



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

**Investigação de vesículas extracelulares em animais submetidos a exercício físico aeróbio
agudo e após injúria traumática cerebral**

Brasília

2016

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA MOLECULAR

GETÚLIO PEREIRA DE OLIVEIRA JÚNIOR

INVESTIGAÇÃO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES EM ANIMAIS SUBMETIDOS
A EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO AGUDO E APÓS INJÚRIA TRAUMÁTICA
CEREBRAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Patologia Molecular da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do Título de Doutor em Patologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Wellerson Pereira

Brasília

2016

Termo de Aprovação

Tese apresentada publicamente como requisito para obtenção do título de Doutor em Patologia Molecular (Genética), defendida em 15 de dezembro de 2016 e aprovada pela banca examinadora constituída por:

Presidente: Prof. Dr. Rinaldo Wellerson Pereira
Universidade Católica de Brasília e Universidade de Brasília

Examinador interno: Prof. Dra. Kelly Grace Magalhaes
Universidade de Brasília

Examinador externo: Prof. Dr. Fabricio Falconi Costa
Universidade Católica de Brasília

Examinador externo: Prof. Dr. Sergio Amorim de Alencar
Universidade Católica de Brasília

Examinador externo: Prof. Dr. Milton Rocha de Moraes
Universidade Católica de Brasília

Suplente: Prof. Dr. Robert Pogue
Universidade Católica de Brasília

Dedico

A todos que me ajudaram em minha formação acadêmica, principalmente meus pais Eloiza e Getúlio, minha diletíssima namorada Nina, meu irmão Felipe e meus professores.

Agradecimentos

Agradeço a cada momento de aprendizado adquirido durante esses 4 anos de doutorado. Em especial a todos os professores do programa de pós-graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília e do programa de pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, que sempre ensinaram com dedicação e maestria.

Aos funcionários e servidores da Universidade de Brasília e do programa de pós-graduação em Patologia Molecular;

Agradeço também ao meu orientador Rinaldo Wellerson Pereira, pela confiança e orientação ao longo desses 4 anos. A todo o pessoal do laboratório, minha aluna de iniciação científica Lydyane, aos colegas Nézio, William, Felipe, Tulio, Breno, Dianny, Tatiana e Clarissa;

Aos pesquisadores Luciano Paulino, Rosana Falcão e Sônia Bão, coordenadores dos laboratórios de microscopia eletrônica e de força atômica da Universidade de Brasília e da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, por ensinarem técnicas muito importantes no desenvolvimento do projeto e por disponibilizarem o uso de seus microscópios;

Ao grupo de pesquisa em educação física da Universidade Católica de Brasília, em especial aos pesquisadores Bernardo Petriz e Jeaser Almeida, pelo exercício dos animais. Ao pesquisador Rafael Texeira Neto, por disponibilizar as amostras utilizadas nesse estudo.

À pesquisadora Xandra O. Breakefield e ao pesquisador Michael J. Whalen, do *Massachusetts General Hospital*, por terem me aceito durante o período de doutorado sanduíche, especialmente ao Michael, por ter sido um exemplo de pesquisador e orientador para minha carreira. A todo o grupo do laboratório de injúria traumática cerebral, em especial, Limin, Nick, Lauren, Sevda, Joon, Jack, Yi;

A todos meus amigos não cientistas, que não entendem como funciona o mundo da ciência mas sempre me incentivaram em minhas pesquisas;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior do Ministério da Educação (CAPES/MEC) pelo fornecimento das bolsas de Doutorado e doutorado sanduíche.

"If you wish to make an apple pie from scratch, you must first invent the universe."

- **Carl Sagan**

Publicações no eixo da tese

Publicados:

GOMES, C. P.; **OLIVEIRA-JR, G. P.**; MADRID, B.; ALMEIDA, J. A.; FRANCO, O. L.; PEREIRA, R. W. Circulating miR-1, miR-133a, and miR-206 levels are increased after a half-marathon run. **Biomarkers**, v. 19, n. 7, p. 585-589, 2014.

PETRIZ, B. A.; GOMES, C. P.; ALMEIDA, J. A.; **DE OLIVEIRA, G. P.**; RIBEIRO, F. M.; PEREIRA, R. W.; FRANCO, O. L. The Effects of Acute and Chronic Exercise on Skeletal Muscle Proteome. **Journal of Cellular Physiology**, v. 232, n. 2, p. 257-269, 2017.

Em preparação:

OLIVEIRA-JR, G.P; PORTO, W.F; PEREIRA, L.M; VIANA, J; FILHO, N.N.A; PETRIZ, B; ALMEIDA, J; FRANCO, O.L; PEREIRA, R.W. **Impact of physical exercise in the population of rat's serum extracellular vesicles small RNAs.**

OLIVEIRA-JR, G.P; PORTO, W.F; PEREIRA, L.M; VIANA, J; REIS, A; MARCOLA, T.G; FRANCO, O.L; TEIXEIRA-NETO, R; PEREIRA, R.W. **Small RNA characterization of extracellular vesicles purified from horse plasma after an endurance riding.**

Sumário

Sumário.....	8
RESUMO	12
ABSTRACT	13
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE FIGURAS	16
1 Apresentação	24
2 Revisão bibliográfica.....	25
2.1 Impacto do exercício na liberação de biomoléculas em fluidos biológicos.....	25
2.2 Injúria traumática cerebral e morte celular por necroptose.....	29
2.3 Vesículas Extracelulares (EVs).....	32
2.3.1 Classificação de VEs	32
2.3.2 Função de VEs na comunicação celular	36
2.3.3 Composição e conteúdo de VEs	39
2.4 Pequenos RNAs não codificadores (ncRNAs).....	43
2.5 microRNAs circulantes em espaço extracelular.....	45
3 Justificativa.....	48
4 Capítulo 1 – Caracterização biofísica de vesículas extracelulares e pequenos RNAs associados a vesículas extracelulares presentes no soro de ratos submetidos a exercício físico agudo aeróbio leve, moderado e intenso.	49
4.1 Objetivos	50
4.1.1 Objetivo geral	50
4.1.2 Objetivos específicos.....	50
4.2 Fluxograma – Capítulo 1	51
4.3 Metodologia	52
4.3.1 Exercício aeróbio agudo dos ratos.....	52
4.3.2 Coleta de soro	53
4.3.3 Purificação de VEs	53
4.3.4 Contagem e concentração de VEs utilizando resistência de pulso.....	54
4.3.5 Microscopia eletrônica de Transmissão	54
4.3.6 Microscopia de Força Atômica.....	55

4.3.7	Espalhamento de luz dinâmica (DLS).....	55
4.3.8	Identificação de proteínas marcadoras	56
4.3.9	Extração de RNA.....	58
4.3.10	Caracterização e quantificação de pequenos RNAs em Bioanalyzer	58
4.3.11	Sequenciamento de pequenos RNAs em Illumina GAII-X.....	59
4.3.12	Análises de bioinformática usando NextGene	59
4.3.13	Análise estatística dos dados	60
4.4	Resultados	61
4.4.1	Exercício aeróbio agudo dos ratos.....	61
4.4.2	Contagem e concentração de VEs utilizando resistência de pulso.....	61
4.4.3	Microscopia eletrônica de VEs.....	62
4.4.4	Microscopia de força atômica de VEs.....	64
4.4.5	Espalhamento de luz dinâmica de VEs.....	66
4.4.6	Quantificação e identificação de proteínas associadas a VEs	66
4.4.7	Extração, quantificação e caracterização de smallRNA purificados de VEs	70
4.4.8	Sequenciamento de pequenos RNAs em Illumina GA-IIX e análise de bioinformática utilizando alinhador BWA e software NEXTGENE® (SoftGenetics)....	72
4.4.9	Análise de miRNAs exógenos.....	85
5	Capítulo 2 – Caracterização biofísica de vesículas extracelulares e pequenos RNAs associados a vesículas extracelulares presentes no plasma de cavalos submetidos a prova de enduro	87
5.1	Objetivos	88
5.1.1	Objetivo geral	88
5.1.2	Objetivos específicos.....	88
5.2	Fluxograma – Capítulo 2.....	89
5.3	Metodologia	90
5.3.1	Coleta do plasma de Cavalos submetidos a prova de enduro.....	90
5.3.2	Purificação de VEs	90
5.3.3	Contagem e concentração de VEs utilizando resistência de pulso.....	91

5.3.4	Microscopia eletrônica	91
5.3.5	Espalhamento de luz dinâmica (DLS)	92
5.3.6	Identificação de proteínas enriquecidas em VEs de plasma de cavalos submetidos a prova de enduro	92
5.3.7	Extração de RNA	93
5.3.8	Caracterização e quantificação de pequenos RNAs em Bioanalyzer	94
5.3.9	Construção de bibliotecas para sequenciamento de small RNAs em MiSeq (Illumina)	94
5.3.10	Sequenciamento de pequenos RNAs em Illumina MiSeq	95
5.3.11	Análises de bioinformática usando alinhamento contra bancos de dados	95
5.3.12	Análise estatística dos dados	95
5.4	Resultados	96
5.4.1	Contagem e concentração de VEs utilizando resistência de pulso	96
5.4.2	Microscopia eletrônica de VEs	97
5.4.3	Espalhamento de luz dinâmica de VEs	98
5.4.4	Identificação de proteínas enriquecidas em VEs de plasma de cavalos submetidos a prova de enduro	100
5.4.5	Extração, quantificação e caracterização de smallRNA purificados de VEs ...	102
5.4.6	Construção de bibliotecas para sequenciamento de small RNAs em MiSeq (Illumina)	104
5.4.7	Sequenciamento de pequenos RNAs em Illumina MiSeq e análise de bioinformática utilizando alinhador BWA e software Nextgene (SoftGenetics)	107
5.5	Discussão capítulos 1 e 2	117
6	Capítulo 3 – O impacto das proteínas RIPK1 e RIPK3 em vesículas extracelulares purificadas do cérebro de camundongos submetidos à injúria traumática cerebral e na morte celular por necroptose em macrófagos derivados da medula óssea (MDMO)	129
6.1	Objetivos	130
6.1.1	Objetivo Geral	130
6.1.2	Objetivos específicos	130

6.2	Fluxograma – Capítulo 3.....	131
6.3	Metodologia	132
6.3.1	Animais.....	132
6.3.2	Contusão e concussão cerebral.....	132
6.3.3	Purificação de vesículas extracelulares	133
6.3.4	Identificação de proteínas por <i>Western blotting</i>	133
6.3.5	Nanoparticle tracking analysis	Erro! Indicador não definido.
6.3.6	Cultura de macrófagos derivados da medula óssea.....	134
6.3.7	Ativação de Necroptose em Macrófagos.....	135
6.3.8	Purificação de VEs de macrófagos.....	135
6.3.9	Tratamento de células neuronais HT-22 com VEs.....	136
6.4	Resultados	136
6.4.1	Purificação e caracterização de VEs do cérebro de camundongos submetidos a contusão e concussão cerebral.....	136
6.4.2	Purificação e caracterização de vesículas extracelulares purificadas de macrófagos em necroptose após 2h.....	139
6.4.3	Purificação e caracterização de vesículas extracelulares purificadas de macrófagos em necroptose após 24h.....	142
6.4.4	Identificação de proteínas associadas a VEs purificadas de macrófagos em necroptose.....	146
6.4.5	Função biológicas de VEs necroptóticas.....	148
6.5	Discussão.....	151
7	Conclusões.....	154
8	Referências Bibliográficas.....	155

RESUMO

As vesículas extracelulares (VEs) são liberadas pelas células e circulam em fluidos biológicos. Elas carregam e entregam proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos que participam da regulação da expressão gênica na célula receptora. Entre os ácidos nucleicos transportados por VEs estão os microRNAs (miRNA). As VEs participam de diferentes estados de saúde e doença, por exemplo, durante uma prática esportiva e injúria traumática cerebral (ITC). O exercício físico é importante componente no tratamento de doenças metabólicas. Já a ITC é uma grande causa de morte no mundo, devido a quedas, acidentes de carros e na prática de esportes como futebol americano e boxe. Este trabalho tem como objetivo caracterizar os miRNAs associados a VEs presentes no soro de ratos e plasma de cavalos submetidos a exercício físico aeróbio agudo. Além disso, tem como objetivo caracterizar VEs após ITC em camundongos e na morte celular por necroptose, um dos componentes da ITC, em macrófagos. Ratos foram exercitados em esteira em intensidades leve, moderada e intensa e cavalos foram submetidos a prova oficial de enduro equestre e amostras de sangue foram coletadas antes da prova, após 66km, após o final da prova (130km), 2h após o final da prova e 15h após o final da prova. A caracterização de VEs foi feita, os pequenos RNAs foram extraídos de VEs e sequenciados. A caracterização biofísica das partículas mostrou aumento na concentração de VEs tanto no soro de ratos exercitados quanto no plasma de cavalos após a prova de enduro. Entre os miRNAs diferencialmente expressos após o exercício em ratos são rno-miR-128-3p, rno-miR-25-3p, rno-miR-148a-3p, rno-miR-191a-5p, rno-miR-22-3p, rno-miR-27a-3p e em cavalos eca-miR-30d, eca-miR-25, eca-miR-30e, eca-miR-423-5p, eca-miR-92a e eca-miR-140-3p. Camundongos foram submetidos à ITC em laboratório e as VEs foram purificadas diretamente do cérebro, quantificadas e a presença de IL-1 β analisadas nessas VEs. A via de morte por necroptose foi ativada em macrófagos derivados da medula óssea (MDMO) após tratamento com LPS+ZVAD e as VEs foram analisadas. A ITC não aumentou a concentração de VEs no cérebro de camundongos mas mostrou um aumento na concentração de IL-1 β em VEs de camundongos lesionados. A morte por necroptose em MDMO induziu um aumento na concentração de VEs, tendo as proteínas RIPK1 e RIPK3 papel na liberação e carregamento proteico de VEs. As VEs purificadas de MDMO necroptóticos podem causar morte celular em linhagem de célula neuronal receptora. Este estudo pode servir como base para outros estudos e também ajudar no entendimento do papel de VEs na atividade física e na ITC.

Palavras-chave: Vesículas extracelulares; microRNAs (miRNA); exercício físico; injúria traumática cerebral (ITC); necroptose.

ABSTRACT

Extracellular vesicles (EVs) are vesicles released by cells and circulates in biological fluids. They carry and delivey proteins, lipids and nucleic acids that regulates gene expression in the recipient cell. Among the nucleic acids transported by extracellular vesicles are microRNAs (miRNA). EVs can contribute in health and disease states, during a sport practice and traumatic brain injury (TBI). Physical exercise is an important factor for metabolic disease treatment, instead, TBI is major cause of death, due mainly to falls, car accidents and sports practice like american football and boxing. This work aims to characterize miRNAs associated with EVs in rat`s serum and plasma horses subjected to acute aerobic exercise. In addition, aims to characterize EVs after TBI in mice and after necroptosis cell death, one component of TBI, in macrophages. Rats were exercised on a treadmill in low, moderate and high intensities and horses were subjected to official equestrian endurance race. Blood samples were collected before the race, after 66km, after the end of the race (130km), 2 hours after the race and 15h after the end of the race. The characterization of EVs was made using resistive pulse sensing, transmission electron microscopy, atomic force microscopy, dynamic light scattering and *western blotting*. Small RNAs were purified from EVs and sequenced. Biophysical characterization showed increase in rat`s serum EVs concentration after exercise and increase in horses`s plasma EVs concentration during the race. Rat`s and horse`s EVs were enriched for exosomes markers (tetraspanins). Between the differentially present rat`s EVs miRNAs were rno-miR-128-3p, rno-miR-25-3p, rno-miR-148a-3p, rno-miR-191a-5p, rno-miR-22-3p, rno-miR-27a-3p and for horse`s EVs eca-miR-30d, eca-miR-25, eca-miR-30e, eca-miR-423-5p, eca-miR-92a and eca-miR-140-3p. EVs were purified from mice brains after receiving TBI. EVs were quantified and IL-1 β was checked in EVs. Necroptosis cell death was activated in bone marrow derived macrophages (BMDM) after treatment with LPS+ZVAD and EVs were purified. TBI didn`t increase EVs concentration in mice brains but increased IL-1 β concentration in EVs from injured mice. Macrophages dying by necroptosis increases EVs release, having RIPK1 and RIPK3 roles in EVs secretion and protein cargo. EVs purified from necroptotics macrophages can induce cell death in neuronal cell lineage. This study is important because it can help in the understanding of EVs roles during a physical exercise and TBI.

Key words: Extracellular vesicles; microRNA (miRNA); physical exercise; traumatic brain injury (ITC); necroptosis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de anticorpos utilizados nos projetos para detecção de proteínas por Western Blotting e Microscopia eletrônica de Transmissão.....	57
Tabela 2. Peso em gramas dos ratos Winstar de linhagem isogênica avaliados no estudo.	61
Tabela 3. Velocidade aplicada em esteira, máximo estado estável de lactato e tempo aplicados durante exercício aeróbio agudo de ratos <i>Winstar</i>	61
Tabela 4. Amostras purificadas de VEs foram analisadas em relação à altura média por microscopia de força atômica.	65
Tabela 5 Amostras purificadas de VEs foram analisadas em relação ao diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta de superfície e condutividade por espalhamento de luz dinâmica.	66
Tabela 6. Resultado do sequenciamento de pequenos RNAs purificados de VEs purificados do soro de ratos exercitados em diferentes intensidades de exercício. Número de <i>reads</i> totais, após filtro de qualidade e alinhamento com banco de dados de microRNAs maduros.	73
Tabela 7. Resultado do sequenciamento de piRNAs purificados de VEs purificados do soro de ratos exercitados em diferentes intensidades de exercício. Número de <i>reads</i> não alinhados contra banco de dados de piRNA, <i>reads</i> mapeados, porcentagem de <i>reads</i> que mapearam e cobertura média dos <i>reads</i>	74
Tabela 8. Resultado do sequenciamento de RNA ribossomal (rRNA) purificados de VEs purificados do soro de ratos exercitados em diferentes intensidades de exercício. Número de <i>reads</i> não mapeados contra banco de dados de rRNA, <i>reads</i> mapeados, porcentagem de <i>reads</i> que mapearam e cobertura média dos <i>reads</i>	75
Tabela 9. Resultado do sequenciamento de tRNA purificados de VEs purificados do soro de ratos exercitados em diferentes intensidades de exercício. Número de <i>reads</i> não mapeados contra banco de dados de tRNA, <i>reads</i> mapeados, porcentagem de <i>reads</i> que mapearam e cobertura média dos <i>reads</i>	76
Tabela 10. Abundancia de miRNAs transportados por VEs no soro de ratos exercitados em diferentes intensidades de exercício aeróbio agudo.	79
Tabela 11. Valores de log2FoldChange e de Padj da contagem de <i>reads</i> dos 6 miRNAs diferencialmente expressos entre os grupos não exercitados e exercitados na intensidade leve.	80
Tabela 12. Valores de log2FoldChange e de Padj da contagem de <i>reads</i> dos 3 miRNAs diferencialmente expressos entre os grupos controle e exercício intenso.	82

Tabela 13. Valores de log2FoldChange e de Padj da contagem de <i>reads</i> do piRNA diferencialmente expressos entre os grupos controle e exercício intenso.	85
Tabela 14. Valores de diâmetro de VEs e concentração medidos por resistência de pulso para os grupos T0, T1, T2, T3 e T4.....	97
Tabela 15. Amostras purificadas de VEs foram analisadas em relação ao diâmetro médio e índice de polidispersão por espalhamento de luz dinâmica.....	99
Tabela 16. Resultado do sequenciamento de pequenos RNAs purificados de VEs purificados do plasma de cavalos submetidos a prova de enduro. Número de <i>reads</i> totais, após filtro de qualidade e alinhamento com banco de dados de microRNAs maduros.....	108
Tabela 17. Resultado do sequenciamento de pequenos RNAs purificados de VEs purificados do plasma de cavalos submetidos a prova de enduro. Número de <i>reads</i> totais, após filtro de qualidade e alinhamento com banco de dados de rRNA.	110
Tabela 18. Resultado do sequenciamento de pequenos RNAs purificados de VEs purificados do plasma de cavalos submetidos a prova de enduro. Número de <i>reads</i> totais, após filtro de qualidade e alinhamento com banco de dados de snRNA.....	112
Tabela 19. Quantidade de miRNAs maduros identificados pelo <i>software</i> NextGene com pelo menos 1 <i>read</i> por amostra.	114
Tabela 20. Valores de log2FoldChange e de Padj da contagem de <i>reads</i> dos 6 miRNAs diferencialmente expressos entre os grupos T0 e T4.....	116
Tabela 21. Lista de proteínas purificadas de VEs derivadas de Macrófagos WT, D138N e RIP3-\- tratados com LPS+ZVAD por 24h.....	147

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema representando as principais vias de sinalização envolvidas no controle da hipertrofia do músculo esquelético e da biogênese mitocondrial. Múltiplos sinais primários, incluindo o estiramento mecânico, cálcio, pH, estado redox, hipóxia e status de energia muscular, são alteradas pelo exercício dinâmico voluntário. Após o início de um ou mais destes sinais primários, proteínas quinases/fosfatases são ativadas para mediar um sinal específico induzido pelo exercício. Em células de mamíferos, existem muitas cascatas de sinalização. Essas vias são reguladas em vários locais, com substancial *crossstalk* entre caminhos que produzem uma rede de transdução de sinal altamente sensível e complexa (HAWLEY et al., 2014).....27
- Figura 2.** Representação esquemática da via de sinalização de necroptose mediada por TNF α . Após a ligação do receptor TNFR, a proteína TRADD é recrutada e forma um complexo com RIPK1. Após a absorção de TNFR, o complexo é dissociado e a proteína caspase-8 é ativada para mediar apoptose. Em condições onde caspase-8 está inibida, RIPK1 interage fisicamente com RIPK3 formando o complexo necrossomático. O complexo necrossomático fosforila a proteína efetora de necroptose MLKL, que se direciona até a membrana plasmática causando o seu rompimento (CHO, Y. S., 2014).31
- Figura 3.** Representação esquemática de diferentes tipos de VEs. As populações principais incluem exossomas, microvesículas e corpos apoptóticos. Adaptado de GYORGY et al. (2011).33
- Figura 4.** Representação esquemática dos diferentes tipos de vesículas secretados por células eucarióticas, tanto por brotamento direto da membrana plasmática (microvesículas) ou por fusão dos corpos multivesiculares com a membrana plasmática (exossomas). Adaptado de COLOMBO et al. (2014).....34
- Figura 5.** Composição global de vesículas extracelulares (VEs). Representação esquemática da composição e orientação da membrana de VEs: famílias de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Adaptado de COLOMBO et al. (2014).42
- Figura 6.** Mecanismo de biogênese de miRNA. m7G, 7-metilguanósina. Adaptado de VAN ROOIJ; OLSON (2012).....45
- Figura 7.** Mecanismos celulares de liberação e sistemas de transporte extracelular de miRNAs. Adaptado de CREEMERS et al. (2012).47
- Figura 8.** Fluxograma indicando o passo-a-passo do capítulo intitulado: Caracterização biofísica de vesículas extracelulares e pequenos RNAs associados a vesículas extracelulares

presentes no soro de ratos submetidos a exercício físico agudo aeróbio leve, moderado e intenso.	51
Figura 9. Fluxograma representando a metodologia empregada no exercício aeróbio agudo dos ratos.	53
Figura 10. Concentração de VEs por mL de soro em animais não exercitados e exercitados nas intensidades leve, moderada e intensa.	62
Figura 11. Micrografias eletrônicas de purificado de VEs de soro de ratos mostrando a presença de partículas com morfologia e tamanho compatíveis com Exossomas (A) e (B) e mostrando o controle negativo em (C) e (D). Barra de escala = 500nm. As setas vermelhas indicam as vesículas extracelulares.	63
Figura 12. Micrografias eletrônicas de purificado de VEs de soro de ratos mostrando a presença de partículas com morfologia e tamanho compatíveis com Exossomas e a presença de partículas de ouro representando indiretamente a presença de proteínas CD63 (A) e CD09 (C). As setas vermelhas indicam vesículas positivas para marcação, já as setas amarelas sinalizam vesículas não marcadas. As amostras B e D (controles negativos) foram preparadas substituindo as VEs por PBS1X e incubando com os anticorpos anti-CD63 (B) e CD09 (D).	64
Figura 13. Imagem de topografia de VEs purificadas do soro de ratos exercitados em diferentes intensidades. (A) Pool de VEs do grupo controle (não exercitado) diluídas 1:10. (B) Pool de VEs do grupo exercitado na intensidade leve diluída 1:100. (C) Pool de VEs do grupo exercitado na intensidade moderada diluída 1:100 e (D) pool de VEs do grupo exercitado na intensidade intensa diluída 1:100.	65
Figura 14. Quantificação de proteínas totais purificadas de VEs do soro de ratos não exercitados, exercitados nas intensidades leve, moderada e intensa.	67
Figura 15. Perfil de proteínas totais separadas por eletroforese de proteína em gel de acrilamida 12%. As proteínas foram extraídas de VEs purificadas do soro de ratos exercitados em diferentes intensidades. STD = Marcador Bio-rad <i>Broad-Range</i> ; NE = grupo não exercitado (controle).	68
Figura 16. Identificação de proteínas enriquecidas em VEs por <i>western blotting</i> . Foram identificadas proteínas marcadoras de vesículas secretadas pelo retículo endoplasmático (Calnexina) e proteínas marcadoras de vesículas secretadas pela via endossomal (CD63 e CD81). NE = grupo não exercitado (controle); L = grupo exercitado na intensidade leve; M = grupo exercitado na intensidade moderada; I = grupo exercitado na alta intensidade.	69

Figura 17. Identificação de ApoA-IV em VEs por <i>western blotting</i> . NE = grupo não exercitado (controle); L = grupo exercitado na intensidade leve; M = grupo exercitado na intensidade moderada; I = grupo exercitado na alta intensidade.	70
Figura 18. Caracterização das 19 amostras de pequenos RNAs extraídos de ratos exercitados em diferentes intensidades utilizando <i>Chip RNA pico 6000</i> . C1 a C4 representam os indivíduos do grupo controle (não exercitado). L1 a L5 representam os indivíduos do grupo treinado na intensidade leve. M1 a M5 representam os indivíduos do grupo treinado na intensidade moderada. H1 a H5 representam os indivíduos do grupo treinado na intensidade intensa.	71
Figura 19. Caracterização das 19 amostras de pequenos RNAs extraídos de ratos exercitados em diferentes intensidades utilizando <i>Chip small RNA</i> . C1 a C4 representa o grupo controle (não exercitado). L1 a L5 representa o grupo treinado na intensidade leve. M1 a M5 representa o grupo treinado na intensidade moderada. H1 a H5 representa o grupo treinado na intensidade intensa.	71
Figura 20. Quantificação de 18 amostras de pequenos RNAs de VEs purificadas do soro de ratos exercitados em diferentes intensidades utilizando <i>Bioanalyzer small RNA Chip</i> . Não houve diferença estatística entre os grupos não exercitados e exercitados nas intensidades leve, moderado e intensa ($p > 0,05$).	72
Figura 21. Porcentagem de <i>reads</i> mapeados após o sequenciamento de pequenos RNAs de VEs purificadas do soro de ratos exercitados em diferentes intensidades de exercício. A primeira coluna retrata o perfil geral da porcentagem de <i>reads</i> , enquanto a segunda coluna representa apenas os <i>reads</i> conhecidos.	78
Figura 22. MicroRNAs diferencialmente expressos em VEs de ratos não exercitados com ratos exercitados na intensidade leve após análise de sequenciamento de nova geração pelo pacote estatístico Deseq2. Os pontos vermelhos representam significância estatística de $P_{adj} < 0.1$. As setas vermelhas indicam os miRNAs diferencialmente expressos.	80
Figura 23. MicroRNAs diferencialmente expressos em VEs de ratos não exercitados com ratos exercitados na intensidade moderada após análise de sequenciamento de nova geração pelo pacote estatístico Deseq2. Os pontos vermelhos representam significância estatística de $P_{adj} < 0.1$	81
Figura 24. MicroRNAs diferencialmente expressos em VEs de ratos não exercitados com ratos exercitados na intensidade intensa após análise de sequenciamento de nova geração pelo pacote estatístico Deseq2. Os pontos vermelhos representam significância estatística de $P_{adj} < 0.1$. As setas vermelhas indicam os miRNAs diferencialmente expressos.	82

Figura 25. PiRNAs diferencialmente expressos em VEs de ratos não exercitados comparados com ratos exercitados nas intensidades leve (A), moderada (B) e intensa (C) após análise de sequenciamento de nova geração pelo pacote estatístico Deseq2. Os pontos vermelhos representam significância estatística de $P_{adj} < 0.1$. O eixo X representa a média do número de reads para um determinado piRNA e o eixo Y representa a diferença na presença ou ausência em \log_2 . Cada ponto é considerado um piRNA. A seta vermelha indica o piRNA diferencialmente expresso.	85
Figura 26. Alinhamento de reads que não mapearam contra miRNAs maduros de <i>rattus norvegicus</i> contra o banco de dados de miRNAs maduros de todas as espécies disponíveis no miRBase. Percebe-se um grande número de reads dos miRNAs cin-miR-4011a-5p, mmu-miR-2137 e hsa-miR-4532.	86
Figura 27. Fluxograma indicando o passo-a-passo do capítulo intitulado: Caracterização biofísica de vesículas extracelulares e pequenos RNAs associados a vesículas extracelulares presentes no plasma de cavalos submetidos a prova de enduro.	89
Figura 28. Diâmetro e porcentagem da população de VEs purificadas do plasma de cavalos submetidos a prova de enduro. Repouso (T0), durante a prova após completarem 66km (T1), logo após completarem o fim prova (T2), 2 horas após a prova (T3) e 15 horas após o final do esforço, no dia seguinte (T4).	96
Figura 29. Micrografias eletrônicas de purificado de VEs de plasma de cavalos submetidos a prova de enduro. Figuras A e C mostram a presença de partículas com morfologia e tamanho compatíveis com Exossomas e a presença de partículas de ouro representando indiretamente a presença de proteínas CD63 (A) e CD09 (C). As amostras B e D (controles negativos) foram preparadas substituindo as VEs por PBS1X e incubando com os anticorpos anti-CD63 (B) e CD09 (D).	98
Figura 30. Distribuição do tamanho de VEs purificadas de plasma de cavalos submetidos a prova de enduro analisadas por espalhamento de luz dinâmica. (A) Repouso, (B) durante a prova após completarem 66km, (C) logo após completarem o fim prova, (D) 2 horas após a prova e (E) 15 horas após o final do esforço, no dia seguinte.	99
Figura 31. Perfil de proteínas totais separadas por eletroforese de proteína em gel de acrilamida 12%. As proteínas foram extraídas de VEs purificadas do soro de ratos exercitados em diferentes intensidades. M = Marcador Bio-rad <i>Broad-Range</i> ; (T0) Repouso, (T1) durante a prova após completarem 66km, (T2) logo após completarem o fim prova, (T3) 2 horas após a prova e (T4) 15 horas após o final do esforço, no dia seguinte; CP = controle positivo (proteínas extraídas de células C2C12); CN = controle negativo (PBS1X).	100

Figura 32. Identificação de proteínas marcadoras de vesículas secretadas pelo retículo endoplasmático (Calnexina) e proteínas marcadoras de vesículas secretadas pela via endossomal (TSG101). A análise quantitativa das bandas mostra presença de calnexina apenas no controle positivo e aumento da proteína TSG101 em T1, T3 e T4.	101
Figura 33. Identificação de proteínas marcadoras de vesículas secretadas pela via endossomal (Flotillin-1, CD81 e CD9). A análise quantitativa das bandas mostra um aumento destas proteínas em T3.	102
Figura 34. Caracterização das 24 amostras de pequenos RNAs extraídos de cavalos submetidos a prova de enduro utilizando <i>Chip small RNA</i> . As amostras 1T0 a 5T0 representam 5 amostras do ponto T0; As amostras 1T1 a 5T1 representam a coleta dos animais após 66km da prova; as amostras 1T2 até 5T2 representam o tempo T2. As amostras 1T3 até 5T3 representam o ponto T3; e as amostras 1T4 até 5T4 representam o último ponto de coleta T4.	103
Figura 35. Quantificação de 24 amostras de pequenos RNAs extraídos de ratos exercitados em diferentes intensidades utilizando <i>Chip small RNA</i> . As amostras 1T0 a 5T0 representam 5 amostras do ponto T0; As amostras 1T1 a 5T1 representam a coleta dos animais após 66km da prova; as amostras 1T2 até 5T2 representam o tempo T2. As amostras 1T3 até 5T3 representam o ponto T3; e as amostras 1T4 até 5T4 representam o último ponto de coleta T4.	104
Figura 36. Resultado da ligação dos adaptadores, transcrição reversa e amplificação em duas amostras (3T3 e 4T3) de pequenos RNAs de VEs de plasma de cavalos submetidos a prova de enduro. Em detalhe os tamanhos de interesse para separação em gel de acrilamida.	105
Figura 37. Gel de acrilamida 6% referente a separação dos fragmentos de cDNA em gel de acrilamida gerados pela ligação do RNA extraído ligados com adaptadores 3', 5', e amplificados para duas amostras A1 e A2 (A). Os fragmentos de interesse (setas amarelas) referente ao tamanho de miRNA e piRNA foram removidos do gel (retângulos vermelhos) e eluídos para o sequenciamento (B).	106
Figura 38. Caracterização do cDNA após a separação em gel de acrilamida 6% para 11 bibliotecas construídas. Fragmentos de tamanho entre 100 e 150pb foram enriquecidos como destacado em vermelho.	107
Figura 39. Heatmap mostrando os dados dos 30 miRNAs maduros mais abundantes em VEs purificadas de plasma de cavalos em repouso (T0), durante a prova após completarem 66km (T1), logo após completarem o fim prova (T2), 2 horas após a prova (T3) e 15 horas após o final do esforço, no dia seguinte (T4). Os valores utilizados levam em conta reads crus.	110
Figura 40. Porcentagem de <i>reads</i> que mapearam com banco de dados de miRNA, rRNA e snRNA para <i>Equus caballus</i>	114

Figura 41. MicroRNAs diferencialmente expressos em VEs de cavalos submetidos a prova de enduro após análise de sequenciamento de nova geração pelo pacote estatístico Deseq2. (A) comparação entre os grupos T0 e T1. (B) comparação entre os grupos T0 e T2. (C) comparação entre os grupos T0 e T3. (D) comparação entre os grupos T0 e T4. Os pontos vermelhos representam significância estatística de $P_{adj} < 0.1$. O eixo X representa a média do número de <i>reads</i> para um determinado miRNA e o eixo Y representa a diferença na presença ou ausência em log2. Cada ponto é considerado um miRNA. Setas vermelhas indicam os três miRNAs diferencialmente expressos.....	116
Figura 42. Fluxograma representando as etapas executadas no capítulo intitulado: O impacto das proteínas RIPK1 e RIPK3 em VEs purificadas do cérebro de camundongos submetidos à injúria traumática cerebral e na morte celular por necroptose em macrófagos derivados da medula óssea (MDMO).	131
Figura 43. Western blotting para identificação da proteína marcadora de VEs, Alix, em 12 frações de gradiente de sacarose de purificado de VEs do cérebro de camundongos submetidos a contusão (CCI) e concussão (CHI) cerebral.	137
Figura 44. VEs purificadas do cérebro de camundongos WT, D138N e RIP3 ^{KO} após contusão cerebral (CCI) foram quantificadas por nanoparticle tracking analysis. Cada ponto representa VEs purificadas de um animal.....	137
Figura 45. VEs purificadas do cérebro de camundongos WT, D138N e RIP3KO após contusão cerebral (CCI) foram medidas em relação ao diâmetro modal por nanoparticle tracking analysis. Cada ponto representa VEs purificadas de um animal.	138
Figura 46. Western blotting para identificação da proteína madura IL-1 β em VEs purificadas do cérebro de camundongos WT, D138N e RIP3KO submetidos a contusão cerebral (CCI). Duas réplicas biológicas foram utilizadas nesse experimento.....	138
Figura 47. Western blotting para identificação da proteína precursora IL-1 β em VEs purificadas do cérebro de camundongos WT submetidos a concussão cerebral (CHI). Quatro réplicas biológicas foram utilizadas nesse experimento.....	139
Figura 48. Caracterização da via de necroptose em macrófagos. Macrófagos derivados da medula óssea foram tratados com LPS+ZVAD por 2h e as células mortas coradas com Iodeto de Propídio (PI) (acima). Após duas horas de tratamento o número de macrófagos mortos foi significativamente maior do que os controles (esquerda). Western blotting indicando a presença da proteína efetora de necroptose, p-Mkl1, apenas nas células tratadas com LPS+ZVAD, não estando presente na presença do inibidor químico da proteína RIPK1, Necrostatin-1 (NEC1) (direita).	140

Figura 49. Caracterização de VEs purificadas de macrófagos derivadas da medula óssea após 2h de tratamento. Concentração de partículas por mL (esquerda) e distribuição do diâmetro modal (direita) de VEs purificadas de macrófagos derivadas da medula óssea de camundongos WT tratados com ativadores da via de necroptose por 2h.....	141
Figura 50. Western blotting para identificação da Interleucina pró-inflamatória IL-1 β em Macrófagos necroptóticos e VEs purificadas dessas células. A proteína marcadora CD63 é enriquecida nas VEs das células tratadas com LPS, LPS+ZVAD e LPS+ZVAD+NEC1, enquanto a IL-1 β é enriquecida em VEs purificadas de macrófagos tratados com LPS+ZVAD.	142
Figura 51. Caracterização da via de necroptose em macrófagos WT, D138N e RIP3 $^{-/-}$ após 24h. Macrófagos derivados da medula óssea foram tratados com LPS+ZVAD por 24h e as células mortas coradas com Iodeto de Propídio (PI) (acima). Após 24 horas de tratamento os Macrófagos RIP3 $^{-/-}$ foram altamente tolerantes à morte celular causada por necroptose, enquanto os Macrófagos WT e D138N foram completamente mortos após 24h do tratamento com LPS+ZVAD (esquerda). Western blotting indicando a presença da proteína efetora de necroptose, p-Mkl1, tanto nas células WT quanto D138N tratadas com LPS+ZVAD, entretanto, as células RIP3 $^{-/-}$ não expressaram a proteína p-Mkl1.....	143
Figura 52. Caracterização de VEs purificadas de macrófagos WT, D138N e RIP3KO derivadas da medula óssea após 24h de tratamento. A concentração de partículas por mL (esquerda) e distribuição do diâmetro modal (direita) foram medidos por nanoparticle tracking analysis. A concentração de VEs foi estatisticamente maior em células WT tratadas com LPS+ZVAD comparadas com células D138N e RIP3KO. Não houve diferença estatística entre o diâmetro modal nos grupos.	144
Figura 53. Perfil total de proteínas purificadas de VEs derivadas de Macrófagos WT, D138N e RIP3 $^{-/-}$. Proteínas de VEs foram extraídas, separadas em gel SDS-PAGE 12% e coradas com prata para análise do perfil total de proteínas presentes em VEs.	145
Figura 54. Western blotting para identificar a Interleucina pró-inflamatória IL-1 β em VEs purificadas de macrófagos WT, D138N e RIP3 $^{-/-}$ após tratamento com LPS+ZVAD.....	145
Figura 55. Western blotting para estabelecer uma relação entre IL-1 β e VEs. As proteínas IL-1 β e CD63 foram identificadas após purificação de VEs por gradiente de sacarose. Nota-se que essas duas proteínas compartilham as frações 9 e 10 do gradiente, sugerindo que estão sendo transportadas juntas em VEs.....	146

Figura 56. Vias metabólicas identificadas por gene ontology das 20 proteínas mais abundantes presentes em VEs de macrófagos necroptóticos WT (esquerda), D138N (centro) e RIP3-/- (direita).	148
Figura 57. Linhagem de células neuronais HT22 tratadas com VEs purificados de macrófagos WT tratados com LPS+ZVAD e seus controles. O tratamento com VEs de macrófagos necroptóticos foi o que mais causou morte celular em células HT22.	149
Figura 58. Western blotting mostrando a presença de LPS em VEs purificadas de macrófagos tratados com LPS+ZVAD e a ausência de LPS em células de macrófagos e no sobrenadante do purificado de VEs.	150

1 Apresentação

O presente documento tem como foco a investigação de vesículas extracelulares (VEs) e pequenos RNAs associados a essas VEs em modelos animais submetidos a exercício aeróbio agudo e injúria traumática cerebral (ITC). O documento foi dividido em três capítulos.

O primeiro capítulo trata da caracterização biofísica de VEs presentes no soro de ratos submetidos a diferentes intensidades de exercício aeróbio em esteira. Este capítulo também tem como objetivo caracterizar a população de pequenos RNAs associados a essas vesículas.

Já o segundo capítulo trata da caracterização biofísica de VEs presentes no plasma de cavalos durante uma prova de enduro assim como a caracterização da população de pequenos RNAs associados a essas vesículas. No primeiro capítulo foi investigado o papel do exercício físico agudo leve, moderado e intenso na população de pequenos RNAs circulantes em VEs no soro de ratos. No segundo capítulo foi investigado o impacto de uma prova de enduro equestre na população de pequenos RNAs circulantes em VEs no plasma de cavalos de corrida. As metodologias utilizadas nos dois capítulos são basicamente as mesmas, envolvendo a utilização de técnicas de microscopia, de resistência de pulso, de espalhamento de luz dinâmica, de identificação de proteínas de membranas, extração, caracterização e sequenciamento de pequenos RNAs. Os projetos diferem-se principalmente em relação ao tipo de fluido biológico utilizado, soro no primeiro capítulo e plasma no segundo, ao modelo animal utilizado, ratos no primeiro capítulo e cavalos no segundo, e em relação ao tipo de exercício e pontos de coleta.

Já o terceiro capítulo foi feito durante período de doutorado sanduíche no *Massachusetts General Hospital*. Esse capítulo tem como objetivo investigar as VEs após injúria traumática cerebral (contusão e concussão) no cérebro de camundongos, assim como estudar o impacto das proteínas efetoras de necroptose RIPK1 e RIPK3 na liberação e composição proteica de VEs liberadas por macrófagos derivados da medula óssea (MDMO).

Os três capítulos são importantes por ainda serem escassas na literatura as descrições de funções biológicas de VEs após o exercício físico e ITC, o que torna componente importante no entendimento e tratamento de várias doenças.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Impacto do exercício na liberação de biomoléculas em fluidos biológicos

O aumento do exercício está diretamente relacionado com melhorias para a saúde, como por exemplo na redução no risco de doença cardiovasculares (LEON et al., 1987). 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 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; HOLLOSZY, 2009).

A diminuição da ocorrência de doenças em decorrência do exercício pode ser explicada por todo o conjunto de citocinas inflamatórias liberadas em fluidos biológicos por diferentes tecidos em resposta a atividade física. Por exemplo, a corrida de longa distância induz o aumento na liberação de uma cascata de citocinas, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), o antagonista receptor de IL-1, receptores de TNF e interleucina 10 (IL-10) (SPRENGER et al., 1992).

Outras melhorias causadas pela atividade física que podem ajudar na redução no risco de doenças cardiovasculares é a melhoria no perfil de lipoproteínas no plasma em decorrência de atividades físicas moderadas e intensas. Foi demonstrado que o exercício intenso aumenta os níveis de HDL no plasma (KRAUS et al., 2002).

Recentemente, vem sendo estudado o impacto do exercício na população de miRNAs circulantes em soro e plasma depois de diferentes tipos de exercício (BAGGISH, AARON L et al., 2011; GOMES et al., 2014; NIELSEN, SØREN et al., 2014). Porém, os estudos de miRNAs circulantes em fluidos biológicos tem como principal objetivo a identificação de biomarcadores para lesão muscular e altos níveis de consumo de oxigênio (AOI et al., 2013).

É considerado um consenso de que os miRNAs desempenham um papel importante no desenvolvimento muscular em resposta ao estresse causado pela atividade física (NIELSEN, S. et al., 2010), fato que miRNAs específicos presentes em músculo esquelético e cardíaco já foram descritos (MCCARTHY, J.J., 2008). 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). Para uma abordagem complementar, tem sido analisada a expressão diferencial de miRNAs (BRADBURY, 2003).

Entre os mecanismos moleculares já conhecidos envolvidos no exercício aeróbio, exercício 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, pode-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 coativadores transcricionais, alteram a transcrição sem se ligarem diretamente ao DNA. O coativador *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR γ) da família de proteínas (PGC) foi identificada como a família central dos coativadores transcricionais envolvidos na indução de biogênese mitocondrial (BAAR, 2004; JOSEPH et al., 2006).

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

A biogênese mitocondrial é regulada em nível transcricional e pós-transcricional da expressão gênica onde PGC-1 α é um importante coativador de genes nucleares que codificam proteínas mitocondriais, enquanto que o fator de transcrição mitocondrial A (Tfam) regula a expressão de DNA 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).

Outras vias de sinalização importantes incluem a via das Quinases dependentes de calmodulina Ca²⁺ (CaMK), calcineurina, proteína quinase ativada por AMP (AMPK), proteínas quinases ativadas por mitógenos (ERK1/2, p38 MAPK), e a proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR). Os alvos destas vias de sinalização incluem muitos fatores de transcrição, coativadores, e repressores (HAWLEY et al., 2014).

AMPK e p38 MAPK participam de duas cascatas de sinalização importantes que convergem para a regulação do PGC-1 α e consequentemente a regulação da biogênese mitocondrial. AMPK induz biogênese mitocondrial, em parte, pela fosforilação e ativação direta de PGC-1 α mas também pela fosforilação do repressor transcricional HDAC5, que

diminui a inibição do fator de transcrição potencializador do miócito fator 2 (MEF2), um regulador conhecido de PGC-1 α . A ativação de MEF2 está associada com aumento da capacidade oxidativa muscular e da corrida de endurance. P38 MAPK fosforila e ativa PGC-1 α e também aumenta a expressão de PGC-1 α pela fosforilação do fator de transcrição ATF-2 que por sua vez aumenta a abundância de proteína PGC-1 α pela ligação e ativação no sítio de CREB dentro do promotor de PGC-1 α . A proteína supressora de tumores p53, ativada por AMPK e/ou p38 MAPK, está emergindo como outro fator de transcrição envolvido na indução da biogênese mitocondrial induzida pelo exercício no músculo esquelético (**Figura 1**) (HAWLEY et al., 2014).

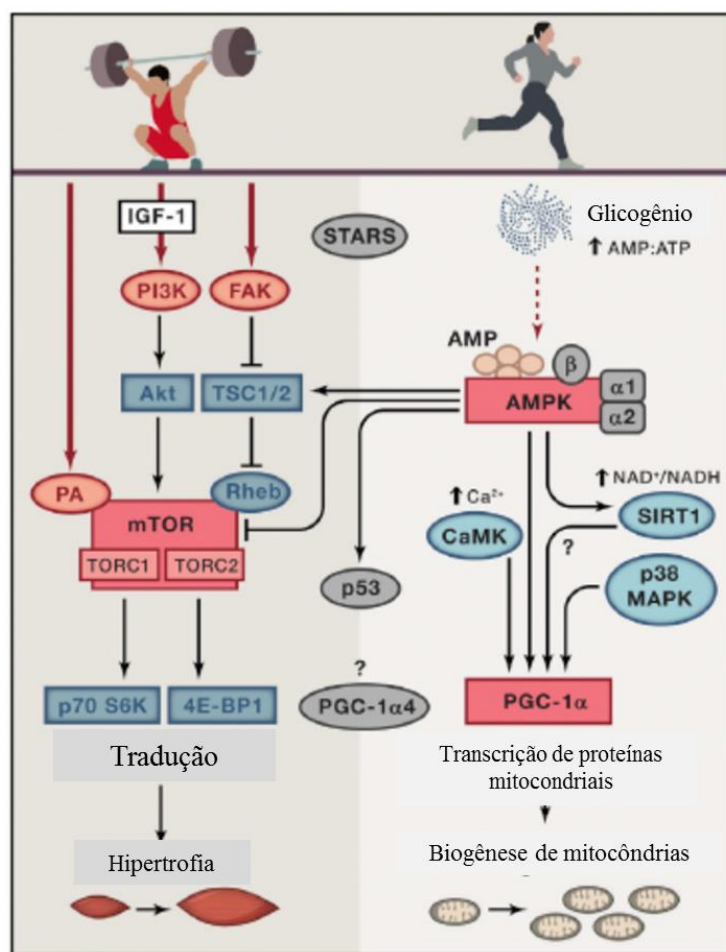


Figura 1. Esquema representando as principais vias de sinalização envolvidas no controle da hipertrofia do músculo esquelético e da biogênese mitocondrial. Múltiplos sinais primários, incluindo o estiramento mecânico, cálcio, pH, estado redox, hipóxia e status de energia muscular, são alteradas pelo exercício dinâmico voluntário. Após o início de um ou mais destes sinais primários, proteínas quinases/fosfatases são ativadas para mediar um sinal específico induzido pelo exercício. Em células de mamíferos, existem muitas cascatas de sinalização. Essas vias são reguladas em vários locais, com substancial troca de informações

entre caminhos que produzem uma rede de transdução de sinal altamente sensível e complexa. Adaptado de (HAWLEY et al., 2014).

Cada uma das centenas de miRNAs conhecidos pode regular vários mRNAs alvos, tornando este processo um dos mais complexos reguladores gênicos. É conhecida a importância da regulação de miRNA em adaptações ao exercício no músculo esquelético, entre eles miR-1 e miR-133 (CHEN, J. F. et al., 2006) e miR-206 (CHEN, J. F. et al., 2010), mostrando uma área fértil de investigação. Por exemplo, miRNAs foram encontrados envolvidos na resposta ao treinamento e destreinamento ao exercício aeróbico em seres humanos e à sobrecarga funcional e exercícios de resistência em camundongos (ROTH, 2011).

Em uma revisão importante em 2016 Safdar e colaboradores sugerem que vesículas extracelulares podem contribuir para a entrega de “exerquinas”, que seriam a soma total de todos os fatores humorais gerados pelo exercício (peptídeos e miRNAs) que são expressos, produzidos e secretados por todos os tecidos e órgãos (exercitados ou não exercitados) na circulação. Essas exerquinas poderiam promover a comunicação entre órgãos e potencializar os benefícios sistêmicos do exercício (SAFDAR; SALEEM; TARNOPOLSKY, 2016).

Entre os modelos animais utilizados na fisiologia do exercício, estão ratos e camundongos submetidos a experimentos em esteiras ou piscinas e também cavalos submetidos a provas de enduro equestre.

A corrida de enduro é um esporte equestre baseada em corridas de longa distância controladas. Desde 1950, a corrida de resistência tem sido um esporte competitivo e que tem sido aprovada como uma das competições internacionais reconhecidas pela FEI (Federação Equestre Internacional) desde 1982. A maior parte das raças foram testadas e utilizadas para corridas de enduro. As raças mais competitivas são a árabe ou árabes-Cruzes (Anglo-Árabe) devido à sua composição de fibras musculares (FAISAL; MOHD ADZAHAN; GOH, 2012).

O esforço aeróbico prolongado produzido pela prova de enduro pode criar distúrbios hidroeletrólíticos potencialmente levando a problemas metabólicos, por isso, os veterinários presentes em provas de resistência têm de prestar cuidados de emergência. Os problemas mais comuns geralmente incluem a síndrome do cavalo exausto, miopatias, insolação e laminite (ROBERT, 2009). Os radicais livres produzidos durante o exercício são também responsáveis pelos processos adaptativos de sistemas antioxidantes. Cavalos de enduro competindo em corridas de resistência livre de velocidade são normalmente submetidos a meses ou mesmo anos de formação, o que resulta em aumento de defesas antioxidantes e evita que os animais

enfrentem consequências de estresse oxidativo, mesmo quando a intensidade e distância da corrida são muito extenuantes (SIQUEIRA et al., 2014).

2.2 Injúria traumática cerebral e morte celular por necroptose

A injúria traumática cerebral (ITC) ocorre quando uma injúria externa acomete a região cerebral. A ITC pode ser classificada de acordo com a seriedade (leve ou severa), mecanismo ou localização. A principal divisão ocorre em relação ao mecanismo, que pode ser penetrante (contusão) ou fechada (concussão) (GHAJAR, 2000).

A ITC do tipo penetrante (contusão) ocorre quando o cérebro se move dentro do crânio de uma forma suficiente para se chocar contra ele, causando um edema no parênquima cerebral (hemorragia e edema) (TABER; WARDEN; HURLEY, 2006).

A concussão é definida como uma injúria no cérebro causada por um golpe direto na cabeça, no rosto, na nuca ou em qualquer parte do corpo que resulte em uma força expressiva na cabeça. Normalmente a concussão resulta de uma rápida perda de consciência. Além disso, não resulta de perda estrutural de tecido cerebral como na contusão (MCCRORY et al., 2013).

A concussão é também classificada como ITC leve e representa 70 a 90% dos casos de ITC. Ela é de difícil diagnóstico, frequentemente subjetivo, problema atenuado em crianças, pois apresentam dificuldades em reconhecer e definir os sintomas da concussão (SHAN et al., 2016). A concussão está fortemente associada com o transtorno de estresse pós-traumático (PTSD) e problemas de saúde em soldados americanos após retornarem da guerra no Iraque em 2006. Essas concussões ocorrem devido à explosões causadas por bombas e no combate direto (HOGE et al., 2008).

Outro ponto importante sobre a concussão que vem chamando atenção nos últimos anos é sua relação com o esporte de contato físico, principalmente no futebol americano (GUSKIEWICZ et al., 2003) e no boxe (VIANO et al., 2005). As repetitivas concussões nesses esportes podem resultar em mau funcionamento crônico do sistema motor (DE BEAUMONT et al., 2007) e doenças neurodegenerativas como a encefalopatia traumática crônica, causada em parte por traumas repetitivos no cérebro (BAUGH et al., 2012).

A ITC é um importante problema de saúde pública no mundo. Por exemplo, nos Estados Unidos, no ano de 2005, estimou-se que 5,3 milhões de pessoas viviam com deficiências relacionadas à ITC e enfrentaram inúmeros desafios em seus esforços para retornar a uma vida

plena e produtiva (LANGLOIS; RUTLAND-BROWN; WALD, 2006). No Brasil, as principais causas de ITC são tiros com armas de fogo e acidentes de carros (MARTINS et al., 2009).

As principais características relacionadas a ITC incluem hematoma, dilaceramento de tecidos, sangramento e danos físicos ao cérebro resultantes de complicações de longo prazo e morte. Eventos secundários sérios também podem ocorrer, como estresse oxidativo, edema maciço, e alterações nos mecanismos neurotransmissores endógenos (HERNANDEZ-ONTIVEROS et al., 2015).

A morte celular causada pela ITC envolve principalmente a morte neuronal das células da glia e lesão axonal traumática, tanto em humanos como em animais. Essas lesões fazem com que as células em estado terminal exibam uma morfologia apoptótica ou necrótica. Neurônios apoptóticos e necróticos foram identificados após contusões agudas em regiões remotas do local do impacto nos dias e semanas após o trauma, enquanto oligodendrócitos degenerados e astrócitos foram observados dentro da substância branca cerebral lesionada (RAGHUPATHI, 2004).

No ano de 2005, foi descrito um novo modelo de morte celular programada, independente das proteínas caspases, chamado de necroptose. A necroptose, diferentemente da apoptose, é caracterizada pela morfologia necrótica das células mortas e pela ativação da autofagia. Essa morte celular programada contribui em lesões cerebrais isquêmicas de camundongos e pode ser revertida com a utilização do inibidor químico *Necrostatin-1* (NEC-1) (DEGTEREV et al., 2005). Já em 2008 foi demonstrado que o tratamento de camundongos com NEC-1 antes e após experimentos de impacto cortical controlado (CCI) diminuiu o número de células mortas no córtex e no giro denteado, diminuindo o dano no tecido cerebral e melhorando a performance motora (YOU et al., 2008). Também em 2008 foi demonstrado que NEC-1 bloqueia a necroptose pela inibição seletiva da proteína *Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase* (RIPK1) (DEGTEREV et al., 2008). Além da ativação da proteína RIPK1, a proteína RIPK3 também é essencial para a ativação da via de necroptose (CHO, Y. et al., 2009). Portanto, após a célula receber um estímulo externo, seja por TNF ou IFN α , quando as proteínas caspases estão desativadas, as proteínas RIPK1 e RIPK3 são ativadas e servem como uma plataforma para a ativação da proteína efetora de necroptose, *Mixed lineage kinase domain-like protein* (MLKL) (NAJJAR et al., 2016) (**Figura 2**).

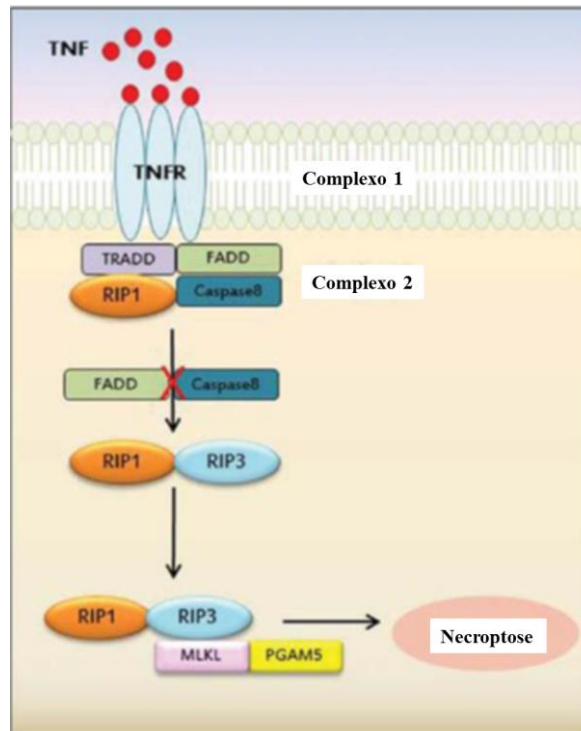


Figura 2. Representação esquemática da via de sinalização de necroptose mediada por TNF α . Após a ligação do receptor TNFR, a proteína TRADD é recrutada e forma um complexo com RIPK1. Após a absorção de TNFR, o complexo é dissociado e a proteína caspase-8 é ativada para mediar apoptose. Em condições onde caspase-8 está inibida, RIPK1 interage fisicamente com RIPK3 formando o complexo necrossômico. O complexo necrossômico fosforila a proteína efetora de necroptose MLKL, que se direciona até a membrana plasmática causando o seu rompimento. Adaptado de (CHO, Y. S., 2014).

Para melhor entender o papel das proteínas RIPK1 e RIPK3 são fundamentais estudos envolvendo a superexpressão e repressão destes genes. Porém, camundongos *knockout* para a proteína RIPK1 morrem logo após o nascimento. Para resolver esse problema foram gerados camundongos *knock-in* por uma mutação no aspartato (D) na posição 138 para uma asparagina (D138N). Essa mutação torna o domínio quinase da proteína RIPK1 inativo, tornando-os resistentes à necroptose (POLYKRATIS et al., 2014). Já camundongos *knockout* para a proteína RIPK3 são viáveis e também resistentes a morte por necroptose (KAISER et al., 2011).

As cascatas da via de sinalização de morte celular derivadas da injúria traumática cerebral são um importante fator na progressão da ITC e devem ser controlados para uma melhor recuperação e tratamento (DJEBAILI et al., 2005). Dessa forma, a participação das vesículas extracelulares na morte celular por apoptose é bem documentada (GARG et al., 2014; HUBER et al., 2005; ZHANG, H.-G. et al., 2006), portanto, as VEs podem ter um papel importante na

morte celular por necroptose contribuindo para o entendimento das lesões causadas por ITC. Vale ressaltar que muitas das lesões causadas pela ITC ocorrem durante o esporte de impacto tornando essas duas áreas de investigação complementares.

2.3 Vesículas Extracelulares (VEs)

2.3.1 Classificação de VEs

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 (RATAJCZAK et al., 2006). Um terceiro mecanismo para a comunicação intercelular emergiu na década de 80 e envolve a transferência intercelular de vesículas extracelulares (VEs, do inglês *extracellular vesicles*) (HARDING; HEUSER; STAHL, 1983; PAN; JOHNSTONE, 1983).

Vesículas extracelulares (VEs) são as vesículas que circulam nos espaços extracelulares e fluidos biológicos. São compostas por diferentes classes de vesículas com características biológicas distintas. As principais características utilizadas na diferenciação entre as diversas classes de VEs são: biogênese, proteínas marcadoras de membrana, proteínas internas, densidade de flutuação em gradiente de densidade e tamanho (RAPOSO, G.; STOORVOGEL, 2013).

Todas as células parecem liberar vesículas extracelulares, e cada tipo de célula pode liberar um conjunto heterogêneo de vesículas. As vesículas são liberadas por células de mamíferos (COSTA-SILVA et al., 2015), bactérias gram-negativas (LI, Z.; CLARKE; BEVERIDGE, 1998) e gram-positivas (LEE, E. Y. et al., 2009), fungos (RODRIGUES et al., 2008), leveduras (OLIVEIRA et al., 2010), parasitas unicelulares como o protozoário causador da malária (COUPER et al., 2010), células de plantas (DÖRMANN et al., 2014), nematódeos (MAIZELS et al., 2012) e moscas (GROSS et al., 2012).

Até o ano de 2012 não havia um critério bem estabelecido na literatura em relação a nomenclatura para as VEs, o que levava os pesquisadores a nomeá-las em relação a patologias ou ao fluido biológico e tipo celular do qual as vesículas eram purificadas, por exemplo: *epididimosomes*, *argosomes*, *exosome-like vesicles*, corpos apoptóticos, micropartículas,

promininosomes, prostasomes, dexosomes, texosomes, dex, tex, exossomas, nanopartículas, microvesículas, *ectosomes, archeosomes* e *oncosomes* (GOULD; RAPOSO, 2013; SIMPSON; MATHIVANAN, 2012).

Em 2011 foi demonstrado que lipoproteínas de alta densidade (HDL) também podem participar da comunicação celular (VICKERS et al., 2011). Com a formação da sociedade internacional de vesículas extracelulares (ISEV) em 2012 se tornou consenso na literatura que as VEs são divididas em três principais classes: Corpos apoptóticos, microvesículas e exossomas (**Figura 3**) (HILL et al., 2013).

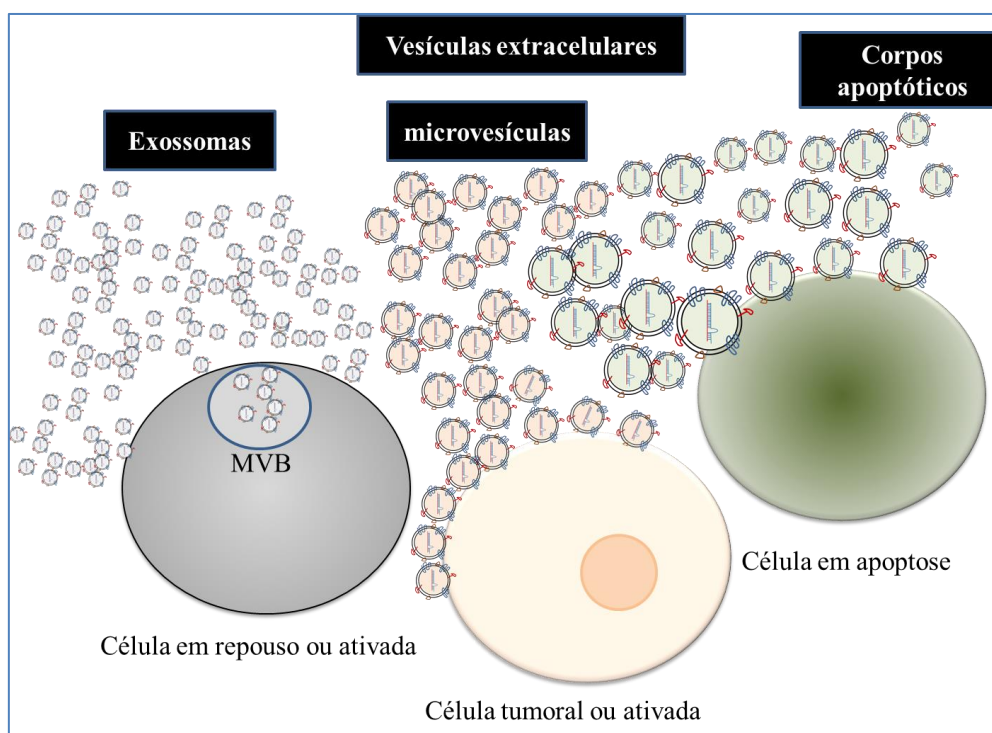


Figura 3. Representação esquemática de diferentes tipos de VEs. As populações principais incluem exossomas, microvesículas e corpos apoptóticos. Adaptado de GYORGY et al. (2011).

Os corpos apoptóticos são vesículas cuja biogênese se inicia pelo brotamento da membrana plasmática quando uma célula entra em apoptose tardia. Corpos apoptóticos podem ter entre 50 e 5.000 nm de tamanho, são heterogêneos em relação à morfologia e flutuam em gradiente de densidade mais elevadas ($>1,23$ g/ml) (MATHIVANAN; JI; SIMPSON, 2010).

Microvesículas (MVs) são secretadas via o brotamento direto da membrana plasmática, assim como acontece com os corpos apoptóticos. Porém, a liberação não está obrigatoriamente associada à apoptose. As MVs têm entre 50 e 1000 nm de diâmetro e apresentam como

característica principal o enriquecimento de fosfatidilserina em suas membranas (KALRA et al., 2012).

Os exossomas são vesículas de bicamada lipídica, apresentam diâmetro entre 30-130nm e flutuação em gradiente de densidade de sacarose no plasma entre 1,15 e 1,27 g/ml⁻¹ e em células em cultura entre 1,13–1,19 g/mL⁻¹ (CABY et al., 2005).

Já as lipoproteínas de alta densidade (HDL) são formadas por uma mistura de partículas de lipoproteínas, e sua densidade fica entre 1,063 a 1,21 g/ml (YUANA et al., 2014). A lipoproteína ApoA-1 é o principal componente das HDL e tem papel importante na biogênese e função das HDL (TSOMPANIDI et al., 2010).

A diferença principal entre corpos apoptóticos, microvesículas e exossomas consiste na biogênese de cada uma delas. Diferentemente dos corpos apoptóticos e das microvesículas, os exossomas são gerados pela via endossomal. Os exossomas são formados pela invaginação da membrana citoplasmática do endossomo primário, dando origem aos compartimentos multivesiculares internos (MVBs, do inglês *multivesicular bodies*) na célula. Estes MVBs formam vesículas internas nas células chamadas de vesículas intraluminais (ILs). Após a fusão das MVBs com a membrana plasmática ocorre a liberação das ILs no espaço extracelular, quando passam a ser chamadas exossomas (**Figura 4**) (COLOMBO; RAPOSO; THERY, 2014).

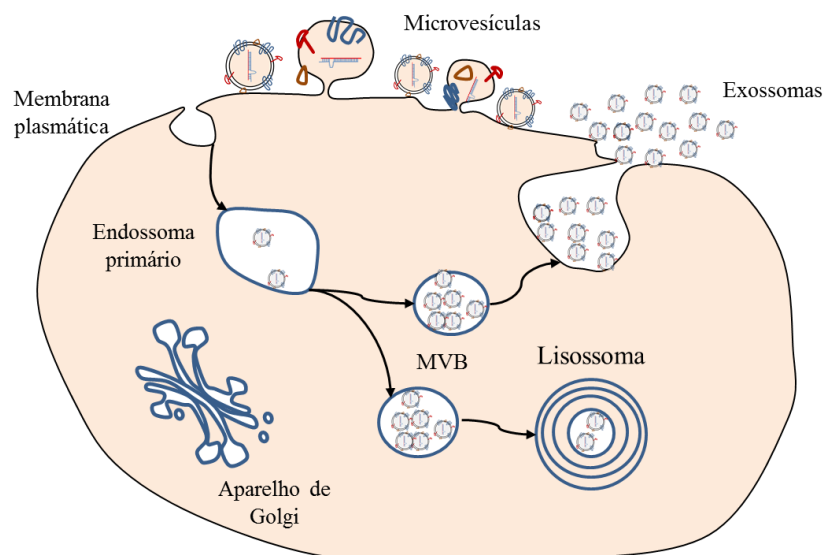


Figura 4. Representação esquemática dos diferentes tipos de vesículas secretados por células eucarióticas, tanto por brotamento direto da membrana plasmática (microvesículas) ou por fusão dos corpos multivesiculares com a membrana plasmática (exossomas). Adaptado de COLOMBO et al. (2014).

Apesar dessas diferenças em relação às diferentes classes de VEs, ainda é um desafio afirmar a presença de apenas um tipo de vesícula em uma preparação, existindo subpopulações dentro de exossomas e microvesículas, cada subpopulação contendo proteínas de membrana específicas e carregamentos específicos (TKACH; THÉRY, 2016).

Os exossomas foram inicialmente descritos em dois trabalhos envolvendo a liberação de receptor de transferrina em reticulócitos no início dos anos 80. Com a utilização de microscopia eletrônica de transmissão, ambos grupos conseguiram monitorar a endocitose dos receptores de transferrina presentes na membrana plasmática para compartimentos intracelulares (endossomos) com posterior formação de corpos multivesiculares (MVBs) e fusão com a membrana plasmática liberando vesículas carregando os receptores de transferrina (HARDING et al., 1983; PAN; JOHNSTONE, 1983).

Após as duas publicações no ano de 1983, poucos artigos foram publicados nos anos seguintes. A existência desta via de secreção de VEs foi confirmada depois em células apresentadoras de antígenos, onde ficou demonstrado que vesículas secretadas por linfócitos-B humanos e murinos são capazes de mediar a apresentação de antígenos apresentando MHC-II a células T (RAPOSO, GRACA et al., 1996). A existência de vias de secreção de VEs foram posteriormente confirmadas em células epiteliais e células tumorais (WOLFERS et al., 2001). No ano de 2007 foi proposta a comunicação intercelular mediada por RNAs secretados em exossomas (VALADI et al., 2007), provocando forte interesse pelo campo de estudo (RAPOSO, G.; STOORVOGEL, 2013).

As vesículas extracelulares podem ser purificadas utilizando diferentes métodos. Na maioria dos estudos, as vesículas são isoladas por centrifugação diferencial, técnica considerada o “padrão ouro” para isolar diferentes tipos de VEs (REKKER et al., 2014; VAN DEUN et al., 2014).

A centrifugação diferencial envolve múltiplas centrifugações sequenciais. Em cada etapa de centrifugação é separado o precipitado do sobrenadante, aumentando a força centrífuga nas centrifugações seguintes para isolar componentes menores e menos. Em geral, a aplicação de força centrífuga de 200 a 1,500 x g é suficiente para *pelletar* células e “*debris* celulares”, 10,000 a 20,000 x g é suficiente para *pelletar* vesículas com tamanho entre 100 e 800 nm (geralmente chamadas microvesículas) e cerca de 100,000 a 200,000 x g para sedimentar as vesículas menores, com diâmetro menor do que 100 nm (geralmente chamadas de exossomas) (CRESCITELLI et al., 2013).

Algumas empresas desenvolveram métodos de purificação de VEs mais rápidos e sem a necessidade de ultracentrífugas. Esses métodos se baseiam na utilização de polímeros de exclusão de volume (PolietilenoGlicol, dextrans) e centrifugações a baixa rotação para *pelletar* VEs (RIDER; HURWITZ; MECKES JR, 2016).

2.3.2 Função de VEs na comunicação celular

As VEs representam um modo importante de comunicação intercelular, servindo como veículos de transferência de membrana, proteínas citosólicas, lipídeos e RNA entre as células. As deficiências no entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na formação de VEs ainda dificultam o entendimento da relevância fisiológica *in vivo* (RAPOSO, G.; STOORVOGEL, 2013).

As funções de VEs incluem a entrega de fatores de virulência bacteriana ao hospedeiro (BOMBERGER et al., 2009), a modulação de respostas inflamatórias e imunitárias na comunicação feto-mãe (KSHIRSAGAR et al., 2012). Vesículas extracelulares secretadas por células do sistema imune apresentam função imunomodulatória, induzindo tanto a supressão quanto a ativação de respostas imunes (FERNÁNDEZ-MESSINA et al., 2015).

Um dos estudos pioneiros envolvendo exossomas mostrou a participação destas vesículas na apresentação de antígenos (RAPOSO, GRACA et al., 1996). Neste estudo sobre exossomas liberados por linfócitos B, foi demonstrado por microscopia eletrônica que compartimentos endossomais de células apresentadoras de antígenos MHC classe II podem fundir-se diretamente com a membrana plasmática, o que resulta na liberação de vesículas contendo MHC classe II. As vesículas secretadas, isoladas do meio de cultura mostraram composição global de proteínas de superfície de exossomas diferentes significativamente da composição de proteínas da membrana plasmática. Os exossomas provenientes de ambos os linfócitos B humanos e murino induziram respostas em células T restritas a MHC classe II (RAPOSO, GRACA et al., 1996).

Após este estudo, outros autores demonstraram que as moléculas de exossomas positivas para MHC podem induzir respostas de células T, tanto diretamente quanto indiretamente. Foi demonstrado que exossomas derivados de células dendríticas (DC) podem estimular as células T CD4+ e CD8+ apenas na presença de DC, assim as vesículas atuam indiretamente ativando células T (THÉRY et al., 2002).

O papel de estimulador do sistema imune causado por VEs não tem sido apenas estudado via apresentação de antígenos, mas também pela capacidade de VEs de estimular diretamente células efetoras do sistema imune, tais como células *natural killer* (NK), células B e macrófagos (FERNÁNDEZ-MESSINA et al., 2015).

Vesículas extracelulares secretadas por células T, B e células dendríticas do sistema imunológico contêm repertórios de microRNA (miRNA) diferentes das suas células de origem. Células T transferem miRNAs para células apresentadoras de antígenos por meio de VEs durante a sinapse imunológica. Os miRNAs são funcionalmente entregues e a inibição da via esfingomielinase-2 diminui a transferência de miRNAs entre as células (MITTELBRUNN et al., 2011). Além disso, foi demonstrado que células T regulatórias (Treg) secretam o miRNA let-7d via VEs, suprimindo a proliferação de células Th1 e a secreção de citocinas. O mecanismo foi comprovado utilizando Treg mutantes para a produção de *Dicer* e proteínas envolvidas na biogênese de exossomas (Rab27a e Rab27b) (OKOYE et al., 2014).

Vesículas extracelulares também foram demonstradas tendo efeito protetor sobre o sistema imune. Vesículas extracelulares liberadas pelas células tronco mesenquimais derivadas de células tronco embrionárias humanas reduziram o tamanho do infarto de miocárdio em ratos durante lesão por isquemia/reperfusão (LAI et al., 2010). Exossomas também mostraram efeito durante transplantes intestinais e cardíacos, onde exossomas derivados de células dendríticas podem induzir tolerância em modelos de aloenxerto em ratos.

Exossomas oferecem uma nova visão sobre a biologia do câncer com implicações diagnósticas e terapêuticas (BRINTON et al., 2014). Devido a sua comunicação célula-a-célula, exossomas influenciam a progressão do tumor, tendo a liberação de vesículas aumentadas em células cancerígenas (LESPAGNOL et al., 2008). Os exossomas derivados de tumores inibem a atividade citotóxica de células NK, bloqueando a ativação por IL-2, mediando assim o crescimento tumoral (CLAYTON; TABI, 2005).

Vesículas extracelulares podem ser isoladas a partir de sangue e outros fluidos corporais e revelar processos de doenças que ocorrem no corpo, incluindo o crescimento de tumores (KHAN et al., 2012). Além de ser um reservatório de biomarcadores de câncer, elas podem ser reprojctadas para restabelecer a imunidade tumoral (BRINTON et al., 2014) e utilizados na bioengenharia genética para entregar drogas ou RNAs de interferência em órgãos de difícil acesso, como o cérebro (ALVAREZ-ERVITI et al., 2011).

Artigo publicado em 2015 descreveu que uma proteoglicana, Glypican-1 (GPC1), é especificamente enriquecida em exossomas derivados de células de câncer pancreático. Esses

exossomas positivos para GPC1 podem ser identificados no soro de pacientes com alta especificidade e sensibilidade se tornando um potencial biomarcador para câncer pancreático (MELO et al., 2015).

As VEs também apresentam papel importante na comunicação de células cancerígenas com o tecido do estroma. Foi demonstrado que VEs contendo a proteína WNT11 secretadas por fibroblastos se comunicam com células tumorais levando a transição epitelial a mesenquimal e causando aumento da motilidade e agressividade em células tumorais (KATSUDA; KOSAKA; OCHIYA, 2014).

Foi demonstrado também que exossomas tumorais positivos para NKG2DLs, podem regular negativamente a expressão de NKG2D e como resultado prejudicar a função citotóxica de células T CD8 +(CLAYTON et al., 2008). Outro estudo confirmou o papel de exossomas tumorais positivos para NKG2DL como mediadores de escape do tumor. HEDLUND et al. (2011) mostraram que exossomas derivados de células tumorais, células de leucemia e linfoma, carregam NKG2DLs que suprimem a citotoxicidade das células NK, e conseqüentemente promovem a fuga do sistema imune para estas células.

Uma das primeiras publicações envolvendo VEs e câncer surgiu em 2008 envolvendo VEs purificados de glioblastoma. Os autores mostraram que exossomas derivados de glioblastoma podem entrar em células endoteliais microvasculares cerebrais humanas (HBMVECs) e traduzir mRNA repórter transportado por exossomas. Além disso, os autores demonstraram que exossomas de glioblastoma podem estimular um fenótipo angiogênico em células endoteliais normais do cérebro e podem estimular a proliferação de outras células de glioma. Além do papel potencial do mRNA nestes processos, exossomas também apresentaram proteínas angiogênicas, tais como angiogenina, FGF α , IL-6, IL-8, TIMP-1, VEGF e TIMP-2. Presumivelmente, a maioria destas proteínas agem interagindo com receptores cognatos na superfície de células endoteliais para promover angiogênese (SKOG et al., 2008).

Foi também demonstrado o papel crítico para exossomas de câncer positivos para TGF β na indução da geração de tumores pelo estroma. Exossomas conseguem esse feito por meio do direcionamento da diferenciação dos fibroblastos para um fenótipo *myofibroblast-like* que suporta a angiogênese *in vitro* e crescimento tumoral *in vivo*. Esses efeitos dos exossomas são dependentes de TGF β 1, gerando um miofibroblasto que é absolutamente diferente do gerado pelo uso de TGF β 1 solúvel. O estudo ressalta que o formato biofísico deste fator de crescimento particular é crucial ao dirigir a resposta celular e subseqüentes mudanças patológicas que possam surgir (WEBBER et al., 2014).

A promoção do crescimento tumoral também foi mostrada por exossomas induzindo angiogênese *in vitro* e *in vivo*. GESIERICH et al. (2006) relataram que exossomas tumorais que carregam a tetraspanina Tspan8, demonstrada ser forte indutor de angiogênese, induzem a ramificação de células endoteliais *in vitro* e angiogênese *in vivo*.

Além disso, PEINADO et al. (2012) mostraram *in vivo* que exossomas derivados de uma linhagem de células de câncer altamente metastática podem induzir uma maior carga tumoral metastática e distribuição tecidual comparado com exossomas derivados de uma linhagem de célula de câncer fracamente metastática. O mecanismo proposto foi que exossomas podem promover o nicho metastático “educando” células derivadas da medula óssea em direção a um fenótipo prometastático e próvasculogênico por meio da regulação positiva da oncoproteína MET.

Outro artigo mostrou a formação de nicho prémetastático dependente de VEs. Utilizando VEs purificadas da linhagem de adenocarcinoma ductal pancreático (altamente metastática) foi demonstrado que estas VEs portadoras de proteína MIF são captadas por células Kupffer, causando secreção de TGF- β e o aumento da produção de Fibronectina em células estreladas hepáticas. Em seguida, as células derivadas da medula óssea se ligaram às regiões hepáticas enriquecidas com fibronectina, levando à formação de nicho pré-metastático no fígado (COSTA-SILVA et al., 2015).

Exossomas derivados de células tumorais não são os únicos envolvidos na progressão de tumores. Exossomas derivados de macrófagos ativados por IL-4 foram demonstrados aumentando a invasão de células de câncer de mama pela transferência de miRNAs oncogênicos, como miR-223 (YANG, M. et al., 2011).

Em alguns organismos não é bem entendido como estas vesículas entram nas células alvo, mas artigos sugerem que o processo pode ser facilitado por lipídeos presentes nas membranas ou com a ajuda de polissacarídeos como Heparan sulfato e proteoglicanas (CHRISTIANSON et al., 2013). A multiplicidade de formas pelas quais as VEs são produzidas com carregamentos específicos por organismos diferentes fornece um conjunto de mecanismos que podem ser aproveitados para aplicações em biotecnologia (GYORGY et al., 2014).

2.3.3 Composição e conteúdo de VEs

A composição molecular de VEs pode ser dividida em proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos (**Figura 5**). Vesículas extracelulares devem ser desprovidas de contaminantes, tais

como proteínas séricas e componentes proteicos originados de compartimentos intracelulares (por exemplo, retículo endoplasmático, mitocôndrias e aparelho de golgi) que são ausentes ou diminuídas nas frações de VEs (LÖTVALL et al., 2014). Como consequência da sua origem, exossomas de diferentes tipos de células contêm proteínas associadas ao endossoma (Rab GTPase, SNAREs, Anexinas e *Flotillin*), algumas das quais estão envolvidas na biogênese dos corpos multivesiculares (Alix e Tsg101) (RAPOSO, G.; STOORVOGEL, 2013).

As proteínas tetraspaninas são comumente encontradas em VEs. As principais tetraspaninas incluem CD63, CD81, e CD9 sendo consideradas proteínas “marcadoras” de exossomas (MATHIVANAN; LIM; et al., 2010). Nota-se que cada proteína marcadora pode estar presente em alguns subtipos de VEs e não em outros (TKACH; THÉRY, 2016). Histonas, proteassoma e componentes do ribossomo são provavelmente liberados em VEs com diâmetro maior, derivadas da membrana plasmática e/ou vesículas apoptóticas, e não em exossomas (SCHILLER et al., 2008).

Os exossomas são enriquecidos em colesterol, esfingomiéline, ceramida e fosfatidilserina (MATSUO et al., 2004). Alguns destes lipídios (por exemplo esfingomiéline e colesterol) e algumas proteínas exossomais (proteínas –âncoras-GPI e *Flotillin*) também são enriquecidas em subdomínios da membrana plasmática resistentes a detergentes, chamados *lipid rafts* (IKONEN, 2001). Foi recentemente mostrada a ligação direta entre a endocitose de *Lipids Rafts* e a eventual secreção em exossomas em células tronco mesenquimais (TAN et al., 2013).

As microvesículas (MVs) também contêm lipídeos, proteínas citosólicas, RNAs e microRNAs com capacidade de regular a função em células alvo. Elas podem interagir com as células alvo de diversas maneiras, entre elas: liberando mediadores solúveis; por meio de interações ligante-receptor; fundindo as membranas da MVs com a da célula alvo e transferindo o conteúdo da MV (especialmente RNAs e microRNAs); e finalmente por fagocitose/endocitose por macrófagos e células endoteliais (LEMOINNE et al., 2014).

O interesse científico em vesículas extracelulares cresceu bastante a partir do ano de 2007, ano em que ficou demonstrado que exossomas são capazes de transferir material genético funcionalmente entre células e tecidos (LOTVALL; VALADI, 2007).

Esse artigo mostrou a presença tanto de RNA mensageiro quanto microRNAs em exossomas derivados de linhagem celular de mastócitos humanos e murinos. Esses dois tipos de RNAs podem ser transferidos de um mastócito para outro, provavelmente através da fusão do exossoma à membrana celular do destinatário. O mRNA é funcionalmente entregue e o pode

levar à tradução de novas proteínas em uma célula receptora. Utilizando microarranjos para mRNA e miRNAs foram identificados 1.300 mRNAs e 120 miRNAs nestes exossomas derivados de mastócito, esses 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 tradução de proteínas de camundongos nas células humanas. O RNA transportado entre as células via exossomas recebeu a denominação de exosomal *shuttle RNA* (esRNA) (VALADI et al., 2007).

A partir deste estudo pioneiro, as VEs foram purificadas da maioria dos tipos celulares e de fluidos biológicos como saliva (PALANISAMY et al., 2010), urina (PISITKUN; SHEN; KNEPPER, 2004), leite materno (ADMYRE et al., 2007), soro (ALMQVIST et al., 2008), plasma (CABY et al., 2005) e fluidos nasal (LÄSSER et al., 2011), brônquico (QAZI et al., 2010), seminal (GATTI et al., 2005) e amniótico (KELLER et al., 2007).

Estudos posteriores demonstraram o conteúdo de RNA purificado de VEs isoladas de células em culturas (SKOG et al., 2008) e fluidos biológicos (HUNTER et al., 2008). Vesículas extracelulares com características de exossomas liberadas por células do sistema imunológico foram descritas incorporando seletivamente miRNAs que foram funcionalmente transferidos para células alvo por meio de fusão de membranas (MONTECALVO et al., 2012). Análise de RNA a partir de VEs por sequenciamento de nova geração demonstrou que, em adição ao mRNA e aos miRNA, as VEs também contém grande variedade de outros pequenos RNAs não codificadores, incluindo transcritos de RNA que se sobrepõem com regiões codificadoras de proteínas, sequências repetitivas, RNAs estruturais, fragmentos de tRNA, *vault* RNA, Y RNA, e pequenos RNAs de interferência (BELLINGHAM; COLEMAN; HILL, 2012).

Também foi demonstrada a presença de DNA dupla fita (THAKUR et al., 2014) e DNA mitocondrial (GUESCINI et al., 2010) em VEs.

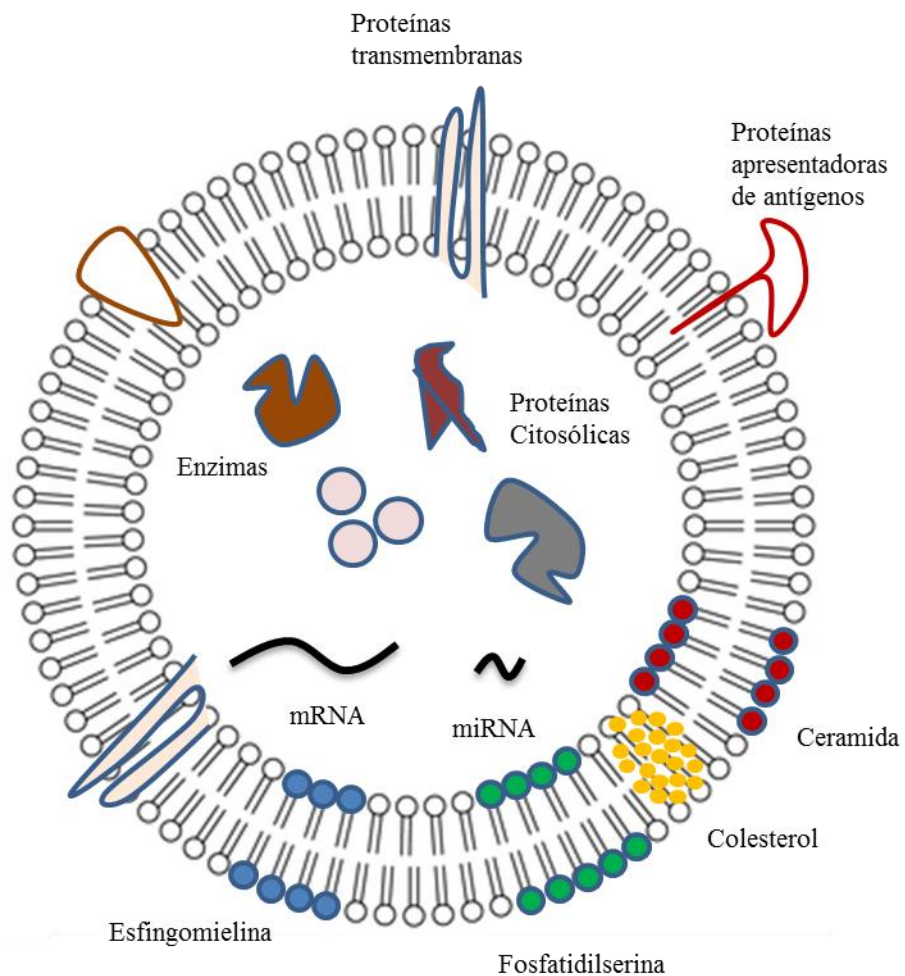


Figura 5. Composição global de vesículas extracelulares (VEs). Representação esquemática da composição e orientação da membrana de VEs: famílias de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Adaptado de COLOMBO et al. (2014).

Devido ao grande número de biomoléculas detectadas em VEs, surgiram bancos de dados específicos para compilar os dados. O primeiro banco de dados a surgir foi o ExoCarta, no ano de 2009. ExoCarta compilava moléculas de proteínas e RNA identificados em exossomas e está disponível gratuitamente para a comunidade científica através da página na *web* (<http://exocarta.ludwig.edu.au>) (MATHIVANAN; SIMPSON, 2009). Em 2012, ExoCarta foi substituído pelo banco de dados Vesiclepedia (<http://www.microvesicles.org>), que avalia manualmente dados moleculares (lipídeos, RNA, e proteínas) identificados em diferentes classes de VEs de mais de 300 estudos independentes publicados ao longo dos últimos anos (KALRA et al., 2012). Em 2013 surgiu o EVpedia, que é um banco de dados integrado de alto rendimento para conjunto de dados de vesículas extracelulares procariótica e eucarióticas. O banco de dados EVpedia (<http://evpedia.info>) fornece conjuntos de dados de larga escala de

componentes vesiculares (proteínas, mRNAs, miRNA, e lipídeos) presentes em vesículas extracelulares de procariotos, eucariotos não mamíferos e mamíferos (KIM et al., 2013).

Além do potencial uso biotecnológico, o estudo de miRNAs e proteínas transportados por vesículas extracelulares vem sendo estudados como possíveis biomarcadores para diferentes estados de saúde e doença, já que a maioria dos fluidos biológicos contém quantidades significativas de VEs (BRETZ et al., 2013; ZHOU, H. et al., 2008).

2.4 Pequenos RNAs não codificadores (ncRNAs)

Após mais de uma década do sequenciamento do primeiro genoma humano no ano de 2003, ficou demonstrado que apenas uma pequena parcela do DNA (aproximadamente 1,5%) presente no genoma humano é transcrito em RNA mensageiro e traduzido em proteínas (LANDER, 2011). Apesar de apenas uma pequena parcela do DNA transcrever RNA mensageiro, aproximadamente 80% do genoma tem capacidade de transcrever moléculas de RNA não codificadores (ncRNAs) de proteínas que participam do metabolismo celular (CONSORTIUM, 2012). Estes ncRNAs estão envolvidos na regulação da expressão gênica tanto em nível pós-transcricional quanto no nível genômico. Os ncRNAs mais bem estudados são os RNAs ribossomais (rRNA), RNAs transportadores (tRNA), microRNAs (miRNAs), piwiRNAs (piRNAs), pequenos RNAs nucleares (snRNA) e pequenos RNAs nucleolares (snoRNA) (ESTELLER, 2011).

Os piRNAs formam a maior classe de pequenos RNAs não codificadores e atuam via associação com proteínas Piwi formando o complexo piRISC. Os piRNAs tem como função principal a defesa de células da linhagem germinativa do ataque de elementos transponíveis (SIOMI et al., 2011). PiRNAs já foram detectados circulando em espaços extracelulares como saliva (BAHN et al., 2015) e plasma (HUANG et al., 2013).

Os microRNAs (miRNA) são RNAs de fita simples, não codificadores de proteínas com tamanho aproximado de 22 nucleotídeos. Estão envolvidos na regulação da expressão gênica ao nível pós-transcricional. Os miRNAs já foram encontrados em plantas, animais e alguns vírus (BARTEL, 2009).

O primeiro miRNA foi descrito no ano de 1993, onde foi demonstrado a presença de um pequeno RNA, gerado no gene *lin-4* do nematoide *C. elegans*. Este RNA apresentou sequências complementares a região 3'UTR do mRNA do gene *lin-14*, e foi proposto que o

RNA gerado por *lin-4* inibia a produção da proteína pelo gene *lin-14* (LEE, R. C.; FEINBAUM; AMBROS, 1993).

Foi a partir da descoberta do segundo miRNA, no ano 2000, onde ficou demonstrado a presença do miRNA *let7a* em diferentes tipos celulares, tecidos e organismos, que foi atribuído aos miRNAs função conservada em diferentes espécies. Com isso ficou conhecido os múltiplos papéis de miRNAs no desenvolvimento de plantas, animais e em muitos processos biológicos (ROUGVIE, 2001).

Para humanos, estão descritos no banco de dados de miRNA – miRBase - 1881 precursores de miRNAs e 2588 miRNAs maduros. Já para *Rattus norvegicus*, são descritos 495 precursores e 765 miRNAs maduros. Para *Equus caballus*, estão descritos 715 precursores de miRNAs e 690 miRNAs maduros, consultado em 03 de dezembro de 2016 (KOZOMARA; GRIFFITHS-JONES, 2013). 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).

A biogênese de miRNAs se dá por meio de genes no DNA quando esses genes são normalmente transcritos pela RNA polimerase II e formam um transcrito 5'cap e poliadenilado, chamado miRNA primário (pri-miRNA). O miRNA primário forma uma estrutura em forma de gancho que é clivada pelas enzimas *Drosha* e *DiGeorge* síndrome região crítica 8 (DGCR8), obtendo-se um precursor – pré-miRNA - em forma de gancho, com aproximadamente 70 nucleotídeos de comprimento. O pré-miRNA é exportado a partir do núcleo para o citoplasma, onde é novamente clivado pela enzima *Dicer*, dando origem a duplex miRNA-miRNA* de cerca de 22 nucleotídeos de comprimento. Após a dissociação do duplex de miRNA, uma fita é incorporada ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC, do inglês *RNA-induced silencing complex*). Os miRNAs incorporados no RISC muitas vezes reconhecem os seus alvos pelos nucleotídeos das posições de 2 a 7 do miRNA (conhecida como a "região semente") (VAN ROOIJ; OLSON, 2012).

Condições de estresse podem influenciar a biogênese de miRNA em múltiplos níveis. O miRNA maduro normalmente complementar a região 3'UTR de mRNAs, pode atuar degradando o mRNA de três principais maneiras: degradando o mRNA; inibindo a tradução, por meio de desestabilização do ribossomo e causando a deadenilação e *de-capping* do mRNA (**Figura 6**) (VAN ROOIJ; OLSON, 2012).

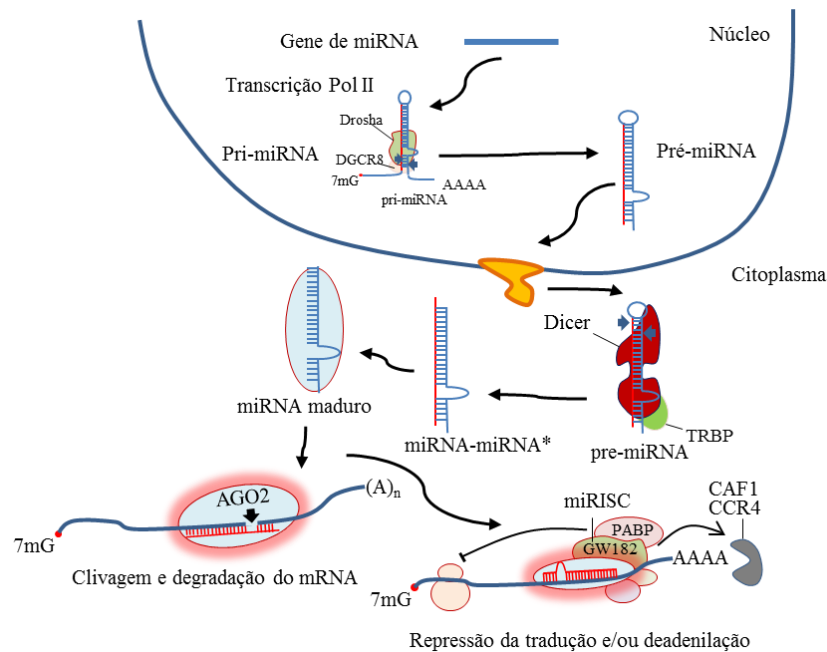


Figura 6. Mecanismo de biogênese de miRNA. m7G, 7-metilguanossina. Adaptado de VAN ROOIJ; OLSON (2012).

Os miRNAs controlam genes envolvidos em vários processos biológicos, entre eles, apoptose, proliferação, diferenciação, metástase (ALMEIDA, M. I.; REIS; CALIN, 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; MA et al., 2011).

2.5 microRNAs circulantes em espaço extracelular

A função central de miRNAs, foi conhecida como sendo atuante de forma intracelular, porém a partir de 2008 foi demonstrada a presença de miRNAs circulando nos espaços extracelulares como plasma e soro (CHEN, X. et al., 2008; MITCHELL et al., 2008).

O primeiro estudo a avaliar sistematicamente a presença de miRNAs em plasma de humanos mostrou que miRNAs estão presentes no plasma de forma estável e que são protegidos da atividade de RNases endógenas. Além disso, o estudo comparou os níveis do miRNA miR-141 no soro de pacientes com câncer de próstata e saudáveis, encontrando níveis aumentados deste miRNA no soro dos pacientes (MITCHELL et al., 2008).

MITCHELL et al. (2008) sugere ao fim da discussão de seu trabalho que as formas pelas quais os miRNAs circulantes em fluidos biológicos são protegidos das atividades das RNases

endógenas podem ser pelo empacotamento destes miRNAs dentro de VEs, proteção via associação a complexo de proteínas e modificações na estrutura do miRNA que o torne resistente às RNAses.

Ainda no mesmo ano, outro estudo mostrou que os miRNAs estão presentes no soro e plasma de seres humanos e outros animais de maneira estável, resistentes a condições adversas e resistentes a digestão por RNaseA. O estudo identificou padrões da presença específica de miRNAs no soro para pacientes com câncer de pulmão, câncer colo retal e diabetes, fornecendo evidência de que miRNAs no soro podem servir como potenciais biomarcadores para detecção de vários tipos de cânceres e outras doenças (CHEN, X. et al., 2008).

O mesmo grupo do estudo publicado por Mitchell em 2008 mostrou que a maioria dos miRNAs circulantes em plasma e soro humanos estão associados a complexos proteicos. Uma caracterização adicional mostrou que a proteína Argonauta2 cofracionava com miRNAs plasmáticos em separação por cromatografia de exclusão de tamanho. Portanto, o estudo foi importante para demonstrar a presença de duas populações de miRNAs circulantes, uma protegida das RNase endógenas por meio da associação com complexos proteicos e outra associada a vesículas extracelulares (ARROYO et al., 2011).

Ainda no ano de 2011 foi proposto outro mecanismo pelo qual miRNA circulam em espaço extracelular protegido da atividade de RNases endógenas. Foi mostrada a associação de miRNAs a lipoproteínas de alta densidade (HDL) que distribuem os miRNAs para células receptoras funcionalmente. O processo de incorporação de miRNA em HDL parece ser regulado pela via de Ceramida e Esfingomielinase neutra (nSMase2) (VICKERS et al., 2011).

Portanto, o conhecimento atual dos mecanismos de circulação de miRNAs em fluidos biológicos podem ser resumidos por três mecanismos: (i) Durante a biogênese de miRNAs, tanto pré-miRNAs quanto miRNAs maduros podem ser incorporados em VEs e serem liberados no espaço extracelular; (ii) Os miRNAs também podem circular no espaço extracelular associados a proteína Argonauta 2; (iii) Os miRNAs podem ser seletivamente transportados via associação a lipoproteínas de alta densidade (HDL). Possivelmente a associação de miRNAs com proteínas é resultado da morte celular com liberação do conteúdo intracelular no espaço extracelular, sendo considerado um transporte passivo. Já a associação de miRNAs com VEs e HDL parece ser ativa biologicamente (**Figura 7**) (CREEMERS; TIJSEN; PINTO, 2012).

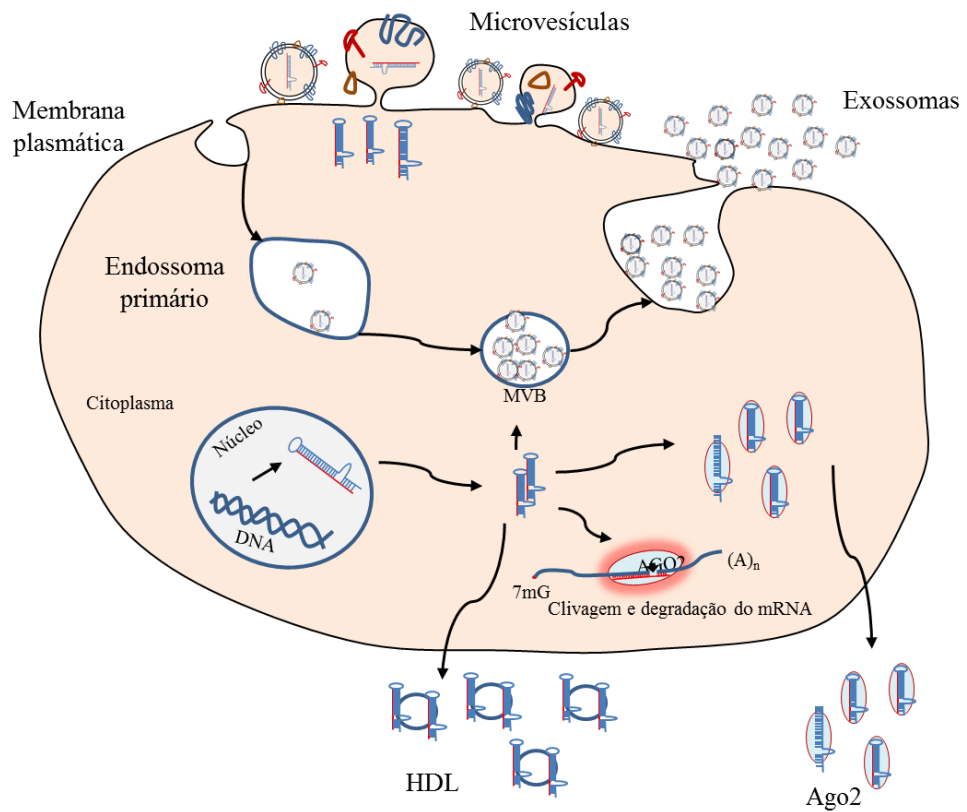


Figura 7. Mecanismos celulares de liberação e sistemas de transporte extracelular de miRNAs. Adaptado de CREEMERS et al. (2012).

Também foi mostrada a participação de miRNAs exógenos na regulação da expressão gênica. Foi proposto 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 et al., 2012). Apesar de não ser consenso na literatura o impacto de miRNAs de plantas na regulação de genes em mamífero, análises *in silico* de dados de sequenciamento de nova geração de VEs presentes no leite suíno relataram a presença de grande quantidade de miRNAs de plantas presentes nesse fluido biológico (LUKASIK; ZIELENKIEWICZ, 2014). Outra forma de regulação envolvendo miRNAs e genes de diferentes espécies foi demonstrado por BUCK et al. (2014), onde VEs do nematóide gastrointestinal *Heligmosomoides polygyrus* transportaram pequenos RNAs e suprimiram a resposta inata *in vivo* de camundongos (BUCK et al., 2014).

3 Justificativa

A identificação de vesículas extracelulares mediando à transferência de ácidos nucleicos e proteínas entre células e tecidos tem um enorme potencial de gerar biomarcadores para diferentes estados em um organismo, sejam eles patológicos ou fisiológicos. A compreensão do repertório de RNAs e proteínas circulantes associados à VEs durante o exercício físico aeróbio agudo e em mecanismos de morte celular causados por injúria traumática cerebral é de muita importância para a utilização de VEs no *delivery* de moléculas e no tratamento de doenças. O papel das VEs como transportadores de proteínas, mRNAs e miRNAs envolvidos na comunicação celular em estados patológicos e fisiológicos abre a perspectiva para sua utilização biotecnológica. A atividade física desempenha um importante papel no controle de doenças que crescem a cada ano no Brasil, como diabetes, obesidade e câncer. Da mesma forma, o Brasil tem números altíssimos de casos de injúria traumática cerebral resultantes de perfuração por arma de fogo e também por acidentes de carro. Diferentes artigos foram publicados nos últimos anos avaliando o impacto do exercício na população de miRNAs circulantes como biomarcadores em fluidos biológicos. Estes artigos se limitaram a avaliar miRNAs circulantes em geral. A purificação prévia de vesículas extracelulares em fluidos biológicos é importante pois o mecanismo de liberação de VEs é altamente controlado biologicamente, logo, o entendimento do conteúdo de moléculas de RNAs e proteínas podem ajudar no direcionamento destas vesículas e na regulação da expressão gênica em células alvo. No contexto do exercício aeróbio, temos a hipótese que durante o exercício, os tecidos estressados liberam VEs e estas VEs podem ter papel nos benefícios da adaptação ao exercício. Os resultados podem ser importantes para se entender melhor os mecanismos moleculares envolvidos na resposta ao exercício físico, na busca de biomarcadores moleculares e no direcionamento de vesículas após a atividade física.

4 Capítulo 1 – Caracterização biofísica de vesículas extracelulares e pequenos RNAs associados a vesículas extracelulares presentes no soro de ratos submetidos a exercício físico agudo aeróbio leve, moderado e intenso.

4.1 Objetivos

4.1.1 Objetivo geral

Caracterizar biofísicamente vesículas extracelulares e sequenciar pequenos RNAs associados a vesículas extracelulares presentes no soro de ratos submetidos a exercício físico agudo aeróbio leve, moderado e intenso.

4.1.2 Objetivos específicos

1. Submeter ratos à uma sessão de exercício aeróbio em esteira em intensidades leve, moderada, intensa e controle (não exercitado);
2. Purificar vesículas extracelulares presentes no soro dos ratos submetidos e não submetidos ao exercício;
3. Caracterizar vesículas extracelulares presentes no soro dos ratos submetidos e não submetidos ao exercício por meio da identificação de proteínas marcadoras, contagem e concentração de vesículas, microscopias eletrônica e de força atômica e espalhamento de luz dinâmica;
4. Purificar pequenos RNAs de vesículas extracelulares presentes no soro de ratos submetidos e não submetidos ao exercício aeróbio;
5. Sequenciar a população de pequenos RNAs presentes em vesículas extracelulares presentes no soro de ratos submetidos e não submetidos ao exercício aeróbio;
6. Caracterizar os pequenos RNAs associados a vesículas extracelulares presentes no soro de ratos submetidos ao exercício físico aeróbio leve, moderado e intenso por meio de análises bioinformáticas;

4.2 Fluxograma – Capítulo 1

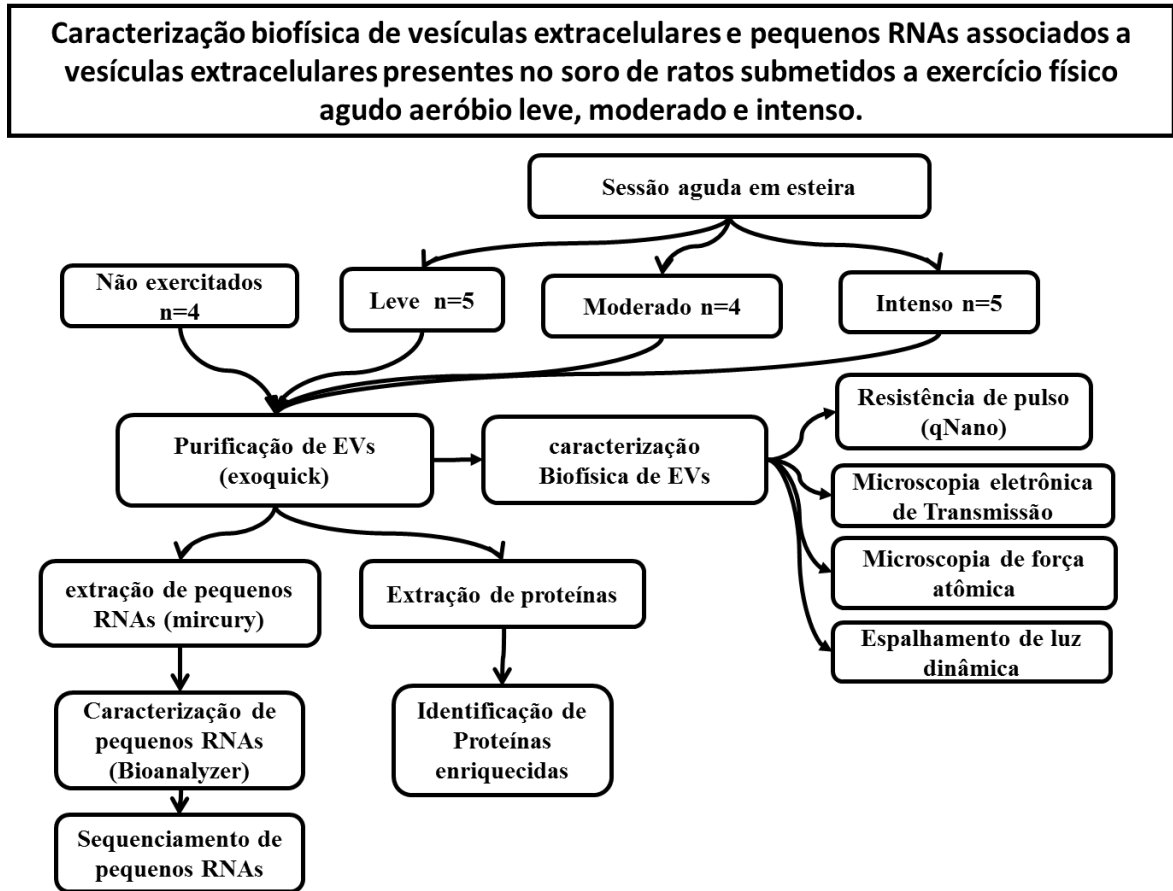


Figura 8. Fluxograma indicando o passo-a-passo do capítulo intitulado: Caracterização biofísica de vesículas extracelulares e pequenos RNAs associados a vesículas extracelulares presentes no soro de ratos submetidos a exercício físico agudo aeróbio leve, moderado e intenso.

4.3 Metodologia

4.3.1 Exercício aeróbio agudo dos ratos

Três grupos de ratos *Wistar* de linhagem isogênica foram exercitados em esteira rolante sob diferentes intensidades. Antes da divisão dos grupos de exercício agudo e controle, todos os animais passaram por uma fase inicial de aclimação e adaptação. A aclimação durou uma semana e consistiu em deixar os animais na esteira, sem movimento, por 10 a 30 minutos. A adaptação também durou uma semana e consistiu em submeter os animais ao exercício em esteira sem inclinação, no qual a velocidade e a duração do exercício foram de 12 a 20 m.min⁻¹. O grupo controle (n=4), também chamado não exercitado (NE), peso médio 271,7 g ± 14,4 g não realizou esforço físico. Um grupo foi exercitado em intensidade baixa (n=5), peso médio 295 g ± 18,3 g, foi exercitado 20% abaixo do máxima fase estável de lactato (MLSS) e velocidade média da esteira de 14 a 16 m.min⁻¹. O grupo exercitado na intensidade moderada (n=5), peso médio 303 g ± 37,5 g, foi exercitado na intensidade relativa à MLSS (20 e 22 m.min⁻¹). O grupo exercitado na alta intensidade (n=5), peso médio 284,6 g ± 21,8 g foi exercitado 20% acima da intensidade relativa à MLSS (24 a 26 m.min⁻¹ (**Figura 9**)). Todos os ratos foram exercitados durante 40 minutos. Os animais exercitados na intensidade leve percorreram ao fim do exercício 640m, os animais exercitados na intensidade moderada percorreram ao fim do exercício 880m e os animais exercitados na alta intensidade percorreram 1.040m ao fim do exercício. As intensidades escolhidas para execução da sessão aguda de exercício aeróbio teve como base artigo publicado que analisou o estado estável máximo de lactato (MLSS) em ratos *Wistar* exercitados em esteira, e obtiveram o MLSS a velocidade de 20m.min (CONTARTEZE et al., 2008). Em ratos naturalmente hipertensos, SHR, o MLSS também foi obtido com velocidade de 20m.min (ALMEIDA, J. A. et al., 2012). As linhagens isogênicas foram obtidas do biotério da Universidade Federal de São Paulo. Água e comida foram fornecidas *ad libitum*, e os animais foram mantidos em ciclo de 12:12h de claridade e escuro em sala a 23±2°C. Os animais foram alojados em grupos de quatro indivíduos dentro de caixas de polipropileno com dimensões de 40 x 33x 17cm (comprimento, largura, altura) com maravalha. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética de uso animal da Universidade de Brasília e todos os procedimentos foram feitos de acordo com o colégio brasileiro de experimentação animal.

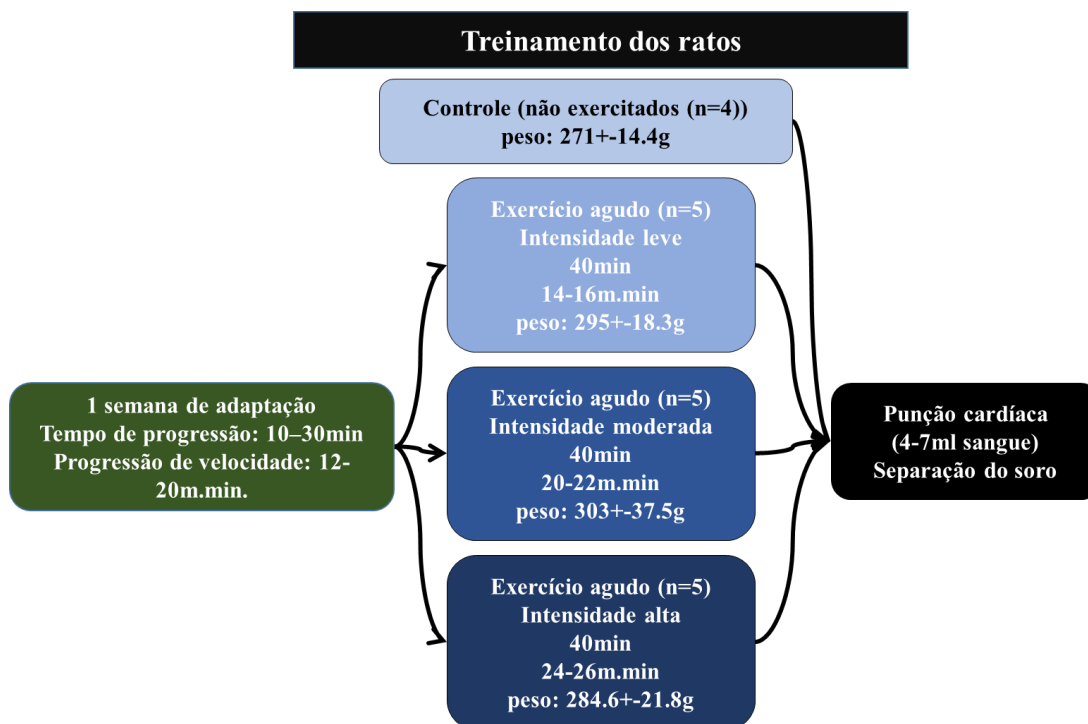


Figura 9. Fluxograma representando a metodologia empregada no exercício aeróbio agudo dos ratos.

4.3.2 Coleta de soro

Ao final do período do exercício, os animais foram sacrificados por sedação letal com xilazina 2% (50mg.kg⁻¹) e quetamina 10% (80mg.kg⁻¹). Após a sedação, foi feita uma punção cardíaca a fim de obter o sangue dos animais. Entre 4 e 7ml de sangue foram coletados por punção cardíaca em tubos contendo ativador de coágulo e o soro pobre em plaquetas foi obtido após centrifugação a 1.200 x g por 15min. A separação do soro foi feita até 3 horas após a coleta. Em seguida, o soro foi armazenado em freezer -80°C.

4.3.3 Purificação de VEs

A purificação de vesículas extracelulares foi feita utilizando o kit comercial Exoquick™ *Exosome Precipitation Solution* (System Biosciences) seguindo as recomendações do fabricante. Inicialmente 500µL de soro foram centrifugados a 3.000 x g por 15 minutos para garantir a remoção de células e *debris* celulares. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e 126µL de Exoquick foi adicionado ao sobrenadante, misturados por

inversão do tubo 10 vezes e incubados *overnight* a 4°C. Em seguida, a mistura Exoquick/soro foi centrifugada por 1.500 x g por 30min a temperatura ambiente. Após essa centrifugação as VEs são “pelletadas” no fundo do tubo. O sobrenadante foi removido por aspiração com pipeta e nova centrifugação por 1.500 x g por 5 minutos para garantir a completa remoção de Exoquick, tomando cuidado para não remover as VEs presentes no pellet. Para finalizar, o *pellet* foi ressuspensionado em 200µL de tampão PBS 1X. Destes 200µL, 50µL foram utilizados para todas as metodologias de caracterização de exossomas e 150µL foram utilizados na extração de smallRNA.

4.3.4 Contagem e concentração de VEs utilizando resistência de pulso

A determinação da concentração de partículas por mL no soro foi feita utilizando a tecnologia de resistência de pulso (IZON, Christchurch, New Zealand). Resumidamente a tecnologia se baseia no monitoramento de fluxo de corrente elétrica que passa através de um poro de abertura ajustável. Partículas únicas são medidas em tempo real e em alta performance. Amostras de VEs foram diluídas 40x em tampão PBS 1X e 40µL de VEs foram lidas utilizando os seguintes parâmetros: tamanho do poro NP150; abertura do poro 49mm; Corrente utilizada 0,28V e pressão 1cm.H₂O. A corrente média entre todas as amostras variou entre 126,83nA e 129,30nA. A análise da concentração de partículas foi feita utilizando o software *Izon Control Suite* versão 2.2. A calibração foi feita utilizando esferas de diâmetros e concentrações conhecidos diluídos em PBS e medidos de forma idêntica as amostras.

4.3.5 Microscopia eletrônica de Transmissão

Grids de nickel de 200mesh foram limpos por lavagens de 10 segundos em acetona, 10 segundos em etanol 100% e 10 segundos em água destilada. Em seguida, os *grids* foram revestidos com resina plástica Formvar 0,5% diluído em clorofórmio 100%. O protocolo utilizado na preparação de MET foi baseado no protocolo descrito por (LASSER; ELDH; LOTVALL, 2012).

O processamento das amostras de VEs, foi feito inicialmente depositando uma gota de 10µL de VEs em *parafilm*. Em seguida, *grids* de nickel revestido com resina plástica Formvar e os *grids* revestidos foram colocados no topo da gota de VEs por 30 a 60 min. Os *grids* foram

lavados três vezes, cada lavagem utilizando gotas de 30 μ L de PBS 1X em filme plástico. Os *grids* contendo VEs foram fixados em uma gota de paraformaldeído a 2% por 10 min e lavados novamente por três vezes utilizando PBS1X antes da imunomarcção. O *grid* foi transferido para uma gota de 30 μ L contendo anticorpos primários anti-CD63, CD09 e CD81 na concentração de 1:50. Os *grids* foram incubados por 40 min com anticorpos primários e lavados com BSA 0,1% em PBS1X. Em seguida, os *grids* foram incubados com anticorpo secundário anti-IGG de coelho conjugado a partícula de ouro de 10nm, na concentração de 1:20. Os *grids* foram pósfixados com glutaraldeído 2,5% e incubados por 10 min. Os *grids* foram lavados por cinco vezes utilizando água destilada. Finalmente, os *grids* foram contrastados com acetato de uranila 3% e incubados no topo da gota por 15 min. As imagens foram adquiridas utilizando 80 KVs em microscópio eletrônico de transmissão modelo JEOL 1011, do laboratório de microscopia eletrônica da Universidade de Brasília.

4.3.6 Microscopia de Força Atômica

Vesículas extracelulares ressuspensas em PBS1X foram diluídas 100 vezes e 1 μ L de amostra foi aplicado em placa contendo superfície atômica lisa de mica muscovita. Após aguardar a secagem completa da amostra foram feitas leituras de 20 μ m x 20 μ m de área utilizando modo contato, varredura do tipo contínua e força constante (5nA). O microscópio de força atômica utilizado foi SPM-9600 (Shimadzu, Kyoto, Japão). Além da aquisição da topografia das VEs, as imagens foram adquiridas em contraste de fase simultaneamente. Os resultados obtidos foram analisados por meio do programa Shimadzu SPM-9600. As imagens sofreram correção na média de cada linha no eixo X, planefit (auto) e Zmag de 3.0 para 0.5. A contagem de partículas foi feita excluindo as partículas das bordas das imagens e foram contadas aproximadamente 700 partículas por grupo (não exercitadas, exercitadas nas intensidades, leve, moderada e intensa).

4.3.7 Espalhamento de luz dinâmica (DLS)

A técnica de espalhamento de luz dinâmica foi utilizada para determinar o perfil da distribuição de tamanho de pequenas partículas em suspensão ou polímeros em solução. Além disso, o espalhamento de luz dinâmica permite avaliar o potencial zeta de superfície das VEs,

que tem relação com as cargas eletrocinéticas de moléculas biológicas presentes nas membranas de VEs. Primeiramente, 5 μ L de VEs foram diluídas 200 vezes em água Milli-Q até um volume final de 1ml. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15.000 x g para garantir a completa remoção de precipitados de PBS 1X presente nas VEs que podem interferir no resultado. O sobrenadante foi coletado e colocado em cubetas de vidro para medição do diâmetro. O controle negativo (5 μ L de PBS 1X) foi utilizado para fazer o controle (zerar o equipamento) no equipamento Zetasizer Nano (Malvern). Os valores obtidos correspondem à média \pm desvio padrão de cinco medidas de cada suspensão de VEs. O índice de polidispersão também foi medido.

4.3.8 Identificação de proteínas marcadoras

A extração de proteínas de vesículas extracelulares (VEs) foi feita utilizando alíquotas de 5 μ L de VEs, diluídas em 50 μ L de tampão de extração de proteínas RIPA 1X (150 mM NaCl; 1.0% Triton X-100; 1% desoxicolato de sódio; 0.1% SDS; 25 mM Tris-HCL, pH 7,4), e agitadas por 20s. O volume de 0,5 μ L de coquetel inibidor de protease foi adicionado, para evitar a degradação de proteínas, e o conteúdo de proteínas totais de VEs, quantificado e analisado em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%.

A quantificação de proteínas foi realizada utilizando o kit *Qubit® Protein Assay* (Life Technologies) de acordo com as recomendações do fabricante. O perfil de proteínas totais de VEs e de proteínas marcadoras de exossomas foram identificadas por *Western blotting* (WB). Foram acrescentadas às 4 amostras (controle, leve, moderado e intensa) um controle positivo contendo proteínas extraídas de células de mioblastos e um controle negativo contendo PBS 1X. Ambos os controles passaram pelo mesmo procedimento de extração, quantificação e WB. Para isso, inicialmente as proteínas foram separadas por tamanho em eletroforese de proteínas em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12% em cuba de eletroforese (Bio-Rad Mini Protean II). Em cada gel foi aplicado uma concentração de 20 μ g de proteína totais extraída por poço. A eletroforese foi realizada com voltagem de 150V e amperagem de 15mA por 2h. Um gel foi corado com *Coomassie blue* e as proteínas dos outros géis foram transferidas para membranas de *Polyvinylidene Difluoride* (PVDF). A transferência foi feita semi-seca utilizando o transferidor *Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell*, Bio-rad em tampão de transferência contendo 48mM Tris, 39mM glicina, 20% (v/v) metanol e 1,3mM SDS. A transferência foi feita por 1h em voltagem de 15V e amperagem de 200mA. Após a transferência, os géis foram

corados com comassie para se analisar a eficiência da transferência. As membranas foram bloqueadas por 1h em BSA3% diluído em tampão TBST 1X (50mM Tris.HCl pH 7.4; 150mM NaCl; 0.1% Tween 20).

Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpos primários policlonais de coelho anti-CD63, anti-calnexina, anti-CD81 e anti-ApoA-IV (*Santa Cruz Biotechnology*), todos na concentração de 1:500 diluídos em BSA 1% em tampão TBST 1X *overnight*. Após três lavagens de 10min com TBST 1X, o anticorpo secundário anti-IGG de coelho e anti-IGG de cabra (1:1000; Sigma), conjugados com fosfatase alcalina, foram aplicados às membranas, e incubadas por 1h em BSA 1% diluído em tampão TBST 1X. Após 3 lavagens de 10min com TBST 1X as membranas foram reveladas utilizando revelador NBT/BCIP (*AP color development buffer, Bio-rad*) até o surgimento da cor. A revelação foi interrompida utilizando água deionizada por 10 min.

Todos os anticorpos utilizados nos dois capítulos da tese estão representados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Lista de anticorpos utilizados nos projetos para detecção de proteínas por *Western Blotting* e Microscopia eletrônica de Transmissão.

	Anticorpos utilizados	Fabricante
Anticorpos primários	TSG 101 ANTICORPO (M-19), GOAT, IgG, 200µg/mL	SANTA CRUZ
	ALIX ANTICORPO (Q-19) GOAT IGG, 200 µG/ML	SANTA CRUZ
	APOA-IV (N-20) GOAT IGG 200 µG/ML	SANTA CRUZ
	CALNEXIN (H-70) RABBIT IGG - 200 µg/ml	SANTA CRUZ
	CD9 ANTICORPO (H-110) RABBIT IGG, 200 µG/mL	SANTA CRUZ
	CD81 ANTICORPO (H-121) RABBIT IgG, 200 µG/mL	SANTA CRUZ
	CD63 ANTICORPO (H-193), RABBIT IgG - 200µg/mL	SANTA CRUZ
	FLOTILLIN-1(H-104)RABBIT POLYCLONAL IGG -200 µg/mL	SANTA CRUZ
	ANTI-RABBIT IGG F(AB') ₂ , F(AB') ₂ FRAGM&	Sigma
	ANTI-GOAT IGG (H+L), F(AB') ₂ FRAGMENT,&	Sigma

**Anticorpo conjugado com
ouro**

Ac policlonal de cabra anti IgG de
coelho H&L (10nm Gold)

Abcam

A análise quantitativa das bandas obtidas no *western blotting* foram feitas inicialmente correndo géis em paralelo corados em comassie como controle de carregamento. Em seguida, as áreas sob as curvas das amostras exercitadas nas intensidades leve, moderada, intensa, controle positivo e controle negativo foram divididas pela área sob a curva da amostra não exercitada utilizando o software de análise de imagens ImageJ.

4.3.9 Extração de RNA

A extração de smallRNA de VEs foi feita utilizando 150 µL de amostras ressuspendidas em PBS1X utilizando o kit de extração *miRCURY™ RNA Isolation Kit* (Exiqon) e seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, 150 µL de VEs foram misturadas com 60 µL de solução de lise BF, vortexados por 5 segundos e incubados por 3 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 20 µL de solução de precipitação de proteína BF, vortexados por 5 segundos, incubados por 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugados por 3 minutos a 11.000 x g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, foi adicionado 270 µL de isopropanol 100%, vortexados por 5 segundos, a amostra foi transferida para colunas *microRNA Mini Spin Column BF*, incubadas por 2 minutos a temperatura ambiente e centrifugadas por 30 segundos a 11.000 x g. Descartaram-se as amostras que passaram pela coluna. Em seguida, adicionou-se 100 µL de solução de lavagem 1BF dentro da coluna e centrifugou-se por 30 segundos a 11.000 x g. Novamente o material que passou pela coluna foi descartado. Adicionou-se 700 µL de solução de lavagem 2BF a coluna e centrifugou-se por 30 segundos a 11.000 x g. Descartou-se o material que passou pela coluna. Adicionou mais uma vez 250 µL de solução de lavagem 2BF a coluna, centrifugou-se por 2 minutos a 11.000 x g para a completa secagem da coluna. A coluna foi transferida para um novo tubo e o RNA eluído após duas lavagens com 50 µL cada de água livre de RNase colocada diretamente na membrana, incubada por 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugadas por 1 minuto a 11.000 x g.

4.3.10 Caracterização e quantificação de pequenos RNAs em Bioanalyzer

Os pequenos RNAs extraídos foram encaminhados para análise em Bioanalyzer 2100 (Agilent). Foi utilizado o chip *Agilent Small RNA kit* que permite uma análise rápida e sensível na caracterização de pequenos ácidos nucleicos na faixa de tamanho de 6-150 nt.

4.3.11 Sequenciamento de pequenos RNAs em Illumina GAII-X

Um total de 18 amostras (não exercitados n=4, exercício leve n=5, exercício moderado n=4, exercício intenso n=5) foram secas utilizando RNAsstable (Biomatrica) e enviadas a *facility SeqMatic* (San Diego, USA) onde as bibliotecas foram geradas e o sequenciamento foi feito. As bibliotecas foram feitas utilizando o kit de preparo de bibliotecas de pequenos RNAs *small RNA library preparation kit* (Illumina, San Diego, EUA). O sequenciamento foi feito em uma única *lane, single read* e o kit de sequenciamento utilizado foi o de 36 pares de base. Foi utilizado o sequenciador *Genome Analyzer Iix* que gera mais de 40 milhões de *reads* e 1.5 Gb de *output por lane*. As amostras C1, C4, M1, M2, M3, M4, I2 e I5 foram sequenciadas duas vezes (réplicas técnicas) com objetivo de se obter números de *reads* mais representativos para essas amostras.

4.3.12 Análises de bioinformática usando NextGene

Após os dados serem gerados foram feitas duas análises de bioinformáticas principais. A primeira análise foi feita utilizando o software comercial NEXTGENE® (SoftGenetics). O software NextGENE é executado no sistema operacional Windows®, e fornece interface amigável para análise de dados de NGS, não necessitando de apoio de linguagem de bioinformática que são muitas vezes necessárias ao utilizar programas como o CLC Bio, Lasergene, DNASTAR, MAQ, SOAP, Top Hat, BWA e Bowtie. Todo o processamento de conversão dos dados de FastQ para fasta, trimagem do *reads*, alinhamento e contagem dos *reads* foi feito pelo software. Foi utilizado parâmetro de alinhamento de 85%, ou seja, no máximo 2 *mismatches* em 12 bases. O *pipeline* utilizado seguiu algumas publicações envolvendo análises de pequenos RNAs. Após a filtragem de *reads* de baixa qualidade e *trimming* dos adaptadores os *reads* foram alinhados contra bancos de dados na seguinte ordem: miRNAs maduros disponível no miRBase, piRNAs disponível no piRNABank e para finalizar rRNA e tRNA disponível no banco de dados de RNA não codificadores do Ensembl. Em seguida, os *reads*

que não mapearam nos bancos de dados foram utilizados na busca por miRNAs exógenos que circulam dentro de exossomas no soro. Para isso, os *reads* não mapeados foram alinhados contra o banco de dados de miRNAs maduros disponíveis no miRBase para todas as espécies. O cálculo de expressão diferencial foi feito com o auxílio do pacote Deseq2 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014), no ambiente R. RNAs alinhados no genoma e sem descrição foram utilizados na busca de novos miRNAs utilizando a ferramenta de predição de miRNAs miRDeep2.

4.3.13 Análise estatística dos dados

As análises estatísticas para determinar a concentração de VEs, concentração de proteínas e RNAs associadas a VEs foram feitas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com as múltiplas comparações feitas pelo teste U de Mann-Whitney. O teste de Shapiro-Wilk foi feito para checar a normalidade dos dados. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Para a análise dos dados de sequenciamento, as amostras que foram sequenciadas duas vezes tiveram seus *reads counts* somados e foi preparada uma planilha contendo o número de *reads* de RNA por amostra no formato .CSV. Essa planilha foi utilizada como *input* das análises estatísticas. A análise estatística da expressão diferencial dos *reads* gerados pelo sequenciamento foi feita utilizando a distribuição binomial negativa por meio do pacote Deseq2 (Bioconductor). O valor de P ajustado foi considerado estatisticamente significativo se $P_{adj} < 0,1$. Os *heatmaps* contendo os 30 miRNAs mais presentes nas amostras foram gerado também pelo Deseq2.

4.4 Resultados

4.4.1 Exercício aeróbio agudo dos ratos

As tabelas a seguir mostram os valores de peso (**Tabela 2**), tempo de exercício, velocidade aplicada na esteira e máximo estado estável de lactato (MLSS) (**Tabela 3**) dos ratos utilizados no projeto. Os dados foram medidos antes e durante o exercício agudo.

Tabela 2. Peso em gramas dos ratos *Winstar* de linhagem isogênica avaliados no estudo.

Não exercitados (n=4)	Exercício leve (n=5)		Exercício moderado (n=5)		Exercício intenso (n=5)		
	peso (g)		peso (g)		peso (g)		
NE1	260	L1	310	M1	300	I1	270
NE2	290	L2	270	M2	265	I2	255
NE3	265	L3	300	M3	265	I3	300
NE4	/	L4	280	M4	355	I4	313
XX	XX	L5	315	M5	330	I5	285
Media	271,7	Média	295	Média	303	Média	284,6
DP±	14,4	DP±	18,3	DP±	37,5	DP±	21,8

Tabela 3. Velocidade aplicada em esteira, máximo estado estável de lactato e tempo aplicados durante exercício aeróbio agudo de ratos *Winstar*.

	Não exercitados	Leve	Moderado	Intenso
Vel. (m.min)	sem exercício	14-16m.min	20-22m.min	24-26m.min
Lim de Lact	n/a	20% ↓ do MLSS	no MLSS	20% ↑ do MLSS
Tempo (min)	n/a	40min	40min	40min
Distancia (metros)	0	640	880	1.040

4.4.2 Contagem e concentração de VEs utilizando resistência de pulso

Após a coleta do sangue dos animais, separação do soro, purificação de VEs, foi feita a contagem de VEs presentes por mL de soro. A análise por resistência de pulso (qNano) das VEs mostrou um aumento estatisticamente significativo (Kruskal-Wallis e Mann-Whitney U) na concentração de VEs no soro dos animais exercitados comparado aos animais não exercitados (**Figura 10**). A mediana da concentração de VEs no grupo controle foi de $1,1 \times 10^9$, no grupo exercitado na intensidade leve de 3×10^9 partículas/mL ($p=0,014$), no grupo exercitado na

intensidade moderada de $2,5 \times 10^9$ ($p=0,021$) partículas/mL e no grupo exercitado em alta intensidade de 3×10^9 partículas/mL ($p=0,02$). Não houve diferença estatística na concentração de VEs entre os exercícios leve, moderado e intenso.

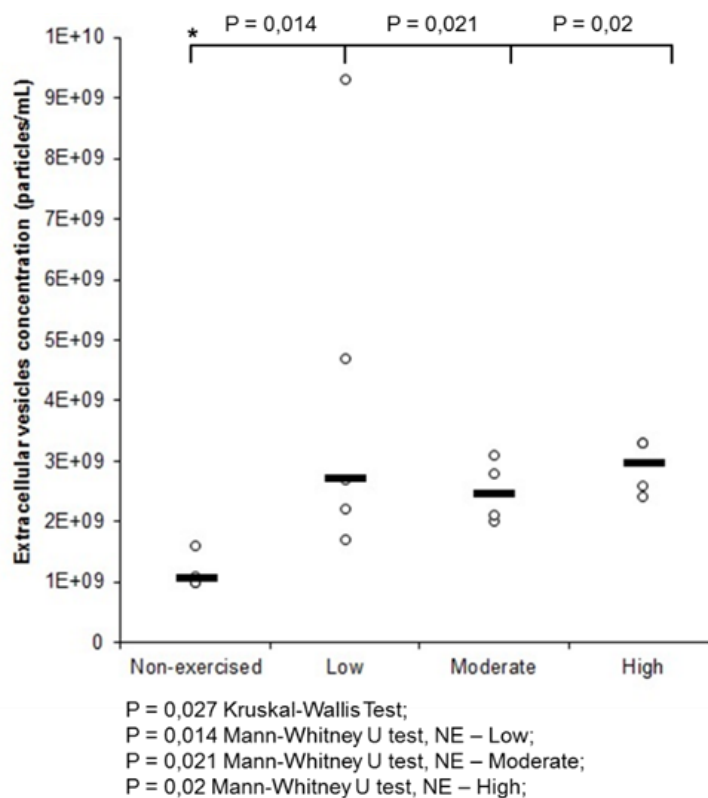


Figura 10. Concentração de VEs por mL de soro em animais não exercitados e exercitados nas intensidades leve, moderada e intensa.

4.4.3 Microscopia eletrônica de VEs

As imagens de VEs obtidas mostram vesículas com morfologia, tamanho e proteínas de membrana compatíveis com as vesículas consideradas Exossomas (**Figura 11**). Foram feitas várias preparações, partindo inicialmente da análise da morfologia e tamanho.

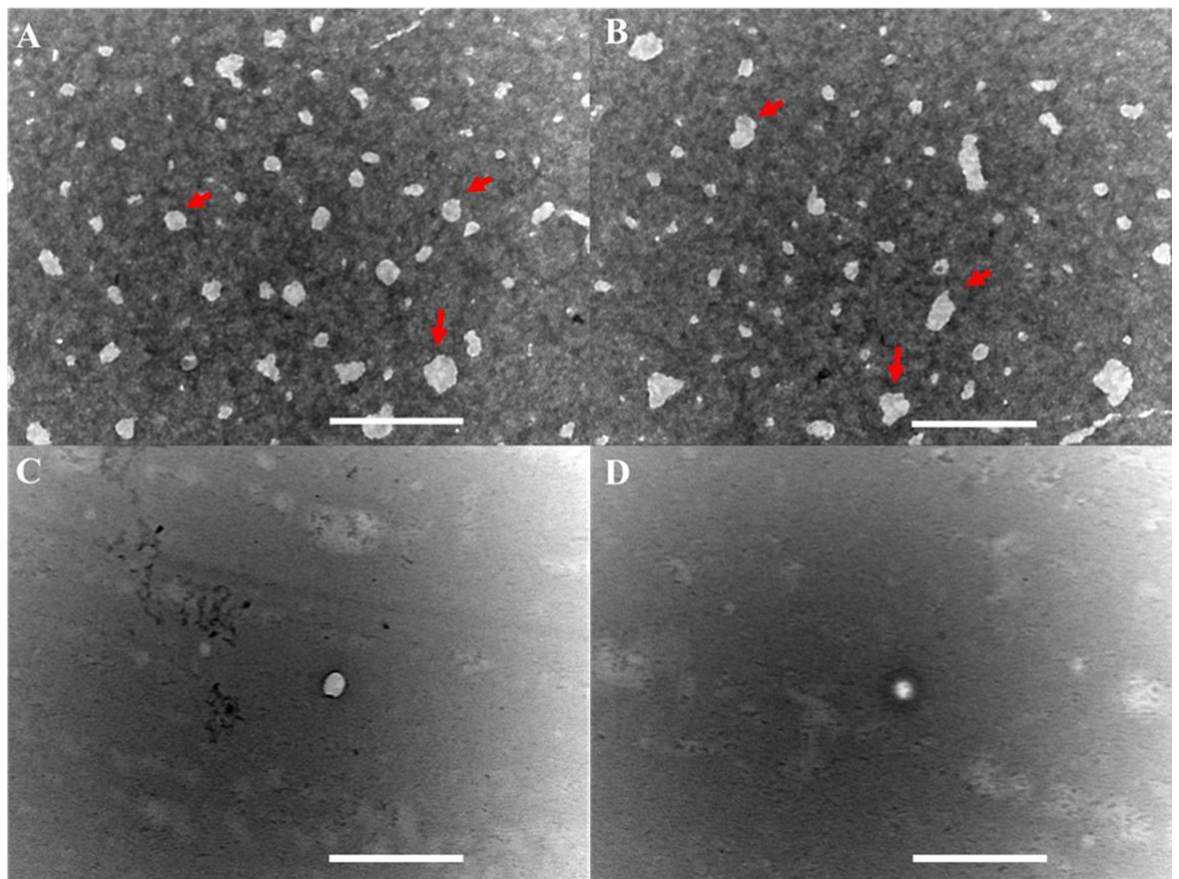


Figura 11. Micrografias eletrônicas de purificado de VEs de soro de ratos mostrando a presença de partículas com morfologia e tamanho compatíveis com Exossomas (A) e (B) e mostrando o controle negativo em (C) e (D). Barra de escala = 500nm. As setas vermelhas indicam as vesículas extracelulares.

A imunomarcção de VEs com anticorpos relatados na literatura para proteínas enriquecidas em purificações de exossomas (CD9, CD63) foi feita como demonstrado na **Figura 12**. Os resultados sugerem a presença de um grande número de partículas com morfologia e tamanho compatíveis com exossomas, entre 30 e 100 nm. A imunomarcção mostrou a presença de poucas partículas positivas para as proteínas CD09 e CD63 (**Figura 12A** e **Figura 12C**). Os controles negativos foram ausentes para partículas com tamanho e morfologia compatíveis com VEs e mostraram a presença de ouro porém em baixa concentração e espaçadas (**Figura 12B** e **Figura 12C**).

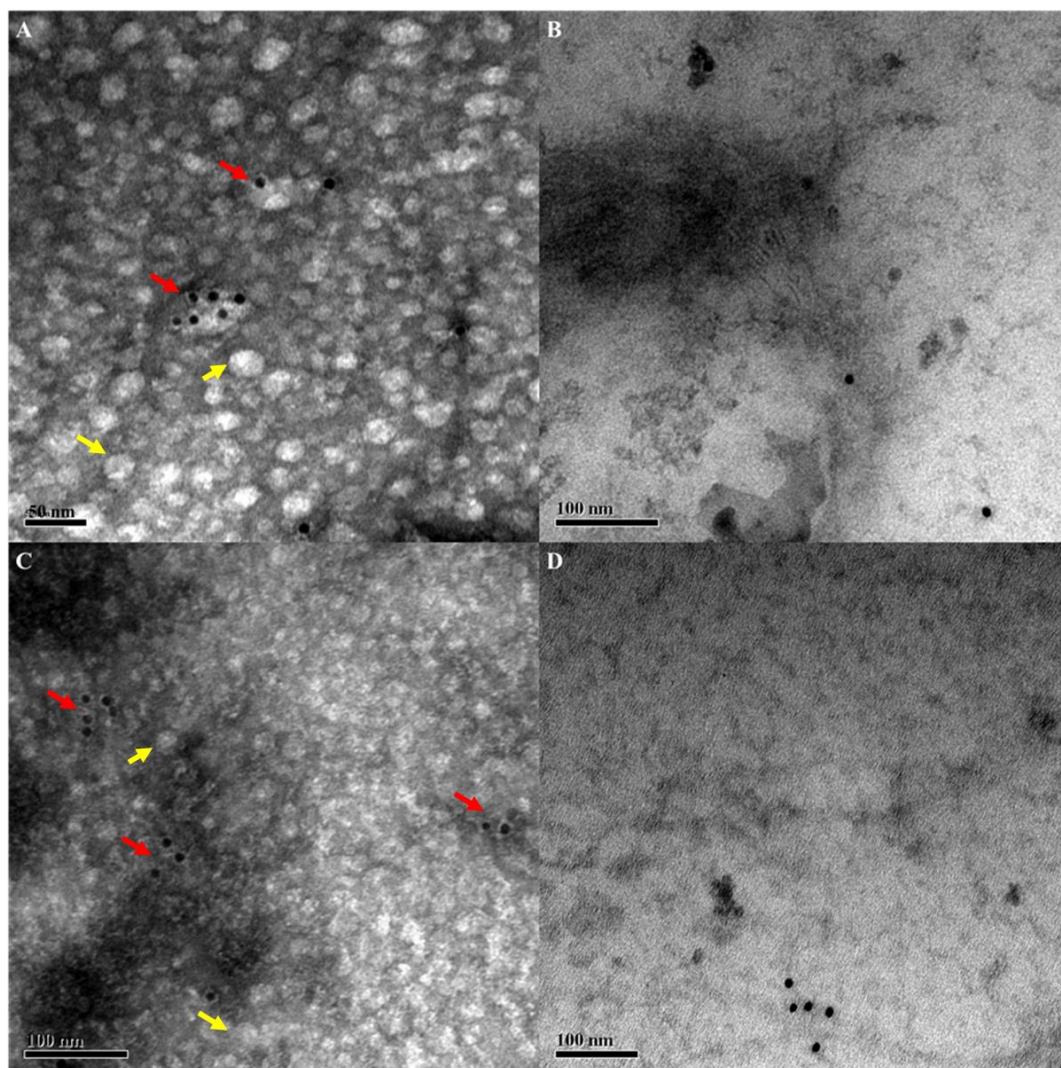


Figura 12. Micrografias eletrônicas de purificado de VEs de soro de ratos mostrando a presença de partículas com morfologia e tamanho compatíveis com Exossomas e a presença de partículas de ouro representando indiretamente a presença de proteínas CD63 (A) e CD09 (C). As setas vermelhas indicam vesículas positivas para marcação, já as setas amarelas sinalizam vesículas não marcadas. As amostras B e D (controles negativos) foram preparadas substituindo as VEs por PBS1X e incubando com os anticorpos anti-CD63 (B) e CD09 (D).

4.4.4 Microscopia de força atômica de VEs

As amostras purificadas de VEs dos 4 grupos estudados (controle (não exercitado), exercício leve, exercício moderado, exercício intenso) foram analisadas em relação a sua altura média, média da área de superfície e volume em nanômetros cúbicos por microscopia de força atômica. As imagens de topografia adquiridas mostram as partículas mais altas com coloração

mais clara enquanto partículas mais baixas são mostradas em coloração mais escura (**Figura 13**).

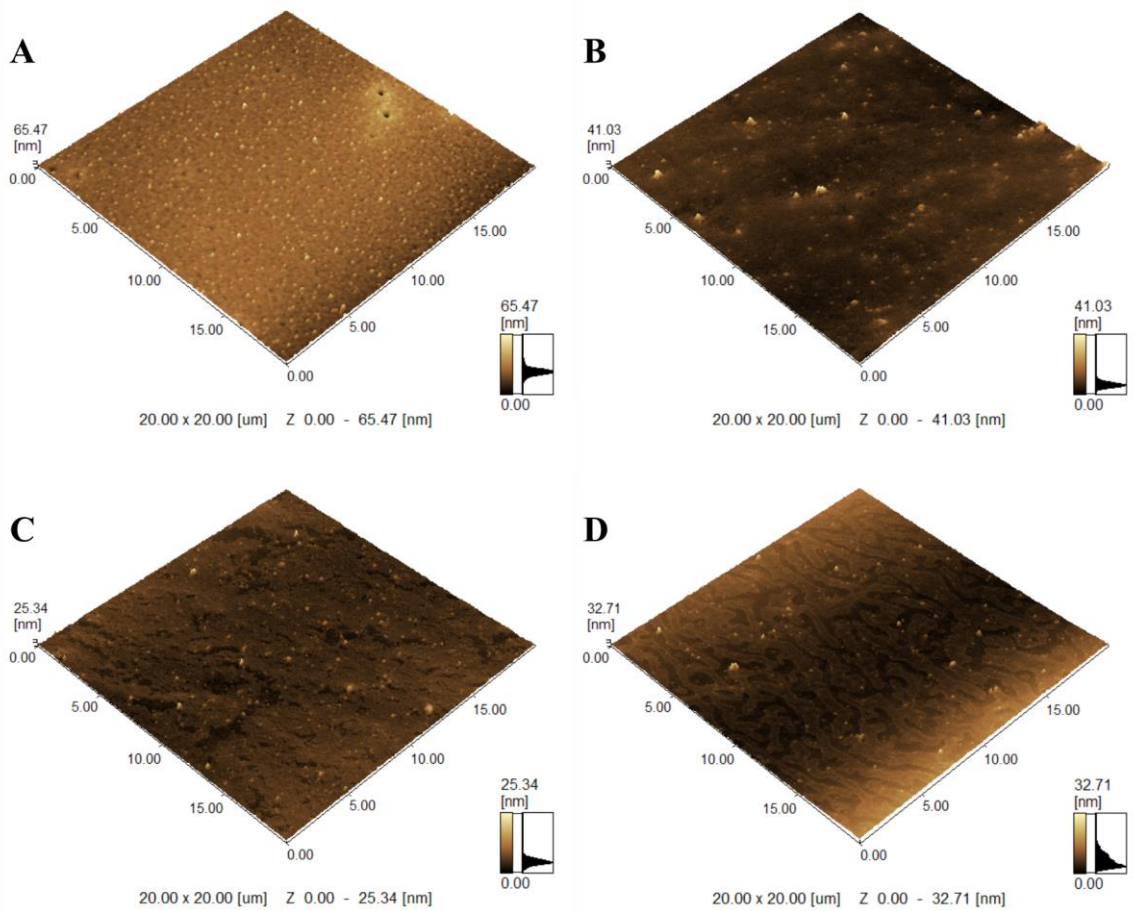


Figura 13. Imagem de topografia de VEs purificadas do soro de ratos exercitados em diferentes intensidades. (A) Pool de VEs do grupo controle (não exercitado) diluídas 1:10. (B) Pool de VEs do grupo exercitado na intensidade leve diluída 1:100. (C) Pool de VEs do grupo exercitado na intensidade moderada diluída 1:100 e (D) pool de VEs do grupo exercitado na intensidade intensa diluída 1:100.

A altura, área de superfície e volume das partículas foram contabilizadas. Os resultados mostram diminuição do tamanho médio da altura, da média da área de superfície e do volume conforme se aumenta a intensidade do exercício (**Tabela 4**).

Tabela 4. Amostras purificadas de VEs foram analisadas em relação à altura média por microscopia de força atômica.

	Não exercitados	Desvio Padrão	Leve	Desvio Padrão	Moderado	Desvio Padrão	Intenso	Desvio Padrão
Média da altura (nm)	45,38	± 7,39	23,3	±8,03	11,17	± 1,88	16,7	± 4,39

4.4.5 Espalhamento de luz dinâmica de VEs

As amostras purificadas de VEs dos 4 grupos estudados (controle (não exercitado), exercício leve, exercício moderado, exercício intenso) foram analisadas em relação ao diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta de superfície e condutividade por espalhamento de luz dinâmica. Os resultados mostram que houve diminuição da média do diâmetro das partículas apenas no grupo leve, havendo aumento do diâmetro nos grupos moderado e intenso em relação ao controle (**Tabela 5**). O índice de polidispersão também aumentou nos grupos exercitados em relação ao controle e o potencial zeta se manteve estável.

Tabela 5 Amostras purificadas de VEs foram analisadas em relação ao diâmetro médio, índice de polidispersão, potencial zeta de superfície e condutividade por espalhamento de luz dinâmica.

	Não exercitados	Leve	Moderado	Intenso
Média em Z	201,8±23,33	130,53±5,60	242,8±12,1	245,9±28,01
Índice de polidispersão	0,528	0,699	1	1
Potencial Zeta	-18,7	-15	-20,5	-17,55

4.4.6 Quantificação e identificação de proteínas associadas a VEs

Proteínas purificadas de amostras de VEs dos 4 grupos estudados (não exercitados, exercício leve, exercício moderado, exercício intenso), foram quantificadas independentemente (n=18) em *Qubit® Fluorometer*. O teste não paramétrico de comparação de grupos Kruskal-Wallis e o teste de comparações múltiplas de U Mann-Whitney indicou diferença estatística na comparação entre os grupos não exercitados e exercitados nas intensidades leve, moderada e intensa (p<0,05) (**Figura 14**). A mediana da concentração de proteínas de VEs partiu de 0,935mg/mL no grupo não exercitado para 4,33mg/mL no grupo exercitado na intensidade leve

($p=0,014$), $4,31\text{mg/mL}$ no grupo exercitado na intensidade moderada ($p=0,014$) e $4,31\text{mg/mL}$ no grupo exercitado em alta intensidade ($p=0,014$).

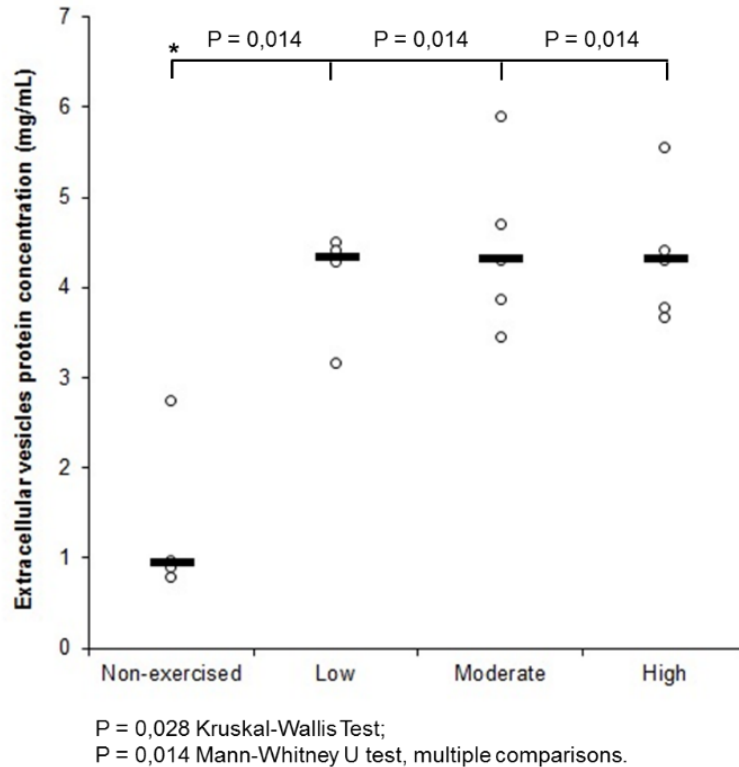


Figura 14. Quantificação de proteínas totais purificadas de VEs do soro de ratos não exercitados, exercitados nas intensidades leve, moderada e intensa.

Após a purificação e quantificação de proteínas de VEs, as amostras foram separadas por SDS-PAGE 12% e analisadas em relação as proteínas totais presentes (**Figura 15**) e em relação às proteínas previamente descritas na literatura relacionadas a diferentes compartimentos celulares. Percebe-se a presença de proteínas de diferentes massas moleculares presentes associadas a VEs purificadas do soro. O perfil total de proteínas na fração purificada pelo Exoquick (VEs) é diferente do perfil de proteínas da fração sobrenadante. A fração sobrenadante mostra grande concentração de proteínas por volta de 60KDa, possivelmente albuminas e IGG (**Figura 15**).

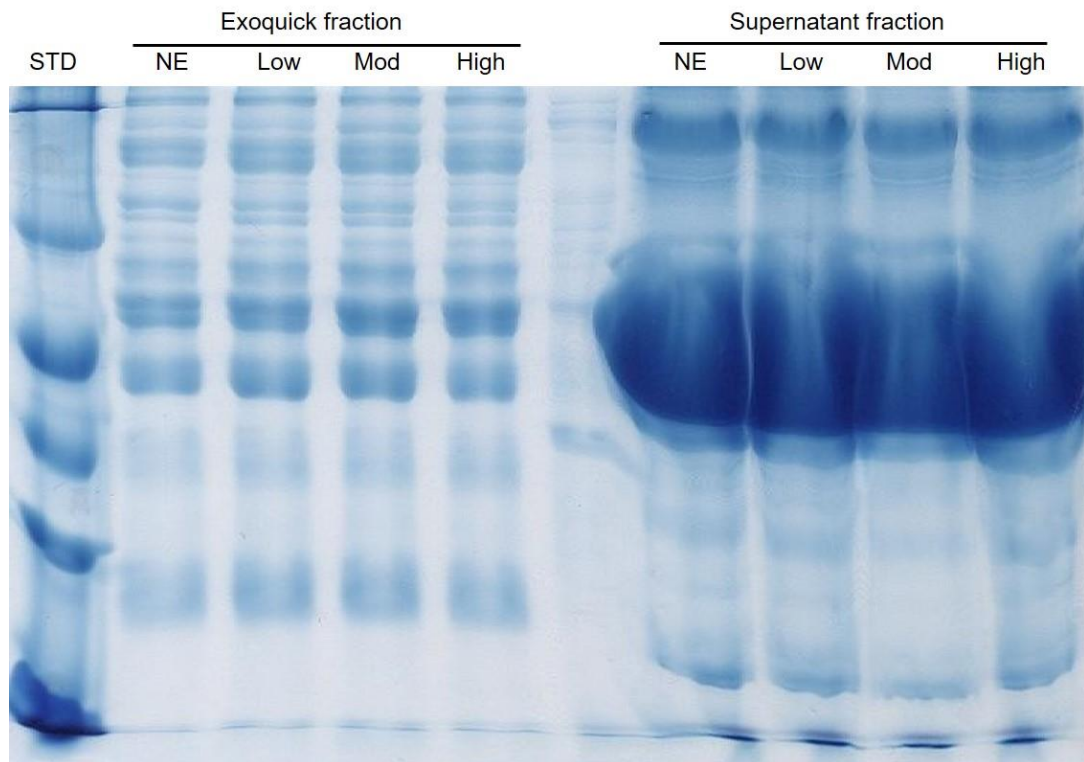


Figura 15. Perfil de proteínas totais separadas por eletroforese de proteína em gel de acrilamida 12%. As proteínas foram extraídas de VEs purificadas do soro de ratos exercitados em diferentes intensidades. STD = Marcador Bio-rad *Broad-Range*; NE = grupo não exercitado (controle).

Após a análise das proteínas totais extraídas das VEs por SDS-PAGE, foi feita a transferência das proteínas dos géis para membranas de PVDF a fim de se analisar proteínas específicas já previamente descritas em populações de exossomas e células.

As análises de proteínas enriquecidas em preparações de exossomas e células mostraram que a população e VEs mostra-se ausente de proteínas marcadoras de vesículas secretadas pelo retículo endoplasmático (calnexina), ao mesmo tempo que mostra-se positivo para proteínas previamente descritas enriquecidas em uma classe de vesículas extracelulares (CD63 e CD81). A presença de CD63 é maior do que a presença de CD81. A proteína calnexina foi positiva apenas no controle positivo, que consiste de proteínas extraídas de células de mioblastos C2C12 (**Figura 16**). A proteína ApoA-IV, marcadora de lipoproteínas de alta densidade, foi encontrada em todos os grupos (NE, Leve, Moderado, Intenso) com um leve aumento nos grupos exercitados nas intensidades moderada e intensa (**Figura 17**).

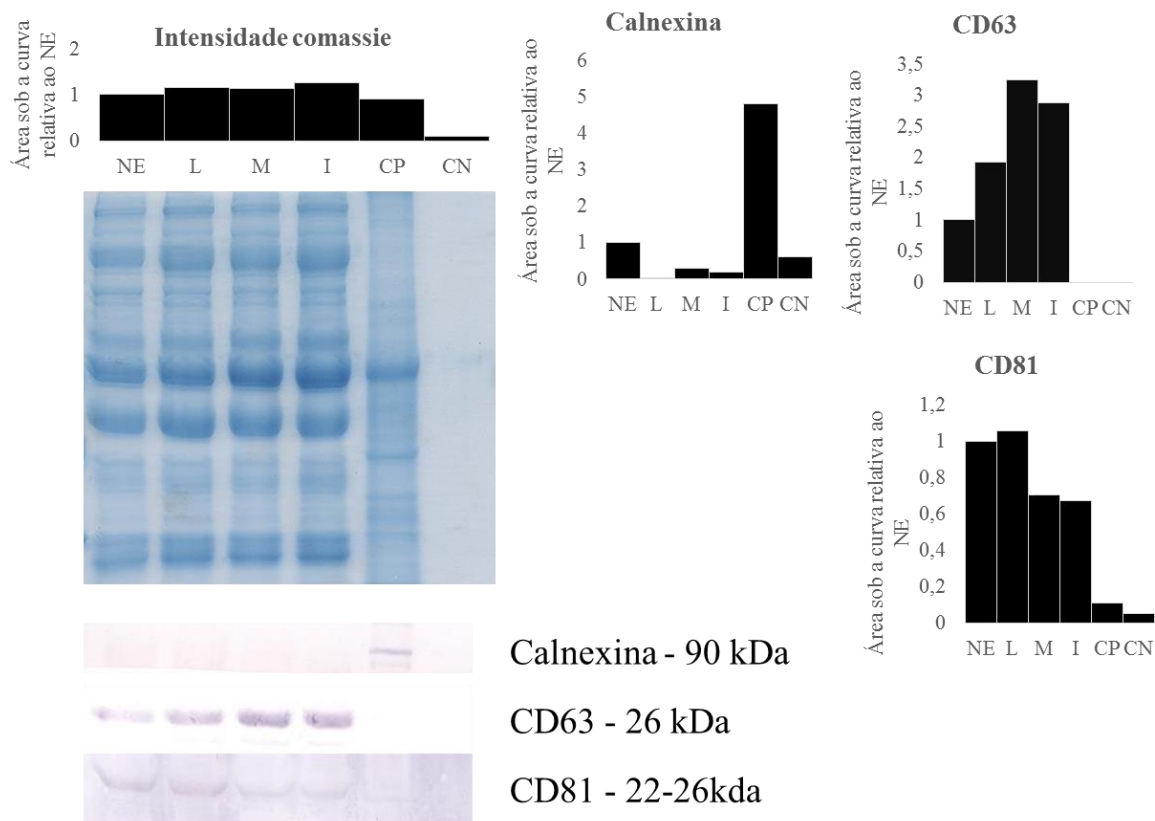


Figura 16. Identificação de proteínas enriquecidas em VEs por *western blotting*. Foram identificadas proteínas marcadoras de vesículas secretadas pelo retículo endoplasmático (Calnexina) e proteínas marcadoras de vesículas secretadas pela via endossomal (CD63 e CD81). NE = grupo não exercitado (controle); L = grupo exercitado na intensidade leve; M = grupo exercitado na intensidade moderada; I = grupo exercitado na intensidade alta.

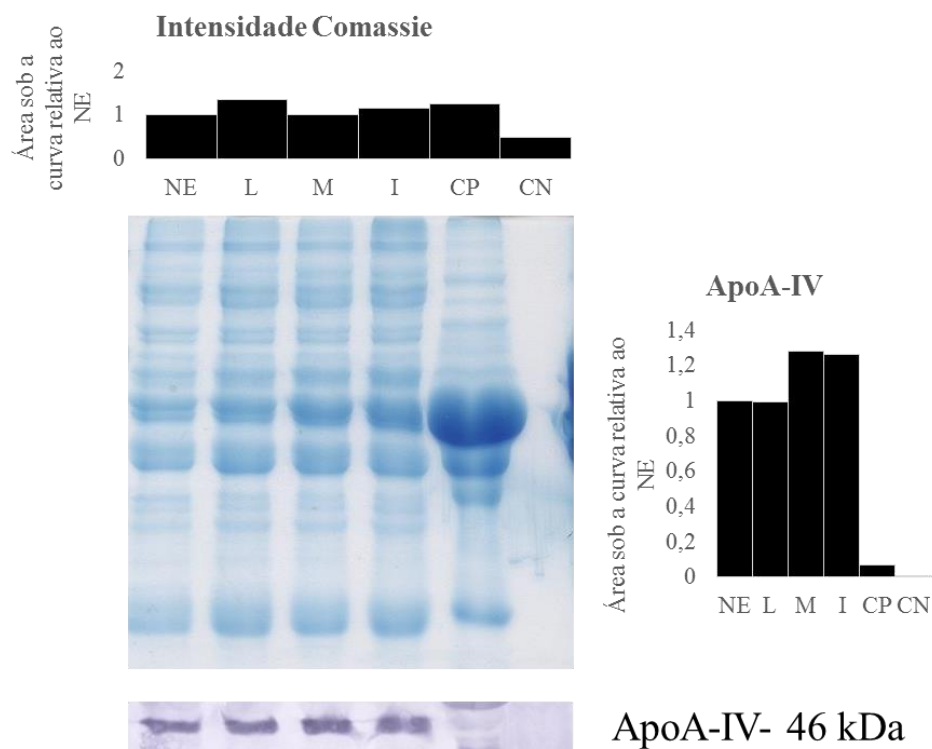


Figura 17. Identificação de ApoA-IV em VEs por *western blotting*. NE = grupo não exercitado (controle); L = grupo exercitado na intensidade leve; M = grupo exercitado na intensidade moderada; I = grupo exercitado na alta intensidade.

4.4.7 Extração, quantificação e caracterização de smallRNA purificados de VEs

Os pequenos RNAs foram extraídos das amostras previamente purificadas de VEs de forma individual de cada grupo, totalizando 19 amostras extraídas. O RNA foi caracterizado utilizando o *RNA 6000 Pico Kit* e caracterizado e quantificado com *Small RNA Analysis Kits* ambos para Bioanalyzer 2100, Agilent. A quantificação com o kit RNA 6000 Pico mostrou o enriquecimento de pequenos RNAs em todas as amostras purificadas e ausência de RNAs ribossômicos 18S e 28S (**Figura 18**).

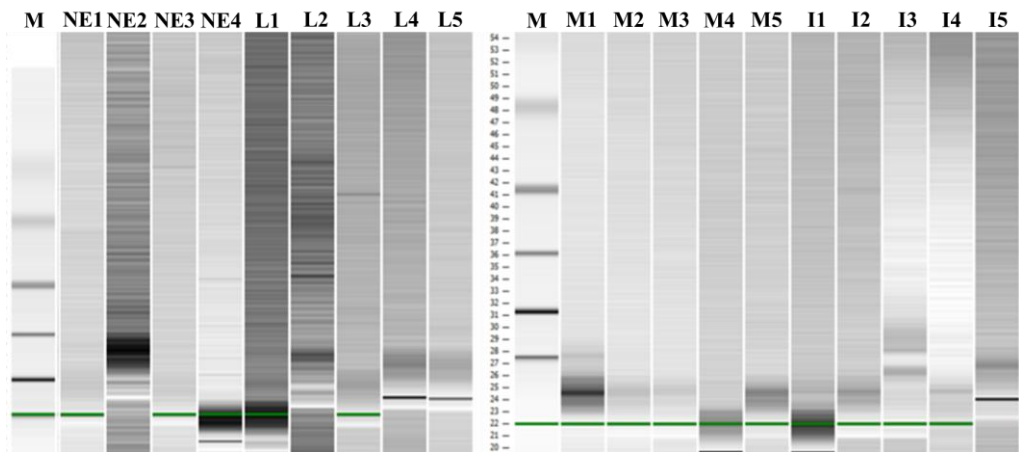


Figura 18. Caracterização das 19 amostras de pequenos RNAs extraídos de ratos exercitados em diferentes intensidades utilizando *Chip RNA pico 6000*. C1 a C4 representam os indivíduos do grupo controle (não exercitado). L1 a L5 representam os animais do grupo exercitado na intensidade leve. M1 a M5 representam os animais do grupo exercitado na intensidade moderada. I1 a I5 representam os animais do grupo exercitado na alta intensidade.

Para melhorar a resolução da caracterização dos pequenos RNAs extraídos foi feita a caracterização com o Chip específico para pequenos RNAs (*Chip small RNA*). Os resultados mostraram o enriquecimento de RNAs de tamanho aproximado entre 20 e 40 nucleotídeos, o que corresponde ao tamanho de microRNAs maduros (**Figura 19**).

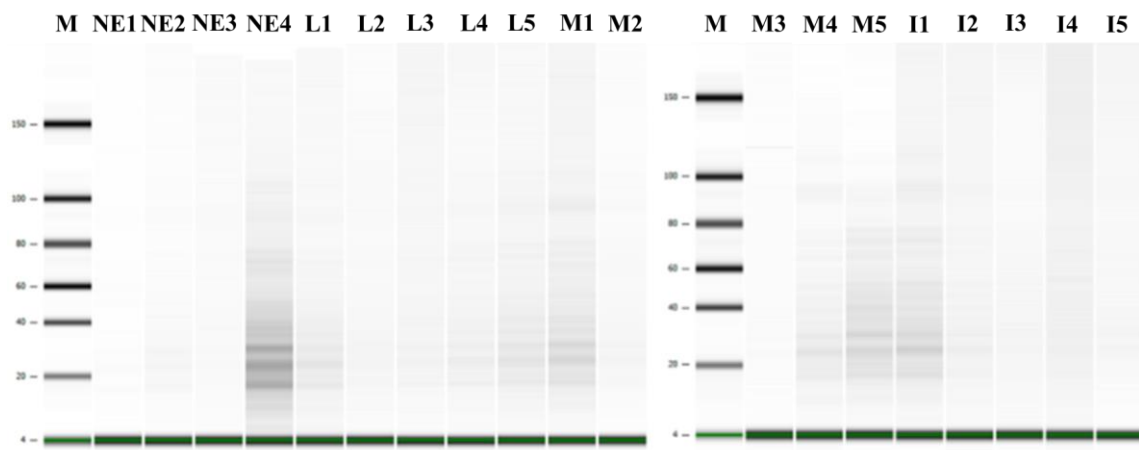


Figura 19. Caracterização das 19 amostras de pequenos RNAs extraídos de ratos exercitados em diferentes intensidades utilizando *Chip small RNA*. C1 a C4 representa o grupo controle (não exercitado). L1 a L5 representa o grupo treinado na intensidade leve. M1 a M5 representa o grupo treinado na intensidade moderada. H1 a H5 representa o grupo treinado na intensidade intensa.

Os resultados gerados pelo Bioanalyzer permitem ainda quantificar o RNA caracterizado em duas classes: pequenos RNAs (até 150 nt) e microRNAs (16 a 30 nt). Não houve diferenças estatísticas nas comparações entre os grupos não exercitados e exercitados nas intensidades leve, moderado e intensa ($p > 0,05$) (**Figura 20**).

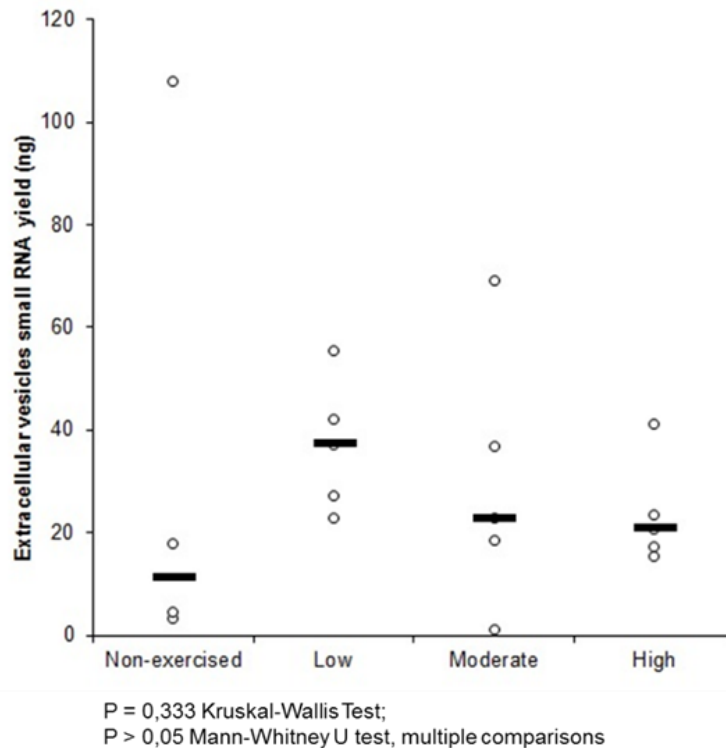


Figura 20. Quantificação de 18 amostras de pequenos RNAs de VEs purificadas do soro de ratos exercitados em diferentes intensidades utilizando *Bioanalyzer small RNA Chip*. Não houve diferença estatística entre os grupos não exercitados e exercitados nas intensidades leve, moderado e intensa ($p > 0,05$).

4.4.8 Sequenciamento de pequenos RNAs em Illumina GA-IIX e análise de bioinformática utilizando alinhador BWA e software NEXTPGENE® (SoftGenetics).

Após a caracterização e quantificação do RNA purificado de VEs, devido à baixa concentração de RNA, todo o RNA foi secado utilizando RNastable® (Biomátrica) conforme as recomendações do fabricante. Em seguida, o RNA foi enviado a *facility SeqMatic*, localizada em Fremont, Califórnia para a construção das bibliotecas de pequenos RNAs e para o

sequenciamento. Após o envio dos arquivos, duas estratégias de bioinformática foram utilizadas para buscar o perfil de microRNAs e outros pequenos RNAs presentes nas amostras. A primeira estratégia fez o uso do *software* de análise de dados de NGS NEXTGENE® (SoftGenetics). Os parâmetros de filtro de qualidade do *software* foram: *median score threshold* ≥ 13 e *called base number of each read* ≥ 16 . Primeiro os dados brutos (Fastq) foram convertidos em fasta e em seguida o adaptador foi trimado das sequencias. A **Tabela 6** representa os valores brutos obtidos no sequenciamento, valores de *reads* após a filtragem, trimagem de adaptador e alinhamento com o banco de dados de microRNAs maduros de *Rattus norvegicus* do miRBase. Importante ressaltar que devido à baixa concentração de RNA presente em amostras de vesículas extracelulares enviada para a construção da biblioteca e sequenciamento, o valor obtido de *reads* mapeáveis foi baixo, frequência de 24,92% dos *reads* totais, o que indica que foram sequenciados em sua maior parte apenas adaptadores. Após o alinhamento dos *reads* mapeáveis contra os microRNAs maduros, obteve-se uma frequência de 7,25% dos *reads* alinhados (**Tabela 6**).

Tabela 6. Resultado do sequenciamento de pequenos RNAs purificados de VEs purificados do soro de ratos exercitados em diferentes intensidades de exercício. Número de *reads* totais, após filtro de qualidade e alinhamento com banco de dados de microRNAs maduros.

Amostras	Total de reads na amostra	Reads trimados com sucesso	% de reads após trimagem	Reads não alinhados	Reads alinhados	% de miRNAs	Cobertura média
NE1	1439395	253591	17,62	237079	16512	6,51	119
NE1_2a	931964	147431	15,82	137883	9548	6,48	74
NE2	395005	42852	10,85	38863	3989	9,31	55
NE3	1530531	101331	6,62	91384	9947	9,82	101
NE4	2046700	669132	32,69	617411	51721	7,73	443
NE4_2a	1653928	400855	24,24	368639	32216	8,04	298
L1	281733	68718	24,39	60709	8009	11,65	147
L2	1741490	153059	8,79	145473	7586	4,96	96
L3	362405	68326	18,85	63342	4984	7,29	74
L4	1350427	607711	45	480682	127029	20,9	493
L5	1037888	334571	32,24	283162	51409	15,37	497
M1	49121	2264	4,61	2259	5	0,22	1
M1_2a	58416	1981	3,39	1976	5	0,25	2
M2	213104	23460	11,01	22132	1328	5,66	25
M2_2a	150943	14199	9,41	13382	817	5,75	16

M3	67512	21297	31,55	20105	1192	5,6	40
M3_2a	44576	10356	23,23	9688	668	6,45	26
M4	1909854	294964	15,44	280089	14875	5,04	162
M4_2a	1221443	164036	13,43	155507	8529	5,2	101
M5	1916749	570477	29,76	545507	24970	4,38	239
I1	3484966	2078111	59,63	1986653	91458	4,4	490
I2	1018048	198349	19,48	193613	4736	2,39	47
I2_2a	1182106	173171	14,65	168888	4283	2,47	42
I3	931756	169363	18,18	164178	5185	3,06	51
I4	1623795	88560	5,45	85154	3406	3,85	49
I5	123370	24348	19,74	23628	720	2,96	21
I5_2a	117540	17307	14,72	16604	703	4,06	18
Total	26884765	6699820	24,920508		485830	7,251389	138,037

Após o alinhamento contra banco de dados de miRNA, os *reads* mapeáveis que não mapearam contra miRNA foram alinhados contra o banco de dados não redundantes de piwi-RNA (piRNA) disponível no piRNABank afim de identificar piRNAs presentes nas amostras de VEs. Surpreendentemente o número médio de *reads* que mapearam contra o banco de dados de piRNAs foi maior do que o dobro (16,63%) do número de *reads* que mapearam contra o banco de dados de miRNAs maduros (**Tabela 7**).

Tabela 7. Resultado do sequenciamento de piRNAs purificados de VEs purificados do soro de ratos exercitados em diferentes intensidades de exercício. Número de *reads* não alinhados contra banco de dados de piRNA, *reads* mapeados, porcentagem de *reads* que mapearam e cobertura média dos *reads*.

Amostras	<i>Reads</i> não alinhados	<i>Reads</i> alinhados	% de piRNAs	Cobertura média
NE1	169729	67350	26,56	849
NE1_2a	104781	33102	22,45	507
NE2	31042	7821	18,25	277
NE3	78640	12744	12,58	222
NE4	523664	93747	14,01	487
NE4_2a	322275	46364	11,57	270
L1	53907	6802	9,9	130
L2	129647	15826	10,34	202
L3	52443	10899	15,95	225
L4	351344	129338	21,28	934
L5	224183	58979	17,63	698

M1	2251	8	0,35	1
M1_2a	1965	11	0,56	1
M2	19052	3080	13,13	130
M2_2a	11734	1648	11,61	71
M3	18458	1647	7,73	62
M3_2a	8955	733	7,08	42
M4	257397	22692	7,69	343
M4_2a	143979	11528	7,03	214
M5	478179	67328	11,8	546
I1	1557435	429218	20,65	1006
I2	161232	32381	16,33	527
I2_2a	145200	23688	13,68	422
I3	141917	22261	13,14	340
I4	77829	7325	8,27	151
I5	18797	4831	19,84	174
I5_2a	13744	2860	16,53	95
Total		1114211	16,6305	330,59

Após o alinhamento contra banco de dados de piRNA, os *reads* mapeáveis que não mapearam contra miRNA e piRNA foram alinhados contra o banco de dados de RNA ribossomal disponível no banco de dados de RNAs não codificadores do Ensembl afim de identificar o número de RNA ribossomal presente. Os resultados mostram um baixo número de *reads* que mapearam contra este banco de dados, na média apenas 1,77% dos *reads* (**Tabela 8**).

Tabela 8. Resultado do sequenciamento de RNA ribossomal (rRNA) purificados de VEs purificados do soro de ratos exercitados em diferentes intensidades de exercício. Número de *reads* não mapeados contra banco de dados de rRNA, *reads* mapeados, porcentagem de *reads* que mapearam e cobertura média dos *reads*.

Amostras	<i>Reads</i> não mapeados	<i>Reads</i> mapeados	% de rRNA	Cobertura média
NE1	168349	1380	0,54	28
NE1_2a	104008	773	0,52	24
NE2	30516	526	1,23	20
NE3	78242	398	0,39	15
NE4	503110	20554	3,07	137
NE4_2a	309197	13078	3,26	104
L1	52577	1330	1,94	30
L2	128700	947	0,62	21

L3	51757	686	1	20
L4	344074	7270	1,2	64
L5	218904	5279	1,58	58
M1	2251	0	0	0
M1_2a	1963	2	0,1	2
M2	18894	158	0,67	8
M2_2a	11631	103	0,73	7
M3	18273	185	0,87	8
M3_2a	8853	102	0,98	13
M4	251543	5854	1,98	80
M4_2a	140501	3478	2,12	47
M5	465000	13179	8,03	125
I1	1519986	37449	1,8	215
I2	159453	1779	0,9	37
I2_2a	143585	1615	0,93	33
I3	140726	1191	0,7	24
I4	76777	1052	1,19	39
I5	18527	270	1,11	21
I5_2a	13466	278	1,61	33
Total	4980863	118916	1,77491	44,93

Após o alinhamento contra banco de dados de rRNA, os *reads* mapeáveis que não mapearam contra miRNA, piRNA e rRNA foram alinhados contra o banco de dados de RNA transportadores disponível no banco de dados de RNAs não codificadores do Ensembl afim de identificar o número de RNA transportadores (tRNA) presentes. Os resultados mostraram que 6,36% dos *reads* mapeáveis mapearam contra o banco de dados de RNA transportador (**Tabela 9**).

Tabela 9. Resultado do sequenciamento de tRNA purificados de VEs purificados do soro de ratos exercitados em diferentes intensidades de exercício. Número de *reads* não mapeados contra banco de dados de tRNA, *reads* mapeados, porcentagem de *reads* que mapearam e cobertura média dos *reads*.

Amostras	Reads não mapeados	Reads mapeados	% de tRNA	Cobertura média
NE1	148054	20295	8	82
NE1_2a	93006	11002	7,46	54
NE2	27614	2902	6,77	22
NE3	74710	3532	3,49	22
NE4	449077	54033	8,08	136
NE4_2a	279385	29812	7,44	70

L1	47721	4856	7,07	24
L2	121566	7134	4,66	34
L3	47765	3992	5,84	22
L4	307864	36210	5,96	117
L5	194665	24239	7,24	86
M1	2248	3	0,13	1
M1_2a	1956	7	0,35	1
M2	17052	1842	7,85	19
M2_2a	10606	1025	7,22	17
M3	13103	5170	24,28	99
M3_2a	6473	2380	22,98	62
M4	235025	16518	5,6	69
M4_2a	132014	8487	5,17	41
M5	425844	39156	6,86	122
I1	1409363	110623	5,32	317
I2	149367	10086	5,08	54
I2_2a	135240	8345	4,82	49
I3	130803	9923	5,86	46
I4	68537	8240	9,3	48
I5	14351	4176	17,15	48
I5_2a	10973	2493	14,4	29
Total	4554382	426481	6,3656	62,63

A **Figura 21** resume a porcentagem de *reads* que mapearam nos diferentes bancos de dados utilizados na primeira análise de bioinformática. Ainda existem aproximadamente 68% de *reads* desconhecidos, que não mapearam com os bancos de dados de miRNA, piRNA, rRNA e tRNA. Dentro do grupo de *reads* desconhecidos podem ser encontrados novos RNAs, sendo necessárias diferentes abordagens computacionais para a detecção destes novos RNAs.

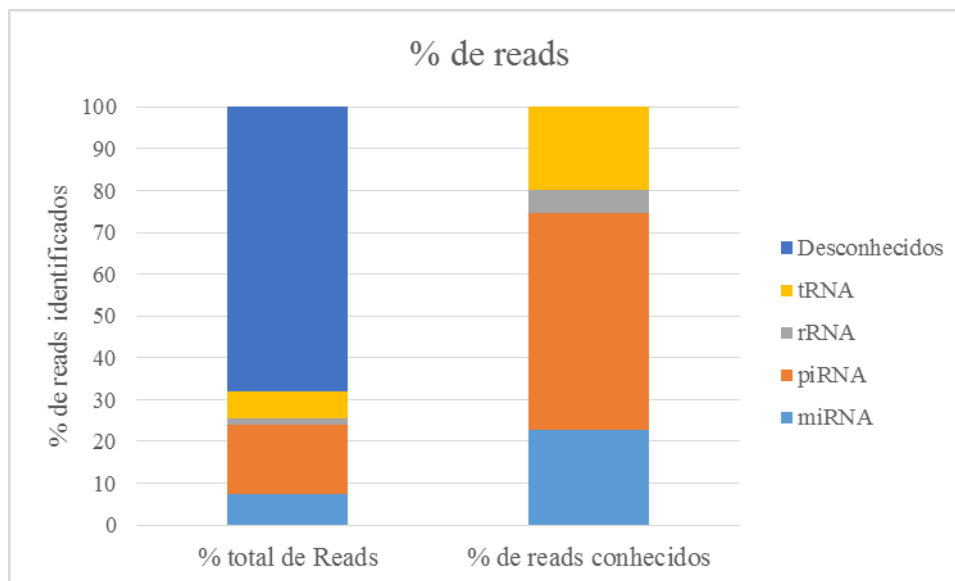


Figura 21. Porcentagem de *reads* mapeados após o sequenciamento de pequenos RNAs de VEs purificadas do soro de ratos exercitados em diferentes intensidades de exercício. A primeira coluna retrata o perfil geral da porcentagem de *reads*, enquanto a segunda coluna representa apenas os *reads* conhecidos.

Do total de 765 miRNAs maduros descritos no banco de dados do miRBase para *Rattus norvegicus*, foram identificados na média total de amostras, 41,5 microRNAs maduros com pelo menos 5 *reads* alinhados. Este número é importante pois representa a quantidade de miRNAs transportados dentro de VEs, que é um número realmente pequeno se comparado com a concentração de miRNAs celulares (**Tabela 10**). Os dez miRNAs maduros mais abundantes identificados pelo software NextGene foram os miRNAs: rno-miR-486, rno-miR-191a-5p, rno-miR-3557-5p, rno-miR-320-3p, rno-miR-22-3p, rno-miR-423-5p, rno-miR-423-3p, rno-miR-378a-3p, rno-miR-3473, rno-miR-140-3p.

Tabela 10. Abundancia de miRNAs transportados por VEs no soro de ratos exercitados em diferentes intensidades de exercício aeróbio agudo.

Amostras	Número de miRNAs > 5 reads	Médias	Média total
NE1	68		
NE2	29	50	
NE3	44		
NE4	59		
L1	20		
L2	31		
L3	25	42	
L4	90		
L5	44		41,5
M1	21		
M2	17	32,5	
M3	49		
M4	43		
I1	83		
I2	47		
I3	38	41,4	
I4	23		
I5	16		

Após analisar o número de *reads* de cada amostra para cada banco de dados, foi feita uma planilha contendo a contagem de *reads* para cada miRNA em cada amostra. As amostras que foram sequenciadas duas vezes, por exemplo, C1, C4, M1, M2, M3, M4, I2 e I5 tiveram o número de *reads* somados para análise estatística dentro do pacote do R, Deseq2. MicroRNAs estatisticamente significativos foram considerados se $P_{adj} < 0.1$. O número de *reads* de miRNAs identificados no grupo controle foram comparados com o número de *reads* de miRNAs identificados no grupo exercitado na intensidade leve (**Figura 22**)(**Tabela 11**). Foram encontrados 6 miRNAs diferencialmente expressos nessa comparação. Um miRNA foi encontrado “superexpresso” e outros cinco miRNAs foram encontrados em menores concentrações. O eixo X representa a média do número de *reads* para um determinado miRNA e o eixo Y representa a diferença na presença ou ausência em \log_2 . Cada ponto é considerado um miRNA.

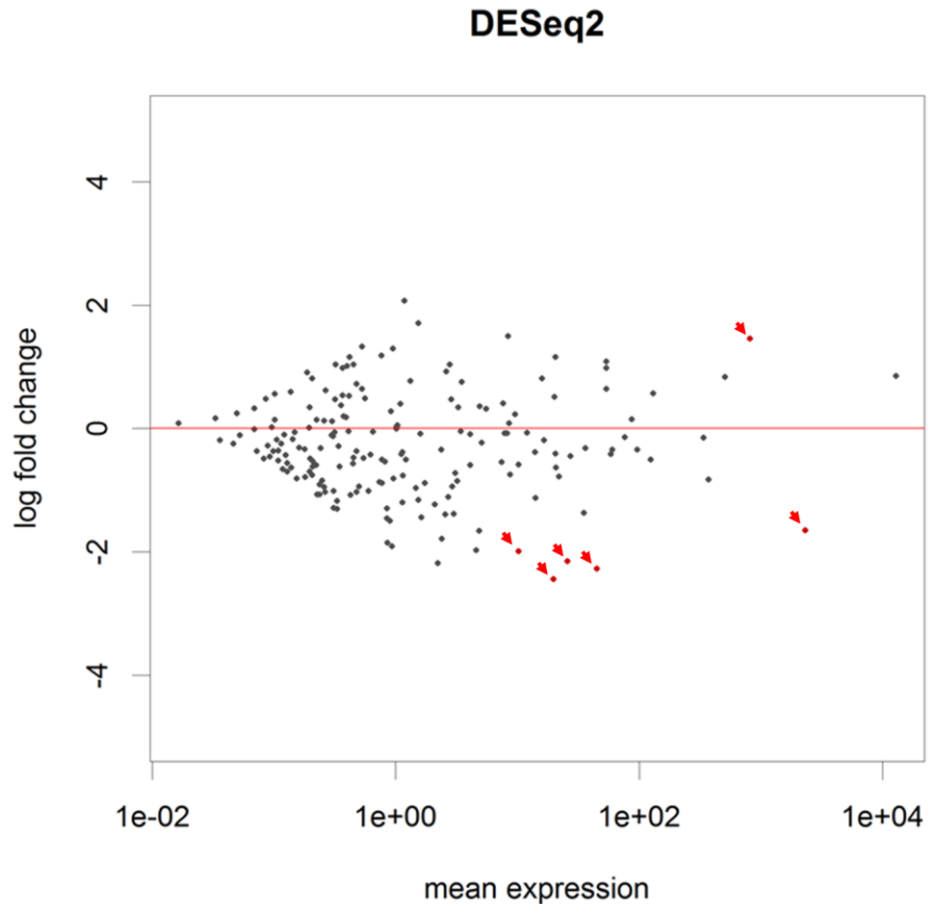


Figura 22. MicroRNAs diferencialmente expressos em VEs de ratos não exercitados comparados com ratos exercitados na intensidade leve após análise de sequenciamento de nova geração pelo pacote estatístico Deseq2. Os pontos vermelhos representam significância estatística de Padj <0.1. As setas vermelhas indicam os miRNAs diferencialmente expressos.

A **Tabela 11** relaciona os 6 miRNAs diferencialmente expressos entre os grupos de ratos não exercitados e exercitados na intensidade leve.

Tabela 11. Valores de log2FoldChange e de Padj da contagem de *reads* dos 6 miRNAs diferencialmente expressos entre os grupos não exercitados e exercitados na intensidade leve.

	baseMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue	padj
rno-miR-128-3p	19,89	-2,44	0,78	-3,11	0,0019	0,0286
rno-miR-25-3p	25,83	-2,15	0,69	-3,11	0,0019	0,0286
rno-miR-148a-3p	44,96	-2,27	0,72	-3,18	0,0015	0,0286
rno-miR-191a-5p	2325,27	-1,65	0,63	-2,63	0,0085	0,0783
rno-miR-22-3p	816,99	1,46	0,54	2,70	0,0070	0,0783
rno-miR-27a-3p	10,21	-1,99	0,79	-2,54	0,0112	0,0862

O número de *reads* de miRNAs identificados no grupo controle foram comparados com o número de *reads* de miRNAs identificados no grupo exercitado na intensidade moderada (**Figura 23**). Nenhum miRNA diferencialmente expresso foi encontrado nessa comparação.

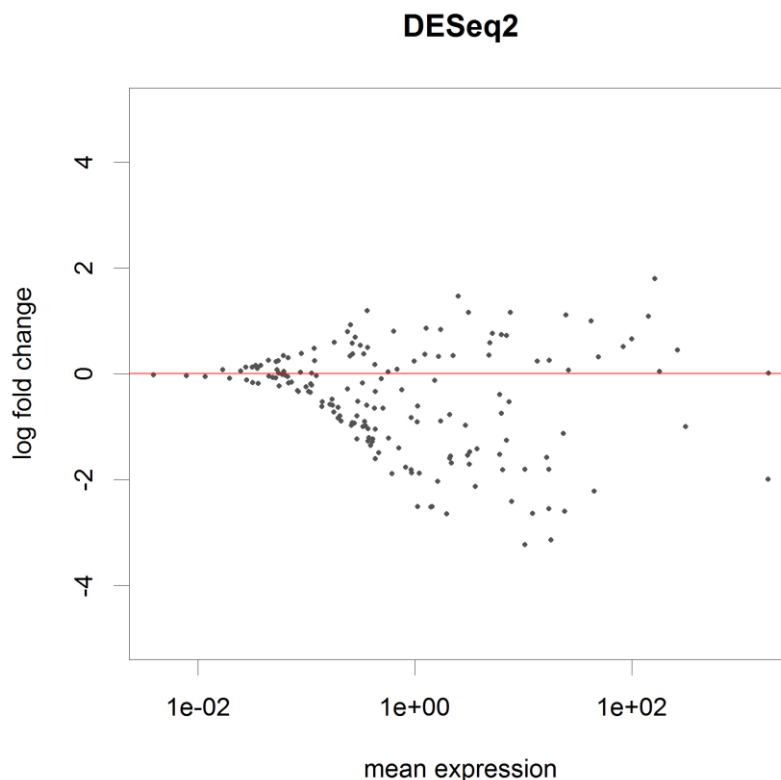


Figura 23. MicroRNAs diferencialmente expressos em VEs de ratos não exercitados com ratos exercitados na intensidade moderada após análise de sequenciamento de nova geração pelo pacote estatístico Deseq2. Os pontos vermelhos representam significância estatística de $P_{adj} < 0.1$.

O número de *reads* de miRNAs identificados no grupo controle foram comparados com o número de *reads* de miRNAs identificados no grupo exercitado na intensidade intensa. Três miRNA diferencialmente expressos foram encontrados nessa comparação. Dois miRNAs foram considerados “superexpressos” no grupo exercitado na intensidade intensa em comparação com o grupo não exercitado. Além disso, um miRNA foi considerado ausente no grupo exercitado na intensidade intensa em comparação com o grupo não exercitado (**Figura 24**)(**Tabela 12**).

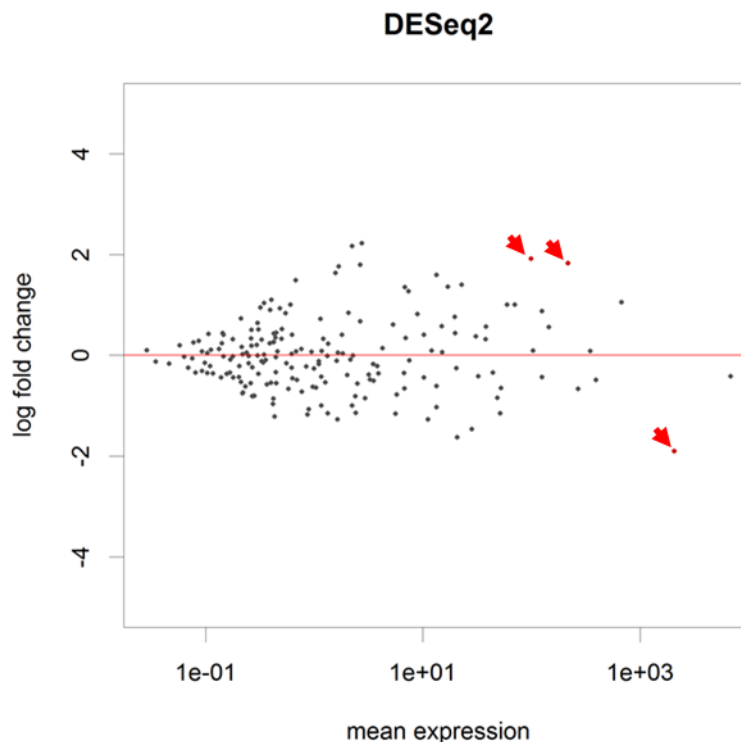


Figura 24. MicroRNAs diferencialmente expressos em VEs de ratos não exercitados com ratos exercitados na intensidade intensa após análise de sequenciamento de nova geração pelo pacote estatístico Deseq2. Os pontos vermelhos representam significância estatística de $P_{adj} < 0.1$. As setas vermelhas indicam os miRNAs diferencialmente expressos.

Tabela 12. Valores de $\log_2\text{FoldChange}$ e de P_{adj} da contagem de *reads* dos 3 miRNAs diferencialmente expressos entre os grupos controle e exercício intenso.

	baseMean	$\log_2\text{FoldChange}$	lfcSE	stat	pvalue	padj
rno-miR-10b-5p	217,62	1,83	0,56	3,28	0,0010	0,0537
rno-miR-191a-5p	2067,53	-1,90	0,60	-3,15	0,0017	0,0537
rno-miR-10a-5p	98,77	1,92	0,67	2,84	0,0045	0,0970

Após analisar o número de *reads* de cada amostra para cada banco de dados, foi feita uma planilha contendo a contagem de *reads* para cada piRNA em cada amostra. As amostras que foram corridas duas vezes, por exemplo, NE1, NE4, M1, M2, M3, M4, I2 e I5 tiveram o número de *reads* somados para análise estatística dentro do pacote do R, Deseq2. piRNAs estatisticamente significativos foram considerados se $P_{adj} < 0.1$. O número de *reads* de piRNA identificados no grupo controle foram comparados com o número de *reads* de miRNAs identificados no grupo exercitado na intensidade leve (**Figura 25A**), moderada (**Figura 25B**) e intensa (**Figura 25C**) (**Tabela 13**). Apenas um único piRNA diferencialmente expresso foi

encontrado na comparação entre o grupo controle e o exercício intenso ($P_{adj} = 0,054$). O piRNA foi encontrado no grupo de exercício intenso 2,74 vezes mais presente do que na comparação com o grupo não exercitado.

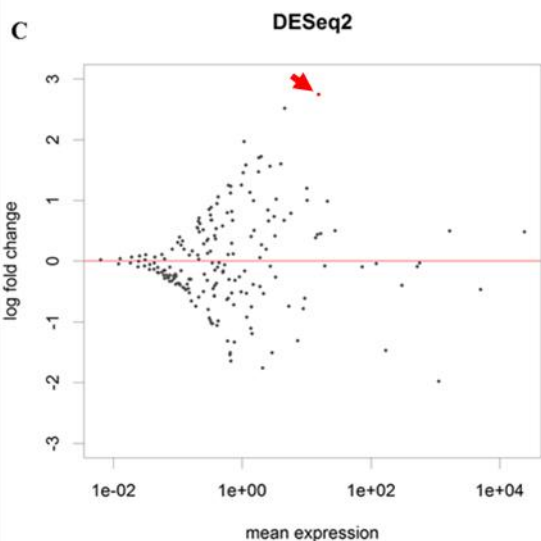
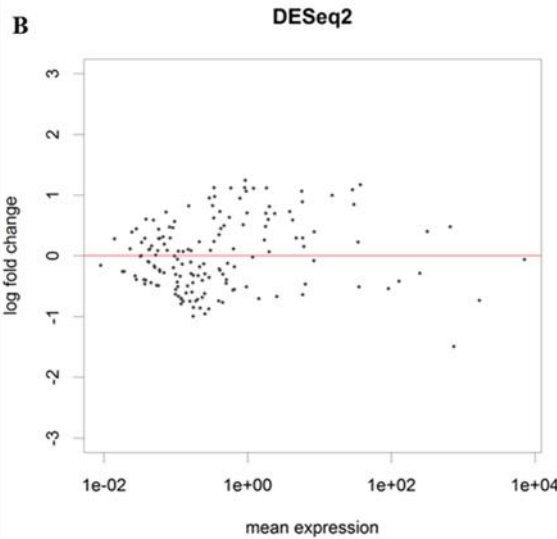
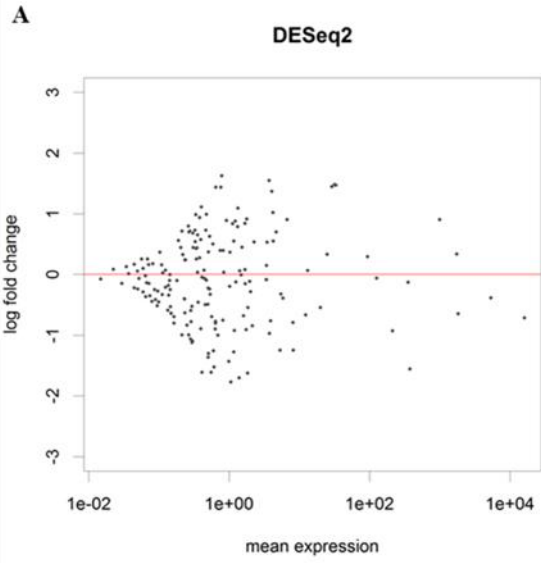


Figura 25. PiRNAs diferencialmente expressos em VEs de ratos não exercitados comparados com ratos exercitados nas intensidades leve (A), moderada (B) e intensa (C) após análise de sequenciamento de nova geração pelo pacote estatístico Deseq2. Os pontos vermelhos representam significância estatística de Padj <0.1. O eixo X representa a média do número de *reads* para um determinado piRNA e o eixo Y representa a diferença na presença ou ausência em log2. Cada ponto é considerado um piRNA. A seta vermelha indica o piRNA diferencialmente expresso.

Tabela 13. Valores de log2FoldChange e de Padj da contagem de *reads* do piRNA diferencialmente expressos entre os grupos controle e exercício intenso.

	baseMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue	padj
rno_piR_032799 gb DQ759134 Rattus norvegicus:3:117888743:117888765:Plus	15,35	2,75	0,85	3,22	0,0013	0,0545

4.4.9 Análise de miRNAs exógenos

Após o alinhamento dos reads contra o banco de dados de miRNAs maduros de *Rattus norvegicus* disponível no miRNAs, os reads não mapeados foram utilizados no mapeamento contra o banco de dados de miRNAs maduros de todas as espécies disponíveis no miRBase. Curiosamente foram detectados muitos reads representando o miRNA cin-miR-4011a-5p do organismo *Ciona intestinalis*. Outros miRNAs exógenos detectados, porém com menor número de reads foram os mmu-miR-2137 e hsa-miR-4532 (**Figura 26**).

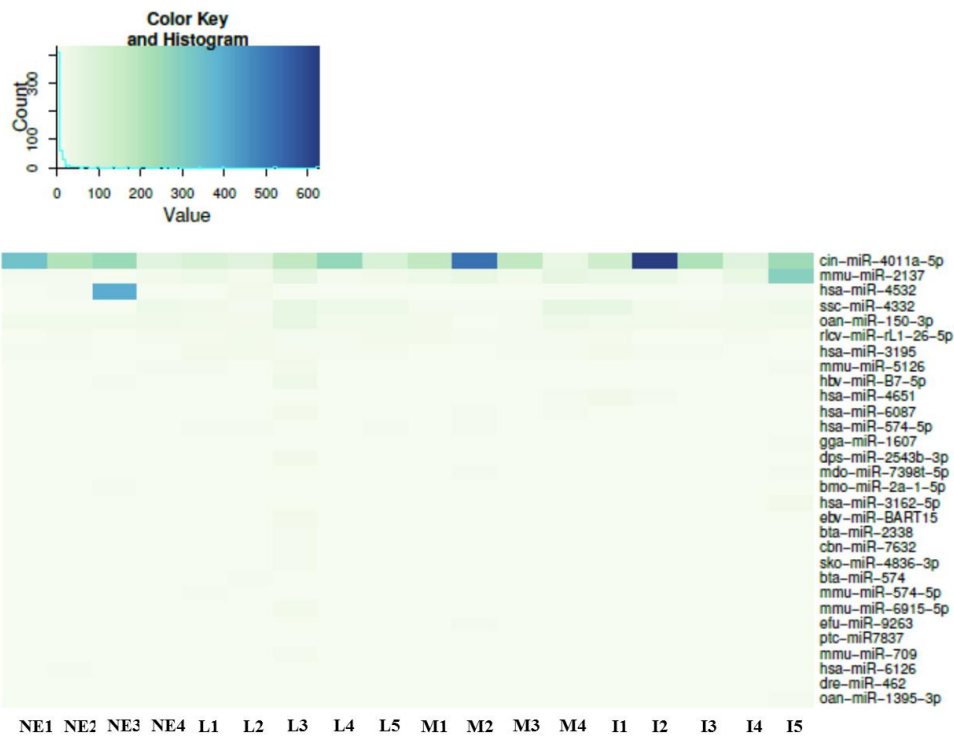


Figura 26. Alinhamento de reads que não mapeiam contra miRNAs maduros de *rattus norvegicus* contra o banco de dados de miRNAs maduros de todas as espécies disponíveis no miRBase. Percebe-se um grande número de reads dos miRNAs cin-miR-4011a-5p, mmu-miR-2137 e hsa-miR-4532.

5 Capítulo 2 – Caracterização biofísica de vesículas extracelulares e pequenos RNAs associados a vesículas extracelulares presentes no plasma de cavalos submetidos a prova de enduro

5.1 Objetivos

5.1.1 Objetivo geral

Caracterizar biofísicamente vesículas extracelulares e sequenciar pequenos RNAs associados a vesículas extracelulares presentes no plasma de cavalos submetidos a prova de enduro equestre.

5.1.2 Objetivos específicos

1. Coletar amostras de plasma de cavalos (n=5) durante uma prova de enduro (em repouso (T0), durante a prova após completarem 66km (T1), logo após completarem o fim prova (160km, T2), 2 horas após a prova (T3) e 15 horas após o final da prova, no dia seguinte (T4)).
2. Purificar vesículas extracelulares presentes no plasma de cavalos;
3. Caracterizar vesículas extracelulares presentes no plasma de cavalos por meio da identificação de proteínas marcadoras, contagem e concentração de vesículas, microscopia eletrônica e espalhamento de luz dinâmica;
4. Extrair pequenos RNAs de vesículas extracelulares presentes no plasma de cavalos submetidos a prova de enduro equestre;
5. Construir bibliotecas para sequenciamento de pequenos RNAs;
6. Sequenciar a população de pequenos RNAs presentes em 24 amostras de vesículas extracelulares purificadas do plasma de cavalos;
7. Caracterizar os pequenos RNAs associados a vesículas extracelulares presentes no plasma de cavalos por meio de análises de bioinformática;

5.2 Fluxograma – Capítulo 2

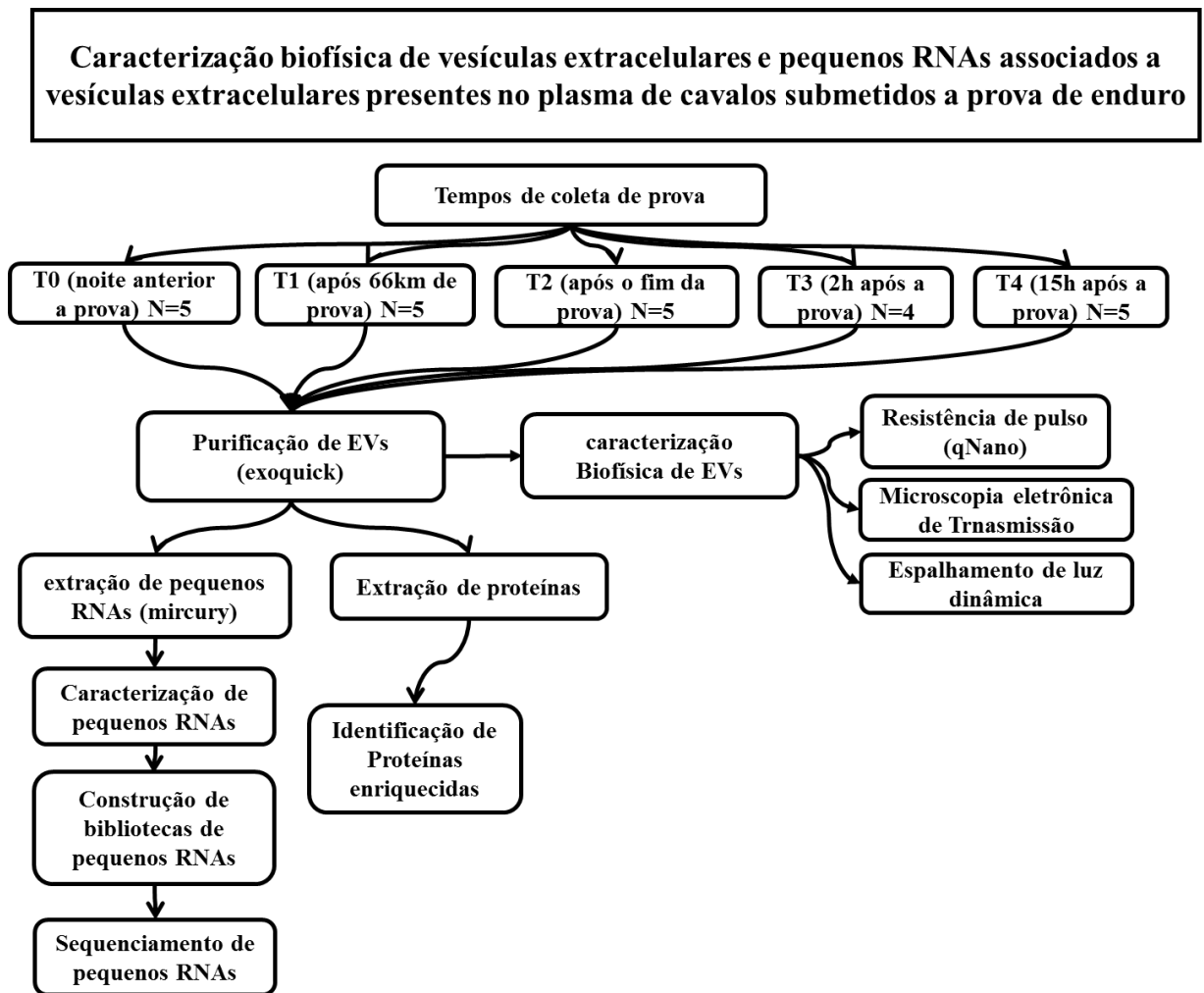


Figura 27. Fluxograma indicando o passo-a-passo do capítulo intitulado: Caracterização biofísica de vesículas extracelulares e pequenos RNAs associados a vesículas extracelulares presentes no plasma de cavalos submetidos a prova de enduro.

5.3 Metodologia

5.3.1 Coleta do plasma de Cavalos submetidos a prova de enduro

Foram escolhidos 5 cavalos da raça Puro Sangue Árabe (ou cruza Árabe) devidamente treinados para completar prova elite de enduro, de 160km de distância. Cada animal passou por programa de condicionamento e cumpriu provas oficiais, de distâncias menores, para graduação de acordo com as normas da Federação Equestre Internacional (FEI), durante um Período de pelo menos 4 anos. Com idade variando entre 9 e 15 anos e peso médio de $390 \pm 7,3$ kg, todos os animais foram devidamente examinados pela equipe veterinária oficial e foram considerados aptos para realizarem a prova. A coleta de sangue venoso foi obtida por meio da venopunção jugular, após procedimento de antissepsia local e retirada de 10mL de sangue total através de agulha acoplada a tubo com anticoagulante citrato de sódio e pressão negativa (Vaccuette). Realizaram-se as coletas na noite anterior a prova, e considerou-se esse momento como basal ou de repouso (T0), durante a prova após completarem 66km (T1), logo após completarem o fim prova (T2), 2 horas após a prova (T3) e 15 horas após o final do esforço, no dia seguinte (T4). Após colhidas as amostras foram acondicionadas em caixa térmica com gelo e água e encaminhados ao laboratório para separação de plasma.

5.3.2 Purificação de VEs

A purificação de vesículas extracelulares foi feita utilizando o kit comercial Exoquick™ *Exosome Precipitation Solution* (System Biosciences) seguindo as recomendações do fabricante, com algumas modificações. Inicialmente 500 microlitros de plasma foram misturados com 500 μ L de tromboplastina do cérebro de coelho (Sigma Aldrich) a fim de remover os fatores de coagulação. Em seguida, a mistura foi incubada a 37°C por 15 min, centrifugada por 10.000 x g por 5 min e o sobrenadante transferido para um novo tubo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3.000 x g por 15 minutos para garantir a remoção de células e *debris* celulares. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e 126 μ L de Exoquick foi adicionado ao sobrenadante, misturados por inversão do tubo 10 vezes e incubados *overnight* a 4°C. A mistura Exoquick/plasma foi centrifugada por 1.500 x g por 30 minutos a temperatura ambiente. Após essa centrifugação as VEs são *pelletadas* no fundo do

tubo. O sobrenadante foi removido por aspiração com pipeta e nova centrifugação por 1.500 x g por 5 minutos para garantir a completa remoção de Exoquick, tomando cuidado para não remover as VEs presentes no *pellet*. Para finalizar, o *pellet* foi ressuspenso em 200µL de tampão PBS1x. Destes 200µL, 50µL foram utilizados para todas as metodologias de caracterização de exossomas e 150µL foram utilizados na extração de smallRNA.

5.3.3 Contagem e concentração de VEs utilizando resistência de pulso

A determinação da concentração de partículas por mL de plasma e a determinação do diâmetro foi feita utilizando a tecnologia de resistência de pulso (IZON, Christchurch, New Zealand). Resumidamente a tecnologia se baseia no monitoramento de fluxo de corrente elétrica que passa através de um poro de abertura ajustável. Partículas únicas são medidas em tempo real e em alta performance. Amostras de VEs foram diluídas 40x em tampão PBS1X e 40µL de VEs foram lidas utilizando os seguintes parâmetros: tamanho do poro NP100; abertura do poro 47,01µm; Corrente utilizada 1V e pressão 20cm.H₂O. A corrente média entre todas as amostras variou entre 81,67nA e 90,42nA. A análise do diâmetro médio, moda e concentração de partículas foram feitas utilizando o software Izon Control Suite versão 2.2. A calibração foi feita utilizando esferas de diâmetros e concentrações conhecidos diluídos em PBS e medidos de forma idêntica as amostras.

5.3.4 Microscopia eletrônica

Grids de nickel de 200mesh foram limpos por lavagens de 10 segundos em acetona, 10 segundos em etanol 100% e 10 segundos em água destilada. Em seguida, os *grids* foram revestidos com formvar 0,5% diluído em clorofórmio 100%.

O processamento das amostras de VEs, foi feito inicialmente depositando uma gota de 10 µL em *parafilm*. Em seguida, um *grid* de nickel foi colocado no topo da gota de VEs por 30 a 60 min. Os *grids* foram lavados três vezes, cada lavagem utilizando uma gota de 30 microlitros de PBS 1x em *parafilm*. Os *grids* contendo VEs foram fixados em uma gota de paraformaldeído a 2% por 10 min e lavar novamente por três vezes utilizando PBS1X antes da imunomarcação. O *grid* foi transferido para uma gota de 30µL contendo anticorpos primários anti-CD63, CD09 e CD81na concentração de 1:50. Os *grids* foram incubados por 40 minutos e lavados com BSA 0,1% em PBS1X. Em seguida, os *grids* foram incubados com anticorpo secundário anti-IGG

de coelho conjugado a partícula de ouro de 10nm, na concentração de 1:20. Os *grids* foram pós-fixados com glutaraldeído 2,5% e incubados por 10 minutos. Os *grids* foram lavados por cinco vezes utilizando água destilada. Finalmente, os *grids* foram contrastados com acetato de uranila 3% e incubados no topo da gota por 15 min. As imagens foram adquiridas utilizando 80 KV em microscópio eletrônico de transmissão modelo JEOL 1011, do laboratório de microscopia eletrônica da Universidade de Brasília.

5.3.5 Espalhamento de luz dinâmica (DLS)

A técnica de espalhamento de luz dinâmica pode ser utilizada para determinar o perfil da distribuição de tamanho de pequenas partículas em suspensão ou polímeros em solução. Além disso, o espalhamento de luz dinâmica permite avaliar o potencial zeta de superfície das VEs, que tem relação com as cargas eletrocinéticas de moléculas biológicas presentes nas membranas de VEs. Primeiramente, 5 µL de VEs foram diluídas 200 vezes em água Milli-Q até um volume final de 1 ml. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15.000 x g por 15 min para garantir a completa remoção de precipitados de PBS1X presente nas VEs que podem interferir no resultado. O sobrenadante foi coletado e colocado em cubas de vidro. O controle negativo (5µL de PBS1X) foi utilizado para fazer o branco no equipamento Zetasizer Nano (Malvern). Os valores obtidos correspondem à média ± desvio padrão de cinco medidas de cada suspensão de VEs. O índice de polidispersão também foi medido.

5.3.6 Identificação de proteínas enriquecidas em VEs de plasma de cavalos submetidos a prova de enduro

A extração de proteínas das vesículas extracelulares (VEs) foi feita utilizando alíquotas de 5 µL de VEs, diluídas em 50 µL de tampão de extração de proteínas RIPA 1X (150 mM NaCl; 1.0% Triton X-100; 1% desoxicolato de sódio; 0.1% SDS; 25 mM Tris-HCL, pH 7,4), e vortexadas por 20s. O volume de 0,5µL de coquetel inibidor de protease foi adicionado, para evitar a degradação de proteínas, e o conteúdo de proteínas totais de VEs, quantificado e analisado em gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) 12%.

A quantificação de proteínas foi realizada utilizando o kit Qubit® Protein Assay (Life Technologies) de acordo com o manual do fabricante. O perfil de proteínas totais de VEs e de

proteínas marcadoras de exossomas foram identificadas por *Western blotting*. Foram acrescentadas às 5 amostras (T0, T1, T2, T3 e T4) um controle positivo contendo proteínas extraídas de células de mioblastos e um controle negativo contendo PBS1X. Ambos os controles passaram pelo mesmo procedimento de extração, quantificação e *western blotting*. Para isso, inicialmente as proteínas foram separadas por tamanho em eletroforese de proteínas em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%, fixados em cuba de eletroforese (Bio-Rad Mini Protean II). Em cada gel foi aplicado uma concentração de 62.5µg de proteína totais extraída por poço. Os géis correram em voltagem de 150V e amperagem de 15 mA por 2h. Um gel foi corado com *coomassie blue* e as proteínas do outro gel foram transferidas para membranas de PVDF. A transferência foi feita semi-seca (Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-rad) em tampão de transferência contendo 48 mM Tris, 39 mM glicina, 20% (v/v) metanol e 1,3mM SDS. A transferência foi feita por 1h em voltagem de 15V e amperagem de 200 mA. Após a transferência os géis foram corados com *comassie* para se analisar a eficiência da transferência. As membranas foram bloqueadas por 1h em BSA3% diluído em tampão TBST1X (50 mM Tris.HCl pH 7.4; 150 mM NaCl; 0.1% Tween 20).

Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpos primários policlonais - IGG de coelho (Flotillin-1, TSG101, CD81, CD9) (1:500) (Santa Cruz Biotechnology) em BSA 1% em TBST1X *overnight*. Após três lavagens com TBST1X, o anticorpo secundário Anti-IGG de coelho (1:750; Sigma), conjugado com fosfatase alcalina, foi aplicado às membranas, e incubadas por 1h em BSA 1% em TBST1X. Após 3 lavagens com TBST1X as membranas foram reveladas utilizando revelador NBT/BCIP (*AP color development buffer*, Bio-rad) até aparecimento da cor. A revelação foi interrompida utilizando água deionizada por 10 min.

5.3.7 Extração de RNA

A extração de smallRNA de VEs foi feita utilizando 150µL de amostras ressuspendidas em PBS1X utilizando o kit de extração *miRCURY™ RNA Isolation Kit* (Exiqon) e seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, 150µL de VEs foram misturadas com 60 µL de solução de lise BF, vortexados por 5 segundos e incubados por 3 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 20µL de solução de precipitação de proteína BF, vortexados por 5 segundos, incubados por 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugados por 3 minutos a 11.000 x g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, foi adicionado 270 µL de isopropanol 100%, vortexados por 5 segundos, a amostra foi transferida para colunas

microRNA Mini Spin Column BF, incubadas por 2 minutos a temperatura ambiente e centrifugadas por 30 segundos a 11.000 x g. Descartaram-se as amostras que passaram pela coluna. Em seguida, adicionou-se 100µL de solução de lavagem 1BF dentro da coluna e centrifugou-se por 30 segundos a 11.000 x g. Novamente o material que passou pela coluna foi descartado. Adicionou-se 700µL de solução de lavagem 2BF a coluna e centrifugou-se por 30 segundos a 11.000 x g. Descartou-se o material que passou pela coluna. Adicionou mais uma vez 250µL de solução de lavagem 2BF a coluna, centrifugou-se por 2 minutos a 11.000 x g para a completa secagem da coluna. A coluna foi transferida para um novo tubo e o RNA eluído após duas lavagens com 50µL cada de água livre de RNase colocada diretamente na membrana, incubada por 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugadas por 1 minuto a 11.000 x g.

5.3.8 Caracterização e quantificação de pequenos RNAs em Bioanalyzer

Os pequenos RNAs extraídos foram encaminhados para análise em Bioanalyzer 2100 (Agilent). O chip utilizado no equipamento foi o *Agilent Small RNA kit* que permite uma análise rápida e sensível para caracterizar pequenos ácidos nucleicos na faixa de tamanho de 6-150 nt.

5.3.9 Construção de bibliotecas para sequenciamento de small RNAs em MiSeq (Illumina).

O RNA total extraído de VEs foi utilizado na construção de bibliotecas de RNAs para sequenciamento em sequenciador MiSeq (Illumina) utilizando o kit de preparo de bibliotecas *TruSeq Small RNA Sample Preparation Kit* (Illumina) de acordo com as recomendações do fabricante. O número total de bibliotecas construídas foi de 24 amostras (T0 n=5, T1 n=5, T2 n=5, T3 n=4 e T4 n=5). As amostras de RNA foram secas utilizando secador em vácuo até o volume final de 6µL. Ao RNA purificado, foram ligados adaptadores proprietários (Illumina) à extremidade 5' e 3'. Em seguida foi feita a síntese de cDNA. Este cDNA foi amplificado com 15 ciclos de PCR para produzir as bibliotecas a serem sequenciadas no sequenciador Illumina MiSeq. Após a amplificação do cDNA, os fragmentos de interesse foram purificados por separação em gel de acrilamida 6% para evitar sequenciar adaptadores e outros fragmentos que não correspondem aos RNAs de interesse. Após a eluição dos fragmentos de interesse no gel, as amostras foram concentradas e quantificadas por PCR quantitativa com o kit *KAPA SYBR®*

FAST qPCR, seguindo as recomendações do fabricante, e levadas ao sequenciador MiSeq. Foram feitas duas corridas com os kits *MiSeq Reagent Kit v2* para 50 ciclos.

5.3.10 Sequenciamento de pequenos RNAs em Illumina MiSeq

O sequenciamento foi feito em uma única *lane*, *single read* e o kit de sequenciamento utilizado foi o de 50ciclos V2 para Miseq que providencia mais de 40 milhões de *reads* e 1.5Gb de *output* por *lane*. Todas amostras foram sequenciadas duas vezes com objetivo de se obter números de *reads* mais representativos. O sequenciador MiSeq do centro de genômica do centro-oeste foi utilizado, o centro de genômica está incubado na Universidade Católica de Brasília.

5.3.11 Análises de bioinformática usando alinhamento contra bancos de dados

A análise dos dados de sequenciamento foi feita utilizando o *software* comercial NEXTGENE® (SoftGenetics). Todo o processamento de conversão dos dados de FastQ para *fasta*, trimagem do *reads*, alinhamento e contagem dos *reads* foi feito dentro do *software*. O *pipeline* utilizado seguiu algumas publicações envolvendo análises de pequenos RNAs. Após a filtragem de *reads* de baixa qualidade e trimagem dos adaptadores os *reads* foram alinhados contra bancos de dados na seguinte ordem: miRNAs maduros disponível no miRBase, rRNA e tRNA disponível no banco de dados de RNA não codificadores do Ensembl.

5.3.12 Análise estatística dos dados

Primeiramente, as amostras que foram sequenciadas duas vezes tiveram seus *reads counts* somados e foi preparada uma planilha contendo o número de *reads*/amostra/RNA no formato .CSV. Essa planilha foi utilizada como input para análises estatísticas. A análise estatística da contagem de *reads* do sequenciamento foi feito pela distribuição binomial negativa analisando as amostras par-a-par por meio do pacote Deseq2 (Bioconductor) no ambiente R. O valor de P ajustado foi considerado estatisticamente significativo se $P_{adj} < 0.1$. O *heatmap* contendo os 30 miRNAs mais presentes nas amostras foi gerado também pelo Deseq2.

5.4 Resultados

5.4.1 Contagem e concentração de VEs utilizando resistência de pulso

Após a coleta do sangue dos animais, separação do plasma, purificação de VEs, foi feita a contagem de VEs/mL de plasma assim como a determinação da moda do diâmetro de partículas. A **Figura 28** representa o diâmetro médio das VEs e a concentração destas VEs/mL de soro do pool de 5 grupos: repouso (T0), durante a prova após completarem 66km (T1), logo após completarem o fim prova (T2), 2 horas após a prova (T3) e 15 horas após o final do esforço, no dia seguinte (T4).

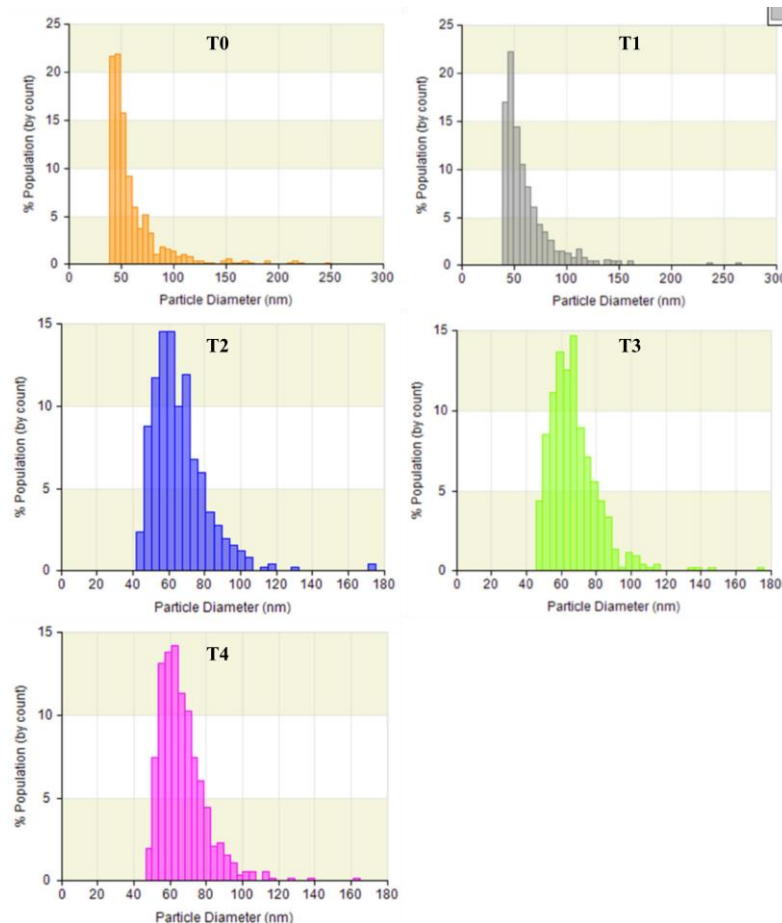


Figura 28. Diâmetro e porcentagem da população de VEs purificadas do plasma de cavalos submetidos a prova de enduro. Repouso (T0), durante a prova após completarem 66km (T1), logo após completarem o fim prova (T2), 2 horas após a prova (T3) e 15 horas após o final do esforço, no dia seguinte (T4).

A tabela a seguir relaciona os valores de média e moda das partículas em nanômetros medidos para os pools dos grupos T0, T1, T2, T3 e T4 (**Tabela 14**).

Tabela 14. Valores de diâmetro de VEs e concentração medidos por resistência de pulso para os grupos T0, T1, T2, T3 e T4.

	Pool T0	Pool T1	Pool T2	Pool T3	Pool T4
Moda do diâmetro das VEs (nm)	44,3	44,4	54,9	65,2	60,8
Média do diâmetro das VEs (nm)	59,2	59,2	63,8	65,2	65,2
Concentração em partículas/mL	5,60E+12	1,20E+13	3,60E+13	3,60E+13	1,10E+14

5.4.2 Microscopia eletrônica de VEs

As imagens de VEs obtidas mostram vesículas com morfologia, tamanho e proteínas de membrana compatíveis com as vesículas consideradas Exossomas (**Figura 29**). Foram feitas várias preparações, partindo inicialmente da análise da morfologia e tamanho. Após a aquisição dos anticorpos foi feita a imunomarcagem de VEs com anticorpos relatados na literatura anti-proteínas enriquecidas em purificações de exossomas (CD63, CD9). Os resultados sugerem a presença de um grande número de partículas com morfologia e tamanho compatíveis com exossomas, entre 30 e 100nm. A imunomarcagem mostrou a presença de poucas partículas positivas para as proteínas CD63 e CD9 (**Figura 29A Figura 29C**). Os controles negativos foram ausentes para partículas com tamanho e morfologia compatíveis com VEs e mostraram a presença de ouro porém em baixa concentração e espalhadas (**Figura 29B Figura 29D**).

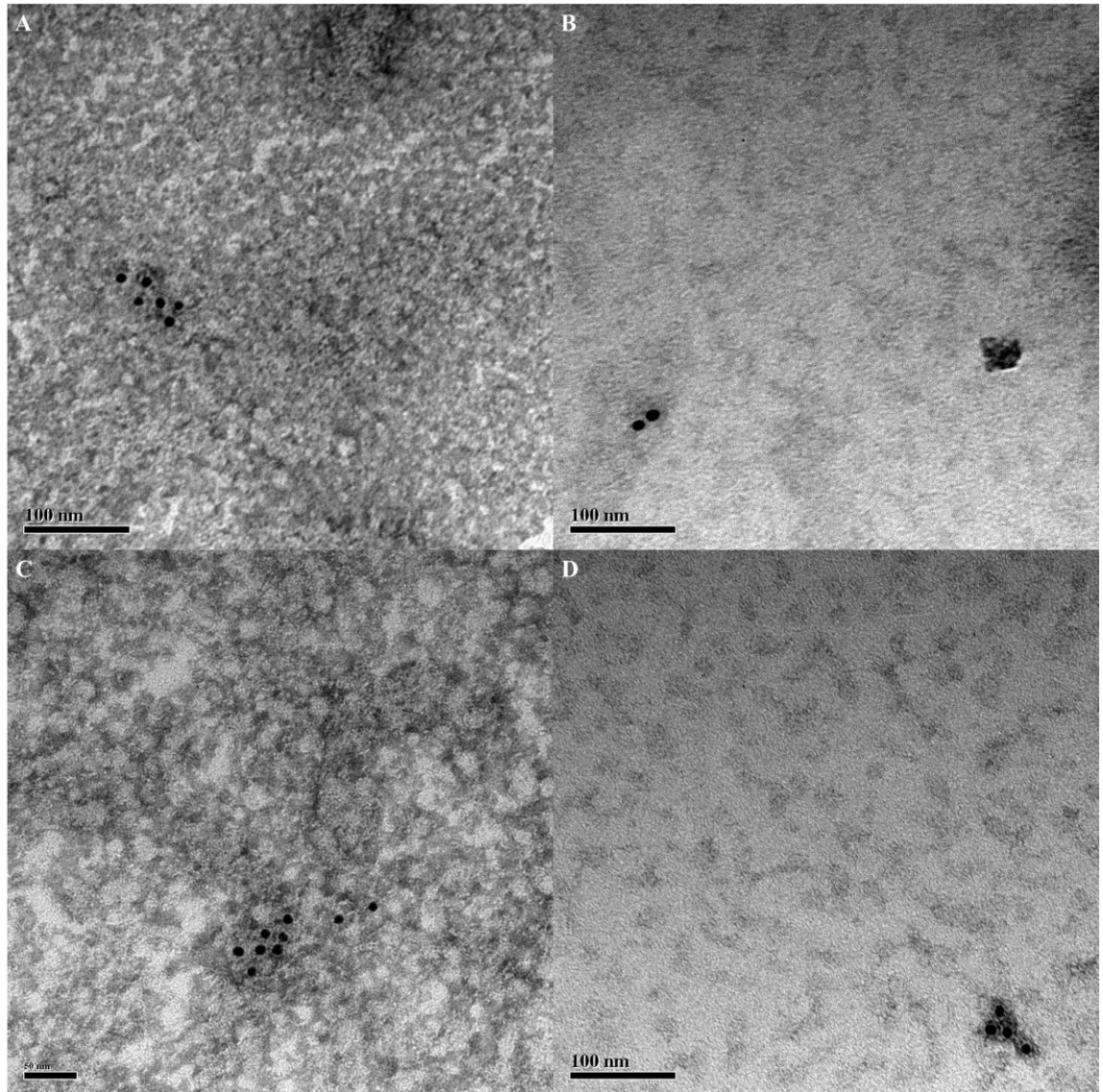


Figura 29. Micrografias eletrônicas de purificado de VEs de plasma de cavalos cavalos submetidos a prova de endure. Figuras A e C mostram a presença de partículas com morfologia e tamanho compatíveis com Exossomas e a presença de partículas de ouro representando indiretamente a presença de proteínas CD63 (A) e CD09 (C). As amostras B e D (controles negativos) foram preparadas substituindo as VEs por PBS1X e incubando com os anticorpos anti-CD63 (B) e CD09 (D).

5.4.3 Espalhamento de luz dinâmica de VEs

As amostras purificadas de VEs dos 5 grupos estudados (T0, T1, T2, T3 e T4) foram analisadas em relação ao diâmetro médio e índice de polidispersão por espalhamento de luz

dinâmica. Os resultados mostraram diminuição na média do diâmetro das partículas após o T0, atingindo o menor diâmetro no T3 e voltando ao diâmetro basal no T4. (

Tabela 15). O índice de polidispersão se manteve estável entre todos os pontos amostrados.

Tabela 15. Amostras purificadas de VEs foram analisadas em relação ao diâmetro médio e índice de polidispersão por espalhamento de luz dinâmica.

	T0	T1	T2	T3	T4
Média em Z (diâmetro/nm)	61,7	55,14	59,86	49,92	62,98
Índice de polidispersão	0,543	0,529	0,426	0,427	0,482

Em seguida, foram analisadas as 5 curvas geradas pelo equipamento em cada tempo de coleta. Os resultados são demonstrados na **Figura 30**. Os tempos T0 e T1 apresentaram uma tendência de três picos em cada amostra, representados amostras de tamanhos próximos a 10nm, 80nm e 3000nm sendo os picos maiores praticamente irrelevantes pela baixa intensidade. Já nos tempos T2, T3 e T4 percebe-se uma tendência a apenas um pico por volta de 80nm (**Figura 30**).

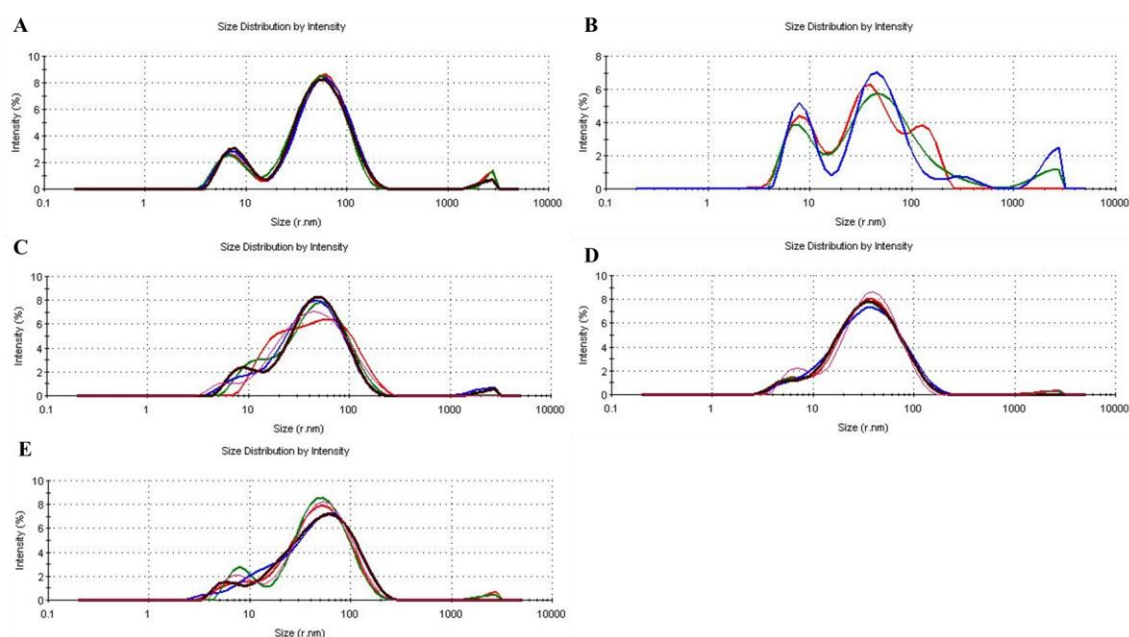


Figura 30. Distribuição do tamanho de VEs purificadas de plasma de cavalos submetidos a prova de enduro analisadas por espalhamento de luz dinâmica. (A) Repouso, (B) durante a prova após completarem 66km, (C) logo após completarem o

fim prova, (D) 2 horas após a prova e (E) 15 horas após o final do esforço, no dia seguinte.

5.4.4 Identificação de proteínas enriquecidas em VEs de plasma de cavalos submetidos a prova de enduro

As amostras purificadas de VEs dos 5 grupos estudados (T0, T1, T2, T3 e T4) foram extraídas e analisadas em relação as proteínas totais presentes (**Figura 31**) e em relação às proteínas previamente descritas na literatura relacionadas a diferentes compartimentos celulares.

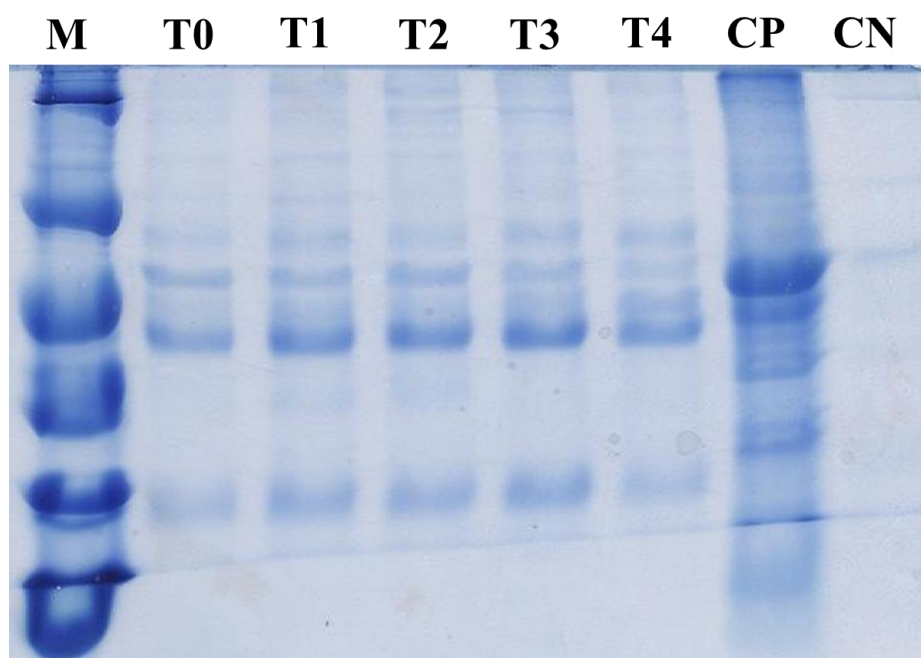


Figura 31. Perfil de proteínas totais separadas por eletroforese de proteína em gel de acrilamida 12%. As proteínas foram extraídas de VEs purificadas do soro de ratos exercitados em diferentes intensidades. M = Marcador Bio-rad *Broad-Range*; (T0) Repouso, (T1) durante a prova após completarem 66km, (T2) logo após completarem o fim prova, (T3) 2 horas após a prova e (T4) 15 horas após o final do esforço, no dia seguinte; CP = controle positivo (proteínas extraídas de células C2C12); CN = controle negativo (PBS1X).

Após a análise das proteínas totais extraídas das VEs, foi feita a transferência das proteínas para membranas de PVDF a fim de se analisar proteínas específicas já previamente

descritas em populações de exossomas e células (**Figura 32**). As análises de proteínas enriquecidas em preparações de exossomas e células mostraram que a população e VEs mostra-se ausente de proteínas marcadoras de vesículas secretadas pelo retículo endoplasmático (calnexina), ao mesmo tempo que mostra-se positivo para proteínas previamente descritas enriquecidas em vesículas extracelulares (Flotillin-1, TSG101, CD81, CD9). A presença de CD81 e Flotillin-1 é mais marcante do que a presença de CD9. A proteína calnexina foi positiva apenas no controle positivo, que consiste de proteínas extraídas de células de mioblastos C2C12. Interessante verificar que para as proteínas Flotillin-1, CD81 e CD9 o momento de coleta T3 apresentou maior concentração dessas proteínas mesmo sendo aplicada a mesma concentração de proteínas totais em cada poço do gel (**Figura 33**).

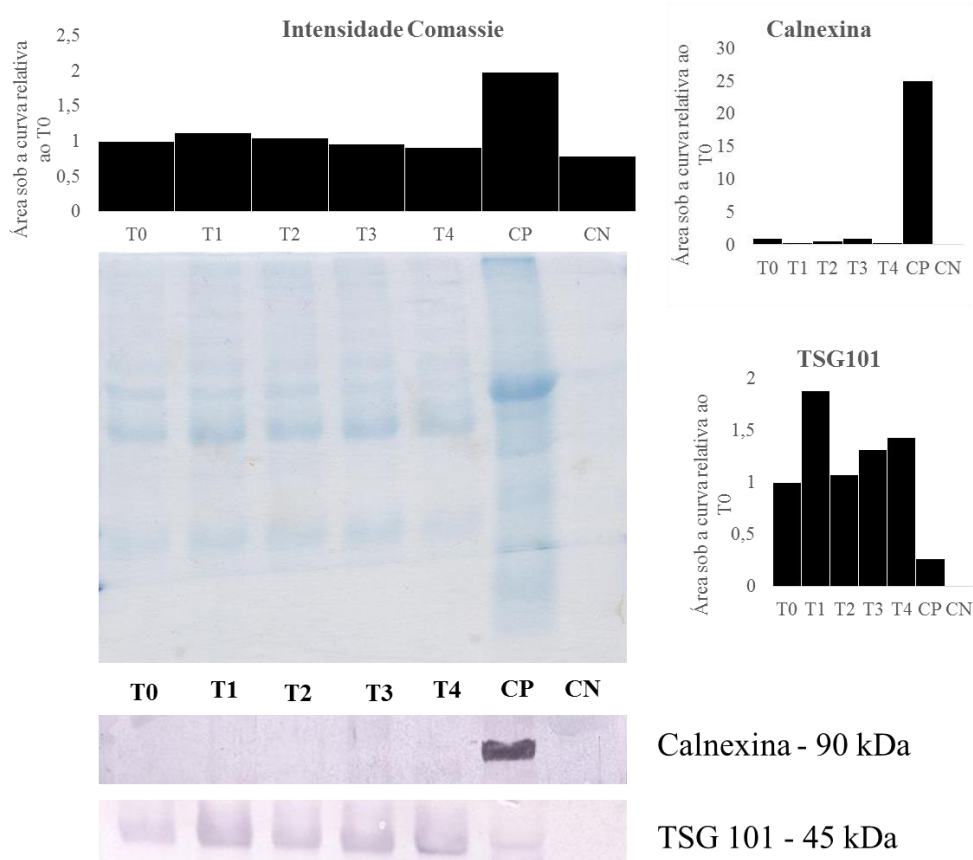


Figura 32. Identificação de proteínas marcadoras de vesículas secretadas pelo retículo endoplasmático (Calnexina) e proteínas marcadoras de vesículas secretadas pela via endossomal (TSG101). A análise quantitativa das bandas mostra presença de calnexina apenas no controle positivo e aumento da proteína TSG101 em T1, T3 e T4.

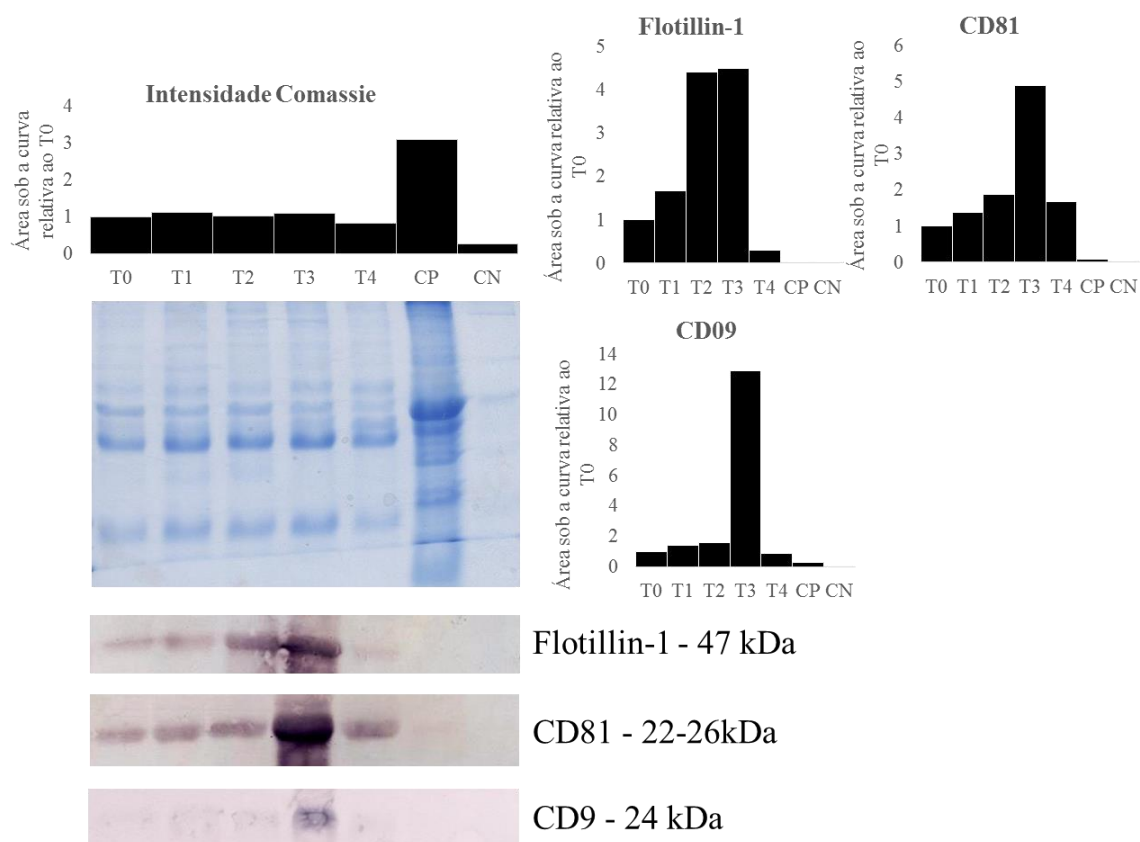


Figura 33. Identificação de proteínas marcadoras de vesículas secretadas pela via endossomal (Flotillin-1, CD81 e CD9). A análise quantitativa das bandas mostra um aumento destas proteínas em T3.

5.4.5 Extração, quantificação e caracterização de smallRNA purificados de VEs

Os pequenos RNAs foram extraídos das amostras previamente purificadas de VEs de forma individual em cada grupo, totalizando 24 amostras extraídas (T0 n=5, T1 n=5, T2 n=5, T3 n=4 e T4 n=5). O RNA foi caracterizado utilizando o *Small RNA Analysis Kits* (Figura 34) Bioanalyzer 2100, Agilent. A quantificação com o kit *Small RNA Analysis Kits* mostrou o enriquecimento de pequenos RNAs em todas as amostras purificadas e ausência de RNAs ribossômicos 18S e 28S (Figura 34). Os resultados mostraram o enriquecimento de RNAs de tamanho aproximado entre 20 e 40 nucleotídeos, o que corresponde ao tamanho de microRNAs maduros.

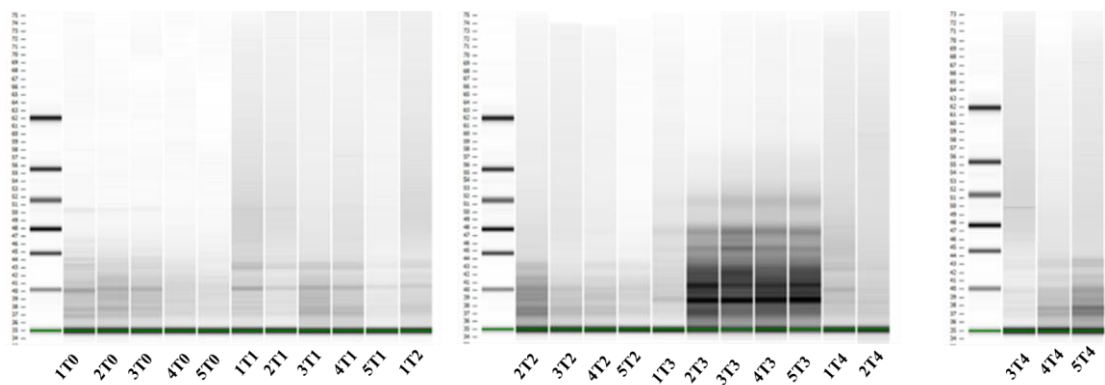


Figura 34. Caracterização das 24 amostras de pequenos RNAs extraídos de cavalos submetidos a prova de enduro utilizando *Chip small RNA*. As amostras 1T0 a 5T0 representam 5 amostras do ponto T0; As amostras 1T1 a 5T1 representam a coleta dos animais após 66km da prova; as amostras 1T2 até 5T2 representam o tempo T2. As amostras 1T3 até 5T3 representam o ponto T3; e as amostras 1T4 até 5T4 representam o último ponto de coleta T4.

Os resultados gerados pelo Bioanalyzer permitem ainda quantificar o RNA caracterizado em duas classes: pequenos RNAs (até 150 nt) e microRNAs (16 a 30nt). Apesar de não ser o método mais adequado para quantificação de RNA os resultados mostraram baixa concentração de RNA purificados de VEs. As amostras 2T3, 3T3, 4T3 e 5T3 apresentaram maior concentração de RNA (**Figura 35**).

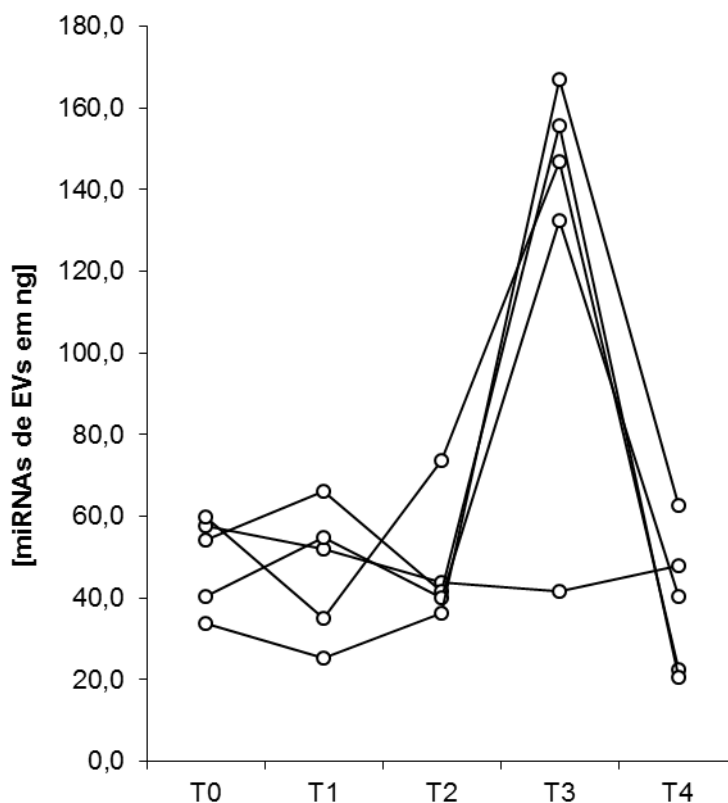


Figura 35. Quantificação de 24 amostras de pequenos RNAs extraídos de VEs purificadas de cavalos submetidos a prova de enduro. As amostras 1T0 a 5T0 representam 5 amostras do ponto T0; As amostras 1T1 a 5T1 representam a coleta dos animais após 66km da prova; as amostras 1T2 até 5T2 representam o tempo T2. As amostras 1T3 até 5T3 representam o ponto T3; e as amostras 1T4 até 5T4 representam o último ponto de coleta T4.

A concentração de pequenos RNAs extraídas variou de 17ng para a amostra com concentração mais baixa (5T1) até 167ng para a amostra com maior concentração de RNA (5T3). Na média, o tempo T3 (2 horas após a prova) apresentou maior concentração de RNA e o tempo T4 (15 horas após a prova) a menor concentração.

5.4.6 Construção de bibliotecas para sequenciamento de small RNAs em MiSeq (Illumina).

Após a caracterização do RNA purificados de VEs do plasma de cavalos submetidos a prova de enduro foi feita a construção de 24 bibliotecas para o sequenciamento de smallRNAs (5 amostras T0, 5 amostras T1, 5 amostras T2, 4 amostras T3 e 5 amostras T4). A construção das bibliotecas envolve a ligação dos adaptadores 3' e 5', transcrição reversa, 15 ciclos de PCR

para amplificação e duas corridas com o kit de 50 ciclos V2. Após a amplificação por PCR os resultados mostraram diferentes tamanhos de produtos de amplificação variando de 42 até 171pb. Os tamanhos referentes aos pequenos RNAs estão entre 147 e 157pb pois são valores referentes aos microRNAs maduros (22nt) e piwiRNAs (32nt) somados com 125pb dos adaptadores ligados (**Figura 36**).

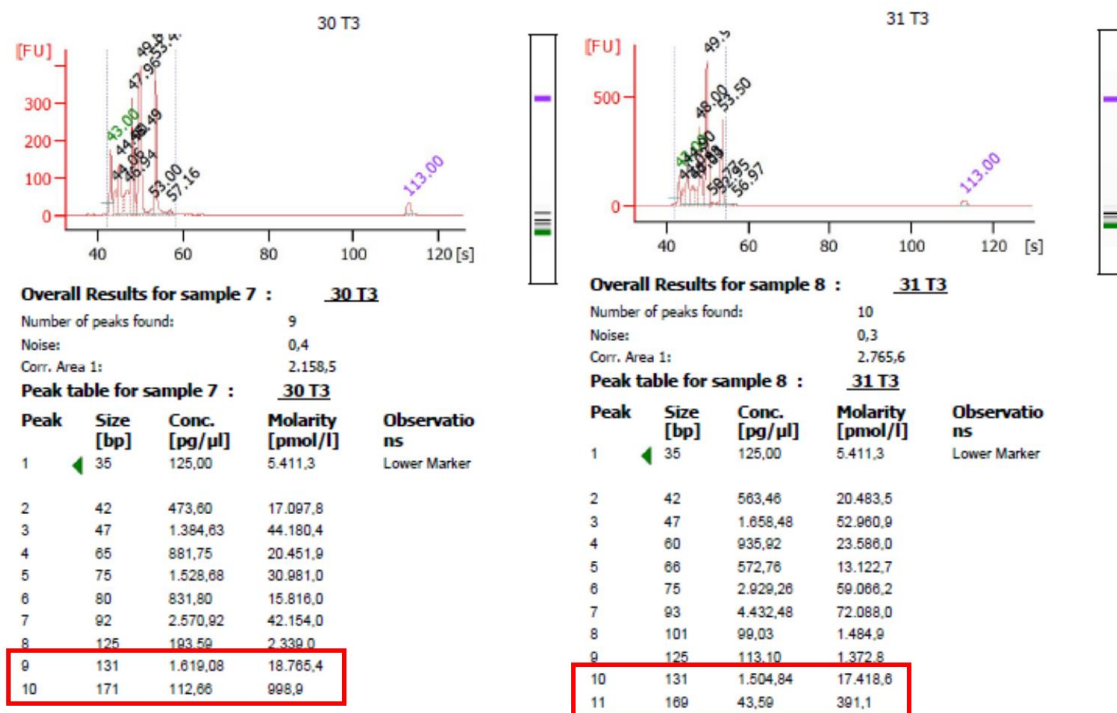


Figura 36. Resultado da ligação dos adaptadores, transcrição reversa e amplificação em duas amostras (3T3 e 4T3) de pequenos RNAs de VEs de plasma de cavalos submetidos a prova de endurecimento. Em detalhe os tamanhos de interesse para separação em gel de acrilamida.

Após a caracterização do cDNA, foi feita a separação dos fragmentos de interesse em gel de acrilamida a 6% para evitar sequenciar adaptadores e outros fragmentos que não correspondem aos RNAs de interesse. Após a corrida, o gel foi corado e as bandas referentes aos tamanhos de 147pb e 157pb foram fracamente visualizadas (**Figura 37A**, setas amarelas). Em seguida, esses fragmentos foram removidos dos géis (**Figura 37B**, retângulos vermelhos), eluídos e caracterizados em Bioanalyzer. Nota-se uma banda forte nas amostras (A1 e A2). Essa banda tem tamanho menor do que a banda mais baixa do marcador que corresponde a 140pb. Portanto a banda forte que aparece nas amostras é possivelmente dímero de adaptadores (~125pb). A banda de miRNAs e piRNA aparecem como um pequeno rastro acima das bandas dos adaptadores. A **Figura 37B** mostra como foram cortadas as bandas de interesse.

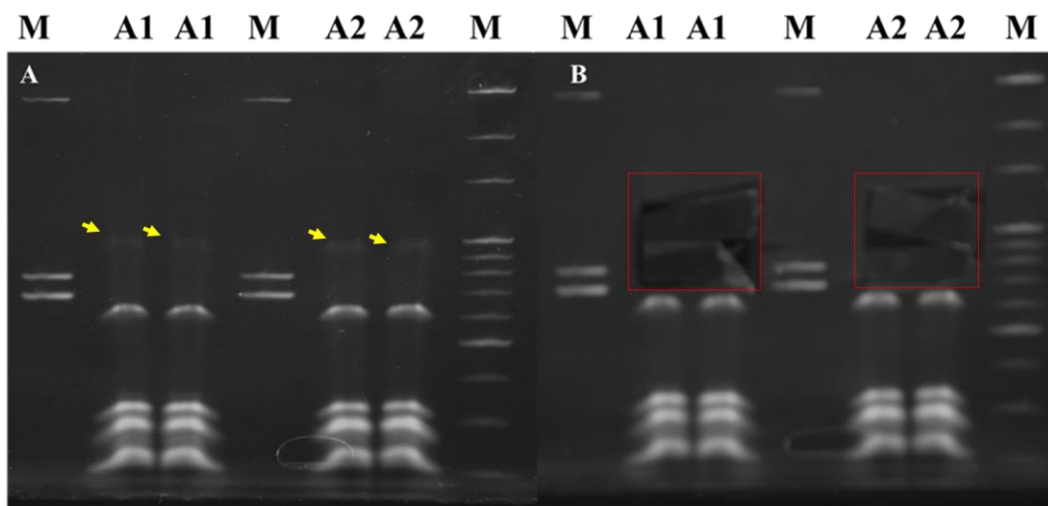


Figura 37. Gel de acrilamida 6% referente a separação dos fragmentos de cDNA em gel de acrilamida gerados pela ligação do RNA extraído ligados com adaptadores 3', 5', e amplificados para duas amostras A1 e A2 (A). Os fragmentos de interesse (setas amarelas) referente ao tamanho de miRNA e piRNA foram removidos do gel (retângulos vermelhos) e eluídos para o sequenciamento (B).

Após a remoção e eluição dos fragmentos de interesse do gel, foi feita a caracterização das bandas utilizando chip *DNA high sensitivity* do Bioanalyzer. A caracterização do cDNA após a separação dos fragmentos mostrou picos possivelmente de adaptadores de 125pb e também mostrou pico mais intenso de tamanho 148pb referentes aos microRNAs ligados aos adaptadores (**Figura 38**). A caracterização foi feita para todas as bibliotecas construídas e todas apresentaram o mesmo perfil de picos. Apesar da separação em gel de acrilamida, é difícil excluir completamente os dímeros de adaptadores que permanecem nas amostras e que tem tamanho próximo aos tamanhos dos miRNAs.

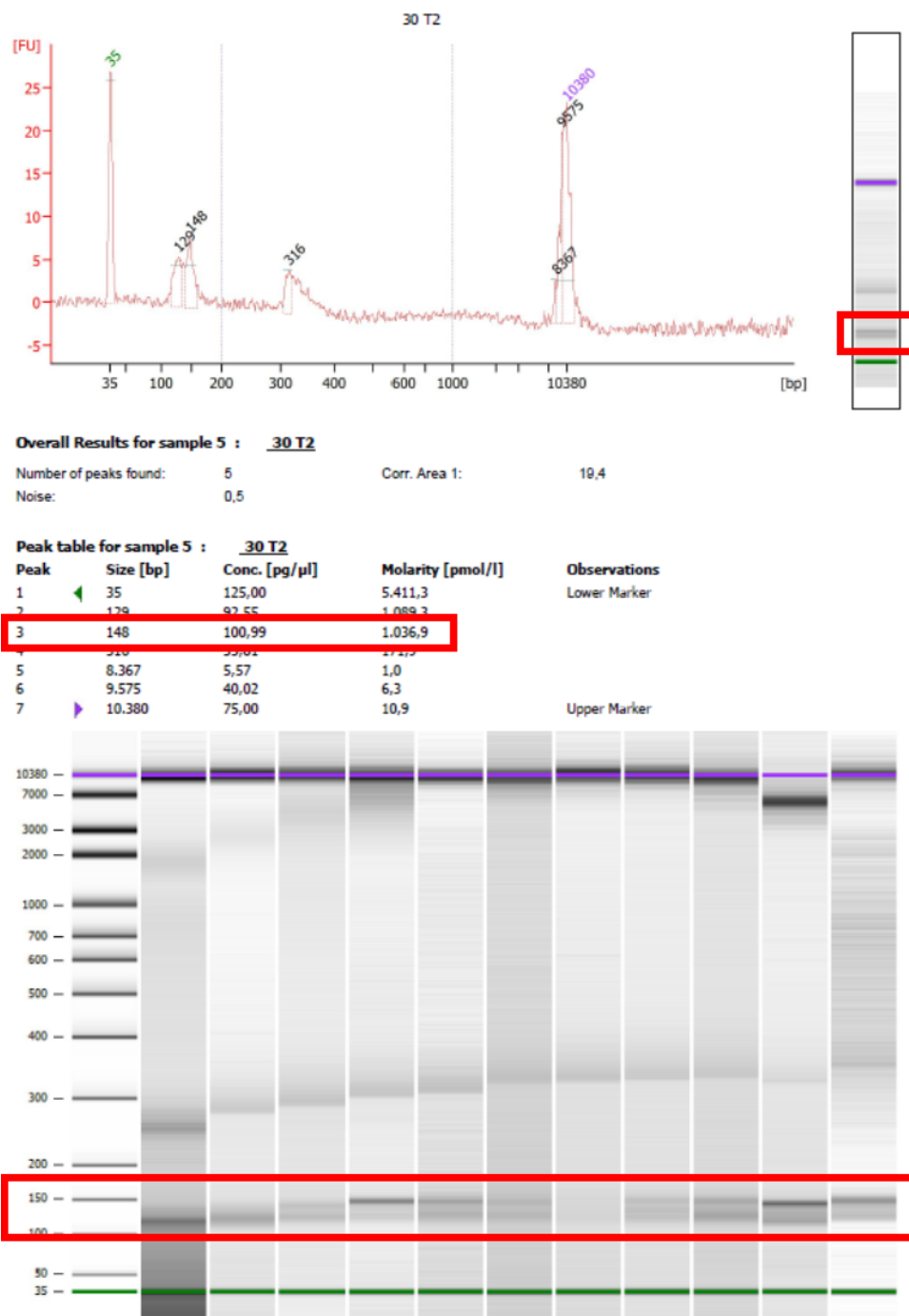


Figura 38. Caracterização do cDNA após a separação em gel de acrilamida 6% para 11 bibliotecas construídas. Fragmentos de tamanho entre 100 e 150pb foram enriquecidos como destacado em vermelho.

5.4.7 Sequenciamento de pequenos RNAs em Illumina MiSeq e análise de bioinformática utilizando alinhador BWA e software Nextgene (SoftGenetics).

Duas estratégias de bioinformática foram utilizadas para buscar o perfil de microRNAs e outros pequenos RNAs presentes nas amostras de VEs purificadas do plasma de cavalos submetidos a prova de enduro. A primeira estratégia fez o uso do *software* de análise de dados de NGS NEXTGENE® (SoftGenetics). Os parâmetros de filtro de qualidade do *software* foram: *median score threshold* ≥ 13 e *called base number of each read* ≥ 16 . Primeiro os dados brutos (fastq) foram convertidos em fasta e em seguida o adaptador foi trimado das sequencias. A **Tabela 16** representa os valores brutos obtidos no sequenciamento, valores de *reads* após a filtragem, trimagem de adaptador e alinhamento com o banco de dados de microRNAs maduros de *Equus caballus* do miRBase. Importante ressaltar que devido à baixa concentração de RNA presente em amostras de vesículas extracelulares, o valor obtido de *reads* mapeáveis foi baixo, na média 13,41% dos *reads* totais, o que indica que foram sequenciados em sua maior parte adaptadores. Após o alinhamento dos *reads* mapeáveis contra os microRNAs maduros, obteve-se uma média de 3,08% dos *reads* alinhados (**Tabela 16**).

Tabela 16. Resultado do sequenciamento de pequenos RNAs purificados de VEs purificados do plasma de cavalos submetidos a prova de enduro. Número de *reads* totais, após filtro de qualidade e alinhamento com banco de dados de microRNAs maduros.

Amostras	Total de <i>reads</i> na amostra	<i>Reads</i> trimados com sucesso	% de <i>reads</i> após trimagem	<i>Reads</i> Mapeados	% de miRNAs	Cobertura média
1T0_1a	387432	24980	6,45	2654	10,62	90
1T0_2a	652079	43171	6,62	4475	10,37	133
1T1_1a	674189	134598	19,96	4496	3,34	164
1T1_2a	749160	157359	21	5262	3,34	159
1T2_1a	439048	35220	8,02	5371	15,25	188
1T2_2a	531224	44146	8,31	6741	15,27	214
1T4_1a	548538	106538	19,42	2283	2,14	109
1T4_2a	772648	152752	19,77	3355	2,2	146
2T0_1a	591424	85557	14,47	1584	1,85	54
2T0_2a	860370	130043	15,11	2455	1,89	72
2T1_1a	495465	104276	21,05	3699	3,55	111
2T1_2a	554008	118592	21,41	4453	3,75	138
2T2_1a	664045	138187	20,81	1205	0,87	52
2T2_2a	725269	152939	21,09	1336	0,87	48
2T3_1a	686077	88207	12,86	1176	1,33	82
2T3_2a	219311	30931	14,1	441	1,43	55
2T4_1a	549870	85833	15,61	2612	3,04	244

2T4_2a	567437	79568	14,02	2724	3,42	254
3T0_1a	41595	5826	14,01	214	3,67	26
3T0_2a	70843	10156	14,34	374	3,68	23
3T1_1a	284727	52777	18,54	591	1,12	35
3T1_2a	412334	76231	18,49	882	1,16	35
3T2_1a	222039	34622	15,59	1065	3,08	68
3T2_2a	605658	98484	16,26	3087	3,13	119
3T3_1a	961882	52318	5,44	889	1,7	306
3T3_2a	803195	43529	5,42	715	1,64	266
3T4_1a	472024	116646	24,71	2866	2,46	133
3T4_2a	460682	109066	23,67	2870	2,63	115
4T0_1a	489422	44012	8,99	492	1,12	48
4T0_2a	498401	47387	9,51	544	1,15	57
4T1_1a	574589	90340	15,72	2095	2,32	69
4T1_2a	788140	132936	16,87	2989	2,25	101
4T2_1a	545289	89044	16,33	693	0,78	67
4T2_2a	564103	93784	16,63	792	0,84	68
4T3_1a	988525	57926	5,86	522	0,9	318
4T3_2a	1040029	61226	5,89	538	0,88	490
4T4_1a	798680	79899	10	2762	3,46	121
4T4_2a	764912	78759	10,3	2794	3,55	149
5T0_1a	713699	51677	7,24	2011	3,89	156
5T0_2a	718164	54166	7,54	2109	3,89	161
5T1_1a	504307	63807	12,65	4163	6,52	238
5T1_2a	650248	85395	13,13	5714	6,69	272
5T2_1a	551595	42614	7,73	735	1,72	95
5T2_2a	595547	47923	8,05	743	1,55	58
5T3_1a	321993	35180	10,93	3042	8,65	347
5T3_2a	303892	34215	11,26	2984	8,72	291
5T4_1a	657901	109419	16,63	4591	4,2	131
5T4_2a	540893	91937	17	3975	4,32	145
Total	27612902	3704198	13,414736	114163	3,0819897	142,1042

O número de reads para cada miRNA por amostra foi utilizado como *input* na preparação de heatmap contendo os 30 miRNAs mais abundantes (**Figura 39**). Os dez miRNAs maduros mais abundantes identificados pelo software NextGene foram os miRNAs: eca-miR-486-5p, eca-miR-486-3p, eca-miR-30e, eca-miR-30d, eca-miR-25, eca-miR-140-3p, eca-miR-92a, eca-miR-423-5p, eca-miR-101, eca-miR342-3p.

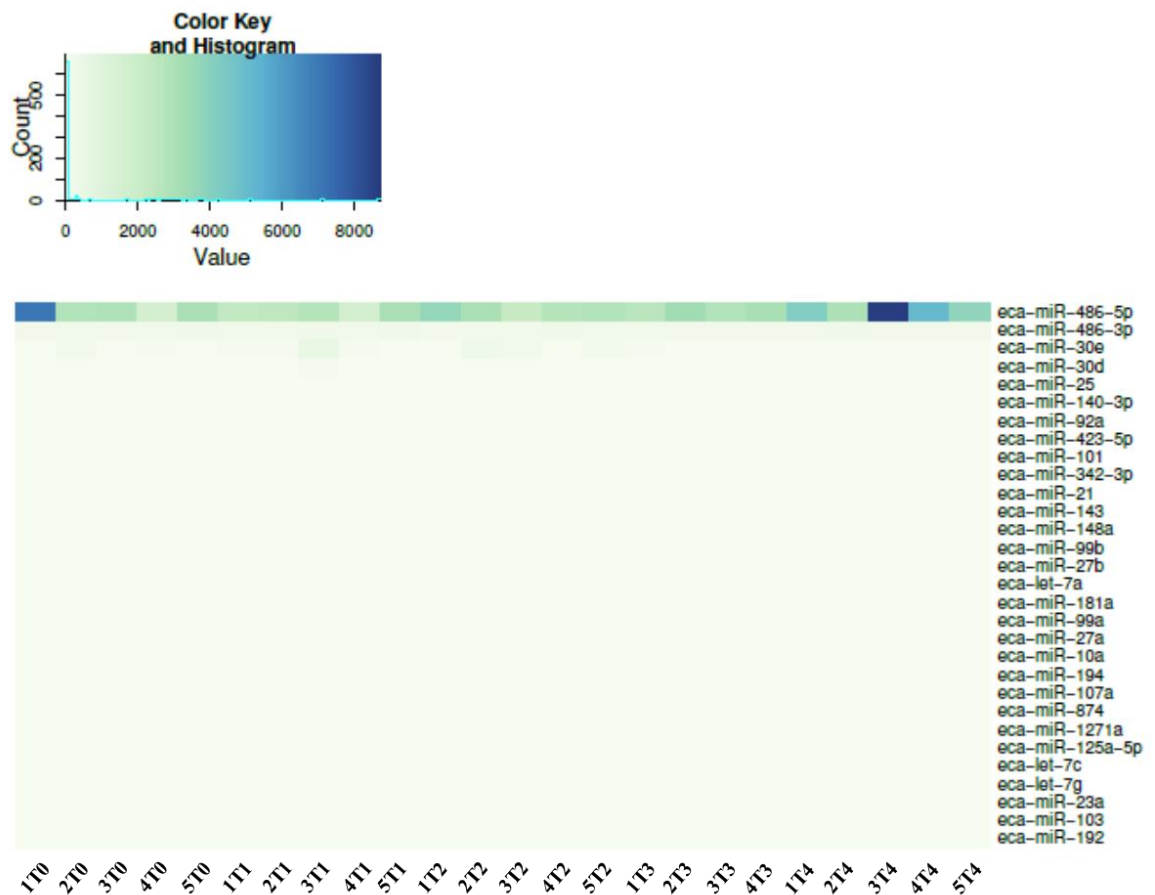


Figura 39. *Heatmap* mostrando os dados dos 30 miRNAs maduros mais abundantes em VEs purificadas de plasma de cavalos em repouso (T0), durante a prova após completarem 66km (T1), logo após completarem o fim prova (T2), 2 horas após a prova (T3) e 15 horas após o final do esforço, no dia seguinte (T4). Os valores utilizados levam em conta *reads* crus.

Após o alinhamento contra banco de dados de miRNA, os *reads* mapeáveis que não mapearam contra miRNA foram alinhados contra o banco de dados de RNA ribossomais de *Equus caballus* disponível no Ensembl afim de identificar rRNAs presentes nas amostras de VEs (**Tabela 17**). Como era de se esperar, o número de *reads* que mapearam contra o banco de dados de rRNA foi pequeno (1,87%) do número de *reads* que mapearam contra o banco de dados de miRNAs maduros.

Tabela 17. Resultado do sequenciamento de pequenos RNAs purificados de VEs purificados do plasma de cavalos submetidos a prova de enduro. Número de *reads* totais, após filtro de qualidade e alinhamento com banco de dados de rRNA.

Amostras	Reads não mapeados	Reads mapeados	% de rRNA	Cobertura média
1T0_1a	22064	262	1,05	22
1T0_2a	38278	418	0,97	28
1T1_1a	129451	651	0,48	52
1T1_2a	151256	841	0,53	46
1T2_1a	29732	117	0,33	20
1T2_2a	37248	157	0,36	22
1T4_1a	103362	893	0,84	61
1T4_2a	148070	1327	0,87	103
2T0_1a	71906	12067	14,1	443
2T0_2a	109002	18586	14,29	592
2T1_1a	100269	308	0,3	22
2T1_2a	113803	336	0,28	29
2T2_1a	134875	2107	1,52	140
2T2_2a	149088	2515	1,64	136
2T3_1a	86308	723	0,82	35
2T3_2a	30199	291	0,94	19
2T4_1a	82927	294	0,34	35
2T4_2a	76521	323	0,41	34
3T0_1a	5154	458	7,86	42
3T0_2a	8956	826	8,13	61
3T1_1a	49446	2740	5,19	169
3T1_2a	71390	3959	5,19	171
3T2_1a	33065	492	1,42	57
3T2_2a	93972	1425	1,45	98
3T3_1a	51372	57	0,11	6
3T3_2a	42766	48	0,11	5
3T4_1a	113445	335	0,29	32
3T4_2a	105846	350	0,32	24
4T0_1a	40033	3487	7,92	199
4T0_2a	43322	3521	7,43	186
4T1_1a	87054	1191	1,32	68
4T1_2a	128175	1772	1,33	96
4T2_1a	88123	228	0,26	26
4T2_2a	92744	248	0,26	27
4T3_1a	57140	264	0,46	25
4T3_2a	60368	320	0,52	31
4T4_1a	76853	284	0,36	33
4T4_2a	75657	308	0,39	41
5T0_1a	48457	1209	2,34	74
5T0_2a	50770	1287	2,38	85
5T1_1a	59429	215	0,34	27

5T1_2a	79393	288	0,34	39
5T2_1a	41711	168	0,39	19
5T2_2a	46978	202	0,42	17
5T3_1a	31913	225	0,64	16
5T3_2a	31000	231	0,68	13
5T4_1a	104280	548	0,5	57
5T4_2a	87514	448	0,49	49
Total	3520685	69350	1,87220014	75,67

Após o alinhamento contra banco de dados de rRNA, os *reads* mapeáveis que não mapearam contra miRNA e rRNA foram alinhados contra o banco de dados de *small nuclear* RNA disponível no banco de dados de RNAs não codificadores do Ensembl afim de identificar o número de snRNAs presente (**Tabela 18**). Os resultados mostram um baixo número de *reads* que mapearam contra este banco de dados, na média apenas 0,86% dos *reads*.

Tabela 18. Resultado do sequenciamento de pequenos RNAs purificados de VEs purificados do plasma de cavalos submetidos a prova de enduro. Número de *reads* totais, após filtro de qualidade e alinhamento com banco de dados de snRNA.

Amostras	Reads não mapeados	Reads mapeados	% de snRNA	Cobertura média
1T0_1a	21167	897	3,59	133
1T0_2a	36684	1594	3,69	88
1T1_1a	127764	1687	1,25	69
1T1_2a	149267	1989	1,26	84
1T2_1a	29439	293	0,83	42
1T2_2a	36844	404	0,92	56
1T4_1a	103271	91	0,09	7
1T4_2a	147906	164	0,11	11
2T0_1a	66818	5088	5,95	225
2T0_2a	100915	8087	6,22	262
2T1_1a	98773	1496	1,43	101
2T1_2a	112071	1732	1,46	106
2T2_1a	134821	54	0,04	4
2T2_2a	149019	69	0,05	6
2T3_1a	86206	102	0,12	11
2T3_2a	30146	53	0,17	10
2T4_1a	82900	27	0,03	14
2T4_2a	76478	43	0,05	11
3T0_1a	4948	206	3,54	35
3T0_2a	8511	445	4,38	80

3T1_1a	48643	803	1,52	64
3T1_2a	70162	1228	1,61	79
3T2_1a	33010	55	0,16	21
3T2_2a	93835	137	0,14	22
3T3_1a	51353	19	0,04	3
3T3_2a	42752	14	0,03	3
3T4_1a	113264	181	0,16	50
3T4_2a	105653	193	0,18	28
4T0_1a	39860	173	0,39	15
4T0_2a	43114	208	0,44	12
4T1_1a	86183	871	0,96	67
4T1_2a	126781	1394	1,05	91
4T2_1a	88105	18	0,02	3
4T2_2a	92734	10	0,01	3
4T3_1a	57099	41	0,07	6
4T3_2a	60337	31	0,05	5
4T4_1a	76806	47	0,06	6
4T4_2a	75596	61	0,08	8
5T0_1a	48285	172	0,33	24
5T0_2a	50593	177	0,33	16
5T1_1a	58770	659	1,03	85
5T1_2a	78534	859	1,01	63
5T2_1a	41694	17	0,04	6
5T2_2a	46963	15	0,03	2
5T3_1a	31855	58	0,16	9
5T3_2a	30941	59	0,17	6
5T4_1a	104164	116	0,11	13
5T4_2a	87427	87	0,09	11
Total	3488461	32224	0,869932	43,25

Após o mapeamento contra bancos de dados de miRNA, rRNA e snRNA os *reads* mapeáveis foram plotados a fim de se analisar a porcentagem de *reads* que foram identificados (Figura 40).

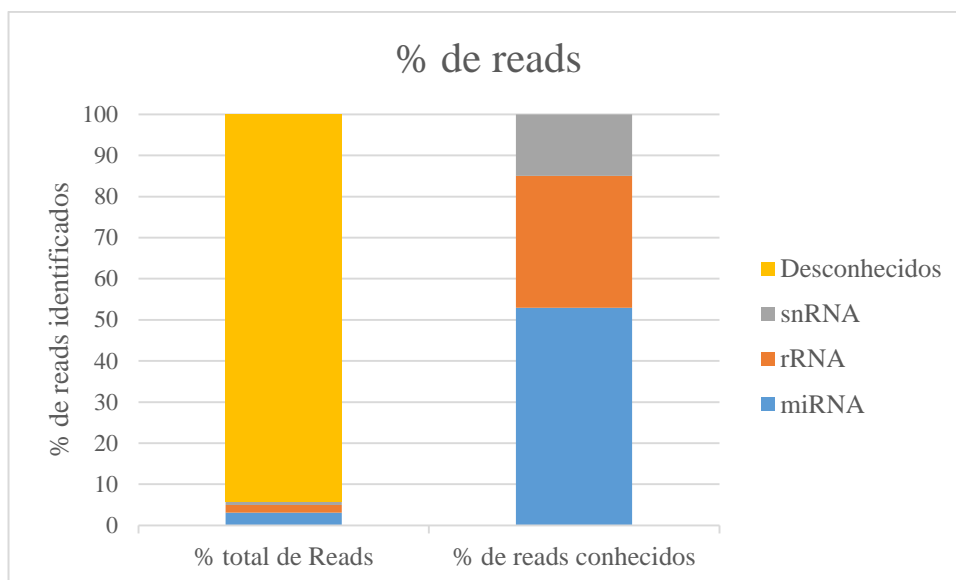


Figura 40. Porcentagem de *reads* que mapearam com banco de dados de miRNA, rRNA e snRNA para *Equus caballus*.

Com o objetivo de se analisar a quantidade de miRNAs com pelo menos 1 *read* identificado nas amostras, foi feita ordenação decrescente do número de *reads* dos miRNAs por amostra (**Tabela 19**).

Tabela 19. Quantidade de miRNAs maduros identificados pelo *software* NextGene com pelo menos 1 *read* por amostra.

Amostras	Quantidade de miRNAs com pelo menos 1 <i>read</i>
1T0	45
2T0	39
3T0	18
4T0	13
5T0	16
1T1	40
2T1	37
3T1	31
4T1	13
5T1	22
1T2	42
2T2	37
3T2	30
4T2	16
5T2	13

2T3	17
3T3	5
4T3	3
5T3	18
1T4	25
2T4	15
3T4	27
4T4	25
5T4	42

Após analisar o número de *reads* de cada amostra para cada banco de dados, foi feita uma planilha contendo a contagem de *reads* para cada miRNA em cada amostra. Todas as amostras foram corridas duas vezes (réplicas técnicas) e tiveram o número de *reads* somados para análise estatística dentro do pacote do R, Deseq2. MicroRNAs estatisticamente significativos foram considerados se $P_{adj} < 0.1$. O número de *reads* de miRNAs identificados no grupo T0 foram comparados com o número de *reads* de miRNAs identificados no grupo T1, T2, T3 e T4 (**Figura 41**). Foram encontrados 6 miRNAs diferencialmente expressos na comparação do grupo em repouso na prova de enduro (T0) com o grupo pós 15h de prova (T4). Os miRNAs eca-miR-30d, eca-miR-25, eca-miR-30e, eca-miR-423-5p e eca-miR-92a foram encontrados diminuído no grupo T4 comparado com o grupo T0 (**Tabela 20**).

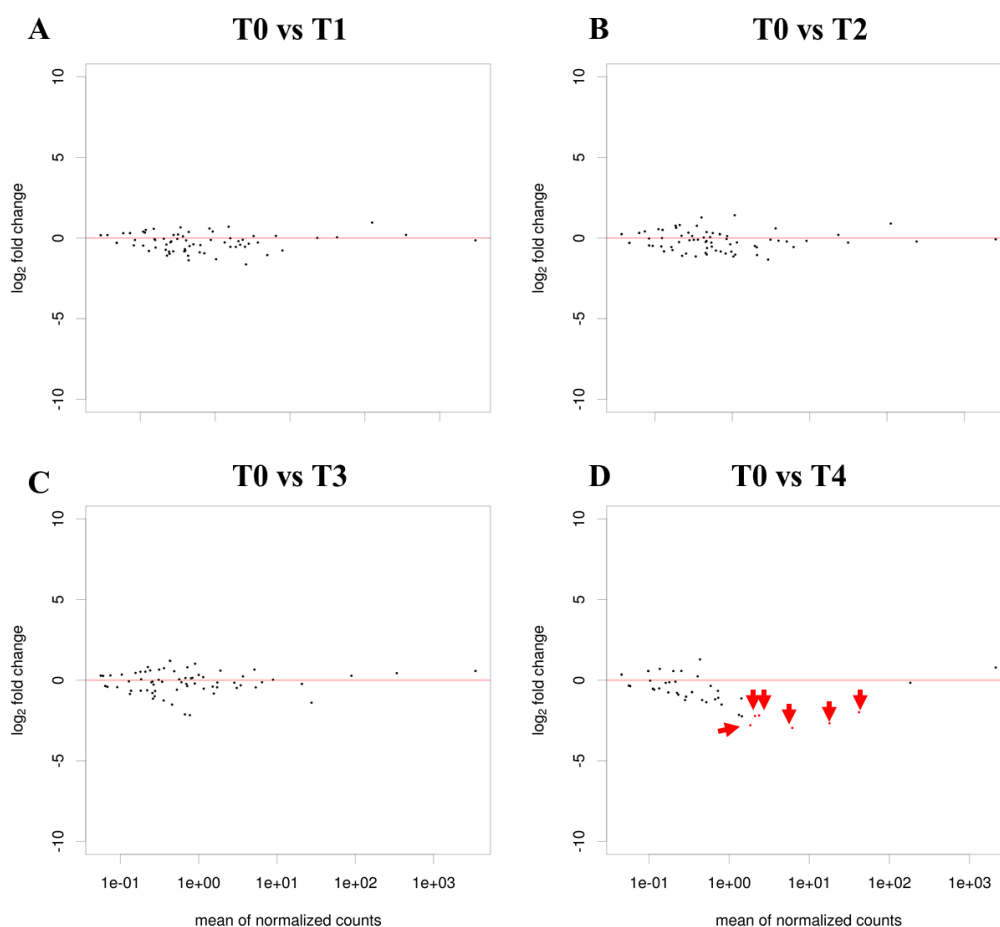


Figura 41. MicroRNAs diferencialmente expressos em VEs de cavalos submetidos a prova de enduro após análise de sequenciamento de nova geração pelo pacote estatístico Deseq2. (A) comparação entre os grupos T0 e T1. (B) comparação entre os grupos T0 e T2. (C) comparação entre os grupos T0 e T3. (D) comparação entre os grupos T0 e T4. Os pontos vermelhos representam significância estatística de $P_{adj} < 0.1$. O eixo X representa a média do número de *reads* para um determinado miRNA e o eixo Y representa a diferença na presença ou ausência em \log_2 . Cada ponto é considerado um miRNA. Setas vermelhas indicam os três miRNAs diferencialmente expressos.

Tabela 20. Valores de $\log_2\text{FoldChange}$ e de P_{adj} da contagem de *reads* dos 6 miRNAs diferencialmente expressos entre os grupos T0 e T4.

	baseMean	$\log_2\text{FoldChange}$	lfcSE	stat	pvalue	padj
eca-miR-30d	17,91	-2,67	0,71	-3,77	0,0002	0,0058
eca-miR-25	6,14	-2,96	0,88	-3,37	0,0008	0,0090
eca-miR-30e	41,86	-1,98	0,58	-3,44	0,0006	0,0090
eca-miR-423-5p	1,83	-2,79	1,01	-2,77	0,0056	0,0502
eca-miR-92a	2,10	-2,22	0,87	-2,55	0,0108	0,0778

5.5 Discussão capítulos 1 e 2

Um importante resultado obtido no capítulo 1 foi o aumento na concentração de VEs por mL no soro de ratos exercitados comparados aos ratos não exercitados (**Figura 10**). Para melhor avaliar o aumento na concentração de VEs após o exercício no soro de ratos, foi feita análise semiquantitativa da presença de CD-63 nas amostras de VEs por *western Blotting*. Assim como a concentração de partículas detectadas pela técnica de resistência de pulso (qNano), a concentração de CD63 identificada por *western blotting* também aumentou nos ratos exercitados nas intensidades leve, moderada e intensa, em relação aos ratos não exercitados (**Figura 16**). Estes dois resultados sugerem um aumento na liberação de vesículas extracelulares positivas para CD63.

De maneira similar também foi obtido um aumento na concentração de VEs por mL de plasma nos cavalos após a prova comparados ao momento de repouso antes da prova. O pico na concentração de VEs foi obtido após 15 horas da prova, não retornando ao estado de *baseline*, anterior a prova (**Figura 28**). As proteínas marcadoras de VEs, CD9, CD81 e Flotillin-1, atingiram maior concentração 2h após a prova (**Figura 33**).

Os dados encontrados corroboram o primeiro artigo que relatou aumento na concentração de VEs no plasma de humanos imediatamente após ciclos agudos de exercício em bicicleta e corrida (FRÜHBEIS et al., 2015). O autor sugere que o aumento da concentração de VEs na circulação após o exercício está relacionado a ativação fisiológica do corpo causada pela atividade física. As VEs podem ajudar no descarte de moléculas geradas sob condições de estresse e ajudar as células e tecidos a manter a homeostase, assim como ter papel na modulação imune, na ativação da reparação tecidual e vascular (FRÜHBEIS et al., 2015).

Foi demonstrado o aumento da produção de exossomas pela identificação do aumento de CD63 em células cultivadas com diferentes concentrações de heparanase. Não houve alterações nos níveis de CD9, CD81 e Flotillin-1 em decorrência do tratamento com heparanase (ROUCOURT et al., 2015). Outro artigo utilizou a contagem de vesículas por *nanoparticle tracking analysis* e a identificação de CD63 por *Western Blotting* para mostrar o aumento na produção de exossomas após cultivo celular em condições de hipóxia (KING; MICHAEL; GLEADLE, 2012).

Possivelmente o aumento da concentração de VEs no soro após o exercício físico é causado por diferentes mecanismos pelos quais os tecidos, principalmente tecidos muscular, endotelial e cardíaco se comunicam sob estímulo do exercício. A diminuição na proteína marcadora CD81 após o exercício em ratos e a ausência do pico de maior concentração das proteínas marcadoras 15h após prova no plasma de cavalos pode ser explicado pela nova corrente vigente sobre a existência de subpopulações de VEs (KOWAL et al., 2016) e também pelas diferenças no fluido biológico utilizado entre os dois capítulos, o soro contém mais vesículas devido ao processo de coagulação (WITWER et al., 2013).

O tecido muscular esquelético é considerado um órgão endócrino, pois secreta diversas citocinas e peptídeos chamados “miocinas” que possuem efeitos autócrinos, parácrinos e endócrinos. Entre algumas citocinas liberadas pelo tecido muscular estão a interleucina (IL) 6, IL-8, IL-15 e FGF21 (HAWLEY et al., 2014). Exossomas purificados de células mononucleares do sangue (PBMC) podem induzir ao aumento da liberação de citocinas pró inflamatórias e quimiocinas em PBMC (DANESH et al., 2014).

Além disso, a atividade física é conhecida por aumentar as concentrações plasmáticas de hormônio do crescimento (GH) e prolactina (LUGER et al., 1992). Duas semanas de exercício aeróbio intenso é suficiente para aumentar as concentrações plasmática de fator de crescimento semelhante a insulina e de proteínas de ligação a hormônio do crescimento (ROELEN et al., 1997).

Também é relatado na literatura que a oxigenação muscular e cerebral diminui progressivamente com o aumento da intensidade de exercício físico (SUBUDHI; DIMMEN; ROACH, 2007).

Como comparação, linhagens de células de câncer MCF7, MDA-MB 231 e SKBR3 liberam mais exossomas em cultura em ambientes de hipóxia (KING et al., 2012). Outros exemplos de aumento de liberação em exossomas em células sob condições de hipóxia foram descritos para células tronco mesenquimais da placenta (pMSC) (SALOMON et al., 2013), células tronco mesenquimais derivadas do cordão umbilical (ZHANG, H.-C. et al., 2012). Também foi demonstrado que cardiomiócitos sob condições de hipóxia, aumentam a transcrição de HF1-a e a liberação de exossomas carregados com TNF-a (YU et al., 2012).

Já foi mostrada a ação antiinflamatória de exossomas purificados de células tronco mesenquimais prevenindo vias proliferativas ativadas por hipóxia. O tratamento com exossomas suprimiu os níveis da citocina pró inflamatória interleucina-6 em tecido de pulmão sob hipóxia (LEE, C. et al., 2012).

Após a caracterização biofísica de vesículas extracelulares, os pequenos RNAs foram extraídos, caracterizados em Bioanalyzer (**Figura 19**, **Figura 20**, capítulo 1) e (**Figura 34**, **Figura 35**, capítulo 2), as bibliotecas foram construídas e o sequenciamento foi feito.

Já foi demonstrada a baixa concentração de miRNAs em fluidos biológicos comparados com tecidos e células, sendo a opção de sequenciamento uma estratégia ainda desafiadora (PRITCHARD; CHENG; TEWARI, 2012). Quando se utiliza vesículas extracelulares a concentração de RNA é ainda mais reduzida, já que uma grande parcela das vesículas podem não conter cópias de miRNAs (CHEVILLET et al., 2014).

Nossos resultados da caracterização dos RNAs purificados de vesículas extracelulares feitas em Bioanalyzer nos capítulos 1 e 2 corroboram com a literatura já descrita que mostram que os exossomas ou vesículas extracelulares carregam RNAs pequenos, menores do que 200 nucleotídeos em geral, e são ausentes de RNAs ribossomais 18S e 28S (LASSER et al., 2011; LASSER et al., 2012).

Um dos artigos utilizados como base para este trabalho buscou caracterizar miRNAs circulantes em vesículas extracelulares presentes no plasma de humanos e testar diferentes *kits* de preparo de bibliotecas para o sequenciamento. Os *kits* da Illumina apresentaram aproximadamente 50% de *reads* mapeáveis após o processamento dos *reads* (HUANG et al., 2013). Nossos resultados obtidos do sequenciamento dos pequenos RNAs de VEs no soro de ratos mostram um aproveitamento de aproximadamente 33% de *reads* mapeáveis no alinhamento contra os bancos de dados de pequenos RNAs feitos pelo *software* NextGene (**Figura 21**). Composto os *reads* mapeáveis, piwiRNAs corresponderam a 50% dos *reads*, miRNAs corresponderam a 22% dos *reads*, RNAs transportadores a 20% e RNAs ribossomais a 8% dos *reads* analisados com NextGene (**Figura 21**). Além disso, NextGene foi capaz de identificar na média geral entre as amostras 41 miRNAs maduros, do total de 765 miRNAs maduros disponíveis no miRBase para *Rattus norvegicus*, com pelo menos 5 *reads* identificados (**Tabela 10**)

Os resultados do sequenciamento dos pequenos RNAs nas VEs no plasma de cavalos mostraram um aproveitamento de aproximadamente 13,41% de *reads* mapeáveis no alinhamento contra os bancos de dados de pequenos RNAs feitos pelo *software* NextGene (**Tabela 16**). Composto os *reads* mapeáveis, miRNAs maduros corresponderam a 54% dos *reads*, rRNA corresponderam a 30% dos *reads*, e snRNAs obtiveram 16% dos *reads* pela análise com NextGene. Na média geral, conforme mostra a **Tabela 19**. Quantidade de miRNAs maduros identificados pelo *software* NextGene com pelo menos 1 *read* por amostra. foram

identificados pelo *software* NextGene 24 miRNAs maduros com pelo menos 1 *read* por amostra.

O *software* para análise de dados de NGS *NextGene* utilizado nesse trabalho foi desenvolvido em 2012 e dois artigos foram publicados no ano de 2014 utilizando o *software* para análise de expressão diferencial de miRNA em células periféricas do sangue humano após choque hemorrágico (UHLICH et al., 2014), e na identificação de miRNAs diferencialmente expressos em mosquitos após exposição ao vírus da dengue (CAMPBELL et al., 2014).

Um estudo publicado em 2010 que sequenciou amostras de soro de pacientes com câncer de pulmão identificou 109 e 101 miRNAs nos diferentes grupos pesquisados (HU et al., 2010). Em amostras de soro de pacientes que devolveram sepse foram identificados 153 miRNAs no grupo não sobrevivente e 173 miRNAs no grupo que sobreviveu a sepse (WANG et al., 2012). É importante lembrar que amostra de soro total contém mais miRNAs do que as amostras de VEs purificadas do soro, já que o soro total contém miRNAs associados a proteínas, vesículas extracelulares e também contém miRNAs frutos da apoptose e necrose celular (SCHWARZENBACH et al., 2014).

A baixa porcentagem de *reads* mapeáveis obtidos pelo sequenciamento é reflexo da baixa concentração de RNA extraídos que foram utilizados nos preparos das bibliotecas e no sequenciamento, sendo sequenciados em sua maioria junção entre adaptadores (WILLIAMS et al., 2013).

Comparando os 10 miRNAs mais abundantes em todas as amostras identificados em VEs no soro de ratos pelo NextGene estão: rno-miR-486, rno-miR-191a-5p, rno-miR-3557-5p, rno-miR-320-3p, rno-miR-22-3p, rno-miR-423-5p, rno-miR-423-3p, rno-miR-378a-3p, rno-miR-3473, rno-miR-140-3p .

Já para os miRNAs de VEs no plasma de cavalos, os 10 miRNAs mais abundantes foram: eca-miR-486-5p, eca-miR-486-3p, eca-miR-30e, eca-miR-30d, eca-miR-25, eca-miR-140-3p, eca-miR-92a, eca-miR-423-5p, eca-miR-101, eca-miR342-3p.

Três grupos de pesquisadores estudaram miRNAs circulantes em vesículas extracelulares de amostras de soro humano, utilizando o sequenciamento como metodologia de análise. Tanto na comparação entre amostras de exossomas de urina e soro de pacientes saudáveis, os quatro miRNAs hsa-miR-486, hsa-miR-320a, hsa-miR-378a, hsa-miR-191 foram identificados entre os doze miRNAs mais abundantes em amostras de exossomas purificados do soro. Destes quatro miRNAs apenas hsa-miR-191 apareceu entre os miRNAs mais abundantes em amostras de exossomas purificados de urina (LI, M. et al., 2014). Este resultado é importante para

demonstrar a especificidade que miRNAs circulantes em exossomas apresentam em diferentes fluidos biológicos.

Outro estudo envolvendo pacientes saudáveis e com doença de Alzheimer buscou identificar miRNAs em exossomas do soro dos voluntários. Nesse estudo foi sugerido a utilização de hsa-miR-486-5p e hsa-miR-191-5p como controles endógenos para qPCR, devido à grande concentração destes miRNAs e pouca diferença de expressão entre as amostras (CHENG, L et al., 2014). Vale ressaltar que a alta concentração de miR-486 no plasma pode ser um indicativo de hemólise (SHKURNIKOV et al., 2016).

Os miRNAs hsa-miR-191-5p, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-486-3p e hsa-miR-320a também foram encontrados entre os 25 miRNAs mais abundantes em exossomas do soro e plasma de humanos saudáveis (CHENG, L. et al., 2014). No soro de mulheres em gestação normal, foram encontrados os miRNAs hsa-miR140-3p, hsa-miR191 e hsa-miR-486-5p entre os dez miRNAs mais abundantes após sequenciamento de nova geração (YANG, Q. et al., 2011).

Algumas das variações nos níveis de miRNAs encontradas em alguns estudos podem ser explicadas pelas variações metodológicas existentes nesses estudos. Essas variações metodológicas vão desde a coleta do sangue e separação do soro passando por diferentes metodologias de purificação de VEs, de *kits* de extração de RNA, preparo de bibliotecas e análise de dados de sequenciamento (WITWER et al., 2013).

HUANG et al. (2013) comparou três *kits* de preparo de bibliotecas para sequenciamento de miRNAs em vesículas do plasma, *NEBNext multiplex small RNA library preparation kit* (NEB, New England Biolab, Ipswich, MA, USA), *NEXTflex small RNA sequencing kit* (Bioo Scientific, Austin, TX, USA) e *TruSeq small RNA sample preparation kit* (Illumina, San Diego, CA, USA). Os resultados mostraram que o *kit* da empresa NEB identificou 21 vezes mais sequências de miR-129-5p do que os *kit* da Illumina e da Bioo. O *kit* Illumina gerou mais de 50 vezes mais sequências de miR-486-5p do que o *kit* Bioo Scientific e NEB. O *kit* Bioo Scientific produziu 31 vezes mais sequências de miR-124-3p do que Illumina e NEB. As variações metodológicas também foram evidentes para os 20 miRNAs mais abundantes identificados (HUANG et al., 2013). Esses resultados mostram uma seleção preferencial de miRNAs de acordo com o *kit* de preparo de bibliotecas utilizado. Nossos resultados corroboram com o estudo, já que o miRNA rno-miR-486 foi considerado o mais abundante tanto em VEs do soro de ratos quanto em VEs do plasma de cavalos.

Após comparar com a literatura o resultado dos miRNAs mais abundantes encontrados nos estudos, a análise de “expressão” diferencial foi feita tanto para VEs no soro de ratos e plasma de cavalos com objetivo de buscar miRNAs diferencialmente expressos entre os grupos de animais exercitados.

A primeira comparação envolveu os miRNAs diferencialmente expressos entre os ratos não exercitados e exercitados na intensidade leve. Os rno-miR-25-3p, rno-miR-148a-3p, rno-miR-22-3p, rno-miR-191a-5p, rno-miR-128-3p e rno-miR27a-3p foram encontrados diferencialmente expressos nessa comparação (**Figura 22**). Porém os , rno-miR-128-3p e rno-miR27a-3p não foram considerados candidatos por serem miRNAs raros, com baixo número de *reads* em todas as amostras. Na comparação entre os ratos exercitados em alta intensidade e não exercitados, os miRNAs rno-miR-10a, rno-miR-10b e rno-miR-191-5p foram encontrados diferencialmente expressos (**Figura 24**)

Para o estudo dos miRNAs diferencialmente expressos em VEs no plasma de cavalos, os miRNAs eca-miR-30d, eca-miR-25, eca-miR-30e, eca-miR-423-5p e eca-miR-92a foram encontrados diminuídos 15h após a prova comparadas ao repouso no dia anterior a prova (**Figura 41**)

O miR-25 foi descrito na literatura diminuído em cultura de células musculares lisas das vias aéreas após estímulo com citocinas pró inflamatórias IL-1b, TNF-a e IFN-g. Os mRNAs alvos de miR-25 incluíam diversos transcritos conhecidos por participarem da regulação do sistema imune, em especial KLF4, proteína com papel importante na inflamação, proliferação e diferenciação de células musculares lisas vasculares e participa da mudança fenotípica como um potente inibidor da expressão de genes específico do músculo. KLF4 também participa da resposta inflamatória, já que é um regulador chave da diferenciação de monócitos e ajuda com a ativação de genes em resposta pró-inflamatórias a IFN-g, LPS ou TNF-a. Os resultados sugerem que miR-25 regula o fator de transcrição KLF4 e tem importante papel na regulação das respostas inflamatórias em células musculares lisas de vias aéreas (KUHN et al., 2010). Os resultados com a atividade física sugerem uma alta carga de citocinas pró-inflamatórias em tecidos e células após a atividade física, o que explicaria a redução nos níveis de miR-25 extracelulares.

Já o miR-148a-3p foi o miRNAs mais abundante em exossomas purificados de leite suíno, e aumentou nos períodos de lactação. Este miRNA tem como alvo direto o gene DNA metiltransferase 3b (DNMT3). Essa interação entre altos níveis de miR-148-3p dentro de exossomas do leite suíno e seu alvo nas células sugere que miR-148a-3p levam a repressão da

tradução de DNMT3B e uma consequente diminuição de metilação *de novo* em células do trato digestivo infantil (CHAO et al., 2012; GU et al., 2012). Como em nosso estudo se trata de amostras de soro, é difícil traçar o destino final destas vesículas extracelulares, porém, os resultados da análise de miR-148-3p sugerem que a diminuição no nível deste miRNA dentro de vesículas no soro pode indiretamente levar ao aumento traducional de DNMT3b, e assim induzir um aumento na metilação em células e tecidos alvos destas vesículas. São necessários mais experimentos para testar essa hipótese.

O miRNA miR-191a-5p foi estudado com possível biomarcador para detecção de lesão tubular proximal induzida por cisplatina em ratos. Este miRNA foi encontrado aumentado na urina quando ocorre necrose dos túbulos proximais durante a coleta de urina. Este miRNAs apresentou sensibilidade comparáveis aos marcadores atualmente utilizados, tais como soro BUN, creatinina, e biomarcadores proteicos na urina (KANKI et al., 2014).

Outros importantes estudos buscaram analisar a importância do miR191a-5p em diferentes tipos de cânceres. Este miRNA está associado com vários tumores humanos, incluindo no cólon, pulmão, pâncreas, próstata, e câncer de estômago, assim como em doenças hematopoiéticas associadas a leucemia linfocítica aguda (LLA). O miR-191 foi encontrado hipometilado e super expresso em tumor de fígado, e a inibição de miR-191 diminuiu a proliferação celular e o crescimento do tumor em células de carcinoma hepatocelular (ELYAKIM et al., 2010). A ativação do cluster miR-191 e miR-425 (miR-191/425), pela expressão dos genes DALRD3 e Receptor de Estrógeno α (ER α) foi demonstrado modulando a tumorigênese de células de câncer de mama (DI LEVA et al., 2013). O miR-191 também exibido papéis específicos do tipo de tumor na tumorigênese, como miR-191 reprime MDM4 e CDK6 expressão no câncer folicular ovariana e da tireóide, atrasando assim a progressão do câncer e morte relacionada ao tumor (PENG et al., 2014).

O *cluster* miR-191/425 foi estudado em tecido de câncer gástrico (GC) e no soro, a fim de se poder relacionar estes miRNAs como possíveis biomarcadores de câncer gástrico. Foi demonstrado níveis aumentos significativamente deste *cluster* em tecidos humanos de GC em relação aos controles normais adjacentes. Além disso, os níveis de miR-191 correlacionaram com o estágio do tumor e o estado metastático. Logo, o nível de miR-191 no soro foi significativamente mais elevado no grupo de GC do que no grupo controle. Os resultados sugerem que a inibição de miR-191 ou miR-425 nas linhagens celulares HGC CG-27 não só reduziu a proliferação celular e progressão do ciclo celular, mas também prejudicou a migração e invasão celulares. Os autores indicaram a potencial utilização de miR-191 como um novo

biomarcador estável para o diagnóstico de GC (PENG et al., 2014). Os nossos resultados mostraram diminuição nos níveis de rno-miR-191-5p tanto após o exercício leve quanto após o exercício intenso.

O miR-22-3p foi o único miRNAs encontrado significativamente aumentado na comparação entre ratos não exercitados e exercitados na intensidade leve.

Um grupo de pesquisadores testaram hipótese que exossomas secretados pelas células tronco mesenquimais (MSCs) comunicam com cardiomiócitos para transferir miRNAs que melhorem a função cardíaca após enfarte do miocárdio através da regulação da expressão de genes específicos. Os resultados do artigo mostraram que a entrega de miR-22 reduziu a apoptose em cardiomiócitos isquêmicos, melhorou a fibrose e a função cardíaca pós enfarte do miocárdio (FENG et al., 2014).

Já o miR-10b tem alta expressão em células de câncer metastático de mama MDA-MB-231, em comparação com células de câncer da mama não metastáticas ou células não malignas da mama. Este miRNA é ativamente secretado para o meio por meio de exossomas. Após a absorção de exossomas carregados com miR-10b, ele suprime o nível de proteína de seus genes-alvo, como HOXD10 e KLF4, indicando sua importância funcional. O tratamento com derivados de exossomas purificados de células MDA-MB-231 pode induzir a capacidade de invasão de células humanas mamárias epiteliais (HMLE) não-malignas (SINGH et al., 2014). Além disso, miR-10b circulante no plasma foi estudado como promissor biomarcador para detecção do *status* do linfonodo em câncer de mama (CHEN, W. et al., 2013).

Uma ampla revisão da literatura revelou que o exercício tem um efeito positivo sobre uma ampla gama de parâmetros de qualidade de vida, em pacientes diagnosticados com câncer. A intensidade moderada de exercício, de 3 a 5 dias por semana, de 20 a 30 minutos por sessão foi considerada ideal nesses pacientes (COURNEYA; MACKAY; JONES, 2000). Da mesma forma, estudo envolvendo mulheres com câncer de mama mostrou que pacientes que se exercitavam obtiveram índices de qualidade de vida mais alta em comparação com mulheres com câncer que não se exercitavam (YOUNG-MCCAUGHAN; SEXTON, 1990).

Baseado nos dados da literatura e nos resultados apresentados, é possível especular que os benefícios causados pelo exercício físico em pacientes com câncer pode estar relacionado com a diminuição nos níveis de alguns miRNAs oncomiRs liberados dentro de vesículas extracelulares no soro/plasma. Estas vesículas podem direcionar, ou até “sequestrar” miRNA celulares, e assim contribuir para a melhoria dos sintomas de câncer. Estudos futuros são necessários para tentar esclarecer este envolvimento.

O conhecimento científico envolvendo miRNAs circulantes em resposta à diferentes exercícios físicos ainda é muito recente. O primeiro artigo a analisar indiretamente os efeitos do exercício na população de miRNAs circulantes foi em 2009. Laterza et al, após tratar ratos com substâncias tóxicas para o músculo esquelético, avaliou os níveis dos miRNAs miR-122, miR-133a no plasma dos animais (LATERZA et al., 2009).

Antes de se conhecer o perfil de miRNAs circulantes em soro e plasma, os estudos focaram em escolher miRNAs enriquecidos em tecido muscular, chamados myomiRs (miR-1, miR-133a e miR-206) (MCCARTHY, J. J.; ESSER, 2007), para análise em soro/plasma utilizando qPCR (BAGGISH, A. L. et al., 2011). Já foi demonstrado o aumento da concentração de myomiRs no plasma de atletas recreacionais após uma meia maratona (GOMES et al., 2014). É importante notar que não foram identificados estudos de sequenciamento de miRNAs em soro e plasma que encontraram os myomiRs enriquecidos nestes fluidos biológicos. Os miRNAs circulantes em soro e plasma são oriundos de um complexo conjunto de células e tecidos.

Em 2014 foi publicado artigo que estudou o perfil total de miRNAs circulantes no plasma em resposta ao exercício aeróbio agudo e ao exercício de endurance. As coletas foram realizadas em homens jovens saudáveis antes e depois de uma sessão de exercício físico agudo e também após doze semanas de exercício de resistência. De um painel disponível com 752 miRNAs, 188 miRNAs foram utilizados nas análises por apresentar valores de Ct menores do que 33,5. Após a sessão de exercício agudo de 60 min em bicicleta a 65% do *peak-watt*. Oito miRNAs foram encontrados diminuídos imediatamente após o exercício (miR-106a, miR-221, miR-30b, miR-151-5p, let-7i, miR-146a, miR-652, miR-151-3p). Uma hora após o exercício agudo, 5 miRNAs foram encontrados aumentos (miR-338-3p, miR-330-3p, miR-223, miR-139-5p, miR-143) e três horas após o exercício, apenas o miR-1 foi encontrado aumentado (NIELSEN, SØREN et al., 2014). Em relação ao exercício resistido, onde os voluntários se exercitaram em bicicleta ergométrica com uma frequência de cinco vezes por semana, durante doze semanas, os resultados mostraram diminuição de sete miRNAs (miR-342-3p, let-7d, miR-766, miR-25, miR-148a, miR-185, miR-21), enquanto dois miRNAs foram encontrados aumentados significativamente após as 12 semanas de exercício (miR-103, miR-107) (NIELSEN, SØREN et al., 2014). Os resultados dos miRNAs miR-25 e miR-148a corroboram com nossos resultados, onde estes dois miRNAs foram encontrados significativamente reduzidos após o exercício leve (**Figura 22**).

A primeira publicação envolvendo miRNAs circulantes dentro de vesículas extracelulares foi publicada no ano de 2015. Este artigo mostrou correlação positiva significativa entre o *fitness* aeróbio e miRNAs músculo específicos (GUESCINI et al., 2015).

É importante ressaltar que a diminuição nos níveis de miR-221 e miR-146a após o exercício agudo encontrado no estudo de NIELSEN, SØREN et al. (2014) está em discordância com o estudo publicado por BAGGISH, AARON L et al. (2011). Nesse estudo, a expressão basal de tanto miR-221 quanto miR-146a foi encontrada elevada na resposta ao exercício agudo e após 10 semanas de exercício de endurance de remo. No estudo de Nielsen, nem miR-221 quanto miR-146 foram encontrados diferencialmente expressos após 12 semanas de exercício de resistência. Além disso, as respostas induzidas pelo exercício agudo e pelo exercício de resistência no estudo de Baggish, em termos da presença de miR-21, entraram em contradição com o estudo. Sempre que o exercício agudo não tinha efeito na expressão de miR-21, o exercício de resistência marcadamente diminuiu a expressão. No entanto, a diminuição da presença no estudo de Nielsen esta em concordância com o achado por BYE et al. (2013) que demonstrou associação entre o baixo consumo máximo de oxigênio e altos níveis de presença de miR-21 circulantes no soro. As diferenças entre os estudos podem ser explicadas pelos diferentes protocolos de exercício aplicados. NIELSEN, SØREN et al. (2014) exercitou seus voluntários por 1 h a 65% da potência máxima. Já BAGGISH, AARON L et al. (2011) utilizou teste de VO2 máximo para definir o exercício agudo.

Até o presente momento não foi descrito um estudo envolvendo sequenciamento de miRNAs em vesículas extracelulares sob o estímulo do exercício. Isto torna difícil a comparação já que os miRNAs considerados diferencialmente expressos em estudos de não foram encontrados.

Os RNAs que interagem com proteínas piwi (piRNAs), são a maior classe de pequenas moléculas de RNA não codificadoras expressas em células de animais (SIOMI et al., 2011). Os piRNAs foram um complexo proteína-RNA por meio de interações com proteínas piwi. Estes complexos piRNAs foram descritos envolvidos no silenciamento gênico ao nível pós-transcricional e epigenético de retrotransposões e outros elementos genéticos nas células da linhagem germinativa, em particular durante a espermatogênese (LAU et al., 2006; SIOMI et al., 2011).

Os resultados mostram que os piRNAs mais presente em amostras de vesículas extracelulares purificadas do soro de ratos, em todas as amostras, foram os piRNAs: rno_piR_024955 seguido pelos rno_piR_005567 e rno_piR_012174.

Em amostra de exossomas purificados de saliva, o piRNA mais abundante foi o piR-018570, que teve um nível de presença média de 32.296 *reads* por milhão em todas as amostras estudadas. Para confirmar a presença destes piRNAs em exossomas na saliva, dois piRNAs abundantes no estudo (piR-001184 and piR-014923) foram escolhidos para validação por ddPCR (BAHN et al., 2015).

No caso do exercício aeróbio agudo em cavalos, precisa-se entender o tipo de exercício praticado, que foi uma etapa do campeonato de Enduro Equestre, prova sob as normas da Federação Equestre Internacional (FEI).

Em relação aos miRNAs diferencialmente expressos em amostras coletadas em diferentes tempos de prova, miR-25 foi encontrado com expressão aumentada em doenças como insuficiência cardíaca, tanto em ratos e seres humanos. A utilização de um oligonucleotídeo antisense (antagomir) contra miR-25 conseguiu interromper a insuficiência cardíaca estabelecida em modelo de rato, melhorando a função cardíaca e sobrevivência (WAHLQUIST et al., 2014).

A super expressão de miR-30d levou ao aumento da expressão do gene da insulina, enquanto que a inibição de miR-30d aboliu a transcrição do gene de insulina estimulada por glicose (TANG et al., 2009). Os MiR-25 e miR-30d têm como alvo direto a região 3' UTR do gene TP53 com o objetivo de regular negativamente os níveis da proteína p53 e reduzir a expressão de genes que são ativados transcricionalmente por p53 (KUMAR et al., 2011).

O microRNA-423 (miR-423) foi regulado positivamente em carcinoma hepatocelular (HCC). MiR-423 exerce efeitos de promoção do crescimento na carcinogênese hepática através da diminuição da expressão do gene supressor de tumor p21Cip1/WAF1 (LIN et al., 2011). Os resultados deste estudo consideraram miR-423 como um novo miRNA oncogênico para HCC. O miR-423 também foi regulado positivamente em pacientes com câncer de mama que desenvolveram metástase (VOLINIA et al., 2012).

Um estudo que buscou avaliar as diferenças na expressão gênica e na presença de miRNAs no sangue periféricos de cavalos antes e após prova de enduro (160 km) encontrou 167 miRNAs diferencialmente expressos após a prova. Desses 167, 21 (miR-15a, miR-16, miR-17, miR-18a, miR-20ab, miR-21-5p, miR-27a, miR-30b, miR-93, miR-101, miR-106, miR-107, miR-125b, miR-130, miR-138-5p, miR-145, miR-181ab-5p, miR-221, miR-223, miR-342-3p e miR-505) foram considerados tiveram alvos confirmados dentro de genes expressos em sangue periférico e estão relacionados ao exercício (MACH et al., 2016). Nenhum destes miRNAs foram encontrados em nosso estudo, o que pode ser justificado pela diferença do fluido biológico

utilizado (VEs do plasma vs sangue periférico) e também pela metodologia de identificação (microArray vs sequenciamento).

**6 Capítulo 3 – O impacto das proteínas
RIPK1 e RIPK3 em vesículas extracelulares
purificadas do cérebro de camundongos
submetidos à injúria traumática cerebral e
na morte celular por necroptose em
macrófagos derivados da medula óssea
(MDMO)**

6.1 Objetivos

6.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o impacto das proteínas RIPK1 e RIPK3 na concentração de vesículas extracelulares purificadas do cérebro de camundongos após injúria traumática cerebral e em macrófagos derivados da medula óssea.

6.1.2 Objetivos específicos

- Purificar vesículas extracelular do cérebro de camundongos WT, D138N e RIP3^{KO} após contusão e concussão cerebral;
- Caracterizar vesículas extracelular do cérebro de camundongos WT, D138N e RIP3^{KO} após contusão e concussão cerebral;
- Purificar e crescer macrófagos derivados da medula óssea de camundongos WT, D138N e RIP3^{KO};
- Tratar macrófagos WT, D138N e RIP3^{KO} com drogas que ativem a via de necroptose;
- Purificar e caracterizar vesículas extracelulares derivadas de macrófagos WT, D138N e RIP3^{KO} após morte por necroptose;

6.2 Fluxograma – Capítulo 3

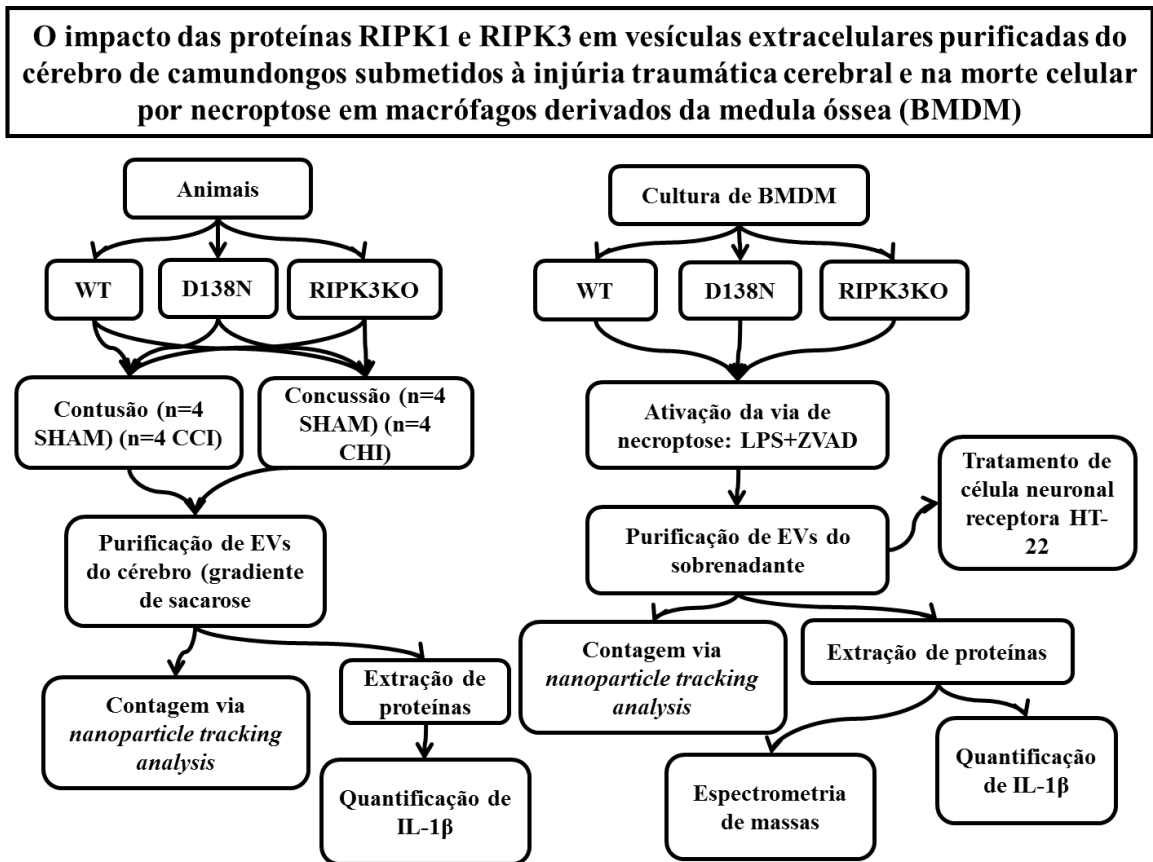


Figura 42. Fluxograma representando as etapas executadas no capítulo intitulado: O impacto das proteínas RIPK1 e RIPK3 em VEs purificadas do cérebro de camundongos submetidos à injúria traumática cerebral e na morte celular por necroptose em macrófagos derivados da medula óssea (MDMO).

6.3 Metodologia

6.3.1 Animais

Camundongos fêmeas C57BL/6 entre 8 e 10 semanas de idade foram utilizados nos experimentos de contusão e concussão cerebral. Para coleta de células da medula óssea foram utilizados camundongos fêmeas C57BL/6 entre 4 e 10 semanas de idade. Os genótipos D138N, mutação pontual na proteína RIP1, e RIP3^{KO} foram adquiridos junto ao laboratório Jackson (The Jackson Laboratory) e mantidos no biotério do *Massachusetts General Hospital*.

6.3.2 Contusão e concussão cerebral

O procedimento cirúrgico para realização do impacto cortical controlado (contusão, CCI) foi realizado 48h antes da coleta do cérebro e da purificação de vesículas extracelulares. Os camundongos foram anestesiados com isoflurano a 4% (Anaquest, Memphis, TN) em 70% de N₂O e 30% de O₂ por 45 segundos usando um vaporizador *Fluotec 3* (Colonial Medical, Amherst, NH). Durante a cirurgia, a anestesia foi mantida com 3,5% de isoflurano. A cabeça foi posicionada em um aparelho estereotáxico e após uma incisão na linha média do couro cabeludo, uma craniotomia de 5 mm foi feita com uma broca de mão e lâmina cilíndrica acima do lobo parietal esquerdo. A dura-máter foi deixada intacta. O impacto foi feito com pistão pneumático de ponta plana de 3 mm a uma velocidade de 6 m/s, duração de 100 ms e profundidade de 0,6 mm. O pistão foi centralizado na dura-máter e o cérebro comprimido até o ponta do pistão tocar na superfície do cérebro. O cérebro é deformado aproximadamente 0,6 mm durante o ajuste da ponta do pistão e a profundidade total do impacto é de 1,2 mm. Este nível de lesão resulta em perda significativa do Hipocampo ipsilateral dorsal e déficits cognitivos robustos avaliados por *Morris Water Maze*. Os camundongos não lesionados foram chamados de Sham, pois receberam as mesmas doses de anestesia e craniotomia sem CCI. Neste desenho experimental 8 animais foram utilizados, 4 Sham e 4 Contusão.

O protocolo de concussão seguiu o mesmo procedimento anestésico da contusão. Após os camundongos estarem anestesiados, foram colocados em papel *Kimwipe* (*Kimwipe, Kimberly-Clark, Irving, TX, USA*), segurados pela cauda e posicionados com a cabeça embaixo de um tubo PVC de 96,5cm de comprimento e 5cm de diâmetro. Em seguida, um peso de metal

de 54gramas foi solto dentro do tubo de pvc acertando diretamente a parte dorsal do crânio, entre as suturas coronal e lambdóide. Com o impacto, a cabeça do camundongo rasga o papel e permite a aceleração da cabeça no plano anterior, posterior. Os camundongos Sham receberam a anestesia mas não sofreram a concussão. Para os experimentos de concussão, 8 animais foram utilizados, 4 Sham e 4 concussão.

6.3.3 Purificação de vesículas extracelulares

Os animais foram anestesiados e sacrificados 48h após as contusões e concussões e os cérebros foram coletados. Apenas as regiões ipsilaterais do córtex foram utilizados para a purificação de vesículas extracelulares. O protocolo de purificação utilizado seguiu as recomendações de (PEREZ-GONZALEZ et al., 2012). Resumidamente, os córtex foram depositados em solução contendo 20 unidades/ml *Papain* (Worthington) em *Hibernate E solution* (3 ml/córtex; BrainBits, Springfield, IL) por 15 min a 37 °C. O tecido foi gentilmente homogeneizado em 2 volumes (6 ml/cortex) de *Hibernate E* gelada. Os córtex homogeneizados foram filtrados em filtro de 40 µm seguido por filtro de 10 µm (BD Biosciences). Em seguida, o filtrado foi centrifugado por 300 x g por 10 min at 4 °C, 2.000 x g for 20 min at 4 °C, e filtrado com filtro de seringa de 0.2 µm (Millipore). O filtrado foi diluído em 40ml de PBS ultrapuro e as VEs foram isoladas do filtrado por ultracentrifugação a 120.000 x g por 2h a 4 °C. O *pellet* foi ressuscitado em 40ml de PBS ultrapuro e nova ultracentrifugação a 120.000 x g por 2h a 4 °C foi feita. Em seguida, o *pellet* foi ressuscitado em 500 µL de PBS e carregado no topo de um gradiente contendo 8%, 30%, 45% e 60% de sacarose e ultracentrifugados por 200000 x g por 1h a 4 °C. Em seguida, foram coletadas 12 frações de 1ml do topo do gradiente, diluídas em PBS e ultracentrifugadas por 120.000 x g por 1h a 4 °C. Os *pellets* foram ressuscitados em 40µL de PBS ultrapuro e armazenados em freezer -80 °C. Para determinar as frações de VEs presentes no gradiente de sacarose, 20µL de amostra foi utilizada em *Western Blotting*.

6.3.4 Identificação de proteínas por *Western blotting*

A extração de proteínas das vesículas extracelulares (VEs) foi feita utilizando 20µL VEs, diluídas em 2 µL de tampão de extração de proteínas RIPA 10X (Millipore) adicionado de 0,2 µL de coquetel inibidor de protease e vortexadas por 20s. O conteúdo de proteínas totais de

VEs foi analisado em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%. O perfil de proteínas totais de VEs e de proteínas marcadoras de exossomas foram identificadas por *Western blotting*. Foram separadas 12 frações do gradiente de sacarose, de 8% a 60%. Inicialmente as proteínas foram separadas por tamanho em eletroforese de proteínas em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12%, fixados em cuba de eletroforese (Bio-Rad Mini Protean II). Em cada gel foi aplicado um volume de 22,2 μ L de VEs de cada fração por poço. Os géis correram em voltagem de 150V e amperagem de 15 mA por 1h. O gel foi transferido para membranas de PVDF. A transferência foi feita seca utilizando *iBlot 2 Dry Blotting System* (Thermo Fisher). A transferência foi feita por 7min em voltagem de 20V. As membranas foram bloqueadas por 1h em BSA 5% diluído em tampão TBST 1X (50 mM Tris.HCl pH 7.4; 150 mM NaCl; 0.1% Tween 20).

Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpo primário anti-Alix (1:100) (Santa Cruz Biotechnology), anti IL-1 β (1:100) (Abcam, ab2105) em BSA 5% em TBST1X overnight. O anticorpo anti IL-1 β reconhece tanto a forma precursora (31KDa) quanto a forma madura da proteína (17KDa). Após três lavagens com TBST1X, o anticorpo secundário Anti-IGG de coelho (1:1000; Sigma), conjugado com HRP, foi aplicado às membranas, e incubadas por 1h em BSA 5% em TBST1X. Após 3 lavagens com TBST1X as membranas foram reveladas utilizando *Luminata Crescendo Western HRP substrate* (Millipore).

6.3.5 Análise por rastreamento de nanopartículas

A medida de concentração e distribuição de tamanho de VEs foram feitas pelo equipamento *Nanoparticle tracking analysis* (Malvern, EUA) versão 2.2. As variáveis utilizadas foram *camera shutter* 1495, *camera gain* no máximo, tempo de duração de vídeo de 60 segundos. Os vídeos foram feitos do lado direito do ponto de captura (*red spot*). As análises foram feitas com *screen gain* no máximo. Todas as variáveis foram mantidas entre todas as leituras.

6.3.6 Cultura de macrófagos derivados da medula óssea

A primeira etapa para cultivo de macrófagos derivados da medula óssea consiste na preparação do meio de cultura. As células tronco devem ser inicialmente cultivadas em meio chamado *High Serum* por pelo menos 5 dias. O meio *High Serum* contém 30% de sobrenadante

das células L929 (crescidas por 7 dias em RPMI com 10% soro fetal bovino e 1% Pen\Strep), 20% de soro fetal bovino, 1% Pen\Strep em RPMI. O sobrenadante da célula L929 é utilizado como fornecedor do fator de crescimento de macrófagos, M-CSF. As células L929 foram cedidas gentilmente pela Dra. Xandra Breakefield do Massachusetts General Hospital.

Femurs e tíbias foram removidos de camundongos e a medula óssea coletada em tubo Falcon com a ajuda de seringa contendo PBS ultrapuro. Após centrifugação a 300 x g por 5 min as células tronco da medula óssea foram semeadas em 16 placas de petri de 15 cm de diâmetro (Corning) contendo 15 mL de meio *High Serum*. As células foram incubadas a 37 °C. Após 3 dias de incubação, foram adicionados mais 5 mL de *High Serum* em cada placa. Após 5 dias de incubação, as células foram coletadas das placas de petri via lavagem com PBS, centrifugadas, contadas e 2 milhões de células foram semeadas por placa de petri de 15cm contendo 20mL de *Low Serum* (10% sobrenadante L929, 10% soro fetal bovino e 1% Pen\Strep em RPMI). Após o dia 7 as células estavam prontas para receber os tratamentos. No dia dos tratamentos, o meio foi substituído pelo meio de tratamento (apenas RPMI) e os tratamentos foram feitos 5 minutos após a substituição do novo meio.

6.3.7 Ativação de Necroptose em Macrófagos

A ativação da via de morte celular nos Macrófagos foi feita durante 2h e 24h utilizando os seguintes tratamentos: DMSO 0.3% (Sigma-Aldrich), LPS de *E.coli* 10ng/mL (Sigma-Aldrich), Zvad 50uM (ApexBio), Necrostatin-1 30 uM (ApexBio), LPS 10ng/mL + Zvad 50uM, LPS 10ng/mL + Zvad 50uM + Necrostatin-1 30 uM. ZVAD é um inibidor químico de todas as caspases e Necrostatin-1 (NEC1) é um inibidor químico específico da proteína RIPK1. Após 2h e 24h, Iodeto de propídio foi adicionado nas placas e células mortas, positivas para Iodeto de propídio, foram contadas no microscópio. Após a contagem de células mortas, o sobrenadante do meio foi coletado, processado para purificação de vesículas e as células utilizadas para identificação de proteínas por *Western Blotting*.

6.3.8 Purificação de VEs de macrófagos

A purificação seguiu o protocolo de centrifugação diferencial. O sobrenadante das células foi centrifugado a 300 x g por 10 min para remoção de eventuais células mortas, 2.000 x g por

20 min para remoção de debris, filtração com filtro de 0,8 μm e ultracentrifugação a 120.000 x g por 2h a 4°C. As vesículas purificadas dos diferentes tratamentos foram contadas e medidas utilizando o *Nanoparticle tracking analysis*.

6.3.9 Tratamento de células neuronais HT-22 com VEs

A linhagem de célula neuronal HT-22 foi utilizada como recipiente para avaliar o papel funcional das vesículas extracelulares secretadas por macrófagos em necroptose. Células HT-22 foram cultivadas em placas de petri de 6 poços contendo meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de Pen\Strep até atingirem uma confluência de 90%. A mesma concentração de vesículas (5×10^8 \text{mL}) foi utilizada nos tratamentos. Após 48h do tratamento com vesículas, Iodeto de propídio foi adicionado nas células e as células mortas foram contadas no microscópio.

6.4 Resultados

6.4.1 Purificação e caracterização de VEs do cérebro de camundongos submetidos a contusão e concussão cerebral

A purificação de VEs diretamente do cérebro de camundongos seguiu o protocolo de (PEREZ-GONZALEZ et al., 2012). O protocolo utiliza série de filtrações, centrifugação diferencial e gradiente de sacarose para purificar VEs. A **Figura 43** mostra que a presença da proteína marcadora de VEs, Alix, que foi identificada nas frações 4, 5, 6 e 7 de um gradiente de 30% a 45% de sacarose.

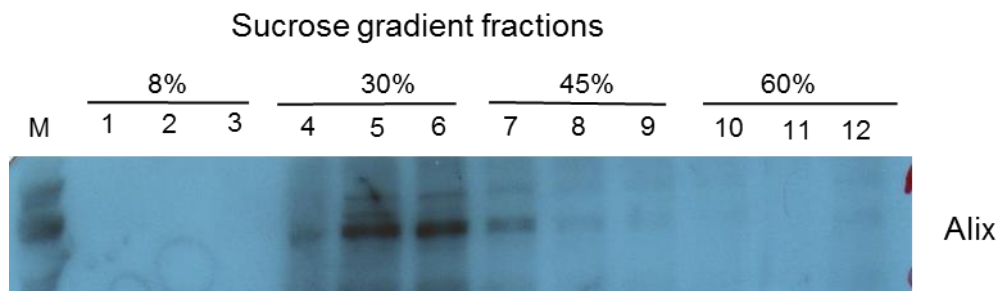


Figura 43. *Western blotting* para identificação da proteína marcadora de VEs, Alix, em 12 frações de gradiente de sacarose de purificado de VEs do cérebro de camundongos submetidos a contusão (CCI) e concussão (CHI) cerebral.

Após a identificação das frações cuja proteína Alix foi positiva no *Western Blotting*, as frações positivas foram combinadas e precipitadas para formar uma amostra de VEs. Após isso, foi feita a contagem de VEs/mL e a distribuição do tamanho modal das partículas utilizando o *nanoparticle tracking analysis*. Não houve diferença estatística na concentração e no tamanho das VEs entre os grupos Sham e CCI (contusão), tanto nos animais WT, quanto nos animais $RIP3^{KO}$ e D138N (**Figura 44**).

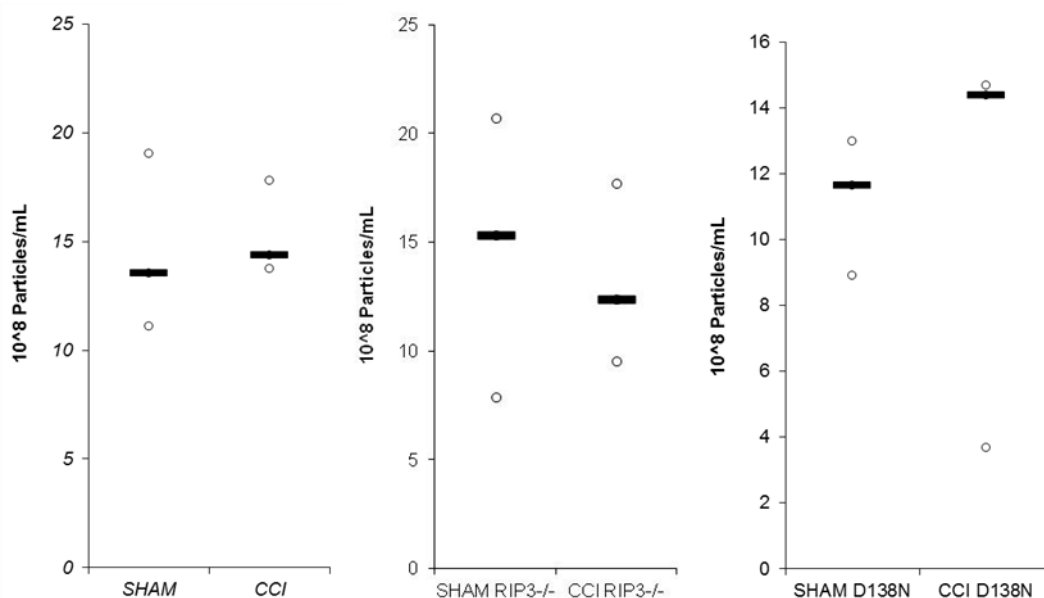


Figura 44. VEs purificadas do cérebro de camundongos WT, D138N e $RIP3^{KO}$ após contusão cerebral (CCI) foram quantificadas por *nanoparticle tracking analysis*. Cada ponto representa VEs purificadas de um animal.

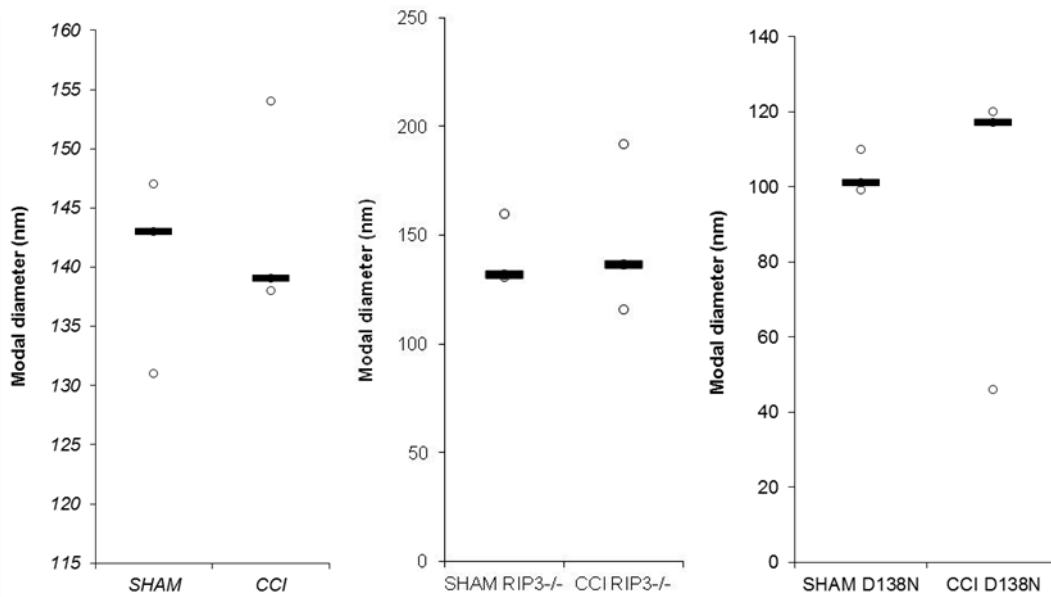


Figura 45. VEs purificadas do cérebro de camundongos WT, D138N e RIP3KO após contusão cerebral (CCI) foram medidas em relação ao diâmetro modal por *nanoparticle tracking analysis*. Cada ponto representa VEs purificadas de um animal.

Em seguida, foi analisada a presença da Interleucina 1 β (IL-1 β) associada a VEs liberadas após a contusão e concussão cerebrais. Utilizando duplicatas biológicas foi demonstrado por *Western Blotting* um aumento na presença da IL-1 β madura nas amostras de contusão, comparados com as amostras Sham tanto nos grupos WT, D138N e RIP3^{KO} (**Figura 46**).

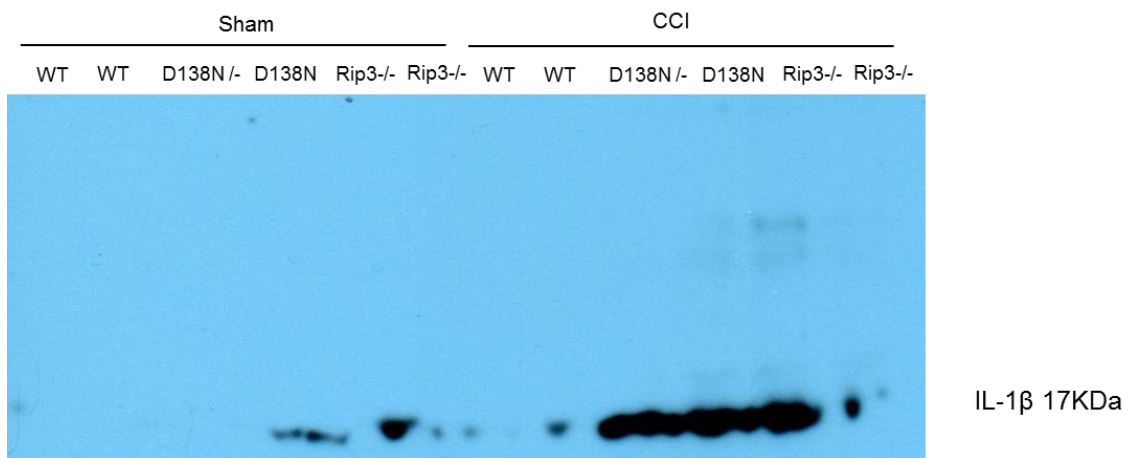


Figura 46. *Western blotting* para identificação da proteína madura IL-1 β em VEs purificadas do cérebro de camundongos WT, D138N e RIP3KO submetidos a contusão cerebral (CCI). Duas réplicas biológicas foram utilizadas nesse experimento.

De forma semelhante, também foi observado um aumento na presença da proteína IL-1 β em amostras de VEs purificadas após a concussão cerebral (CHI) de camundongos. Utilizando quatro réplicas biológicas, foi possível identificar o aumento na IL-1 β em VEs em 3 das 4 amostras (**Figura 47**).

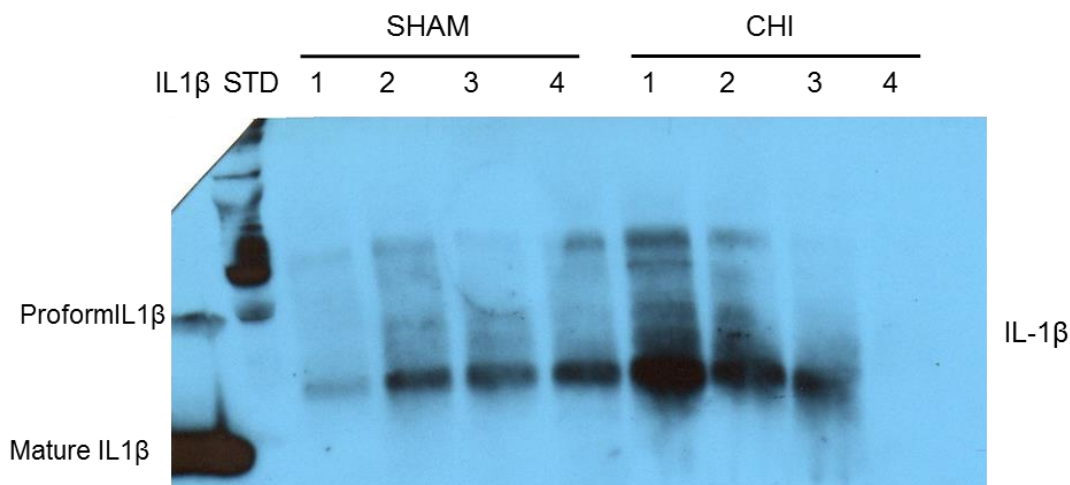


Figura 47. *Western blotting* para identificação da proteína precursora IL-1 β em VEs purificadas do cérebro de camundongos WT submetidos a concussão cerebral (CHI). Quatro réplicas biológicas foram utilizadas nesse experimento.

6.4.2 Purificação e caracterização de vesículas extracelulares purificadas de macrófagos em necroptose após 2h.

Após o estudo de VEs purificadas diretamente do cérebro de camundongos submetidos a injúria traumática cerebral, foi iniciado estudo com a ativação da morte celular por necroptose em macrófagos derivados da medula óssea de camundongos. Após a diferenciação das células-tronco da medula em macrófagos por 7 dias as células foram tratadas por 2h com LPS+ZVAD para ativação da via de necroptose e as células mortas foram identificadas com ajuda do corante Iodeto de Propídio (PI) e contadas em microscópio. Células vivas (campo claro) e mortas (PI+) foram contadas em 5 campos do microscópio em três experimentos independentes. Os tratamentos utilizados foram DMSO, LPS, ZVAD, LPS+ZVAD e LPS+ZVAD+NEC1. Necrostatin-1 (NEC1) é um inibidor químico específico da proteína RIPK1. Após 2h, o número de células mortas no tratamento com LPS+ZVAD é estatisticamente maior do que os outros grupos, indicando que a via de necroptose estava ativada após 2h. Para confirmar que a morte celular estava ocorrendo pela via de necroptose e não alguma via de sinalização diferente, foi

feito um *western blotting* para identificação da proteína MLKL fosforilada (p-Mkl). Os resultados do *western blotting* mostram a presença de p-Mkl apenas na amostra tratada com LPS+ZVAD, desaparecendo com a aplicação do inibidor da proteína RIPK1, NEC1, configurando assim uma morte por necroptose (**Figura 48**).

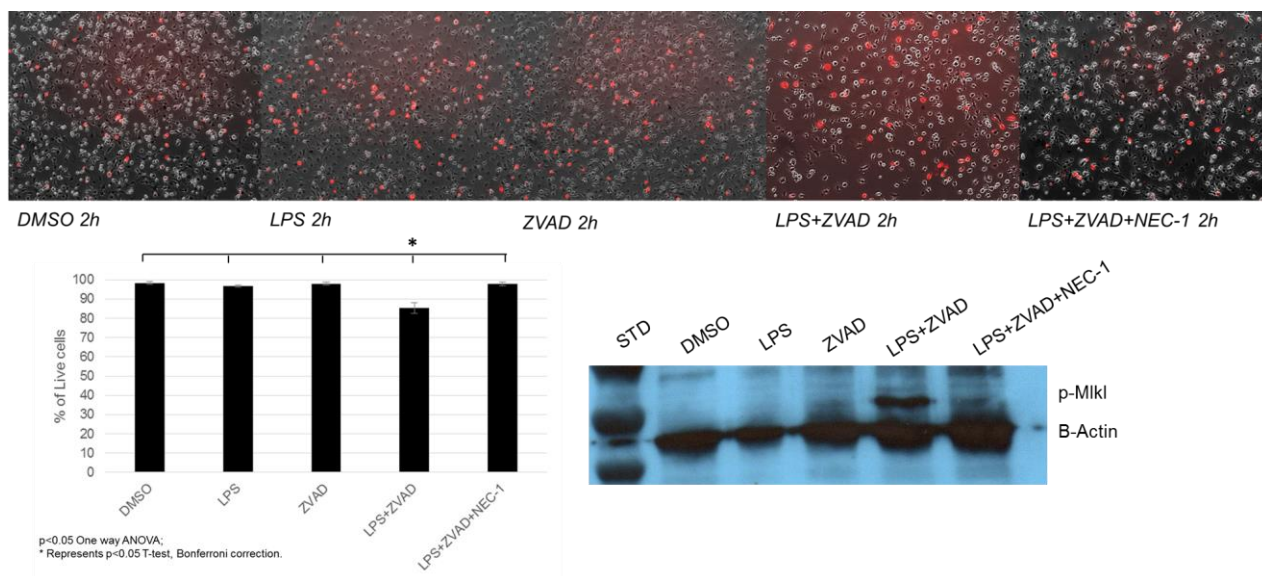


Figura 48. Caracterização da via de necroptose em macrófagos. Macrófagos derivados da medula óssea foram tratados com LPS+ZVAD por 2h e as células mortas coradas com Iodeto de Propídio (PI) (acima). Após duas horas de tratamento o número de macrófagos mortos foi significativamente maior do que os controles (esquerda). *Western blotting* indicando a presença da proteína efetora de necroptose, p-Mkl, apenas nas células tratadas com LPS+ZVAD, não estando presente na presença do inibidor químico da proteína RIPK1, Necrostatin-1 (NEC1) (direita).

Após a caracterização da morte celular em macrófagos após 2h, foi feita a purificação e caracterização de VEs do sobrenadante das células após cada tratamento. A **Figura 49** mostra que há um aumento estatisticamente significativo na liberação de VEs de macrófagos após 2h nos tratamentos com LPS, LPS+ZVAD e e LPS+ZVAD+NEC1 comparados aos tratamentos com DMSO e ZVAD. Em relação ao tamanho modal das partículas, houve um aumento significativo no tamanho de VEs purificadas de macrófagos tratados com LPS e LPS+ZVAD+NEC1 comparados com as VEs purificadas de células tratadas com DMSO, ZVAD e LPS+ZVAD.

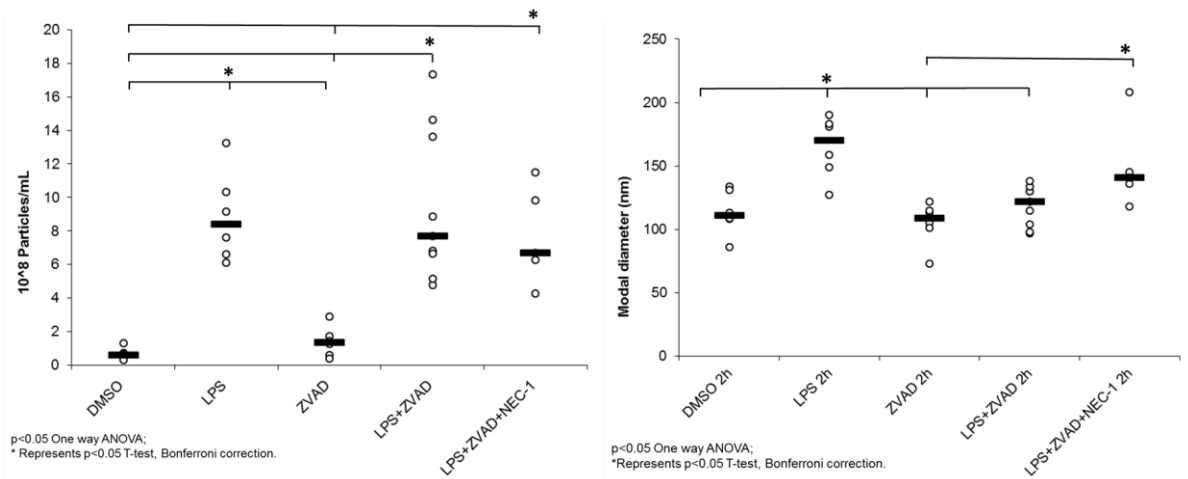


Figura 49. Caracterização de VEs purificadas de macrófagos derivados da medula óssea após 2h de tratamento. Concentração de partículas por mL (esquerda) e distribuição do diâmetro modal (direita) de VEs purificadas de macrófagos derivados da medula óssea de camundongos WT tratados com ativadores da via de necroptose por 2h.

Para assegurar a correta mensuração na concentração de VEs pelo *Nanoparticle tracking analysis* (NTA), foi feito um *western blotting* para identificação da proteína CD63 (marcador de VEs) e para a proteína de interesse, IL-1 β . Os resultados encontrados da presença de CD63 em VEs por *Western blotting* corroboram com os resultados medidos pelo NTA, pois a presença de CD63 é maior em VEs purificadas de macrófagos tratados com LPS, LPS+ZVAD (LZ) e LPS+ZVAD+NEC1 (LZN). A proteína IL-1 β foi encontrada aumentada em VEs purificadas de macrófagos tratados com LPS+ZVAD, e desapareceu após o tratamento com NEC1, o que indica uma relação dependente da secreção de IL-1 β associada a VEs com a proteína RIPK1. **(Figura 50).**

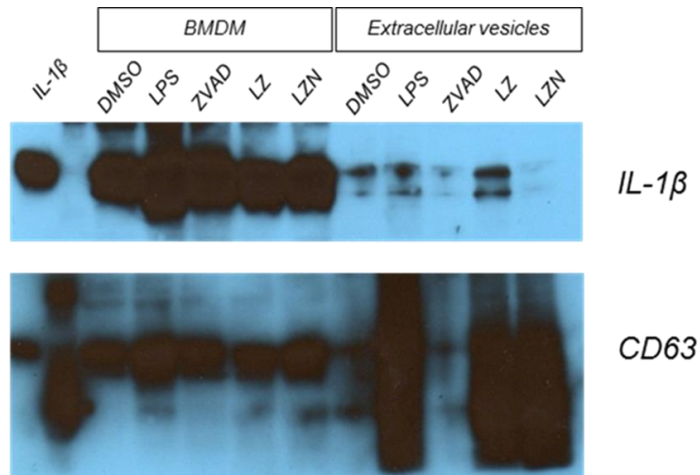


Figura 50. *Western blotting* para identificação da Interleucina pró-inflamatória IL-1 β em Macrófagos necroptóticos e VEs purificadas dessas células. A proteína marcadora CD63 é enriquecida nas VEs das células tratadas com LPS, LPS+ZVAD e LPS+ZVAD+NEC1, enquanto a IL-1 β é enriquecida em VEs purificadas de macrófagos tratados com LPS+ZVAD.

6.4.3 Purificação e caracterização de vesículas extracelulares purificadas de macrófagos em necroptose após 24h.

Após caracterizar a morte de macrófagos por necroptose após 2h, foi feita a caracterização após 24h utilizando células mutantes para as proteínas RIPK1 (D138N) e RIPK3 (RIP3 $^{-/-}$). A **Figura 51** mostra uma porcentagem maior de células mortas após o tratamento com DMSO comparados com os resultados de 2h. Além disso, mostra que as células RIP3 $^{-/-}$ foram altamente resistentes à morte por necroptose após o tratamento com LPS+ZVAD. Aproximadamente 90% das células WT estavam mortas após 24h do tratamento com LPS+ZVAD, enquanto as células D138N tiveram fenótipo intermediário entre WT e RIP3 $^{-/-}$ (**Figura 51**). Para confirmar a ativação da via de necroptose foi feito um *western blotting* para identificação da proteína efetora p-Mkl. Tanto as células WT quando D138N foram positivas para a presença de p-Mkl, enquanto que as células RIP3 $^{-/-}$ foram negativas para a presença dessa proteína (**Figura 51**).

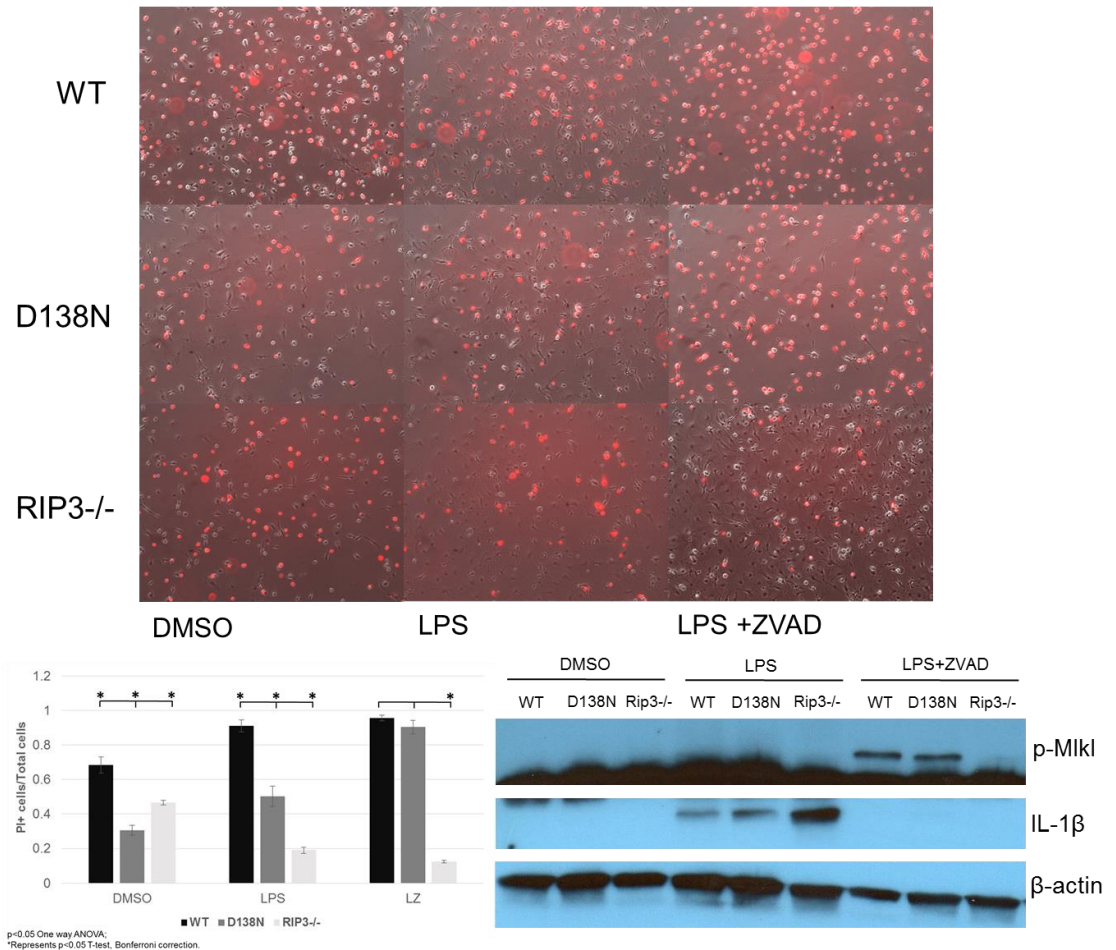


Figura 51. Caracterização da via de necroptose em macrófagos WT, D138N e RIP3^{-/-} após 24h. Macrófagos derivados da medula óssea foram tratados com LPS+ZVAD por 24h e as células mortas coradas com Iodeto de Propídio (PI) (acima). Após 24 horas de tratamento os Macrófagos RIP3^{-/-} foram altamente tolerantes à morte celular causada por necroptose, enquanto os Macrófagos WT e D138N foram completamente mortos após 24h do tratamento com LPS+ZVAD (esquerda). *Western blotting* indicando a presença da proteína efetora de necroptose, p-Mkl1, tanto nas células WT quanto D138N tratadas com LPS+ZVAD, entretanto, as células RIP3^{-/-} não expressaram a proteína p-Mkl1.

Após a caracterização da morte celular em macrófagos após 24h, foi feita a purificação e caracterização de VEs do sobrenadante das células WT, D138N e RIP3^{-/-} após cada tratamento. A **Figura 52** mostra que há um aumento estatisticamente significativo na liberação de VEs de macrófagos após 24h nos tratamentos com LPS+ZVAD apenas nas células WT comparados aos tratamentos com DMSO, LPS e LPS+ZVAD em todas as outras células. Em relação ao tamanho modal das partículas, não houve diferença estatística entre as VEs purificadas das diferentes células tratadas ou não tratadas.

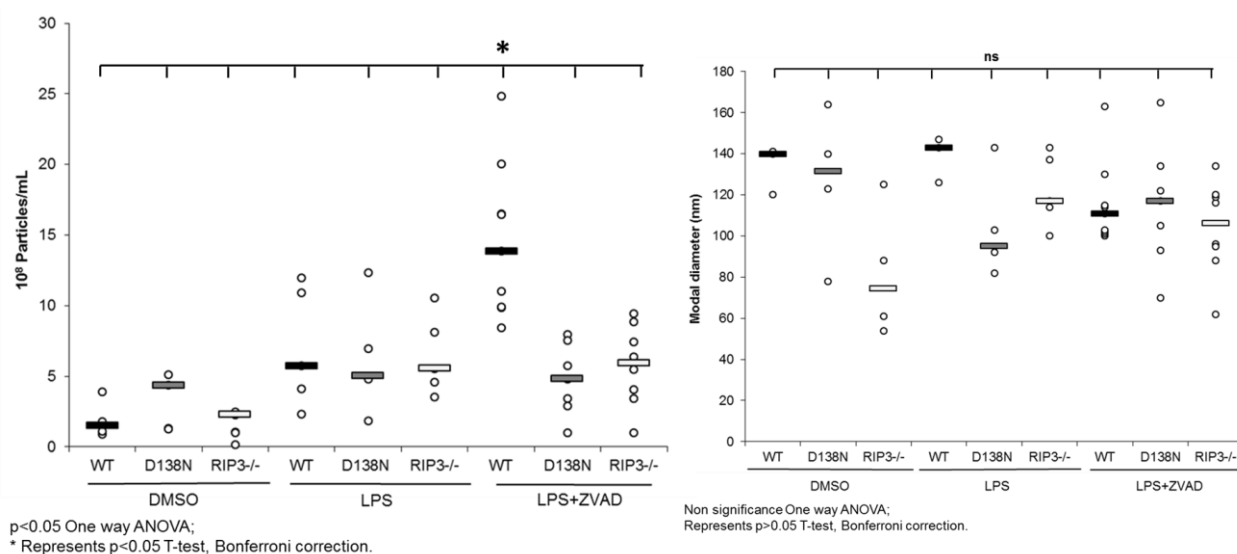


Figura 52. Caracterização de VEs purificadas de macrófagos WT, D138N e RIP3KO derivados da medula óssea após 24h de tratamento. A concentração de partículas por mL (esquerda) e distribuição do diâmetro modal (direita) foram medidos por *nanoparticle tracking analysis*. A concentração de VEs foi estatisticamente maior em células WT tratadas com LPS+ZVAD comparadas com células D138N e RIP3KO. Não houve diferença estatística entre o diâmetro modal nos grupos.

Para analisar o perfil total de proteínas presentes em VEs purificadas de macrófagos após cada tratamento, as proteínas de VEs foram extraídas, e foi feito um SDS-PAGE corado com prata. Experimentos anteriores mostraram que o tratamento com DMSO praticamente não libera VEs e o SDS-PAGE mostra que o tratamento com DMSO praticamente não apresenta proteínas. Porém, VEs purificadas de macrófagos tratados com LPS e LPS+ZVAD carregam proteínas de diferentes pesos moleculares, sendo enriquecidas em proteínas de baixo peso molecular. Além disso, algumas bandas presentes nas células WT e D138N tratadas com LPS+ZVAD foram ausentes nas células RIP3^{-/-} (**Figura 53**).

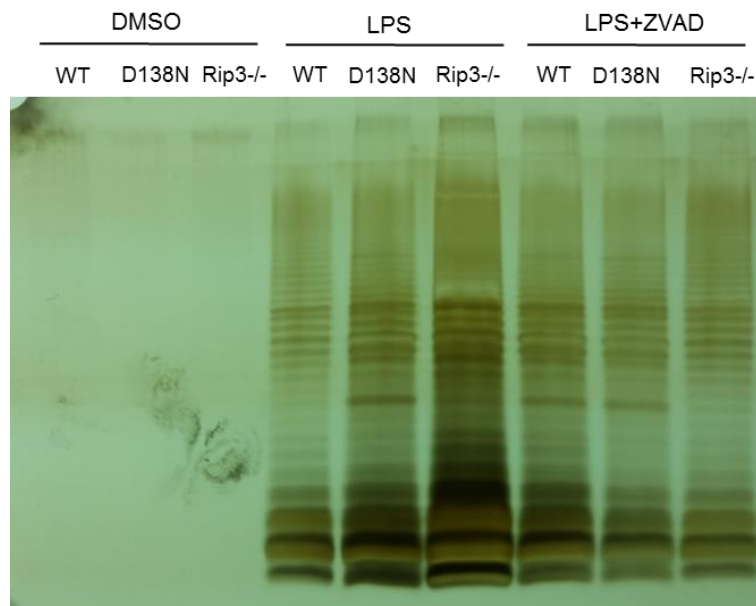


Figura 53. Perfil total de proteínas purificadas de VEs derivadas de Macrófagos WT, D138N e RIP3^{-/-}. Proteínas de VEs foram extraídas, separadas em gel SDS-PAGE 12% e coradas com prata para análise do perfil total de proteínas presentes em VEs.

Para buscar entender a relação entre IL-1 β e VEs secretadas por macrófagos em necroptose e a sua relação com as proteínas RIPK1 e RIPK3 foi feito um *Western Blotting* para detectar IL-1 β nas diferentes VEs dos diferentes genótipos. Nos tratamentos com LPS, a presença de IL-1 β foi detectada apenas nos genótipos D138N e RIP3^{-/-}. Já nos tratamentos de ativação de necroptose, LPS+ZVAD, IL-1 β foi detectada levemente nas VEs WT e nas VEs RIP3^{-/-}. Aparentemente o domínio quinase D138N da proteína RIPK1 é necessário para a incorporação de IL-1 β em VEs de macrófagos (**Figura 54**).

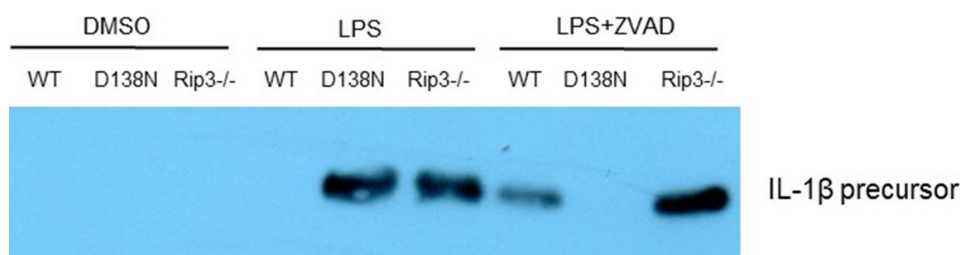


Figura 54. *Western blotting* para identificar a Interleucina pró-inflamatória IL-1 β em VEs purificadas de macrófagos WT, D138N e RIP3^{-/-} após tratamento com LPS+ZVAD.

Para tentar confirmar se a proteína IL-1 β realmente estava sendo secretada associada a VEs foi feita uma purificação com gradiente de sacarose e *western blotting* para as proteínas

IL-1 β e CD63. Foi demonstrado cofracionamento entre IL-1 β e CD63 nas frações 9 e 10 do gradiente de sacarose, entre 45% a 60% de sacarose (**Figura 55**).

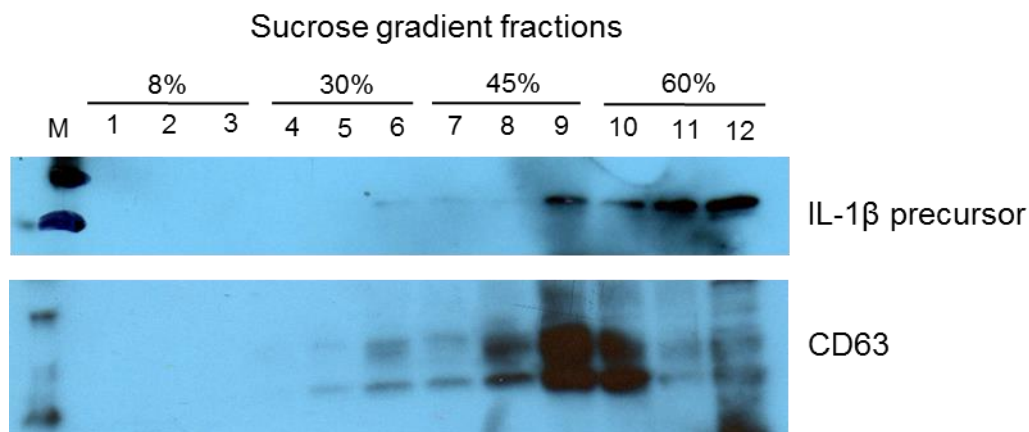


Figura 55. *Western blotting* para estabelecer uma relação entre IL-1 β e VEs. As proteínas IL-1 β e CD63 foram identificadas após purificação de VEs por gradiente de sacarose. Nota-se que essas duas proteínas compartilham as frações 9 e 10 do gradiente, sugerindo que estão sendo transportadas juntas em VEs.

6.4.4 Identificação de proteínas associadas a VEs purificadas de macrófagos em necroptose.

Para identificar o impacto das proteínas RIPK1 e RIPK3 na liberação de VEs durante a morte por necroptose em macrófagos, amostras de VEs secretadas por macrófagos tratados com LPS+ZVAD por 24h foram purificadas, as proteínas de VEs dos genótipos WT, D138N e RIP3 $\text{-}\backslash\text{-}$ foram extraídas, separadas por SDS-PAGE e enviadas para sequenciamento em espectrometria de massas na *Taplin Biological Mass Spectrometry Facility*. VEs purificadas de macrófagos WT apresentaram 320 proteínas totais, já VEs purificadas de macrófagos D138N apresentaram 41 proteínas e VEs purificadas de macrófagos e RIP3 $\text{-}\backslash\text{-}$ apresentaram 31 proteínas totais. Entre as 20 proteínas mais abundantes nas três amostras estão as proteínas *Pyruvate kinase* (PKM), proteínas do citoesqueleto como Actinas (Acta2), Tubulinas (Tuba1a), GAPDH (**Tabela 21**).

Tabela 21. Lista de proteínas purificadas de VEs derivadas de Macrófagos WT, D138N e RIP3-/- tratados com LPS+ZVAD por 24h.

WT - 320 proteins	D138N - 41 proteins	RIP3KO - 31 proteins
Pkm	Acta2	Acta2
Ncl	Pkm	ApoE
Iqgap1	Anxa2	Phb2
Cltc	Atp5a1	Rps3
Pgk1	Hspa8	Eef1a1
Ptpn6	Eno1	Gapdh
Eef1a1	Atp5b	Cfl1
Acta2	Pfn1	Pfn1
Rps3	Gapdh	Tubb2a
Eno1	Uba52	Hist1h1c
Ftl1	Rpl12	Ran
Tuba1a	Eef1a1	Pltp
Srsf1	Cfl1	Arhgdia
Idh1	Rps3	Rap1a
Fermt3	Hspa1a	Smad1
Ehd1	Lpl	Pkm
Ehd4	Aldh1b1	Rpl22
Tubb2a	Baz2a	Anxa2
Gapdh	Sept6	Hbbt1
Gnb2l1	Hbbt1	Aldh1b1

As 20 proteínas mais abundantes foram utilizadas como input para análise no *Gene Ontology* para se identificar os processos biológicos mais relevantes dessas proteínas. Nas proteínas presentes em VEs purificadas de macrófagos WT, a principal via metabólica foi da Glicólise, enquanto em VEs de macrófagos D138N e RIP3-/- a principal via metabólica encontrada foi das Rho GTPases (**Figura 56**).

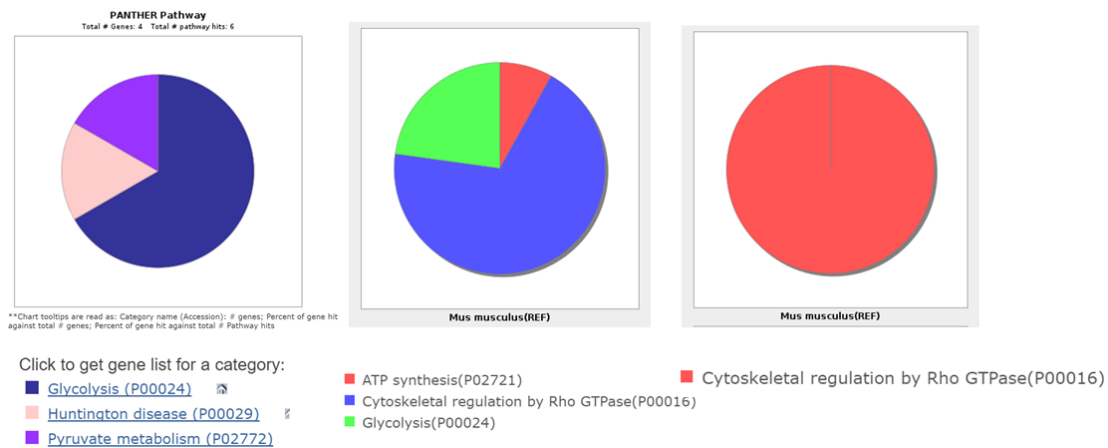


Figura 56. Vias metabólicas identificadas por *gene ontology* das 20 proteínas mais abundantes presentes em VEs de macrófagos necroptóticos WT (esquerda), D138N (centro) e RIP3-/- (direita).

6.4.5 Função biológicas de VEs necroptóticas

É importante buscar entender a relevância biológica das VEs. Para tanto, testou-se a hipótese de que as VEs purificadas de Macrófagos em estágio de morte celular por necroptose poderia atuar causando a necroptose em outra células sensível para este tipo de morte celular, como um propagador de sinal. Portanto, VEs purificadas de macrófagos após o tratamento de 24h com LPS+ZVAD foram usadas como tratamento em uma linhagem de célula neuronal, HT-22. A **Figura 57** mostra que o tratamento com VEs purificadas de macrófagos após o tratamento com LPS+ZVAD aumentou significativamente a morte de células HT-22 em comparação com o tratamento com VEs purificadas de macrófagos tratados com DMSO, LPS, ZVAD ou LPS+ZVAD+NEC1. Este resultado sugere que as VEs purificadas de macrófagos em necroptose podem atuar causando a morte celular em outra célula.

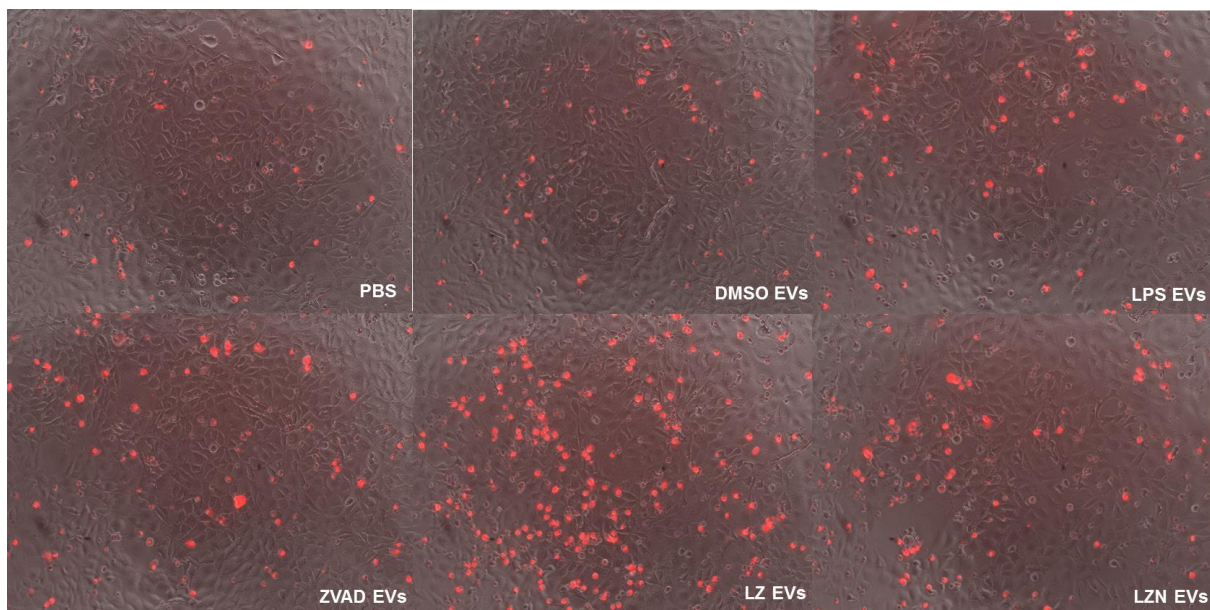


Figura 57. Linhagem de células neuronais HT22 tratadas com VEs purificados de macrófagos WT tratados com LPS+ZVAD e seus controles. O tratamento com VEs de macrófagos necroptóticos foi o que mais causou morte celular em células HT22.

Um problema do experimento anterior diz respeito ao conteúdo das VEs purificadas após a necroptose em macrófagos. As VEs poderiam estar causando a morte em outras células pelo fato de incorporarem os compostos utilizados no tratamento dos macrófagos, LPS e ZVAD e não por mecanismos biológicos inerentes a essas VEs. Para testar essa hipótese, foi feito um *western blotting* para identificar se VEs purificadas de macrófagos tratados com LPS poderiam incorporar ou transportar esse LPS para outras células. A **Figura 58** mostra que apenas as amostras de VEs foram positivas para o anticorpo anti-LPS. Três amostras de lisado de macrófagos e o sobrenadante da purificação de VEs foram negativos para a presença de LPS (**Figura 58**).

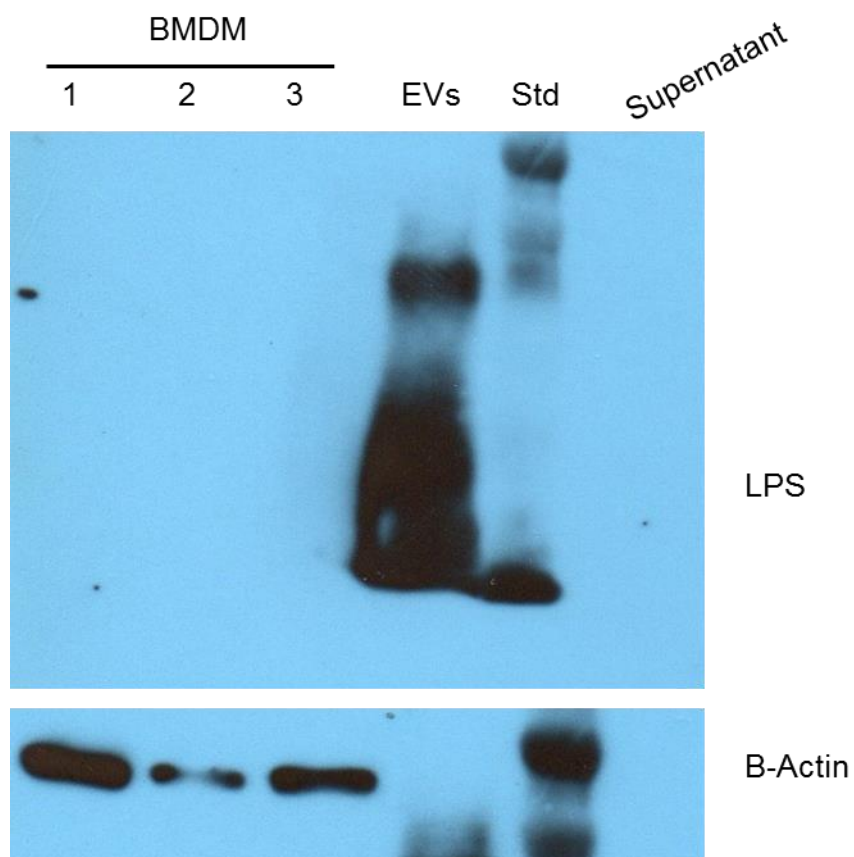


Figura 58. *Western blotting* mostrando a presença de LPS em VEs purificadas de macrófagos tratados com LPS+ZVAD e a ausência de LPS em células de macrófagos e no sobrenadante do purificado de VEs.

6.5 Discussão

Os resultados obtidos da purificação de VEs do cérebro de camundongos submetidos a injúria traumática cerebral (ITC), mostram que apesar de não haver diferença na concentração de VEs nos grupos tratados (contusão e concussão) com o grupo não tratado (Sham), houve um aumento na presença da Interleucina próinflamatória IL-1 β nos grupos submetidos a ITC.

Um estudo publicado em 2016 comparou os níveis dos miRNAs associados a VEs cerebrais de camundongos submetidos a ITC. Os autores mostraram que os níveis dos microRNAs purificados de VEs miR-21, miR-146, miR-7a, and miR-7b aumentaram no hemisfério cerebral que recebeu a lesão, enquanto que os níveis de miR-212 diminuíram. Este estudo revela um novo mecanismo potencial de comunicação célula-célula não descrito anteriormente em ITC (HARRISON et al., 2016). Apesar desse estudo não ter avaliado a concentração de VEs pós ITC, foi demonstrado aumento na concentração de miRNAs associados à VEs

Foi demonstrado na literatura que há um aumento na concentração de IL-1 β e IL-10 livres no cérebro de ratos submetidos a ITC dentro das primeiras 24h após a injúria (KAMM et al., 2006). Infelizmente o protocolo de purificação de VEs diretamente do cérebro de camundongos só foi descrito em 2012 (PEREZ-GONZALEZ et al., 2012), o que torna os estudos envolvendo ITC e VEs cerebrais ainda escassos para comparação.

A maior parte da IL-1 β é secretada e disponível livremente no espaço extracelular, mas também pode estar disponível protegida em VEs. Essa diferença explica o mecanismo de sinalização, já que a IL-1 β livre tem rápida meia vida, sua sinalização é mais local, enquanto que IL-1 β protegida por VEs pode sinalizar em regiões mais distantes da lesão primária (MACKENZIE et al., 2001; QU et al., 2007).

Já os dados relativos à ativação da via de necroptose em macrófagos mostram que existe um aumento na liberação de VEs após o tratamento com LPS, LPS+ZVAD e LPS+ZVAD+NEC-1 comparadas ao grupo não estimulado após 2h (**Figura 49**). Esse aumento após na liberação de VEs após 2h parece ser dependente da ativação por LPS. Porém após 24h de tratamento a única diferença estatística ocorreu no tratamento com LPS+ZVAD, o que indica uma liberação de VEs específica para necroptose. Este é o primeiro estudo a mostrar o aumento na liberação de VEs em macrófagos primários após indução da morte por necroptose. Além disso, a redução na liberação de VEs em células D138N e RIP3KO indicam que tanto as

proteínas RIPK1 quanto RIPK3 podem estar envolvidas em alguma etapa da biogênese ou liberação de VEs.

Foi demonstrado que o tratamento de células dendríticas com LPS por 24h aumentou a liberação de VEs nessas células (SOO et al., 2012). De maneira similar, VEs purificadas de macrófagos infectados com os patógenos intracelulares *Mycobacterium tuberculosis*, *M bovis BCG*, *Salmonella typhimurium* ou *Toxoplasma gondii* podem estimular uma resposta pró-inflamatória dependente de TLR e MYD88 em macrófagos não estimulados (BHATNAGAR et al., 2007).

Outra relação verificada nos resultados envolve a proteína RIPK1 e a liberação de IL-1 β em VEs. Tanto na utilização do inibidor farmacológico NEC-1 quanto na utilização do modelo genético animal D138N, a presença da proteína IL-1 β em purificado de VEs não foi confirmada (**Figura 50 e 54**) Esses resultados sugerem que a proteína RIPK1 está envolvida no mecanismo de carregamento de IL-1 β em VEs, o que seria uma nova função para RIPK1.

A proteína RIPK1 quando ativada pode atuar em outras vias de sinalização independentes da morte por Necroptose. RIPK1 e RIPK3 quando ativados por LPS promovem a ativação de Erk, cFos e NF- κ B o que leva a uma expressão aguda de citocinas pró-inflamatórias (NAJJAR et al., 2016).

O único artigo que estudou o impacto de VEs na morte por necroptose de linhagem de células epiteliais endocervicais tratadas com *Neisseria gonorrhoeae*. Essa bactéria é capaz de inibir a apoptose nessas células e induzir a liberação de VEs carregadas com a proteína inibidora de apoptose cIAP2. Com a liberação das VEs e diminuição da concentração intracelular de cIAP2 as células morrem por necroptose (NUDEL; MASSARI; GENCO, 2015).

Uma das hipóteses iniciais era que as VEs purificadas de macrófagos necroptóticos estariam carregadas com proteínas ativadoras da via de necroptose (RIPK1, RIPK3 e p-MLKL), porém essa hipótese não foi confirmada pois essas proteínas não foram encontradas em VEs por *Western Blotting* (dados não demonstrados). Logo, a ativação da morte celular em células neuronais HT-22 receptoras deve ser induzida por outras proteínas que não estão envolvidas diretamente na morte por necroptose (RIPK1, RIPK3 e p-MLKL), sendo necessários estudos futuros para identificar quais componentes participam dessa morte celular.

Os dados de sequenciamento de proteínas de VEs purificadas de MDMO necroptóticos revelam grande presença de proteínas da família das RhoGTPases (**Figura 56**), proteínas envolvidas na transdução de sinais intracelulares básicos como proliferação e diferenciação celulares, motilidade, adesão, sobrevivência e secreção (BOUREUX et al., 2007).

É consenso a atuação de VEs na propagação e transdução de sinais em células receptoras. Por exemplo, exossomas derivados de linhagem celular de câncer de próstata, inibem a proliferação de células T quando cocultivados. Esses exossomas causam apoptose de uma maneira dose dependente nas células T devido ao *delivery* de FasL (ABUSAMRA et al., 2005). Os dados de espectrometria de massas não indicam a presença de FasL em VEs purificadas de MDMO necroptóticos, o que sugere outros mecanismos para indução da morte na célula receptora, possivelmente pela entrega de LPS incorporado em VEs após a adição no meio de cultura.

7 Conclusões

O exercício aeróbio agudo nas intensidades leve, moderada e intensa aumenta a concentração de VEs no soro de ratos;

Os miRNAs rno-miR-128-3p, rno-miR-25-3p, rno-miR-148a-3p, rno-miR-191a-5p, rno-miR-22-3p, rno-miR-27a-3p estão diferencialmente expressos em VEs do soro de ratos exercitados na intensidade leve;

Os miRNAs rno-miR-10b-5p, rno-miR-191a-5p, rno-miR-10a-5p e o piRNA rno_piR_032799 foram encontrados diferencialmente expressos em VEs do soro de ratos exercitados na alta intensidade;

A concentração de VEs no plasma de cavalos aumenta durante uma prova de enduro, atingindo a concentração mais elevada após 15h de prova de enduro;

Os miRNAs eca-miR-30d, eca-miR-25, eca-miR-30e, eca-miR-423-5p, eca-miR-92a e eca-miR-140-3p estão diminuídos em VEs do plasma de cavalos 15h após uma prova de enduro.

A injúria traumática cerebral (contusão e concussão) aumentou a concentração da interleucina pró-inflamatória IL-1 β em VEs purificadas diretamente do cérebro de camundongos;

O tratamento de macrófagos derivados da medula óssea (MDMO) com LPS, LPS+ZVAD e LPS+ZVAD+NEC1 aumenta a concentração de VEs em meio de cultura após 2h;

A morte por necroptose aumenta a concentração de VEs derivadas por macrófagos após 2h;

As proteínas RIPK1 e RIPK3 estão envolvidas na liberação de VEs em MDMO ativados para morte por necroptose;

A proteína RIPK1 está envolvida no carregamento de IL-1 β em VEs derivadas de MDMO após ativação de necroptose;

A concentração de proteínas totais associadas a VEs derivadas de MDMO necroptóticas é diminuída em MDMO mutantes para RIPK1 e para RIPK3 sugerindo papel dessas proteínas no carregamento de proteínas em VEs;

VEs purificadas de MDMO necroptóticos podem causar morte celular em linhagem de célula neuronal receptora.

8 Referências Bibliográficas

ABUSAMRA, A. J.; ZHONG, Z.; ZHENG, X.; LI, M.; ICHIM, T. E.; CHIN, J. L.; MIN, W.-P. Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8+ T-cell apoptosis. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 35, n. 2, p. 169-173, 2005.

ADMYRE, C.; JOHANSSON, S. M.; QAZI, K. R.; FILÉN, J.-J.; LAHESMAA, R.; NORMAN, M.; NEVE, E. P.; SCHEYNIUS, A.; GABRIELSSON, S. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 3, p. 1969-1978, 2007.

ALMEIDA, J. A.; PETRIZ, B. A.; DA COSTA GOMES, C. P.; PEREIRA, R. W.; FRANCO, O. L. Assessment of maximal lactate steady state during treadmill exercise in SHR. **BMC research notes**, v. 5, n. 1, p. 661, 2012.

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.

ALMQVIST, N.; LÖNNQVIST, A.; HULTKRANTZ, S.; RASK, C.; TELEMO, E. Serum-derived exosomes from antigen-fed mice prevent allergic sensitization in a model of allergic asthma. **Immunology**, v. 125, n. 1, p. 21-27, 2008.

ALVAREZ-ERVITI, L.; SEOW, Y.; YIN, H.; BETTS, C.; LAKHAL, S.; WOOD, M. J. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. **Nature biotechnology**, v. 29, n. 4, p. 341-345, 2011.

AOI, W.; ICHIKAWA, H.; MUNE, K.; TANIMURA, Y.; MIZUSHIMA, K.; NAITO, Y.; YOSHIKAWA, T. Muscle-enriched microRNA miR-486 decreases in circulation in response to exercise in young men. **Frontiers in physiology**, v. 4, 2013.

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. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 12, p. 5003-5008, 2011.

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. 02, p. 269-273, 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.

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. 16, p. 3983-3994, 2011.

BAHN, J. H.; ZHANG, Q.; LI, F.; CHAN, T.-M.; LIN, X.; KIM, Y.; WONG, D. T.; XIAO, X. The Landscape of MicroRNA, Piwi-Interacting RNA, and Circular RNA in Human Saliva. **Clinical chemistry**, v. 61, n. 1, p. 221-230, 2015.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 215-233, 2009.

BAUGH, C. M.; STAMM, J. M.; RILEY, D. O.; GAVETT, B. E.; SHENTON, M. E.; LIN, A.; NOWINSKI, C. J.; CANTU, R. C.; MCKEE, A. C.; STERN, R. A. Chronic traumatic encephalopathy: neurodegeneration following repetitive concussive and subconcussive brain trauma. **Brain imaging and behavior**, v. 6, n. 2, p. 244-254, 2012.

BELLINGHAM, S. A.; COLEMAN, B. M.; HILL, A. F. Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells. **Nucleic acids research**, p. gks832, 2012.

BHATNAGAR, S.; SHINAGAWA, K.; CASTELLINO, F. J.; SCHOREY, J. S. Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo. **Blood**, v. 110, n. 9, p. 3234-3244, 2007.

BOMBERGER, J. M.; MACEACHRAN, D. P.; COUTERMARSH, B. A.; YE, S.; O'TOOLE, G. A.; STANTON, B. A. Long-distance delivery of bacterial virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles. **PLoS Pathog**, v. 5, n. 4, p. e1000382-e1000382, 2009.

BOUREUX, A.; VIGNAL, E.; FAURE, S.; FORT, P. Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. **Molecular biology and evolution**, v. 24, n. 1, p. 203-216, 2007.

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

BRETZ, N. P.; RIDINGER, J.; RUPP, A. K.; RIMBACH, K.; KELLER, S.; RUPP, C.; MARME, F.; UMANSKY, L.; UMANSKY, V.; EIGENBROD, T.; SAMMAR, M.; ALTEVOGT, P. Body fluid exosomes promote secretion of inflammatory cytokines in monocytic cells via Toll-like receptor signaling. **J Biol Chem**, v. 288, n. 51, p. 36691-702, Dec 20 2013.

BRINTON, L. T.; SLOANE, H. S.; KESTER, M.; KELLY, K. A. Formation and role of exosomes in cancer. **Cell Mol Life Sci**, Oct 22 2014.

BUCK, A. H.; COAKLEY, G.; SIMBARI, F.; MCSORLEY, H. J.; QUINTANA, J. F.; LE BIHAN, T.; KUMAR, S.; ABREU-GOODGER, C.; LEAR, M.; HARCUS, Y. Exosomes secreted by nematode parasites transfer small RNAs to mammalian cells and modulate innate immunity. **Nature communications**, v. 5, 2014.

BYE, A.; ROSJO, H.; ASPENES, S. T.; CONDORELLI, G.; OMLAND, T.; WISLOFF, U. Circulating microRNAs and aerobic fitness--the HUNT-Study. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e57496, 2013.

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.

CAMPBELL, C.; HARRISON, T.; HESS, A.; EBEL, G. MicroRNA levels are modulated in *Aedes aegypti* after exposure to Dengue-2. **Insect molecular biology**, v. 23, n. 1, p. 132-139, 2014.

CHAO, S. B.; GUO, L.; OU, X. H.; LUO, S. M.; WANG, Z. B.; SCHATTEN, H.; GAO, G. L.; SUN, Q. Y. Heated spermatozoa: effects on embryonic development and epigenetics. **Hum Reprod**, v. 27, n. 4, p. 1016-24, Apr 2012.

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, J. F.; TAO, Y.; LI, J.; DENG, Z.; YAN, Z.; XIAO, X.; WANG, D. Z. microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. **J Cell Biol**, v. 190, n. 5, p. 867-79, Sep 6 2010.

CHEN, W.; CAI, F.; ZHANG, B.; BAREKATI, Z.; ZHONG, X. Y. The level of circulating miRNA-10b and miRNA-373 in detecting lymph node metastasis of breast cancer: potential biomarkers. **Tumor Biology**, v. 34, n. 1, p. 455-462, 2013.

CHEN, X.; BA, Y.; MA, L.; CAI, X.; YIN, Y.; WANG, K.; GUO, J.; ZHANG, Y.; CHEN, J.; GUO, X.; LI, Q.; LI, X.; WANG, W.; WANG, J.; JIANG, X.; XIANG, Y.; XU, C.; ZHENG, P.; ZHANG, J.; LI, R.; ZHANG, H.; SHANG, X.; GONG, T.; NING, G.; ZEN, K.; ZHANG, C. Y. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. **Cell Res**, v. 18, n. 10, p. 997-1006, Oct 2008.

CHENG, L.; DOECKE, J.; SHARPLES, R.; VILLEMAGNE, V.; FOWLER, C.; REMBACH, A.; MARTINS, R.; ROWE, C.; MACAULAY, S.; MASTERS, C. Prognostic serum miRNA biomarkers associated with Alzheimer's disease shows concordance with neuropsychological and neuroimaging assessment. **Molecular psychiatry**, 2014.

CHENG, L.; SHARPLES, R. A.; SCICLUNA, B. J.; HILL, A. F. Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood. **J Extracell Vesicles**, v. 3, 2014.

CHEVILLET, J. R.; KANG, Q.; RUF, I. K.; BRIGGS, H. A.; VOJTECH, L. N.; HUGHES, S. M.; CHENG, H. H.; ARROYO, J. D.; MEREDITH, E. K.; GALLICHOTTE, E. N. Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 41, p. 14888-14893, 2014.

CHO, Y.; CHALLA, S.; MOQUIN, D.; GENGA, R.; RAY, T. D.; GUILDFORD, M.; CHAN, F. K.-M. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. **Cell**, v. 137, n. 6, p. 1112-1123, 2009.

CHO, Y. S. Perspectives on the therapeutic modulation of an alternative cell death, programmed necrosis (Review). **International journal of molecular medicine**, v. 33, n. 6, p. 1401-1406, 2014.

CHRISTIANSON, H. C.; SVENSSON, K. J.; VAN KUPPEVELT, T. H.; LI, J.-P.; BELTING, M. Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 43, p. 17380-17385, 2013.

CLAYTON, A.; MITCHELL, J. P.; LINNANE, S.; MASON, M. D.; TABI, Z. Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 11, p. 7249-7258, 2008.

CLAYTON, A.; TABI, Z. Exosomes and the MICA-NKG2D system in cancer. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 34, n. 3, p. 206-213, 2005.

COLOMBO, M.; RAPOSO, G.; THERY, C. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 30, p. 255-89, Oct 11 2014.

CONSORTIUM, E. P. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. **Nature**, v. 489, n. 7414, p. 57-74, 2012.

CONTARTEZE, R. V.; MANCHADO FDE, B.; GOBATTO, C. A.; DE MELLO, M. A. Stress biomarkers in rats submitted to swimming and treadmill running exercises. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 151, n. 3, p. 415-22, Nov 2008.

COSTA-SILVA, B.; AIELLO, N. M.; OCEAN, A. J.; SINGH, S.; ZHANG, H.; THAKUR, B. K.; BECKER, A.; HOSHINO, A.; MARK, M. T.; MOLINA, H. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. **Nature cell biology**, 2015.

COUPER, K. N.; BARNES, T.; HAFALLA, J.; COMBES, V.; RYFFEL, B.; SECHER, T.; GRAU, G. E.; RILEY, E. M.; DE SOUZA, J. B. Parasite-derived plasma microparticles contribute significantly to malaria infection-induced inflammation through potent macrophage stimulation. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 1, p. e1000744, 2010.

COURNEYA, K. S.; MACKAY, J. R.; JONES, L. W. Coping with cancer: can exercise help? **The Physician and Sportsmedicine**, v. 28, n. 5, p. 49-73, 2000.

CREEMERS, E. E.; TIJSEN, A. J.; PINTO, Y. M. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? **Circ Res**, v. 110, n. 3, p. 483-95, Feb 3 2012.

CRESCITELLI, R.; LASSER, C.; SZABO, T. G.; KITTEL, A.; ELDH, M.; DIANZANI, I.; BUZAS, E. I.; LOTVALL, J. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. **J Extracell Vesicles**, v. 2, 2013.

DANESH, A.; INGLIS, H. C.; JACKMAN, R. P.; WU, S.; DENG, X.; MUENCH, M. O.; HEITMAN, J. W.; NORRIS, P. J. Exosomes from red blood cell units bind to monocytes and

induce proinflammatory cytokines, boosting T-cell responses in vitro. **Blood**, v. 123, n. 5, p. 687-696, 2014.

DE BEAUMONT, L.; LASSONDE, M.; LECLERC, S.; THÉORET, H. Long-term and cumulative effects of sports concussion on motor cortex inhibition. **Neurosurgery**, v. 61, n. 2, p. 329-337, 2007.

DEGTEREV, A.; HITOMI, J.; GERMSCHIED, M.; CH'EN, I. L.; KORKINA, O.; TENG, X.; ABBOTT, D.; CUNY, G. D.; YUAN, C.; WAGNER, G. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. **Nature chemical biology**, v. 4, n. 5, p. 313-321, 2008.

DEGTEREV, A.; HUANG, Z.; BOYCE, M.; LI, Y.; JAGTAP, P.; MIZUSHIMA, N.; CUNY, G. D.; MITCHISON, T. J.; MOSKOWITZ, M. A.; YUAN, J. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. **Nature chemical biology**, v. 1, n. 2, p. 112-119, 2005.

DI LEVA, G.; PIOVAN, C.; GASPARINI, P.; NGANKEU, A.; TACCIOLI, C.; BRISKIN, D.; CHEUNG, D. G.; BOLON, B.; ANDERLUCCI, L.; ALDER, H. Estrogen mediated-activation of miR-191/425 cluster modulates tumorigenicity of breast cancer cells depending on estrogen receptor status. **PLoS Genet**, v. 9, n. 3, p. e1003311, 2013.

DJEBAILI, M.; GUO, Q.; PETTUS, E. H.; HOFFMAN, S. W.; STEIN, D. G. The neurosteroids progesterone and allopregnanolone reduce cell death, gliosis, and functional deficits after traumatic brain injury in rats. **Journal of neurotrauma**, v. 22, n. 1, p. 106-118, 2005.

DÖRMANN, P.; KIM, H.; OTT, T.; SCHULZE-LEFERT, P.; TRUJILLO, M.; WEWER, V.; HUECKELHOVEN, R. Cell-autonomous defense, re-organization and trafficking of membranes in plant-microbe interactions. **New Phytologist**, v. 204, n. 4, p. 815-822, 2014.

ELYAKIM, E.; SITBON, E.; FAERMAN, A.; TABAK, S.; MONTIA, E.; BELANIS, L.; DOV, A.; MARCUSSON, E. G.; BENNETT, C. F.; CHAJUT, A. hsa-miR-191 is a candidate oncogene target for hepatocellular carcinoma therapy. **Cancer research**, v. 70, n. 20, p. 8077-8087, 2010.

ESTELLER, M. Non-coding RNAs in human disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 12, p. 861-874, 2011.

FAISAL, N. H.; MOHD ADZAHAN, N.; GOH, Y. M. Identification Of Equine Establishments With Different Performance Status Of Endurance Horses. 2012.

FENG, Y.; HUANG, W.; WANI, M.; YU, X.; ASHRAF, M. Ischemic preconditioning potentiates the protective effect of stem cells through secretion of exosomes by targeting Mecp2 via miR-22. **PLoS one**, v. 9, n. 2, p. e88685, 2014.

FERNÁNDEZ-MESSINA, L.; GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ, C.; RIVAS-GARCÍA, E.; SÁNCHEZ-MADRID, F.; DE LA FUENTE, H. Immunomodulatory role of microRNAs transferred by extracellular vesicles. **Biology of the Cell**, 2015.

FRÜHBEIS, C.; HELMIG, S.; TUG, S.; SIMON, P.; KRÄMER-ALBERS, E.-M. Physical exercise induces rapid release of small extracellular vesicles into the circulation. **Journal of extracellular vesicles**, v. 4, 2015.

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.

GARG, A.; MARTIN, S.; GOLAB, J.; AGOSTINIS, P. Danger signalling during cancer cell death: origins, plasticity and regulation. **Cell Death & Differentiation**, v. 21, n. 1, p. 26-38, 2014.

GATTI, J.-L.; MÉTAYER, S.; BELGHAZI, M.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J.-L. Identification, proteomic profiling, and origin of ram epididymal fluid exosome-like vesicles. **Biology of reproduction**, v. 72, n. 6, p. 1452-1465, 2005.

GESIERICH, S.; BEREZOVSKIY, I.; RYSCHICH, E.; ZÖLLER, M. Systemic induction of the angiogenesis switch by the tetraspanin D6. 1A/CO-029. **Cancer research**, v. 66, n. 14, p. 7083-7094, 2006.

GHAJAR, J. Traumatic brain injury. **The Lancet**, v. 356, n. 9233, p. 923-929, 2000.

GOMES, C. P.; OLIVEIRA-JR, G. P.; MADRID, B.; ALMEIDA, J. A.; FRANCO, O. L.; PEREIRA, R. W. Circulating miR-1, miR-133a, and miR-206 levels are increased after a half-marathon run. **Biomarkers**, v. 19, n. 7, p. 585-589, 2014.

GOULD, S. J.; RAPOSO, G. As we wait: coping with an imperfect nomenclature for extracellular vesicles. **Journal of extracellular vesicles**, v. 2, 2013.

GROSS, J. C.; CHAUDHARY, V.; BARTSCHERER, K.; BOUTROS, M. Active Wnt proteins are secreted on exosomes. **Nature cell biology**, v. 14, n. 10, p. 1036-1045, 2012.

GU, Y.; LI, M.; WANG, T.; LIANG, Y.; ZHONG, Z.; WANG, X.; ZHOU, Q.; CHEN, L.; LANG, Q.; HE, Z. Lactation-related microRNA expression profiles of porcine breast milk exosomes. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. e43691, 2012.

GUESCINI, M.; CANONICO, B.; LUCERTINI, F.; MAGGIO, S.; ANNIBALINI, G.; BARBIERI, E.; LUCHETTI, F.; PAPA, S.; STOCCHI, V. Muscle Releases Alpha-Sarcoglycan Positive Extracellular Vesicles Carrying miRNAs in the Bloodstream. 2015.

GUESCINI, M.; GENEDANI, S.; STOCCHI, V.; AGNATI, L. F. Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. **Journal of neural transmission**, v. 117, n. 1, p. 1-4, 2010.

GUSKIEWICZ, K. M.; MCCREA, M.; MARSHALL, S. W.; CANTU, R. C.; RANDOLPH, C.; BARR, W.; ONATE, J. A.; KELLY, J. P. Cumulative effects associated with recurrent concussion in collegiate football players: the NCAA Concussion Study. **Jama**, v. 290, n. 19, p. 2549-2555, 2003.

GYORGY, B.; HUNG, M. E.; BREAKFIELD, X. O.; LEONARD, J. N. Therapeutic Applications of Extracellular Vesicles: Clinical Promise and Open Questions. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, Oct 3 2014.

GYORGY, B.; SZABO, T. G.; PASZTOI, M.; PAL, Z.; MISJAK, P.; ARADI, B.; LASZLO, V.; PALLINGER, E.; PAP, E.; KITTEL, A.; NAGY, G.; FALUS, A.; BUZAS, E. I. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. **Cell Mol Life Sci**, v. 68, n. 16, p. 2667-88, Aug 2011.

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.

HARDING, C.; HEUSER, J.; STAHL, P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. **The Journal of cell biology**, v. 97, n. 2, p. 329-339, 1983.

HARRISON, E. B.; HOCHFELDER, C. G.; LAMBERTY, B. G.; MEAYS, B. M.; MORSEY, B. M.; KELSO, M. L.; FOX, H. S.; YELAMANCHILI, S. V. Traumatic brain injury increases levels of miR-21 in extracellular vesicles: implications for neuroinflammation. **FEBS Open Bio**, 2016.

HAWLEY, J. A.; HARGREAVES, M.; JOYNER, M. J.; ZIERATH, J. R. Integrative biology of exercise. **Cell**, v. 159, n. 4, p. 738-749, 2014.

HAWLEY, J. A.; HOLLOSZY, J. O. Exercise: it's the real thing! **Nutrition reviews**, v. 67, n. 3, p. 172-178, 2009.

HEDLUND, M.; NAGAEVA, O.; KARGL, D.; BARANOV, V.; MINCHEVA-NILSSON, L. Thermal and oxidative stress causes enhanced release of NKG2D ligand-bearing immunosuppressive exosomes in leukemia/lymphoma T and B cells. **PloS one**, v. 6, n. 2, p. e16899, 2011.

HERNANDEZ-ONTIVEROS, D. G.; TAJIRI, N.; ACOSTA, S.; GIUNTA, B.; TAN, J.; BORLONGAN, C. V. Microglia activation as a biomarker for traumatic brain injury. **Towards translating research to clinical practice: Novel Strategies for Discovery and Validation of Biomarkers for Brain Injury**, p. 39, 2015.

HILL, A. F.; PEGTEL, D. M.; LAMBERTZ, U.; LEONARDI, T.; O'DRISCOLL, L.; PLUCHINO, S.; TER-OVANESYAN, D.; NOLTE, E. N. ISEV position paper: extracellular vesicle RNA analysis and bioinformatics. **Journal of extracellular vesicles**, v. 2, 2013.

HOGUE, C. W.; MCGURK, D.; THOMAS, J. L.; COX, A. L.; ENGEL, C. C.; CASTRO, C. A. Mild traumatic brain injury in US soldiers returning from Iraq. **New England journal of medicine**, v. 358, n. 5, p. 453-463, 2008.

HU, Z.; CHEN, X.; ZHAO, Y.; TIAN, T.; JIN, G.; SHU, Y.; CHEN, Y.; XU, L.; ZEN, K.; ZHANG, C. Serum MicroRNA signatures identified in a genome-wide serum MicroRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 10, p. 1721-1726, 2010.

HUANG, X.; YUAN, T.; TSCHANNEN, M.; SUN, Z.; JACOB, H.; DU, M.; LIANG, M.; DITTMAR, R. L.; LIU, Y.; LIANG, M. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. **BMC genomics**, v. 14, n. 1, p. 319, 2013.

HUBER, V.; FAIS, S.; IERO, M.; LUGINI, L.; CANESE, P.; SQUARCINA, P.; ZACCHEDDU, A.; COLONE, M.; ARANCIA, G.; GENTILE, M. Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. **Gastroenterology**, v. 128, n. 7, p. 1796-1804, 2005.

HUNTER, M. P.; ISMAIL, N.; ZHANG, X.; AGUDA, B. D.; LEE, E. J.; YU, L.; XIAO, T.; SCHAFER, J.; LEE, M.; SCHMITTGEN, T. D. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. **PLoS one**, v. 3, n. 11, p. e3694, 2008.

IKONEN, E. Roles of lipid rafts in membrane transport. **Current opinion in cell biology**, v. 13, n. 4, p. 470-477, 2001.

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.

KAISER, W. J.; UPTON, J. W.; LONG, A. B.; LIVINGSTON-ROSANOFF, D.; DALEY-BAUER, L. P.; HAKEM, R.; CASPARY, T.; MOCARSKI, E. S. RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice. **Nature**, v. 471, n. 7338, p. 368-372, 2011.

KALRA, H.; SIMPSON, R. J.; JI, H.; AIKAWA, E.; ALTEVOGT, P.; ASKENASE, P.; BOND, V. C.; BORRAS, F. E.; BREAKFIELD, X.; BUDNIK, V.; BUZAS, E.; CAMUSSI, G.; CLAYTON, A.; COCUCCI, E.; FALCON-PEREZ, J. M.; GABRIELSSON, S.; GHO, Y. S.; GUPTA, D.; HARSHA, H. C.; HENDRIX, A.; HILL, A. F.; INAL, J. M.; JENSTER, G.; KRAMER-ALBERS, E. M.; LIM, S. K.; LLORENTE, A.; LOTVALL, J.; MARCILLA, A.; MINCHEVA-NILSSON, L.; NAZARENKO, I.; NIEUWLAND, R.; NOLTE-'T HOEN, E. N.; PANDEY, A.; PATEL, T.; PIPER, M. G.; PLUCHINO, S.; PRASAD, T. S.; RAJENDRAN, L.; RAPOSO, G.; RECORD, M.; REID, G. E.; SANCHEZ-MADRID, F.; SCHIFFELERS, R. M.; SILJANDER, P.; STENSALLE, A.; STORVOGEL, W.; TAYLOR, D.; THERY, C.; VALADI, H.; VAN BALKOM, B. W.; VAZQUEZ, J.; VIDAL, M.; WAUBEN, M. H.; YANEZ-MO, M.; ZOELLER, M.; MATHIVANAN, S. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. **PLoS Biol**, v. 10, n. 12, p. e1001450, 2012.

KAMM, K.; VANDERKOLK, W.; LAWRENCE, C.; JONKER, M.; DAVIS, A. T. The effect of traumatic brain injury upon the concentration and expression of interleukin-1 β and interleukin-10 in the rat. **Journal of Trauma and Acute Care Surgery**, v. 60, n. 1, p. 152-157, 2006.

KANKI, M.; MORIGUCHI, A.; SASAKI, D.; MITORI, H.; YAMADA, A.; UNAMI, A.; MIYAMAE, Y. Identification of urinary miRNA biomarkers for detecting cisplatin-induced proximal tubular injury in rats. **Toxicology**, v. 324, p. 158-168, 2014.

KATSUDA, T.; KOSAKA, N.; OCHIYA, T. The roles of extracellular vesicles in cancer biology: toward the development of novel cancer biomarkers. **Proteomics**, v. 14, n. 4-5, p. 412-425, 2014.

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.

KELLER, S.; RUPP, C.; STOECK, A.; RUNZ, S.; FOGEL, M.; LUGERT, S.; HAGER, H.; ABDEL-BAKKY, M.; GUTWEIN, P.; ALTEVOGT, P. CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid. **Kidney international**, v. 72, n. 9, p. 1095-1102, 2007.

KHAN, S.; JUTZY, J. M.; VALENZUELA, M. M. A.; TURAY, D.; ASPE, J. R.; ASHOK, A.; MIRSHAHIDI, S.; MERCOLA, D.; LILLY, M. B.; WALL, N. R. Plasma-derived exosomal survivin, a plausible biomarker for early detection of prostate cancer. 2012.

KIM, D. K.; KANG, B.; KIM, O. Y.; CHOI, D. S.; LEE, J.; KIM, S. R.; GO, G.; YOON, Y. J.; KIM, J. H.; JANG, S. C.; PARK, K. S.; CHOI, E. J.; KIM, K. P.; DESIDERIO, D. M.; KIM, Y. K.; LOTVALL, J.; HWANG, D.; GHO, Y. S. EVpedia: an integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles. **J Extracell Vesicles**, v. 2, 2013.

KING, H. W.; MICHAEL, M. Z.; GLEADLE, J. M. Hypoxic enhancement of exosome release by breast cancer cells. **BMC cancer**, v. 12, n. 1, p. 421, 2012.

KOWAL, J.; ARRAS, G.; COLOMBO, M.; JOUVE, M.; MORATH, J. P.; PRIMDAL-BENGTSON, B.; DINGLI, F.; LOEW, D.; TKACH, M.; THÉRY, C. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 8, p. E968-E977, 2016.

KOZOMARA, A.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. **Nucleic acids research**, p. gkt1181, 2013.

KRAUS, W. E.; HOUMARD, J. A.; DUSCHA, B. D.; KNETZGER, K. J.; WHARTON, M. B.; MCCARTNEY, J. S.; BALES, C. W.; HENES, S.; SAMSA, G. P.; OTVOS, J. D. Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 19, p. 1483-1492, 2002.

KSHIRSAGAR, S.; ALAM, S.; JASTI, S.; HODES, H.; NAUSER, T.; GILLIAM, M.; BILLSTRAND, C.; HUNT, J.; PETROFF, M. Immunomodulatory molecules are released from the first trimester and term placenta via exosomes. **Placenta**, v. 33, n. 12, p. 982-990, 2012.

KUHN, A. R.; SCHLAUCH, K.; LAO, R.; HALAYKO, A. J.; GERTHOFFER, W. T.; SINGER, C. A. MicroRNA expression in human airway smooth muscle cells: role of miR-25 in regulation of airway smooth muscle phenotype. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 42, n. 4, p. 506-513, 2010.

KUMAR, M.; LU, Z.; TAKWI, A. A. L.; CHEN, W.; CALLANDER, N. S.; RAMOS, K. S.; YOUNG, K. H.; LI, Y. Negative regulation of the tumor suppressor p53 gene by microRNAs. **Oncogene**, v. 30, n. 7, p. 843-853, 2011.

LAI, R. C.; ARSLAN, F.; LEE, M. M.; SZE, N. S. K.; CHOO, A.; CHEN, T. S.; SALTO-TELLEZ, M.; TIMMERS, L.; LEE, C. N.; EL OAKLEY, R. M. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. **Stem cell research**, v. 4, n. 3, p. 214-222, 2010.

LANDER, E. S. Initial impact of the sequencing of the human genome. **Nature**, v. 470, n. 7333, p. 187-197, 2011.

LANGLOIS, J. A.; RUTLAND-BROWN, W.; WALD, M. M. The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview. **The Journal of head trauma rehabilitation**, v. 21, n. 5, p. 375-378, 2006.

LASSER, C.; ALIKHANI, V. S.; EKSTROM, K.; ELDH, M.; PAREDES, P. T.; BOSSIOS, A.; SJOSTRAND, M.; GABRIELSSON, S.; LOTVALL, J.; VALADI, H. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. **J Transl Med**, v. 9, p. 9, 2011.

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

LÄSSER, C.; O'NEIL, S. E.; EKERLJUNG, L.; EKSTRÖM, K.; SJÖSTRAND, M.; LÖTVALL, J. RNA-containing exosomes in human nasal secretions. **American journal of rhinology & allergy**, v. 25, n. 2, p. 89-93, 2011.

LATERZA, O. F.; LIM, L.; GARRETT-ENGELE, P. W.; VLASAKOVA, K.; MUNIAPPA, N.; TANAKA, W. K.; JOHNSON, J. M.; SINA, J. F.; FARE, T. L.; SISTARE, F. D. Plasma MicroRNAs as sensitive and specific biomarkers of tissue injury. **Clinical chemistry**, v. 55, n. 11, p. 1977-1983, 2009.

LAU, N. C.; SETO, A. G.; KIM, J.; KURAMOCHI-MIYAGAWA, S.; NAKANO, T.; BARTEL, D. P.; KINGSTON, R. E. Characterization of the piRNA complex from rat testes. **Science**, v. 313, n. 5785, p. 363-367, 2006.

LEE, C.; MITSIALIS, S. A.; ASLAM, M.; VITALI, S. H.; VERGADI, E.; KONSTANTINOOU, G.; SDRIMAS, K.; FERNANDEZ-GONZALEZ, A.; KOUREMBANAS, S. Exosomes mediate the cytoprotective action of mesenchymal stromal cells on hypoxia-induced pulmonary hypertension. **Circulation**, v. 126, n. 22, p. 2601-2611, 2012.

LEE, E. Y.; CHOI, D. Y.; KIM, D. K.; KIM, J. W.; PARK, J. O.; KIM, S.; KIM, S. H.; DESIDERIO, D. M.; KIM, Y. K.; KIM, K. P. Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: Proteomics-based characterization of Staphylococcus aureus-derived membrane vesicles. **Proteomics**, v. 9, n. 24, p. 5425-5436, 2009.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843-54, Dec 3 1993.

LEMOINNE, S.; THABUT, D.; HOUSSET, C.; MOREAU, R.; VALLA, D.; BOULANGER, C. M.; RAUTOU, P.-E. The emerging roles of microvesicles in liver diseases. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, 2014.

LEON, A. S.; CONNETT, J.; JACOBS, D. R.; RAURAMAA, R. Leisure-time physical activity levels and risk of coronary heart disease and death: the Multiple Risk Factor Intervention Trial. **Jama**, v. 258, n. 17, p. 2388-2395, 1987.

LESPAGNOL, A.; DUFLAUT, D.; BEEKMAN, C.; BLANC, L.; FIUCCI, G.; MARINE, J.-C.; VIDAL, M.; AMSON, R.; TELERMAN, A. Exosome secretion, including the DNA damage-induced p53-dependent secretory pathway, is severely compromised in TSAP6/Steap3-null mice. **Cell Death & Differentiation**, v. 15, n. 11, p. 1723-1733, 2008.

LI, M.; ZERINGER, E.; BARTA, T.; SCHAGEMAN, J.; CHENG, A.; VLASSOV, A. V. Analysis of the RNA content of the exosomes derived from blood serum and urine and its potential as biomarkers. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 369, n. 1652, p. 20130502, 2014.

LI, Z.; CLARKE, A. J.; BEVERIDGE, T. J. Gram-negative bacteria produce membrane vesicles which are capable of killing other bacteria. **Journal of bacteriology**, v. 180, n. 20, p. 5478-5483, 1998.

LIN, J.; HUANG, S.; WU, S.; DING, J.; ZHAO, Y.; LIANG, L.; TIAN, Q.; ZHA, R.; ZHAN, R.; HE, X. MicroRNA-423 promotes cell growth and regulates G1/S transition by targeting p21Cip1/Waf1 in hepatocellular carcinoma. **Carcinogenesis**, v. 32, n. 11, p. 1641-1647, 2011.

LÖTVALL, J.; HILL, A. F.; HOCHBERG, F.; BUZÁS, E. I.; DI VIZIO, D.; GARDINER, C.; GHO, Y. S.; KUROCHKIN, I. V.; MATHIVANAN, S.; QUESENBERRY, P. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. **Journal of extracellular vesicles**, v. 3, 2014.

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

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome biology**, v. 15, n. 12, p. 1, 2014.

LUGER, A.; WATSCHINGER, B.; DEUSTER, P.; SVOBODA, T.; CLODI, M.; CHROUSOS, G. P. Plasma growth hormone and prolactin responses to graded levels of acute exercise and to a lactate infusion. **Neuroendocrinology**, v. 56, n. 1, p. 112-117, 1992.

LUKASIK, A.; ZIELENKIEWICZ, P. In Silico Identification of Plant miRNAs in Mammalian Breast Milk Exosomes—A Small Step Forward? **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e99963, 2014.

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.

MACH, N.; PLANCADE, S.; PACHOLEWSKA, A.; LECARDONNEL, J.; RIVIÈRE, J.; MOROLDO, M.; VAIMAN, A.; MORGENTHALER, C.; BEINAT, M.; NEVOT, A.

Integrated mRNA and miRNA expression profiling in blood reveals candidate biomarkers associated with endurance exercise in the horse. **Scientific reports**, v. 6, 2016.

MACKENZIE, A.; WILSON, H. L.; KISS-TOTH, E.; DOWER, S. K.; NORTH, R. A.; SURPRENANT, A. Rapid secretion of interleukin-1 β by microvesicle shedding. **Immunity**, v. 15, n. 5, p. 825-835, 2001.

MAIZELS, R. M.; HEWITSON, J. P.; MURRAY, J.; HARCUS, Y. M.; DAYER, B.; FILBEY, K. J.; GRAINGER, J. R.; MCSORLEY, H. J.; REYNOLDS, L. A.; SMITH, K. A. Immune modulation and modulators in *Heligmosomoides polygyrus* infection. **Experimental parasitology**, v. 132, n. 1, p. 76-89, 2012.

MARTINS, E. T.; LINHARES, M. N.; SOUSA, D. S.; SCHROEDER, H. K.; MEINERZ, J.; RIGO, L. A.; BERTOTTI, M. M.; GULLO, J.; HOHL, A.; DAL-PIZZOL, F. Mortality in severe traumatic brain injury: a multivariate analysis of 748 Brazilian patients from Florianopolis City. **Journal of Trauma and Acute Care Surgery**, v. 67, n. 1, p. 85-90, 2009.

MATHIVANAN, S.; JI, H.; SIMPSON, R. J. Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. **Journal of proteomics**, v. 73, n. 10, p. 1907-20, Sep 10 2010.

MATHIVANAN, S.; LIM, J. W.; TAURO, B. J.; JI, H.; MORITZ, R. L.; SIMPSON, R. J. Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 9, n. 2, p. 197-208, Feb 2010.

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

MATSUO, H.; CHEVALLIER, J.; MAYRAN, N.; LE BLANC, I.; FERGUSON, C.; FAURÉ, J.; BLANC, N. S.; MATILE, S.; DUBOCHET, J.; SADOUL, R. Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. **Science**, v. 303, n. 5657, p. 531-534, 2004.

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.

MCCRORY, P.; MEEUWISSE, W. H.; AUBRY, M.; CANTU, B.; DVOŘÁK, J.; EICHEMENDIA, R. J.; ENGBRETSEN, L.; JOHNSTON, K.; KUTCHER, J. S.; RAFTERY, M. Consensus statement on concussion in sport: the 4th International Conference on Concussion in Sport held in Zurich, November 2012. **British journal of sports medicine**, v. 47, n. 5, p. 250-258, 2013.

MELO, S. A.; LUECKE, L. B.; KAHLERT, C.; FERNANDEZ, A. F.; GAMMON, S. T.; KAYE, J.; LEBLEU, V. S.; MITTENDORF, E. A.; WEITZ, J.; RAHBARI, N. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. **Nature**, 2015.

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. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 30, p. 10513, 2008.

MITTELBRUNN, M.; GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ, C.; VILLARROYA-BELTRI, C.; GONZÁLEZ, S.; SÁNCHEZ-CABO, F.; GONZÁLEZ, M. Á.; BERNAD, A.; SÁNCHEZ-MADRID, F. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. **Nature communications**, v. 2, p. 282, 2011.

MONTECALVO, A.; LARREGINA, A. T.; SHUFESKY, W. J.; STOLZ, D. B.; SULLIVAN, M. L.; KARLSSON, J. M.; BATY, C. J.; GIBSON, G. A.; ERDOS, G.; WANG, Z. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. **Blood**, v. 119, n. 3, p. 756-766, 2012.

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.

NAJJAR, M.; SALEH, D.; ZELIC, M.; NOGUSA, S.; SHAH, S.; TAI, A.; FINGER, J. N.; POLYKRATIS, A.; GOUGH, P. J.; BERTIN, J. RIPK1 and RIPK3 Kinases Promote Cell-Death-Independent Inflammation by Toll-like Receptor 4. **Immunity**, v. 45, n. 1, p. 46-59, 2016.

NIELSEN, S.; ÅKERSTRÖM, T.; RINNOV, A.; YFANTI, C.; SCHEELE, C.; PEDERSEN, B. K.; LAYE, M. J. The miRNA plasma signature in response to acute aerobic exercise and endurance training. **PLoS one**, v. 9, n. 2, p. e87308, 2014.

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.

NUDEL, K.; MASSARI, P.; GENCO, C. A. Neisseria gonorrhoeae modulates cell death in human endocervical epithelial cells through export of exosome-associated cIAP2. **Infection and immunity**, v. 83, n. 9, p. 3410-3417, 2015.

OKOYE, I. S.; COOMES, S. M.; PELLY, V. S.; CZIESO, S.; PAPAYANNOPOULOS, V.; TOLMACHOVA, T.; SEABRA, M. C.; WILSON, M. S. MicroRNA-containing T-regulatory-cell-derived exosomes suppress pathogenic T helper 1 cells. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 89-103, 2014.

OLIVEIRA, D. L.; NAKAYASU, E. S.; JOFFE, L. S.; GUIMARÃES, A. J.; SOBREIRA, T.; NOSANCHUK, J. D.; CORDERO, R.; FRASES, S.; CASADEVALL, A.; ALMEIDA, I. C. Characterization of yeast extracellular vesicles: evidence for the participation of different pathways of cellular traffic in vesicle biogenesis. **PLoS One**, v. 5, n. 6, p. e11113, 2010.

PALANISAMY, V.; SHARMA, S.; DESHPANDE, A.; ZHOU, H.; GIMZEWSKI, J.; WONG, D. T. Nanostructural and transcriptomic analyses of human saliva derived exosomes. **PLoS one**, v. 5, n. 1, p. e8577, 2010.

PAN, B.-T.; JOHNSTONE, R. M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. **Cell**, v. 33, n. 3, p. 967-978, 1983.

PEINADO, H.; ALEČKOVIĆ, M.; LAVOTSHKIN, S.; MATEI, I.; COSTA-SILVA, B.; MORENO-BUENO, G.; HERGUETA-REDONDO, M.; WILLIAMS, C.; GARCÍA-SANTOS, G.; GHAJAR, C. M. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. **Nature medicine**, v. 18, n. 6, p. 883-891, 2012.

PENG, W.-Z.; MA, R.; WANG, F.; YU, J.; LIU, Z.-B. Role of miR-191/425 cluster in tumorigenesis and diagnosis of gastric cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 3, p. 4031-4048, 2014.

PEREZ-GONZALEZ, R.; GAUTHIER, S. A.; KUMAR, A.; LEVY, E. The exosome secretory pathway transports amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragments from the cell into the brain extracellular space. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 51, p. 43108-43115, 2012.

PISITKUN, T.; SHEN, R.-F.; KNEPPER, M. A. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 36, p. 13368-13373, 2004.

POLYKRATIS, A.; HERMANCE, N.; ZELIC, M.; RODERICK, J.; KIM, C.; VAN, T.-M.; LEE, T. H.; CHAN, F. K.; PASPARAKIS, M.; KELLIHER, M. A. Cutting edge: RIPK1 Kinase inactive mice are viable and protected from TNF-induced necroptosis in vivo. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 4, p. 1539-1543, 2014.

PRITCHARD, C. C.; CHENG, H. H.; TEWARI, M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 5, p. 358-369, 2012.

QAZI, K. R.; PAREDES, P. T.; DAHLBERG, B.; GRUNEWALD, J.; EKLUND, A.; GABRIELSSON, S. Proinflammatory exosomes in bronchoalveolar lavage fluid of patients with sarcoidosis. **Thorax**, v. 65, n. 11, p. 1016-1024, 2010.

QU, Y.; FRANCHI, L.; NUNEZ, G.; DUBYAK, G. R. Nonclassical IL-1 β secretion stimulated by P2X7 receptors is dependent on inflammasome activation and correlated with exosome release in murine macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 3, p. 1913-1925, 2007.

RAGHUPATHI, R. Cell death mechanisms following traumatic brain injury. **Brain pathology**, v. 14, n. 2, p. 215-222, 2004.

RAPOSO, G.; NIJMAN, H. W.; STOORVOGEL, W.; LIEJENDEKKER, R.; HARDING, C. V.; MELIEF, C.; GEUZE, H. J. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. **The Journal of experimental medicine**, v. 183, n. 3, p. 1161-1172, 1996.

RAPOSO, G.; STOORVOGEL, W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. **J Cell Biol**, v. 200, n. 4, p. 373-83, Feb 18 2013.

- 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.
- REKKER, K.; SAARE, M.; ROOST, A. M.; KUBO, A.-L.; ZAROVNI, N.; CHIESI, A.; SALUMETS, A.; PETERS, M. Comparison of serum exosome isolation methods for microRNA profiling. **Clinical biochemistry**, v. 47, n. 1, p. 135-138, 2014.
- RIDER, M. A.; HURWITZ, S. N.; MECKES JR, D. G. ExtraPEG: A Polyethylene Glycol-Based Method for Enrichment of Extracellular Vesicles. **Scientific reports**, v. 6, 2016.
- ROBERT, C. Care during equestrian endurance trials. **Pratique Vétérinaire Equine**, v. 41, n. 161, p. 31-40, 2009.
- RODRIGUES, M. L.; NAKAYASU, E. S.; OLIVEIRA, D. L.; NIMRICHTER, L.; NOSANCHUK, J. D.; ALMEIDA, I. C.; CASADEVALL, A. Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence. **Eukaryotic cell**, v. 7, n. 1, p. 58-67, 2008.
- ROELEN, C.; DE VRIES, W.; KOPPESCHAAR, H.; VERVOORN, C.; THIJSSSEN, J.; BLANKENSTEIN, M. Plasma insulin-like growth factor-I and high affinity growth hormone-binding protein levels increase after two weeks of strenuous physical training. **International journal of sports medicine**, v. 18, n. 4, p. 238-241, 1997.
- 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.
- ROUCOURT, B.; MEEUSSEN, S.; BAO, J.; ZIMMERMANN, P.; DAVID, G. Heparanase activates the syndecan-syntenin-ALIX exosome pathway. **Cell research**, 2015.
- ROUGVIE, A. E. Control of developmental timing in animals. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, n. 9, p. 690-701, 2001.
- SAFDAR, A.; SALEEM, A.; TARNOPOLSKY, M. A. The potential of endurance exercise-derived exosomes to treat metabolic diseases. **Nature Reviews Endocrinology**, 2016.
- SALOMON, C.; RYAN, J.; SOBREVIA, L.; KOBAYASHI, M.; ASHMAN, K.; MITCHELL, M.; RICE, G. E. Exosomal signaling during hypoxia mediates microvascular endothelial cell migration and vasculogenesis. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e68451, 2013.
- SCHILLER, M.; BEKEREDJIAN-DING, I.; HEYDER, P.; BLANK, N.; HO, A.; LORENZ, H. Autoantigens are translocated into small apoptotic bodies during early stages of apoptosis. **Cell Death & Differentiation**, v. 15, n. 1, p. 183-191, 2008.
- SCHWARZENBACH, H.; NISHIDA, N.; CALIN, G. A.; PANTEL, K. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 11, n. 3, p. 145-156, 2014.

SHAN, R.; SZMYDYNGER-CHODOBSKA, J.; WARREN, O. U.; MOHAMMAD, F.; ZINK, B. J.; CHODOBSKI, A. A new panel of blood biomarkers for the diagnosis of mild traumatic brain injury/concussion in adults. **Journal of neurotrauma**, v. 33, n. 1, p. 49-57, 2016.

SHKURNIKOV, M. Y.; KNYAZEVA, E.; FOMICHEVA, K.; MIKHAILENKO, D.; NYUSHKO, K.; SARIBEKYAN, E.; SAMATOV, T.; ALEKSEEV, B. Y. Analysis of Plasma microRNA Associated with Hemolysis. **Bulletin of experimental biology and medicine**, v. 160, n. 6, p. 748-750, 2016.

SIMPSON, R.; MATHIVANAN, S. Extracellular microvesicles: the need for internationally recognised nomenclature and stringent purification criteria. **J Proteomics Bioinform**, v. 5, n. 2, 2012.

SINGH, R.; POCHAMPALLY, R.; WATABE, K.; LU, Z.; MO, Y.-Y. Exosome-mediated transfer of miR-10b promotes cell invasion in breast cancer. **Molecular cancer**, v. 13, n. 1, p. 256, 2014.

SIOMI, M. C.; SATO, K.; PEZIC, D.; ARAVIN, A. A. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 12, n. 4, p. 246-258, 2011.

SIQUEIRA, R.; WEIGEL, R.; NUNES, G.; MORI, C.; FERNANDES, W. Oxidative profiles of endurance horses racing different distances. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 2, p. 455-461, 2014.

SKOG, J.; WURDINGER, T.; VAN RIJN, S.; MEIJER, D. H.; GAINCHE, L.; SENA-ESTEVEZ, M.; CURRY, W. T., JR.; CARTER, B. S.; KRICHEVSKY, A. M.; BREAKEFIELD, X. O. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. **Nat Cell Biol**, v. 10, n. 12, p. 1470-6, Dec 2008.

SOO, C. Y.; SONG, Y.; ZHENG, Y.; CAMPBELL, E. C.; RICHES, A. C.; GUNN-MOORE, F.; POWIS, S. J. Nanoparticle tracking analysis monitors microvesicle and exosome secretion from immune cells. **Immunology**, v. 136, n. 2, p. 192-197, 2012.

SPRENGER, H.; JACOBS, C.; NAIN, M.; GRESSNER, A.; PRINZ, H.; WESEMANN, W.; GEMSA, D. Enhanced release of cytokines, interleukin-2 receptors, and neopterin after long-distance running. **Clinical immunology and immunopathology**, v. 63, n. 2, p. 188-195, 1992.

SUBUDHI, A. W.; DIMMEN, A. C.; ROACH, R. C. Effects of acute hypoxia on cerebral and muscle oxygenation during incremental exercise. **Journal of Applied Physiology**, v. 103, n. 1, p. 177-183, 2007.

TABER, K. H.; WARDEN, D. L.; HURLEY, R. A. Blast-related traumatic brain injury: what is known? **The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences**, v. 18, n. 2, p. 141-145, 2006.

TAN, S. S.; YIN, Y.; LEE, T.; LAI, R. C.; YEO, R. W. Y.; ZHANG, B.; CHOO, A.; LIM, S. K. Therapeutic MSC exosomes are derived from lipid raft microdomains in the plasma membrane. **Journal of extracellular vesicles**, v. 2, 2013.

- TANG, X.; MUNIAPPAN, L.; TANG, G.; ÖZCAN, S. Identification of glucose-regulated miRNAs from pancreatic β cells reveals a role for miR-30d in insulin transcription. **Rna**, v. 15, n. 2, p. 287-293, 2009.
- THAKUR, B. K.; ZHANG, H.; BECKER, A.; MATEI, I.; HUANG, Y.; COSTA-SILVA, B.; ZHENG, Y.; HOSHINO, A.; BRAZIER, H.; XIANG, J. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. **Cell research**, v. 24, n. 6, p. 766, 2014.
- THÉRY, C.; DUBAN, L.; SEGURA, E.; VÉRON, P.; LANTZ, O.; AMIGORENA, S. Indirect activation of naïve CD4⁺ T cells by dendritic cell-derived exosomes. **Nature immunology**, v. 3, n. 12, p. 1156-1162, 2002.
- TKACH, M.; THÉRY, C. Communication by extracellular vesicles: Where we are and where we need to go. **Cell**, v. 164, n. 6, p. 1226-1232, 2016.
- TSOMPANIDI, E. M.; BRINKMEIER, M. S.; FOTIADOU, E. H.; GIAKOUMI, S. M.; KYPREOS, K. E. HDL biogenesis and functions: role of HDL quality and quantity in atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 208, n. 1, p. 3-9, 2010.
- UHLICH, R. M.; KONIE, J. A.; DAVIS, J. W.; MISFELDT, M. L.; NELSON, C.; CALALUCE, R.; BARNES, S. L. Novel microRNA correlations in the severely injured. **Surgery**, v. 156, n. 4, p. 834-841, 2014.
- 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 DEUN, J.; MESTDAGH, P.; SORMUNEN, R.; COCQUYT, V.; VERMAELEN, K.; VANDESOMPELE, J.; BRACKE, M.; DE WEVER, O.; HENDRIX, A. The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling. **J Extracell Vesicles**, v. 3, 2014.
- VAN ROOIJ, E.; OLSON, E. N. MicroRNA therapeutics for cardiovascular disease: opportunities and obstacles. **Nature reviews Drug discovery**, v. 11, n. 11, p. 860-872, 2012.
- VIANO, D. C.; CASSON, I. R.; PELLMAN, E. J.; BIR, C. A.; ZHANG, L.; SHERMAN, D. C.; BOITANO, M. A. Concussion in professional football: comparison with boxing head impacts—part 10. **Neurosurgery**, v. 57, n. 6, p. 1154-1172, 2005.
- 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.
- VOLINIA, S.; GALASSO, M.; SANA, M. E.; WISE, T. F.; PALATINI, J.; HUEBNER, K.; CROCE, C. M. Breast cancer signatures for invasiveness and prognosis defined by deep sequencing of microRNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 8, p. 3024-3029, 2012.

WAHLQUIST, C.; JEONG, D.; ROJAS-MUÑOZ, A.; KHO, C.; LEE, A.; MITSUYAMA, S.; VAN MIL, A.; PARK, W. J.; SLUIJTER, J. P.; DOEVENDANS, P. A. Inhibition of miR-25 improves cardiac contractility in the failing heart. **Nature**, v. 508, n. 7497, p. 531-535, 2014.

WANG, H.; ZHANG, P.; CHEN, W.; FENG, D.; JIA, Y.; XIE, L. Serum microRNA signatures identified by Solexa sequencing predict sepsis patients' mortality: a prospective observational study. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e38885, 2012.

WEBBER, J. P.; SPARY, L. K.; SANDERS, A. J.; CHOWDHURY, R.; JIANG, W. G.; STEADMAN, R.; WYMANT, J.; JONES, A. T.; KYNASTON, H.; MASON, M. D.; TABI, Z.; CLAYTON, A. Differentiation of tumour-promoting stromal myofibroblasts by cancer exosomes. **Oncogene**, Jan 20 2014.

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.

WILLIAMS, Z.; BEN-DOV, I. Z.; ELIAS, R.; MIHAILOVIC, A.; BROWN, M.; ROSENWAKS, Z.; TUSCHL, T. Comprehensive profiling of circulating microRNA via small RNA sequencing of cDNA libraries reveals biomarker potential and limitations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 11, p. 4255-4260, 2013.

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.

WITWER, K. W.; BUZAS, E. I.; BEMIS, L. T.; BORA, A.; LÄSSER, C.; LÖTVALL, J.; NOLTE, E. N. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. **Journal of extracellular vesicles**, v. 2, 2013.

WOLFERS, J.; LOZIER, A.; RAPOSO, G.; REGNAULT, A.; THÉRY, C.; MASURIER, C.; FLAMENT, C.; POUZIEUX, S.; FAURE, F.; TURSZ, T. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. **Nature medicine**, v. 7, n. 3, p. 297-303, 2001.

YANG, M.; CHEN, J.; SU, F.; YU, B.; LIN, L.; LIU, Y.; HUANG, J. D.; SONG, E. Microvesicles secreted by macrophages shuttle invasion-potentiating microRNAs into breast cancer cells. **Molecular cancer**, v. 10, p. 117, 2011.

YANG, Q.; LU, J.; WANG, S.; LI, H.; GE, Q.; LU, Z. Application of next-generation sequencing technology to profile the circulating microRNAs in the serum of preeclampsia versus normal pregnant women. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 23, p. 2167-2173, 2011.

YOU, Z.; SAVITZ, S. I.; YANG, J.; DEGTEREV, A.; YUAN, J.; CUNY, G. D.; MOSKOWITZ, M. A.; WHALEN, M. J. Necrostatin-1 reduces histopathology and improves functional outcome after controlled cortical impact in mice. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 28, n. 9, p. 1564-1573, 2008.

YOUNG-MCCAUGHAN, S.; SEXTON, D. A retrospective investigation of the relationship between aerobic exercise and quality of life in women with breast cancer. *Oncology nursing forum*, 1990. p.751-757.

YU, X.; DENG, L.; WANG, D.; LI, N.; CHEN, X.; CHENG, X.; YUAN, J.; GAO, X.; LIAO, M.; WANG, M. Mechanism of TNF- α autocrine effects in hypoxic cardiomyocytes: initiated by hypoxia inducible factor 1 α , presented by exosomes. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 53, n. 6, p. 848-857, 2012.

YUANA, Y.; LEVELS, J.; GROOTEMAAT, A.; STURK, A.; NIEUWLAND, R. Co-isolation of extracellular vesicles and high-density lipoproteins using density gradient ultracentrifugation. **J Extracell Vesicles**, v. 3, 2014.

ZHANG, H.-C.; LIU, X.-B.; HUANG, S.; BI, X.-Y.; WANG, H.-X.; XIE, L.-X.; WANG, Y.-Q.; CAO, X.-F.; LV, J.; XIAO, F.-J. Microvesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells stimulated by hypoxia promote angiogenesis both in vitro and in vivo. **Stem cells and development**, v. 21, n. 18, p. 3289-3297, 2012.

ZHANG, H.-G.; LIU, C.; SU, K.; YU, S.; ZHANG, L.; ZHANG, S.; WANG, J.; CAO, X.; GRIZZLE, W.; KIMBERLY, R. P. A membrane form of TNF- α presented by exosomes delays T cell activation-induced cell death. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 12, p. 7385-7393, 2006.

ZHOU, H.; CHERUVANKY, A.; HU, X.; MATSUMOTO, T.; HIRAMATSU, N.; CHO, M. E.; BERGER, A.; LEELAHAVANICHKUL, A.; DOI, K.; CHAWLA, L. S. Urinary exosomal transcription factors, a new class of biomarkers for renal disease. **Kidney international**, v. 74, n. 5, p. 613-621, 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.