



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Nutrição

Adriano Teixeira Pereira

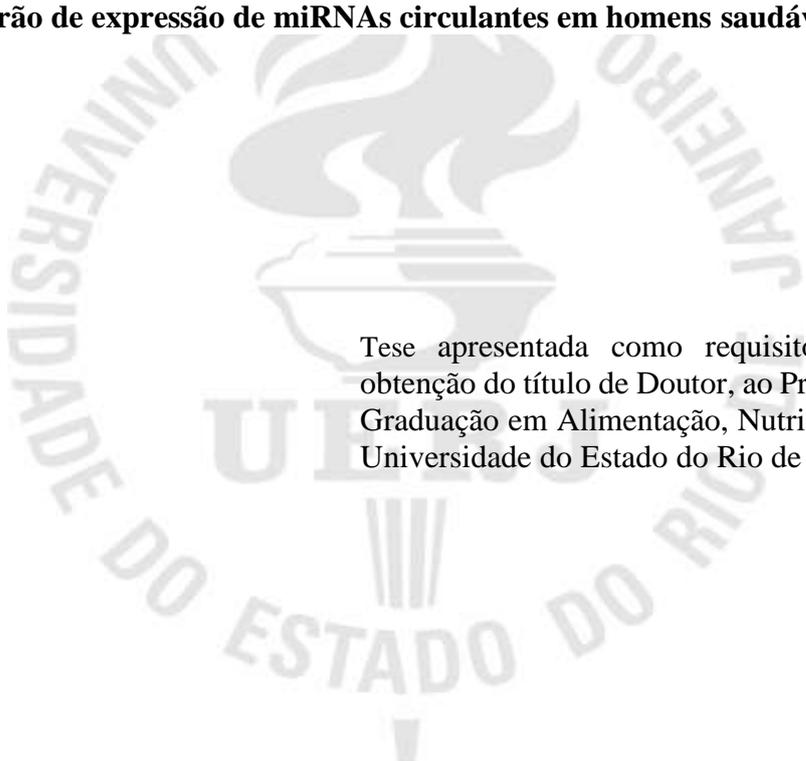
**Adaptações fisiológicas e metabólicas ao exercício físico agudo e crônico
relações com o padrão de expressão de miRNAs circulantes em homens
saudáveis.**

Rio de Janeiro

2020

Adriano Teixeira Pereira

Adaptações fisiológicas e metabólicas ao exercício físico agudo e crônico e relações com o padrão de expressão de miRNAs circulantes em homens saudáveis



Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof^a Dra. Josely Correa Koury

Coorientadora: Prof^a Dra. Marta Citelli dos Reis

Rio de Janeiro

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CEH/A

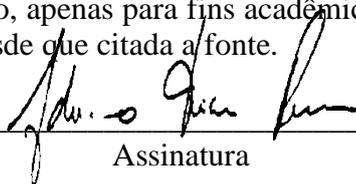
P436 Pereira, Adriano Teixeira.
Adaptações fisiológicas e metabólicas ao exercício físico agudo e crônico
relações com o padrão de expressão de miRNAs circulantes em homens
saudáveis / Adriano Teixeira Pereira. – 2020.
85 f.

Orientadora: Josely Correa Koury
Coorientadora: Marta Citelli dos Reis
Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de
Nutrição.

1. Nutrição – Teses. 2. Exercício – Teses. 3. Músculo – Teses. I. Koury,
Josely Correa. II. Reis, Marta Citelli dos. III. Universidade do Estado do Rio de
Janeiro. Instituto de Nutrição. IV. Título.

es CDU 612.3

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta
tese, desde que citada a fonte.


Assinatura

17/05/2021

Data

Adriano Teixeira Pereira

Adaptações fisiológicas e metabólicas ao exercício físico agudo e crônico e relações com o padrão de expressão de miRNAs circulantes em homens saudáveis.

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

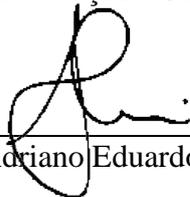
Apresentada em 30 de julho, de 2020

Banca Examinadora:



Prof.ª. Dr.ª Josely Correa Koury (Orientadora)

Instituto de Nutrição - Uerj



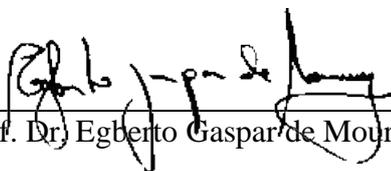
Prof. Dr. Adriano Eduardo Lima da Silva

Faculdade de Educação Física - UTFPR



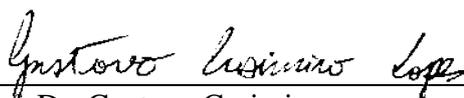
Prof. Dr.ª AminaChain Costa

Universidade Federal Fluminense – UFF



Prof. Dr. Egberto Gaspar de Moura

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - Uerj



Prof. Dr. Gustavo Casimiro

Instituto de Educação e Desportos - Uerj

Rio de Janeiro

2020

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, que sempre fez parte das minhas realizações, alegrias e sonhos. Obrigado por vocês existirem e por me fazerem tão feliz.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo amor incondicional e apoio constante que transformam meus sonhos em realidade;

À minha orientadora Prof^aDr^aJosely Correa Koury e coorientadora Prof^aDr^aMarta Citelli pela orientação, pela atenção, pela paciência e carinho. Muito obrigado pela oportunidade de aprender, de crescer e de me tornar uma pessoa melhor;

Ao Instituto de Pesquisa da Capacitação Física do Exército pela oportunidade acadêmica, apoio irrestrito, confiança, incentivo e acompanhamento constante na realização deste trabalho;

Aos laboratórios de Fisiopatologia e Bioquímica da Nutrição e ao laboratório para Estudos da Interação entre Nutrição e Genética (Instituto de Nutrição – UERJ) pelas análises e resultados dos exames laboratoriais realizados.;

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde (Instituto de Nutrição – UERJ) pela contribuição e aprendizagem;

Ao Programa de Pós Graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde do Instituto de Nutrição da UERJ, em especial à minha turma de doutorado pela convivência, amizade e aprendizado.

Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e viver com ousadia. pois o triunfo pertence a quem se atreve e a vida é muito bela para ser insignificante!

Charles Chaplin

RESUMO

PEREIRA, Adriano T. *Adaptações fisiológicas e metabólicas ao exercício físico agudo e crônico: relações com o padrão de expressão de miRNAs circulantes em homens saudáveis*. 2020. 88 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Não estão completamente esclarecidos os mecanismos de adaptação e respostas agudas provocadas pelo exercício físico. As concentrações séricas de biomarcadores específicos são sinalizadoras das respostas adaptativas. A expressão de miRNAs circulantes (c-miRNAs), moléculas mediadoras intracelulares essenciais para numerosos processos biológicos, pode ser usada para compreender as alterações induzidas pelo exercício. O presente estudo objetivou determinar as variações de biomarcadores bioquímicos e fisiológicos relacionados à lesão tecidual e ao processo inflamatório, e a expressão de c-miRNAs de homens saudáveis ($18,5 \pm 0,5$ anos), condicionados e não condicionados fisicamente, após a realização de exercício resistido (ER) agudo e treinamento crônico. Os participantes foram classificados em não condicionados ($n=10$) ou condicionados ($n=10$) fisicamente, de acordo com o teste de Cooper. Foram coletadas amostras de sangue em três momentos: basal, 1h, 24h-pós ER (repetições máximas de flexão de braços, alternada e sem intervalos, com a realização de repetições máximas de agachamento) e após 12 semanas de treinamento crônico (corrida contínua), além disso foram realizados teste de força escapular, de membros inferiores e de coluna lombar. Após o ER agudo, ambos os grupos apresentaram o mesmo comportamento dos marcadores bioquímicos (aumento da concentração sérica de creatina quinase pós-1h e 24h ($P < 0,05$) e manutenção da concentração sérica da interleucina-6), porém a expressão dos c-miRNAs foi dinâmica e distinta entre os grupos, no grupo não condicionado foram observadas redução no padrão de expressão dos c-miRNAs mediadores da função muscular (c-miR-1-3p pós-1h; c-miR-133 pós-24h) e no grupo condicionado redução da expressão do mediador do processo inflamatório (c-miR-21-3p). Após o exercício crônico, foram observadas adaptações sistêmicas, como o aumento do VO_{2max} do grupo não condicionado e da força em ambos os grupos. Houve redução da expressão dos c-miR-21-3p e -133a no grupo não condicionado, podendo ser considerado como uma modificação em função do incremento do condicionamento físico, gerado pelo treinamento crônico. Nossos resultados, em conjunto, apontam para a importância do condicionamento físico no estudo dos c-miRNAs. O incremento do condicionamento físico, possivelmente, influenciou o perfil de expressão dos c-miRNAs específicos de lesão tecidual e processo inflamatório. Os c-miRNAs podem ser promissores biomarcadores capazes de indicar o processo de resposta ou de adaptação causado pelo exercício físico.

Palavras-chave: Exercício agudo e crônico. Músculo esquelético. Fisicamente condicionado e não condicionado. miRNAs e c-miRNAs.

ABSTRACT

PEREIRA, Adriano T. *Physiological and metabolic adaptations to acute and chronic physical exercise and relationships with the expression of circulating miRNAs in healthy men*. Tese 2020. 85 f. (Doutorado em Ciências) –Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

The mechanisms of adaptation and acute responses caused by physical exercise are not fully understood. Serum concentrations of specific biomarkers signal adaptive responses. The expression of circulating miRNAs (c-miRNAs), intracellular mediating molecules essential for numerous biological processes, can be used to understand the changes induced by exercise. The present study aimed to determine the variations of biochemical and physiological biomarkers related to tissue damage and the inflammatory process, and the expression of c-miRNAs of healthy men (18.5 ± 0.5 years), conditioned and not physically conditioned, after performing acute resistance exercise (RE) and chronic training. Participants were classified as unconditioned ($n = 10$) or physically conditioned ($n = 10$), according to the Cooper test. Blood samples were collected at three times: baseline, 1h, 24h-post RE (maximum repetitions of arm flexion, alternating and without intervals, with maximum repetitions of squats) and after 12 weeks of chronic training (continuous running), in addition, scapular strength, lower limbs and lumbar spine tests were performed. After acute RE, both groups showed the same behavior as biochemical markers (increased serum creatine kinase concentration after 1h and 24h ($P < 0.05$) and maintenance of serum interleukin-6 concentration), however the expression of c-miRNAs were dynamic and distinct between groups, in the unconditioned group a reduction in the expression pattern of c-miRNAs mediating muscle function was observed (c-miR-1-3p post-1h; c-miR-133a post-24h) and in the conditioned group reduced expression of the mediator of the inflammatory process (c-miR-21-3p). After chronic exercise, systemic adaptations were observed, such as increased VO_{2max} in the unconditioned group and strength in both groups. There was a reduction in the expression of c-miR-21-3p and -133a in the non-conditioned group, which can be considered as a modification due to the increase in physical conditioning, generated by chronic training. Our results, taken together, point to the importance of physical conditioning in the study of c-miRNAs. The increase in physical conditioning, possibly, influenced the expression profile of specific c-miRNAs of tissue damage and inflammatory process. C-miRNAs can be promising biomarkers capable of indicating the response or adaptation process caused by physical exercise.

Keywords: Acute and chronic exercise. Skeletal muscle. Physically conditioned and unconditioned. miRNAs and c-miRNAs.

RESUMEN

PEREIRA, Adriano T. *Adaptaciones fisiológicas y metabólicas al ejercicio físico agudo y crónico y relaciones con el patrón de expresión de los miRNAs circulantes en hombres sanos*. 2020. 85 f. Tese (Doutorado em Ciências) –Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Los mecanismos de adaptación y las respuestas agudas causadas por el ejercicio físico no se comprenden completamente. Las concentraciones séricas de biomarcadores específicos señalan respuestas adaptativas. La expresión de miRNAs circulantes (c-miRNAs), moléculas mediadoras intracelulares esenciales para numerosos procesos biológicos, puede usarse para comprender los cambios inducidos por el ejercicio. El presente estudio tuvo como objetivo determinar las variaciones de los biomarcadores bioquímicos y fisiológicos relacionados con el daño tisular y el proceso inflamatorio, y la expresión de c-miRNAs de hombres sanos (18.5 ± 0.5 años), condicionados y no físicamente condicionados, después de realizar ejercicio de resistencia aguda (ER) y entrenamiento crónico. Los participantes fueron clasificados como no condicionados (n = 10) o físicamente condicionados (n = 10), de acuerdo con la prueba de Cooper. Se recogieron muestras de sangre tres veces: línea de base, 1 h, 24 h después de la ER (repeticiones máximas de flexión del brazo, alternadas y sin intervalos, con repeticiones máximas de sentadillas) y después de 12 semanas de entrenamiento crónico (carrera continua). Además, se realizaron pruebas de fuerza escapular, miembros inferiores y columna lumbar. Después de la ER aguda, ambos grupos mostraron el mismo comportamiento que los marcadores bioquímicos (aumento de la concentración sérica de creatina quinasa después de 1 h y 24 h (P < 0.05) y mantenimiento de la concentración sérica de interleucina-6), sin embargo, la expresión de los c-miRNAs fue dinámica y distinta entre los grupos, en el grupo no condicionado se observó una reducción en el patrón de expresión de los c-miRNAs que median la función muscular (c-miR-1-3p post-1h; c-miR-133 post-24h) y en el grupo condicionado, expresión reducida del mediador del proceso inflamatorio (c-miR-21-3p). Después del ejercicio crónico, se observaron adaptaciones sistémicas, como un aumento del VO₂máx en el grupo no condicionado y la fuerza en ambos grupos. Hubo una reducción en la expresión de c-miR-21-3p y -133a en el grupo no condicionado, lo que puede considerarse como una modificación debido al aumento en el acondicionamiento físico, generado por el entrenamiento crónico. Nuestros resultados, tomados en conjunto, apuntan a la importancia del acondicionamiento físico en el estudio de c-miRNAs. El aumento en el acondicionamiento físico, posiblemente, influyó en el perfil de expresión de c-miRNAs específicos de daño tisular y proceso inflamatorio. Los c-miRNAs pueden ser biomarcadores prometedores capaces de indicar la respuesta o el proceso de adaptación causado por el ejercicio físico.

Palabras clave: Ejercicio agudo y crónico. Músculo esquelético. Físicamente condicionado y no condicionado. miRNAs y c-miRNAs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão Bibliográfica

- Figura 1 - Organização da Fibra Muscular. Estrutura e organização da fibra muscular e dos mecanismos contráteis.20
- Figura 2 - Dano Muscular. Eletromicrografia ilustrando dano muscular e desestruturação das linhas Z.20
- Figura 3 - Tipos de contração muscular. As contrações que implicam em movimento articular podem ser classificadas em: a) concêntricas e b) excêntricas.20
- Figura 4 - Resumo da biogênese e os mecanismos de ação dos miRNAs.....28

Artigo 1

- Figura 1- Fluxograma de inclusão e exclusão dos participantes do estudo39
- Figura 2 - Comparação dos valores de expressão relativa dos c-miRNAs selecionados no momento basal. # diferença significativa entre os grupos.....46
- Figura3 - Boxplots (mediana, percentil 25 e percentil 75) do comportamento da expressão dos c-miRNAs selecionados após 1h e 24h de exercício agudo em indivíduos condicionados e não condicionados. miR 206 (A), miR1-3p (B), miR-133a (C), miR-21-3p (D). * diferença significativa comparado ao momento basal e # diferença significativa entre os grupos.47

Artigo 2

- Figura 1- Fluxograma de inclusão e exclusão dos participantes do estudo59
- Figura 2 - Detalhamento do delineamento do estudo60
- Figura 3 -. Boxplots (mediana, percentil 25 e percentil 75) do comportamento da expressão dos c-miRNAs selecionados após treinamento crônico em indivíduos condicionados e não condicionados. c-miR-133a (A), c-miR-21-3p (B), c-miR-206 (C). * diferença significativa comparado ao momento basal e # diferença significativa entre os grupos.65

LISTA DE TABELAS

Revisão Bibliográfica

Tabela 1 - c-miRNAs agrupados de acordo com a função biológica a que estão envolvidos.....	30
--	----

Artigo 1

Tabela 1 - Características gerais dos participantes, de acordo com a classificação do condicionamento físico (Grupo Condicionado e Não Condicionado)	44
Tabela 2 - Mediana (IIQ) da concentração sérica de marcadores bioquímicos de lesão muscular, processo inflamatório e glicemia, de acordo com a classificação pelo condicionamento físico (Grupo Condicionado e Não Condicionado)....	45

Artigo 2

Tabela 1 - Características gerais dos participantes, de acordo com a classificação do condicionamento físico (Não Condicionado e Condicionado)	63
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACSM	<i>American College of Sports Medicine</i>
AKT	Proteínaquinase 1
AMPK	Proteína quinase dependente de AMP
AMPKK	<i>AMPK quinase</i>
CK	Creatina quinase
c-miRNA	microRNA circulantes
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GIP	Peptídeo inibidor gástrico
GLUT-4	<i>Glucose transporter4</i>
IGF	<i>Insulin-likegrowthfactor</i>
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corporal
IR	<i>Insulin Receptor</i>
IRS	<i>Insulin Receptor Substrate</i>
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
miRNA	microRNA
PI3K	Proteína fosfatidilinositol 3-quinase
PYY	Peptídeo YY
qPCR	quantitativepolymerasechainreaction
RISC	<i>RNA-inducedsilencingcomplex</i>
RNA _m	RNA mensageiro
VO ₂ max	Consumo máximo de oxigênio

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1	REFERENCIAL TEÓRICO	16
1.1	Atividade física e exercício físico	16
1.2	Tipos de exercício	16
1.3	Aptidão física	18
1.4	Exercício Físico e Lesão Muscular	19
1.5	Marcadores de lesão tecidual	21
1.6	Adaptações fisiológicas ao exercício físico agudo e crônico	23
1.7	Processo de reparação induzido pelo exercício físico	25
1.8	miRNAs: conceitos, biogênese e função	27
1.9	miRNAs circulantes	29
1.10	c-miRNase exercício físico	30
2	JUSTIFICATIVA	34
3	OBJETIVO	35
3.1	Objetivo geral	35
3.2	Objetivos específicos	35
4	MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1	Artigo 1: MicroRNAs circulantes durante prática de exercício resistido agudo em homens saudáveis com diferentes níveis de condicionamento físico	36
4.1.1	Introdução	37
4.1.2	Métodos	38
4.1.3	Resultados	43
4.1.4	Discussão	47
4.1.5	Referências	52
4.2	Artigo 2: Influência do incremento do condicionamento físico sobre a expressão de c-miRNAs específicos e sua relação com marcadores fisiológicos em homens saudáveis	56
4.2.1	Introdução	56
4.2.2	Métodos	58
4.2.3	Resultados	63
4.2.4	Discussão	66
4.2.5	Conclusão	67
4.2.6	Referências	68
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
	REFERÊNCIAS	72

INTRODUÇÃO

Os termos "atividade física" e "exercício físico" descrevem diferentes conceitos, porém, são frequentemente empregados de forma equivocada. A atividade física é definida como qualquer movimento corporal produzido pelos músculos esqueléticos que resulta em gasto de energia; já o exercício físico deve ser planejado, estruturado e repetitivo tendo como objetivo final ou intermediário a melhoria ou a manutenção da capacidade física (CASPERSEN; POWELL; CHRISTENSON, 1985).

O exercício físico promove importantes efeitos fisiológicos e metabólicos, agudos e crônicos, assim como o aumento da massa muscular esquelética, o ganho de força, a diminuição dos estoques de gordura, o aumento do gasto calórico, aumento da taxa metabólica de repouso e redução da tolerância à glicose (KELLEY; KELLEY, 2013). As adaptações advindas do exercício físico estão diretamente relacionadas ao tipo (resistência ou força), ao volume, à intensidade e à frequência do exercício (agudo ou crônico) (EGAN; ZIERATH, 2013).

O exercício agudo é caracterizado pela realização de uma sessão isolada de exercícios que gera respostas imediatas, ocorrendo ao longo das primeiras 24 ou 48 horas após o exercício, como elevação da frequência cardíaca, pressão arterial e temperatura corporal, bem como o aumento da sensibilidade à insulina (HAWLEY; HARGREAVES; JOYNER; ZIERATH, 2014). O exercício crônico refere-se à exposição regular de sessões de exercícios que geram adaptações sistêmicas como a bradicardia de repouso, hipertrofia muscular e elevação da potência aeróbia, entre outros (KURA; FLHO, 2011).

O efeito benéfico do exercício na saúde é sistêmico e não se restringe aos tecidos que estão mais ativamente envolvidos na geração de movimento (HAWLEY; HARGREAVES; JOYNER; ZIERATH, 2014). Por sua vez, o condicionamento físico está diretamente relacionado à melhora do quadro oxidativo (POWERS; CRISWELL; LAWLER; JI *et al.*, 1994), da capacidade cardiorrespiratória e da composição corporal (BRYNER; ULLRICH; SAUERS; DONLEY *et al.*, 1999), da resposta glicêmica (TREMBLAY; SIMONEAU; BOUCHARD, 1994) e inflamatória (ZALDIVAR; WANG-RODRIGUEZ; NEMET; SCHWINDT *et al.*, 2006). As respostas ao exercício agudo e crônico envolvem uma alteração gradual no conteúdo de proteínas e atividades enzimáticas. Essas mudanças progressivas refletem a ativação e/ou repressão de vias de sinalização específicas que regulam a transcrição e a tradução e têm efeitos na expressão gênica (PILEGAARD; SALTIN; NEUFER, 2003).

O estudo das respostas bioquímicas e moleculares ao exercício é, portanto, uma ferramenta importante para entender como essas respostas sistêmicas são integradas e como se

relacionam com o estado de saúde (NEUFER; BAMMAN; MUOIO; BOUCHARD *et al.*, 2015). O exercício físico agudo extenuante está relacionado à leucocitose transitória, aumentos significativos nas concentrações séricas da creatina quinase (CK) e na concentração de citocinas pró e anti-inflamatórias no tecido muscular e no sangue (MOOREN; BLOMING; LECHTERMANN; LERCH *et al.*, 2002; NIEMAN; HENSON; SMITH; UTTER *et al.*, 2001; ROSA; BICUDO; VAISBERG, 2002). Os efeitos crônicos do exercício físico sobre marcadores inflamatórios apontam uma diminuição do quadro pró-inflamatório local e sistêmico, maior produção e secreção de citocinas com função anti-inflamatória, com destaque para a interleucina-6 (IL-6) no tecido muscular e no sangue e melhora do poder antioxidante das células (PETERSEN; PEDERSEN, 2005). Porém, esses marcadores atuam com diferentes mecanismos de ação pró e anti-inflamatórios, variando de acordo com os estímulos agudos e crônicos, dificultando a interpretação em função de resultados divergentes, dependendo dos protocolos utilizados, da intensidade, do volume e da frequência de exercícios empregados, bem como o nível de aptidão dos sujeitos investigados, proporcionando poucos intervalos de referência específicos (LEE; FRAGALA; KAVOURAS; QUEEN *et al.*, 2017)

As respostas inflamatórias, no contexto do exercício físico agudo e adaptação crônica ao treinamento físico, podem ser acompanhadas por marcadores de inflamação, dentre outros, as citocinas, leucócitos e concentração sérica da enzima CK. A cascata inflamatória induzida pelo exercício atrai muita atenção e estudos sugerem que o exercício agudo moderado ativa fortes mecanismos anti-inflamatórios, que implicam na adaptação ao exercício físico e nos benefícios para a saúde (HANDSCHIN; SPIEGELMAN, 2008; LANCASTER; FEBBRAIO, 2014; PEDERSEN; FEBBRAIO, 2012; PETERSEN; PEDERSEN, 2005). No entanto, o exercício extenuante também está ligado à perturbações inflamatórias deletérias que podem causar danos nos tecidos (JEUKENDRUP; VET-JOOP; STURK; STEGEN *et al.*, 2000; OSTROWSKI; ROHDE; ZACHO; ASP *et al.*, 1998).

As respostas bioquímicas podem ser melhor explicadas por meio de mecanismos moleculares que regulam a adaptação ao exercício, porém ainda não são totalmente claros. Recentemente, tem surgido um crescente interesse em compreender e determinar a influência de exercícios físicos sobre o perfil de microRNAs (miRNAs), que são comunicadores intercelulares com papel regulatório pós-transcricional (MENDELL; OLSON, 2012).

Os miRNAs são pequenos RNAs não-codificantes que regulam mais de 60% dos genes humanos e desempenham um papel crítico na regulação dos mecanismos homeostáticos (FRIEDMAN; FARH; BURGE; BARTEL, 2009).

Além da localização intracelular na qual ocorre a sua biogênese, os miRNAs foram detectados em diferentes fluidos corporais, incluindo o sangue, chamados de microRNAs circulantes (c-miRNAs), que podem ser ativamente ou passivamente liberados dos tecidos e podem regular a expressão gênica de células distantes, agindo como um verdadeiro mecanismo de comunicação intercelular (MENDELL; OLSON, 2012). Os c-miRNAs também têm sido descritos como poderosos biomarcadores emergentes e obtidos por meios minimamente invasivos em várias condições fisiológicas e patológicas e definem perfis de doenças específicas (WANG; CHEN; SEN, 2016).

Embora os c-miRNAs tenham sido estudados como biomarcadores de várias doenças, ainda são escassas as informações sobre o seu comportamento nas adaptações fisiológicas impostas pelo exercício agudo e crônico que conduzam a um bom condicionamento físico em pessoas saudáveis. Além de evidenciar mecanismos moleculares envolvidos, novos c-miRNAs podem ser revelados como biomarcadores pela associação às adaptações fisiológicas induzidas pelo exercício agudo e crônico.

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Atividade física e exercício físico

O termo atividade física se refere a qualquer movimento corporal produzido pelos músculos esqueléticos e que resulta em dispêndio de energia e, portanto, pode incluir a atividade física tanto ocupacional quanto das horas de lazer. Em contrapartida, o exercício, considerado uma subclasse de atividade física, é definido como o movimento corporal planejado, estruturado e repetitivo, executado com a finalidade de melhorar ou manter um ou mais componentes da aptidão física (CASPERSEN; POWELL; CHRISTENSON, 1985).

O exercício físico promove melhora na função cardiopulmonar, melhora o desempenho cognitivo e ajuda na prevenção e tratamento de uma variedade de condições de saúde, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes e outros distúrbios do metabolismo, doenças neurológicas, sarcopenia, osteoporose e câncer (BOUCHARD; SHEPHARD; STEPHENS; SUTTON *et al.*, 1990). Além disso, programas de exercícios sob medida são essenciais para otimizar a saúde em pessoas com uma ampla variedade de deficiências (PETERSON; GORDON; HURVITZ; BURANT, 2012).

1.2 Tipos de exercício

O uso do termo "exercício físico" na pesquisa científica muitas vezes abrange variáveis modificáveis. Estas incluem a frequência (agudo ou crônico), a modalidade (aeróbica ou resistida), a intensidade e duração das sessões de exercícios, constituindo fatores que afetam as respostas metabólicas e moleculares (CASPERSEN; POWELL; CHRISTENSON, 1985)

O exercício agudo é caracterizado pela realização de uma sessão isolada de exercícios que gera respostas imediatas e tardias. As respostas imediatas ocorrem até alguns minutos após o término do exercício, como elevação da frequência cardíaca, pressão arterial e temperatura corporal. Já as respostas tardias ocorrem ao longo das primeiras 24 ou 48 horas após o exercício, como o aumento da sensibilidade insulínica (HAWLEY; HARGREAVES; JOYNER; ZIERATH, 2014)

O exercício crônico refere-se à exposição regular de sessões de exercícios que geram adaptações sistêmicas como a bradicardia de repouso, hipertrofia muscular e elevação da potência aeróbia, entre outros, representando as alterações morfofuncionais que diferenciam um indivíduo bem condicionado fisicamente de um mal condicionado (KURA; FLHO, 2011).

As respostas adaptativas alcançadas com os estímulos oferecidos pelo processo de treinamento físico recebem as características do tipo de exercício sistematicamente utilizado nos treinos. Nesse contexto, podem-se caracterizar os exercícios físicos dinâmicos ou estáticos, cada um implicando respostas adaptativas distintas. Desse modo, cada exercício determina o grau de atividade dos vários órgãos, dos diferentes tipos de músculos e unidades motoras utilizadas na execução do movimento(VIRU; VIRU, 1993). O exercício aeróbio (exercícios baseados na resistência) e o exercício resistido (exercícios baseados na força)representam os dois extremos do exercício contínuo(EGAN; ZIERATH, 2013).

O exercício aeróbio utiliza o oxigênio no processo de geração de energia dos músculos. Esse tipo de exercício trabalha uma grande quantidade de grupos musculares de forma rítmica como andar, correr, nadar, pedalar, dançar e são executados com intensidade baixa porém de grande duração. A biogênese mitocondrial é uma resposta bem estabelecida ao treinamento de exercícios aeróbicos e é definida por um aumento no número e volume mitocondrial do músculo, bem como mudanças concomitantes na composição das organelas(HOWALD; HOPPELER; CLAASSEN; MATHIEU *et al.*, 1985).

Após 6 semanas de treinamento físico, a densidade mitocondrial muscular aumenta de 50% a 100% (HOOD, 2001). Melhorias no desempenho proporcionam aumentos na aptidão aeróbia de todo o corpo medida pelo consumo máximo de oxigênio (VO_2max) e refletem melhorias na capacidade oxidativa intrínseca do músculo e utilização de substratos em trabalho muscular subsequentes (PHILLIPS; GREEN; TARNOPOLSKY; HEIGENHAUSER *et al.*, 1996; VOLLAARD; CONSTANTIN-TEODOSIU; FREDRIKSSON; ROOYACKERS *et al.*, 2009).

Especificamente, essas adaptações metabólicas refletem o aumento da abundância de proteínas envolvidas na produção de ATP mitocondrial (HOLLOSZY, 1967),ciclo dos ácidos tricarboxílicos(EGAN; DOWLING; O'CONNOR; HENRY *et al.*, 2011), a mobilização, transporte e oxidação de ácidos graxos (TALANIAN; HOLLOWAY; SNOOK; HEIGENHAUSER *et al.*, 2010), metabolismo glicolítico(TREMBLAY; SIMONEAU; BOUCHARD, 1994), capacidade antioxidante (POWERS; CRISWELL; LAWLER; JI *et al.*, 1994), transporte de glicose e síntese de glicogênio (PERSEGHIN; PRICE; PETERSEN; RODEN *et al.*, 1996).

O exercício resistido é, geralmente, realizado com a utilização de pesos, desenvolvendo a potência, força e resistência muscular, aumentando a massa magra, favorecendo uma melhor aptidão física e qualidade de vida por facilitar atividades do cotidiano como carregar pesos, subir escadas, entre outros. Consequentemente, as respostas metabólicas e moleculares às

diferentes modalidades são distintas ea especificidade de uma dada resposta molecular é acoplada a um resultado funcional(COFFEY; ZHONG; SHIELD; CANNY *et al.*, 2006).

A hipertrofia muscular refere-se a um aumento no tamanho muscular, enquanto a força refere-se à capacidade de mover uma carga externa e está relacionada ao tamanho do músculo (BOOTH; THOMASON, 1991; FOLLAND; WILLIAMS, 2007).Essas adaptações podem apoiar melhorias no desempenho atlético, melhorar a função musculoesquelética relacionada à saúde e compensar a perda de força de músculo em estado patológico (MACALUSO; DE VITO, 2004). As principais adaptações morfológicas incluem aumento na área de secção transversa do músculo, muitas vezes ocorrendo preferencialmente em fibras do tipo IIa(ADAMS; HATHER; BALDWIN; DUDLEY, 1993), mudança no ângulo de penetração das fibras musculares individuais e aumento da proporção de tecido não-contrátil, como colágeno (FOLLAND; WILLIAMS, 2007).

As adaptações neurológicas favorecem o aumento da força muscular por meio de melhorias na ativação da unidade motora, frequência de disparo e sincronia das unidades motoras de alto limiar (SALE, 1988). As adaptações neurais ocorrem rapidamente e tendem a preceder adaptações hipertróficas (MORITANI, 1979), que ocorrem em um ritmo mais lento (WONG; BOOTH, 1990).

1.3 Aptidão física

Em contraste com a atividade física, que está relacionada aos movimentos que as pessoas realizam, a aptidão física é um conjunto de atributos que as pessoas têm ou alcançam. Estar fisicamente apto foi definido como a capacidade de realizar tarefas cotidianas com vigor e agilidade, sem fadiga excessiva e com ampla energia para desfrutar de atividades de lazer e enfrentar emergências imprevistas. Embora a definição possa ser conceitualmente sólida, coisas como vigor, alerta, fadiga e prazer não são facilmente medidos. Por outro lado, vários componentes mensuráveis contribuem para a aptidão física(CASPERSEN; POWELL; CHRISTENSON, 1985).

Os componentes mais frequentemente citados se dividem em dois grupos: um relacionado à saúde e outro relacionado a habilidades que dizem respeito mais à capacidade atlética. Os componentes relacionados à saúde da aptidão física são a resistência cardiorrespiratória, a resistência muscular, a força muscular, a composição corporal e a flexibilidade. Assim como a quantidade de atividade física varia de baixa a alta, o mesmo acontece com o nível de condicionamento físico. Além disso, os níveis dos cinco componentes

relacionados à saúde não precisam variar em conjunto, podendo uma pessoa ser forte, mas sem flexibilidade(PATE, 1983).

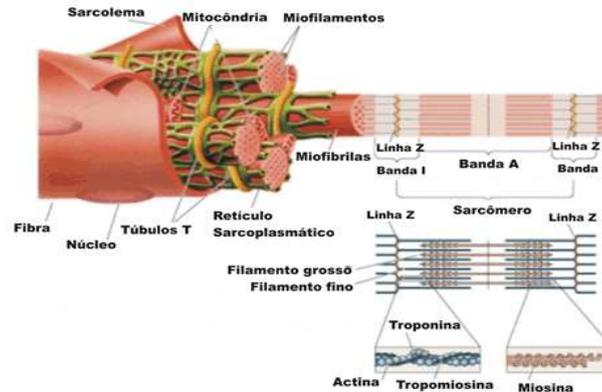
O VO₂max pode ser definido como o maior volume de oxigênio por unidade de tempo que um indivíduo consegue captar, respirando ar atmosférico durante o exercício. É alcançado quando se atingem níveis máximos de débito cardíaco e de extração periférica de oxigênio e não é ultrapassado mesmo com incremento na carga de trabalho muscular(TAYLOR; BUSKIRK; HENSCHERL, 1955).

O VO₂max vem sendo considerado um dos parâmetros de grande importância como preditor de performance, pois a capacidade do ser humano para realizar exercícios de longa e média duração depende principalmente do metabolismo aeróbio sendo, assim, um índice muito empregado para classificar a capacidade funcional cardiorrespiratória(SILVA; ROMANO; JUNIOR; CORDEIRO *et al.*, 1997).

1.4 Exercício Físico e Lesão Muscular

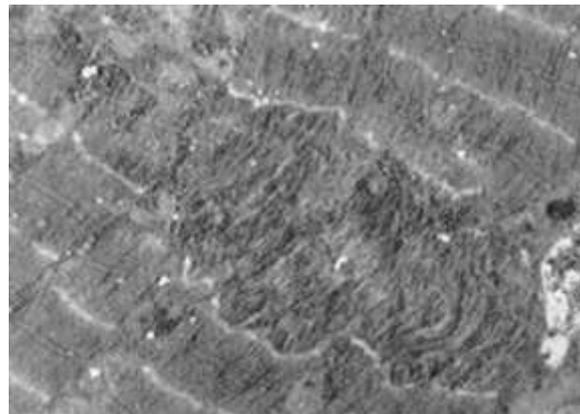
O exercício físico, naturalmente, pode causar microtraumas teciduais adaptativos no músculo esquelético, que resultam em uma resposta inflamatória moderada. Na maioria das vezes, ocorre a recuperação dos traumas como parte do processo de adaptação do treinamento físico (SMITH, 2004). Entretanto, se não houver tempo suficiente entre as sessões para a recuperação (MAYHEW; THYFAULT; KOCH, 2005), ou se a sobrecarga for excessiva, os períodos de exercícios intensos exigem que o mesmo trabalho seja realizado por uma menor quantidade de fibras saudáveis, aumentando a probabilidade de trauma (Figura 1). A continuidade do exercício sem repouso acarretará a laceração de mais fibras, agravando o quadro e retardando a recuperação (CLARKSON; HUBAL, 2002). Assim, indivíduos que realizam sessões mais longas de atividades físicas intensas, estão sujeitos a uma maior incidência de danos musculares, tendo em vista o aumento da sobrecarga imposta ao aparelho locomotor (BULLOCK; JONES; GILCHRIST; MARSHALL, 2010). Essa carga excessiva de exercício pode causar danos no sarcolema, na lâmina basal, nos elementos contrácteis e no citoesqueleto (Koch, 2014), resultando na desestruturação de componentes musculares, como as membranas, a linha Z, o sarcolema, os túbulos T e as miofibrilas (Figura 2).

Figura 1 - Organização da Fibra Muscular. Estrutura e organização da fibra muscular e dos mecanismos contráteis.



Adaptado de <http://magisnef.wordpress.com> (2007).

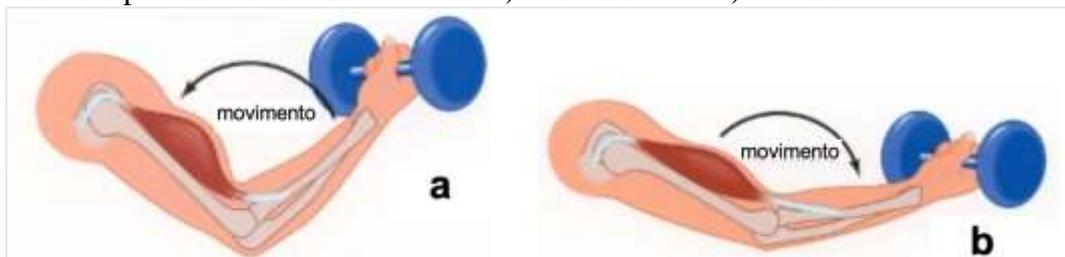
Figura 2 - Dano Muscular. Eletromicrografia ilustrando dano muscular e desestruturação das linhas Z.



Adaptado de Clarkson, 2002.

O dano muscular pode ocorrer em diferentes magnitudes dependendo do tipo de contração. As contrações excêntricas, que ocorrem quando o músculo é alongado enquanto está sob tensão (Figura 3) (LASTAYO; WOOLF; LEWEK; SNYDER-MACKLER *et al.*, 2003), têm sido relacionadas com a ocorrência de traumas (BRANCACCIO; MAFFULLI; BUONAURO; LIMONGELLI, 2008).

Figura 3 -Tipos de contração muscular. As contrações que implicam em movimento articular podem ser classificadas em: a) concêntricas e b) excêntricas.



Adaptada de <http://bodyandmindmb.blogspot.com.br/2012/01/contracao-excentrica-vs-hipertrofia.html>

Durante o exercício físico intenso, em uma fase inicial, é sugerido que o dano muscular seja causado tanto pela força mecânica, que é imposta à musculatura, como pela formação excessiva de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (EROs) (SUMNERS; DYER; FOX; MILEVA *et al.*, 2011). Porém, o exato mecanismo que leva ao dano tecidual não é totalmente compreendido, acredita-se que envolvem aspectos metabólicos, além dos mecânicos, com a contribuição relativa variando de acordo com a duração, intensidade e o tipo de exercício realizado (TEE; BOSCH; LAMBERT, 2007). A segunda fase da ocorrência do dano muscular é caracterizada pela resposta inflamatória a esse quadro, com consequente migração de neutrófilos e macrófagos para o tecido danificado, aumentando o dano do tecido danificado pela liberação de espécies de EROs, que atuam como mensageiros das vias de sinalização intracelular das células inflamatórias, e de óxido nítrico (SUMNERS; DYER; FOX; MILEVA *et al.*, 2011). O fator *kappaB* é um fator central de transcrição, incluindo muitas citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e as interleucinas (IL1, 6, 10 e 2), entre outras (LEITE; SARNI, 2003). Dessas citocinas, as IL-6, 10 e 2 são usadas como marcadores da inflamação derivada de dano muscular ocorrido pela prática de exercício físico intenso, por ser reconhecido que a concentração das mesmas aumenta na circulação, após exercício prolongado. Já a concentração circulante do TNF- α e da IL1 é mantida inalterada ou apresenta incrementos relativamente modestos e retardados após o exercício, apesar de serem consideradas as principais citocinas indutoras das reações na fase aguda (SUZUKI; NAKAJI; YAMADA; TOTSUKA *et al.*, 2002).

1.5 Marcadores de lesão tecidual

A análise da extensão dos danos teciduais pode ser efetuada por meio direto ou indireto. O meio direto é realizado pela análise de amostra do músculo (biópsia) ou de imagens por ressonância magnética ou ultrassom (CLARKSON; HUBAL, 2002). O meio indireto pode ser o registro de valores de ação voluntária máxima, aquisição de respostas subjetivas de dor (através de escalas de percepção) e análise das concentrações de enzimas plasmáticas, proteínas musculares e mioglobina no sangue. Os métodos indiretos adotados para análise do dano muscular são os mais empregados em estudos, em função da facilidade de coleta e, sobretudo, pelo baixo custo quando comparado aos métodos diretos (FOSCHINI; PRESTES; CHARRO, 2007).

A CK, lactato desidrogenase (LDH), aspartatoaminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), são enzimas encontradas, frequentemente, como marcadores de dano

celular, já que são moléculas citoplasmáticas e não têm a capacidade de atravessar a membrana sarcoplasmática. Por esse fato, o aumento da concentração sérica dessas enzimas é utilizado como indicativo de dano na membrana muscular, apesar de também indicar danos em outras estruturas teciduais (SKENDERI; KAVOURAS; ANASTASIOU; YIANNAKOURIS *et al.*, 2006). O aumento da concentração dessas enzimas pode ocorrer tanto após o exercício intenso, como nos valores de repouso após o exercício (BRANCACCIO; MAFFULLI; BUONAURO; LIMONGELLI, 2008). Assim, indivíduos não treinados apresentam valores de repouso menores do que indivíduos treinados, embora se saiba a resposta ao exercício possa ser atenuada pela repetição do exercício, que faz com que um exercício, quando repetido várias vezes, provoque menos danos as fibras do grupamento muscular envolvido do que o exercício inicial (MOUGIOS, 2007).

A CK é uma enzima encontrada em diversos tecidos, mas, principalmente, nas células musculares esqueléticas, cardíacas e no tecido cerebral, cuja função é tamponar as concentrações de adenosina trifosfato (ATP) e adenosina difosfato (ADP), catalisando a troca reversível de ligações de fosfato de alta energia entre a fosfocreatina e o ADP produzido durante a contração, estando, assim, associada com a formação de ATP nos sistemas contráteis e de transporte (BRANCACCIO; MAFFULLI; BUONAURO; LIMONGELLI, 2008).

A CK é uma enzima chave que controla a energia celular, com várias isoenzimas, que são compartimentadas especificamente nos compartimentos onde a energia é produzida ou utilizada (WALLIMANN; WYSS; BRDICZKA; NICOLAY *et al.*, 1992). Existem pelo menos cinco isoformas de CK, destas, três são citoplasmáticas, compostas pela união de duas subunidades do tipo B e/ou M, em três isoformas possíveis no citoplasma: as isoenzimas CK-BB, CK-MB e CK-MM. Duas isoenzimas são mitocondriais, conhecidas como Macro CK pelo seu grande tamanho molecular, sendo produzidas pela polimerização da CK-MM e da CK-BB com imunoglobulina G (BRANCACCIO; MAFFULLI; BUONAURO; LIMONGELLI, 2008).

A concentração sérica dessas isoenzimas fornecem informações específicas do tecido lesionado, tendo em vista a distribuição das mesmas nos diversos tecidos. A CK-MM é encontrada em diversos domínios da fibra muscular, onde o consumo de ATP é alto, sendo um marcador de desordem muscular, enquanto a CK-MB está relacionada ao infarto do miocárdio e a CK-BB a danos cerebrais (BRANCACCIO; MAFFULLI; BUONAURO; LIMONGELLI, 2008).

A concentração de CK no sangue tem sido proposta como um dos melhores indicadores indiretos de danos musculares devido à sua fácil identificação e ao custo relativamente baixo dos ensaios para quantificá-la, sendo usada não só como marcadora de lesão, mas, também,

como um indicador da intensidade do treinamento e como marcador de “overtraining”. No entanto, alguns problemas dificultam o uso da CK com este propósito, pois há uma grande variabilidade interindivíduos, dificultando a atribuição de valores de referência confiáveis para pessoas que realizam atividade física intensa (KOCH; PEREIRA; MACHADO, 2014).

O pico da concentração sérica de CK ocorre de um a quatro dias após o exercício (MOUGIOS, 2007). A concentração de CK está relacionada à massa corporal e a atividade física (intensidade e duração), com valores de repouso superiores para atletas, tendo em vista o treinamento regular a que são submetidos. Entretanto, após a realização de exercício, valores maiores são alcançados por pessoas destreinadas, demonstrando um comportamento adaptativo dos músculos treinados (BANFI; COLOMBINI; LOMBARDI; LUBKOWSKA, 2012). Embora os valores para os limites de referência para não atletas sejam discrepantes, tendo em vista o diferente nível de atividade física dos participantes dos estudos (MOUGIOS, 2007), vem sendo aceito o valor aproximado de 200 U/L como o limite superior de normalidade para a concentração de CK e valores acima de 10.000 U/L como diagnóstico de rabdomiólise (CLARKSON; HUBAL, 2002). Para atletas, o limite superior da normalidade parece variar de acordo com a modalidade esportiva, sendo propostos valores aproximados de 1300 U/L para jogadores de futebol (LAZARIM; ANTUNES-NETO; DA SILVA; NUNES *et al.*, 2009) e de 1083 U/L para atletas de diferentes modalidades (MOUGIOS, 2007). Da mesma forma, militares atingem, constantemente, durante seu treinamento, concentrações de CK mais que dez vezes acima dos limites superiores de normalidade, devendo-se considerar valores até 50 vezes acima do limite de normalidade como limites superiores para esta população (KENNEY; LANDAU; GONZALEZ; HUNDERTMARK *et al.*, 2012).

1.6 Adaptações fisiológicas ao exercício físico agudo e crônico

O músculo esquelético é um tecido maleável capaz de alterar o tipo e quantidade de proteína em resposta às perturbações na homeostase celular. O complexo processo de adaptação induzida pelo exercício envolve mecanismos de sinalização específicos (IZQUIERDO; IBÁÑEZ; HÄKKINEN; KRAEMER *et al.*, 2004). Para converter um sinal mecânico, como o gerado pela contração muscular, em um evento molecular, há regulação de mensageiros primários e secundários, os quais iniciam cascatas de ativação ou repressão de vias de sinalização de síntese ou degradação proteica e de controle da expressão gênica (WILLIAMS; NEUFER, 1996). As consequências funcionais dessas adaptações são determinadas pelo volume de treinamento, intensidade e frequência. Além disso, muitas características da adaptação ao

treinamento são específicas para o tipo de estímulo (IZQUIERDO; IBÁÑEZ; HÄKKINEN; KRAEMER *et al.*, 2004; MAHONEY; PARISE; MELOV; SAFDAR *et al.*, 2005).

A contração muscular gera aumentos transitórios na quantidade total de RNA mensageiro (RNAm) entre 3 a 12 horas após o exercício e retorna aos níveis basais dentro de 24 horas (BICKEL; SLADE; MAHONEY; HADDAD *et al.*, 2005; PILEGAARD; ORDWAY; SALTIN; NEUFER, 2000; YANG; CREER; JEMIOLO; TRAPPE, 2005). Consequentemente, a adaptação ao treinamento físico provavelmente se deve aos efeitos cumulativos de cada sessão de exercícios, levando a uma mudança no nível de proteínas específicas e a um novo limiar funcional (MAHONEY; PARISE; MELOV; SAFDAR *et al.*, 2005).

Vias de sinalização específicas regulam os mecanorreceptores e conectam os eventos neurais, mecânicos e bioquímicos. Existem numerosos mensageiros envolvidos, incluindo o estiramento mecânico, fluxo de cálcio, estado redox e estado de fosforilação (COFFEY; HAWLEY, 2007). Os estímulos mecânicos modulam a função celular e afetam diretamente a forma e a função do tecido (ALENGHAT; INGBER, 2002). A perturbação mecânica do músculo esquelético promove a ativação da calcineurina, de proteína quinases ativada por mitógenos (MAPK) e do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) (KUMAR; CHAUDHRY; REID; BORIEK, 2002).

A rápida e diferenciada conversão mecanoquímica induzida por modelos distintos de estresse mecânico sugere a existência de especificidade de transdução mecânica na realização do exercício agudo (HORNBERGER; ARMSTRONG; KOH; BURKHOLDER *et al.*, 2005).

O exercício prolongado de intensidade moderada (60–70% do $VO_2\text{max}$) aumenta a captação de cálcio no retículo sarcoplasmático e o número de bombas ativas que recolhem o cálcio (SCHERTZER; GREEN; FOWLES; DUHAMEL *et al.*, 2004). Em contraste, uma única sessão de exercício de alta intensidade (> 100% $VO_2\text{max}$) ou fatigante gera uma redução transitória de 20–50% na captação e liberação de cálcio, retornando aos níveis basais após 60 minutos de recuperação (MATSUNAGA; INASHIMA; TSUCHIMOCHI; YAMADA *et al.*, 2002).

Estas alterações agudas na concentração de cálcio citosólico também podem desencadear eventos secundários após um retorno aos valores basais. Episódios repetidos de exercício induzem uma resposta adaptativa, resultando em uma menor perturbação na liberação e captação de cálcio e, posteriormente, melhora na resistência à fadiga (HOLLOWAY; GREEN; DUHAMEL; FERTH *et al.*, 2005).

Em conjunto, esses achados sugerem que a amplitude e a duração do fluxo de cálcio são reguladas pela duração e frequência do estímulo contrátil. É plausível sugerir que o cálcio

citossólico transiente também pode determinar os eventos subsequentes, como a expressão gênica e a síntese de proteínas (CHIN, 2005). Portanto, o cálcio é um regulador importante na especificidade dos eventos adaptativos induzidos pelo exercício, e seus efeitos provavelmente são alterados pelo modo, intensidade e volume do exercício.

1.7 Processo de reparação induzido pelo exercício físico

O exercício físico induz a um processo inflamatório, o qual ocorre para promover o reparo e remodelamento tecidual após o trauma. A ativação do processo inflamatório é local e sistêmica e regulada por fatores pró e anti-inflamatórios. A inflamação é considerada um processo altamente benéfico e necessário quando relacionada ao treinamento físico regular e sistematizado, com o tempo de descanso necessário para a recuperação, uma vez que em conjunto com a ação de hormônios e outras moléculas sinalizadoras, é responsável pela regeneração e reparo das estruturas danificadas (ZALDIVAR; WANG-RODRIGUEZ; NEMET; SCHWINDT *et al.*, 2006).

O exercício físico provoca microtraumas de graus variados no tecido muscular, tecido esquelético, tecido conjuntivo e tecido ósseo. Esses microtraumas são considerados como danos temporários e reparáveis pois resultam em uma resposta inflamatória aguda, orquestrada, dentre outros, por neutrófilos e macrófagos, cuja função é a limpeza, reparo e desenvolvimento dos tecidos previamente danificados (SMITH, 2000). Os microtraumas no tecido muscular são dependentes da intensidade do esforço e incluem ruptura da matriz extracelular, lâmina basal e do sarcolema. Podem resultar na liberação para a corrente sanguínea de proteínas intracelulares como a mioglobina, LDH, ALT, AST e CK (LAZARIM; ANTUNES-NETO; DA SILVA; NUNES *et al.*, 2009).

O processo adaptativo envolve a ativação de vias de sinalização intracelulares e subsequente ativação gênica que pode resultar em alterações na massa muscular, nas propriedades contráteis e nas respostas metabólicas (BASSEL-DUBY; OLSON, 2006). Essa sinalização proteica é dependente da especificidade dos exercícios empregados, e se reflete no aumento de rendimento em capacidades biomotoras diversas (TOIGO; BOUTELLIER, 2006).

O mecanismo de reparo do dano pode ser dividido basicamente em três fases: uma fase degenerativa seguida de uma fase regenerativa e uma terceira fase de remodelamento do tecido danificado (SMITH, 2004). Constitui um quadro complexo, no qual as células inflamatórias promovem tanto dano quanto regeneração. Isso é feito por meio da ação combinada de EROs, antioxidantes enzimáticos, fatores de crescimento, hormônios e citocinas, que mantêm um

equilíbrio entre atividades pró e antioxidantes e pró e anti-inflamatórias (GLEESON, 2007; TIDBALL, 2005).

As citocinas são as responsáveis pela comunicação intercelular, interórgãos e intersistemas, permitindo que diferentes sistemas orgânicos sejam informados do trauma em um tecido específico. Viabilizam o influxo de neutrófilos, monócitos, linfócitos e outras células que participam da limpeza e regeneração tissular, sinalizando indiretamente o aumento na permeabilidade dos vasos sanguíneos e, conseqüentemente, um incremento na transição de fluidos e proteínas entre os espaços intra e extracelular (MOLDOVEANU; SHEPHARD; SHEK, 2001).

A interleucina 6 (IL-6) vem sendo considerada na literatura como o principal agente regulador da resposta de fase aguda no exercício físico. Essa citocina é produzida em concentrações mais elevadas pelo tecido muscular estriado esquelético, por leucócitos e células endoteliais, via sinalização de citocinas pró-inflamatórias e de EROs, sendo sua secreção relacionada à intensidade, duração e quantidade de massa muscular envolvida no exercício físico (PETERSEN; PEDERSEN, 2005).

As ações anti-inflamatórias da IL-6 são diversificadas, incluindo efeitos inibitórios sobre a produção e secreção, principalmente, de TNF- α , estímulo da síntese das citocinas anti-inflamatórias como o receptor antagonista de IL-1 (IL-1ra) e Interleucina 10 (IL-10), além do estímulo à liberação de receptores solúveis para TNF- α (PETERSEN; PEDERSEN, 2005).

Também atua a glicogenólise hepática e a lipólise no tecido adiposo, via ativação da proteína quinase dependente de AMP (AMPK). O aumento da taxa de oxidação dos ácidos graxos é importante para fornecer energia para os processos de reparo e síntese tecidual (PETERSEN; PEDERSEN, 2005). A IL-6 regula também, a migração das células satélites, a fim de promover a hipertrofia do tecido muscular (SERRANO; BAEZARAJA; PERDIGUERO; JARDÍ *et al.*, 2008). Por fim, a IL-6, em conjunto com outras citocinas, parece dirigir o padrão da resposta inflamatória para uma maior produção de anticorpos e uma acentuada ativação dos eosinófilos (GLEESON, 2006).

Muitos autores utilizaram marcadores de inflamação tais como citocinas, leucócitos, moléculas de adesão celular, cortisol, concentração sérica da CK no contexto da resposta aguda e adaptação crônica ao exercício físico. Estudos têm mostrado que o exercício físico agudo está relacionado a leucocitose transitória, seguida de supressão parcial da imunidade celular e pela redução do número e/ou função dos linfócitos.

Também têm sido mostrados aumentos significativos nas concentrações séricas da CK, proteína C reativa (PCR), moléculas de adesão celular e na concentração de citocinas pró e

anti-inflamatórias (MOOREN; BLOMING; LECHTERMANN; LERCH *et al.*, 2002; NIEMAN; HENSON; SMITH; UTTER *et al.*, 2001; VIRU; VIRU; KARELSON; JANSON *et al.*, 2007). Os estudos que mensuraram os efeitos crônicos do exercício físico sobre marcadores inflamatórios são menos comuns e os resultados apontam, como efeito crônico, uma diminuição do quadro pró inflamatório local e sistêmico (KASAPIS; THOMPSON, 2005).

1.8 miRNAs: conceitos, biogênese e função

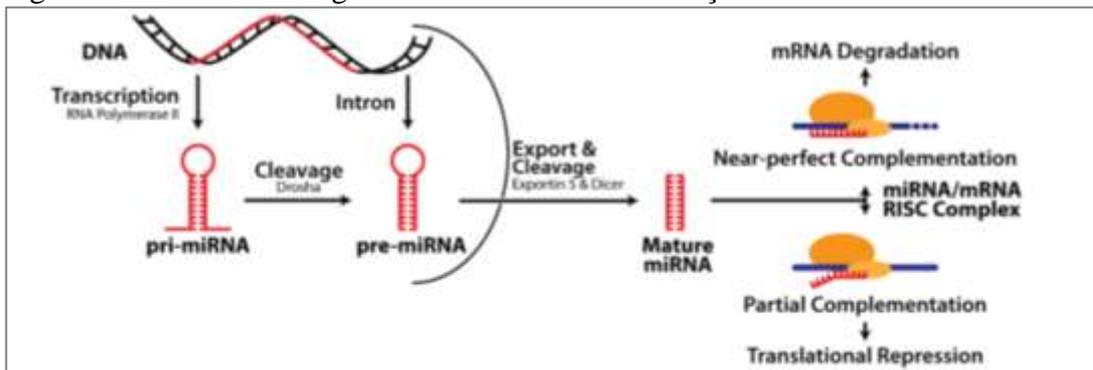
O Lin4 (do inglês lineage-deficient-4) foi o primeiro miRNA observado em 1993, sendo nesta época associado ao controle temporal do desenvolvimento larval em *Caenorhabditis elegans* (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993). Os miRNAs são definidos como pequenas moléculas de RNA de fita simples com aproximadamente 22 nucleotídeos não codificantes de proteínas, que agem como potentes reguladores pós-transcricionais da expressão gênica (KIM, 2005). Os miRNAs podem estar localizados em regiões intergênicas do genoma, em íntrons e também em éxons, tanto de genes codificadores para proteína quanto de genes não codificadores (OLENA; PATTON, 2010).

O crescente interesse pelos miRNAs fez com que aumentasse o número de descobertas ao longo dos anos. Em 2005, havia 465 miRNAs descritos em humanos (BEREZIKOV; GURYEV, 2005), em 2008 esse número aumentou 114%. A versão mais recente do banco de dados miRBase (v22) aponta para 38.589 entradas representando precursores de miRNAs em diferentes organismos. As estimativas são criadas através de vários algoritmos de predição de alvos de miRNA (CHAUDHURI; CHATTERJEE, 2007).

O início do processo de biogênese dos miRNAs ocorre com a transcrição destes no núcleo celular, sendo que a maioria é transcrito pela RNA Polimerase II. Os primeiros miRNAs são denominados de primários (pri-miRNAs) e serão processados dentro do núcleo pela Drosha (ribonuclease III) (LEE; JEON; LEE; KIM *et al.*, 2002), juntamente com a proteína de ligação Pasha (DGCR8) (HAN; LEE; YEOM; KIM *et al.*, 2004). O produto dessa clivagem gera uma molécula menor precursora denominada de pre-miRNA, que é transportada para o citoplasma via mecanismo dependente de exportina-5 e Ran-GTP (LUND, 2004). Em seguida, os pre-miRNAs são clivados por outra RNase III chamada Dicer, para formar o miRNA maduro, de fita dupla (miRNA:miRNA), no qual uma das suas fitas será incorporada em um complexo de ribonucleoproteína, complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), o qual contém a proteína argonauta como um dos principais componentes.

Nessa fase do processamento, uma fita do miRNA será transformada em miRNA maduro e a outra degradada (GREGORY; CHENDRIMADA; COOCH; SHIEKHATTAR, 2005) e como parte do complexo RISC os miRNAs irão interagir com seus RNAm alvos (YI, 2003). A abundância dos miRNAs pode ser controlada na transcrição do pri-miRNA, durante qualquer passo da biogênese e no turnover do miRNA maduro. O miRNA maduro se associa ao RISC e o complexo miRNA/RISC reprime a síntese de proteínas pela degradação de RNAs mensageiros (RNAm) quando há alta complementaridade com o miRNA ou pode inibir a tradução do RNAm quando a complementaridade é menor (SCHWARZ; GRANDE; BUJDOSO; SAEDLER *et al.*, 2008). A Figura 4 resume a biogênese e os mecanismos de ação dos miRNAs mais comuns.

Figura 4 - Resumo da biogênese e os mecanismos de ação dos miRNAs



Fonte: RYAN; JOILIN; WILLIAMS, 2015)

Os mecanismos de ação dos miRNAs são específicos. Como reguladores pós-transcricionais exercem seus efeitos ligando-se à região 3' não traduzida de RNAm alvos, promovendo a redução da expressão proteica através do controle traducional (KIM, 2005). Como dito anteriormente, esse mecanismo de ligação depende do grau de complementaridade com o RNAm-alvo, podendo gerar inibição traducional (complementaridade parcial) ou degradação do RNAm (complementaridade total). Outros mecanismos de ação possíveis dos miRNAs são, deadenilação, degradação e captura dos RNAm nos P-bodies (corpos de processamento citoplasmáticos) (FAZI; NERVI, 2008). O mecanismo de ação via P-bodies ocorre da seguinte forma: um miRNA ligado a uma proteína argonauta reconhece seus RNAm alvos por pareamento de bases; a proteína argonauta, localizada nos P-bodies, vai interagir com o GW182, depois o complexo RNAm-miRNA-Argonauta é encaminhado aos P-bodies. No P-body, o RNAm alvo é deadenilado pelas enzimas deadenilases presentes, então degradado ou até mesmo removido da maquinaria traducional (PILLAI; BHATTACHARYYA; ARTUS; ZOLLER *et al.*, 2005).

A partir de seu modo de ação, foi observado que um único miRNA é capaz de regular 200 RNAm apresentando funções totalmente diversas, ou seja, os miRNAs constituem uma enorme e complexa rede regulatória da sinalização celular. Em animais, a maioria dos miRNAs liga-se na região 3'-UTR do mRNA-alvo com complementaridade imperfeita funcionando como repressor traducional. Como essa classe de RNAs possui sequências pequenas, um único miRNA pode regular diversos RNAm-alvo e vários miRNAs podem atuar num mesmo RNAm-alvo (BARTEL, 2004). A partir das análises de predição, os miRNAs têm sido associados à regulação de diversos mecanismos e funcionamento muscular cardíaco e esquelético (CHEN; LODISH, 2005). Adicionalmente, análises de bioinformática de dados de microarray de miRNAs têm identificado miRNAs que são altamente expressos em tecidos específicos, como, fígado, cérebro, hipófise, pâncreas, testículos, músculo estriado esquelético (SOOD; KREK; ZAVOLAN; MACINO *et al.*, 2006), cardíaco (VAN ROOIJ; MARSHALL; OLSON, 2008) e na circulação (MITCHELL; PARKIN; KROH; FRITZ *et al.*, 2008).

1.9 miRNAs circulantes

Na última década, a descoberta da ocorrência de miRNAs no plasma, soro e plaquetas (c-miRNAs) levou a investigações sobre mudanças no padrão de expressão, na tentativa de relacioná-las a várias condições fisiológicas e patológicas (TURCHINOVICH; WEIZ; LANGHEINZ; BURWINKEL, 2011). Tem sido observado que os c-miRNAs são bastante estáveis em diversas situações como, variações no pH, ebulição, congelamento e descongelamento e armazenamento a longo prazo à temperatura ambiente, tornando-os apropriados para utilização como biomarcadores no sangue (CHEN; BA; MA; CAI *et al.*, 2008; WEBER; BAXTER; ZHANG; HUANG *et al.*, 2010).

Os mecanismos que mantêm a estabilidade dos c-miRNAs têm sido estudados. Algumas teorias foram descritas para explicar o transporte e a estabilidade dos c-miRNAs, entre elas a teoria que os c-miRNAs são protegidos por encapsulamento em vesículas de membrana, devido esses c-miRNAs terem sido detectados em microvesículas de sangue periférico (XU; LIU; YAO; DAI *et al.*, 2015).

Os c-miRNAs atuam como moléculas de sinalização, pois em algumas espécies eles são secretados na circulação e atuam em locais distantes para regular a expressão gênica, embora ainda não se saiba como esses c-miRNAs são liberados na corrente sanguínea e quais condições regulam esse processo (MORI, 2018; THOMOU; MORI; DREYFUSS; KONISHI *et al.*, 2017; VALADI; EKSTRÖM; BOSSIOS; SJÖSTRAND *et al.*, 2007). Estudos sugerem que os c-

miRNAs estão envolvidos na comunicação celular, indicando que, assim como os hormônios e as citocinas, poderiam atuar como mediadores da expressão gênica nas células alvo (SHAH; CALIN, 2013; THOMOU; MORI; DREYFUSS; KONISHI *et al.*, 2017).

Para a detecção e quantificação de perfis de expressão de c-miRNA em fluidos corporais, várias abordagens estão disponíveis, tais como *microarrays*, métodos de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) e sequenciamento (DE PLANELL-SAGUER; RODICIO, 2013). Os mais utilizados são os métodos de *microarrays* e qPCR. O primeiro possibilita a realização de triagem de alto rendimento e são geralmente usados para a descoberta e identificação de c-miRNAbiomarcadores. Por outro lado, aqPCR oferece a vantagem de alta especificidade e sensibilidade e é considerada como o padrão ouro para a detecção de c-miRNA em laboratórios clínicos, sendo de fácil acesso e rotineiramente processados na avaliação médica (CHEN; BA; MA; CAI *et al.*, 2008). A Tabela 1 resume a expressão de c-miRNAs de acordo com a rota metabólica.

Tabela 1- c-miRNAs agrupados de acordo com a função biológica a que estão envolvidos

Rota metabólica	Referências	c-miRNAs
Função muscular e cardíaca	Baggishet <i>al.</i>	miR-21, miR-133a
	Aoi <i>et al.</i>	miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-208b, miR-486, miR-499
	Uhlemanet <i>al.</i>	miR-133
	Moorenet <i>al.</i>	miR-1, miR-133a, miR-206, miR-208b, miR-499
	Baggishet <i>al.</i>	miR-1, miR-133a, miR-499-5p, miR-208a
	Gomes <i>et al.</i>	miR-1, miR-133a, miR-206
	Clausset <i>al.</i>	miR-1, miR-26a, miR-29b, miR-30a, miR-133a
	Banzetet <i>al.</i>	miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-208a, miR-208b, miR-499
	Cui <i>et al.</i>	miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-499
	Resposta inflamatória	Baggishet <i>al.</i>
Moorenet <i>al.</i>		miR-155, miR-21
Baggishet <i>al.</i>		miR-146a
Gonzalo-Calvo <i>et al.</i>		miR-106
Lesão endotelial	Uhlemanet <i>al.</i>	miR-126
	Baggishet <i>al.</i>	miR-126
Angiogenese	Baggishet <i>al.</i>	miR-20a, miR-221, miR-222, miR-210, miR-328
Hipoxia	Baggishet <i>al.</i>	miR-21, miR-210, miR-146a
Tecido cerebral	Baggishet <i>al.</i>	miR-134
Proliferação celular	Cui <i>et al.</i>	miR-16, miR-122

1.10 c-miRNAs e exercício físico

Osc-miRNAs foram descritos como reguladores de ajuste fino de muitos processos biológicos, tanto na saúde, incluindo o exercício físico, como na doença. Exercícios agudos ou

crônicos alteram o perfil de miRNA sem músculo esquelético, cardíaco, hepático e no sistema imune (DAVIDSEN; GALLAGHER; HARTMAN; TARNOPOLSKY *et al.*, 2011). Estudos anteriores destacaram o papel dos miRNAs na adaptação induzida pelo exercício, incluindo a hipertrofia do músculo esquelético, remodelação e metabolismo (DRUMMOND; MCCARTHY; FRY; ESSER *et al.*, 2008a), a angiogênese (LI; ZHANG; LIU; DAI *et al.*, 2013) e alterações estruturais cardíacas (DUISTERS; TIJSEN; SCHROEN; LEENDERS *et al.*, 2009a). Os miRNAs no músculo esquelético, modulam processos de proliferação, diferenciação e regeneração em células musculares adultas (CALLIS; DENG; CHEN; WANG, 2008; KIM; LEE; SIVAPRASAD; MALHOTRA *et al.*, 2006) e os miR-1, -133a, -133b e -206, em conjunto, respondem por quase 25% de toda expressão dos miRNAs no músculo esquelético e são referidos como myomiRs (MCCARTHY; ESSER, 2007b).

O efeito do exercício sobre o perfil sérico dos c-miRNAs foi citado por vários autores (BAGGISH; HALE; WEINER; LEWIS *et al.*, 2011; MOOREN; VIREECK; KRÜGER; THUM, 2014; NIELSEN; ÅKERSTRÖM; RINNOV; YFANTI *et al.*, 2014). Estudos com modelos experimentais aparentemente similares não conseguiram encontrar os mesmos comportamentos de c-miRNAs específicos. Assim, enquanto Mooren *et al.* (MOOREN; VIREECK; KRÜGER; THUM, 2013), Baggish *et al.* (BAGGISH; HALE; WEINER; LEWIS *et al.*, 2011) e Clauss *et al.* (CLAUSS; WAKILI; HILDEBRAND; KÄÄB *et al.*, 2016) observaram aumento na expressão dos c-miR-1 e c-miR-133a, Gonzalo-Calvo *et al.* (DE GONZALO-CALVO; DÁVALOS; MONTERO; GARCÍA-GONZÁLEZ *et al.*, 2015) não descreveram alterações nesses c-miRNAs imediatamente após uma maratona. Da mesma forma, não foram observadas concordâncias no padrão de expressão de c-miRNAs após um período de treinamento com um cicloergômetro (AOI; ICHIKAWA; MUNE; TANIMURA *et al.*, 2013; LEE; FRAGALA; KAVOURAS; QUEEN *et al.*, 2017; NIELSEN; ÅKERSTRÖM; RINNOV; YFANTI *et al.*, 2014). Por outro lado, mudanças semelhantes para os mesmos c-miRNAs foram observadas em resposta a exercícios de naturezas muito diferentes. Por exemplo, os aumentos em c-miR-133a e -133b foram observados 2 e 6h após corrida em declive (BANZET; CHENNAOUI; GIRARD; RACINAIS *et al.*, 2013), imediatamente após um teste de sprint no ciclismo (CUI; LI; NIU; ZHANG *et al.*, 2015) ou imediatamente após uma maratona e após exercícios resistidos agudos como *pull-down*, *leg press* e *butterfly* (UHLEMANN; MÖBIUS-WINKLER; FIKENZER; ADAM *et al.*, 2014).

O papel dos c-miRNAs na adaptação induzida pelo exercício vem sendo investigado, incluindo hipertrofia, remodelação e metabolismo do músculo esquelético (DRUMMOND; MCCARTHY; FRY; ESSER *et al.*, 2008b; SAFDAR; ABADI; AKHTAR; HETTINGA *et al.*,

2009), angiogênese(LI; ZHANG; LIU; DAI *et al.*, 2013)e alterações estruturais cardíacas (DUISTERS; TIJSEN; SCHROEN; LEENDERS *et al.*, 2009b). A associação recíproca entre inflamação e miRNAs foi relatada em investigações *in vitro* e *in vivo* demonstraram que os estímulos inflamatórios ativam a biogênese de miRNAs(TILI; MICHAILLE; CIMINO; COSTINEAN *et al.*, 2007). Dada a sua natureza dinâmica, os miRNAs têm sido propostos na regulação e otimização da resposta inflamatória e na manutenção da homeostase (LIU; ABRAHAM, 2013). As vias celulares alteradas por miRNAs relacionados à inflamação variam desde a síntese de citocinas até a ativação de leucócitos (O'CONNELL; RAO; BALTIMORE, 2012).

Perfis alterados de c-miRNAs foram relatados após ambos exercícios agudos e crônicos (BAGGISH; HALE; WEINER; LEWIS *et al.*, 2011; SAWADA; KON; WADA; USHIDA *et al.*, 2013) e a maioria dos estudos analisaram c-miRNAs previamente descritos como mediadores de processos fisiológicos ligados às adaptações do exercício no músculo esquelético, coração ou vasculatura(AOI; ICHIKAWA; MUNE; TANIMURA *et al.*, 2013; BAGGISH; HALE; WEINER; LEWIS *et al.*, 2011; BAGGISH; PARK; MIN; ISAACS *et al.*, 2014; BANZET; CHENNAOUI; GIRARD; RACINAIS *et al.*, 2013; GOMES; OLIVEIRA-JR; MADRID; ALMEIDA *et al.*, 2014; MOOREN; VIREECK; KRÜGER; THUM, 2014; UHLEMANN; MÖBIUS-WINKLER; FIKENZER; ADAM *et al.*, 2014).

Dada a importância fisiológica da resposta inflamatória induzida pelo exercício na adaptação à saúde e treinamento, o papel dos c-miRNAs como comunicadores intercelulares, reguladores das respostas fisiológicas e seu potencial como biomarcadores estão sendo investigados e os c-miRNAs relacionados à inflamação são chamados de c-inflammamiRs. Os c-miR-21, -146 e -223 foram relatados em estudos relacionados à inflamação induzida pelo exercício físico (AOI; ICHIKAWA; MUNE; TANIMURA *et al.*, 2013; BAGGISH; HALE; WEINER; LEWIS *et al.*, 2011; BAGGISH; PARK; MIN; ISAACS *et al.*, 2014; BANZET; CHENNAOUI; GIRARD; RACINAIS *et al.*, 2013; GOMES; OLIVEIRA-JR; MADRID; ALMEIDA *et al.*, 2014; MOOREN; VIREECK; KRÜGER; THUM, 2014; SAWADA; KON; WADA; USHIDA *et al.*, 2013; UHLEMANN; MÖBIUS-WINKLER; FIKENZER; ADAM *et al.*, 2014).

A estreita associação entre inflamação e exercício físico tem consequências importantes para as adaptações de treinamento e saúde. No entanto, informações limitadas estão disponíveis sobre a regulação de c-inflammamiRs, tanto em doenças como durante o exercício físico. Os poucos estudos que avaliaram a expressão de c-inflammamiRs em resposta ao exercício produziram resultados divergentes(AOI; ICHIKAWA; MUNE; TANIMURA *et al.*, 2013;

BAGGISH; HALE; WEINER; LEWIS *et al.*, 2011; BAGGISH; PARK; MIN; ISAACS *et al.*, 2014; BANZET; CHENNAOUI; GIRARD; RACINAIS *et al.*, 2013; GOMES; OLIVEIRA-JR; MADRID; ALMEIDA *et al.*, 2014; MOOREN; VIERECK; KRÜGER; THUM, 2014; UHLEMANN; MÖBIUS-WINKLER; FIKENZER; ADAM *et al.*, 2014).

Nielsen et al. relataram um aumento nos níveis circulantes de miR-223, 1 hora após a realização de exercício resistido agudo. No entanto, esses autores também relataram uma diminuição dos níveis circulantes dos miRNAs inflamatórios let-7i, c-miR-146, -148a e -221 imediatamente após o mesmo exercício (NIELSEN; ÅKERSTRÖM; RINNOV; YFANTI *et al.*, 2014). Além disso, a conclusão de uma maratona resultou em um aumento nos níveis circulantes do c-inflammiR 146a (BAGGISH; PARK; MIN; ISAACS *et al.*, 2014; UHLEMANN; MÖBIUS-WINKLER; FIKENZER; ADAM *et al.*, 2014).

Vários fatores podem influenciarem as discrepâncias entre estudos, incluindo a intensidade, o tipo e a duração do exercício, o desenho experimental, diferenças na idade e origens genéticas e ambientais dos participantes (MAKAROVA; MALTSEVA; GALATENKO; ABBASI *et al.*, 2014). De fato, o aumento observado nos níveis de c-miR-21 e -221 induzidos por exercícios exaustivos é atenuado após um período de treinamento físico em atletas competitivos, sugerindo um aumento dos c-inflammiRs em participantes mais ativos (BAGGISH; HALE; WEINER; LEWIS *et al.*, 2011).

Além disso, de Gonzalo-Calvo et al. (2015) relataram que diferentes doses de exercício aeróbio agudo induziram respostas distintas e específicas dos c-inflammiRs, que podem estar associadas ao controle da cascata inflamatória induzida pelo exercício. Esses resultados apontam os c-inflammiRs como potenciais biomarcadores de inflamação induzida por exercício (DE GONZALO-CALVO; DÁVALOS; MONTERO; GARCÍA-GONZÁLEZ *et al.*, 2015).

2 JUSTIFICATIVA

Os exercícios físicos conduzidos de forma aguda ou crônica induzem a adaptações no metabolismo consideradas como primordiais para a manutenção ou conquista do condicionamento físico. Ainda não estão completamente esclarecidos os mecanismos que podem conduzir as concentrações séricas de biomarcadores específicos e frequentemente empregados. Entre as diferentes formas de elucidar as alterações induzidas pelo exercício estão os miRNAs.

Os miRNAs destacam-se como importantes reguladores da expressão gênica em diversas condições fisiológicas. A identificação de um padrão de expressão destas moléculas é de extrema importância no entendimento dos mecanismos biológicos que levam às adaptações benéficas ligadas ao exercício físico.

Estudos disponíveis até o momento, apontam que tanto o exercício agudo quanto o crônico alteram os perfis dos c-miRNAs de sujeitos saudáveis. No entanto, há muita controvérsia em função das diferentes características dos grupos estudados que influenciam diretamente os resultados obtidos, entre eles o condicionamento físico, tipo (agudo, crônico, aeróbio, anaeróbio), intensidade, duração do exercício físico, e tempo de repouso para iniciar a coleta de dados.

O entendimento da expressão coordenada de c-miRNAs músculo-específicos poderá, futuramente, fornecer informações sobre os mecanismos envolvidos, otimizar estratégias de treinamento e ajudar o monitoramento e controle dos efeitos sobre a saúde, podendo consolidá-los como biomarcadores relacionados a um estado fisiológico ou patológico, tanto na ciência do esporte como da saúde.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Determinar as variações da expressão de miRNAs circulantes em homens condicionados e não condicionados fisicamente e biomarcadores bioquímicos e fisiológicos relacionados à lesão tecidual e ao processo inflamatório, após a realização de exercício físico agudo e crônico.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a influência do exercício físico agudo/crônico sobre indicadores bioquímicos de lesão tecidual e processo inflamatório em indivíduos condicionados e não condicionados.
- Avaliar as alterações nos padrões de expressão de c-miRNAs em decorrência da mudança do condicionamento físico de homens adultos saudáveis.
- Comparar a expressão de c-miRNAs, antes e após a realização de exercício físico agudo e crônico, em indivíduos com diferentes níveis de condicionamento físico.
- Correlacionar a expressão de miRNAs circulantes com as demais variáveis estudadas.

4 MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os métodos, resultados e discussão serão apresentadas no formato de artigo (Artigo 1 e Artigo 2).

O Artigo 1 refere-se à avaliação da influência do exercício resistido agudo sobre as respostas imediatas da expressão de c-miRNAs específicos e sua relação com biomarcadores bioquímicos de lesão muscular e processo inflamatório em homens saudáveis com diferente condicionamento físico. Os participantes do estudo foram submetidos a uma sessão isolada de exercício resistido, composta pela realização de repetições máximas de flexão de braços, alternada e sem intervalos, com a realização de repetições máximas de agachamento, baseado no método de treinamento de falha concêntrica.

Como forma de complementar o conhecimento foi desenvolvido o Artigo 2, o qual trata da influência do incremento de condicionamento físico, obtido por meio de treinamento crônico (treinamento aeróbico de corrida contínua por 12 semanas), sobre as adaptações da expressão de c-miRNAs específicos e sua relação com marcadores fisiológicos.

4.1 Artigo 1: MicroRNAs circulantes durante prática de exercício resistido agudo em homens saudáveis com diferentes níveis de condicionamento físico

RESUMO

Objetivo: avaliar a influência do exercício resistido (ER) agudo sobre a expressão de miRNAs circulantes (c-miRNAs) específicos e sua relação com biomarcadores bioquímicos de lesão muscular e processo inflamatório em homens saudáveis com diferentes níveis de condicionamento físico. **Métodos:** Os participantes ($18,5 \pm 0,5$ anos) foram classificados em dois grupos: não condicionados ($n=10$) - $VO_{2max} < 41$ ml/kg/min e condicionados ($n=10$) - VO_{2max} alto > 51 ml/kg/min, de acordo com a classificação do *American College of Sports Medicine*. Anterior à realização do ER agudo (repetições máximas de flexão de braços, alternada e sem intervalos, com a realização de repetições máximas de agachamento), foi coletada uma amostra de sangue, assim como após 1h e 24h. **Resultados:** Após o ER agudo, ambos os grupos apresentaram o mesmo comportamento dos marcadores bioquímicos, aumento da concentração sérica de creatina quinase pós-1h e 24h ($P < 0,05$) e manutenção da concentração sérica da interleucina-6. Entretanto, os c-miRNAs apresentaram um comportamento diferenciado, somente no grupo não condicionado, houve redução da expressão do c-miR-1-3p pós-1h da realização do exercício e retornou ao nível inicial pós-24h, enquanto o c-miR-133a apresentou uma redução pós-24h ($P < 0,05$). A expressão dos c-miR-1-3p e -133a, permaneceu constante no grupo condicionado. No grupo condicionado a expressão do c-miR-21-3p apresentou redução pós-24h ($P < 0,05$). Os c-miR-133b e -146-3p não foram expressos, em ambos os grupos, tanto no basal como pós-1 e 24h do exercício agudo. A realização do ER agudo induziu alterações no padrão de expressão dos c-miRNAs mediadores da função muscular no grupo não condicionado e induziu a redução da expressão do mediador do processo inflamatório no grupo condicionado. Esses resultados sugerem que os padrões temporais marcadamente diferentes dos c-miRNAs, em comparação com biomarcadores convencionais, enfatizam um papel potencial como marcadores únicos e em tempo real da fisiologia do exercício. **Palavras Chaves:** Exercício agudo, c-miRNAs.

4.1.1 Introdução

O exercício agudo é caracterizado pela realização de uma sessão isolada de exercícios que gera respostas imediatas, as quais podem se manter ao longo das primeiras 24 ou 48 horas, caracterizando-se como respostas tardias (HAWLEY; HARGREAVES; JOYNER; ZIERATH, 2014). O exercício resistido (ER) é um potente estimulador da síntese de proteínas musculares bem como do crescimento de células musculares (MORITANI, 1979; STARON; KARAPONDO; KRAEMER; FRY *et al.*, 1994), e quando realizado por mais de 2 minutos, está associado positivamente com o VO_{2max} (BENITO; ALVAREZ-SANCHEZ; DÍAZ; MORENCOS *et al.*, 2016; ROBERGS; GORDON; REYNOLDS; WALKER, 2007).

Vários protocolos de ER parecem potencializar respostas a tradicionais biomarcadores bioquímicos como hormônios (testosterona, cortisol e fator de crescimento semelhante à insulina-1) (SCHROEDER; VILLANUEVA; WEST; PHILLIPS, 2013; SMILIOS; PILIANIDIS; KARAMOUZIS; TOKMAKIDIS, 2003), citocinas inflamatórias circulantes (interleucina-6, interleucina-10 e proteína C-reativa) (BENINI; PRADO; ORSATTI; BARCELOS *et al.*, 2015; NEME IDE; ALESSANDRO SOARES NUNES; BRENNIKOFER; MACEDO, 2013) e marcadores de danos musculares creatina quinase, lactato desidrogenase e alanina aspartato transaminase (CK, LDH e AST) (BENINI; PRADO; ORSATTI; BARCELOS *et al.*, 2015). Apesar de terem ajudado na compreensão das respostas induzidas pelo exercício agudo, esses biomarcadores fornecem uma visão limitada das adaptações induzidas pelo exercício físico (LI; YAO; ZHOU; CHENG *et al.*, 2018).

As respostas ao ER agudo envolvem uma alteração gradual no conteúdo de proteínas e atividades enzimáticas. Essas mudanças progressivas refletem a ativação e/ou repressão de vias de sinalização específicas que regulam a transcrição e a tradução e têm efeitos na expressão gênica (PILEGAARD; SALTIN; NEUFER, 2003).

Os miRNAs são pequenos RNAs não-codificantes e variam de 18 a 25 nucleotídeos de comprimento. Regulam a expressão gênica em níveis pós-transcricionais por meio da inibição da tradução ou da degradação do RNAm alvo (FRIEDMAN; FARH; BURGE; BARTEL, 2009). Além da localização intracelular na qual ocorre a sua biogênese, os miRNAs foram detectados em diferentes fluidos corporais, incluindo o sangue, chamados de microRNAs circulantes (c-miRNAs), que podem ser ativamente ou passivamente liberados dos tecidos e podem regular a expressão gênica de células distantes, agindo como um verdadeiro mecanismo de comunicação intercelular (MENDELL; OLSON, 2012).

O exercício agudo ou crônico é capaz de alterar os perfis dos c-miRNAs de indivíduos saudáveis e podem ser usados como potenciais biomarcadores ou mediadores de adaptações

fisiológicas (AOI; ICHIKAWA; MUNE; TANIMURA *et al.*, 2013; BAGGISH; HALE; WEINER; LEWIS *et al.*, 2011; BANZET; CHENNAOUI; GIRARD; RACINAIS *et al.*, 2013; MOOREN; VIERECK; KRÜGER; THUM, 2014). Com base em suas funções biológicas nas respostas induzidas pelo exercício, alguns c-miRNAs tem sido destacados como os MyomiR-1-3p, -133a, -133b e -206 (mediadores da função muscular) e os c-inflamamirs miR-21-3p e miR-146-3p (mediadores do processo inflamatório) (BAGGISH; HALE; WEINER; LEWIS *et al.*, 2011; HORAK; NOVAK; BIENERTOVA-VASKU, 2016). Apesar dos estudos apontarem para o uso dos c-miRNAs como mediadores, em função dos diferentes tipos de exercícios e delineamento dos estudos, o comportamento da expressão desses c-miRNAs é contraditório (BAGGISH; PARK; MIN; ISAACS *et al.*, 2014; BANZET; CHENNAOUI; GIRARD; RACINAIS *et al.*, 2013; CLAUSS; WAKILI; HILDEBRAND; KÄÄB *et al.*, 2016; CUI; LI; NIU; ZHANG *et al.*, 2015; DE GONZALO-CALVO; DÁVALOS; MONTERO; GARCÍA-GONZÁLEZ *et al.*, 2015; MOOREN; VIERECK; KRÜGER; THUM, 2014; UHLEMANN; MÖBIUS-WINKLER; FIKENZER; ADAM *et al.*, 2014).

O condicionamento físico é uma variável pouco estudada e merece mais atenção, pois, possivelmente, influencia a expressão dos c-miRNAs após a realização de exercício físico agudo. Considerando o exposto, a hipótese do presente estudo é que a expressão de c-miRNAs com funções estabelecidas no tecido muscular e no processo inflamatório ocorre de forma diferente em indivíduos com diferentes níveis de condicionamento físico expostos a um exercício resistido.

Para testar essa hipótese, o objetivo do estudo foi avaliar a influência do exercício resistido agudo sobre a expressão de c-miRNAs específicos e sua relação com biomarcadores bioquímicos de lesão muscular e processo inflamatório em homens saudáveis com diferentes níveis de condicionamento físico.

4.1.2 Métodos

4.1.2.1 Participantes

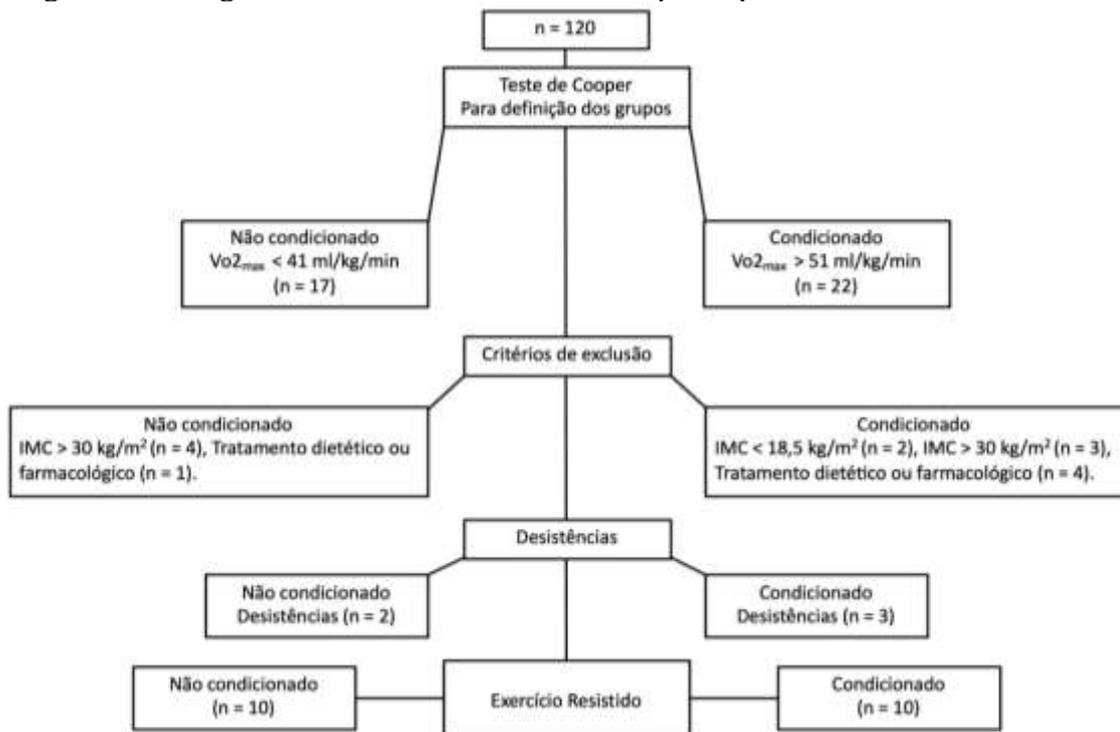
Cento e vinte homens adultos ($18 \pm 0,5$ anos), que se alistaram no serviço militar no Centro de Treinamento Físico do Exército, foram convidados a participar do presente estudo. Todos exerciam atividades recreacionais, envolvidos em esportes individuais (corrida, natação) ou coletivo (futebol).

Os participantes foram classificados de acordo com condicionamento físico (Teste de Cooper) e foram excluídos os que: 1) apresentavam VO_{2max} entre 41 e 51 ml/kg/min (n=81); 2) doença crônica; 3) índice de massa corporal (IMC) $<18,5$ kg/m² e >30 kg/m² (n=9); 4) estavam em tratamento dietético ou farmacológico (n=5). Nenhum participante apresentava intolerância à glicose ou estava em tratamento dietético ou farmacológico.

Durante a execução do ER, 5 indivíduos desistiram de participar do estudo (n= 3 condicionados, n= 2 não condicionados). Com isso concluíram todas as fases do estudo 10 indivíduos em cada grupo. O detalhamento do fluxo de inclusão e exclusão ao longo do estudo é demonstrado na Figura 1.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Salgado de Oliveira – Universo (CAAE: 55948016.1.0000.5282) e foi realizado de acordo com a Declaração de Helsinque. O objetivo do estudo e seus possíveis riscos e desconfortos foram explicados por escrito e oralmente aos participantes antes da obtenção do consentimento por escrito.

Figura 1- Fluxograma de inclusão e exclusão dos participantes do estudo



4.1.2.2 Delineamento do estudo

Os participantes realizaram o teste de Cooper para avaliar o grau de aptidão aeróbia. O teste de corrida/caminhada de 12 minutos de Cooper foi realizado em uma pista oficial de atletismo de 400 metros. Os participantes foram orientados a percorrer a máxima distância possível no tempo de 12 minutos. Para a estimativa do VO_{2max} foi utilizada uma equação

baseada na máxima distância percorrida em metros (DP): VO_{2max} (ml/kg/min) = $(DP - 504,9)/44,73$ (COOPER, 1968).

A partir dos resultados, os participantes foram classificados em dois grupos: não condicionados (aptidão aeróbica ruim; $VO_{2max} < 41$ ml/kg/min) e condicionados (aptidão aeróbica excelente; $VO_{2max} > 51$ ml/kg/min), de acordo com a classificação do *American College of Sports Medicine* (THOMPSON; GORDON; PESCATELLO, 2010).

A primeira fase de coletas de dados (basal) ocorreu após 7 dias da realização do teste de Cooper, com o objetivo de eliminar os efeitos das alterações metabólicas transitórias que poderiam permanecer após realização do referido teste (CLARKSON, 1997).

No tempo basal foi coletado sangue venoso após 8h de jejum, foram realizados testes de força (membros inferiores tração subescapular e preensão manual), medidas antropométricas e avaliação da composição corporal, para caracterização do grupo. Após 24h foi iniciado oER agudo. Novas amostras de sangue foram coletadas após 1 e 24 horas da realização do exercício.

4.1.2.3 Testes de força

O principal objetivo da realização dos testes de força foi verificar a existência de discrepâncias entre os grupos classificados de acordo com a capacidade aeróbia. A força muscular da região escapular e de membros inferiores foi determinada pelos transdutores de força (EMG System do Brasil) com capacidade de 1000kgf acoplados em módulo de aquisição de sinais (EMG System do Brasil) com taxa de amostragem de 1kHz. A força de preensão manual foi mensurada por um dinamômetro eletrônico de força de preensão manual, modelo TRF200 (EMG System do Brasil) com cabo de 2 m flexível, blindado e um sistema de aquisição de dados que permitisse a leitura deste equipamento até 200 kgf.

No teste de tração escapular os participantes foram posicionados em pé com abdução de ombro, flexão de cotovelo, antebraço em posição neutra, punho com uma leve extensão, o polegar deveria estar com extensão e abdução e somente os demais dedos deveriam tocar a empunhadura, devendo fazer força de tração para as laterais.

No teste de força de membros inferiores os participantes ficaram em pé sobre a plataforma com o tronco ereto, os joelhos flexionados em ângulo de 130° a 140° e segurando a barra com a pegada pronada posicionando-a sobre as coxas.

Para o teste de força de preensão manual os participantes foram instruídos a se sentar em uma cadeira com os pés colocados no chão, ombros alinhados e neutros, o cotovelo flexionado a 90° e punho em posição neutra.

Em todos os testes de força foram executadas 3 tentativas com intervalo entre as medidas de 15 segundos e os participantes foram instruídos a aplicar força máxima por 3 segundos.

4.1.2.4 Antropometria e composição corporal

A massa corporal total foi aferida em balança Filizola com precisão de 0,1 kg e a estatura por estadiômetro com aproximação de 0,5 cm. Foi calculado o IMC dividindo a massa corporal total pela estatura elevada ao quadrado (kg/m^2).

A composição corporal foi determinada por absorciometria por dupla emissão de raio-X (DXA), de marca iDXA-Lunar, software Encore 2008 versão 12.20, GE Healthcare, no modo de escaneamento total automático. Para a realização do exame, os participantes foram orientados para utilizar roupas leves sem acessórios de metal.

Os participantes foram colocados em decúbito dorsal e solicitados a permanecerem imóveis até o final do procedimento. O mesmo operador realizou todas as varreduras e as medições no bloco de calibração (diariamente) e no simulador de coluna de calibração (semanal), fornecidas pelo fabricante, apresentaram coeficientes de variação $< 0,7\%$.

4.1.2.5 Exercício resistido agudo

Os participantes do estudo foram submetidos a uma sessão isolada de exercícios resistidos, baseado no método de treinamento de falha concêntrica. Para evitar um quadro de hipoglicemia todos os participantes consumiram, 30 minutos antes da sessão de exercícios, suco de laranja natural (200 mL) (índice glicêmico 70) e polpa de banana verde (25 g) para causar saciedade e garantir o baixo índice glicêmico (< 50).

A sessão foi composta pela realização de repetições máximas de flexão de braços, alternada e sem intervalos, com a realização de repetições máximas de agachamento e todos foram encorajados a se exercitar até a exaustão.

Os participantes iniciaram o teste realizando as repetições máxima de flexões de braços até a interrupção do movimento durante a fase concêntrica devida à fadiga muscular momentânea (falha concêntrica). Em seguida, iniciaram a realização de agachamentos até a falha concêntrica, mantendo a alternância dos tipos de exercícios. O teste foi interrompido quando o participante apresentava falha muscular total e foi registrado o número total de repetições em cada tipo de exercício (flexão e agachamento) bem como o tempo total da execução do teste.

4.1.2.6 Coletas de sangue

No tempo basal foi coletado sangue venoso após 8h de jejum. No dia do experimento, após 1h da realização do exercício resistido, nova amostra de sangue foi coletada (pós 1h). Na manhã do dia seguinte os participantes compareceram em jejum noturno e foi coletada a terceira amostra de sangue venoso (pós 24h). As punções venosas foram realizadas por profissionais capacitados. Em cada tempo foram coletados 20 ml de sangue em tubo sem anticoagulante. Após centrifugação por 15 minutos a 2.500 *rpm* o soro foi armazenado em alíquotas de 500 μ L a -80°C até o momento das análises.

4.1.2.7 Determinação de marcadores séricos de inflamação, lesão muscular e glicemia

Foi considerado como marcador de lesão tecidual a concentração sérica de CK, analisada por reação colorimétrica (kitt comercial Gold Analisa). A determinação da IL-6 foi realizada com kit comercial para humanos Millipore ®, caracterizado como MilliplexMagneticHighSensitivityHumanCytokine. Foi adotada a metodologia Luminex do tipo sanduíche, com sensibilidade de 0,1 pg/mL. A concentração de glicose foi determinada pelo método colorimétrico por meio do aparelho bioquímico BT/3000 Plus de marca Wiener. A concentração basal foi considerada como referência para as variações encontradas (pós-1h e pós-24h).

4.1.2.8 c-miRNAs selecionados

Com base em suas funções biológicas conhecidas na adaptação induzida pelo exercício, incluindo a hipertrofia do músculo esquelético, remodelação, metabolismo, angiogênese, regeneração, além da sua atuação no processo inflamatório, foram selecionados seis c-miRNAs: MyomiR-1-3p, -133a, -133b e -206 (mediadores da função muscular), e c-inflammiR-21-3p e miR-146-3p (mediadores do processo inflamatório) (BAGGISH; HALE; WEINER; LEWIS *et al.*, 2011; HORAK; NOVAK; BIENERTOVA-VASKU, 2016).

4.1.2.9 Análise da expressão de c-miRNAs de soro humano

Os miRNAs foram isolados de amostras de soro utilizando-se o kit miRNeasySerum/Plasma Kit (Qiagen, Hilden, Germany). A expressão relativa dos miRNA foi

mensurada usando o equipamento AppliedBiosystems 7500 Fast Real-Time PCR System e o kit TaqManMicroRNAAssay (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA), depois de feita a síntese de cDNA com o kit TaqManTranscriptionReversionMicroRNA kit (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA). As reações foram feitas em duplicatas em placas de 96 poços (MicroAmpOptical 96-Well Reaction Plate, AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA). Foram utilizados ensaios TaqMan (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA) para análise da expressão dos seguintes c-miRNAs: miR-1-3p (477820), -133a (478511), -133b (480871), -206 (477968), -21-3p (477973) e -146-3p (478714). A expressão relativa foi calculada pela comparação com uma amostra calibradora controle, depois que os valores de CT (CycleThreshold) foram normalizados pelo gene do miR451 (478107) (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA). Todos os procedimentos para análises de expressão dos miRNA seguiram as instruções dos respectivos fabricantes. Os resultados do RT-PCR foram analisados pelo método $\Delta\Delta Ct$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

4.1.2.10 Análises estatísticas

As características gerais dos participantes foram apresentadas como média \pm desvio padrão. As medidas bioquímicas, resultados do teste de fadiga, níveis de força e VO_{2max} foram apresentados como mediana e intervalo interquartil (IIQ). Para a comparação entre os grupos nos diferentes momentos foi utilizado o Teste não-paramétrico de Kruskal-wallis com post hoc de Mann-Whitney. Para a comparação intragrupo foi utilizado o teste não-paramétrico de Friedman com post hoc de Wilcoxon.

As variáveis IL6 e miR-1-3p apresentaram dados faltantes, para reduzir o viés gerado pela ausência de dados, foi aplicado o método de imputação de dados por estimativa de máxima verossimilhança com teste de Little $> 0,05$ (LITTLE; RUBIN, 2019) para a perda completamente aleatória. O critério de determinação de significância adotado foi o nível de 5% e a análise estatística foi processada pelo *software* estatístico SPSS.

4.1.3 Resultados

4.1.3.1 Características dos participantes

As características basais dos participantes são mostradas na Tabela 1. A idade dos participantes foi semelhante entre os grupos, assim como a estatura, IMC e massa livre de

gordura (MLG) ($P > 0,005$). Os indivíduos condicionados apresentaram menor massa corporal total, massa gorda e percentual de gordura do que os não condicionados ($P < 0,005$). As variáveis relacionadas a condição física somente o VO_{2max} foi maior nos indivíduos condicionados ($P < 0,001$).

Tabela 1– Características gerais dos participantes, de acordo com a classificação do condicionamento físico (Grupo Condicionado e Não Condicionado)

Características	Condicionado (n=10)	Nãocondicionado (n=10)	P-valor
Idade (anos)	18,5 ± 0,5	18,5 ± 0,5	1,000
Altura (cm)	171,3 ± 6,7	175,2 ± 5,6	0,218
MCT (kg)	63 ± 5	72,7 ± 10,1	0,023
IMC (kg/m ²)	21,6 ± 1,8	24 ± 2,9	0,123
MG (kg)	8,8 ± 3,1	17,4 ± 6,7	0,002
MLG (kg)	54,1 ± 4,1	55,3 ± 4,7	0,853
G (%)	13,9 ± 4,3	23,3 ± 6,4	0,001
Condição Física			
VO_{2max} (l/min/kg)	54,6 ± 3	33,2 ± 6	< 0,001
MMI (kgf)	100,9 ± 39,2	109,1 ± 17,1	0,203
ESC (kgf)	31,3 ± 8	26,2 ± 8,7	0,346
HND (kgf)	31,2 ± 6,2	28,7 ± 4,5	0,254

Os valores são apresentados em média e desvio padrão. (MCT) massa corporal total, (IMC) índice de massa corporal, (MG) massa gorda, (MLG) massa livre de gordura, (G) percentual de gordura, (MMI) força de membros inferiores, (ESC) força de tração escapular (HND) força de prensão manual.

4.1.3.2 Exercício resistido agudo

Durante a realização do exercício resistido agudo, foram computadas a quantidade total de execução de cada exercício e o tempo total de execução do teste. O grupo condicionado realizou maior número de flexões de braços 49 repetições, IIQ (46 – 63) e $P=0,006$ e agachamentos 123 repetições, IIQ (79 – 180) e $P=0,004$, quando comparado com o grupo não condicionado 33 repetições, IIQ (24 – 41) e 67 repetições, IIQ (63 - 97), respectivamente. Conseqüentemente, o tempo total de execução do grupo condicionado foi 60% maior com 401,5 segundos, IIQ (341 – 481) e $P=0,003$ do que o grupo não condicionado 242 segundos, IIQ (213 - 254).

4.1.3.3 Alterações nos marcadores bioquímicos em resposta ao exercício resistido agudo

Os resultados dos marcadores bioquímicos são mostrados na Tabela 2. Na condição basal, não foram observadas diferenças entre os grupos para todos os marcadores bioquímicos ($P>0,05$). A concentração sérica de CK apresentou o mesmo comportamento em ambos os grupos, com aumento pós-1h (condicionado $P= 0,009$; não condicionado $P= 0,007$) e pós-24h

(condicionado P = 0,005; não condicionado P= 0,037) da execução do exercício agudo. O grupo condicionado pós-24h, apresentou valores mais elevados (P= 0,029) quando comparado com o não condicionado (Tabela 2).

A concentração sérica da IL-6 se manteve constante ao longo do estudo para ambos os grupos. A concentração sérica de glicose apresentou o mesmo comportamento para ambos os grupos, com valores mais elevados pós-1h de exercício (condicionado P= 0,005; não condicionado P= 0,012) e valores semelhantes ao basal pós-24h. Ao longo do estudo nenhum participante apresentou glicemia < 70 mg/dL (Tabela 2).

4.1.3.4 Expressão dos c-miRNAs selecionados no momento basal

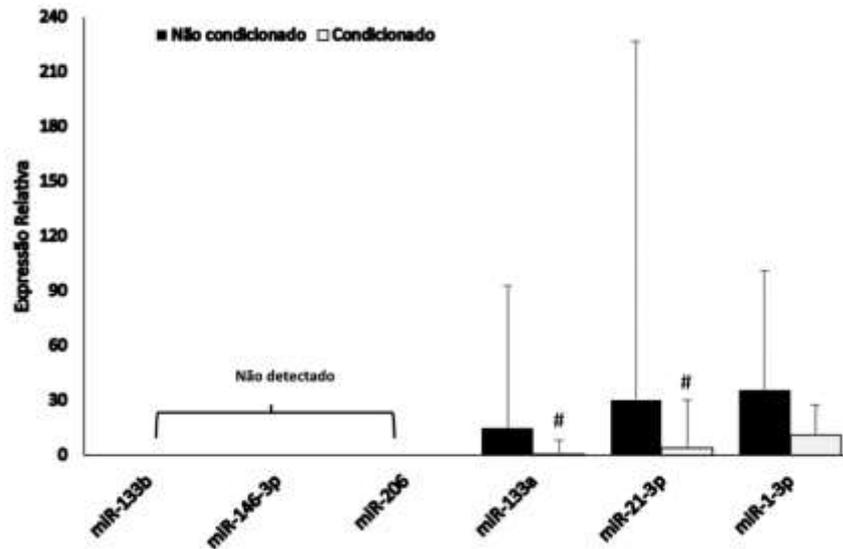
A expressão relativa dos c-miRNA foi avaliada no momento basal, pós-1h e 24h da execução de exercício resistido. A Figura 2 apresenta a comparação da expressão dos c-miR-133a e c-miR-21-3p somente no momento basal. Os c-miR-133b, -146-3p e -206 não foram detectados em ambos os grupos. As expressões dos miR-133a e -21-3p foram significativamente maiores no grupo não condicionado, enquanto a expressão miR-1-3p não diferiu entre os grupos.

Tabela 2-. Mediana (IIQ) da concentração sérica de marcadores bioquímicos de lesão muscular, processo inflamatório e glicemia, de acordo com a classificação pelo condicionamento físico (Grupo Condicionado e Não Condicionado)

Marcadores	Condicionado (n= 10)			NãoCondicionado (n=10)		
	Basal	Após 1h	Após 24h	Basal	Após 1h	Após 24h
CPK (U/L)	165,1 (112,9 – 624,5)	211,6* (151,1 – 762,3)	568,0 ^{&} (485,1 – 1042,7)	133,7 (103,8 – 186,5)	193,6 * (110,8 – 248,2)	213,5 ^{&#} (162,8 – 750,2)
IL 6 (pg/mL)	17,2 (5,3 – 53,0)	13,8 (2,6 – 21,9)	7,3 (4,8 – 26,0)	11,3 (4,9 – 33,5)	10,0 (1,25 – 32,1)	17,5 (7,9 – 27,0)
Glicose (mg/dL)	80,0 (74,2 – 86,2)	96,5* (92,7 – 100,5)	84,5 ^{&} (80,7 – 86,2)	82,0 (76,0 – 106,5)	104,0* (97,7 – 106,5)	83,0 ^{&} (76,0 – 92,0)

CK - creatina fosfoquinase, IL6 - interleucina 6. Valores representados por mediana (intervalo interquartil), * diferença significativa comparado ao momento basal, [&] Diferença significativa comparado ao momento 1h e [#] Diferença significativa entre os grupos.

Figura 2 - Comparação dos valores de expressão relativa dos c-miRNAs selecionados no momento basal. # diferença significativa entre os grupos.



4.1.3.5 Alterações dos c-miRNAs em resposta ao exercício agudo

As respostas imediatas da expressão relativa dos c-miRNAs, 1h e 24h após o término do ER agudo, são apresentadas na Figura 3. A realização do exercício agudo só induziu alterações no padrão de expressão dos c-miRNAs mediadores da função muscular do grupo não condicionado. No entanto, a expressão do c-miR-21-3p, mediador do processo inflamatório, foi reduzida pós-24h da realização do exercício físico somente no grupo condicionado.

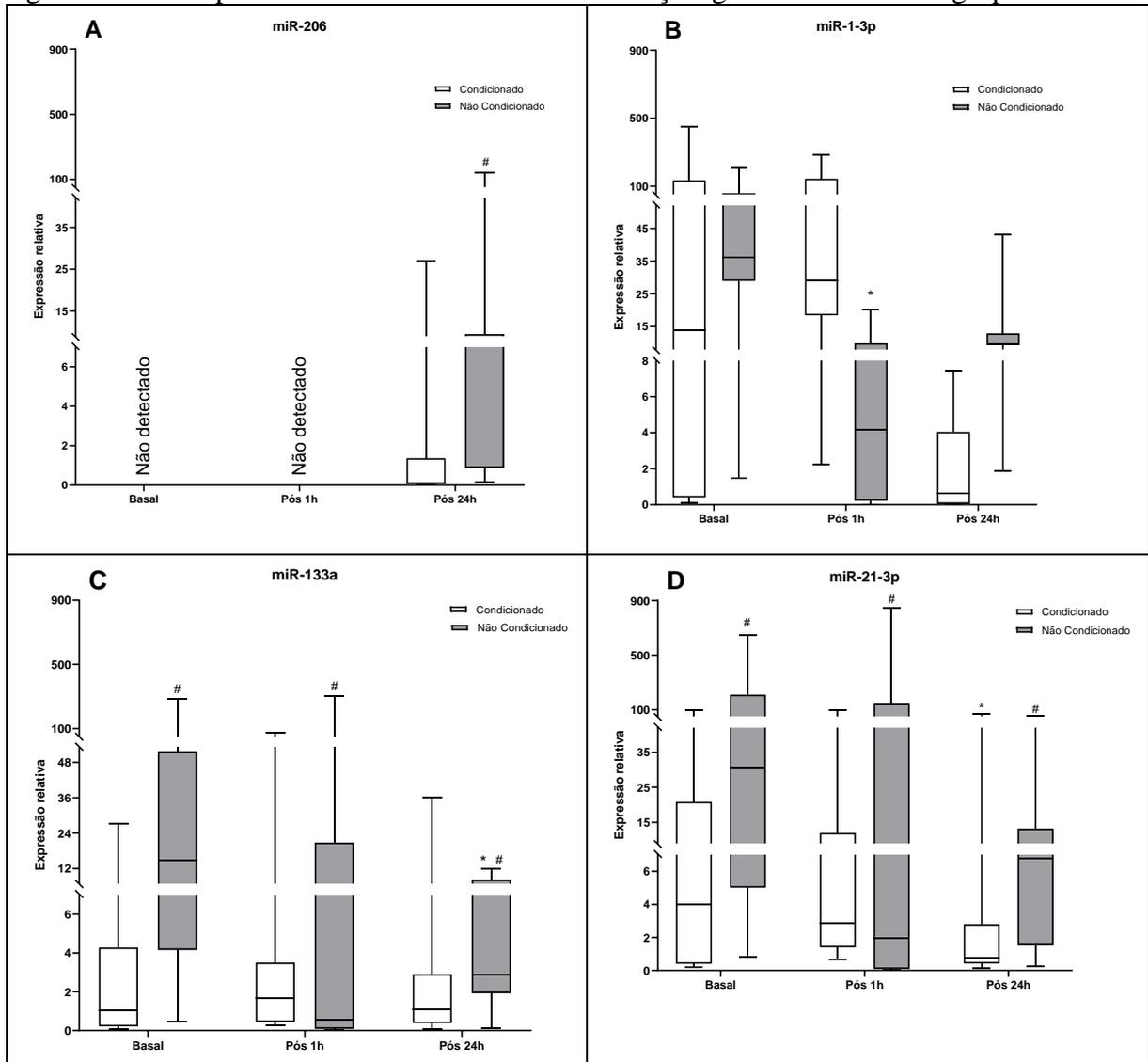
Embora o miR-206 não tenha sido detectado no momento basal, pós-24h a realização do exercício sua expressão relativa foi detectada em ambos os grupos sendo maior no grupo não condicionado ($p = 0,031$) (Figura 3, A).

Somente no grupo não condicionado, a expressão do miR-1-3p, quando comparada com o momento basal, apresentou uma diminuição ($P = 0,043$) pós-1h da realização do exercício e retornou ao nível inicial pós-24h (Figura 3, B) enquanto o miR-133a apresentou uma queda pós-24h (Figura 3, C). A expressão dos miR-1-3p e 133a, permaneceu constante no grupo condicionado (Figura 3, B e C).

No grupo condicionado o miR-21-3p apresentou queda significativa ($p = 0,022$) pós-24h, quando comparado com o momento basal. No grupo não condicionado, não foi observado alteração significativa pós-1 e 24h da realização do exercício agudo (Figura 3, D).

Os miR-133b e miR-146-3p não foram expressos, em ambos os grupos, tanto no basal como pós-1 e 24h do exercício agudo.

Figura3 - Boxplots (mediana, percentil 25 e percentil 75) do comportamento da expressão dos c-miRNAs selecionados após 1h e 24h de exercício agudo em indivíduos condicionados e não condicionados. miR 206 (A), miR1-3p (B), miR-133a (C), miR-21-3p (D). * diferença significativa comparado ao momento basal e # diferença significativa entre os grupos.



4.1.4 Discussão

Para o nosso conhecimento, além do presente estudo, somente um outro considerou o condicionamento físico como variável relacionada à expressão de c-miRNAs, porém os indivíduos de ambos os sexos estavam em situação de repouso (BYE; RØSJØ; ASPENES; CONDORELLI *et al.*, 2013). Com isso, o presente estudo é o primeiro a verificar diferenças na expressão de c-miRNAs relacionados à lesão tecidual e à inflamação considerando o condicionamento físico de homens jovens, antes e após a realização de ER agudo.

No início do estudo (momento basal) os grupos não apresentaram diferenças nos testes de força e nos marcadores bioquímicos. Entretanto, os c-miRNAs apresentaram um

comportamento diferenciado. Os miR-133b e miR-206, que regulam RNAs alvos que atuam na regeneração bem como na proliferação e diferenciação de mioblastos (HORAK; NOVAK; BIENERTOVA-VASKU, 2016) e o miR-146-3p, que atua no processo inflamatório (BAGGISH; HALE; WEINER; LEWIS *et al.*, 2011), apresentaram expressões abaixo do limite detectável, em ambos os grupos. Nielsen et al (2014) também não detectaram alguns c-miRNAs cardíacos e musculares como o miR-206 e miR-208 em 32 homens treinados antes da realização de exercício agudo com cicloergômetro (NIELSEN; ÅKERSTRÖM; RINNOV; YFANTI *et al.*, 2014).

A não detecção desses c-miRNAs, apesar dos altos níveis de expressão intracelular, está de acordo com a concepção de que o mecanismo de secreção celular de c-miRNAs é um processo seletivo, sendo alguns destinados a serem secretados e outros a permanecerem no compartimento intracelular (PIGATI; YADDANAPUDI; IYENGAR; KIM *et al.*, 2010). Para ambos os grupos do presente estudo, a expressão do miR-1-3p foi baixa e similar. Tem sido descrito que sua expressão é muito baixa em indivíduos saudáveis e está aumentada no infarto agudo do miocárdio (AI; ZHANG; LI; PU *et al.*, 2010).

O miR-21-3p recebeu considerável atenção de outros autores como marcador de estresse oxidativo, inflamação e está ligado a algumas doenças relacionadas à inflamação crônica (CHENG; LIU; ZHANG; LIN *et al.*, 2009; ROY; SEN, 2011; THUM; GROSS; FIEDLER; FISCHER *et al.*, 2008; WEBER; BAKER; MOORE; SEARLES, 2010). Bye et al (2013) observaram em adultos noruegueses que a expressão do miR-21-3p foi maior no grupo com baixo VO_{2max} em situação de repouso (BYE; RØSJØ; ASPENES; CONDORELLI *et al.*, 2013). No presente estudo, foi observado resultado semelhante, o grupo não condicionado também apresentou maior expressão do miR-21-3p. Apesar da diferença da faixa etária dos participantes dos respectivos estudos, os resultados sugerem que o nível de condicionamento físico parece implicar na modulação da expressão dos miR-21-3p e apontam para a possível ocorrência de um processo inflamatório neste grupo.

O miR-133a é abundantemente expresso no miocárdio e controla a hipertrofia (MCCARTHY; ESSER, 2007a), promove a diferenciação e a regeneração dos mioblastos, regula a angiogênese, controla o estresse oxidativo, e reduz a migração celular (CHEN; MANDEL; THOMSON; WU *et al.*, 2006). No presente estudo, a expressão do miR-133a foi maior no grupo não condicionado. Este resultado é inédito e sugestivo de que na ausência de condicionamento físico a expressão desse miRNA é maior do que a dos indivíduos condicionados.

O VO_{2max} é um indicador da capacidade aeróbia, o exercício proposto no presente estudo possuía características neuromusculares, no entanto alguns autores (BENITO; ALVAREZ-SANCHEZ; DÍAZ; MORENCOS *et al.*, 2016; ROBERGS; GORDON; REYNOLDS; WALKER, 2007) observaram que o ER realizado por mais de 2 minutos, envolvendo grandes massas musculares, está associado positivamente com o VO_{2max} . Esses achados possivelmente ocorreram em função das menores áreas transversais do músculo esquelético, maiores proporções de fibras de contração lenta, aumento da atividade enzimática aeróbica e maior densidade mitocondrial e capilar (TESCH; WRIGHT; VOGEL; DANIELS *et al.*, 1985). Embora essas qualidades não contribuam diretamente com a força muscular máxima, indivíduos com alto VO_{2max} podem apresentar melhores índices de recuperação durante o exercício anaeróbico (RATAMESS; ROSENBERG; KANG; SUNDBERG *et al.*, 2014). Semelhante aos resultados do presente estudo, indivíduos com alto VO_{2max} foram capazes de manter o desempenho no agachamento por mais tempo do que os com baixo VO_{2max} (RATAMESS; ROSENBERG; KANG; SUNDBERG *et al.*, 2014) e foi encontrada uma associação positiva entre o número de flexões de braço realizado e o VO_{2max} em 1104 bombeiros americanos (YANG; CHRISTOPHI; FARIOLI; BAUR *et al.*, 2019).

Os marcadores bioquímicos de lesão tecidual e de inflamação são sensíveis a intensidade e duração de exercícios físicos (FISCHER, 2006). No presente estudo, após a realização do ER de forma aguda, ambos os grupos (condicionados e não condicionados) apresentaram marcadores bioquímicos com comportamento semelhante, tanto pós-1h quanto pós-24h da execução do exercício. Em ambos os grupos, o exercício proposto provocou dano do tecido muscular, sugerido pelo aumento contínuo da CK, mesmo pós-24h. O grupo condicionado apresentou maiores valores séricos de CK, possivelmente devido a maior quantidade total de execução de cada exercício e o tempo final para execução do teste.

A concentração sérica de IL-6 responde a lesão muscular e está mais relacionada ao exercício concêntrico de forma independente a duração do exercício, sendo este o fator mais importante, o qual determina a amplitude de variação plasmática da IL-6 pós-exercício (BRUUNSGAARD; GALBO; HALKJAER-KRISTENSEN; JOHANSEN *et al.*, 1997). Alterações na homeostase de cálcio, reduzida disponibilidade de glicose e aumento da formação de espécies reativas de oxigênio, são capazes de ativar a transcrição de fatores que reconhecidamente regulam a síntese de IL-6 (FISCHER, 2006). No presente estudo, não foram observadas diferenças na concentração sérica de IL-6 entre e inter-grupos, possivelmente devido a disponibilidade de glicose, a qual apresentou variação positiva pós-1 e 24h a realização do exercício em ambos os grupos. Os participantes não apresentaram hipoglicemia durante todo

o estudo, mostrando a eficácia da ingestão da bebida de baixo índice glicêmico oferecida anteriormente a realização do exercício agudo.

A relação entre expressão dos c-miRNAs e a prática de exercícios físicos em diferentes grupos foi descrita em diversos estudos (AOI; ICHIKAWA; MUNE; TANIMURA *et al.*, 2013; BAGGISH; HALE; WEINER; LEWIS *et al.*, 2011; BANZET; CHENNAOUI; GIRARD; RACINAIS *et al.*, 2013; FERNÁNDEZ-SANJURJO; DE GONZALO-CALVO; FERNÁNDEZ-GARCÍA; DÍEZ-ROBLES *et al.*, 2018; MOOREN; VIREECK; KRÜGER; THUM, 2014). Apesar da ampla divulgação, não foram encontrados estudos que descrevessem o perfil de expressão dos c-miRNAs em indivíduos com diferente condicionamento físico submetidos a ER agudo.

Nossos resultados apontam que a expressão relativa dos c-miRNAs mediadores da função muscular mostrou alterações dinâmicas diferentes entre e inter-grupos, em resposta ao exercício proposto. O miR-206 atua na proliferação e diferenciação de mioblastos e na regeneração muscular (HORAK; NOVAK; BIENERTOVA-VASKU, 2016), reprimindo o gene HDAC4, um repressor da transcrição de muitos genes musculares, e os genes Pax3 e Pax7 que aumentam a capacidade proliferativa das células satélites e prejudicam a diferenciação miogênica (CHEN; TAO; LI; DENG *et al.*, 2010).

No presente estudo, o c-miR-206, embora não tenha sido detectado no momento basal, apresentou expressão relativa pós-24h em ambos os grupos, sendo maior no grupo não condicionado, não obstante tenha realizado menor quantidade dos exercícios propostos e apresentado valores de CK menores do que o grupo condicionado pós-24h. Possivelmente, o aumento da expressão do miR-206 pós-exercício não está associado ao dano do tecido muscular pois, apesar do aumento da CK, outros c-miRNAs selecionados não apresentaram o mesmo comportamento, reforçando a concepção do processo seletivo de secreção celular de c-miRNAs. Além disso, as concentrações séricas de CK foram maiores no grupo condicionado, ao passo que a expressão do miR-206 foi maior no grupo não condicionado. A menor expressão do grupo condicionado, pode estar relacionado a maior adaptação ao exercício físico.

Os miR-1-3p e miR-133a além de atuarem na diferenciação e a regeneração dos mioblastos e controlarem o estresse oxidativo, também controlam a hipertrofia muscular (CHEN; MANDEL; THOMSON; WU *et al.*, 2006). Foi observado que o nível de expressão de ambos é regulado negativamente no ER após sobrecarga muscular funcional, permitindo a expressão RNAs alvos como o HGF e IGF-1, que possuem papéis bem estabelecidos na hipertrofia do músculo esquelético (MCCARTHY; ESSER, 2007a). No presente estudo, o grupo condicionado não apresentou qualquer diferença entre os miR-1-3p e

-133a, pós-1h e -24h do exercício agudo. Somente no grupo não condicionado foi observada redução na expressão do miR-1 pós-1h e do miR133a pós-24h, quando comparados aos valores basais. Esses resultados sugerem uma maior adaptação do grupo condicionado e a necessidade de regulação imediata no grupo não condicionado para permitir a tradução de proteínas ligadas à adaptação muscular que podem contribuir para a hipertrofia muscular.

O exercício agudo induz a um processo inflamatório com o objetivo de promover o reparo e remodelamento tecidual após o trauma (ZALDIVAR; WANG-RODRIGUEZ; NEMET; SCHWINDT *et al.*, 2006). O miR-21-3p regula muitas funções relevantes ao exercício entre elas, o processo inflamatório, a contratilidade do músculo esquelético e a adaptação a hipóxia/isquemia (DONG; CHENG; YANG; LI *et al.*, 2009; SHEEDY, 2015; WEBER; BAKER; MOORE; SEARLES, 2010). A ablação do miR-21-3p, em alguns modelos experimentais, demonstrou maior proteção contra doenças inflamatórias, indicando que a atividade do miR-21-3p promove o processo inflamação (GUINEA-VINIEGRA; JIMÉNEZ; SCHONTHALER; NAVARRO *et al.*, 2014; SHI; LIANG; YANG; XIA *et al.*, 2013). Li et al (2018) observaram a diminuição da expressão relativa do miR-21-3p após a realização de um exercício agudo com cicloergômetro em 10 atletas masculinos de basquetebol (25 ± 4 anos) (LI; YAO; ZHOU; CHENG *et al.*, 2018), assim como Cui et al (2017) observaram uma redução imediatamente após um exercício agudo, seguido de um aumento após o início da fase de recuperação (24h) (CUI; SUN; YIN; GUO *et al.*, 2017). Apesar de o presente estudo não ter observado variação na concentração sérica da IL-6 em ambos os grupos, o miR-21-3p reduziu sua expressão pós-24h da realização do ER no grupo condicionado, fato não observado no grupo não condicionado, que apresentou maior expressão no início do estudo, sugerindo que a dinâmica das respostas ao exercício agudo são capazes de permanecer após 24h do esforço físico. Este resultado sugere que o resultado inicial pode refletir uma ação pró-inflamatória (grupo não condicionado), e a redução na fase de recuperação (grupo condicionado) uma resposta anti-inflamatória imuno regulatória (SHEEDY, 2015). Concordando com os nossos achados, existem evidências de que os processos pró-oxidativos e pró-inflamatórios, que ocorrem após o exercício agudo, podem ser vitais para as respostas adaptativas de longo prazo ao treinamento físico (ALLEN; SUN; WOODS, 2015).

As limitações do presente estudo não comprometeram os resultados observados. O tamanho amostral refletiu comportamento similar a outros estudos, a falta de controle das atividades físicas anteriores ao início do estudo dificultou a discussão do grupo não condicionado, porém a consistência dos resultados permitiu o entendimento da relação entre a expressão de c-miRNAs e o condicionamento físico.

Em conclusão, em situação de repouso, foi observado maior expressão de alguns c-miRNAs específicos em indivíduos não condicionados. Após o ER agudo, ambos os grupos apresentaram o mesmo comportamento nos marcadores bioquímicos, porém a regulação dos c-miRNAs selecionados foi dinâmica e distinta entre os grupos. A realização do ER agudo induziu alterações no padrão de expressão dos c-miRNAs mediadores da função muscular no grupo não condicionado e induziu a redução da expressão do mediador do processo inflamatório no grupo condicionado. Esses padrões temporais marcadamente diferentes dos c-miRNAs, em comparação com biomarcadores convencionais, enfatizam um papel potencial como marcadores únicos e em tempo real da fisiologia do exercício.

Como mostrado no presente estudo, o condicionamento físico influencia na expressão dos c-miRNAs específicos, tanto na condição de repouso quanto após a realização de ER agudo, o qual gera respostas fisiológicas imediatas e tardias. Para aprofundar o conhecimento sobre a influência do condicionamento físico sobre o perfil de expressão dos c-miRNAs específicos de lesão tecidual e processo inflamatório, a utilização de protocolos com exercícios crônicos planejados parecem ser um bom modelo de estudo, uma vez que geram adaptações sistêmicas que melhoram o condicionamento físico.

4.1.5 Referências

AI, J.; ZHANG, R.; LI, Y.; PU, J. *et al.* Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. **Biochemical and biophysical research communications**, 391, n. 1, p. 73-77, 2010.

ALLEN, J.; SUN, Y.; WOODS, J. A. Exercise and the regulation of inflammatory responses. *In: Progress in molecular biology and translational science*: Elsevier, 2015. v. 135, p. 337-354.

AOI, W.; ICHIKAWA, H.; MUNE, K.; TANIMURA, Y. *et al.* Muscle-enriched microRNA miR-486 decreases in circulation in response to exercise in young men. **Frontiers in physiology**, 4, p. 80, 2013.

BAGGISH, A. L.; HALE, A.; WEINER, R. B.; LEWIS, G. D. *et al.* Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training. **The Journal of physiology**, 589, n. 16, p. 3983-3994, 2011.

BAGGISH, A. L.; PARK, J.; MIN, P.-K.; ISAACS, S. *et al.* Rapid upregulation and clearance of distinct circulating microRNAs after prolonged aerobic exercise. **Journal of applied physiology**, 116, n. 5, p. 522-531, 2014.

BANZET, S.; CHENNAOUI, M.; GIRARD, O.; RACINAIS, S. *et al.* Changes in circulating microRNAs levels with exercise modality. **Journal of applied physiology**, 115, n. 9, p. 1237-1244, 2013.

- BENINI, R.; PRADO, P. N.; ORSATTI, C.; BARCELOS, L. *et al.* Effects of acute total body resistance exercise on hormonal and cytokines changes in men and women. **The Journal of sports medicine and physical fitness**, 55, n. 4, p. 337-344, 2015.
- BENITO, P. J.; ALVAREZ-SANCHEZ, M.; DÍAZ, V.; MORENCOS, E. *et al.* Cardiovascular fitness and energy expenditure response during a combined aerobic and circuit weight training protocol. **PloS one**, 11, n. 11, 2016.
- BRUUNSGAARD, H.; GALBO, H.; HALKJAER-KRISTENSEN, J.; JOHANSEN, T. *et al.* Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage. **The Journal of physiology**, 499, n. 3, p. 833-841, 1997.
- BYE, A.; RØSJØ, H.; ASPENES, S. T.; CONDORELLI, G. *et al.* Circulating microRNAs and aerobic fitness—the HUNT-Study. **PloS one**, 8, n. 2, 2013.
- CHEN, J.-F.; MANDEL, E. M.; THOMSON, J. M.; WU, Q. *et al.* The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. **Nature genetics**, 38, n. 2, p. 228-233, 2006.
- CHEN, J.-F.; TAO, Y.; LI, J.; DENG, Z. *et al.* microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. **Journal of Cell Biology**, 190, n. 5, p. 867-879, 2010.
- CHENG, Y.; LIU, X.; ZHANG, S.; LIN, Y. *et al.* MicroRNA-21 protects against the H₂O₂-induced injury on cardiac myocytes via its target gene PDCD4. **Journal of molecular and cellular cardiology**, 47, n. 1, p. 5-14, 2009.
- CLARKSON, P. Eccentric exercise and muscle damage. **International Journal of Sports Medicine**, 18, n. S 4, p. S314-S317, 1997.
- CLAUSS, S.; WAKILI, R.; HILDEBRAND, B.; KÄÄB, S. *et al.* MicroRNAs as biomarkers for acute atrial remodeling in marathon runners (The miRathon study—a sub-study of the Munich marathon study). **PLoS One**, 11, n. 2, p. e0148599, 2016.
- COOPER, K. H. A means of assessing maximal oxygen intake: correlation between field and treadmill testing. **Jama**, 203, n. 3, p. 201-204, 1968.
- CUI, S.; SUN, B.; YIN, X.; GUO, X. *et al.* Time-course responses of circulating microRNAs to three resistance training protocols in healthy young men. **Scientific reports**, 7, n. 1, p. 2203, 2017.
- CUI, S. F.; LI, W.; NIU, J.; ZHANG, C. Y. *et al.* Acute responses of circulating microRNAs to low-volume sprint interval cycling. **Frontiers in physiology**, 6, p. 311, 2015.
- DE GONZALO-CALVO, D.; DÁVALOS, A.; MONTERO, A.; GARCÍA-GONZÁLEZ, Á. *et al.* Circulating inflammatory miRNA signature in response to different doses of aerobic exercise. **Journal of applied physiology**, 119, n. 2, p. 124-134, 2015.
- DONG, S.; CHENG, Y.; YANG, J.; LI, J. *et al.* MicroRNA expression signature and the role of microRNA-21 in the early phase of acute myocardial infarction. **Journal of Biological Chemistry**, 284, n. 43, p. 29514-29525, 2009.

- FERNÁNDEZ-SANJURJO, M.; DE GONZALO-CALVO, D.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, B.; DÍEZ-ROBLES, S. *et al.* Circulating microRNA as emerging biomarkers of exercise. **Exercise and sport sciences reviews**, 46, n. 3, p. 160-171, 2018.
- FISCHER, C. P. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance. **Exerc immunol rev**, 12, n. 6-33, p. 41, 2006.
- FRIEDMAN, R. C.; FARH, K. K.-H.; BURGE, C. B.; BARTEL, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome research**, 19, n. 1, p. 92-105, 2009.
- GUINEA-VINIEGRA, J.; JIMÉNEZ, M.; SCHONTHALER, H. B.; NAVARRO, R. *et al.* Targeting miR-21 to treat psoriasis. **Science translational medicine**, 6, n. 225, p. 225re221-225re221, 2014.
- HAWLEY, J. A.; HARGREAVES, M.; JOYNER, M. J.; ZIERATH, J. R. Integrative biology of exercise. **Cell**, 159, n. 4, p. 738-749, 2014.
- HORAK, M.; NOVAK, J.; BIENERTOVA-VASKU, J. Muscle-specific microRNAs in skeletal muscle development. **Developmental biology**, 410, n. 1, p. 1-13, 2016.
- LI, Y.; YAO, M.; ZHOU, Q.; CHENG, Y. *et al.* Dynamic regulation of circulating microRNAs during acute exercise and long-term exercise training in basketball athletes. **Frontiers in physiology**, 9, p. 282, 2018.
- LITTLE, R. J.; RUBIN, D. B. **Statistical analysis with missing data**. John Wiley & Sons, 2019. 0470526793.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. **methods**, 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- MCCARTHY, J. J.; ESSER, K. A. MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy. **Journal of applied physiology**, 2007.
- MENDELL, J. T.; OLSON, E. N. MicroRNAs in stress signaling and human disease. **Cell**, 148, n. 6, p. 1172-1187, 2012.
- MOOREN, F. C.; VIREECK, J.; KRÜGER, K.; THUM, T. Circulating Micrnas As Potential Biomarkers Of Aerobic Exercise: 2385 Board# 90 May 30, 9. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, 46, n. 5S, p. 640, 2014.
- MORITANI, T. Neural factors versus hypertrophy in the time course of muscle strength gain. **American journal of physical medicine**, 58, n. 3, p. 115-130, 1979.
- NEME IDE, B.; ALESSANDRO SOARES NUNES, L.; BREZIKOFER, R.; MACEDO, D. V. Time course of muscle damage and inflammatory responses to resistance training with eccentric overload in trained individuals. **Mediators of inflammation**, 2013, 2013.
- NIELSEN, S.; ÅKERSTRÖM, T.; RINNOV, A.; YFANTI, C. *et al.* The miRNA plasma signature in response to acute aerobic exercise and endurance training. **PloS one**, 9, n. 2, p. e87308, 2014.

- PIGATI, L.; YADDANAPUDI, S. C.; IYENGAR, R.; KIM, D.-J. *et al.* Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. **PloS one**, 5, n. 10, 2010.
- PILEGAARD, H.; SALTIN, B.; NEUFER, P. D. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 α gene in human skeletal muscle. **The Journal of physiology**, 546, n. 3, p. 851-858, 2003.
- RATAMESS, N. A.; ROSENBERG, J. G.; KANG, J.; SUNDBERG, S. *et al.* Acute oxygen uptake and resistance exercise performance using different rest interval lengths: The influence of maximal aerobic capacity and exercise sequence. **The Journal of Strength & Conditioning Research**, 28, n. 7, p. 1875-1888, 2014.
- ROBERGS, R. A.; GORDON, T.; REYNOLDS, J.; WALKER, T. B. Energy expenditure during bench press and squat exercises. **Journal of strength and conditioning research**, 21, n. 1, p. 123, 2007.
- ROY, S.; SEN, C. K. MiRNA in innate immune responses: novel players in wound inflammation. **Physiological genomics**, 43, n. 10, p. 557-565, 2011.
- SCHROEDER, E. T.; VILLANUEVA, M.; WEST, D. D.; PHILLIPS, S. M. Are acute post-resistance exercise increases in testosterone, growth hormone, and IGF-1 necessary to stimulate skeletal muscle anabolism and hypertrophy? **Medicine & Science in Sports & Exercise**, 45, n. 11, p. 2044-2051, 2013.
- SHEEDY, F. J. Turning 21: induction of miR-21 as a key switch in the inflammatory response. **Frontiers in immunology**, 6, p. 19, 2015.
- SHI, C.; LIANG, Y.; YANG, J.; XIA, Y. *et al.* MicroRNA-21 knockout improve the survival rate in DSS induced fatal colitis through protecting against inflammation and tissue injury. **PloS one**, 8, n. 6, p. e66814, 2013.
- SMILIOS, I.; PILIANIDIS, T.; KARAMOUZIS, M.; TOKMAKIDIS, S. P. Hormonal responses after various resistance exercise protocols. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, 35, n. 4, p. 644-654, 2003.
- STARON, R.; KARAPONDO, D.; KRAEMER, W.; FRY, A. *et al.* Skeletal muscle adaptations during early phase of heavy-resistance training in men and women. **Journal of applied physiology**, 76, n. 3, p. 1247-1255, 1994.
- TESCH, P. A.; WRIGHT, J. E.; VOGEL, J. A.; DANIELS, W. L. *et al.* The influence of muscle metabolic characteristics on physical performance. **European journal of applied physiology and occupational physiology**, 54, n. 3, p. 237-243, 1985.
- THOMPSON, W. R.; GORDON, N. F.; PESCATELLO, L. S. **ACSM's guidelines for exercise testing and prescription**. Lippincott Williams & Wilkins, 2010. 0781769035.
- THUM, T.; GROSS, C.; FIEDLER, J.; FISCHER, T. *et al.* MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. **Nature**, 456, n. 7224, p. 980-984, 2008.

UHLEMANN, M.; MÖBIUS-WINKLER, S.; FIKENZER, S.; ADAM, J. *et al.* Circulating microRNA-126 increases after different forms of endurance exercise in healthy adults. **European journal of preventive cardiology**, 21, n. 4, p. 484-491, 2014.

WEBER, M.; BAKER, M. B.; MOORE, J. P.; SEARLES, C. D. MiR-21 is induced in endothelial cells by shear stress and modulates apoptosis and eNOS activity. **Biochemical and biophysical research communications**, 393, n. 4, p. 643-648, 2010.

YANG, J.; CHRISTOPHI, C. A.; FARIOLI, A.; BAUR, D. M. *et al.* Association between push-up exercise capacity and future cardiovascular events among active adult men. **JAMA network open**, 2, n. 2, p. e188341-e188341, 2019.

ZALDIVAR, F.; WANG-RODRIGUEZ, J.; NEMET, D.; SCHWINDT, C. *et al.* Constitutive pro-and anti-inflammatory cytokine and growth factor response to exercise in leukocytes. **Journal of applied physiology**, 100, n. 4, p. 1124-1133, 2006.

4.2 Artigo 2: Influência do incremento do condicionamento físico sobre a expressão de c-miRNAs específicos e sua relação com marcadores fisiológicos em homens saudáveis.

RESUMO

Objetivo: Avaliar a influência do incremento de condicionamento físico, por meio de treinamento crônico sobre a expressão de c-miRNAs circulares (c-miRNAs) específicos e sua relação com marcadores fisiológicos em homens saudáveis. **Métodos:** Os participantes foram classificados em dois grupos: não condicionados (n=10) - $VO_{2max} < 41$ ml/kg/min e condicionados (n=10) - $VO_{2max} > 51$ ml/kg/min, de acordo com a classificação do *American College of Sports Medicine*. Os participantes foram envolvidos em um treinamento contínuo de 12 semanas de corrida. Foram coletadas amostras de sangue antes (basal) e após este período. Além disso, a força de membros inferiores e de coluna lombar foram aferidas. **Resultados:** As variáveis relacionadas à condição física (força e VO_{2max}) aumentaram em ambos os grupos, demonstrando a eficácia do treinamento para o incremento no condicionamento físico dos participantes não condicionados. A expressão dos c-miRNAs selecionados foi distinta entre os grupos, somente no grupo não condicionado, a expressão dos c-miR-133a e -21-3p foi reduzida após o incremento do condicionamento físico, gerado pelo treinamento crônico. **Conclusão:** Nossos resultados sugerem que os c-miRNAs podem ser promissores biomarcadores capazes de indicar o processo de adaptação causado pelo exercício físico crônico.

Palavras Chaves: Exercício crônico, c-miRNAs, condicionamento físico.

4.2.1 Introdução

O exercício crônico refere-se à exposição regular de sessões de exercícios que geram adaptações sistêmicas, representando as alterações morfofuncionais que diferenciam um indivíduo bem condicionado fisicamente de um mal condicionado (GARBER; BLISSMER;

DESCHENES; FRANKLIN *et al.*, 2011). O treinamento de *endurance* promove adaptações fisiológicas como a remodelação miocárdica (BAGGISH; WANG; WEINER; ELINOFF *et al.*, 2008), hipertrofia do músculo esquelético (KIESSLING; PILSTRÖM; KARLSSON; PIEHL, 1973) e angiogênese vascular periférica (GUTE; FRAGA; LAUGHLIN; AMANN, 1996).

No entanto, as adaptações fisiológicas que ocorrem em resposta ao treinamento físico diferem de acordo com a predisposição genética (WOLFARTH; RANKINEN; HAGBERG; LOOS *et al.*, 2014) e a modalidade do exercício (HOLLOSZY; COYLE, 1984; KRAEMER; FLECK; EVANS, 1996). Essas adaptações são induzidas por uma variedade de mecanismos, incluindo alterações na expressão gênica e aumento da síntese de proteínas (COFFEY; HAWLEY, 2007), mas os mecanismos específicos que conduzem essas modificações moleculares permanecem pouco compreendidos. Está definido que as adaptações ao exercício físico regular envolvem uma alteração gradual no conteúdo de proteínas e atividades enzimáticas por meio de ativação e/ou repressão de vias de sinalização específicas que regulam a transcrição e a tradução e têm efeitos sobre a expressão gênica (PILEGAARD; SALTIN; NEUFER, 2003).

Os miRNAs são pequenos RNAs não-codificantes e variam de 18 a 25 nucleotídeos de comprimento. Regulam a expressão gênica pós-transcricional por meio da inibição da tradução ou da degradação do RNAm alvo (FRIEDMAN; FARH; BURGE; BARTEL, 2009). Além da localização intracelular, na qual ocorre a sua biogênese, os miRNAs foram encontrados em diferentes fluidos corporais, incluindo o sangue, sendo denominados de microRNAs circulantes (c-miRNAs), os quais podem ser ativamente ou passivamente liberados dos tecidos e podem regular a expressão gênica de células distantes, agindo como um verdadeiro mecanismo de comunicação intercelular (MENDELL; OLSON, 2012). No entanto, os mecanismos precisos subjacentes à secreção, como a captação e a atuação dos c-miRNAs nas células receptoras ainda são desconhecidos (BOON; VICKERS, 2013; SAPP; SHILL; ROTH; HAGBERG, 2017).

O exercício físico é capaz de alterar os perfis dos c-miRNAs de indivíduos saudáveis e podem ser usados como potenciais biomarcadores ou mediadores de adaptações fisiológicas (AOI; ICHIKAWA; MUNE; TANIMURA *et al.*, 2013; BAGGISH; HALE; WEINER; LEWIS *et al.*, 2011; BANZET; CHENNAOUI; GIRARD; RACINAIS *et al.*, 2013; MOOREN; VIERECK; KRÜGER; THUM, 2014). Com base em suas funções nas respostas induzidas pelo exercício, alguns c-miRNAs tem sido destacados como os Myomirs miR-1-3p, -133a, -133b e -206 (mediadores da função muscular) e os c-inflamamirs miR-21-3p e miR-146-3p (mediadores do processo inflamatório) (BAGGISH; HALE; WEINER; LEWIS *et al.*, 2011; HORAK; NOVAK; BIENERTOVA-VASKU, 2016). Apesar de alguns autores demonstrarem

alterações nos níveis de c-miRNAs, após a realização de programas de treinamento de endurance, em função dos diferentes tipos de exercícios e delineamento dos estudos, o comportamento da expressão de determinados c-miRNAs é divergente (BAGGISH; HALE; WEINER; LEWIS *et al.*, 2011; MOOREN; VIREECK; KRÜGER; THUM, 2014; NIELSEN; ÅKERSTRÖM; RINNOV; YFANTI *et al.*, 2014; WARDLE; BAILEY; KILIKEVICIUS; MALKOVA *et al.*, 2015).

O condicionamento físico é uma variável pouco estudada e merece mais atenção, pois, possivelmente, influencia a expressão dos c-miRNAs e, conseqüentemente, a regulação gênica que induz as adaptações fisiológicas ao exercício crônico. Considerando o exposto, a hipótese do presente estudo é que o incremento do condicionamento físico implica em modificações no padrão de expressão c-miRNAs, com funções estabelecidas no tecido muscular e no processo inflamatório. Para testar a hipótese, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência do incremento de condicionamento físico, por meio de treinamento crônico sobre a expressão de c-miRNAs específicos e sua relação com marcadores fisiológicos em homens saudáveis.

4.2.2 Métodos

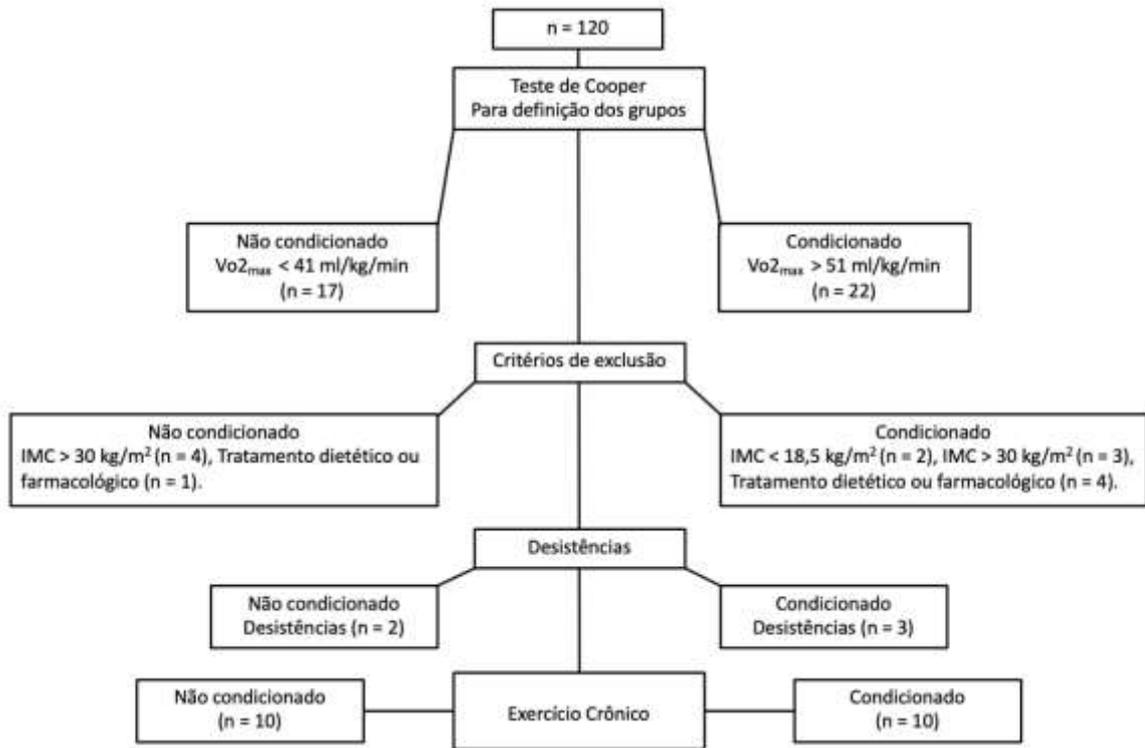
4.2.2.1 Participantes

Cento e vinte homens adultos ($18 \pm 0,5$ anos), que se alistaram no serviço militar no Centro de Treinamento Físico do Exército, foram convidados a participar do presente estudo. Todos aceitaram participar e exerciam atividades recreacionais como esportes individuais (corrida, natação) ou coletivo (futebol).

Os participantes foram classificados de acordo com condicionamento físico (Teste de Cooper) e foram excluídos os que: 1) apresentavam VO_{2max} entre 41 e 51 ml/kg/min (n=81); 2) doença crônica; 3) índice de massa corporal (IMC) $<18,5$ kg/m² e >30 kg/m² (n=9); 4) estavam em tratamento dietético ou farmacológico (n=5). Nenhum participante apresentava intolerância a glicose ou estava em tratamento dietético ou farmacológico. Após o processo de exclusão, os indivíduos participaram de um treinamento de corrida contínua por 12 semanas. Durante a execução do treinamento, cinco indivíduos desistiram de participar do estudo (n=3 condicionados, n=2 não condicionados). Com isso concluíram todas as fases do estudo 10 indivíduos em cada grupo. O detalhamento do fluxo de inclusão e exclusão ao longo do estudo é demonstrado na Figura 1.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Salgado de Oliveira – Universo (CAAE: 55948016.1.0000.5282) e foi realizado de acordo com a Declaração de Helsinque. O objetivo do estudo e seus possíveis riscos e desconfortos foram explicados por escrito e oralmente aos participantes antes da obtenção do consentimento por escrito.

Figura 1- Fluxograma de inclusão e exclusão dos participantes do estudo



4.2.2.2 Delineamento do estudo

Os participantes realizaram o teste de Cooper para avaliar o grau de aptidão aeróbia. O teste de corrida/caminhada de 12 minutos de Cooper foi realizado em uma pista oficial de atletismo de 400 metros. Os participantes foram orientados a percorrer a máxima distância possível no tempo de 12 minutos. Para a estimativa do VO_{2max} foi utilizada uma equação baseada na máxima distância percorrida em metros (DP): VO_{2max} (ml/kg/min) = $(DP - 504,9)/44,73$ (COOPER, 1968).

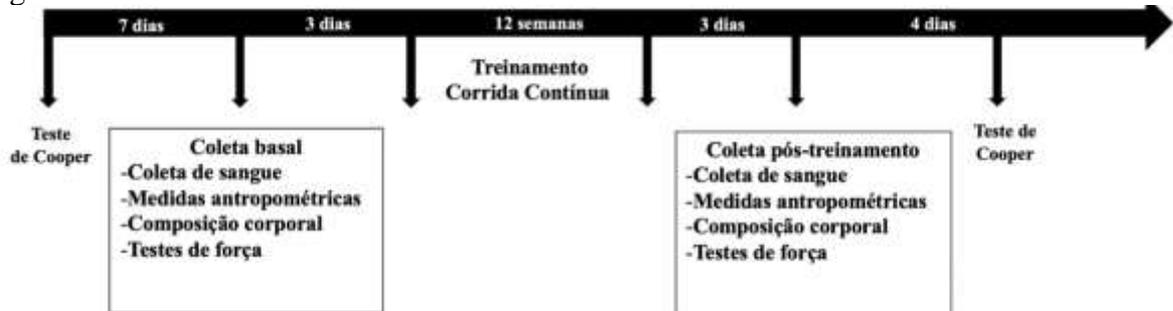
A partir dos resultados, os participantes foram classificados em dois grupos: não condicionados (aptidão aeróbica ruim; $VO_{2max} < 41$ ml/kg/min) e condicionados (aptidão aeróbica excelente; $VO_{2max} > 51$ ml/kg/min), de acordo com a classificação do *American College of Sports Medicine* (THOMPSON; GORDON; PESCATELLO, 2010). Após as 12 semanas de treinamento, os participantes foram novamente classificados com o objetivo de avaliar se houve modificação no condicionamento físico.

Classificação do ACSM para potência aeróbia máxima (VO_{2max}): > 56 ml/kg/min – superior; > 51 ml/kg/min – excelente; > 45 ml/kg/min – bom; > 42 ml/kg/min – razoável; > 38 ml/kg/min – ruim; e > 26 ml/kg/min – muito ruim.

A primeira fase de coletas de dados (basal) ocorreu após 7 dias da realização do teste de Cooper, com o objetivo de eliminar os efeitos das alterações metabólicas transitórias que poderiam permanecer após realização do referido teste (CLARKSON, 1997).

No tempo basal, após 8h de jejum foi coletado sangue venoso, foram realizados testes de força (membros inferiores e lombar), medidas antropométricas e avaliação da composição corporal, para caracterização do grupo. Para isolar a possível influência dos testes de força, os grupos iniciaram o treinamento de corrida contínua após o terceiro dia. O treinamento teve duração de 12 semanas e a segunda coleta de dados, que incluiu nova coleta de sangue e testes de força de membros inferiores e lombar, ocorreu três dias após o término do treinamento. Finalizando o estudo, após quatro dias da segunda avaliação, foi realizado novo teste de Cooper para reclassificação dos participantes. O detalhamento do delineamento do estudo é demonstrado na Figura 2.

Figura 2 – Detalhamento do delineamento do estudo



4.2.2.3 Testes de força

O principal objetivo da realização dos testes de força foi verificar a existência de discrepâncias entre os grupos classificados de acordo com a capacidade aeróbia. A força muscular da região lombar e de membros inferiores foi determinada pelos transdutores de força (EMG System do Brasil) com capacidade de 1000kgf acoplados em módulo de aquisição de sinais (EMG System do Brasil) com taxa de amostragem de 1kHz.

No teste de força de tração lombar os participantes ficaram em pé sobre a plataforma com os joelhos totalmente estendido, tronco entre 75° a 85° de flexão e segurando a barra com a pegada pronada com os cotovelos estendidos.

No teste de força de membros inferiores os participantes ficaram em pé sobre a plataforma com o tronco ereto, os joelhos flexionados em ângulo de 130° a 140° e segurando a barra com a pegada pronada posicionando-a sobre as coxas.

Em todos os testes de força foram executadas 3 tentativas com intervalo entre as medidas de 15 segundos e os participantes foram instruídos a aplicar força máxima por 3 segundos.

4.2.2.24 Antropometria e composição corporal

A massa corporal total foi aferida em balança Filizola com precisão de 0,1 kg e a estatura por estadiômetro com aproximação de 0,5 cm. Foi calculado o índice de massa corporal (IMC) dividindo a massa corporal total pela estatura elevada ao quadrado (kg/m^2).

A composição corporal foi determinada por absorciometria de emissão de raio-X de dupla energia (DXA), de marca iDXA-Lunar, software Encore 2008 versão 12.20, GE Healthcare, no modo de escaneamento total automático. Para a realização do exame, os participantes foram orientados para utilizar roupas leves sem acessórios de metal.

Os participantes foram colocados em decúbito dorsal e solicitados a permanecerem imóveis até o final do procedimento. O mesmo operador realizou todas as varreduras e as medições no bloco de calibração (diariamente) e no simulador de coluna de calibração (semanal), fornecidas pelo fabricante, apresentaram coeficientes de variação $< 0,7\%$.

4.2.2.5 Treinamento físico

Ambos os grupos foram submetidos a um treinamento aeróbio de corrida contínua por 12 semanas, executado três vezes por semana, sempre na parte da manhã.

A determinação do volume e intensidade inicial foi baseada na planilha de desenvolvimento de padrão de desempenho para corrida contínua do Manual de Treinamento Físico Militar (EB20-MC-10.350). O grupo condicionado iniciou o treinamento com volume de 4500 m e intensidade de 70% do $\text{VO}_{2\text{max}}$. Foi aplicado um incremento semanal de 368 metros no volume e 0,11% do $\text{VO}_{2\text{max}}$ na intensidade até a semana 8. Entre as semanas 9 a 12, houve um decréscimo semanal de 680 metros e incremento de 1,62% do $\text{VO}_{2\text{max}}$. O grupo não condicionado iniciou o treinamento com volume de 3700 m e intensidade de 70% do $\text{VO}_{2\text{max}}$. Foi aplicado um incremento semanal de 300 metros no volume e 0,07% do $\text{VO}_{2\text{max}}$ na intensidade. Entre as semanas 9 a 12, houve um decréscimo semanal de 550 metros e

incremento de 1,36% do VO_{2max} . Os participantes foram instruídos a manter suas rotinas alimentares.

4.2.2.6 Coletas de sangue

Tanto no momento basal quanto no final, foi coletado sangue venoso após 8h de jejum. As punções venosas foram realizadas por profissionais capacitados. Em cada tempo foram coletados 20 ml de sangue em tubo sem anticoagulante. Após centrifugação por 15 minutos a 2.500 rpm o soro foi armazenado em alíquotas de 500 μ L a -80° C até o momento das análises.

4.2.2.7 c-miRNAs selecionados

Com base em suas funções biológicas conhecidas na adaptação induzida pelo exercício, incluindo a hipertrofia do músculo esquelético, remodelação, metabolismo, angiogênese, regeneração, além da sua atuação no processo inflamatório, foram selecionados seis c-miRNAs: Myomirs miR-1-3p, -133a, -133b e -206 (mediadores da função muscular) e c-inflamamirs miR-21-3p e miR-146-3p (mediadores do processo inflamatório) (BAGGISH; HALE; WEINER; LEWIS *et al.*, 2011; HORAK; NOVAK; BIENERTOVA-VASKU, 2016).

4.2.2.8 Análise da expressão de c-miRNAs de soro humano

Os miRNAs foram isolados de amostras de soro utilizando-se o kit miRNeasySerum/Plasma Kit (Qiagen, Hilden, Germany). A expressão relativa dos miRNA foi mensurada usando o equipamento AppliedBiosystems 7500 Fast Real-Time PCR System e o kit TaqManMicroRNAAssay (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA), depois de feita a síntese de cDNA com o kit TaqManTranscriptionReversionMicroRNA kit (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA). As reações foram feitas em duplicatas em placas de 96 poços (MicroAmpOptical 96-Well Reaction Plate, AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA). Foram utilizados ensaios TaqMan (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA) para análise da expressão dos seguintes c-miRNAs: miR-1-3p (477820), -133a (478511), -133b (480871), -206 (477968), -21-3p (477973) e -146-3p (478714). A expressão relativa foi calculada pela comparação com uma amostra calibradora controle, depois que os valores de CT (CycleThreshold) foram normalizados pelo gene do miR451 (478107) (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA). Todos os procedimentos para análises de expressão dos miRNA

seguiram as instruções dos respectivos fabricantes. Os resultados do RT-PCR foram analisados pelo método $\Delta\Delta C_t$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

4.2.2.9 Análises estatísticas

As características gerais dos participantes são apresentadas como média \pm desvio padrão. Os níveis de força, VO_{2max} e composição corporal são apresentados como mediana e intervalo interquartil (IIQ). Para a comparação entre os grupos nos diferentes momentos foi utilizado o Teste não-paramétrico de Kruskal-wallis com post hoc de Mann-Whitney. Para a comparação intragrupo foi utilizado o teste não-paramétrico de Friedman com post hoc de Wilcoxon. Para as análises de correlação foi utilizado o método de Spearman. O critério de determinação de significância adotado foi o nível de 5% e a análise estatística foi processada pelo software estatístico SPSS.

4.2.3 Resultados

4.2.3.1 Características dos participantes

As características basais dos participantes são mostradas na Tabela 1. A idade dos participantes foi semelhante entre os grupos, assim como a estatura, IMC e MLG ($P > 0,005$).

Tabela 1 – Características gerais dos participantes, de acordo com a classificação do condicionamento físico (Não Condicionado e Condicionado)

Características	Não Condicionado (n= 10)	Condicionado (n=10)	P-valor
Idade (anos)	18,5 \pm 0,5	18,5 \pm 0,5	1,000
Altura (cm)	175,2 \pm 5,6	171,3 \pm 6,7	0,218
MCT (kg)	72,7 \pm 10,1	63 \pm 5	0,023
IMC (kg/m ²)	24 \pm 2,9	21,6 \pm 1,8	0,123
MG (kg)	17,4 \pm 6,7	8,8 \pm 3,1	0,002
MLG (kg)	55,3 \pm 4,7	54,1 \pm 4,1	0,853
% G (%)	23,3 \pm 6,4	13,9 \pm 4,3	0,001
Condição Física			
VO ₂ max (l/min/kg)	33,2 \pm 6	54,6 \pm 3	< 0,001
MMI (kgf)	109,1 \pm 17,1	100,9 \pm 39,2	0,203
LMB (kgf)	108,7 \pm 33,6	115,1 \pm 26,3	0,346

Os valores são apresentados em média e desvio padrão. (MCT) massa corporal total, (IMC) índice de massa corporal, (MG) massa gorda, (MLG) massa livre de gordura, (%G) percentual de gordura, (MMI) força de membros inferiores, (LMB) força lombar.

Os indivíduos condicionados apresentaram menor massa corporal total, massa gorda e percentual de gordura do que os não condicionados ($P < 0,005$). Entre as variáveis relacionadas à condição física, somente o VO_{2max} foi maior nos indivíduos condicionados ($P < 0,001$).

4.2.3.2 Alterações nos marcadores fisiológicos em resposta ao exercício crônico

O VO_{2max} e os níveis de força de membros inferiores e lombar apresentaram o mesmo comportamento em ambos os grupos, com aumento após o período de treinamento. Sendo que o VO_{2max} do grupo condicionado permaneceu mais elevado (Tabela 2).

As variáveis relacionadas à condição física apresentaram o mesmo comportamento nos grupos com o aumento semelhante dos níveis de força de membros inferiores e lombar e aumento do VO_{2max} (Tabela 2). O grupo não condicionado, de acordo com a classificação dos valores de VO_{2max} , apresentou a seguinte distribuição: um (10%) participante alcançou a faixa do “excelente”, seis (60%) participantes alcançaram a faixa “bom”, dois (20%) participantes alcançaram a faixa “razoável” e um (10%) participante permaneceu na faixa ruim. No grupo condicionado sete (70%) participantes alcançaram a faixa superior, dois (20%) participantes permaneceram na faixa excelente e um (10%) participante passou para a faixa bom.

4.2.3.3 Expressão dos c-miRNAs antes e depois do exercício crônico

No momento basal, os c-miR-133b, -146-3p e -206 não foram detectados em ambos os grupos. As expressões dos c-miR-133a ($p=0,015$) e -21-3p ($p=0,035$) foram maiores no grupo não condicionado, enquanto a expressão do c-miR-1-3p apresentou elevada variação em ambos os grupos, o que prejudicou possíveis interpretações.

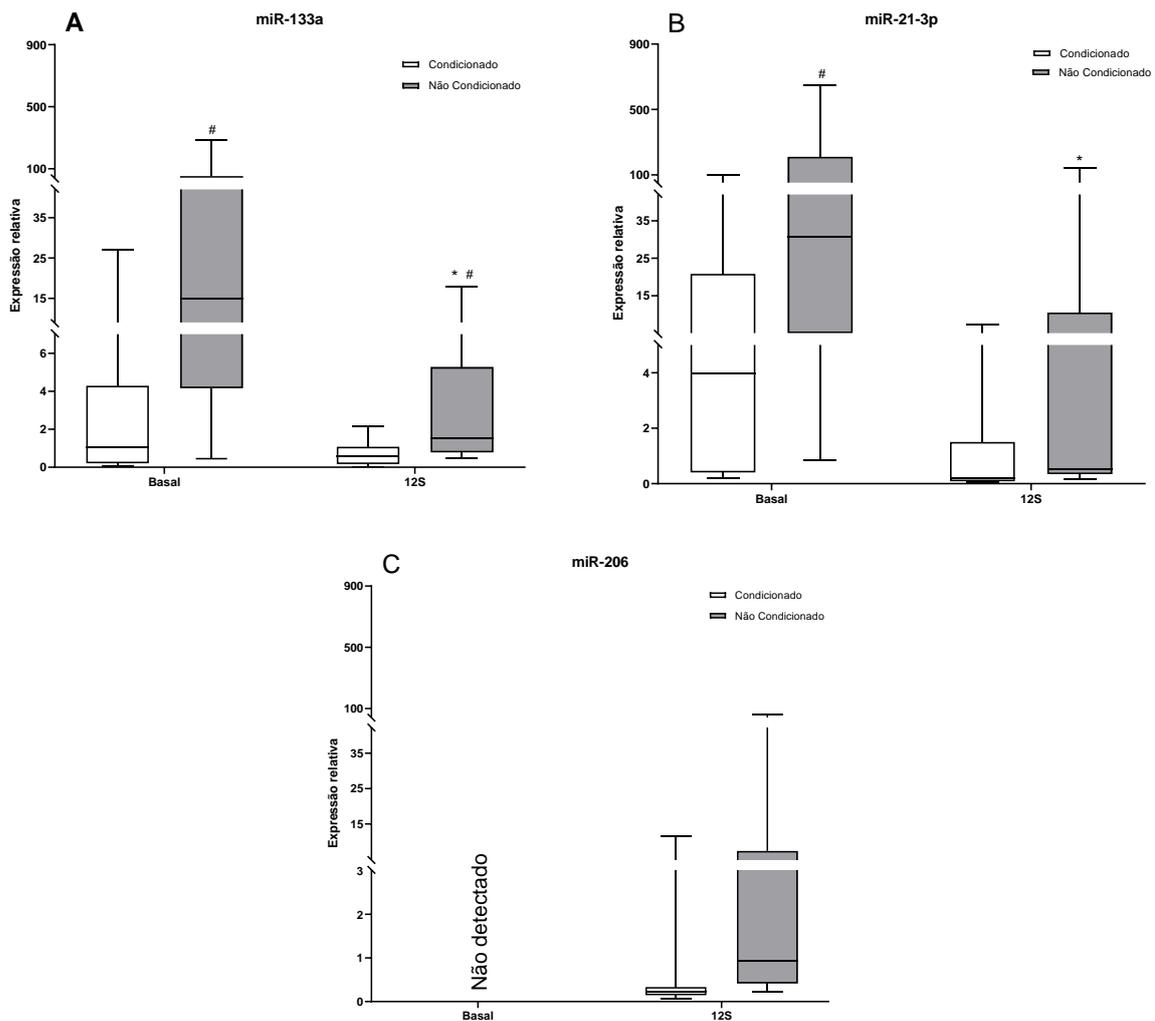
As respostas adaptativas da expressão relativa dos c-miRNAs, antes e após o período de treinamento crônico, são apresentadas na Figura 3. A realização do treinamento crônico somente induziu alterações no padrão de expressão dos c-miRNAs específicos do grupo não condicionado, no qual a expressão do c-miR-133a ($p=0,013$) e -21-3p ($p=0,037$) foram reduzidas após a realização do treinamento (Figura 3, A e B). O c-miR-206 apresentou expressão relativa, em ambos os grupos, após o período de treinamento crônico (Figura 3, C). Não foram observadas correlações entre as variáveis estudadas em ambos os grupos classificados de acordo com o condicionamento.

Tabela 2- Mediana (IIQ) das variáveis relacionadas à condição física (potência aeróbia máxima, níveis de força lombar e membros inferiores) e composição corporal, de acordo com a classificação pelo condicionamento físico aeróbio

Marcadores	Não Condicionados (n= 10)			Condicionados (n= 10)		
	Basal	Pós-treino	P-valor	Basal	Pós-treino	P-valor
VO ₂ max (l/min/kg)	35,6 [#] (28,9 – 37,8)	46,8 [#] (44,6 – 49,6)	0,005	53,5 (52,9 – 58,0)	60,2 (53,5 – 60,3)	0,02
FMI (kgf)	101,6 (96,4 – 122,5)	143,2 (124,7 – 166,8)	0,005	91,8 (72,8 – 135,5)	145,5 (140,0 – 165,7)	0,005
LMB (kgf)	101,6 (86,3 – 144,4)	165,0 (143,5 – 180,4)	0,005	114,1 (95,2 – 127,5)	180,4 (160,3 – 209,3)	0,005

FMI – força de membros inferiores, LMB – força lombar. Valores representados por mediana (intervalo interquartil), # Diferença significativa entre os grupos.

Figura 3 -.Boxplots (mediana, percentil 25 e percentil 75) do comportamento da expressão dos c-miRNAs selecionados após treinamento crônico em indivíduos condicionados e não condicionados. c-miR-133a (A), c-miR-21-3p (B), c-miR-206 (C). * diferença significativa comparado ao momento basal e # diferença significativa entre os grupos.



4.2.4 Discussão

O condicionamento físico está relacionado à expressão de c-miRNAs, em indivíduos de ambos os sexos, em situação de repouso (BYE; RØSJØ; ASPENES; CONDORELLI *et al.*, 2013). Para o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a mostrar a influência do incremento do condicionamento físico, por meio de treinamento de endurance, sobre a expressão de c-miRNAs mediadores da função muscular (c-miR-1-3p, -133a, -133b e -206) e do processo inflamatório (c-miR-21-3p e -146-3p).

No presente estudo, o plano de treinamento de corrida contínua, durante 12 semanas, gerou adaptações sistêmicas nos participantes e foi observado, em ambos os grupos, um comportamento semelhante das variáveis relacionadas à condição física, com incremento da força de membros inferiores e coluna lombar, assim como o aumento do VO_{2max} . Apesar da semelhança entre os grupos, a expressão dos c-miRNAs selecionados mostrou comportamento diferenciado em resposta ao treinamento proposto.

O miR-133a regula a hipertrofia, promove a diferenciação e a regeneração dos mioblastos, regula a angiogênese, controla o estresse oxidativo e reduz a migração celular (CHEN; MANDEL; THOMSON; WU *et al.*, 2006). Foi observado que o seu nível de expressão é regulado negativamente após sobrecarga muscular funcional, permitindo a expressão de RNAm alvos como o HGF e IGF-1, que possuem papéis bem estabelecidos na hipertrofia do músculo esquelético (MCCARTHY; ESSER, 2007a). Além disso, foi observado que a expressão do miR-133a foi reduzida após um treinamento de endurance de 12 semanas (NIELSEN; ÅKERSTRÖM; RINNOV; YFANTI *et al.*, 2014).

No presente estudo, a expressão do c-miR-133a do grupo não condicionado, embora tenha sido reduzida após o incremento de condicionamento físico, foi maior do que a do grupo condicionado durante todo o estudo. Este resultado é inédito e sugestivo de que o condicionamento físico regula o c-miR-133a, pois sua expressão é maior em indivíduos não condicionados. No entanto, os mecanismos subjacentes ao direcionamento e captação pelas células receptoras e sua forma de atuação ainda não foram esclarecidos (BOON; VICKERS, 2013; RAYNER; HENNESSY, 2013).

Os c-miR-133b e -206, que regulam RNAm alvos que atuam na regeneração bem como na proliferação e diferenciação de mioblastos (HORAK; NOVAK; BIENERTOVA-VASKU, 2016) e o miR-146-3p, que atua no processo inflamatório (BAGGISH; HALE; WEINER; LEWIS *et al.*, 2011), apresentaram expressões abaixo do limite detectável, em ambos os grupos. Nielsen *et al.* (2014) observaram resultado semelhante (NIELSEN; ÅKERSTRÖM; RINNOV;

YFANTI *et al.*, 2014), apesar dos altos níveis de expressão intracelular, fato que reforça a concepção de que o mecanismo de secreção celular de c-miRNAs é um processo seletivo, sendo alguns destinados a serem secretados e outros a permanecerem no compartimento intracelular (PIGATI; YADDANAPUDI; IYENGAR; KIM *et al.*, 2010).

O c-miR-206 atua na proliferação e diferenciação de mioblastos e na regeneração muscular (HORAK; NOVAK; BIENERTOVA-VASKU, 2016), reprimindo o gene HDAC4, um repressor da transcrição de muitos genes musculares, e os genes Pax3 e Pax7 que aumentam a capacidade proliferativa das células satélites e prejudicam a diferenciação miogênica (CHEN; TAO; LI; DENG *et al.*, 2010). No presente estudo, o c-miR-206, embora não tenha sido detectado no momento basal, apresentou expressão relativa em ambos os grupos após o período de treinamento. Possivelmente, a realização de exercício físico regularmente induziu o aumento da expressão do miR-206, em função da modulação necessária para a regeneração das células musculares contribuindo para as adaptações geradas pelo exercício físico.

O c-miR-21-3p regula muitas funções relevantes ao exercício entre elas, o processo inflamatório, a contratilidade do músculo esquelético e a adaptação a hipóxia/isquemia (DONG; CHENG; YANG; LI *et al.*, 2009; SHEEDY, 2015; WEBER; BAKER; MOORE; SEARLES, 2010). A ablação do c-miR-21-3p, em alguns modelos experimentais, demonstrou maior proteção contra doenças inflamatórias, indicando que a atividade do c-miR-21-3p promove o processo inflamação (GUINEA-VINIEGRA; JIMÉNEZ; SCHONTHALER; NAVARRO *et al.*, 2014; SHI; LIANG; YANG; XIA *et al.*, 2013). Nielsen *et al.* (2014) demonstrou que a expressão do c-mir-21-3p foi reduzida após um período de 12 semanas de treinamento com ciclo ergômetro (NIELSEN; ÅKERSTRÖM; RINNOV; YFANTI *et al.*, 2014). Nossos resultados demonstraram que a expressão do c-miR-21-3p no grupo não condicionado, embora elevada no momento basal, comparada com o grupo condicionado, reduziu drasticamente após o período de treinamento, se igualando ao grupo condicionado. Possivelmente, esta é uma resposta adaptativa ao incremento do condicionamento físico deste grupo.

4.2.5 Conclusão

Após o período de treinamento, os grupos apresentaram comportamento semelhante das variáveis relacionadas à condição física, porém a expressão dos c-miRNAs selecionados foi distinta entre os grupos. A realização do exercício crônico induziu alterações no padrão de

expressão dos c-miRNAs mediadores da função muscular e do processo inflamatório somente no grupo não condicionado.

O condicionamento físico influenciou na expressão dos c-miRNAs específicos, tanto na condição de repouso quanto após a realização de exercício crônico. A expressão dos c-miR-21-3p e -133a no grupo não condicionado foi modificada em função do incremento do condicionamento físico, gerado pelo treinamento crônico. Nossos resultados sugerem que os c-miRNAs podem ser promissores biomarcadores capazes de indicar o processo de adaptação causado pelo exercício físico crônico.

4.2.6 Referências

- AOI, W.; ICHIKAWA, H.; MUNE, K.; TANIMURA, Y. *et al.* Muscle-enriched microRNA miR-486 decreases in circulation in response to exercise in young men. **Frontiers in physiology**, 4, p. 80, 2013.
- BAGGISH, A. L.; HALE, A.; WEINER, R. B.; LEWIS, G. D. *et al.* Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training. **The Journal of physiology**, 589, n. 16, p. 3983-3994, 2011.
- BAGGISH, A. L.; WANG, F.; WEINER, R. B.; ELINOFF, J. M. *et al.* Training-specific changes in cardiac structure and function: a prospective and longitudinal assessment of competitive athletes. **Journal of applied physiology**, 104, n. 4, p. 1121-1128, 2008.
- BANZET, S.; CHENNAOUI, M.; GIRARD, O.; RACINAIS, S. *et al.* Changes in circulating microRNAs levels with exercise modality. **Journal of applied physiology**, 115, n. 9, p. 1237-1244, 2013.
- BOON, R. A.; VICKERS, K. C. Intercellular transport of microRNAs. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, 33, n. 2, p. 186-192, 2013.
- BYE, A.; RØSJØ, H.; ASPENES, S. T.; CONDORELLI, G. *et al.* Circulating microRNAs and aerobic fitness—the HUNT-Study. **PloS one**, 8, n. 2, 2013.
- CHEN, J.-F.; MANDEL, E. M.; THOMSON, J. M.; WU, Q. *et al.* The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. **Nature genetics**, 38, n. 2, p. 228-233, 2006.
- CHEN, J.-F.; TAO, Y.; LI, J.; DENG, Z. *et al.* microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. **Journal of Cell Biology**, 190, n. 5, p. 867-879, 2010.
- CLARKSON, P. Eccentric exercise and muscle damage. **International Journal of Sports Medicine**, 18, n. S 4, p. S314-S317, 1997.
- COFFEY, V. G.; HAWLEY, J. A. The molecular bases of training adaptation. **Sports medicine**, 37, n. 9, p. 737-763, 2007.

- COOPER, K. H. A means of assessing maximal oxygen intake: correlation between field and treadmill testing. **Jama**, 203, n. 3, p. 201-204, 1968.
- DONG, S.; CHENG, Y.; YANG, J.; LI, J. *et al.* MicroRNA expression signature and the role of microRNA-21 in the early phase of acute myocardial infarction. **Journal of Biological Chemistry**, 284, n. 43, p. 29514-29525, 2009.
- FRIEDMAN, R. C.; FARH, K. K.-H.; BURGE, C. B.; BARTEL, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome research**, 19, n. 1, p. 92-105, 2009.
- GARBER, C. E.; BLISSMER, B.; DESCHENES, M. R.; FRANKLIN, B. A. *et al.* Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. 2011.
- GUINEA-VINIEGRA, J.; JIMÉNEZ, M.; SCHONTHALER, H. B.; NAVARRO, R. *et al.* Targeting miR-21 to treat psoriasis. **Science translational medicine**, 6, n. 225, p. 225re221-225re221, 2014.
- GUTE, D.; FRAGA, C.; LAUGHLIN, M. H.; AMANN, J. F. Regional changes in capillary supply in skeletal muscle of high-intensity endurance-trained rats. **Journal of applied physiology**, 81, n. 2, p. 619-626, 1996.
- HOLLOSZY, J. O.; COYLE, E. F. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. **Journal of applied physiology**, 56, n. 4, p. 831-838, 1984.
- HORAK, M.; NOVAK, J.; BIENERTOVA-VASKU, J. Muscle-specific microRNAs in skeletal muscle development. **Developmental biology**, 410, n. 1, p. 1-13, 2016.
- KIESSLING, K.-H.; PILSTRÖM, L.; KARLSSON, J.; PIEHL, K. Mitochondrial volume in skeletal muscle from young and old physically untrained and trained healthy men and from alcoholics. **Clinical Science and Molecular Medicine**, 44, n. 6, p. 547-554, 1973.
- KRAEMER, W. J.; FLECK, S. J.; EVANS, W. J. Strength and power training: physiological mechanisms of adaptation. **Exercise and sport sciences reviews**, 24, p. 363-397, 1996.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **methods**, 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- MCCARTHY, J. J.; ESSER, K. A. MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy. **Journal of applied physiology**, 2007.
- MENDELL, J. T.; OLSON, E. N. MicroRNAs in stress signaling and human disease. **Cell**, 148, n. 6, p. 1172-1187, 2012.
- MOOREN, F. C.; VIREECK, J.; KRÜGER, K.; THUM, T. Circulating Micrnas As Potential Biomarkers Of Aerobic Exercise: 2385 Board# 90 May 30, 9. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, 46, n. 5S, p. 640, 2014.
- NIELSEN, S.; ÅKERSTRÖM, T.; RINNOV, A.; YFANTI, C. *et al.* The miRNA plasma signature in response to acute aerobic exercise and endurance training. **PloS one**, 9, n. 2, p. e87308, 2014.

- PIGATI, L.; YADDANAPUDI, S. C.; IYENGAR, R.; KIM, D.-J. *et al.* Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. **PloS one**, 5, n. 10, 2010.
- PILEGAARD, H.; SALTIN, B.; NEUFER, P. D. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 α gene in human skeletal muscle. **The Journal of physiology**, 546, n. 3, p. 851-858, 2003.
- RAYNER, K. J.; HENNESSY, E. J. Extracellular communication via microRNA: lipid particles have a new message. **Journal of lipid research**, 54, n. 5, p. 1174-1181, 2013.
- SAPP, R. M.; SHILL, D. D.; ROTH, S. M.; HAGBERG, J. M. Circulating microRNAs in acute and chronic exercise: more than mere biomarkers. **Journal of Applied Physiology**, 122, n. 3, p. 702-717, 2017.
- SHEEDY, F. J. Turning 21: induction of miR-21 as a key switch in the inflammatory response. **Frontiers in immunology**, 6, p. 19, 2015.
- SHI, C.; LIANG, Y.; YANG, J.; XIA, Y. *et al.* MicroRNA-21 knockout improve the survival rate in DSS induced fatal colitis through protecting against inflammation and tissue injury. **PloS one**, 8, n. 6, p. e66814, 2013.
- THOMPSON, W. R.; GORDON, N. F.; PESCATELLO, L. S. **ACSM's guidelines for exercise testing and prescription**. Lippincott Williams & Wilkins, 2010. 0781769035.
- WARDLE, S. L.; BAILEY, M. E.; KILIKEVICIUS, A.; MALKOVA, D. *et al.* Plasma microRNA levels differ between endurance and strength athletes. **PloS one**, 10, n. 4, 2015.
- WEBER, M.; BAKER, M. B.; MOORE, J. P.; SEARLES, C. D. MiR-21 is induced in endothelial cells by shear stress and modulates apoptosis and eNOS activity. **Biochemical and biophysical research communications**, 393, n. 4, p. 643-648, 2010.
- WOLFARTH, B.; RANKINEN, T.; HAGBERG, J. M.; LOOS, R. J. *et al.* Advances in exercise, fitness, and performance genomics in 2013. **Med Sci Sports Exerc**, 46, n. 5, p. 851-859, 2014.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos resultados, em conjunto, apontam para a importância do condicionamento físico no estudo dos c-miRNAs. Em condição de ausência de treinamento físico (basal), foi observado maior expressão c-miRNAs específicos (c-miR-21, -133a) em indivíduos não condicionados. Após a realização do ER agudo, ambos os grupos apresentaram comportamento similar dos marcadores bioquímicos, porém a regulação c-miRNAs foi dinâmica e distinta (grupo não condicionado - função muscular; grupo condicionado - mediador do processo inflamatório). O incremento do condicionamento físico, possivelmente, influenciou o perfil de expressão dos c-miRNAs específicos de lesão tecidual e processo inflamatório. Os c-miRNAs podem ser promissores biomarcadores capazes de indicar o processo de resposta ou de adaptação causado pelo exercício físico. Estudos subsequentes são necessários para explorar esse conceito, examinando c-miRNAs em diversas populações expostas a diferentes tipos de exercícios físicos, duração e intensidade, considerando o condicionamento físico. Expandir essa análise para c-miRNAs adicionais também é importante para o melhor entendimento das adaptações relevantes para o incremento do condicionamento físico e diferenciar essas alterações daquelas observadas em condições de doenças.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, G. R.; HATHER, B. M.; BALDWIN, K. M.; DUDLEY, G. A. Skeletal muscle myosin heavy chain composition and resistance training. **Journal of Applied Physiology**, 74, n. 2, p. 911-915, 1993.
- AI, J.; ZHANG, R.; LI, Y.; PU, J. *et al.* Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. **Biochemical and biophysical research communications**, 391, n. 1, p. 73-77, 2010.
- ALENGHAT, F. J.; INGBER, D. E. Mechanotransduction: all signals point to cytoskeleton, matrix, and integrins. **Science Signaling**, 2002, n. 119, p. pe6-pe6, 2002.
- ALLEN, J.; SUN, Y.; WOODS, J. A. Exercise and the regulation of inflammatory responses. *In: Progress in molecular biology and translational science*: Elsevier, 2015. v. 135, p. 337-354.
- AOI, W.; ICHIKAWA, H.; MUNE, K.; TANIMURA, Y. *et al.* Muscle-enriched microRNA miR-486 decreases in circulation in response to exercise in young men. **Frontiers in physiology**, 4, p. 80, 2013.
- BAGGISH, A. L.; HALE, A.; WEINER, R. B.; LEWIS, G. D. *et al.* Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training. **The Journal of physiology**, 589, n. 16, p. 3983-3994, 2011.
- BAGGISH, A. L.; PARK, J.; MIN, P.-K.; ISAACS, S. *et al.* Rapid upregulation and clearance of distinct circulating microRNAs after prolonged aerobic exercise. **Journal of applied physiology**, 116, n. 5, p. 522-531, 2014.
- BAGGISH, A. L.; WANG, F.; WEINER, R. B.; ELINOFF, J. M. *et al.* Training-specific changes in cardiac structure and function: a prospective and longitudinal assessment of competitive athletes. **Journal of applied physiology**, 104, n. 4, p. 1121-1128, 2008.
- BANFI, G.; COLOMBINI, A.; LOMBARDI, G.; LUBKOWSKA, A. Metabolic markers in sports medicine. **Advances in clinical chemistry**, 56, p. 2, 2012.
- BANZET, S.; CHENNAOUI, M.; GIRARD, O.; RACINAIS, S. *et al.* Changes in circulating microRNAs levels with exercise modality. **Journal of applied physiology**, 115, n. 9, p. 1237-1244, 2013.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **cell**, 116, n. 2, p. 281-297, 2004.
- BASSEL-DUBY, R.; OLSON, E. N. Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. **Annu. Rev. Biochem.**, 75, p. 19-37, 2006.
- BENINI, R.; PRADO, P. N.; ORSATTI, C.; BARCELOS, L. *et al.* Effects of acute total body resistance exercise on hormonal and cytokines changes in men and women. **The Journal of sports medicine and physical fitness**, 55, n. 4, p. 337-344, 2015.

- BENITO, P. J.; ALVAREZ-SANCHEZ, M.; DÍAZ, V.; MORENCOS, E. *et al.* Cardiovascular fitness and energy expenditure response during a combined aerobic and circuit weight training protocol. **PloS one**, 11, n. 11, 2016.
- BEREZIKOV, E.; GURYEV, V. van de BJ, Wienholds E, Plasterk RH, Cuppen E. **Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. Cell.** 2005; **120**: 21, 4, 2005.
- BICKEL, C. S.; SLADE, J.; MAHONEY, E.; HADDAD, F. *et al.* Time course of molecular responses of human skeletal muscle to acute bouts of resistance exercise. **Journal of applied physiology**, 98, n. 2, p. 482-488, 2005.
- BOON, R. A.; VICKERS, K. C. Intercellular transport of microRNAs. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, 33, n. 2, p. 186-192, 2013.
- BOOTH, F. W.; THOMASON, D. B. Molecular and cellular adaptation of muscle in response to exercise: perspectives of various models. **Physiological reviews**, 71, n. 2, p. 541-585, 1991.
- BOUCHARD, C.; SHEPHARD, R.; STEPHENS, T.; SUTTON, J. *et al.*, 1990, **Exercise, fitness, and health: the consensus statement.** Human Kinetics Publishers. 3-28.
- BRANCACCIO, P.; MAFFULLI, N.; BUONAURO, R.; LIMONGELLI, F. M. Serum enzyme monitoring in sports medicine. **Clinics in sports medicine**, 27, n. 1, p. 1-18, 2008.
- BRUUNSGAARD, H.; GALBO, H.; HALKJAER-KRISTENSEN, J.; JOHANSEN, T. *et al.* Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage. **The Journal of physiology**, 499, n. 3, p. 833-841, 1997.
- BRYNER, R. W.; ULLRICH, I. H.; SAUERS, J.; DONLEY, D. *et al.* Effects of resistance vs. aerobic training combined with an 800 calorie liquid diet on lean body mass and resting metabolic rate. **Journal of the American College of Nutrition**, 18, n. 2, p. 115-121, 1999.
- BULLOCK, S. H.; JONES, B. H.; GILCHRIST, J.; MARSHALL, S. W. Prevention of physical training-related injuries: recommendations for the military and other active populations based on expedited systematic reviews. **American journal of preventive medicine**, 38, n. 1, p. S156-S181, 2010.
- BYE, A.; RØSJØ, H.; ASPENES, S. T.; CONDORELLI, G. *et al.* Circulating microRNAs and aerobic fitness—the HUNT-Study. **PloS one**, 8, n. 2, 2013.
- CALLIS, T. E.; DENG, Z.; CHEN, J.-F.; WANG, D.-Z. Muscling through the microRNA world. **Experimental biology and medicine**, 233, n. 2, p. 131-138, 2008.
- CASPERSEN, C. J.; POWELL, K. E.; CHRISTENSON, G. M. Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. **Public health reports**, 100, n. 2, p. 126, 1985.
- CHAUDHURI, K.; CHATTERJEE, R. MicroRNA detection and target prediction: integration of computational and experimental approaches. **DNA and cell biology**, 26, n. 5, p. 321-337, 2007.

- CHEN, C.-Z.; LODISH, H. F., 2005, **MicroRNAs as regulators of mammalian hematopoiesis**. Elsevier. 155-165.
- CHEN, J.-F.; MANDEL, E. M.; THOMSON, J. M.; WU, Q. *et al.* The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. **Nature genetics**, 38, n. 2, p. 228-233, 2006.
- CHEN, J.-F.; TAO, Y.; LI, J.; DENG, Z. *et al.* microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. **Journal of Cell Biology**, 190, n. 5, p. 867-879, 2010.
- CHEN, X.; BA, Y.; MA, L.; CAI, X. *et al.* Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. **Cell research**, 18, n. 10, p. 997, 2008.
- CHENG, Y.; LIU, X.; ZHANG, S.; LIN, Y. *et al.* MicroRNA-21 protects against the H₂O₂-induced injury on cardiac myocytes via its target gene PDCD4. **Journal of molecular and cellular cardiology**, 47, n. 1, p. 5-14, 2009.
- CHIN, E. R. Role of Ca²⁺/calmodulin-dependent kinases in skeletal muscle plasticity. **Journal of applied Physiology**, 99, n. 2, p. 414-423, 2005.
- CLARKSON, P. Eccentric exercise and muscle damage. **International Journal of Sports Medicine**, 18, n. S 4, p. S314-S317, 1997.
- CLARKSON, P. M.; HUBAL, M. J. Exercise-induced muscle damage in humans. **American journal of physical medicine & rehabilitation**, 81, n. 11, p. S52-S69, 2002.
- CLAUSS, S.; WAKILI, R.; HILDEBRAND, B.; KÄÄB, S. *et al.* MicroRNAs as biomarkers for acute atrial remodeling in marathon runners (The miRathon study—a sub-study of the Munich marathon study). **PLoS One**, 11, n. 2, p. e0148599, 2016.
- COFFEY, V. G.; HAWLEY, J. A. The molecular bases of training adaptation. **Sports medicine**, 37, n. 9, p. 737-763, 2007.
- COFFEY, V. G.; ZHONG, Z.; SHIELD, A.; CANNY, B. J. *et al.* Early signaling responses to divergent exercise stimuli in skeletal muscle from well-trained humans. **The FASEB journal**, 20, n. 1, p. 190-192, 2006.
- COOPER, K. H. A means of assessing maximal oxygen intake: correlation between field and treadmill testing. **Jama**, 203, n. 3, p. 201-204, 1968.
- CUI, S.; SUN, B.; YIN, X.; GUO, X. *et al.* Time-course responses of circulating microRNAs to three resistance training protocols in healthy young men. **Scientific reports**, 7, n. 1, p. 2203, 2017.
- CUI, S. F.; LI, W.; NIU, J.; ZHANG, C. Y. *et al.* Acute responses of circulating microRNAs to low-volume sprint interval cycling. **Frontiers in physiology**, 6, p. 311, 2015.

- DAVIDSEN, P. K.; GALLAGHER, I. J.; HARTMAN, J. W.; TARNOPOLSKY, M. A. *et al.* High responders to resistance exercise training demonstrate differential regulation of skeletal muscle microRNA expression. **Journal of Applied Physiology**, 110, n. 2, p. 309-317, 2011.
- DE GONZALO-CALVO, D.; DÁVALOS, A.; MONTERO, A.; GARCÍA-GONZÁLEZ, Á. *et al.* Circulating inflammatory miRNA signature in response to different doses of aerobic exercise. **Journal of applied physiology**, 119, n. 2, p. 124-134, 2015.
- DE PLANELL-SAGUER, M.; RODICIO, M. C. Detection methods for microRNAs in clinic practice. **Clinical biochemistry**, 46, n. 10-11, p. 869-878, 2013.
- DONG, S.; CHENG, Y.; YANG, J.; LI, J. *et al.* MicroRNA expression signature and the role of microRNA-21 in the early phase of acute myocardial infarction. **Journal of Biological Chemistry**, 284, n. 43, p. 29514-29525, 2009.
- DRUMMOND, M. J.; MCCARTHY, J. J.; FRY, C. S.; ESSER, K. A. *et al.* Aging differentially affects human skeletal muscle microRNA expression at rest and after an anabolic stimulus of resistance exercise and essential amino acids. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, 295, n. 6, p. E1333-E1340, 2008a.
- DRUMMOND, M. J.; MCCARTHY, J. J.; FRY, C. S.; ESSER, K. A. *et al.* Aging differentially affects human skeletal muscle microRNA expression at rest and after an anabolic stimulus of resistance exercise and essential amino acids. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, 295, n. 6, p. E1333, 2008b.
- DUISTERS, R. F.; TIJSEN, A. J.; SCHROEN, B.; LEENDERS, J. J. *et al.* miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor Implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling. **Circulation research**, 104, n. 2, p. 170-178, 2009a.
- DUISTERS, R. F.; TIJSEN, A. J.; SCHROEN, B.; LEENDERS, J. J. *et al.* miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor: implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling. **Circulation research**, 104, n. 2, p. 170-178, 2009b.
- EGAN, B.; DOWLING, P.; O'CONNOR, P. L.; HENRY, M. *et al.* 2-D DIGE analysis of the mitochondrial proteome from human skeletal muscle reveals time course-dependent remodelling in response to 14 consecutive days of endurance exercise training. **Proteomics**, 11, n. 8, p. 1413-1428, 2011.
- EGAN, B.; ZIERATH, J. R. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. **Cell metabolism**, 17, n. 2, p. 162-184, 2013.
- FAZI, F.; NERVI, C. MicroRNA: basic mechanisms and transcriptional regulatory networks for cell fate determination. **Cardiovascular research**, 79, n. 4, p. 553-561, 2008.
- FERNÁNDEZ-SANJURJO, M.; DE GONZALO-CALVO, D.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, B.; DÍEZ-ROBLES, S. *et al.* Circulating microRNA as emerging biomarkers of exercise. **Exercise and sport sciences reviews**, 46, n. 3, p. 160-171, 2018.
- FISCHER, C. P. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance. **Exerc immunol rev**, 12, n. 6-33, p. 41, 2006.

FOLLAND, J. P.; WILLIAMS, A. G. Morphological and neurological contributions to increased strength. **Sports medicine**, 37, n. 2, p. 145-168, 2007.

FOSCHINI, D.; PRESTES, J.; CHARRO, M. A. Relação entre exercício físico, dano muscular e dor muscular de início tardio. **Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum**, 9, n. 1, p. 101-106, 2007.

FRIEDMAN, R. C.; FARH, K. K.-H.; BURGE, C. B.; BARTEL, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome research**, 19, n. 1, p. 92-105, 2009.

GARBER, C. E.; BLISSMER, B.; DESCHENES, M. R.; FRANKLIN, B. A. *et al.* Quantity and quality of exercise for developing and maintaining cardiorespiratory, musculoskeletal, and neuromotor fitness in apparently healthy adults: guidance for prescribing exercise. 2011.

GLEESON, M. Immune system adaptation in elite athletes. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, 9, n. 6, p. 659-665, 2006.

GLEESON, M. Immune function in sport and exercise. **Journal of applied physiology**, 103, n. 2, p. 693-699, 2007.

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

GREGORY, R. I.; CHENDRIMADA, T. P.; COOCH, N.; SHIEKHATTAR, R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. **Cell**, 123, n. 4, p. 631-640, 2005.

GUINEA-VINIEGRA, J.; JIMÉNEZ, M.; SCHONTHALER, H. B.; NAVARRO, R. *et al.* Targeting miR-21 to treat psoriasis. **Science translational medicine**, 6, n. 225, p. 225re221-225re221, 2014.

GUTE, D.; FRAGA, C.; LAUGHLIN, M. H.; AMANN, J. F. Regional changes in capillary supply in skeletal muscle of high-intensity endurance-trained rats. **Journal of applied physiology**, 81, n. 2, p. 619-626, 1996.

HAN, J.; LEE, Y.; YEOM, K.-H.; KIM, Y.-K. *et al.* The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. **Genes & development**, 18, n. 24, p. 3016-3027, 2004.

HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B. M. The role of exercise and PGC1 α in inflammation and chronic disease. **Nature**, 454, n. 7203, p. 463, 2008.

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

HOLLOSZY, J. O. Biochemical adaptations in muscle effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. **Journal of biological chemistry**, 242, n. 9, p. 2278-2282, 1967.

HOLLOSZY, J. O.; COYLE, E. F. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. **Journal of applied physiology**, 56, n. 4, p. 831-838, 1984.

- HOLLOWAY, G.; GREEN, H.; DUHAMEL, T.; FERTH, S. *et al.* Muscle sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ cycling adaptations during 16 h of heavy intermittent cycle exercise. **Journal of Applied Physiology**, 99, n. 3, p. 836-843, 2005.
- HOOD, D. A. Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. **Journal of applied physiology**, 90, n. 3, p. 1137-1157, 2001.
- HORAK, M.; NOVAK, J.; BIENERTOVA-VASKU, J. Muscle-specific microRNAs in skeletal muscle development. **Developmental biology**, 410, n. 1, p. 1-13, 2016.
- HORNBERGER, T. A.; ARMSTRONG, D. D.; KOH, T. J.; BURKHOLDER, T. J. *et al.* Intracellular signaling specificity in response to uniaxial vs. multiaxial stretch: implications for mechanotransduction. **American journal of physiology-Cell physiology**, 288, n. 1, p. C185-C194, 2005.
- HOWALD, H.; HOPPELER, H.; CLAASSEN, H.; MATHIEU, O. *et al.* Influences of endurance training on the ultrastructural composition of the different muscle fiber types in humans. **Pflügers Archiv**, 403, n. 4, p. 369-376, 1985.
- IZQUIERDO, M.; IBÁÑEZ, J.; HÄKKINEN, K.; KRAEMER, W. J. *et al.* Maximal strength and power, muscle mass, endurance and serum hormones in weightlifters and road cyclists. **Journal of sports sciences**, 22, n. 5, p. 465-478, 2004.
- JEUKENDRUP, A.; VET-JOOP, K.; STURK, A.; STEGEN, J. *et al.* Relationship between gastro-intestinal complaints and endotoxaemia, cytokine release and the acute-phase reaction during and after a long-distance triathlon in highly trained men. **Clinical Science**, 98, n. 1, p. 47-55, 2000.
- KASAPIS, C.; THOMPSON, P. D. The effects of physical activity on serum C-reactive protein and inflammatory markers: a systematic review. **Journal of the American College of Cardiology**, 45, n. 10, p. 1563-1569, 2005.
- KELLEY, G. A.; KELLEY, K. S. Effects of exercise in the treatment of overweight and obese children and adolescents: a systematic review of meta-analyses. **Journal of obesity**, 2013, 2013.
- KENNEY, K.; LANDAU, M. E.; GONZALEZ, R. S.; HUNDERTMARK, J. *et al.* Serum creatine kinase after exercise: drawing the line between physiological response and exertional rhabdomyolysis. **Muscle & nerve**, 45, n. 3, p. 356-362, 2012.
- KIESSLING, K.-H.; PILSTRÖM, L.; KARLSSON, J.; PIEHL, K. Mitochondrial volume in skeletal muscle from young and old physically untrained and trained healthy men and from alcoholics. **Clinical Science and Molecular Medicine**, 44, n. 6, p. 547-554, 1973.
- KIM, H. K.; LEE, Y. S.; SIVAPRASAD, U.; MALHOTRA, A. *et al.* Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. **The Journal of cell biology**, 174, n. 5, p. 677-687, 2006.
- KIM, V. N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. **Nature reviews Molecular cell biology**, 6, n. 5, p. 376-385, 2005.

- KOCH, A.; PEREIRA, R.; MACHADO, M. The creatine kinase response to resistance exercise. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, 14, n. 1, p. 68-77, 2014.
- KRAEMER, W. J.; FLECK, S. J.; EVANS, W. J. Strength and power training: physiological mechanisms of adaptation. **Exercise and sport sciences reviews**, 24, p. 363-397, 1996.
- KUMAR, A.; CHAUDHRY, I.; REID, M. B.; BORIEK, A. M. Distinct signaling pathways are activated in response to mechanical stress applied axially and transversely to skeletal muscle fibers. **Journal of Biological Chemistry**, 277, n. 48, p. 46493-46503, 2002.
- KURA, G. G.; FLHO, H. T. Adaptações agudas e crônicas dos exercícios resistidos no sistema cardiovascular. **EFDeportes. com, Revista Digital. Buenos Aires, ano**, 15, 2011.
- LANCASTER, G. I.; FEBBRAIO, M. A. The immunomodulating role of exercise in metabolic disease. **Trends in immunology**, 35, n. 6, p. 262-269, 2014.
- LASTAYO, P. C.; WOOLF, J. M.; LEWEK, M. D.; SNYDER-MACKLER, L. *et al.* Eccentric muscle contractions: their contribution to injury, prevention, rehabilitation, and sport. **Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy**, 33, n. 10, p. 557-571, 2003.
- LAZARIM, F. L.; ANTUNES-NETO, J. M.; DA SILVA, F. O.; NUNES, L. A. *et al.* The upper values of plasma creatine kinase of professional soccer players during the Brazilian National Championship. **Journal of Science and Medicine in Sport**, 12, n. 1, p. 85-90, 2009.
- LEE, E. C.; FRAGALA, M. S.; KAVOURAS, S. A.; QUEEN, R. M. *et al.* Biomarkers in Sports and Exercise: Tracking Health, Performance, and Recovery in Athletes. **Journal of strength and conditioning research**, 31, n. 10, p. 2920, 2017.
- 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**, 75, n. 5, p. 843-854, 1993.
- LEE, Y.; JEON, K.; LEE, J. T.; KIM, S. *et al.* MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. **The EMBO journal**, 21, n. 17, p. 4663-4670, 2002.
- LEITE, H. P.; SARNI, R. S. Radicais livres, antioxidantes e nutrição. **Rev Bras Nutr Clin**, 18, n. 2, p. 87-94, 2003.
- LI, J.; ZHANG, Y.; LIU, Y.; DAI, X. *et al.* Microvesicle-mediated transfer of microRNA-150 from monocytes to endothelial cells promotes angiogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, 288, n. 32, p. 23586-23596, 2013.
- LI, Y.; YAO, M.; ZHOU, Q.; CHENG, Y. *et al.* Dynamic regulation of circulating microRNAs during acute exercise and long-term exercise training in basketball athletes. **Frontiers in physiology**, 9, p. 282, 2018.
- LITTLE, R. J.; RUBIN, D. B. **Statistical analysis with missing data**. John Wiley & Sons, 2019. 0470526793.

LIU, G.; ABRAHAM, E. MicroRNAs in immune response and macrophage polarization. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, 33, n. 2, p. 170-177, 2013.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **methods**, 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LUND, E. Gut tin ger S, Ca la do A, Dahl berg JE, Ku tay U. **Nuc le ar ex port of mic roR NA pre cursors. Sci en ce**, 303, n. 5654, p. 95-98, 2004.

MACALUSO, A.; DE VITO, G. Muscle strength, power and adaptations to resistance training in older people. **European journal of applied physiology**, 91, n. 4, p. 450-472, 2004.

MAHONEY, D.; PARISE, G.; MELOV, S.; SAFDAR, A. *et al.* Analysis of global mRNA expression in human skeletal muscle during recovery from endurance exercise. **The FASEB journal**, 19, n. 11, p. 1498-1500, 2005.

MAKAROVA, J. A.; MALTSEVA, D. V.; GALATENKO, V. V.; ABBASI, A. *et al.* Exercise immunology meets MiRNAs. **Exercise immunology review**, 20, 2014.

MATSUNAGA, S.; INASHIMA, S.; TSUCHIMOCHI, H.; YAMADA, T. *et al.* Altered sarcoplasmic reticulum function in rat diaphragm after high-intensity exercise. **Acta physiologica scandinavica**, 176, n. 3, p. 227-232, 2002.

MAYHEW, D. L.; THYFAULT, J. P.; KOCH, A. J. Rest-interval length affects leukocyte levels during heavy resistance exercise. **Journal of strength and conditioning research**, 19, n. 1, p. 16, 2005.

MCCARTHY, J. J.; ESSER, K. A. MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy. **Journal of applied physiology**, 2007a.

MCCARTHY, J. J.; ESSER, K. A. MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy. **Journal of applied physiology**, 102, n. 1, p. 306-313, 2007b.

MENDELL, J. T.; OLSON, E. N. MicroRNAs in stress signaling and human disease. **Cell**, 148, n. 6, p. 1172-1187, 2012.

MITCHELL, P. S.; PARKIN, R. K.; KROH, E. M.; FRITZ, B. R. *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 105, n. 30, p. 10513-10518, 2008.

MOLDOVEANU, A. I.; SHEPHARD, R. J.; SHEK, P. N. The cytokine response to physical activity and training. **Sports medicine**, 31, n. 2, p. 115-144, 2001.

MOOREN, F. C.; BLOMING, D.; LECHTERMANN, A.; LERCH, M. M. *et al.* Lymphocyte apoptosis after exhaustive and moderate exercise. **Journal of applied physiology**, 93, n. 1, p. 147-153, 2002.

- MOOREN, F. C.; VIREECK, J.; KRÜGER, K.; THUM, T. Circulating microRNAs as potential biomarkers of aerobic exercise capacity. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, 306, n. 4, p. H557-H563, 2013.
- MOOREN, F. C.; VIREECK, J.; KRÜGER, K.; THUM, T. Circulating Micrnas As Potential Biomarkers Of Aerobic Exercise: 2385 Board# 90 May 30, 9. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, 46, n. 5S, p. 640, 2014.
- MORI, M. A. Non-Coding RNAs: Entwining Metabolism and Aging. **Frontiers in endocrinology**, 9, p. 111, 2018.
- MORITANI, T. Neural factors versus hypertrophy in the time course of muscle strength gain. **American journal of physical medicine**, 58, n. 3, p. 115-130, 1979.
- MOUGIOS, V. Reference intervals for serum creatine kinase in athletes. **British journal of sports medicine**, 41, n. 10, p. 674-678, 2007.
- NEME IDE, B.; ALESSANDRO SOARES NUNES, L.; BREZIKOFER, R.; MACEDO, D. V. Time course of muscle damage and inflammatory responses to resistance training with eccentric overload in trained individuals. **Mediators of inflammation**, 2013, 2013.
- NEUFER, P. D.; BAMMAN, M. M.; MUOIO, D. M.; BOUCHARD, C. *et al.* Understanding the cellular and molecular mechanisms of physical activity-induced health benefits. **Cell metabolism**, 22, n. 1, p. 4-11, 2015.
- NIELSEN, S.; ÅKERSTRÖM, T.; RINNOV, A.; YFANTI, C. *et al.* The miRNA plasma signature in response to acute aerobic exercise and endurance training. **PloS one**, 9, n. 2, p. e87308, 2014.
- NIEMAN, D. C.; HENSON, D. A.; SMITH, L. L.; UTTER, A. C. *et al.* Cytokine changes after a marathon race. **Journal of applied physiology**, 91, n. 1, p. 109-114, 2001.
- O'CONNELL, R. M.; RAO, D. S.; BALTIMORE, D. microRNA regulation of inflammatory responses. **Annual review of immunology**, 30, p. 295-312, 2012.
- OLENA, A. F.; PATTON, J. G. Genomic organization of microRNAs. **Journal of cellular physiology**, 222, n. 3, p. 540-545, 2010.
- OSTROWSKI, K.; ROHDE, T.; ZACHO, M.; ASP, S. *et al.* Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running. **The Journal of physiology**, 508, n. 3, p. 949-953, 1998.
- PATE, R. R. A New Definition of Youth Fitness. **The Physician and Sportsmedicine**, 11, n. 4, p. 77-83, 1983/04/01 1983.
- PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M. A. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. **Nature Reviews Endocrinology**, 8, n. 8, p. 457, 2012.
- PERSEGHIN, G.; PRICE, T. B.; PETERSEN, K. F.; RODEN, M. *et al.* Increased glucose transport-phosphorylation and muscle glycogen synthesis after exercise training in insulin-resistant subjects. **New England Journal of Medicine**, 335, n. 18, p. 1357-1362, 1996.

PETERSEN, A. M. W.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **Journal of applied physiology**, 98, n. 4, p. 1154-1162, 2005.

PETERSON, M. D.; GORDON, P. M.; HURVITZ, E. A.; BURANT, C. F. Secondary muscle pathology and metabolic dysregulation in adults with cerebral palsy. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, 303, n. 9, p. E1085-E1093, 2012.

PHILLIPS, S.; GREEN, H.; TARNOPOLSKY, M.; HEIGENHAUSER, G. *et al.* Progressive effect of endurance training on metabolic adaptations in working skeletal muscle. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, 270, n. 2, p. E265-E272, 1996.

PIGATI, L.; YADDANAPUDI, S. C.; IYENGAR, R.; KIM, D.-J. *et al.* Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. **PloS one**, 5, n. 10, 2010.

PILEGAARD, H.; ORDWAY, G. A.; SALTIN, B.; NEUFER, P. D. Transcriptional regulation of gene expression in human skeletal muscle during recovery from exercise. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, 279, n. 4, p. E806-E814, 2000.

PILEGAARD, H.; SALTIN, B.; NEUFER, P. D. Exercise induces transient transcriptional activation of the PGC-1 α gene in human skeletal muscle. **The Journal of physiology**, 546, n. 3, p. 851-858, 2003.

PILLAI, R. S.; BHATTACHARYYA, S. N.; ARTUS, C. G.; ZOLLER, T. *et al.* Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. **Science**, 309, n. 5740, p. 1573-1576, 2005.

POWERS, S. K.; CRISWELL, D.; LAWLER, J.; JI, L. L. *et al.* Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 266, n. 2, p. R375-R380, 1994.

RATAMESS, N. A.; ROSENBERG, J. G.; KANG, J.; SUNDBERG, S. *et al.* Acute oxygen uptake and resistance exercise performance using different rest interval lengths: The influence of maximal aerobic capacity and exercise sequence. **The Journal of Strength & Conditioning Research**, 28, n. 7, p. 1875-1888, 2014.

RAYNER, K. J.; HENNESSY, E. J. Extracellular communication via microRNA: lipid particles have a new message. **Journal of lipid research**, 54, n. 5, p. 1174-1181, 2013.

ROBERGS, R. A.; GORDON, T.; REYNOLDS, J.; WALKER, T. B. Energy expenditure during bench press and squat exercises. **Journal of strength and conditioning research**, 21, n. 1, p. 123, 2007.

ROSA, C.; BICUDO, L. F. P.; VAISBERG, M. W. Influências do exercício na resposta imune. **Revista brasileira de Medicina do Esporte**, 2002.

ROY, S.; SEN, C. K. MiRNA in innate immune responses: novel players in wound inflammation. **Physiological genomics**, 43, n. 10, p. 557-565, 2011.

RYAN, B.; JOILIN, G.; WILLIAMS, J. M. Plasticity-related microRNA and their potential contribution to the maintenance of long-term potentiation. **Frontiers in molecular neuroscience**, 8, p. 4, 2015.

SAFDAR, A.; ABADI, A.; AKHTAR, M.; HETTINGA, B. P. *et al.* miRNA in the regulation of skeletal muscle adaptation to acute endurance exercise in C57Bl/6J male mice. **PloS one**, 4, n. 5, p. e5610, 2009.

SALE, D. G. Neural adaptation to resistance training. **Medicine and science in sports and exercise**, 20, n. 5 Suppl, p. S135-145, 1988.

SAPP, R. M.; SHILL, D. D.; ROTH, S. M.; HAGBERG, J. M. Circulating microRNAs in acute and chronic exercise: more than mere biomarkers. **Journal of Applied Physiology**, 122, n. 3, p. 702-717, 2017.

SAWADA, S.; KON, M.; WADA, S.; USHIDA, T. *et al.* Profiling of circulating microRNAs after a bout of acute resistance exercise in humans. **PloS one**, 8, n. 7, p. e70823, 2013.

SCHERTZER, J.; GREEN, H.; FOWLES, J.; DUHAMEL, T. *et al.* Effects of prolonged exercise and recovery on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ cycling properties in rat muscle homogenates. **Acta physiologica scandinavica**, 180, n. 2, p. 195-208, 2004.

SCHROEDER, E. T.; VILLANUEVA, M.; WEST, D. D.; PHILLIPS, S. M. Are acute post-resistance exercise increases in testosterone, growth hormone, and IGF-1 necessary to stimulate skeletal muscle anabolism and hypertrophy? **Medicine & Science in Sports & Exercise**, 45, n. 11, p. 2044-2051, 2013.

SCHWARZ, S.; GRANDE, A. V.; BUJDOSO, N.; SAEDLER, H. *et al.* The microRNA regulated SBP-box genes SPL9 and SPL15 control shoot maturation in Arabidopsis. **Plant molecular biology**, 67, n. 1-2, p. 183-195, 2008.

SERRANO, A. L.; BAEZA-RAJA, B.; PERDIGUERO, E.; JARDÍ, M. *et al.* Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. **Cell metabolism**, 7, n. 1, p. 33-44, 2008.

SHAH, M. Y.; CALIN, G. A. The mix of two worlds: non-coding RNAs and hormones. **Nucleic acid therapeutics**, 23, n. 1, p. 2-8, 2013.

SHEEDY, F. J. Turning 21: induction of miR-21 as a key switch in the inflammatory response. **Frontiers in immunology**, 6, p. 19, 2015.

SHI, C.; LIANG, Y.; YANG, J.; XIA, Y. *et al.* MicroRNA-21 knockout improve the survival rate in DSS induced fatal colitis through protecting against inflammation and tissue injury. **PloS one**, 8, n. 6, p. e66814, 2013.

SILVA, P. R. S.; ROMANO, A.; JUNIOR, P. Y.; CORDEIRO, J. R. *et al.* Ergoespirometria computadorizada ou calometria indireta: um método não invasivo de crescente valorização na avaliação cardiorrespiratória ao exercício. **Acta Fisiátrica**, 4, n. 1, p. 31-43, 1997.

SKENDERI, K. P.; KAVOURAS, S. A.; ANASTASIOU, C. A.; YIANNAKOURIS, N. *et al.* Exertional rhabdomyolysis during a 246-km continuous running race. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, 38, n. 6, p. 1054, 2006.

SMILIOS, I.; PILIANIDIS, T.; KARAMOUZIS, M.; TOKMAKIDIS, S. P. Hormonal responses after various resistance exercise protocols. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, 35, n. 4, p. 644-654, 2003.

SMITH, L. L. Cytokine hypothesis of overtraining: a physiological adaptation to excessive stress? **Medicine & Science in Sports & Exercise**, 32, n. 2, p. 317, 2000.

SMITH, L. L. Tissue trauma: the underlying cause of overtraining syndrome? **Journal of strength and conditioning research**, 18, n. 1, p. 185-193, 2004.

SOOD, P.; KREK, A.; ZAVOLAN, M.; MACINO, G. *et al.* Cell-type-specific signatures of microRNAs on target mRNA expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 103, n. 8, p. 2746-2751, 2006.

STARON, R.; KARAPONDO, D.; KRAEMER, W.; FRY, A. *et al.* Skeletal muscle adaptations during early phase of heavy-resistance training in men and women. **Journal of applied physiology**, 76, n. 3, p. 1247-1255, 1994.

SUMNERS, D. P.; DYER, A.; FOX, P.; MILEVA, K. N. *et al.* Montmorency cherry juice reduces muscle damage caused by intensive strength exercise. 2011.

SUZUKI, K.; NAKAJI, S.; YAMADA, M.; TOTSUKA, M. *et al.* Systemic inflammatory response to exhaustive exercise. Cytokine kinetics. **Exercise immunology review**, 8, p. 6, 2002.

TALANIAN, J. L.; HOLLOWAY, G. P.; SNOOK, L. A.; HEIGENHAUSER, G. J. *et al.* Exercise training increases sarcolemmal and mitochondrial fatty acid transport proteins in human skeletal muscle. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, 299, n. 2, p. E180-E188, 2010.

TAYLOR, H. L.; BUSKIRK, E.; HENSCHER, A. Maximal oxygen intake as an objective measure of cardio-respiratory performance. **Journal of applied physiology**, 8, n. 1, p. 73-80, 1955.

TEE, J. C.; BOSCH, A. N.; LAMBERT, M. I. Metabolic consequences of exercise-induced muscle damage. **Sports medicine**, 37, n. 10, p. 827-836, 2007.

TESCH, P. A.; WRIGHT, J. E.; VOGEL, J. A.; DANIELS, W. L. *et al.* The influence of muscle metabolic characteristics on physical performance. **European journal of applied physiology and occupational physiology**, 54, n. 3, p. 237-243, 1985.

THOMOU, T.; MORI, M. A.; DREYFUSS, J. M.; KONISHI, M. *et al.* Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues. **Nature**, 542, n. 7642, p. 450, 2017.

THOMPSON, W. R.; GORDON, N. F.; PESCATELLO, L. S. **ACSM's guidelines for exercise testing and prescription**. Lippincott Williams & Wilkins, 2010. 0781769035.

THUM, T.; GROSS, C.; FIEDLER, J.; FISCHER, T. *et al.* MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. **Nature**, 456, n. 7224, p. 980-984, 2008.

TIDBALL, J. G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 288, n. 2, p. R345-R353, 2005.

TILI, E.; MICHAILLE, J.-J.; CIMINO, A.; COSTINEAN, S. *et al.* Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF- α stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. **The Journal of Immunology**, 179, n. 8, p. 5082-5089, 2007.

TOIGO, M.; BOUTELLIER, U. New fundamental resistance exercise determinants of molecular and cellular muscle adaptations. **European journal of applied physiology**, 97, n. 6, p. 643-663, 2006.

TREMBLAY, A.; SIMONEAU, J.-A.; BOUCHARD, C. Impact of exercise intensity on body fatness and skeletal muscle metabolism. **Metabolism**, 43, n. 7, p. 814-818, 1994.

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

UHLEMANN, M.; MÖBIUS-WINKLER, S.; FIKENZER, S.; ADAM, J. *et al.* Circulating microRNA-126 increases after different forms of endurance exercise in healthy adults. **European journal of preventive cardiology**, 21, n. 4, p. 484-491, 2014.

VALADI, H.; EKSTRÖM, K.; BOSSIOS, A.; SJÖSTRAND, M. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nature cell biology**, 9, n. 6, p. 654, 2007.

VAN ROOIJ, E.; MARSHALL, W. S.; OLSON, E. N. Toward microRNA-based therapeutics for heart disease: the sense in antisense. **Circulation research**, 103, n. 9, p. 919-928, 2008.

VIRU, A.; VIRU, M. The specific nature of training on muscle: a review. **Research in Sports Medicine: An International Journal**, 4, n. 2, p. 79-98, 1993.

VIRU, A.; VIRU, M.; KARELSON, K.; JANSON, T. *et al.* Adrenergic effects on adrenocortical cortisol response to incremental exercise to exhaustion. **European journal of applied physiology**, 100, n. 2, p. 241-245, 2007.

VOLLAARD, N. B.; CONSTANTIN-TEODOSIU, D.; FREDRIKSSON, K.; ROOYACKERS, O. *et al.* Systematic analysis of adaptations in aerobic capacity and submaximal energy metabolism provides a unique insight into determinants of human aerobic performance. **Journal of Applied Physiology**, 106, n. 5, p. 1479-1486, 2009.

WALLIMANN, T.; WYSS, M.; BRDICZKA, D.; NICOLAY, K. *et al.* Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. **Biochemical Journal**, 281, n. 1, p. 21-40, 1992.

WANG, J.; CHEN, J.; SEN, S. MicroRNA as biomarkers and diagnostics. **Journal of cellular physiology**, 231, n. 1, p. 25-30, 2016.

WARDLE, S. L.; BAILEY, M. E.; KILIKEVICIUS, A.; MALKOVA, D. *et al.* Plasma microRNA levels differ between endurance and strength athletes. **PloS one**, 10, n. 4, 2015.

WEBER, J. A.; BAXTER, D. H.; ZHANG, S.; HUANG, D. Y. *et al.* The microRNA spectrum in 12 body fluids. **Clinical chemistry**, 56, n. 11, p. 1733-1741, 2010.

WEBER, M.; BAKER, M. B.; MOORE, J. P.; SEARLES, C. D. MiR-21 is induced in endothelial cells by shear stress and modulates apoptosis and eNOS activity. **Biochemical and biophysical research communications**, 393, n. 4, p. 643-648, 2010.

WILLIAMS, R. S.; NEUFER, P. D. Regulation of gene expression in skeletal muscle by contractile activity. **Handbook of Physiology. Exercise: Regulation and Integration of Multiple Systems**, 12, p. 1124-1146, 1996.

WOLFARTH, B.; RANKINEN, T.; HAGBERG, J. M.; LOOS, R. J. *et al.* Advances in exercise, fitness, and performance genomics in 2013. **Med Sci Sports Exerc**, 46, n. 5, p. 851-859, 2014.

WONG, T. S.; BOOTH, F. W. Protein metabolism in rat gastrocnemius muscle after stimulated chronic concentric exercise. **Journal of applied physiology**, 69, n. 5, p. 1709-1717, 1990.

XU, T.; LIU, Q.; YAO, J.; DAI, Y. *et al.* Circulating microRNAs in response to exercise. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, 25, n. 2, p. e149-e154, 2015.

YANG, J.; CHRISTOPHI, C. A.; FARIOLI, A.; BAUR, D. M. *et al.* Association between push-up exercise capacity and future cardiovascular events among active adult men. **JAMA network open**, 2, n. 2, p. e188341-e188341, 2019.

YANG, Y.; CREER, A.; JEMIOLO, B.; TRAPPE, S. Time course of myogenic and metabolic gene expression in response to acute exercise in human skeletal muscle. **Journal of applied physiology**, 98, n. 5, p. 1745-1752, 2005.

YI, R. Qin Y, Macara IG, Cullen BR. **Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs.** **Genes Dev**, 17, p. 3011-3016, 2003.

ZALDIVAR, F.; WANG-RODRIGUEZ, J.; NEMET, D.; SCHWINDT, C. *et al.* Constitutive pro-and anti-inflammatory cytokine and growth factor response to exercise in leukocytes. **Journal of applied physiology**, 100, n. 4, p. 1124-1133, 2006.