Cléber Rene Alves

**Expressão e seleção de microRNAs no músculo
esquelético de homens saudáveis submetidos ao
treinamento físico aeróbio**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em ciências

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Edilamar Menezes de Oliveira

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 03 de Outubro de 2011.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Alves, Cléber Renê

Expressão e seleção de microRNAs no músculo esquelético de homens saudáveis
submetidos ao treinamento físico aeróbio / Cléber Renê Alves. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Edilamar Menezes de Oliveira.

Descritores: 1.Exercício/fisiologia 2.MicroRNAs 3.Músculo esquelético/fisiologia
4.Transdução de sinal/genética 5.Expressão gênica 6.Homens 7.Esforço físico/genética
8.Esforço físico/fisiologia

USP/FM/DBD-054/14

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, onde busco forças e motivação para continuar o caminho...

Aos meus pais, Maria Aparecida Montanha Alves e Oswaldo Rene Alves, responsáveis por tudo que sou.

À minha irmã, Cleicy Rene Alves e ao seu esposo Cesar da Silva Bernardo, além dos filhos, Livia Alves Bernardo e ao pequenino Lucas Alves Bernardo.

Este trabalho em grande parte só foi idealizado com seus exemplos; de união, verdade e força. Obrigado.

À minha querida tia Maria Josefina Alves “Bila”, que com sua determinação alcançou objetivos antes nunca pensados. Obrigado pelas palavras sinceras.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Edilamar Menezes de Oliveira, minha orientadora, por seu brilhantismo acadêmico, força e presteza;

Ao Prof. Ms. Tiago Fernandes, pela paciência, ensinamentos e contribuições para meu crescimento acadêmico, um incentivador desse trabalho;

À Profa. Dra. Ivani Credidio Trombetta, por sua gentileza e disponibilidade;

Ao Prof. Doutorando José Ribeiro Lemos Junior, impossível seria sem você;

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Negrão, pela confiança empregada ao meu trabalho;

Ao Guilherme Barreto Alves, por todos esses anos me apoiando e incentivando;

Aos amigos e colegas, Glória de Fátima Mota, Ana Maria F. W. Braga, Marcelo Rodrigues dos Santos, Noelly, Fabíola Jomar, Amanda Brasil, Vinicius Arraes, Ângela Valadão, Roberta Bezerra, Marcela Farias, Marcelo Ferrari e José Marcelo, pela ajuda e apoio dispensados;

Às secretárias, Tânia, Mônica, Sandra, Silvana, Maúde, e Shirley, pela paciência e ajuda necessária;

À Polícia Militar do Estado de São Paulo, que sempre me recebeu com cordialidade e confiança, a favor desse trabalho científico. Faço um agradecimento especial, ao capitão José Ribeiro Lemos Junior, por sua incansável dedicação e boa vontade no que fosse inimaginável para levar este trabalho ao fim.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTAS DE FIGURAS

LEGENDAS

RESUMO.....01

SUMMARY.....02

1	INTRODUÇÃO.....	03
2	OBJETIVOS.....	06
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	07
3.1	Treinamento físico aeróbio.....	07
3.2	Células Sâtelites.....	09
3.3	MicroRNAs.....	11
3.4	Localização dos microRNAs.....	11
3.5	Biogênese de microRNAs (via canônica).....	13
3.6	Mecanismo de ação dos microRNAs.....	15
3.7	MiRs da musculatura esquelética humana.....	16
3.7.1	MyomiRs.....	16
3.7.2	MiR-208b.....	23
3.7.3	MiR-181.....	25

3.7.4	MiR-24.....	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1	Amostragem.....	27
4.2	Protocolos de Treinamento Físico.....	28
4.3	Métodos de Avaliação.....	29
4.3.1	Avaliação da Capacidade Cardiorespiratória ao Exercício.....	29
4.3.2	Determinação do limiar anaeróbio e ponto de compensação respiratória	30
4.3.3	Avaliação do Fluxo Sanguíneo Muscular.....	31
4.3.4	Teste de exercício isométrico.....	32
4.3.5	Avaliação da condutância vascular no antebraço.....	33
4.3.6	Avaliação da pressão arterial.....	33
4.3.7	Avaliação da frequência cardíaca.....	34
4.4	Coleta de Tecido.....	34
4.4.1	Extração por biópsia muscular.....	34
4.4.2	Extrações do RNA Total - (músculo esquelético).....	35
4.4.3	Real time - PCR- Detecção dos miRs maduros.....	37
4.4.4	Análise da expressão gênica.....	38
4.4.5	Western Blotting (análises de expressão proteica).....	38
5	ANÁLISE ESTATÍSTICAS.....	40
6	RESULTADOS.....	41
6.1	Expressões gênicas.....	49
6.2	Expressões proteicas.....	52
7	DISCUSSÃO.....	58

8	CONCLUSÃO.....	65
9	LIMITAÇÕES.....	66
10	BIBLIOGRAFIA.....	67
11	COMITÊ DE ÉTICA.....	82
12	ANEXOS.....	83

LISTA DE TABELA

TABELA 1	Dados físicos, cardíacos, ventilatórios e hemodinâmicos pré e pós-treinamento.....	39
----------	--	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Visualização da localização genômica dos miRs.....	10
FIGURA 2	Visualização esquemática da biogênese dos miRs.....	12
FIGURA 3	O miR - lin-4 reprimindo a tradução do mRNA da proteína lin-14....	14
FIGURA 4	Visualização esquemática da localização genômica dos miRs no gene da miosina – MHC	21
FIGURA 5	Organograma do estudo.....	24
FIGURA 6	Visualização esquemática dos teste de exercício isométrico a 30%...	29

ABREVIATURAS

MiRs ou miRNAs – microRNAs;

PAX-7 - Paired box protein-7;

MYOD – fator transcricional miogênico;

MYOG - miogenina;

MYF5- fator de transcrição miogênico;

MFR4- fator regulatório miogênico;

MHC – miosina de cadeia pesada;

FSTL – folistatina;

CD31 – marcador proteico de angiogênese;

VO_{2pico}. - consumo de oxigênio pico;

FSA – fluxo sanguíneo no antebraço;

CVA – condutância vascular no antebraço;

ASC – área sobre a curva;

TAF – teste de aptidão física;

FCR – frequência cardíaca de repouso;

LA – Limiar aeróbio;

LAer- Limiar Anaeróbio ou PCR – Ponto de compensação respiratória;

PAM – pressão arterial média;

RESUMO

Alves CR. *Expressão e seleção de microRNAs no músculo esquelético de homens saudáveis submetidos ao treinamento físico aeróbico* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

O treinamento físico aeróbico (TFA) foi estabelecido como uma conduta importante capaz de alterar a musculatura esquelética humana. Os microRNAs (miRs) surgiram como importantes reguladores de processos biológicos, modulando a expressão de genes pós-transcricionalmente. Os *myomiRs* são miRs específicos do músculo esquelético, em especial o miR-206, que é necessário para uma eficiente regeneração das fibras musculares esqueléticas. No entanto, a expressão do miR-206 em resposta ao TFA, não é completamente compreendida. O objetivo do presente estudo foi determinar os padrões de expressão dos *myomiRs* na musculatura esquelética humana. Doze voluntários saudáveis foram biopsiados pré e pós-treinamento físico. As expressões gênicas e proteicas envolvidas na miogênese foram observadas, incluindo; PAX-7, MYF5, MYOD, MRF4, MYOG, CD31 e FSTL. Além disso, a frequência cardíaca (FC), pressão arterial média (PAM), consumo máximo de oxigênio (VO₂max), fluxo sanguíneo no antebraço (FSA) e condutância vascular no antebraço (CVA), foram avaliados. Ademais, os *myomiRs* foram analisados por PCR em tempo real. O treinamento físico aeróbico foi realizado durante 16 semanas. Todas as variáveis foram reavaliadas após o treinamento. Os indivíduos apresentaram um aumento nas expressões dos *myomiRs*, em especial do miR-206 de 93%. Estas alterações foram acompanhadas por aumento nas expressões dos genes; **PAX-7, MYOD, MYF5, MRF4, MYOG e FSTL**, respectivamente. No entanto, quando analisamos as expressões proteicas, houve redução na FSTL e PAX-7, de 24%, 29%, respectivamente. Além disso, em MYOD, CD31, MYOG e MHC houve aumentos de 21%, 41%, 79% e 94%, respectivamente. Ademais, houve uma diminuição na frequência cardíaca de repouso de 12,5% e aumentos no VO₂pico, FSA e CVA de 14,1%, 68%, 63%, respectivamente. Estes resultados sugerem que em indivíduos saudáveis o miR-206 é altamente expresso após o treinamento físico aeróbico, dessa forma, modulando localmente processos miogênicos regenerativos em homens saudáveis.

Descritores: Exercício/fisiologia; MicroRNAs; Músculo esquelético/fisiologia; Transdução de sinal/genética; Expressão gênica; Homens; Esforço físico/genética; Esforço físico/fisiologia.

SUMMARY

Alves CR. *MicroRNA-206 skeletal muscle-specific modulates pattern of expression in myogenesis in response to endurance training in human* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014.

Endurance training (ET) has been established as an important phenotype capable of altering the human skeletal muscle. MicroRNAs (miRs) have emerged as important regulators of numerous biological processes by modulating gene expression at the post-transcriptional level. The myomiRs are particular miRs of muscles, in special skeletal muscle-specific miR-206 that is required for efficient regeneration muscle fiber. However, the expression of myomiRs and in special miR-206 in response to ET in human skeletal muscle is not completely understood. Twelve healthy volunteers were biopsied pre and post period endurance training. Most of the biological processes involved in the transcriptional regulation were observed, including PAX-7, MYF5, MYOD, MRF4, MYOG, CD31 and FSTL, analyzed by real time PCR. Moreover, heart rate (HR), mean blood pressure (MBP), maximal exercise capacity (VO_{2peak}) forearm blood flow (FBF) and forearm vascular conductance (FVC) were evaluated. The myomiRs levels analyzed by real-time PCR. Endurance training was performed for 16 weeks. All variables were re-assessed following completion of the training period. After endurance training, the individuals showed an increase in myomiRs, in special of 93% in human skeletal muscle in miRNA-206 levels. These alterations were accompanied by increase in **PAX-7, MYOD, MYF5, MRF4, MYOG** and **FSTL** gene expression, respectively. However, when analyzed by western blot comparing pre and post period there were reduction in FSTL of 24% and PAX-7 of 29% in protein levels, but in MYOD, CD31, MYOG and MHC there were increase of 21%, 41%, 79% and 94% in protein levels, respectively. In addition, there was a decrease in heart rate of 12.5% and increases in VO_{2peak} of 14.1%, FBF of 68% and FVC of 63%. These results suggest that in healthy individuals the miR-206 is highly expressed after endurance training, thus modulating locally important parts in myogenic processes in humans.

Descriptors: Exercise/physiology; Micro RNAs; Muscle, skeletal/physiology; Signal transduction/genetics; Gene expression; Men; Physical exertion/genetics; Physical exertion/physiology.

1. INTRODUÇÃO

A musculatura esquelética humana demonstra uma enorme maleabilidade metabólica e contrátil em resposta às alterações provocadas pelo treinamento físico dinâmico (Zammit, Partridge et al. 2006). Os mecanismos celulares e funcionais relacionados, em particular, às adaptações da composição do tecido muscular pelo treinamento físico de endurance (aeróbio), estão bem estabelecidos (Booth 2011). O processo de plasticidade muscular envolve alterações qualitativas e quantitativas nas células das fibras musculares (Carson, Schwartz et al. 1996). Essas melhoras miocelulares se caracterizam por aumentos na densidade capilar, concentrações de mioglobina, capacidade oxidativa, e no tamanho e quantidade de mitocôndrias no músculo esquelético (Fluck and Hoppeler 2003; Booth 2011). Coletivamente esses ajustes contribuem para maximização da entrega de substratos, capacidade respiratória e melhora dos parâmetros contráteis, consequentemente levando ao melhor desempenho atlético, (Fluck 2006). Um dos modelos sugeridos, é que, perturbação na homeostasia provocadas pelo treinamento físico induz à expressão de genes, que determinam o remodelamento do músculo esquelético (miogênese) (Fluck and Hoppeler 2003; Mcardle 2009; Booth 2011). Dessa forma, a expressão gênica é o elo no processo de integração entre estímulos do treinamento físico e a função adaptativa da musculatura esquelética (Yan, Salmons et al. 1996; Booth 2011).

Recentemente, Fluck e Hoppeler evidenciaram que mudanças nos níveis de RNAs mensageiros (mRNAs) determinam a plasticidade muscular. Dessa forma, testaram possíveis adaptações nos mRNAs na fase de recuperação ao

treinamento físico de endurance, e, se isso contribuiria na construção do tecido muscular. O trabalho revelou que houve uma alta expressão no transiente de mRNAs até 8 horas após uma única sessão de treinamento físico de endurance. Os resultados ratificam o conceito de que, a expressão gênica é a principal ligação entre estímulos externos e ajustes estruturais e funcionais no metabolismo muscular oxidativo, e que cada sessão de exercício tem efeito cumulativo na musculatura esquelética (Fluck and Hoppeler 2003).

Os microRNAs (miRs) são moléculas de RNA fita simples de 18-25 nucleotídeos, não codificadores de proteínas, que agem como potentes reguladores pós-transcricionais da expressão gênica (Lee, Feinbaum et al. 1993; Callis, Deng et al. 2008). Nessa descoberta, emergiu questões de sua atuação como moléculas regulatórias que silenciam genes alvos, por degradar moléculas de mRNAs ou por inibir sua tradução (Eisenberg, Alexander et al. 2009). O principal fator que governa a eficácia da ligação dos miRs, está no pareamento base-perfeita entre o sítio alvo na região 3'UTR não traduzida do mRNA, e a região “*seed*” (semente) do miR. Este mecanismo de atuação permite reduções dos níveis proteicos de genes alvo, raramente afetando níveis da expressão transcricional (Van Rooij, Liu et al. 2008). Recentes estudos têm demonstrado que os miRs no músculo esquelético, modulam processos como a proliferação, diferenciação e regeneração em células musculares adultas (Kim, Lee et al. 2006; Callis, Deng et al. 2008; Van Rooij, Liu et al. 2008; Eisenberg, Alexander et al. 2009).

Em Março de 2012 de acordo com a base de dados (miRBase 18.0), identificou-se mais de 1000 miRs na espécie humana comparado aos 135 miRs da espécie *C.elegans*. Atualmente notou-se que um aumento no número de miRs

coincide com um aumento na complexidade animal (Prochnik, Rokhsar et al. 2007). Não obstante, tem sido proposto que a regulação da expressão gênica por miRs, pode ter contribuído para o aumento da complexidade dos organismos vertebrados (Vasques 2012; Jan Novák 2014). Dentre as diferenças de vertebrados e invertebrados, algumas são consideradas principais na evolução do sistema muscular esquelético; 1^a- os invertebrados não apresentam células satélites, que são primordiais na regeneração das fibras musculares; 2^a- nos invertebrados, não existem processos de diferenciação em tipos de fibras musculares (fibras intermediárias, transformando-se em fibras do Tipo I- lentas oxidativas, ou fibras do tipo II- rápida glicolíticas), (Baylies, Bate et al. 1998; Lecroisey, Segalat et al. 2007), e 3^a- existe um grupo de miRs chamados de *myomiRs*, que juntos perfazem 25% da expressão gênica total da musculatura esquelética, nos vertebrados (McCarthy 2008; McCarthy, Esser et al. 2009). São eles: o miR-1, miR-133a, miR-133b, e o miR-206, este último específico do músculo esquelético. Além disso, temos; miR-208a, miR-208b, miR-499, miR-126, miR-29, miR-181 e miR-214, todos envolvidos com a musculatura esquelética, porém envolvidos também com a musculatura cardíaca e vascular (Eisenberg, Alexander et al. 2009; Soci, Fernandes et al. 2011; D. A. Silva ND, Fernandes et al. 2012; Fernandes, Magalhaes et al. 2012).

Deste modo, este trabalho se propõe a estudar como o treinamento físico de endurance afeta a expressão dos miRs na musculatura esquelética humana, e em seus processos miogênicos, além de, encontrar respostas mecanicistas que carecem de verificação e comprovação.

2. OBJETIVOS

1- Avaliar se o treinamento físico aeróbio provoca alterações na expressão dos “*myomiRs*”, na musculatura esquelética humana, em indivíduos saudáveis.

2- Investigar alterações da expressão gênica e proteica, na regulação miogênica determinadas pelo miR-206, em resposta ao treinamento físico aeróbio em indivíduos saudáveis.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1- Treinamento físico aeróbico

O treinamento físico dinâmico é uma conduta que intensifica o funcionamento do sistema cardiovascular e do sistema músculo esquelético humano (Tesch and Karlsson 1985). Outro aspecto importante é os efeitos decorrentes do treinamento físico aeróbio crônico, com: aumentos no débito cardíaco máximo, capacidade oxidativa, aumento na mioglobina, capilarização e frequência cardíaca de repouso. Essas são adaptações associado às mudanças na morfologia e funcionalidade do sistema músculo esquelético e do miocárdio (Negrão 1996).

O movimento humano depende da transformação da energia química trifosfato de adenosina (ATP) em energia mecânica, através da contração dos músculos esqueléticos (Armstrong 1988). A musculatura esquelética não é apenas um grupo homogêneo de fibras com propriedades metabólicas e funcionais semelhantes (Simoneau, Lortie et al. 1985). Na verdade, a distribuição do percentual do tipo de fibras difere entre os indivíduos. Essa distribuição é estabelecida antes do nascimento, e é determinada essencialmente pelo código genético (Pette and Staron 1990). Não obstante, muitos pesquisadores classificam as fibras musculares esqueléticas, da seguinte forma: A) fibras de contração lenta, tipo I (oxidativas), subdivisão: tipo **Ic** (fibras raras, e indiferenciadas), B) fibras de contração rápida, tipo II (glicolíticas), subdivisões: **IIa** (intermediárias e diferenciáveis); **IIb** (tipo glicolíticas por excelência); **IIc** (fibras raras, e

indiferenciadas); **IIx** (fibras patologicamente alteradas) (Bottinelli and Reggiani 2000; Scott, Stevens et al. 2001; D'Antona, Lanfranconi et al. 2006). Ambos os tipos de fibras musculares (I e II) são ativados quando o indivíduo se exercita, além disso, exigem um alto nível de transferência de energia aeróbia e anaeróbia (Gollnick, Parsons et al. 1983; Saltin 1983). Ademais, estudos adicionais sugerem a possibilidade de mudanças nas propriedades bioquímicas-fisiológicas das fibras musculares, com transformação progressiva do tipo de fibra durante treinamento físico específico (Baldwin, Valdez et al. 1982; Gollnick, Parsons et al. 1983; Pette and Vrbova 1985; Aitken, Bennet et al. 1989). Jansson e colaboradores demonstraram em estudos com atletas que em dezoito semanas de treinamento físico anaeróbio, seguidas por onze semanas de treinamento físico aeróbio, acarretou um aumento de 15% nas fibras do tipo glicolíticas e uma redução no mesmo percentual das fibras do tipo oxidativas. Em seguida, na fase aeróbica ficou evidenciado um aumento de 23% no percentual de fibras de contração lenta e uma redução proporcional no percentual de fibras de contração rápida (Jansson, Sjodin et al. 1978; Jacobs, Esbjornsson et al. 1987). Esses achados sugerem que o treinamento físico específico ou/e a inatividade, podem induzir a uma verdadeira transformação na tipagem das fibras musculares esqueléticas (Simoneau, Lortie et al. 1985; Tesch and Karlsson 1985; Scott, Stevens et al. 2001).

Outro fator importante que afeta a resposta ao treinamento físico, é o nível inicial de aptidão física. Indivíduos que estejam pouco adaptados ao treinamento físico, terão consideráveis melhoras, no entanto, um indivíduo bem treinado terá uma magnitude de melhora pequena (Mcardle 2009). Estudos com indivíduos cardíacos sedentários, demonstraram uma melhora de 30% no $VO_{2máx}$, porém, quando o mesmo tipo de treinamento era ministrado a adultos saudáveis ativos,

induzia somente um aumento de 8% no $\text{VO}_{2\text{máx}}$ (Saltin 1983; Simoneau, Lortie et al. 1985). Portanto, uma melhora de 5% na capacidade física aeróbica de um atleta, é tão importante, quanto um aumento na capacidade física de 25% de um indivíduo sedentário (Pollock, Dimmick et al. 1975; Midgley, McNaughton et al. 2007).

3.2 -Células Satélites

As células satélites estão envolvidas no desenvolvimento e regeneração das fibras musculares esqueléticas (Grounds 1998). Nas miofibrilas adultas essas células são mitoticamente quiescentes, mas podem ser ativadas e proliferarem em resposta a estímulos como, sobrecarga mecânica, treinamento físico aeróbio e traumas (Hawke and Garry 2001). São células pequenas, mononucleadas, localizadas entre a lâmina basal e o sarcolema da fibra muscular (Hawke and Garry 2001). Foram denominadas satélites, por sua localização estratégica adjacente a miofibrila adulta (Mauro 1961). As células satélites são capazes de ativar programas miogênicos e se diferenciar em miócitos maduros (Seale and Rudnicki 2000). Essa diferenciação permite reparo, hipertrofia e formação de novas fibras (Allen, Roy et al. 1999). O processo de reparação das fibras musculares é razoavelmente rápido. O dano causado ao músculo por algum agente (lesões/exercício) faz com que as fibras obtenham núcleos extras, via células satélites, para evitar a morte celular, no qual poderia resultar na diminuição da massa muscular e ajustes negativos na expressão de genes que fazem a síntese protéica (Adams 1998). Estima-se que em músculo esquelético de roedores adultos normais, 2% de mionúcleos são restabelecidos semanalmente (Schmalbruch and Lewis 2000). Além disso, a musculatura esquelética dos

mamíferos tem a habilidade de se desenvolver e regenerar, a danos extremamente severos (Hawke and Garry 2001). A regeneração muscular é caracterizada por duas fases: uma fase degenerativa e uma fase regenerativa. O evento inicial da degeneração muscular se faz através da necrose das fibras musculares. Este fato é geralmente gatilho para rompimento das miofibras sarcolemas. A quebra da integridade das miofibrilas reflete no aumento de níveis séricos de proteínas musculares, tais como creatina quinase (CK), a qual é geralmente restrita ao citosol (Armstrong 1990). Em humanos e animais, o aumento da CK sérica é observado depois de estresse mecânico (exercícios intensos) (Coulton, Morgan et al. 1988). Outro mecanismo de grande importância é a homeostasia do cálcio. Hipotetizou-se que, influxos de cálcio aumentados depois de dano sarcolemal ou no retículo sarcoplasmático, resultem numa perda na homeostasia do cálcio e aumento da proteólise cálcio-dependente, podendo assim, danificar miofibrilas e proteínas do citoesqueleto, levando à degeneração (Armstrong 1988; Alderton and Steinhardt 2000). A degeneração muscular é seguida pela ativação do segundo processo, regeneração muscular (Allen, Roy et al. 1999). A proliferação celular é um importante evento necessário para a regeneração. Notavelmente o aumento das células miogênicas fornece novos mionúcleos para a reparação muscular (Campion 1984; Grounds 1998; Hawke and Garry 2001). Nestas condições, as células satélites (células tronco), por serem células miogênicas indiferenciadas, induzem proliferação e diferenciação celular, fornecendo núcleos extras para o crescimento miofibrilar e reparação das fibras musculares danificadas (McCormick and Thomas 1992). Uma vez que a fusão de células miogênicas esteja completa, estes novos mioblastos aumentam de tamanho, e movem o mionúcleo para a periferia da fibra muscular. Em condições normais, o músculo

regenerado é morfológicamente e funcionalmente indistinguível a um músculo sem lesão (Saltin, Henriksson et al. 1977) .

3.3- MicroRNAs

Os miRs são uma classe de pequenos RNAs de aproximadamente 18 a 25 nucleotídeos, não codificadores de proteínas, e responsáveis pela regulação pós-transcricional da expressão gênica de plantas e animais (Kim, 2005). Desempenham um papel central na regulação de genes, como desenvolvimento de células tronco embrionárias, miogênese, adipogênese, metabolismo de gordura e homeostase da glicose (Kim, Lee et al. 2006; McCarthy 2008; Mukherji, Ebert et al. 2011). De acordo com o banco de dados (miRBase 18.0), identificou-se mais de 1000 miRs na espécie humana (Liu, Williams et al. 2012). Estudos estimam que este número possa ser bem maior, constituindo assim, uma das maiores classes de reguladores gênicos encontrados até hoje (Olena and Patton 2009). Esse aumento no número de miRs coincide com um aumento na complexidade animal (Prochnik, Rokhsar et al. 2007). O primeiro miR descoberto na década de 90 e que está associado à regulação do desenvolvimento larval em *C. elegans*, foi o miR Lin-4. (Lee, Feinbaum et al. 1993).

3.4 -Localização dos miRs

Os miRs podem estar presentes em muitas regiões do genoma (Figura 1), como: (a) regiões intergênicas clusterizados, (b) em éxons não codificadores, (c) em íntrons clusterizados codificadores e (d) éxons codificadores (Olena and Patton 2009).

Figura 1. Visualização da localização genômica dos miRs, (V. Narry Kim, 10, 126-139, 2009).

Aproximadamente 50% dos miRs encontrados em mamíferos estão localizados próximo a outros miRs, e assim são chamados de “*clusters*” (Mukherji, Ebert et al. 2011). Esses aglomerados são transcritos a partir de uma única unidade de transcrição (UT) policistrônica (Thum and Van Rooij 2010). Não obstante, há miRs que podem ser transcritos a partir de promotores separados, sugerindo que estes possam suas próprias UT (Montgomery and Van Rooij 2010). Alguns miRs são gerados a partir de UT que não são codificadoras

as proteínas, entretanto outros são gerados a partir de UT codificantes (Olena and Patton 2009). Aproximadamente 40% dos loci de miRs estão localizados em regiões intrônicas, enquanto 10% são encontrados em região exônica (Mukherji, Ebert et al. 2011). Alguns miRs podem ser classificados como intrônicos ou exônicos dependendo dos padrões de splicing alternativo que seus genes hospedeiros são submetidos (Vasudevan, Tong et al. 2007).

3.5- Biogênese dos miRs (Via canônica)

A maioria dos miRs são transcritos pela RNA polimerase II (RNAPII), que geram um transcrito primário chamado (pri-miR) (Czech and Hannon 2011). Esses pri-miRs, são transcritos como um gene comum, por isso apresentam a estrutura cap 5'e a cauda poli (A) (Williams, Liu et al. 2009). O processamento através da via canônica é precedido de eventos de clivagens (He and Hannon 2004). O procedimento tem início pela junção da ribonuclease-Drosha e DGCR8, que é um co-fator que direciona Drosha na clivagem o pri-miR, por isso é essencial no processamento (em humanos) para formar um complexo de multiproteínas, chamado de microprocessador (Czech and Hannon 2011), consequentemente o pri-miR com ~1000-800 nucleotídeos, é clivado liberando um precursor chamado, (pre-miR), contendo ~60-70 nucleotídeos (Lee, Feinbaum et al. 1993). Este pre-miR é exportado do núcleo para o citoplasma, através de uma proteína chamada exportina-5, dependente de Ran-GTP (Yi, Qin et al. 2003; Bohnsack, Czaplinski et al. 2004).

Figura 2. Biogênese dos miRs (via canônica), e inibição da tradução (Fernandes, T., Intech, 189-218, 2012).

No citoplasma o pre-miR, sofre um novo processamento pela enzima Dicer associado ao seu co-fator TRBP, (importante na orientação e direcionamento), consequentemente o pre-miR é clivado em ~ 18-25 nucleotídeos. (Saito, Ishizuka et al. 2005) O duplex é carregado pela Dicer ao complexo RISC (*RNA-induced silence complex*), o qual contém proteínas da família argonauta (AGO) como principais componentes de atuação na atividade catalítica do complexo (Czech and Hannon 2011). Geralmente a fita do duplex com menos estabilidade, será selecionada para ser elemento do complexo miRISC (Khvorova, Reynolds et

al. 2003; Schwarz, Hutvagner et al. 2003; Vasques 2012). O controle na qualidade e quantidade dos miRs, ocorre a qualquer momento da biogênese ou ainda no *turnover* dos miRs maduros (Schwarz, Grande et al. 2008; Czech and Hannon 2011; Fernandes 2012) (figura.2).

3.6- Mecanismo de ação dos miRs

Endogenamente os genes podem ser regulados pelos miRs pós-transcricionalmente de duas formas diferentes (Vasques 2012; Jan Novák 2014). Primeiramente, pela complementariedade total. Não obstante, leva-se a uma degradação total do mRNA, essa ação é comumente encontrada em plantas, e a complementariedade base perfeita é total entre o miR e o mRNA do gene alvo (Rhoades, Reinhart et al. 2002). Segundo pela complementariedade parcial, levando a uma repressão da tradução do mRNA sem a sua degradação (Doench and Sharp 2004). Nesse caso, cada miR tem uma região específica, localizada entre os nucleotídeos 2 e 8 de complementariedade parcial ao mRNA do gene alvo. Essa sequência é conhecida como região semente e é responsável pela especificidade do miR (Lewis, Burge et al. 2005). A repressão sem a degradação do mRNA é geralmente encontrado em animais (mamíferos), no qual, a região semente esta localizada frequentemente na região 3' UTR desse mRNA, além disso, o microRNA tem característica promíscua, podendo se ligar a vários RNAs mensageiros, dessa forma, silenciando muitos genes alvo ao mesmo tempo (Lau, Lim et al. 2001; Jan Novák 2014).

Figura 3. Repressão da tradução do mRNA do lin-14 pelo microRNA lin-4 (Lee, Feinbaum et al. 1993).

Os processos regulatórios genéticos descritos acima são multifacetários, e consistem em um fino conjunto de expressão e repressão de diferentes genes que ocorrem através dos miRs, revisto por Vasques et al.; (Vasques 2012).

3.7 - MiRs da musculatura esquelética humana

3.7.1- *MyomiRs*

Existe um grupo de miRs chamados de *myomiRs*, que juntos perfazem 25% da expressão total da musculatura esquelética, nos vertebrados, são eles: o miR-1, miR-133a, miR-133b, e miR-206 (McCarthy and Esser 2007; McCarthy 2008; McCarthy, Esser et al. 2009). Além disso, um estudo de microarray confirmou a alta expressão do miR-206 e sua especificidade muscular esquelética (Baskerville and Bartel 2005; Liang, Ridzon et al. 2007). Sempere e colaboradores, propuseram pela primeira vez a descrição dos *myomiRs*, mostrando altas expressões em músculos esqueléticos e músculos cardíacos de camundongos e seres humanos (Sempere, Freemantle et al. 2004). A importância dos *myomiRs*

no desenvolvimento muscular, foi confirmado pela primeira vez por Sokol and Ambros, que deletaram o miR-1 da espécie *Drosophila* levando à morte prematura em função de uma carência no crescimento adequado da musculatura esquelética, durante estágios do desenvolvimento larval (Sokol and Ambros 2005; van Rooij, Sutherland et al. 2007). A maioria dos estudos sobre os *myomiRs* são focados na função do miR-1, 133a e 133b, no desenvolvimento cardíaco e doenças (van Rooij, Sutherland et al. 2007; Xiao, Luo et al. 2007). Entretanto, o miR-206 é o único entre a família *myomiRs*, em que é especificamente expresso no músculo esquelético estriado, sendo ausente em outros tecidos ou tendo seu nível de expressão muito baixo (Kim, Lee et al. 2006; McCarthy 2008). Em termos funcionais, os *myomiRs*, comumente regulam genes relacionados a diferenciação muscular. Três pares de *myomiRs*, são transcritos bicistronicamente, são eles: miR-1/133a, miR-1/133b, e miR-206/133b, todos demonstrando importantes papéis no controle da diferenciação muscular (Liu, Williams et al. 2007).

O miR-1 é altamente expresso no músculo esquelético em várias espécies, desde *Drosophila melanogaster* à seres humanos, sendo o mais ancestral e conservado *myomiR* (Eisenberg, Alexander et al. 2009). O miR-1, modula a proliferação e a diferenciação muscular por regular a atividade de fatores transcricionais como; SFR (fator regulador sérico) e MEF2 (fator transcricional). Recentes estudos mostraram que o miR-1 promove miogênese por ter como alvo histonas deacetilases 4 (HDAC4), um repressor transcricional da expressão gênica muscular. Desse modo, o miR-1 reprime a expressão da repressora HDAC4, que atuam como sinal dependente permitindo a diferenciação muscular junto à MEF2 (Chen, Mandel et al. 2006). Portanto, o miR-1 induz a diferenciação muscular,

pois potencializa MEF2 na atividade pro-miogênica (Potthoff and Olson 2007; Eisenberg, Alexander et al. 2009). Além disso, McCarthy e colaboradores, afirmaram que o miR-1 tem sua expressão diminuída durante a hipertrofia muscular esquelética em favorecimento a expressão de genes importantes no crescimento muscular, como, HGF, IGF-1, SRF e LIF (McCarthy and Esser 2007). Em particular o IGF-1. A diminuição da expressão do miR-1 após sete dias de treinamento poderia, em parte, explicar o aumento da expressão proteica do IGF-1 durante respostas iniciais de sobrecargas de treinamento físico com pesos. Dessa forma, liberando a expressão do mRNA de genes-alvo (Adams, Haddad et al. 1999; McCarthy and Esser 2007). Ademais, outro estudo observou aumentos na expressão do miR-1 no músculo esquelético de camundongos, após 3 horas de uma única sessão de treinamento físico de endurance (Safdar, Abadi et al. 2009). As hipóteses foram que o aumento do miR-1 estava associado particularmente a fatores repressores que regulam negativamente a expressão miogênica, como HDAC4, e desse modo, promoveriam o remodelamento da lesão ocasionado pela sessão de treinamento físico de endurance. Portanto, a diminuição ou aumento na expressão do miR-1 está envolvido com o tipo de treinamento empregado; sobrecargas com pesos ou treinamento físico de endurance (Safdar, Abadi et al. 2009).

O miR-133 promove diferenciação celular em células progenitoras mesodermiais e tem a função de regular a proliferação celular de mioblastos, por reprimir um fator transcricional chamado SRF (fator de resposta sérica), que é importante na regulação do ciclo celular e diferenciação no músculo esquelético, *in vivo e in vitro* (Mauro 1961; Callis, Chen et al. 2007). Recentemente, Safdar e colaboradores, não encontraram alteração na expressão do miR-133 após seis

semanas de treinamento físico de endurance, em camundongos. Essa resposta inalterada do miR-133, poderia ser, em partes, por promover a expressão de fatores regulatórios envolvidos na hipertrofia muscular esquelética, como: SRF (fator regulatório do crescimento muscular) – um fator de transcrição que promove o crescimento e a diferenciação de diferentes tipos celulares, como o tecido muscular esquelético (Safdar, Abadi et al. 2009). Além disso, McCarthy e Esser, em recente estudo, mostraram que o miR-133 tem sua expressão diminuída durante a hipertrofia muscular esquelética em favorecimento a expressão de genes importantes no crescimento muscular, como IGF-1 (McCarthy and Esser 2007). Portanto, a diminuição na expressão do miR-133 está envolvido com o aumento no calibre da fibra muscular esquelética em camundongos, liberando assim vias de crescimento e reparo do músculo esquelético (McCarthy and Esser 2007).

O miR-206 é o único especificamente expresso no músculo esquelético e exclusivamente expresso em vertebrados, além de, um dos mais abundantes miRs presentes na musculatura esquelética adulta (Koutsoulidou, Mastroiannopoulos et al. 2011). O miR-1 e o miR-206 pertencem a uma mesma família gênica e podem regular os mesmos mRNAs (Eisenberg, Alexander et al. 2009). Recentemente, revelou-se a vinculação desses miRs com a hipertrofia muscular esquelética. Em um estudo na identificação das bases genéticas da hipertrofia muscular observada em *Texel sheep* (tipo de ovelhas musculosas), os autores investigaram o gene da miostatina como gene candidato para possível alteração fenotípica (Clop, Marcq et al. 2006). De maneira surpreendente, encontrou-se um polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP) na região 3' UTR do gene da miostatina, uma troca de base de G por A, criando um sítio ilegítimo como alvo para os miR-1 e o miR-206. Ambos estavam fortemente expressos no tecido

muscular, sugerindo que esses tiveram um ganho de função, em consequência a afinidade ao sítio alvo- introduzido no gene pelo polimorfismo. Portanto, os miR-1 e miR-206, regulariam negativamente a expressão do gene da miostatina em *Texel sheep* (Clop, Marcq et al. 2006). De fato, a expressão proteica da miostatina estava dramaticamente reprimida neste tipo de ovelha. Para confirmar o estudo, usaram o gene repórter da luciferase, co-expressando 4 sequências *tandem* do gene da miostatina, com a presença da alteração polimórfica e outro vetor com o miR-1 e miR-206 e co-transfectaram em células COS1 para confirmar o estudo. Assim, estes resultados mostraram que estes dois miRs causam uma inibição translacional do gene da miostatina contribuindo para hipertrofia muscular esquelética observada em *Texel sheep* (Clop, Marcq et al. 2006). Análises de base de dados para SNPs mostram que mutações que criam ou destroem sítios alvos para miRs são abundantes e podem ser importantes efetores das variações fenotípicas em humanos e camundongos (Clop, Marcq et al. 2006).

Desta forma, ratifica-se a importância destes pequenos RNAs em diversos processos biológicos (Callis, Deng et al. 2008). Não obstante, o papel do miR-206 na hipertrofia muscular esquelética está associado a fenótipos de transição, ou seja, no momento da diferenciação do tipo de fibra muscular esquelética, há um aumento na expressão do miR-206, e não na origem da fibra muscular esquelética (McCarthy and Esser 2007). O miR-206 está envolvido no aumento da miogênese (Callis, Chen et al. 2007), e promove diferenciação em mioblasto (Anderson, Catoe et al. 2006; Kim, Lee et al. 2006).

Além disso, alguns estudos identificaram alvos regulatórios do miR-206, como: a conexina43 (*gap junctions proteins*) e a Pola1 (subunidade catalítica alfa- p180) da DNA polimerase (enzima). Outros estudos têm sugerido que o miR-206 medeia a

expressão de uma proteína chamada MYOD a qual apresenta um papel chave na regulação da diferenciação muscular esquelética, exercendo como papel fundamental a inibição de genes da follistatina (FSTL) (crescimento muscular) e da Utrofina (UTRN) (citoesqueleto) (Rosenberg, Georges et al. 2006). O miR-206, também é responsável pela regulação da expressão de genes envolvidos no desenvolvimento e diferenciação do tipo de fibra muscular esquelética em adultos (Lecroisey, Segalat et al. 2007). Além disso, este miR regula o *pool* de células satélites existentes na fibra muscular esquelética (Relaix, Rocancourt et al. 2005; Zammit, Partridge et al. 2006). A migração dessas células progenitoras para o desenvolvimento de novas fibras, requer a ativação de genes específicos, como PAX-7 (fator de transcrição) e MET (fator de reparo muscular) (Bober, Franz et al. 1994; Dietrich, Abou-Rebyeh et al. 1999). Ambos, PAX-7 e MET, são genes alvo preditos pelo miR-206 (Heanue, Reshef et al. 1999; Grifone, Demignon et al. 2005). A importância deste miR durante a miogênese é tão evidenciada, que camundongos *knockout*, levam um atraso na reparação da fibra muscular, além de, intensificar doenças como a síndrome de Duchenne (Liu, Williams et al. 2012), levando a uma redução significativa da massa muscular esquelética, devido a hipoplasia muscular (O'Rourke, Georges et al. 2007). O músculo esquelético dos vertebrados é composto por diferentes tipos de fibras, nos quais existem processos contráteis únicos e propriedades metabólicas singulares (Biressi, Molinaro et al. 2007). A composição do tipo de fibra do músculo esquelético é primariamente determinado durante o desenvolvimento peri e pós-natal, mas pode ser alterado durante a vida adulta em resposta a mudanças na atividade contrátil (Biressi, Molinaro et al. 2007; Schiaffino, Sandri et al. 2007). O tipo de fibra no músculo esquelético adulto é regulado, por vias de sinalização dependentes do cálcio

(Bassel-Duby and Olson 2006). O miR-206 regula a expressão proteica de efetores *enhancer* específicos como o MEF2 que aparece *downstream* ao braço da via de sinalização dependente de cálcio. Regula também a expressão gênica de histonas deacetilases, bem como, moduladores de parte do sistema calcineurina/NFAT, codificado pelo gene RCAN2 (gene regulador da calcineurina 2). Adicionalmente, o miR-206 regula a expressão de fatores transcricionais, como; Sox6, Pur β e Sp3, todos repressores transcricionais do gene da β -miosina de cadeia pesada (β -MHC), o que ocorre no sedentarismo, levando mudanças no perfil das fibras musculares esqueléticas, tornando-as tipos de fibras de contração lenta (Hagiwara, Yeh et al. 2007; Ji, Tsika et al. 2007).

Iris Eisenberg, Matthew S. Alexander, Louis M. Kunkel, *J. Cell Med.*, vol. 13., nº1, 2009, pp. 2-11

3.7.2 - *miR-208b*

O miR-208b regula a β -MHC, que é o principal componente das fibras de contração lenta no músculo esquelético. Não obstante, o gene β -MHC e o gene α -MHC, são expressos de maneira opositiva durante seus estágios de desenvolvimento e remodelamento muscular cardíaco (Montgomery, Hullinger et al. 2011). O miR-208a e miR-208b também são co-expressos de maneira opositiva. Essa regulação mantém-se em constante atividade, sendo que, a expressão do miR-208a cardíaco é contínua, enquanto a expressão do miR-208b é intermitente no músculo esquelético, somente tendo sua expressão aumentada em períodos específicos, como no treinamento físico de endurance (Van Rooij, Liu et al. 2008; Montgomery, Hullinger et al. 2011). Por se localizarem dentro do mesmo gene hospedeiro, gene da miosina de cadeia pesada (MHC), dividem uma mesma sequência nucleotídica, se diferenciando em apenas três nucleotídeos, e, conseqüentemente a essa sequência homologa, dividem os mesmos alvos em comum (Van Rooij, Liu et al. 2008; Williams, Liu et al. 2009). O miR-208a é codificado no intron 29 do gene da α -MHC (MYH6), o miR-208b no intron 31 do gene da β -MHC (MYH7) e ainda existe um terceiro miR codificado no gene da MHC, o miR-499, localizado no intron 19 do gene MYH7b (figura 4). O interessante seria saber se, o miR-208b realiza uma função parecida com a do miR-208a, que é reprimir genes de fibras de contração rápidas no músculo esquelético (Van Rooij, Liu et al. 2008). A existência de uma família de miRs que são codificados pelo gene MHC e relacionado ao músculo-específico, levanta questões interessantes; o miR-208a regula a expressão da β -MHC, no qual ele mesmo codifica um miR diretamente relacionado, miR-208b. Outro ponto

interessante seria saber como o músculo estriado está envolvido na rede regulatória, na qual, os miRs estão ajustados em alvos do gene da miosina cardíaca. Essas perguntas abrem novos caminhos para saber como as expressões gênicas musculares e seu desenvolvimento acontece, bem como, quais os circuitos regulatórios que levam às doenças e a saúde (Callis, Chen et al. 2007).

Figura 4. Representação esquemática da localização genômica dos miRs, presentes em diferentes genes da miosina (MHC) e sequências nucleotídicas parecidas (van Rooij, E. 17(5): 662-73 2009)

3.7.3 - *miR-181*

O miR-181 está fortemente associado a regulação da diferenciação celular e também participa na caracterização de fenótipos musculares. Um estudo recente demonstrou aumentos significativos na expressão do miR-181, no músculo esquelético, seguido a uma única sessão de treinamento (Safdar, Abadi et al. 2009). Esse trabalho sugere, o potencial papel do miR-181 na regeneração do músculo esquelético, em razão da sua ação repressora sobre HDAC4, um repressor de MEF2 (fator de diferenciação muscular) (Safdar, Abadi et al. 2009). Além disso, outro estudo, encontrou uma alta expressão do miR-181, no período pós-lesão muscular, em camundongos (Naguibneva, Ameyar-Zazoua et al. 2006). O miR-181 funciona particularmente através da inibição da expressão de um fator de transcrição chamado, HOXA11. O HOXA11 é conhecido por reprimir a proteína MYOD, (fator de diferenciação miogênica), liberando processos de proliferação celular (Naguibneva, Ameyar-Zazoua et al. 2006; Callis, Chen et al. 2007).

3.7.4 - *miR-24*

O miR-24 é um exemplo de miR não específico da musculatura esquelética, porém, envolvido na miogênese muscular, além de regular a expressão de membros da família do TGF- β (fator de crescimento celular). Alguns estudos tem demonstrado que o miR-24 inibi fatores regulatórios miogênicos (MRFs) em cultura celulares de mioblastos (Olson, Sternberg et al. 1986; Brennan, Edmondson et al. 1991). Não obstante, a miostatina por ser um membro da família TGF- β , mostrou-se como um regulador negativo da diferenciação e

crescimento muscular esquelético (McPherron, Lawler et al. 1997; Amthor, Huang et al. 2002). Estudos recentes revelaram que, SMAD3, um modulador de sinalização celular, medeia a supressão da miogênese de proteínas ligadas ao crescimento do músculo esquelético via TGF- β (folistatina) (Liu, Black et al. 2001; Liu, Kang et al. 2004). Entretanto, SMAD7 que é uma proteína que aumenta a diferenciação muscular, está implicada na promoção e aumento da miogênese por interação com MYOD anulando a sinalização da miostatina (Kollias, Perry et al. 2006). Dessa forma, mudanças na expressão do miR-24 afeta mecanismos moleculares como a via do TGF- β , na miogênese. Além disso, durante a miogênese, verificou-se que o miR-24 é altamente expresso e se mantém dessa forma na diferenciação celular, tanto em cardiomiócitos, como no músculo esquelético estriado (Sun, Zhang et al. 2008). Essas observações sugerem que o miR-24 poderia atuar na diferenciação muscular esquelética e na manutenção da homeostasia em tecidos musculares cardíacos (Van Rooij, Sutherland et al. 2006). Considerando que o miR-24 é expresso em múltiplos tecidos, especula-se que poderia ter funções diferentes na homeostasia de cada tecido independentemente (Van Rooij, Sutherland et al. 2006; Van Rooij, Liu et al. 2008).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Amostragem

Foram selecionados 12 indivíduos saudáveis, do sexo masculino, voluntários recrutados da Polícia Militar do Estado de São Paulo, na faixa etária de 20 a 35 anos. Estes indivíduos foram submetidos a uma ergoespiometria, à pletismografia de oclusão venosa (fluxo sanguíneo), a uma coleta de sangue, e a uma coleta de amostra de tecido muscular através da técnica de biopsia muscular no período pré e pós-treinamento físico. Os indivíduos foram treinados sobre a supervisão direta de um professor de Educação Física, que seguiu um protocolo padronizado de intensidade, duração e frequência semanal das sessões do treino.

Figura 5. Organograma do estudo

4.2 - Protocolos de Treinamento Físico

No decorrer do período de março de 2011 a agosto de 2011, o grupo de 12 voluntários foi formado para a realização de 16 semanas de treinamento físico aeróbio. O treinamento físico foi realizado no Centro de Formação de Soldados “Coronel Eduardo Assumpção” e foram treinados na pista de atletismo do próprio local, situado na Av. Dr. Felipe Pinel, 2859 – Pirituba – São Paulo/SP.

O período de treinamento foi de 16 semanas, com três sessões semanais, de 60 a 90 minutos de duração. A sessão de treinamento consistiu em: aquecimento (alongamento); exercícios de resistência muscular localizada; treinamento aeróbio de corrida; e volta à calma. Apesar de a sessão ser realizada em grupo, o treinamento foi individualizado, respeitando as frequências cardíacas correspondentes aos limiares ventilatórios de cada um dos indivíduos, avaliado no teste ergoespirométrico. Nas primeiras nove semanas (Fase I) o treinamento teve um caráter progressivo em relação ao volume; iniciava-se com trinta minutos de corrida e chegando ao final da oitava semana com uma duração de cinquenta minutos à uma hora. Nesta fase, o treinamento aeróbio foi conduzido numa intensidade correspondente ao Limiar Anaeróbio (LA). A frequência cardíaca foi monitorada por um professor de Educação Física, por meio de monitor de frequência cardíaca (marca Polar, modelo A1) momento a momento durante todo o treinamento aeróbio. Na Fase II do treinamento (oito semanas seguintes), o volume da corrida no treinamento físico foi mantido entre 50 e 60 minutos, mas com uma progressão da intensidade de treinamento, correspondente ao ponto de

compensação respiratória (PCR). Nesta fase, em uma ou duas sessões de treinamento físico realizado por semana, a frequência cardíaca poderia ultrapassar o PCR.

4.3 - Métodos de Avaliação

4.3.1 - Avaliação da Capacidade Cardiorespiratória ao Exercício

A avaliação da capacidade cardiorespiratória foi realizada no início e após quatro meses de intervenção do treinamento físico aeróbio. Todos os voluntários foram submetidos a teste ergoespirométrico em um protocolo de rampa, em esteira ergométrica (Quinton Instruments Company, Seattle, Washington). A avaliação foi realizada em um sistema computadorizado (Sensor Medics, modelo Vmax 229, Buena Vista, CA, USA), para medida direta do consumo de oxigênio (VO_2) pico, antes de iniciar o protocolo de treinamento e ao final deste período. Após posicionamento na esteira, os indivíduos colocavam um bucal com transdutor de volume, e ao mesmo tempo em que foi realizada preensão nasal por meio de prendedor apropriado, para que os gases expirados fossem coletados continuamente por intermédio da referida válvula. A ventilação (VE), fração expirada de oxigênio (O_2) e dióxido de carbono (CO_2) foram medidos a cada ciclo respiratório através de sensores. A partir das análises da VE e das concentrações dos gases expirados foram calculados o VO_2 e a produção de dióxido de carbono. O VO_2 pico foi considerado o VO_2 obtido no pico do exercício, quando o indivíduo voluntário se encontra em exaustão e não mais conseguia manter o ritmo da corrida imposto pela esteira.

4.3.2- Determinação do limiar anaeróbio e ponto de compensação respiratória

Além da determinação da capacidade funcional máxima, foram determinados o LA e o PCR que foram utilizados para a prescrição individualizada da intensidade de treinamento físico. O LA foi considerado no minuto em que o paciente apresentou valores de equivalente ventilatório de oxigênio (VE/VO_2) e pressão parcial de oxigênio no final da expiração ($PetO_2$) mais baixos, antes de iniciarem aumento progressivo e incremento do valor de razão de troca respiratória não linear (perda da cinética VO_2 e VCO_2). O PCR foi considerado no minuto em que o indivíduo apresentava valores de equivalente ventilatório de gás carbônico (VE/VCO_2) mais baixos antes de iniciarem um aumento progressivo e pressão parcial de gás carbônico no final da expiração ($PetCO_2$) mais alto antes de começar a diminuir (Skinner, 1980). Todos foram encorajados a realizar o exercício progressivo máximo até que sintomas como dispneia, fadiga intensa ou dor muscular os tornassem inábeis para continuação do teste. O esforço também foi interrompido na presença de arritmias complexas ou sinais de isquemia miocárdica. O período de recuperação foi de quatro minutos, numa velocidade de duas milhas por hora, com a esteira a zero grau de inclinação.

A pressão arterial e a frequência cardíaca foram monitoradas durante todo o teste ergoespiométrico. A pressão arterial foi aferida pelo método auscultatório, utilizando-se um esfigmomanômetro de coluna de mercúrio. As aferições foram realizadas no repouso e a cada dois minutos de exercício e no primeiro, segundo e quarto minutos da recuperação. A frequência cardíaca foi continuamente

monitorada pelo sinal eletrocardiográfico e registrada ao final de cada minuto do exercício e recuperação. O teste ergoespiométrico foi precedido de um eletrocardiograma de repouso, com o registro de doze derivações simultâneas e realizado em ambiente com ar condicionado em temperatura controlada (21°C) pelo menos duas horas após uma refeição leve.

4.3.3 - Avaliação do Fluxo Sanguíneo Muscular

O fluxo sanguíneo muscular foi avaliado pela técnica de pletismografia de oclusão venosa. O braço contralateral (aquele que não estava realizando o exercício isométrico) foi elevado acima do nível do átrio direito para garantir uma adequada drenagem venosa. Um tubo silástico preenchido com mercúrio, conectado a um transdutor de baixa pressão e a um pletismógrafo foi colocado ao redor do antebraço, a 5 cm de distância da articulação úmero-radial e conectado a um pletismógrafo. Um manguito foi colocado ao redor do pulso e outro na parte superior do braço. O manguito do pulso foi inflado a um nível supra-sistólico 1 minuto antes de se iniciar as medidas. Em intervalos de 15 segundos, o manguito do braço foi inflado acima da pressão venosa por um período de 7 a 8 segundos. O aumento em tensão no tubo silástico refletiu o aumento de volume do antebraço e, conseqüentemente, sua vasodilatação. O sinal da onda de fluxo muscular foi registrado em tempo real em um computador através do programa AT/CODAS e WINDAQ, numa frequência de 500 Hz. A condutância vascular no antebraço foi calculada pela divisão da pressão arterial média (mmHg) pelo fluxo sanguíneo no antebraço.

4.3.4 - Teste de Exercício Isométrico

O protocolo de exercício isométrico foi realizado no início e após quatro meses de intervenção do treinamento físico. Protocolo demonstrado esquematicamente na figura 6. Antes do início do protocolo, o indivíduo foi colocado na posição deitada, e a seguir foi determinada sua contração voluntária máxima, pela média de três tentativas de contração máxima (no braço dominante) em um dinamômetro de preensão de mão. A seguir, calculou-se 30% da contração voluntária máxima. Após três minutos de repouso (registros basais), o indivíduo realizou três minutos de exercício isométrico moderado de preensão de mão a 30% da contração voluntária máxima. Após este período, foram realizados três minutos de recuperação. Durante todo o protocolo de exercício isométrico foram feitos os registros simultâneos do fluxo sanguíneo muscular, da pressão arterial e da frequência cardíaca.

Figura 6. Teste de exercício isométrico a 30% da contração voluntária máxima (CVM).

4.3.5 - Avaliação da condutância vascular no antebraço

A condutância vascular do antebraço foi calculada pela divisão do fluxo sanguíneo muscular no antebraço (ml de sangue/min/100ml de tecido) pela pressão arterial média (mmHg), multiplicado por 100, o comportamento dessas variáveis durante o exercício isométrico foi definido pela fórmula da área sobre a curva. Fórmula:

$$=(((G4+H4)+(H4+I4)+(I4+J4))*60)/2$$

4.3.6 - Avaliação da pressão arterial

Durante o protocolo de exercício isométrico a pressão arterial foi medida a cada minuto, no membro inferior esquerdo pelo método oscilométrico (monitor automático de pressão arterial - Dixtal, modelo DX 2710).

4.3.7 - Avaliação da frequência cardíaca

A frequência cardíaca foi obtida através do registro eletrocardiográfico. Foram colocados três eletrodos no tórax do indivíduo, na posição bipolar, para registro da derivação MC5. Após este sinal ser pré-amplificado (General Purpose Amplifier/Stemtech, Inc., GPA-4, modelo 2), ele foi convertido de analógico para digital, e em seguida analisado em um programa de computador AT/CODAS e WINDAQ, numa frequência de 500 Hz.

4.4 - Coleta de Tecido

4.4.1 - Extração por biópsia muscular

A biópsia foi feita no músculo vasto-lateral, aproximadamente no ponto médio entre a borda superior da patela e o trocânter, ou na área de maior secção transversal do músculo. Após assepsia com álcool a 70% e povidine, foi feita anestesia local com lidocaína 1%. Em seguida, foi feita uma pequena incisão na pele e subcutâneo de mais ou menos meio centímetro de comprimento e 1 cm de profundidade. Neste momento, o sangramento local foi estancado por compressão. Através da incisão foi introduzida uma agulha de Allendale (Tarnopolsky, Pearce et al.) (modificado) até uma profundidade suficiente para ultrapassar a fáscia e penetrar o músculo. Por meio de uma pressão negativa, feita por seringa acoplada à agulha, retirou-se um fragmento do músculo vasto-lateral que variou de 50 a 100mg. Após a retirada da agulha, foi feita compressão local por mais ou menos

cinco minutos para estancar o sangramento. Em seguida, foram dados pontos falsos com *micropore* no local da incisão. Por último a coxa foi enfaixada com gaze estéril e atadura aplicando-se compressão moderada, o que foi mantido por um período de seis a oito horas. O fragmento de músculo obtido no procedimento foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e posteriormente mantido congelado a -80°C para posterior análise. As amostras de tecido para extração do miRs foram cortadas em pequenos pedaços e conservadas em *RNAlater* e congeladas -70°C. A biópsia foi realizada em dois momentos: 1º- no início do protocolo, e 2º- após 16 semanas de treinamento físico aeróbio. O procedimento foi realizado no mesmo membro inferior.

4.4.2 - Extrações do RNA Total - Músculo esquelético

As amostras de músculo esquelético retiradas por biópsia muscular (em média de 10 a 50 miligramas de tecido), foram isoladas em 1 ml de *Trizol* (Invitrogen) conforme indicação do fabricante. Um bom enriquecimento da amostra com miRs depende de uma boa homogeneização (maceração com pistilo) e de uma boa extração do RNA total. Logo em seguida, à maceração com pistilo, outro protocolo foi somado ao do *Tryzol* para potencializar a extração do RNA total. Foi usado um aparelho chamado *Fast-Prep*, que dilacera as amostras por meio de BIDS em tubos específicos. A seguir foi transferido o homogeneizado, para um tubo identificado. A amostra foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos nucleoproteicos. Após, foi centrifugada por 10 minutos à velocidade de 12.000 rpm à 4°C. Além

disso, foi adicionado 200µl de clorofórmio, que foi agitado vigorosamente durante 15 segundos (na mão, movimentos de vai e volta). A seguir, a amostra foi incubada por 2-3 minutos à temperatura ambiente. Novamente foi centrifugada por 15 minutos à velocidade de 12.000 rpm à 4°C. Logo em seguida, imediatamente a fase aquosa, onde o RNA corresponde à 60% do volume de *Tryzol* utilizado na homogeneização; aspiramos cuidadosamente a fase aquosa para não contaminar o RNA com proteínas e DNA; Fase Fenol – clorofórmio: fase rosada), a amostra foi transferida, para tubo já identificado. Foi adicionado 500µl de isopropanol e agitado vigorosamente durante 15 segundos (na mão). A seguir foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. Ademais, foi centrifugada por 10 minutos à 12.000 rpm à 4°C. Foi descartado o sobrenadante (no fundo do tubo teremos o RNA precipitado). Foi adicionado 1 ml de etanol 75% e agitado vigorosamente durante 15 segundos (na mão). Logo em seguida, foi centrifugada por mais 5 minutos à 7500 rpm à 4°C, e descartado o sobrenadante. Para finalizar, a amostra foi deixada secar sobre gases estéreis por aproximadamente 5-10 minutos (secar bem). Logo em seguida, foi adicionado 40µl de água DEPC, e dissolvido através de homogeneização. As amostras foram estocadas à -80°C. A amostra final diluída em 40µl de água DEPC foi quantificada a absorbância em UV na A₂₆₀ e A₂₈₀ nm em um Nanodrop. A integridade do RNA foi analisada em gel poliacrilamida 1% em condições denaturante com 1-2 µg do RNA. As amostras foram corridas em gel 13x15x0,75mm e visualizadas em UV transluminador (Chemidoc). Amostras com alta qualidade de RNAs serão claramente visíveis as bandas de tRNA, e as subunidades 5S e 5,8S do rRNA.

4.4.3- Real Time - PCR – Detecção dos miRs maduros

Para detectar os miRs, nós usamos primers específicos; ID-RT/TM: miR-1 – n°002222, miR-133a – n°002246, miR-133b –n° 002247 and miR-206 –n° 000510 de acordo com TaqMan microRNA Assay protocol (Applied Biosystems, CA, USA). Para ensaios com TaqMan MicroRNA Assay foi utilizado o kit Reverse Transcriptase da *Applied Biosystems*. Foram utilizados 1-10ng de RNA em 1µl. Foi preparada uma RT máster mix com: dNTPs 100mM, transcriptase reversa multiscript 50U/ml, tampão 10x para a enzima, inibidores de RNase 20U/ml e água livre de nuclease para completar o volume de 15 µl de reação. Além disso, utilizamos um termociclador, o protocolo consistia em: 16°C por 30 min, 42°C por 30 min, 85°C por 5 min e após as amostras foram mantidas a 4°C. Para a reação de PCR, foi diluído o produto da reação de RT 1:15, além disso foi feita uma máster mix com: TaqMan Small RNA Assay, TaqMan universal PCR, e água – DEPC, volume final 20µl. Em seguida, foi distribuído na placa, e as fluorescências foram lidas em detector ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems). As amostras foram normalizadas pela expressão do U6 (ID-n°001973). Cada amostra foi analisada em duplicata. As relativas expressões dos miRs foram comparados depois da normalização dos valores de referência (ΔCT). Mudanças na expressão dos miRs foram calculadas usando a diferença nos valores do ΔCT entre as duas amostras ($\Delta\Delta CT$) e a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$. Os resultados foram expressos em porcentagem (%) do controle.

4.4.4 – Análise da expressão gênica

A análise da expressão por RT-PCR foi feita para determinação da expressão de genes específicos da via miogênica, para isso utilizamos o protocolo SYBER Green Assay. Além disso, para este ensaio, nós utilizamos também o kit Fermentas, para a produção do cDNA. Então, preparamos *master mix* com: amostras, tampão, *primers*, enzima e água-DEPC, completando o volume final de 10µl. Além disso, usamos um termociclador para o RT, com o seguinte protocolo: 37°C por 30 min, 95°C por 10 min e depois mantida em 4°C por 5 minutos. Para reação PCR foi preparada uma máster mix com *primers* específicos para: PAX-7, MYOD, MYF5, MRF4, MYOG e FSTL. As fluorescências foram lidas em detector ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems). Foi utilizado como normalizador o gene da ciclofilina. Cada amostra foi analisada em duplicata. As relativas expressões dos genes foram comparadas depois da normalização dos valores de referência (ΔCT) Os resultados foram expressos em porcentagem (%) do controle.

4.4.5 - Western blotting (análises de expressão proteica)

As amostras coletadas foram imediatamente homogeneizadas em tampão de extração e colocadas em banho a 100°C por 10 min. As amostras foram mantidas no gelo e centrifugadas (3.000 rpm X 10 min) e depois armazenadas a -20°C. Os homogenatos foram centrifugados por 15 minutos, a 12.000 rpm, a 4°C. O sobrenadante foi retirado, diluído em tampão Laemmli na proporção de 1:4 e aquecidos em água fervente por 5 min (Laemmli 1970) para ser posteriormente

submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 8%). A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, utilizando-se um aparelho da *Bio-Rad* por aproximadamente 2h sob 120 volts. As membranas foram bloqueadas pela incubação com 10 ml de solução bloqueadora (BSA 5%, Tris 10mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,02%) a 4°C, *overnight* ou por 2h na temperatura ambiente. Estas membranas foram posteriormente incubadas a 4°C com o anticorpo primário para proteínas estudadas, como: PAX-7, MYOD, MYOG, CD31 e MHC. O nível de expressão de GAPDH foi utilizado para normalizar os resultados. A ligação do anticorpo primário foi detectada com a utilização de anticorpos secundários (específicos para cada tipo de anticorpo primário) Utilizamos para revelação das proteínas um kit “Super Signal Oeste Femto” (Thermo Scientific) para visualizar um sistema chamado; ChemiDoc™ (BIO-RAD). As bandas foram analisadas usando software de imagem (ImageJ). Os resultados são expressos como porcentagem do controle (%).

5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média. Dados físicos, hemodinâmicos, análises do consumo máximo de oxigênio (VO_2), fluxo sanguíneo do antebraço (FSA), condutância vascular do antebraço (CVA), frequência cardíaca de repouso, expressão dos microRNAs, dos genes e das proteínas musculares, entre o grupo pré e pós-treinamento físico, foi realizada por teste t de “student” pareado, para avaliar possíveis diferenças. Dados de FSA e CVA são apresentados em área sobre a curva (ASC). O nível de significância aceito foi de $p \leq 0.05$.

6. RESULTADOS

As características basais, fisiológicas, demográficas, medições metabólicas e hemodinâmicas, de 12 indivíduos no período pré e pós-treinamento físico aeróbio, são apresentadas na tabela 1.

Não houve diferenças significativas na idade, peso, altura, índice de massa corporal (IMC), e na pressão arterial média (PAM). No entanto, foram observadas diferenças significativas entre o período pré e pós-treinamento, na frequência cardíaca de repouso (FCR), no tempo total de exercício na esteira, nos limiares ventilatórios (LA) e (PCR), e na inclinação máxima atingida na esteira (%),

* $p \leq 0,05$. Os indivíduos estavam em equilíbrio de Hardy Weinberg ($P = 0,30$).

Tabela.1 – Distribuição Geral

Dados Físicos e Hemodinâmicos	Treinamento físico aeróbio		<i>P</i>
	Pré	Pós	
	12	12	
Idade, anos	24±8	25±4	0,38
Peso, kg	76±0	74±0	0,11
Altura, cm	175±6	175±8	0,44
IMC, kg/m ²	25±0	22±0	0,09
Pressão arterial média (rep.) mmHg	95±3	99±0	0,35
Pressão arterial média (pico) mmHg	116±7	121±4	0,33
Tempo total de exercício, seg.	568±8	596±8	0,05*
Inclinação máx. atingida, (%)	9,5 ±3	12±1	0,04*
Tempo total no limiar LA, min.	4,0±1	5,9±1	0,01*
Tempo total no limiar PCR, min.	7,0±1	9,9±1	0,002*
Frequência cardíaca de repouso, bpm	78±2	67±3	0,03*

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. *p≤ 0,05 de significância.

Efeitos do treinamento físico aeróbio

Todos os doze indivíduos completaram o protocolo. Em resposta ao programa de treinamento, os indivíduos do estudo mostraram aumento no VO_2 pico de $10 \pm 1\%$ (pré 43 ± 5 vs. pós 52 ± 4 ml/kg/min), $*p < 0,05$, e tiveram uma diminuição na frequência cardíaca de repouso de $12,5\%$ (pré 78 vs. pós 67 bpm), $*p < 0,05$ (figuras 7, 8). Além disso, os indivíduos tiveram um aumento no FSA de 68% (621 ± 44 vs. 1042 ± 125 ASC); $*p < 0,004$ (figura 9). Similarmente, mostraram um aumento na CVA de 63% (626 ± 46 vs. 1222 ± 125 , ASC), $*p < 0,001$ (figura 10). Portanto, esses dados confirmam que houve adaptações em resposta ao protocolo de treinamento físico aeróbio empregado no estudo.

Figura. 7. Mudanças no consumo de oxigênio pico ($\text{VO}_{2\text{pico}}$), provocadas pelo treinamento físico aeróbio, em indivíduos saudáveis $* p < 0,05$.

Figura. 8. Mudanças na frequência cardíaca de repouso (FCR), provocadas pelo treinamento físico aeróbio, em indivíduos saudáveis * $p < 0,05$.

Figura. 9. Mudanças no fluxo sanguíneo no antebraço (FSA), provocadas pelo treinamento físico aeróbio, em indivíduos saudáveis * $p < 0,004$.

Figura. 10. Mudanças na condutância vascular no antebraço (CVA), provocadas pelo treinamento físico aeróbio, em indivíduos saudáveis * $p < 0,001$.

Treinamento físico aeróbio e *myomiRs*

Em resposta às 16 semanas de treinamento físico aeróbio, foi observado aumento significativo na expressão de todos miRs estudados; miR-1, miR-133a, miR-133b e miR-206, de 74%, 89%, 118% e 93%, respectivamente, * $p \leq 0,05$ (figuras 11, 12, 13, 14).

Figura 11. Mudanças na expressão do miR-1 no músculo esquelético, provocadas pelo treinamento físico aeróbio, em indivíduos saudáveis * $p < 0,05$.

Figura 12. Mudanças na expressão do miR-133a no músculo esquelético, provocadas pelo treinamento físico aeróbio, em indivíduos saudáveis * $p < 0,05$.

Figura 13. Mudanças na expressão do miR-133b no músculo esquelético, provocadas pelo treinamento físico aeróbio, em indivíduos saudáveis * $p < 0,01$.

Figura 14. Mudanças na expressão do miR-206 no músculo esquelético, provocadas pelo treinamento físico aeróbio, em indivíduos saudáveis * $p < 0,02$.

Fatores miogênicos e alvos do miR-206

Com base nos dados da literatura (Eisenberg, Alexander et al. 2009; Chen, Tao et al. 2010; Dey, Gagan et al. 2011; Jan Novák 2014) nós selecionamos como alvo do miR-206 os genes PAX-7 e FSTL. Além disso, determinamos os genes e proteínas que fazem parte da via de sinalização da miogênese (Eisenberg, Alexander et al. 2009; Jan Novák 2014).

Após o treinamento físico, houve aumento nas expressões dos genes, MYOD, MRF4, MYOG, MYF5, PAX-7, e FSTL; de 265%, 161%, 244%, 163%, 43%, e 173%, respectivamente, $*p \leq 0,05$ (figuras 15, 16, 17, 18, 19, 20).

No entanto, quando analisamos por western blot a expressão das proteínas, encontramos redução na PAX-7 e FSTL de 29% e 24%, respectivamente, $*p \leq 0,05$ (figuras 21, 22). Entretanto para MYOD, MYOG, CD31, e β -MHC, houve aumento de 21%, 41%, 79%, e 94% nos níveis de expressão proteica, $*p \leq 0,05$ (figuras 23, 24, 25, 26).

6.1 - Expressões gênicas

Figura 15. Mudanças na expressão gênica da MYOD no músculo esquelético, provocadas pelo treinamento físico aeróbio, em indivíduos saudáveis * $p < 0,05$.

Figura 16. Mudanças na expressão gênica de MRF4 no músculo esquelético, provocadas pelo treinamento físico aeróbio, em indivíduos saudáveis * $p < 0,05$.

Figura 17. Mudanças na expressão gênica da MYOG no músculo esquelético, provocadas pelo treinamento físico aeróbio, em indivíduos saudáveis * $p < 0,04$.

Figura 18. Mudanças na expressão gênica de MYF5 no músculo esquelético, provocadas pelo treinamento físico aeróbio, em indivíduos saudáveis * $p < 0,05$.

Figura 19. Mudanças na expressão gênica de PAX-7 no músculo esquelético, provocadas pelo treinamento físico aeróbio, em indivíduos saudáveis * $p < 0,05$.

Figura 20. Mudanças na expressão gênica da FLST no músculo esquelético, provocadas pelo treinamento físico aeróbio, em indivíduos saudáveis * $p < 0,04$.

6.2 - Expressões proteicas

Figura 21. Mudanças na expressão proteica de PAX-7 no músculo esquelético, provocadas pelo treinamento físico aeróbio, em indivíduos saudáveis * $p < 0,05$.

Figura 22. Mudanças na expressão proteica de folistatina no músculo esquelético, provocadas pelo treinamento físico aeróbio, em indivíduos saudáveis * $p < 0,05$.

Figura 23. Mudanças na expressão proteica de MYOD no músculo esquelético, provocadas pelo treinamento físico aeróbio, em indivíduos saudáveis * $p < 0,03$.

Figura 24. Mudanças na expressão proteica de MYOG no músculo esquelético, provocadas pelo treinamento físico aeróbio, em indivíduos saudáveis * $p < 0,01$.

Figura 25. Mudanças na expressão proteica de CD31 no músculo esquelético, provocadas pelo treinamento físico aeróbio, em indivíduos saudáveis * $p < 0,001$.

Figura 26. Mudanças na expressão proteica de beta-MHC no músculo esquelético, provocadas pelo treinamento físico aeróbio, em indivíduos saudáveis * $p < 0,03$.

7. DISCUSSÃO

Os principais achados do presente estudo são:

1. Aumento na expressão dos *myomiRs*; miR-1, miR-133a, miR-133b e miR-206, no tecido muscular esquelético humano, em resposta ao treinamento físico aeróbio em indivíduos saudáveis;
2. Alterações no padrão de expressão gênica e proteica de fatores de transcrição envolvidos na miogênese, tais como; PAX-7, MYOD, MYF5, MRF4, MYOG, FSTL, e MHC, em resposta ao treinamento físico aeróbio em indivíduos saudáveis;
3. Melhora nas capacidades funcionais, cardíacas e hemodinâmicas, tais como; VO₂pico, vasodilatação, limiares ventiladores e frequência cardíaca de repouso, em resposta ao treinamento físico aeróbio em indivíduos saudáveis.

Alguns estudos têm sugerido que os *myomiRs* possam modular padrões de expressão gênica no músculo esquelético (Callis, Chen et al. 2007; Eisenberg, Alexander et al. 2009). Além disso, poucos trabalhos demonstram mudanças no padrão de expressão dos *myomiRs*, em resposta ao treinamento físico aeróbio (Nielsen, Scheele et al. 2010). Não obstante, a literatura não menciona quais

padrões de expressão gênica e proteica são modificados na miogênese, em resposta ao treinamento físico aeróbio, em seres humanos.

Nosso trabalho evidencia mudanças nos padrões de expressão dos *myomiRs*, além de definir quais padrões de expressão são modificados na miogênese, envolvidos na proliferação, diferenciação e regeneração da musculatura esquelética humana, em resposta ao treinamento físico aeróbio em indivíduos saudáveis.

O miR-206 específico da musculatura esquelética, foi experimentalmente demonstrado, em mioblastos, ser um alvo direto da transcrição dependente de MYOD (Macquarrie, Yao et al.; Jan Novák 2014). Dessa forma, uma vez MYOD aumentada, também aumentará a expressão do miR-206. Além disso, ficou evidenciado em estudos (Amthor, Connolly et al. 1996; Miura and Jasmin 2006; Rosenberg, Georges et al. 2006) que o miR-206 tem como alvo direto o gene da folistatina (repressor muscular), regulando diretamente seu mRNA, na região 3'UTR. Neste caso, MYOD aumenta a expressão do miR-206, que por sua vez reprime a expressão do gene da folistatina (FSTL) pós-transcricionalmente (McCarthy 2008).

Nossos resultados confirmam a maior expressão de MYOD e do miR- 206, e a menor expressão proteica da folistatina, no período pós-treinamento físico aeróbio em seres humanos. Além disso, fatores transcricionais miogênicos, tais como: MRF4, MYF5, MYOG, e β -MHC, estavam aumentados significativamente após o treinamento físico. Ademais um marcador de angiogênese, chamado: CD31, também estava aumentado. Esses dados podem evidenciar mudanças no padrão de expressão de toda a via miogênica, em indivíduos saudáveis submetidos ao treinamento físico aeróbio.

Até o momento, a função da FSTL não era bem estabelecida na literatura. Entretanto, com base em seu padrão de expressão determinado em estágios iniciais do processo miogênico, (Amthor, Connolly et al. 1996) os autores acreditam que possivelmente a FSTL poderia ser um antagonista dos fatores regulatórios da diferenciação muscular. Assim, a FSTL limitaria, fatores como MYOG, que determinam o processo de diferenciação na musculatura esquelética (Jan Novák 2014). Consequentemente, descobriu-se que o miR-206, determina o equilíbrio agonista-antagonista (MYOG/FSTL) no processo miogênico, liberando fatores como: MYF5, β -MHC, e MRF4, que serão capazes de diferenciar mioblastos em miotubulos, levando a regeneração das fibras musculares esqueléticas (Koutsoulidou, Mastroiannopoulos et al. 2011).

A miogênese é um processo complexo em que as células progenitoras do músculo esquelético, após serem liberadas do sômito; migram, proliferam e se diferenciam, dando origem a musculatura esquelética estriada (Bentzinger, Wang et al. 2012). O miR-206, atualmente, é considerado como importante parte do processo de miogênese em seres humanos e em outras espécies, como: ratos, porcos e *zebrafish* (Saito, Ishizuka et al. 2005; Kim, Lee et al. 2006; Shkumatava, Stark et al. 2009; Koutsoulidou, Mastroiannopoulos et al. 2011; Hou, Tang et al. 2012) Durante o desenvolvimento muscular, partes das células satélites, localizadas entre a membrana basal e o sarcolema da musculatura esquelética, entram em quiescência e permanecem em um estado de auto-renovação (Cerletti, Shadrach et al. 2008). Entretanto, mantém sua capacidade de entrar no programa de diferenciação muscular a qualquer momento (Bentzinger, Wang et al. 2012). Neste caso, níveis de expressão do miR-206, estão reprimidos permitindo assim que fatores de transcrição, como PAX-3 e PAX-7 possam aumentar o pool de

células satélites através da proliferação celular (Chen, Tao et al. 2010). Contudo, após o músculo sofrer lesão (choque/exercício), níveis de expressão do miR-206 aumentam, e determinam o processo de diferenciação muscular, transformando miócitos jovens em miotúbulos maduros, para o reparo das fibras musculares. Além disso, o miR-206 reprime a expressão de PAX-3 e PAX-7 nesse processo, diminuindo assim a proliferação celular (McCarthy 2008; Chen, Tao et al. 2010; Dey, Gagan et al. 2011).

Nossos resultados evidenciam aumento na expressão do miR-206 e uma menor expressão proteica de PAX-7. Dessa forma, limitando a capacidade proliferativa das células satélites e liberando a capacidade diferenciadora e regenerativa da musculatura esquelética, após o período de treinamento físico aeróbico. Além disso, é importante destacar que a expressão gênica de PAX-7 está aumentada, mais os efeitos dessa expressão não se traduzem em uma proteína funcionalmente ativa (Dey, Gagan et al. 2011). Dessa forma, nosso trabalho demonstra, pela primeira vez, que o treinamento físico aeróbico, é um importante estimulador de diferenciação no processo de miogênese, regulado pelo miR-206. Não obstante, a literatura evidencia que quando o miR -206 é injetado em um músculo esquelético lesionado, promove sua cicatrização, e consequentemente poderia ser um potencial alvo terapêutico no caso das distrofias, como mostrado em camundongos (Nakasa, Ishikawa et al. 2010; Liu, Williams et al. 2012). Kim e colaboradores, em estudo recente, ratificou a importância do miR-206 na miogênese, mostrando que em condições estáveis, a adição de um miR-206-mimic induz a diferenciação, entretanto, se o miR-206 é bloqueado não ocorre essa diferenciação celular (Kim, Lee et al. 2006).

A atrofia muscular ocorre quando a taxa de degradação proteica excede a taxa de síntese proteica. Esta mudança no equilíbrio entre a síntese e degradação pode ocorrer quando há um aumento na velocidade de degradação de proteínas e / ou uma diminuição na taxa de síntese proteica (Drummond, McCarthy et al. 2008; Drummond 2010). Por conseguinte, sistemas proteolíticos envolvidos na atrofia muscular são responsivos a um grande número de estímulos, tais como: desuso, fatores repressores do crescimento (folistatina), hormônios (glicocorticoides) e a disponibilidade de nutrientes (aminoácidos e glicose) (McCarthy and Esser 2010). Pesquisas realizadas ao longo dos últimos anos tem aprofundado nossa compreensão sobre essas vias anabólicas e catabólicas, identificando novos alvos como os *myomiRs* (McCarthy, Esser et al. 2009).

O treinamento físico aeróbio é uma intervenção chave usada para manter a saúde do músculo esquelético e prevenir doenças crônicas (Russell 2010; Russell, Lamon et al. 2013). Dessa forma, os miRs modificam seus níveis de expressão por serem sensíveis a contração do músculo esquelético estimulado pelo treinamento físico aeróbio (Drummond 2010). No entanto, os exatos sinais de estresse que iniciam estas alterações na expressão dos miRs não são completamente compreendidos (Davidsen 2010). Além disso, estudos na literatura tem divergido sobre os vários tipos de treinamento e duração, e as exatas expressões desses miRs (McCarthy and Esser 2007; Safdar, Abadi et al. 2009; Nielsen, Scheele et al. 2010). Alguns estudos mostraram que o miR-206 é altamente expresso no período pós-treinamento físico (Safdar, Abadi et al. 2009). Entretanto, outros trabalhos demonstram uma diminuição na sua expressão (Keller, Vollaard et al. 1985; Nielsen, Scheele et al. 2010). Isso poderia ser reflexo de mudanças temporais nas adaptações musculares que ocorrem ao longo do treinamento físico. Portanto,

essas discrepâncias na literatura poderiam ser questionadas em razão do tipo de treinamento a que os indivíduos são submetidos (Davidsen 2010). Recente estudo demonstrou que homens saudáveis submetidos ao treinamento físico aeróbio, diminuíam a expressão do miR-206 na musculatura esquelética, no período pós-treinamento físico (Nielsen, Scheele et al. 2010). Assim, esse achado da literatura diverge ao encontrado no nosso trabalho. Entretanto, poderíamos questionar algumas variáveis que Nielsen e colaboradores empregaram em seu estudo, tais como: 1º- os indivíduos foram submetidos ao treinamento físico em cicloergômetro, enquanto nos submetemos nossos indivíduos a um treinamento físico aeróbico, de corrida, ao ar livre, 2º- a duração do nosso treinamento foi de 16 semanas, enquanto a duração do treinamento de Nielsen, foi de 12 semanas, e 3º- as intensidades do treinamento físico foram divergentes entre os estudos. Enquanto nosso trabalho obedecia a um critério rígido, na duração e intensidade do treino, seguindo padrões determinados por um teste de ergoexpirometria, o trabalho de Nielsen e colaboradores não mantinham uma linearidade na duração e intensidade do treinamento. Portanto, o treinamento físico empregado, a duração e as intensidades propostas nos dois estudos, poderiam determinar essas diferenças encontradas no perfil de expressão do miR-206. Ademais, nosso trabalho também se preocupou em evidenciar as alterações, provocadas pelo treinamento físico aeróbio, nas vias de sinalização que são singulares na miogênese. Dessa forma, poderíamos mostrar o papel crucial do miR-206 no treinamento físico aeróbio.

Nos últimos anos, nossos estudos têm se preocupado não só em caracterizar padrões de expressão dos miRs, mas também em demonstrar toda via de sinalização ligada a esses potentes reguladores pós-transcricionais. Além disso, muito dos trabalhos na literatura, do nosso escopo, foram os primeiros a

demonstrar tal alterações acarretadas pelo treinamento físico aeróbio (Soci, Fernandes et al. 2011; D. A. Silva ND, Fernandes et al. 2012; Fernandes, Magalhaes et al. 2012)

Portanto, os nossos resultados demonstram pela primeira vez que os *myomiRs*, e em especial o miR-206, em resposta ao treinamento físico aeróbico, de corrida, ao ar livre , tem os padrões de expressão alterados, e além disso, afeta diferentemente os padrões de expressão gênica e proteica de fatores de transcrição ligadas à miogênese em seres humanos. Deste modo, ressaltamos a importância do miR-206 para uma renovação perfeita e manutenção da massa muscular em indivíduos saudáveis, submetidos ao treinamento físico aeróbio.

8. CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados do presente estudo ampliam a nossa compreensão sobre a regulação da expressão dos microRNAs na musculatura esquelética humana em resposta ao treinamento físico aeróbico.

9. LIMITAÇÕES

Deve-se reconhecer uma série de limitações nesse estudo. A principal seria a relação estabelecida entre a expressão dos *myomiRs*, em especial do miR-206 e as expressões gênicas e proteicas encontradas. O estudo careceu de experimentos que traçassem uma correlação direta entre aumentos ou diminuição na expressão dos miRs e sua ação efetiva na musculatura esquelética (ensaio com luciferase). Assim, trabalhos da literatura já confirmaram em estudos *in vitro* e *in vivo*, essas alterações (McCarthy 2008). Entretanto, ações mecanicista em seres humanos carecem de mais estudos na literatura. Dessa forma, nosso trabalho tenta fazer uma contribuição nesse caminho. Outro ponto importante, foi que foram estudados indivíduos jovens e saudáveis, o que limita a extrapolação dos nossos resultados para outras faixas etárias e possíveis doenças, como distrofias. O mesmo argumento pode ser utilizado para a variável sexo. A amostra era constituída de apenas homens. Portanto, não se conhece os efeitos do treinamento físico aeróbio nos padrões de expressão dos *myomiRs* e da miogênese, em mulheres. Esses padrões de expressão poderiam ser alterados pelo ciclo hormonal que as mulheres são submetidas todos os meses.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Adams, G. R. (1998). "Role of insulin-like growth factor-I in the regulation of skeletal muscle adaptation to increased loading." Exerc Sport Sci Rev **26**: 31-60.
2. Adams, G. R., F. Haddad, et al. (1999). "Time course of changes in markers of myogenesis in overloaded rat skeletal muscles." J Appl Physiol **87**(5): 1705-12.
3. Aitken, J. C., W. M. Bennet, et al. (1989). "The effects of high intensity training upon respiratory gas exchanges during fixed term maximal incremental exercise in man." Eur J Appl Physiol Occup Physiol **58**(7): 717-21.
4. Alderton, J. M. and R. A. Steinhardt (2000). "How calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes." Trends Cardiovasc Med **10**(6): 268-72.
5. Allen, D. L., R. R. Roy, et al. (1999). "Myonuclear domains in muscle adaptation and disease." Muscle Nerve **22**(10): 1350-60.

6. Amthor, H., D. Connolly, et al. (1996). "The expression and regulation of follistatin and a follistatin-like gene during avian somite compartmentalization and myogenesis." Dev Biol **178**(2): 343-62.
7. Amthor, H., R. Huang, et al. (2002). "The regulation and action of myostatin as a negative regulator of muscle development during avian embryogenesis." Dev Biol **251**(2): 241-57.
8. Anderson, C., H. Catoe, et al. (2006). "MIR-206 regulates connexin43 expression during skeletal muscle development." Nucleic Acids Res **34**(20): 5863-71.
9. Armstrong, R. B. (1988). Muscle fiber recruitment patterns and their metabolic correlates. In Exercise, Nutrition, and Energy Metabolism.
10. Armstrong, R. B. (1990). "Initial events in exercise-induced muscular injury." Med Sci Sports Exerc **22**(4): 429-35.
11. Baldwin, K. M., V. Valdez, et al. (1982). "Biochemical properties of overloaded fast-twitch skeletal muscle." J Appl Physiol **52**(2): 467-72.
12. Baskerville, S. and D. P. Bartel (2005). "Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes." RNA **11**(3): 241-7.
13. Bassel-Duby, R. and E. N. Olson (2006). "Signaling pathways in skeletal muscle remodeling." Annu Rev Biochem **75**: 19-37.
14. Baylies, M. K., M. Bate, et al. (1998). "Myogenesis: a view from Drosophila." Cell **93**(6): 921-7.
15. Bentzinger, C. F., Y. X. Wang, et al. (2012). "Building muscle: molecular regulation of myogenesis." Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(2).

16. Biressi, S., M. Molinaro, et al. (2007). "Cellular heterogeneity during vertebrate skeletal muscle development." Dev Biol **308**(2): 281-93.
17. Bober, E., T. Franz, et al. (1994). "Pax-3 is required for the development of limb muscles: a possible role for the migration of dermomyotomal muscle progenitor cells." Development **120**(3): 603-12.
18. Bohnsack, M. T., K. Czaplinski, et al. (2004). "Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs." RNA **10**(2): 185-91.
19. Booth, F. W. a. B., K.M (2011). Handbook of Physiology, Exercise: Regulation and Integration of Multiple Systems Supplement 29: 1074-1123.
20. Bottinelli, R. and C. Reggiani (2000). "Human skeletal muscle fibres: molecular and functional diversity." Prog Biophys Mol Biol **73**(2-4): 195-262.
21. Brennan, T. J., D. G. Edmondson, et al. (1991). "Transforming growth factor beta represses the actions of myogenin through a mechanism independent of DNA binding." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(9): 3822-6.
22. Callis, T. E., J. F. Chen, et al. (2007). "MicroRNAs in skeletal and cardiac muscle development." DNA Cell Biol **26**(4): 219-25.
23. Callis, T. E., Z. Deng, et al. (2008). "Muscling through the microRNA world." Exp Biol Med (Maywood) **233**(2): 131-8.
24. Campion, D. R. (1984). "The muscle satellite cell: a review." Int Rev Cytol **87**: 225-51.

25. Carson, J. A., R. J. Schwartz, et al. (1996). "SRF and TEF-1 control of chicken skeletal alpha-actin gene during slow-muscle hypertrophy." Am J Physiol **270**(6 Pt 1): C1624-33.
26. Cerletti, M., J. L. Shadrach, et al. (2008). "Regulation and function of skeletal muscle stem cells." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **73**: 317-22.
27. Chen, J. F., E. M. Mandel, et al. (2006). "The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation." Nat Genet **38**(2): 228-33.
28. Chen, J. F., Y. Tao, et al. (2010). "microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7." J Cell Biol **190**(5): 867-79.
29. Clop, A., F. Marcq, et al. (2006). "A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep." Nat Genet **38**(7): 813-8.
30. Coulton, G. R., J. E. Morgan, et al. (1988). "The mdx mouse skeletal muscle myopathy: I. A histological, morphometric and biochemical investigation." Neuropathol Appl Neurobiol **14**(1): 53-70.
31. Czech, B. and G. J. Hannon (2011). "Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes." Nat Rev Genet **12**(1): 19-31.
32. D'Antona, G., F. Lanfranconi, et al. (2006). "Skeletal muscle hypertrophy and structure and function of skeletal muscle fibres in male body builders." J Physiol **570**(Pt 3): 611-27.

33. D. A. Silva ND, J., T. Fernandes, et al. (2012). "Swimming training in rats increases cardiac MicroRNA-126 expression and angiogenesis." Med Sci Sports Exerc **44**(8): 1453-62.
34. Davidsen, P. K., I. J. Gallagher, et al. (2010). ""High responders to resistance exercise training demonstrate differential regulation of skeletal muscle microRNA expression." (1985) " J Appl Physiol (1985) **110**((2)): 309-17.
35. Dey, B. K., J. Gagan, et al. (2011). "miR-206 and -486 induce myoblast differentiation by downregulating Pax7." Mol Cell Biol **31**(1): 203-14.
36. Dietrich, S., F. Abou-Rebyeh, et al. (1999). "The role of SF/HGF and c-Met in the development of skeletal muscle." Development **126**(8): 1621-9.
37. Doench, J. G. and P. A. Sharp (2004). "Specificity of microRNA target selection in translational repression." Genes Dev **18**(5): 504-11.
38. Drummond, M. J. (2010). "MicroRNAs and exercise-induced skeletal muscle adaptations." J Physiol **588**: 3849-50.
39. Drummond, M. J., J. J. McCarthy, et al. (2008). "Aging differentially affects human skeletal muscle microRNA expression at rest and after an anabolic stimulus of resistance exercise and essential amino acids." Am J Physiol Endocrinol Metab **295**(6): E1333-40.
40. Eisenberg, I., M. S. Alexander, et al. (2009). "miRNAs in normal and diseased skeletal muscle." J Cell Mol Med **13**(1): 2-11.
41. Fernandes, T., F. C. Magalhaes, et al. (2012). "Exercise training prevents the microvascular rarefaction in hypertension balancing angiogenic and apoptotic factors: role of microRNAs-16, -21, and -126." Hypertension **59**(2): 513-20.

42. Fernandes, T., Úrsula P.R. Soci, Stéphan F.S. Melo, Cléber R. Alves and Edilamar M. Oliveira (2012). "Signaling Pathways that Mediate Skeletal Muscle Hypertrophy: Effects of Exercise Training." Intech - open science/open minds: 189-218.
43. Fluck, M. (2006). "Functional, structural and molecular plasticity of mammalian skeletal muscle in response to exercise stimuli." J Exp Biol **209**(Pt 12): 2239-48.
44. Fluck, M. and H. Hoppeler (2003). "Molecular basis of skeletal muscle plasticity--from gene to form and function." Rev Physiol Biochem Pharmacol **146**: 159-216.
45. Gollnick, P. D., D. Parsons, et al. (1983). "Fiber number and size in overloaded chicken anterior latissimus dorsi muscle." J Appl Physiol **54**(5): 1292-7.
46. Grifone, R., J. Demignon, et al. (2005). "Six1 and Six4 homeoproteins are required for Pax3 and Mrf expression during myogenesis in the mouse embryo." Development **132**(9): 2235-49.
47. Grounds, M. D. (1998). "Age-associated changes in the response of skeletal muscle cells to exercise and regeneration." Ann N Y Acad Sci **854**: 78-91.
48. Hagiwara, N., M. Yeh, et al. (2007). "Sox6 is required for normal fiber type differentiation of fetal skeletal muscle in mice." Dev Dyn **236**(8): 2062-76.
49. Hawke, T. J. and D. J. Garry (2001). "Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology." J Appl Physiol **91**(2): 534-51.

50. He, L. and G. J. Hannon (2004). "MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation." Nat Rev Genet **5**(7): 522-31.
51. Heanue, T. A., R. Reshef, et al. (1999). "Synergistic regulation of vertebrate muscle development by Dach2, Eya2, and Six1, homologs of genes required for Drosophila eye formation." Genes Dev **13**(24): 3231-43.
52. Hou, X., Z. Tang, et al. (2012). "Discovery of MicroRNAs associated with myogenesis by deep sequencing of serial developmental skeletal muscles in pigs." PLoS One **7**(12): e52123.
53. Jacobs, I., M. Esbjornsson, et al. (1987). "Sprint training effects on muscle myoglobin, enzymes, fiber types, and blood lactate." Med Sci Sports Exerc **19**(4): 368-74.
54. Jan Novák, P. K. e. a. (2014). "MicroRNA-206: a Promising Theranostic Marker." Theranostics **4**(2): 119-133.
55. Jansson, E., B. Sjodin, et al. (1978). "Changes in muscle fibre type distribution in man after physical training. A sign of fibre type transformation?" Acta Physiol Scand **104**(2): 235-7.
56. Ji, J., G. L. Tsika, et al. (2007). "Puralpha and Purbeta collaborate with Sp3 to negatively regulate beta-myosin heavy chain gene expression during skeletal muscle inactivity." Mol Cell Biol **27**(4): 1531-43.
57. Keller, P., N. B. Volvaard, et al. (1985). "A transcriptional map of the impact of endurance exercise training on skeletal muscle phenotype." J Appl Physiol (1985) **110**(1): 46-59.
58. Khvorova, A., A. Reynolds, et al. (2003). "Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias." Cell **115**(2): 209-16.

59. Kim, H. K., Y. S. Lee, et al. (2006). "Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation." J Cell Biol **174**(5): 677-87.
60. Kollias, H. D., R. L. Perry, et al. (2006). "Smad7 promotes and enhances skeletal muscle differentiation." Mol Cell Biol **26**(16): 6248-60.
61. Koutsoulidou, A., N. P. Mastroiannopoulos, et al. (2011). "Expression of miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-206 increases during development of human skeletal muscle." BMC Dev Biol **11**: 34.
62. Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
63. Lau, N. C., L. P. Lim, et al. (2001). "An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*." Science **294**(5543): 858-62.
64. Lecroisey, C., L. Segalat, et al. (2007). "The *C. elegans* dense body: anchoring and signaling structure of the muscle." J Muscle Res Cell Motil **28**(1): 79-87.
65. Lee, R. C., R. L. Feinbaum, et al. (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." Cell **75**(5): 843-54.
66. Lewis, B. P., C. B. Burge, et al. (2005). "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets." Cell **120**(1): 15-20.
67. Liang, Y., D. Ridzon, et al. (2007). "Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues." BMC Genomics **8**: 166.

68. Liu, D., B. L. Black, et al. (2001). "TGF-beta inhibits muscle differentiation through functional repression of myogenic transcription factors by Smad3." Genes Dev **15**(22): 2950-66.
69. Liu, D., J. S. Kang, et al. (2004). "TGF-beta-activated Smad3 represses MEF2-dependent transcription in myogenic differentiation." EMBO J **23**(7): 1557-66.
70. Liu, N., A. H. Williams, et al. (2007). "An intragenic MEF2-dependent enhancer directs muscle-specific expression of microRNAs 1 and 133." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(52): 20844-9.
71. Liu, N., A. H. Williams, et al. (2012). "microRNA-206 promotes skeletal muscle regeneration and delays progression of Duchenne muscular dystrophy in mice." J Clin Invest **122**(6): 2054-65.
72. Macquarrie, K. L., Z. Yao, et al. "miR-206 integrates multiple components of differentiation pathways to control the transition from growth to differentiation in rhabdomyosarcoma cells." Skelet Muscle **2**(1): 7.
73. Mauro, A. (1961). "Satellite cell of skeletal muscle fibers." J Biophys Biochem Cytol **9**: 493-5.
74. Mcardle, W. D., Katch, F.I., Katch, V.L. (2009). " In: Exercise Physiology: Energy, Nutrition, and Human Performance. Functional capacity of the cardiovascular." Handbook **4^{ed}**(cap 17): 297-314.
75. McCarthy, J. J. (2008). "MicroRNA-206: the skeletal muscle-specific myomiR." Biochim Biophys Acta **1779**(11): 682-91.
76. McCarthy, J. J. and K. A. Esser (2007). "MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy." J Appl Physiol **102**(1): 306-13.

77. McCarthy, J. J. and K. A. Esser (2010). "Anabolic and catabolic pathways regulating skeletal muscle mass." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **13**(3): 230-5.
78. McCarthy, J. J., K. A. Esser, et al. (2009). "Evidence of MyomiR network regulation of beta-myosin heavy chain gene expression during skeletal muscle atrophy." Physiol Genomics **39**(3): 219-26.
79. McCormick, K. M. and D. P. Thomas (1992). "Exercise-induced satellite cell activation in senescent soleus muscle." J Appl Physiol **72**(3): 888-93.
80. McPherron, A. C., A. M. Lawler, et al. (1997). "Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member." Nature **387**(6628): 83-90.
81. Midgley, A. W., L. R. McNaughton, et al. (2007). "Physiological determinants of time to exhaustion during intermittent treadmill running at $vV_{O(2max)}$." Int J Sports Med **28**(4): 273-80.
82. Miura, P. and B. J. Jasmin (2006). "Utrophin upregulation for treating Duchenne or Becker muscular dystrophy: how close are we?" Trends Mol Med **12**(3): 122-9.
83. Montgomery, R. L., T. G. Hullinger, et al. (2011). "Therapeutic inhibition of miR-208a improves cardiac function and survival during heart failure." Circulation **124**(14): 1537-47.
84. Montgomery, R. L. and E. Van Rooij (2010). "MicroRNA regulation as a therapeutic strategy for cardiovascular disease." Curr Drug Targets **11**(8): 936-42.
85. Mukherji, S., M. S. Ebert, et al. (2011). "MicroRNAs can generate thresholds in target gene expression." Nat Genet **43**(9): 854-9.

86. Naguibneva, I., M. Ameyar-Zazoua, et al. (2006). "The microRNA miR-181 targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation." Nat Cell Biol **8**(3): 278-84.
87. Nakasa, T., M. Ishikawa, et al. (2010). "Acceleration of muscle regeneration by local injection of muscle-specific microRNAs in rat skeletal muscle injury model." J Cell Mol Med **14**(10): 2495-505.
88. Negrão, C., Forjaz, C.L.M., Rondon, M.U.P.B., Brum, P.C. (1996). "Adaptação cardiovascular ao treinamento físico dinâmico. ." Socesp Cardiol. **Vol.2**: 532-540.
89. Nielsen, S., C. Scheele, et al. (2010). "Muscle specific microRNAs are regulated by endurance exercise in human skeletal muscle." J Physiol **588**(Pt 20): 4029-37.
90. O'Rourke, J. R., S. A. Georges, et al. (2007). "Essential role for Dicer during skeletal muscle development." Dev Biol **311**(2): 359-68.
91. Olena, A. F. and J. G. Patton (2009). "Genomic organization of microRNAs." J Cell Physiol **222**(3): 540-5.
92. Olson, E. N., E. Sternberg, et al. (1986). "Regulation of myogenic differentiation by type beta transforming growth factor." J Cell Biol **103**(5): 1799-805.
93. Pette, D. and R. S. Staron (1990). "Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers." Rev Physiol Biochem Pharmacol **116**: 1-76.
94. Pette, D. and G. Vrbova (1985). "Neural control of phenotypic expression in mammalian muscle fibers." Muscle Nerve **8**(8): 676-89.

95. Pollock, M. L., J. Dimmick, et al. (1975). "Effects of mode of training on cardiovascular function and body composition of adult men." Med Sci Sports **7**(2): 139-45.
96. Potthoff, M. J. and E. N. Olson (2007). "MEF2: a central regulator of diverse developmental programs." Development **134**(23): 4131-40.
97. Prochnik, S. E., D. S. Rokhsar, et al. (2007). "Evidence for a microRNA expansion in the bilaterian ancestor." Dev Genes Evol **217**(1): 73-7.
98. Relaix, F., D. Rocancourt, et al. (2005). "A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells." Nature **435**(7044): 948-53.
99. Rhoades, M. W., B. J. Reinhart, et al. (2002). "Prediction of plant microRNA targets." Cell **110**(4): 513-20.
100. Rosenberg, M. I., S. A. Georges, et al. (2006). "MyoD inhibits Fstl1 and Utrn expression by inducing transcription of miR-206." J Cell Biol **175**(1): 77-85.
101. Russell, A. P. (2010). "Molecular regulation of skeletal muscle mass." Clin Exp Pharmacol Physiol **37**(3): 378-84.
102. Russell, A. P., S. Lamon, et al. (2013). "Regulation of miRNAs in human skeletal muscle following acute endurance exercise and short-term endurance training." J Physiol **591**(Pt 18): 4637-53.
103. Safdar, A., A. Abadi, et al. (2009). "miRNA in the regulation of skeletal muscle adaptation to acute endurance exercise in C57Bl/6J male mice." PLoS One **4**(5): e5610.
104. Saito, K., A. Ishizuka, et al. (2005). "Processing of pre-microRNAs by the Dicer-1-Loquacious complex in Drosophila cells." PLoS Biol **3**(7): e235.

105. Saltin, B., J. Henriksson, et al. (1977). "Fiber types and metabolic potentials of skeletal muscles in sedentary man and endurance runners." Ann N Y Acad Sci **301**: 3-29.
106. Saltin, B. a. G., P.D. (1983). Skeletal muscle adaptability: significance for metabolism. In: Handbook of Physiology Skeletal Muscle. American Physiological Society.
107. Schiaffino, S., M. Sandri, et al. (2007). "Activity-dependent signaling pathways controlling muscle diversity and plasticity." Physiology (Bethesda) **22**: 269-78.
108. Schmalbruch, H. and D. M. Lewis (2000). "Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles." Muscle Nerve **23**(4): 617-26.
109. Schwarz, D. S., G. Hutvagner, et al. (2003). "Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex." Cell **115**(2): 199-208.
110. Schwarz, S., A. V. Grande, et al. (2008). "The microRNA regulated SBP-box genes SPL9 and SPL15 control shoot maturation in Arabidopsis." Plant Mol Biol **67**(1-2): 183-95.
111. Scott, W., J. Stevens, et al. (2001). "Human skeletal muscle fiber type classifications." Phys Ther **81**(11): 1810-6.
112. Seale, P. and M. A. Rudnicki (2000). "A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells." Dev Biol **218**(2): 115-24.
113. Sempere, L. F., S. Freemantle, et al. (2004). "Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation." Genome Biol **5**(3): R13.

114. Shkumatava, A., A. Stark, et al. (2009). "Coherent but overlapping expression of microRNAs and their targets during vertebrate development." Genes Dev **23**(4): 466-81.
115. Simoneau, J. A., G. Lortie, et al. (1985). "Human skeletal muscle fiber type alteration with high-intensity intermittent training." Eur J Appl Physiol Occup Physiol **54**(3): 250-3.
116. Soci, U. P., T. Fernandes, et al. (2011). "MicroRNAs 29 are involved in the improvement of ventricular compliance promoted by aerobic exercise training in rats." Physiol Genomics **43**(11): 665-73.
117. Sokol, N. S. and V. Ambros (2005). "Mesodermally expressed Drosophila microRNA-1 is regulated by Twist and is required in muscles during larval growth." Genes Dev **19**(19): 2343-54.
118. Sun, Q., Y. Zhang, et al. (2008). "Transforming growth factor-beta-regulated miR-24 promotes skeletal muscle differentiation." Nucleic Acids Res **36**(8): 2690-9.
119. Tarnopolsky, M. A., E. Pearce, et al. "Suction-modified Bergstrom muscle biopsy technique: experience with 13,500 procedures." Muscle Nerve **43**(5): 717-25.
120. Tesch, P. A. and J. Karlsson (1985). "Muscle fiber types and size in trained and untrained muscles of elite athletes." J Appl Physiol **59**(6): 1716-20.
121. Thum, T. and E. Van Rooij (2010). "MicroRNA therapeutics in cardiovascular medicine." EMBO Mol Med **4**(1): 3-14.
122. Van Rooij, E., N. Liu, et al. (2008). "MicroRNAs flex their muscles." Trends Genet **24**(4): 159-66.

123. van Rooij, E., D. Quiat, et al. (2009). "A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance." Dev Cell **17**(5): 662-73.
124. Van Rooij, E., L. B. Sutherland, et al. (2006). "A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(48): 18255-60.
125. van Rooij, E., L. B. Sutherland, et al. (2007). "Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA." Science **316**(5824): 575-9.
126. Vasques, L. R., Schoof, C.G., Botelho, E.L.S. (2012). MicroRNAs: A New Paradigm for Gene Regulation. S. P. In: Gupta VK, Gaur RK, Gafni Y.
127. Vasudevan, S., Y. Tong, et al. (2007). "Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation." Science **318**(5858): 1931-4.
128. Williams, A. H., N. Liu, et al. (2009). "MicroRNA control of muscle development and disease." Curr Opin Cell Biol **21**(3): 461-9.
129. Xiao, J., X. Luo, et al. (2007). "MicroRNA miR-133 represses HERG K⁺ channel expression contributing to QT prolongation in diabetic hearts." J Biol Chem **282**(17): 12363-7.
130. Yan, Z., S. Salmons, et al. (1996). "Increased contractile activity decreases RNA-protein interaction in the 3'-UTR of cytochrome c mRNA." Am J Physiol **271**(4 Pt 1): C1157-66.
131. Yi, R., Y. Qin, et al. (2003). "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs." Genes Dev **17**(24): 3011-6.

132. Zammit, P. S., T. A. Partridge, et al. (2006). "The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold." J Histochem Cytochem **54**(11): 1177-91.

11. COMITÉ DE ÉTICA

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **09/05/2012**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **409/11** intitulado: **“EXPRESSÃO E SELEÇÃO DE MICRORNAS NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE HOMENS SAUDÁVEIS SUBMETIDOS AO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO.”** apresentado pelo **PROGRAMA de FISIOPATOLOGIA EXPERIMENTAL**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Edilamar Menezes de Oliveira

Pesquisador (a) Executante: Cléber Rene Alves

CEP-FMUSP, 10 de Maio de 2012.

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina

e-mail: cep.fmusp@hcnet.usp.br

12. ANEXOS

ANEXO I – Idade, altura, peso e índice de massa corpórea no pré e pós-treinamento físico aeróbio.

Pré	Ano atual	Nome	Idade	Altura-cm	Peso	IMC
GM-312	2011	D D C	25	168	75.8	26.8
GM-313	2011	L R M	27	172	76	25.6
GM-307	2011	R A O	26	175	86.7	28.3
GM-311	2011	W A S	29	186	109.7	31.7
GM-306	2011	I A B	29	177	102.7	32.7
GM-310	2011	F Q A	21	171	61.9	21.1
GM-314	2011	L F C	21	175	59.7	19.4
GM-308	2011	R G G	24	195	108.1	28.4
GM-315	2011	R M O	20	181	66.4	20.2
GM-316	2011	T F M G	22	171	74.8	25.5
GM-317	2011	W O S	26	171	69.6	23.8
GM-309	2011	A M S J	28	165	80.4	29.5
Pós	Ano atual	Nome	Idade	Altura-cm	Peso	IMC
GM-312	2012	D D C	25	169	72.4	25.35
GM-313	2012	L R M	28	172	74.2	25.08
GM-307	2012	R A O	26	175	84	27.43
GM-311	2012	W A S	30	186	103.7	29.97
GM-306	2012	I A B	29	176	100.4	32.41
GM-310	2012	F Q A	22	172	62.8	21.23
GM-314	2012	L F C	22	175	61.7	20.15
GM-308	2012	R G G	25	194	101.9	27.08
GM-315	2012	R M O	20	182	66.9	20.20
GM-316	2012	T F M G	23	171	69.6	23.80
GM-317	2012	W O S	26	172	67	22.65
GM-309	2012	A M S J	29	165	76.6	22.66

ANEXO II – Pressão arterial – Sistólica e Diastólica, no pré e pós-treino
físico aeróbio.

PAS repouso em pé	PAD repouso	PAM repouso	PAS Pico	PAD Pico	PAM Pico
125	90	102	200	85	123
125	85	98	190	85	120
115	70	85	175	70	105
130	90	103	200	90	126
135	100	112	190	90	123
115	70	85	185	75	111
120	90	100	170	90	116
150	80	103	210	80	123
100	70	80	190	90	123
140	90	107	185	85	118
120	70	87	180	80	113
110	70	83	180	80	113
PAS repouso em pé	PAD repouso	PAM repouso	PAS Pico	PAD Pico	PAM Pico
130	100	110	215	100	138
130	70	90	170	70	103
120	80	93	195	85	121
130	100	110	240	120	160
135	90	105	210	80	123
120	90	100	200	80	120
110	80	90	180	80	113
120	80	93	190	80	116
130	100	110	180	90	120
120	80	93	185	80	115
130	80	110	195	80	118
120	80	93	185	80	115

ANEXO III – Consumo máximo de oxigênio – protocolo, tempos nos limiares –
pré e pós-treinamento físico aeróbio.

Data do teste- Vmax	No do teste	Protocolo	Tempo LA (seg)	Tempo PCR (seg)	tempo total exerc (seg)
18/08/2011	136Q	Veloc-1	300	480	523
19/08/2011	133Q	Veloc-1	300	498	600
16/09/2011	251Q	Veloc-1	360	420	610
18/08/2011	134Q	Veloc-1	300	390	605
15/08/2011	112Q	Veloc-1	120	330	603
18/08/2011	135Q	Veloc-1	210	390	566
22/08/2011	152Q	Veloc-1	300	540	608
15/08/2011	113Q	Veloc-1	300	420	480
22/08/2011	151Q	Veloc-1	300	510	587
22/08/2011	149Q	Veloc-1	300	480	601
22/08/2011	150Q	Veloc-1	300	420	558
15/08/2011	114Q	Veloc-1	360	430	485
Data do teste- Vmax	No do teste	Protocolo	Tempo LA (seg)	Tempo PCR (seg)	tempo total exerc (seg)
29/02/2012	900Q	Veloc-1	360	540	564
24/02/2012	874Q	Veloc-1	378	618	543
24/02/2012	878Q	Veloc-1	420	510	654
29/02/2012	896Q	Veloc-1	330	420	600
24/02/2012	876Q	Veloc-1	150	360	600
24/02/2012	875Q	Veloc-1	330	540	632
29/02/2012	901Q	Veloc-1	330	540	639
27/02/2012	886Q	Veloc-1	300	420	500
29/02/2012	897Q	Veloc-1	300	540	636
27/02/2012	885Q	Veloc-1	450	600	660
28/02/2012	888Q	Veloc-1	450	600	680
28/02/2012	889Q	Veloc-2	400	550	670

ANEXO IV – Frequências cardíacas – nos limiares e percentuais, no pré e pós-treino físico aeróbio.

FC repouso- Em pé	FC LA	LA %F _c max	FC PCR	PCR %F _c máx	FC máx
64	152	78	195	100	195
77	151	78	187	97	193
80	159	90	171	90	176
73	148	86	162	94	172
100	135	73	164	89	185
73	120	63	167	88	190
72	157	79	193	97	200
93	151	83	174	96	181
80	125	68	180	99	183
83	157	81	185	95	195
74	160	86	175	93	187
64	165	92	178	98	180
FC repouso- Em pé	FC LA	LA %F _c max	FC PCR	PCR %F _c máx	FC máx
60	168	84	197	99	198
68	152	81	183	98	187
84	148	80	171	91	185
51	127	83	185	97	153
56	142	86	166	92	180
60	139	76	178	97	200
70	166	83	191	95	200
74	138	79	168	96	175
60	135	72	181	97	187
52	152	80	187	98	191
55	160	78	190	97	189
63	159	79	186	98	192

ANEXO V – Frequências cardíacas e consumo máximo de oxigênio (VO₂máx.) -
nos limiares e percentuais, no pré e pós-treinamento físico aeróbio.

FCrec1	Delta MAX-1	% Fcmax pred (220-idade)	% Fcmax pred (208- (0.7*idade)	VO2baseline (ml/kg/min)	VO2 LA (ml/kg/min)
171	24	195	191	3.7	30.1
163	30	193	189	3.5	30.9
153	23	194	190	3.5	35.3
145	27	191	188	3.6	30.9
160	25	191	188	3.5	28.3
159	31	199	193	3.5	22.4
173	27	199	193	3.9	33.2
152	29	196	191	3.2	27.5
156	27	200	194	4.3	30
160	35	198	193	5.7	42.2
153	34	194	190	3.0	32.9
150	30	192	188	4.0	37.8
FCrec1	Delta MAX-1	% Fcmax pred (220-idade)	% Fcmax pred (208- (0.7*idade)	VO2baseline (ml/kg/min)	VO2 LA (ml/kg/min)
162	36	195	263	4.8	41.3
122	65	192	260	3.7	40.2
159	26	194	262	3.2	34.2
110	43	190	259	3.4	28.3
132	48	191	260	3.2	20.7
180	20	198	265	3.5	38.1
168	32	198	265	3.8	41.6
131	44	195	263	3.3	26.4
153	34	200	266	4.6	29.9
147	44	197	264	3.4	31,3
159	30	194	262	3.2	34.2
110	82	191	260	3.4	28.3

ANEXO VI – Consumo máximo de oxigênio (VO₂máx.) - nos limiares e percentuais, no pré e pós-treinamento físico aeróbio.

%VO₂max LA	VO₂ PCR	%VO₂max PCR	VO₂max relativo (ml/kg/min)	%VO₂max ajustado idade pred
65	44.1	96	46	104
65	44.6	93	47.8	111
90	40.2	97	43.6	100
71	42.1	96	43.6	104
70	34.9	86	40.7	97
47	36	76	47.4	102
55	55.6	93	35.7	130
67	37.8	92	41	92
49	56.1	92	49.3	129
59	61.9	87	50	131
69	47.3	99	47.6	109
84	41	99	45.2	102
%VO₂max LA	VO₂ PCR	%VO₂max PCR	VO₂max relativo (ml/kg/min)	%VO₂max ajustado idade pred
73	55.6	98	56.4	128
80	49.6	99	50.2	118
80	43.6	92	48	110
83	45.6	94	49.3	119
59	34.8	100	62.4	122
67	53.9	94	57.1	125
68	55.8	91	61.4	134
67	37.8	79	59.3	140
51	58.7	100	68.5	125
59	47	89	53	117
59	34.8	100	62.4	122
67	53.9	94	57.1	125

ANEXO VII – Consumo máximo de oxigênio (VO₂máx.) - absolutos e RQ, no
pré e pós-treinamento físico aeróbio.

VO ₂ max absoluto (L/min)	VEbaseline (l/min) (BTPS)	VE max (l/min) (BTPS)	RQ rep	RQ max
3.485	8.6	99.1	0.85	1.25
3.635	10.5	117.4	0.87	1.16
3.783	12	105.5	0.82	1.18
4.786	12.9	141.3	0.83	1.07
4.177	12	165.8	0.86	1.20
2.933	7.4	110.5	0.89	1.34
3.588	10.9	120.5	1.01	1.29
4.430	13	163.1	0.64	1.13
4.136	12.7	114.1	1.04	1.11
2.349	13.2	159.3	0.85	1.16
3.312	8.7	113.1	0.98	1.19
3.632	12.1	100.7	0.91	1.09
VO ₂ max absoluto (L/min)	VEbaseline (l/min) (BTPS)	VE max (l/min) (BTPS)	RQ rep	RQ max
4.085	11.7	108.8	0.86	1.04
3.726	12.4	126	0.87	1.20
4.029	8.7	143.9	0.78	1.30
5.108	13.5	128.9	0.89	0.97
5.501	12.3	142	0.94	1.21
3.609	7.9	111.1	0.77	1.17
3.789	8.7	120.9	0.88	1.10
4.011	13.6	146.7	0.74	1.17
3.927	10	114.3	0.67	1.06
4.688	7.0	95.3	0.91	1.25
5.110	10.5	128.9	0.89	0.97
5.501	12.3	142	0.94	1.21

ANEXO VIII – Laudo ECG e velocidades atingidas na esteira – Cargas e percentuais, no pré e pós-treinamento físico aeróbio.

Laudo ECG	Vel. Max atingida (mph)	Incli. Max atingida %	Carga max Velocidade (km/h)	Carga max inclinação (%)
normal	7,8	9	12,5502	9
normal	8,2	11	13,1938	11
normal	7,8	9	12,5502	9
normal	7,8	9	12,5502	9
normal	7,8	9	12,5502	9
normal	8,2	11	13,1938	11
normal	8,5	13	13,6765	13
normal	7,8	9	12,5502	9
normal	8,2	11	13,1938	11
normal	8,5	13	13,6765	13
normal	8,2	11	13,1938	11
normal	7,8	9	12,5502	9
Laudo ECG	Vel. Max atingida	Incli. Max atingida %	Carga max Velocidade (km/h)	Carga max inclinação (%)
normal	8.2	11	13,1938	11
normal	8.6	17	13,8374	17
normal	8.5	13	13,6765	13
normal	7,4	11	11,9066	7
normal	7.4	9	11,9066	7
normal	8.5	13	13,6765	13
normal	8.5	13	13,6765	13
normal	7.8	11	12,5502	9
normal	8,5	13	13,6765	13
normal	8.5	13	13,6765	13
normal	7,1	11	11,4239	7
normal	7.4	11	11,9066	7