



Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

Laura Reck Cechinel

**Efeito do envelhecimento sobre a homeostase redox e perfil de microRNAs em
vesículas extracelulares circulantes: modulação das vias canônicas de
sinalização associadas à idade**

Porto Alegre

2020

Laura Reck Cechinel

Efeito do envelhecimento sobre a homeostase redox e perfil de microRNAs em vesículas extracelulares circulantes: modulação das vias canônicas de sinalização associadas à idade

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial à obtenção do grau de doutora em Fisiologia.
Orientadora: Dra Ionara Rodrigues Siqueira

Porto Alegre

2020

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, aos meus pais e família, pelo apoio incondicional durante todos estes anos, por acreditarem em mim e me encorajarem a nunca desistir. Eu amo muito vocês.

À Deus que permitiu que eu pudesse chegar até aqui através da minha fé me manteve firme sempre que as dificuldades apareciam.

Ao meu amigo, namorado e noivo, Flávio. Não alcançaria meus objetivos se não fosse pelo teu apoio e a tua convicção de que eu seria capaz. Eu sou eternamente grata por ter transformado os meus sonhos em teus também. Muito obrigada por ficar ao meu lado sempre. Te amo

À minha orientadora, mentora e parceira, Ionara, o meu MUITO OBRIGADA. Foram tantos anos em que eu pude aprender contigo e me tornar a profissional que sou hoje. Obrigada pela dedicação e conhecimento que me foi transmitido, pela confiança e por nunca medir esforços para que eu alcançasse voos mais altos.

Ao longo dos 8 anos no grupo de neuropsicofarmacologia eu amadureci muito e encontrei não somente colegas, mas amigos para a vida toda. A estes amigos, os quais não citarei nomes, pois são muitos, muito obrigada pelo auxílio na bancada e mais ainda pela companhia nos momentos difíceis que precisavam de distração.

Ao Dr. Robert Freishtat e todo o laboratório pela oportunidade, por me receberem de braços abertos e proporcionarem com que eu me sentisse em casa, além de não medirem esforços para me ensinar e auxiliar a conclusão dos experimentos. Os meses que passei em Washington foram maravilhosos e eu nunca esquecerei.

Aos Professores Alex Sander Araújo e Adriane Belló-Klein e sua aluna Giana por disponibilizar o seu laboratório para a realização de experimentos, pelos ensinamentos e por toda ajuda que recebi.

Ao Professor da Universidade Federal de Minas Gerais André Massenssini, à Gisele e Virgínia, alunas desta universidade pela parceria e ajuda na caracterização das vesículas.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia agradeço pelas oportunidades; agradeço ao CNPq e a CAPES por terem financiado meu trabalho e meu desejo de ser cientista.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais volta ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

“Conhecer e pensar não é chegar a uma verdade absolutamente certa, mas dialogar com a incerteza.”

Edgar Morin

RESUMO

O envelhecimento é o principal fator de risco para diversas doenças; nesse contexto, o envolvimento de vesículas extracelulares (VEs) no estresse oxidativo relacionado à idade foi proposto. Além disso, os microRNAs (miRNAs) parecem desempenhar um papel fundamental nas doenças associadas à idade, como nas doenças cardiovasculares. As VEs podem proteger os miRNAs de RNAses endógenas e a internalização dessas vesículas nas células está envolvida na comunicação celular. No entanto, a relação entre o conteúdo das VEs (maquinaria pró e antioxidante e os miRNAs) e doenças relacionadas à idade não foi estudada. Nossa hipótese é de que o processo de envelhecimento seja capaz de impactar a homeostase redox e o perfil de miRNA das VEs circulantes totais e que estes miRNAs tenham alvos nas vias canônicas de estresse oxidativo e relacionadas à idade. O objetivo foi investigar o conteúdo de miRNAs e perfil oxidativo das VEs circulantes totais obtidas de animais adultos jovens e envelhecidos. O plasma foi obtido de ratos *Wistar* machos (3 e 21 meses de idade) e as VEs totais foram isoladas. Foram avaliados o perfil dos miRNA das VEs circulantes totais para determinar os alvos específicos e também o perfil oxidativo das VEs, através da quantificação das enzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase 2, mieloperoxidase (MPO), catalase (CAT) e xantina oxidase (XO). (...) Nossos resultados indicam que o perfil do miRNA pode ter um papel relevante no envelhecimento cardiovascular e consequentemente nas doenças cardíacas devido ao envolvimento destes com o desequilíbrio redox no processo de envelhecimento.

Palavras chave: Envelhecimento, miRNA, estresse oxidativo, hipertrofia cardíaca, NADPH oxidase, mieloperoxidase

ABSTRACT

Aging represents a central risk factor for many non-communicable diseases, in this context, the involvement of extracellular vesicles (EVs) on age-related oxidative stress has been raised. microRNAs (miRNA) have been attracting a lot of attention, since they might have a key role in age-induced pathology, such as in cardiovascular diseases. EVs can protect miRNAs from endogenous RNases and internalization of these vesicles into cells is involved with cell communication. However, the relationship between EVs content, namely pro- and antioxidant machineries as well as miRNAs, and chronic age-related diseases were not evaluated. We hypothesized that aging process is able to impact the redox homeostasis and miRNA profile from circulating total EVs have predicted targets on oxidative stress and age-related canonical pathways. Our aim was to investigate EVs microRNA profiles and predict their downstream signaling effects as well as evaluate pro- and antioxidant machineries (NADPH oxidase 2, myeloperoxidase, xanthine oxidase and catalase) of circulating total EVs from aged and young-adult animals. Plasma was obtained from male *Wistar* rats (3 and 21 months-old) and total EVs were isolated. EV miRNA expression was performed to determine the predicted regulation of targeted mRNAs. (...) Our results indicate that the miRNA profile may have a potential role to drive cardiovascular aging and consequent cardiac diseases due to involvement with redox imbalance in aging process.

Keywords: Aging, miRNA, oxidative stress, cardiac hypertrophy, NADPH oxidase, myeloperoxidase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Pirâmide etária do Brasil e Rio Grande do Sul no ano de 2050.....	15
Figura 2: Principais causas de mortalidade no Brasil.....	16
Figura 3: Biogênese das vesículas extracelulares.....	18
Figura 4: Biogênese dos miRNAs.....	21
Figura 5. Geração e eliminação de espécies reativas, pelos sistemas pró-oxidativos e enzimas antioxidantes, respectivamente.....	25
Figura 6: Formação de espécies reativas pela NADPH oxidase, MPO, em VE.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Projeções populacionais para ano de 2060.....	15
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE: Acetilcolinesterase
AGO-2: Proteína argonauta 2
ANG II: Angiotensina 2
ARG2: Arginase 2
CAT: Catalase
CDC14B: Homólogo B do ciclo 14 da divisão celular
CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório
CICN5: Canal 5 de cloreto
CREAL: Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório
DNA: Ácido desoxirribonucléico
ET-1: Endotelina 1
FASLG: Ligante FAS
FLOT1: Flotilina 1
GPx: Glutaciona peroxidase
GSH: Glutaciona reduzida
H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
HDL: *High density lipoprotein* (Lipoproteína de alta densidade)
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL: Interleucina
IPA: *Ingenuity Pathway Analysis*
LDL: *Low density lipoprotein* (Lipoproteína de baixa densidade)
MAPK: *Mitogen activated protein kinases*
miRNA: microRNA
MPO: Mieloperoxidase
mRNA: RNA mensageiro
MVBs: *Multivesicular Bodies* (Corpos multivesiculares)
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NFAT: *Nuclear factor of activated T cells* (Fator nuclear de células T ativadas)
NF-κβ: *nuclear factor kappa-beta* (Fator nuclear kappa-beta)
NO: Óxido nítrico
NOX: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NTA: *Nanotracking Analysis* (Análise de rastreamento de nanopartículas)
O₂⁻: Ânion superóxido
OH[·]: Radical hidroxil
PKA: Proteína quinase A
PLA: Fosfolipase A
RISC: Complexo de silenciamento induzido por RNA
RNA: Ácido ribonucleico
RO[·]: Radicais alcoxil
ROO[·]: Peroxil
SH3PXD2A: Domínios SH3 e PX da proteína tirosina fosfatase 2A
SNC: Sistema nervoso central
SOD: Superóxido dismutase
VEs: Vesículas Extracelulares
XO: Xantina oxidase

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Envelhecimento.....	14
1.2. Vesículas Extracelulares.....	17
1.3. microRNAs.....	19
1.4. Estresse Oxidativo e Envelhecimento: Papel das vesículas extracelulares e microRNAs.....	22
2. HIPÓTESE.....	29
3. OBJETIVOS.....	30
3.1. Objetivo Geral.....	30
3.2. Objetivos Específicos.....	30
4. MÉTODOS.....	31
4.1. Animais.....	31
4.2. Isolamento de vesículas extracelulares circulantes.....	31
4.3. Caracterização das vesículas extracelulares.....	31
4.3.1. Análise de rastreamento de partículas (NTA).....	32
4.4. Análise de microRNAs.....	32
4.4.1 Extração de microRNA.....	32
4.4.2. Análise de microarray.....	33
4.5. Western blot.....	33
4.6. Atividade da enzima Mieloperoxidase.....	34
4.7. Atividade da enzima Xantina Oxidase.....	34
4.8. Atividade da enzima Catalase.....	34
4.9. Análise Estatística.....	35
5. RESULTADOS.....	36
5.1. Artigo I.....	37
5.2. Artigo II.....	73
6. DISCUSSÃO.....	119
7. CONCLUSÕES.....	130
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131

1. INTRODUÇÃO

1.1. Envelhecimento

A revolução socioeconômica iniciada no século passado provocou mudanças drásticas na relação entre os seres humanos e o meio ambiente resultando no envelhecimento populacional (Giuliani et al., 2018). O aumento da expectativa de vida e, conseqüentemente, da incidência de desordens degenerativas relacionadas ao envelhecimento emergem como um dos maiores desafios enfrentados pelos países desenvolvidos e em desenvolvimento (Christensen et al., 2009). Embora a expectativa média de vida tenha aumentado drasticamente nos últimos 100 anos, isso não foi acompanhado por um aumento equivalente na qualidade de vida (Hung et al., 2011).

Dados de uma revisão recente do *World Population Prospects (2017)*, sugerem que em 2050, uma em cada seis pessoas no mundo terá mais de 65 anos (16%); enquanto em 2019 a contagem era de uma em cada onze (9%). Prevê-se ainda que o número de pessoas com 80 anos ou mais seja triplicado, de 143 milhões em 2019 para 429 milhões em 2050 (ONU, 2020). Segundo dados do Ministério da Saúde, o Brasil, em 2016, tinha a quinta maior população idosa do mundo, e as previsões recentes indicam que, em 2030, o número de idosos ultrapassará o total de crianças entre zero e quatorze anos (USP, 2018) (Figura 1). Ainda, dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) indicam que a população com 65 anos pode alcançar aproximadamente 22% em 2050 (IBGE, 2020). É interessante destacar que o estado do Rio Grande do Sul tem 12,7% da população composta por idosos (acima de 65 anos) e poderá aumentar para 29% em 2060 (Tabela 1; Seplag, 2019). Analisando este iminente aumento na população idosa, faz-se necessário estudar o processo biológico de envelhecimento, sendo um gerador de desafios a diversas áreas.

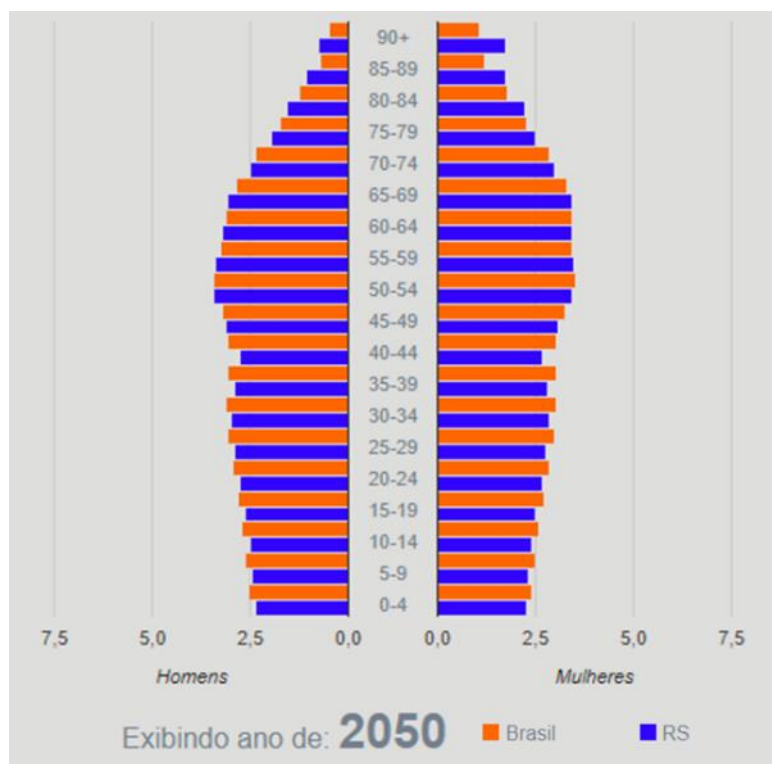


Figura 1: Pirâmide etária do Brasil e Rio Grande do Sul no ano de 2050. Fonte: IBGE, 2020

Idosos (+65)	2019		2060	
	Brasil	RS	Brasil	RS
Total (em milhões)	20,0	1,4	58,2	3,2
Idosos/População	9,5%	12,7%	25,5%	29,0%
1 idoso para cada 'x' pessoas	11	8	4	3

Tabela 1: Projeções populacionais para ano de 2060. Fonte: Seplag, 2019

O envelhecimento é um fenômeno biológico complexo relacionado a uma desregulação progressiva de diversos processos celulares (López-Otín et al., 2013). Este fenômeno biológico é resultado da interação entre fatores ambientais e genéticos, assim, tanto o estilo de vida quanto a carga genética são aspectos determinantes na longevidade de cada indivíduo (Nicita-Mauro et al., 2008). O envelhecimento está relacionado a uma perda da homeostase em diferentes sistemas e órgãos, portanto há um aumento da vulnerabilidade ao desenvolvimento de doenças

associadas, implicando em maior prejuízo para a população idosa, seus prestadores de cuidados e sistemas de saúde (Kovacic et al., 2011).

É importante ressaltar que a idade é o principal fator de risco para o desenvolvimento de diversas doenças crônicas e degenerativas. Estas doenças associadas ao envelhecimento incluem doenças cardiovasculares, doença pulmonar obstrutiva crônica, doença renal crônica, diabetes, osteoartrite, osteoporose, sarcopenia, acidente vascular cerebral, doenças neurodegenerativas (incluindo as doenças de Parkinson e Alzheimer) e muitas formas de câncer (Niccoli and Partridge, 2012; de Cabo et al., 2014).

As doenças cardiovasculares associam-se fortemente à idade, sendo a principal causa de morte na Europa, nos Estados Unidos e Brasil (Kuller et al., 2016; Newman et al., 2008; Camici et al., 2015; GBD, 2018). A prevalência de doenças cardiovasculares aumenta em pessoas com mais de 65 anos, principalmente naquelas com mais de 80 anos, e aumentará em 10% até 2035 (Mozaffarian et al., 2015). Dados indicam que em 2030, mais de 27 milhões de pessoas terão hipertensão, 8 milhões terão doença cardíaca coronária e 3 milhões terão insuficiência cardíaca; grande parte deste aumento está relacionado à população idosa (Figura 2; Mozaffarian et al., 2015). Ainda, as projeções econômicas apontam um aumento na faixa dos 200% nos gastos com doenças cardiovasculares nos próximos anos. Estes dados demonstram a urgência em compreender os mecanismos envolvidos com o envelhecimento e, em especial as doenças cardiovasculares.

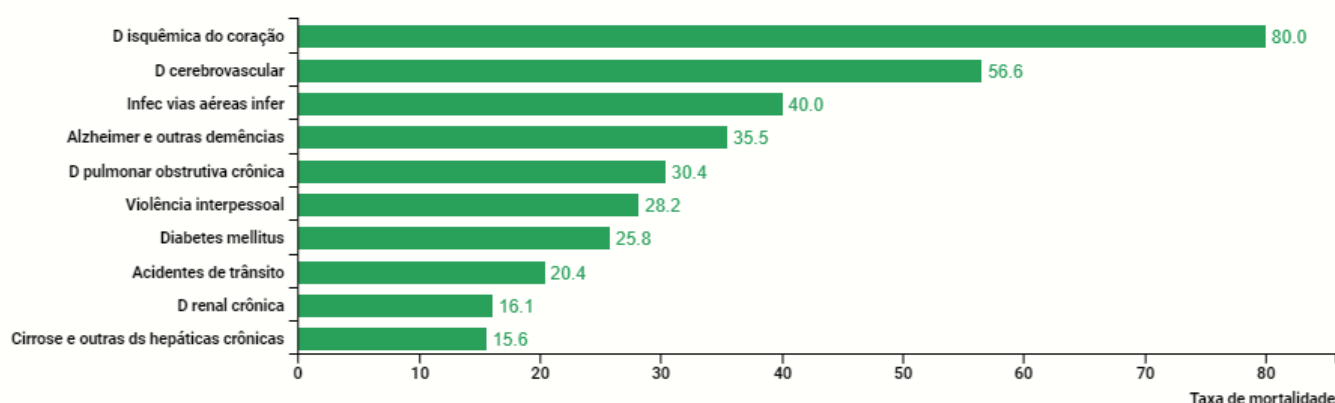


Figura 2: 10 principais causas de mortalidade no Brasil, em 2017. Fonte: GDB, 2018

Há diversas teorias que propõe mecanismos de ação associados aos déficits durante o envelhecimento. Neste contexto, nosso grupo de pesquisa, recentemente descreveu que vesículas extracelulares (VE) desempenham um papel relevante na manutenção do estresse oxidativo observado durante o envelhecimento (Bertoldi et al, 2018). Deste modo a compreensão de mecanismos responsáveis pelos prejuízos observados durante o processo de envelhecimento é fundamental para o desenvolvimento de estratégias que proporcionem uma melhor qualidade de vida à população idosa.

1.2. Vesículas extracelulares

As vesículas extracelulares (VEs) são estruturas heterogêneas e envolvidas em vários processos biológicos. As VEs abrangem uma variedade de vesículas de bicamada lipídicas, entre as mais discutidas na literatura podemos citar: exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos (Figura 3), as quais são classificadas de acordo com seu tamanho, origem, composição e densidade. Além das diferenças morfológicas, os subtipos de VEs desempenham papéis diferentes que parecem estar relacionados ao seu conteúdo (Kanninen et al., 2016). As VEs descritas a seguir podem ser liberadas pela maioria das células, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Howitt e Hill, 2016; Xiao et al., 2017) e são encontradas em vários fluidos corporais, incluindo sangue, saliva e líquido cefalorraquidiano. Devido as suas características já foi proposto que alguns subtipos de VEs, como os exossomos, possam servir como um biomarcador não invasivo para doenças relacionadas à idade, como doença de Alzheimer (Bellingham et al., 2012).

Os exossomos foram descritos pela primeira vez no início dos anos 80; os autores definiram exossomos como pequenas vesículas de aproximadamente 40nm de diâmetro envolvidas com a exocitose de receptores de transferrina (Trams et al., 1981; Pan e Johnstone, 1983). Os exossomos têm 40-150 nm e são gerados através de uma via intracelular específica que envolve a invaginação de endossomos para gerar pequenas vesículas intraluminais durante a maturação. Os endossomos maduros tornam-se corpos multivesiculares (MVBs) (Quek e Hill, 2017), que são processados de duas maneiras: eles podem ser um alvo para a degradação lisossômica ou podem ser fundidos com a membrana plasmática, liberando suas

vesículas no líquido extracelular como exossomos (Howitt e Hill, 2016; Quek e Hill, 2017).

Como a via endossômica está envolvida na formação e liberação dos exossomos, proteínas como tetraspaninas (CD9, CD63, CD81 e CD82), Rab GTPases, flotilina, Alix e TSG101 são usadas como marcadores de exossomos (Stenmark, 2009; Hsu et al., 2010 ; Colombo et al., 2013; Tytell et al., 2016). Além das moléculas constitutivas, os exossomos carregam proteínas específicas de suas células de origem.

As microvesículas variam de 100nm a 1µm e são formadas por brotamento externo direto da membrana plasmática (Bellingham et al., 2012). A geração de microvesículas se inicia com a formação de pequenas vesículas externas que após uma ruptura são liberadas para o espaço extracelular. Semelhante aos exossomos, as microvesículas podem ser liberadas por qualquer tipo de célula; o papel das microvesículas com formas semelhantes pode depender de sua origem celular. Por exemplo, Aleman et al. (2011) demonstraram que microvesículas derivadas de monócitos são mais eficazes na formação de coágulos em comparação com microvesículas derivadas de plaquetas.

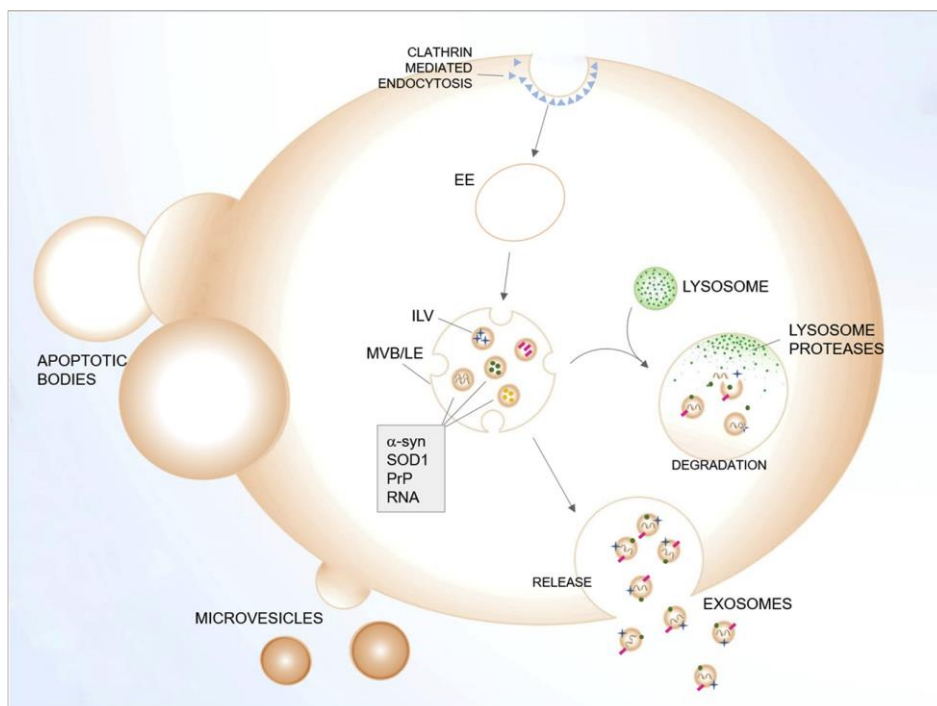


Figura 3. Biogênese das vesículas extracelulares. Fonte: Arbo et al., 2020.

Estudos recentes demonstram que as VEs estão envolvidas em processos de comunicação intercelular de longa distância facilitando a transferência, de proteínas, de enzimas, e também mRNAs e microRNAs (miRNAs) (Brites & Fernandes, 2015; Haney et al., 2013). Além disso, estas estruturas podem ser uma via para descartar componentes indesejáveis e/ou desnecessários (Larson et al., 2014). Trabalhos prévios demonstraram que as VEs estão associadas a diversas doenças de natureza infecciosa e degenerativas (Gupta & Pulliam, 2014; Brites & Fernandes, 2015). No sistema nervoso central (SNC), já foi descrito que a enzima superóxido dismutase (SOD) pode ser liberada por exossomos (Fevrier & Raposo, 2004; Gomes et al., 2007; Rajendran et al., 2006). Além disso, Lehmann e colaboradores (2008) sugeriram que células senescentes podem aumentar a liberação deste tipo de vesícula. O papel das VEs no envelhecimento, foi brevemente discutido pelo nosso grupo de pesquisa; Bertoldi e colegas (2018) descreveram o aumento de espécies reativas em VEs de ratos envelhecidos. Além disso, este trabalho mostrou que a atividade da SOD estava diminuída em VEs de animais envelhecidos. É importante destacar ainda que as VEs derivadas de células senescentes podem secretar diversos fatores, entre eles, miRNAs, os quais podem impactar tanto células adjacentes quando tecidos mais distantes (Takasugi, 2018; Urbanelli et al., 2016).

1.3. microRNAs

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificantes de 19-23 nucleotídeos, que atuam na modulação fina de aproximadamente 30% dos mRNA celulares, fornecendo a regulação pós-transcricional da expressão gênica, além de controlarem muitos processos fisiológicos nas doenças relacionadas à idade (Small et al., 2010). Além disso, os miRNAs são altamente conservados durante a evolução, com um papel bem estabelecido na proliferação, diferenciação, metabolismo, apoptose, desenvolvimento e envelhecimento celular, bem como na fisiopatologia de muitas doenças (Lin et al., 2014).

Os miRNAs são transcritos no núcleo pela RNA polimerase II (ou, em alguns casos, pela RNA polimerase III) como um pré-miRNA. O pré-miRNA apresenta um transcrito longo com uma estrutura em forma de grampo de cabelo (*hairpin*) que exhibe

provisoriamente uma cauda 5'-Cap e uma cauda 3'-poli(A) (Borchert et al., 2006; Fazi & Nervi, 2008; Daugaard & Hansen, 2017). Os pré-miRNAs são então clivados pelo complexo que contém a enzima RNase III, chamada de Drosha e seu cofator DGCR8 (Daugaard & Hansen, 2017; Lee et al., 2003), os pré-miRNAs são subsequentemente exportados para o citoplasma. Após o transporte para o citoplasma, o pré-miRNA é processado, pela Dicer e então uma dupla fita de miRNA é formada; após a dupla fita é desenrolada e o miRNA maduro com 18 a 25 nucleotídeos é liberado. Os miRNAs maduros podem ser carregados pela enzima Dicer no complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), onde a expressão proteica de alvos específicos de mRNA pode ser evitada (Figura 4; Daugaard e Hansen, 2017).

Os miRNAs podem promover a repressão translacional, a desestabilização do mRNA ou uma combinação de ambos, incluindo a inibição do início da tradução e o encurtamento da cauda poli (A) (Djuranovic et al., 2011). Curiosamente alguns autores mostraram que a biogênese de miRNA é independente de Dicer, enquanto outros miRNAs não precisam de Drosha/DGCR8 para sua maturação (Daugaard e Hansen, 2017).

A nomenclatura do miRNAs pode ser, eventualmente, confusa. Neste sentido vale destacar que miRNAs idênticos têm o mesmo número, independentemente da espécie. O pré-miRNA é referido como "mir-", enquanto um "miR-" maiúsculo sugere a forma madura. O "mir" ou "miR" são seguidos por um traço e um número (por exemplo, mir-34 ou miR-34). Os pré-miRNAs que produzem um miRNA maduro idêntico, mas posicionados em diferentes lugares são marcados com um sufixo numérico adicional. Diferentes miRNAs maduros com sequências quase idênticas, exceto um ou dois nucleotídeos, são marcados com uma letra minúscula adicional (por exemplo, miR-29a está relacionado ao miR-29b). Duas cadeias maduras diferentes de miRNA que são clivadas de braços opostos do mesmo miRNA duplex foram convencionalmente designadas, por exemplo, como miR-75-5p (braço 5') e miR-75-3p (braço 3') (de Lucia et al., 2017). É importante ressaltar que os miRNAs não apenas exercem sua função intracelularmente, mas também podem ser exportados das células via VEs, ou ainda ligados a proteínas como Ago-2 ou HDL (Arroyo et al., 2011; Vickers et al., 2015; Boon e Vickers, 2013). Considerando que os miRNAs podem inibir a expressão proteica de alvos específicos de mRNA por

mecanismos distintos, essas moléculas reguladoras podem impactar várias etapas em diferentes caminhos.

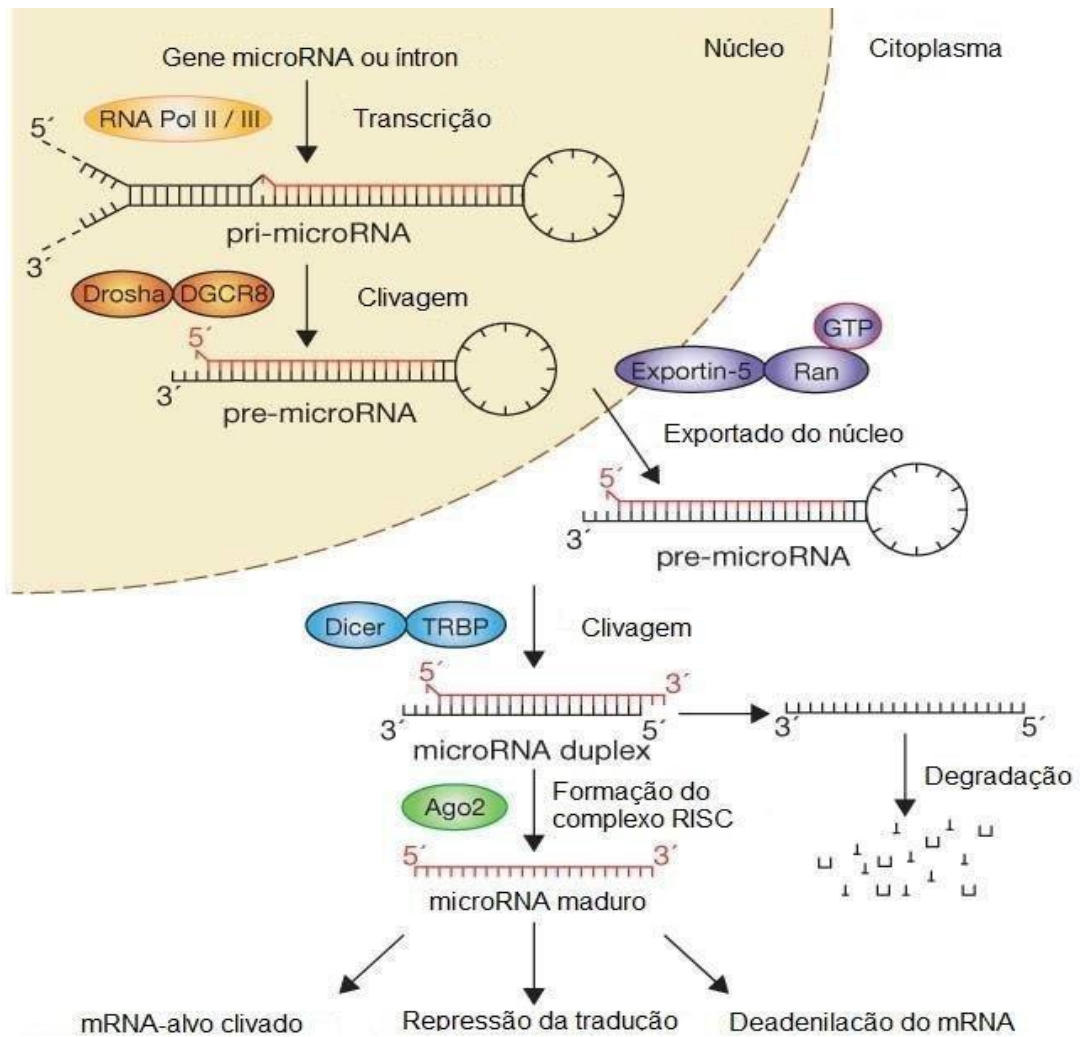


Figura 4. Biogênese dos miRNAs. Fonte: Silva, 2018.

É interessante destacar que os miRNAs transportados pelas VEs estão protegidos da degradação por RNases, deste modo sugere-se a utilização de miRNAs como biomarcadores de diversas doenças. Contudo, além dos valores preditivos de diagnóstico e prognóstico para doenças relacionadas à idade, os miRNAs presentes nas VEs circulantes podem estar envolvidos com o processo de envelhecimento (Friedman et al., 2009).

Neste contexto, alguns estudos utilizando modelos celulares, animais e humanos sugeriram o efeito do processo de envelhecimento no perfil de miRNA de VEs. A literatura sugere que miRNAs podem estar envolvidos tanto na sinalização de

processos de envelhecimento normal quanto em doenças relacionadas à idade. Wang e colaboradores (2018) observaram que altos níveis de miR-92a podem estar relacionados ao processo normal de envelhecimento, enquanto Goren e colegas (2012) relataram que o miR-92a, altamente expresso no tecido cardíaco, pode inibir a angiogênese e contribuir para a remodelação cardíaca. Além disso, Lee e colegas (2018) relataram que os miRNAs, mmu-miR-126b-5p, mmu-miR-184-3p e mmu-miR-200b-5p são diferentemente expressos em exossomos de camundongos com 12 meses de idade.

O papel das VEs contendo miRNAs como mediadores de sinalização parácrina tem sido amplamente estudado em modelos *in vitro* (Bang et al., 2014). Além disso, já foi proposto que o perfil de miRNAs pode ser alterado no estresse oxidativo induzido pelo envelhecimento (Fulzele et al., 2019). Deste modo, é possível inferir que os achados sobre o perfil de miRNA em VEs totais poderiam contribuir para o envelhecimento, doenças relacionadas à idade, no entanto, o papel dos miRNAs e da maquinaria oxidativa das VEs circulantes e a sua relação com as doenças associadas à idade raramente são avaliados.

1.4. Estresse Oxidativo e Envelhecimento: Papel das vesículas extracelulares e microRNAs

A “teoria do envelhecimento pelos radicais livres”, proposta por Harman (1955), ainda é intensamente debatida na comunidade científica e sustenta que os componentes celulares estão sob ataque de radicais livres, resultando em dano estrutural e alteração na função de células e órgãos durante o envelhecimento (Harman et al., 1955). Conceitualmente, o estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre espécies reativas (de oxigênio e nitrogênio) geradas e os mecanismos de defesa antioxidante, enzimáticos e não enzimáticos (Sies, 1985; Halliwell & Cross, 1994).

As espécies reativas são átomos ou moléculas que contém elétrons desemparelhados em sua camada mais externa. Como consequência deste elétron desemparelhado, as espécies reativas são caracterizadas por grande instabilidade e elevada reatividade (Reis et al., 2008). Destacamos dentre as espécies reativas aquelas centradas no oxigênio: o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de

hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxil ($\text{OH}\cdot$), bem como os radicais alcóxil ($\text{RO}\cdot$), peróxil ($\text{ROO}\cdot$) e o óxido nítrico (NO). É importante destacar que estas moléculas são continuamente produzidas durante o metabolismo oxidativo fisiológico. No entanto, na cadeia respiratória, que acontece na membrana interna das mitocôndrias a metabolização do oxigênio não é um processo totalmente eficiente. Na cadeia respiratória, o oxigênio pode escapar como espécie reativa, sendo que cerca de 5% do oxigênio consumido pelas mitocôndrias geram $\text{O}_2\cdot^-$ (Beal, 2005; Dasuri et al., 2013).

Tanto as espécies reativas do oxigênio quanto as do nitrogênio possuem um importante papel em processos biológicos como crescimento e sinalização celular (Lander, 1997; Zheng & Storz, 2000). Reações oxidativas, com potencial gerador de radicais livres, são muito importantes em diversas condições fisiológicas. Durante o processo inflamatório, a produção de radicais livres está envolvida na ativação e migração de leucócitos para as áreas de inflamação. Os leucócitos, macrófagos e neutrófilos, possuem a enzima NADPH oxidase que catalisa a redução monovalente do oxigênio a $\text{O}_2\cdot^-$ (Halliwell, 1992). No tecido vascular existem algumas isoformas de NADPH oxidase: NOX1, NOX2, NOX4 e NOX5 (Drummond e Sobey, 2014). A NOX2 (conhecida como gp91phox) foi a primeira isoforma descoberta; em condições patológicas, a sua super expressão e estimulação produzem grande quantidade de espécies reativas (Lassègue et al., 2012). A NOX2 vascular e leucocitária parece ter um papel central nas doenças cardiovasculares (Zhang et al., 2013; Brandes e Schröder, 2008). Além da NADPH oxidase, a mieloperoxidase (MPO) pode ser derivada de fagócitos e tem um papel importante no controle de patógenos bacterianos e fúngicos (Lu et al., 2015; Nussbaum et al., 2013; Eiserich et al., 2002). Para isso, a enzima MPO, é capaz de oxidar vários compostos biológicos, como o H_2O_2 a outros ácidos podendo gerar hipoclorito, além disso, já foi descrito que o ascorbato é um substrato para o MPO (Dalli et al., 2013; Jaffe et al., 1973; Arnhold, 2004; Thom et al., 2013; Mallat et al., 1999; Gasser e Schifferli, 2005).

Ainda, outra fonte de espécies reativas é a enzima xantina oxidase (XO). Esta enzima, essencial na via das purinas, catalisa a oxidação de hipoxantina a xantina e, após, a geração de ácido úrico e radical ânion superóxido (Farthing e Farthing, 2015). Os tecidos cardíaco e encefálico apresentam baixa atividade desta enzima, no entanto em situações patológicas como isquemia/reperfusão e na presença de citocinas pró-

inflamatórias a ativação da XO pode ser observada. É interessante destacar que os níveis de atividade de XO estão correlacionados à idade no músculo esquelético de ratos, anéis aórticos e no plasma humano (Aranda et al., 2007). Nesse contexto, a XO pode estar envolvida com hiperuricemia induzida pelo envelhecimento e estresse oxidativo

O aumento das espécies reativas pode levar ao dano oxidativo em proteínas celulares, DNA, lipídeos e polissacarídeos (Andreyev et al., 2005; Zorov et al., 2014). A fim de barrar estes danos os organismos possuem sistemas de defesa antioxidante responsáveis por combater a produção excessiva de radicais livres. O sistema antioxidante é formado por componentes enzimáticos como as enzimas glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). A GPx catalisa a redução de hidroperóxidos pela glutathione reduzida (GSH), utilizando então a GSH como doadora de elétrons, formando glutathione oxidada (GSSG), que é reciclada pela glutathione reductase (GR) (Packer, 1997). A SOD catalisa a reação de transformação de O_2^- em H_2O_2 , enquanto que a CAT hidrolisa o H_2O_2 , formando oxigênio e água (Martín-Ventura et al., 2017). Além disso, as defesas antioxidantes possuem componentes não-enzimáticos como a vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (α -tocoferol) e GSH (Dasuri et al., 2013; Uttara et al., 2009). A existência desta rede de defesas antioxidantes apoia a hipótese de que os radicais livres são produzidos em condições fisiológicas e que seus níveis devem ser adequadamente regulados. Os processos envolvidos na geração e eliminação de espécies reativas, bem como as enzimas envolvidas estão detalhadas na Figura 5.

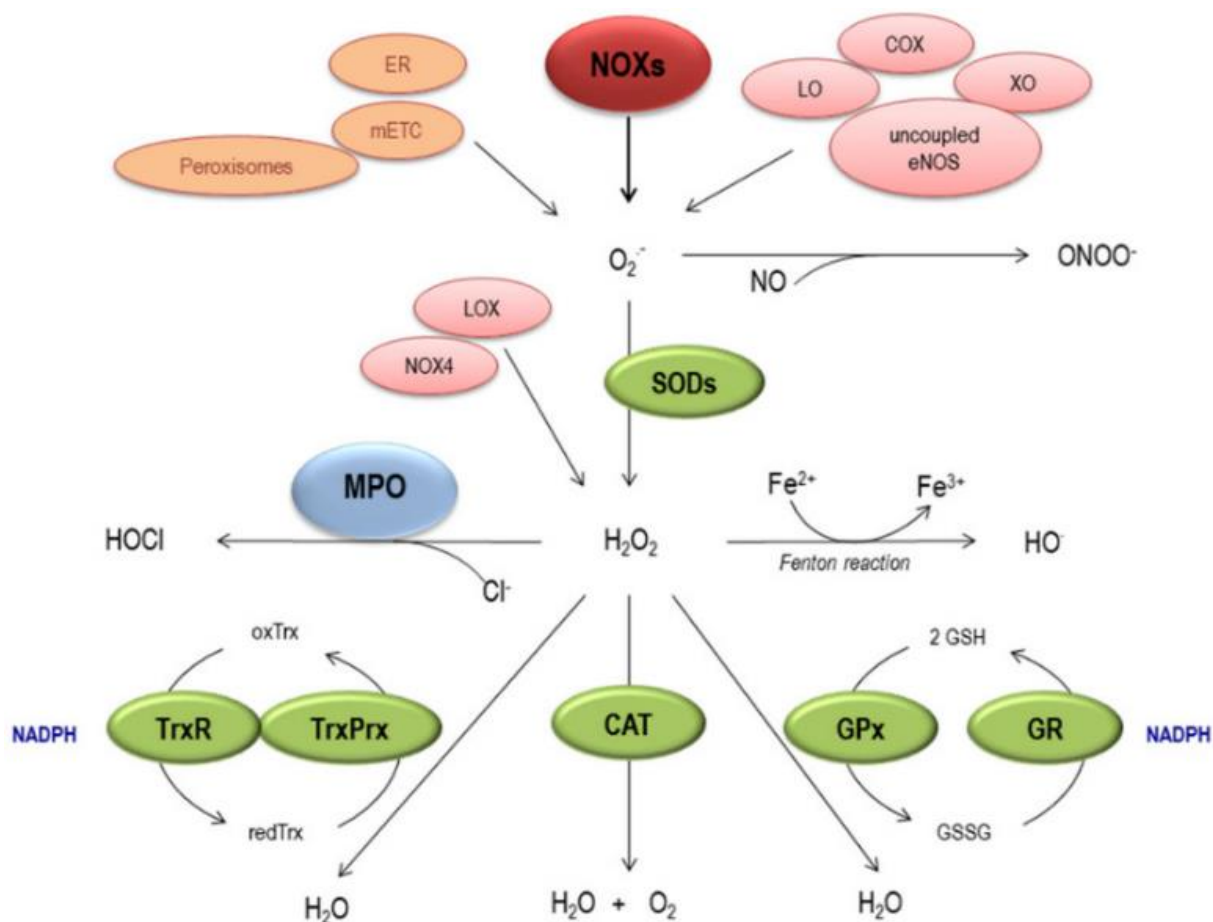


Figura 5: Geração e eliminação de espécies reativas, pelos sistemas pró-oxidativos e enzimas antioxidantes, respectivamente. $O_2^{\cdot-}$ é transformado em H_2O_2 e através de superóxido dismutases (SODs). $O_2^{\cdot-}$ pode reagir rapidamente com NO, levando à formação de $ONOO^{\cdot-}$. O H_2O_2 pode ser convertido em moléculas mais reativas, incluindo o radical hidroxila (OH^{\cdot}) pela reação de Fenton ou em HOCl pela mieloperoxidase (MPO). Além disso, o H_2O_2 também pode ser transformado em H_2O pela catalase (CAT) ou pelos sistemas glutatona peroxidase (GPx) / glutatona redutase (GR) e tioredoxina (Trx) / peroxiredoxina (PRx). Fonte: Martín-Ventura et al., 2017.

O estresse oxidativo pode estar envolvido em vários processos patológicos agudos e crônicos, como doenças cardiovasculares. Alguns estudos propõem que a tolerância do coração ao estresse oxidativo diminui com a idade devido à redução das concentrações das enzimas antioxidantes, como GSH e SOD (Abete et al., 1999). Por exemplo, a aterosclerose já foi associada à oxidação do LDL, especialmente em idosos; além disso, uma associação significativa entre o LDL oxidado e maior rigidez arterial já foi descrita (Gradinaru et al. 2015). A disfunção endotelial também pode ser associada ao aumento do estresse oxidativo em idosos, uma vez que a dilatação fluxo-

mediada da artéria braquial está inversamente relacionada aos níveis de nitrotirosina (produto da nitração da tirosina mediada por espécies reativas de nitrogênio) nas células endoteliais (Donato et al. 2007). Ainda, o estresse oxidativo foi identificado como um dos principais fatores que contribuem para o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca (Maulik & Kumar, 2012). Estudos demonstraram que estímulos hipertróficos como angiotensina II (Ang II), endotelina-1, catecolaminas, citocinas e estímulos biomecânicos podem induzir o aumento da produção de espécies reativas em cardiomiócitos (Laskowski et al. 2006; Liu et al. 2004). A partir desta produção excessiva de espécies reativas uma série de mediadores de sinalização hipertrófica e fatores de transcrição, como as proteínas quinases reguladas por sinal extracelular 1 e 2 (ERK 1/2) e o fator nuclear kappa-beta (NF- κ B) podem ser ativados (Takimoto e Kass 2007). As espécies reativas produzidas pela NADPH oxidase podem contribuir para (ou estão associadas) o desenvolvimento de hipertrofia patológica, fibrose e apoptose (Dai et al. 2011; Murdoch et al. 2006; Schwarzer et al. 2014; Takimoto e Kass 2007)

Como mencionado previamente, alguns estudos já demonstraram que as VEs podem desempenhar um papel importante no estresse oxidativo (Bertoldi et al., 2018; Azevedo et al., 2007). No entanto, os estudos que avaliam a relação entre as VEs e estresse oxidativo indicam que as VEs podem desempenhar um duplo papel na sinalização oxidativa. Alguns trabalhos propõem que a liberação de VEs por células submetidas a estresse oxidativo podem induzir tolerância em células vizinhas e ainda transferir enzimas antioxidantes (Eldh et al., 2010; Fröhlich et al., 2014). Por outro lado, enzimas oxidativas como a NADPH oxidase, foram identificadas em VEs originadas de plaquetas, células endoteliais e linfócitos (Janiszewski et al., 2004; Brodsky et al., 2004; Mostefai et al., 2008). Além disso, Janiszewski e colegas (2004) demonstraram que vesículas derivadas de plaquetas são capazes de produzir espécies reativas em condições patológicas, especificamente durante o choque séptico (Azevedo et al., 2007; Gambim et al., 2007). Ainda, alguns estudos usaram inibidores enzimáticos para estimar o envolvimento da XO na geração de espécies reativas de oxigênio em VEs (Brodsky et al., 2004; Mostefai et al., 2008), no entanto, até onde sabemos, não há relatos avaliando a atividade e o conteúdo de XO em VEs circulantes.

Além disso, estudos demonstraram que VEs derivadas de neutrófilos contêm diversos mediadores inflamatórios, moléculas de adesão (Nicholls e Hazen, 2009; Jaffe et al., 1973) além da enzima MPO (Hong et al., 2012, Jaffe et al., 1973, Pitanga et al. al., 2014).

Considerando as possíveis fontes de espécies reativas, o papel da enzima XO, NADPH oxidase e MPO precisam ser explorados. Já foi reportado que VEs derivadas de linfócitos, após tratamento *in vitro* com antibiótico, aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio estimulando as vias de XO e NADPH oxidase (Mostefai et al., 2008). O desequilíbrio entre a capacidade antioxidante e a produção intrínseca de espécies reativas nas VEs pode contribuir para o estresse oxidativo relacionado à idade. Deste modo, é possível inferir que enzimas oxidativas poderiam estar relacionadas ao aumento no conteúdo de espécies reativas relacionadas ao envelhecimento (Cahill-Smith & Li, 2014). A Figura 6 ilustra a formação de espécies reativas pelas enzimas NADPH oxidase e MPO em vesículas extracelulares.

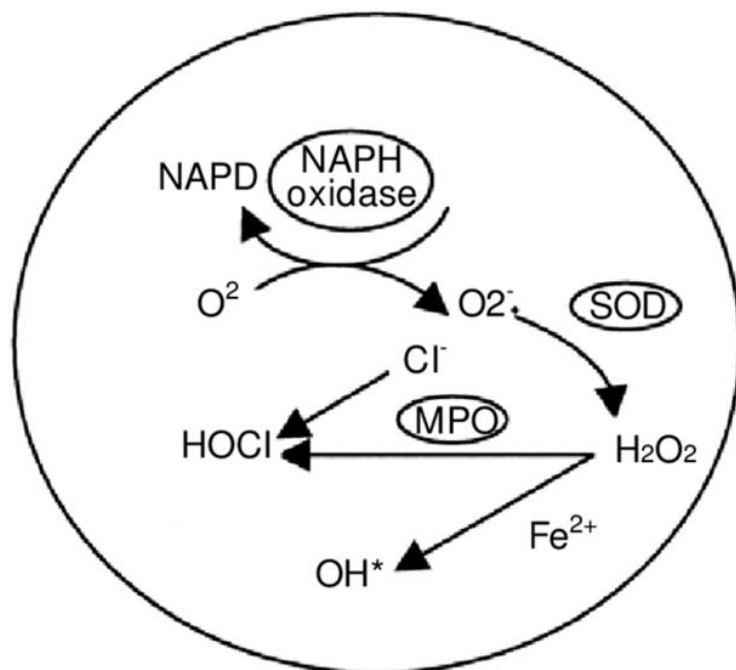


Figura 6: Formação de espécies reativas pela NADPH oxidase, MPO, em VE. Fonte:

Ascensão et al., 2020

Ainda, é interessante destacar que os miRNAs podem desempenhar um papel importante no desequilíbrio da homeostase redox (Gupta & Pulliam, 2014; Brites & Fernandes, 2015). Fulzele e colegas (2019) relataram que o estresse oxidativo relacionado à idade está associado ao aumento de miR-34a-5p nas VEs derivadas do músculo. Ainda, Engedal e colegas (2018) identificaram, em uma revisão recente, vários miRNAs modulados pelo estresse oxidativo além dos alvos moleculares e das vias canônicas afetadas por estes miRNAs. Esses autores descreveram que 13 miRNAs, let-7, miR-9, miR-16, miR-21, miR-22, miR-29b, miR-99a, miR-125b, miR-128, miR-143, miR-144, miR-155 e miR-200c, parecem ser modulados pelo estresse oxidativo. Os autores mostraram que esses miRNAs têm alvos comuns ao desenvolvimento de um estado pró-oxidativo, como o homólogo B do ciclo 14 da divisão celular (CDC14B), um membro da família da proteína tirosina fosfatase, os domínios SH3 e PX da proteína 2A (SH3PXD2A) e canal 5 de cloreto (CICN5) (Engedal et al., 2018). Curiosamente, SH3PXD2A (também chamado Tks5) parece facilitar o sistema NOX e, assim, a produção de espécies reativas (Diaz et al., 2010).

Considerando que o estado oxidativo e o conteúdo das VEs desempenham um papel fundamental no envelhecimento é fundamental buscar uma compreensão sobre a maquinaria pró- e antioxidante e a sua relação com microRNAs derivados de VEs, assim como seu impacto nas vias de sinalização celular relacionadas ao envelhecimento.

2. HIPÓTESE

A hipótese deste trabalho é a de que o processo de envelhecimento altere o perfil de miRNAs de vesículas extracelulares circulantes e com isso impacte a homeostase redox nas vesículas extracelulares circulantes em ratos Wistar envelhecidos, favorecendo a manutenção do estado pro-oxidativo. Além disso as alterações no perfil de microRNAs irão impactar moléculas relevantes em vias de sinalização associadas ao envelhecimento.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos do envelhecimento sobre o perfil de microRNAs e perfil oxidativo das vesículas extracelulares circulantes de ratos Wistar.

3.2. Objetivos específicos

- a) Caracterizar as VEs quanto ao seu tamanho e concentração
- b) Quantificar proteína específica, marcadora de VEs: Flotilina 1
- c) Isolar o microRNA das VEs circulantes
- d) Avaliar o perfil de expressão dos miRNAs das VEs circulantes
- e) Realizar análises de predição de alvos dos microRNAs e o impacto em vias de sinalização.
- f) Determinar a atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO), catalase (CAT) e xantina oxidase (XO) em VEs circulantes
- g) Determinar do conteúdo das enzimas XO, CAT e da subunidade gp91phox da enzima NADPH oxidase em VEs circulantes

4. MÉTODOS

4.1. Animais

Neste estudo foram utilizados ratos *Wistar* machos de 3 e 21 meses de idade provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL - UFRGS). Os animais foram mantidos no Biotério setorial do Departamento de Farmacologia (UFRGS) durante o processo de envelhecimento em condições padrão de biotério com 12 horas de claro/escuro, temperatura controlada (22 ± 2 °C), comida e água *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório (CEUA) (número do projeto #23464). Ao atingirem a idade determinada os animais foram decapitados e o sangue troncular foi coletado em tubos contendo EDTA. O sangue total foi centrifugado a 1000 x g por 10 min para obtenção do plasma. As amostras de plasma foram armazenadas a -80 °C para posterior isolamento das VEs.

4.2. Isolamento de vesículas extracelulares circulantes

As VEs circulantes foram isoladas a partir do plasma utilizando um kit comercial específico ExoQuick™ (System Bioscience, USA) que se baseia na precipitação de vesículas. O plasma (500 µL) foi descongelado em gelo e centrifugado a 3000xg por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e depois incubado com trombina à temperatura ambiente para remover o fibrinogênio. O plasma foi então centrifugado a 10.000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e incubado com ExoQuick™ por 60 minutos a 4°C. A mistura de ExoQuick™/amostras foi centrifugada duas vezes a 1.500 x g por 30 e 5 minutos, respectivamente, a fim de remover o sobrenadante. O sedimento remanescente foi ressuspensão em PBS (300 µL), alíquotado e armazenado a -20°C. O conteúdo total de proteínas das VEs circulantes foi medido pelo método do azul de Coomassie usando albumina de soro bovino como padrão (Bradford, 1976).

4.3. Caracterização das vesículas extracelulares

Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) e o conteúdo de flotilina1 (FLOT1) - uma proteína associada à membrana que é encontrada em VE e por isso comumente usada como marcador de VEs - foi usada para caracterizar melhor a população isolada de VEs (Théry et al., 2018). Com o intuito de maximizar as

informações obtidas por animal e em conformidade com os princípios éticos, no presente trabalho, utilizamos as mesmas amostras descritas em Andrade e colaboradores (2018). Neste referido estudo foram detectados níveis de CD63 e os animais envelhecidos apresentaram níveis reduzidos de CD63 nas VEs plasmáticas (teste t de Student; $p < 0,05$) (de Andrade et al., 2018).

4.3.1. Análise de rastreamento de partículas (NTA)

As distribuições de tamanho e concentração das VEs isoladas foram determinadas usando a Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA). Foi utilizado para as análises o software analítico NanoSight LM14 e NTA 3.2 (Nanosight Ltd., Amesbury, Reino Unido), seguindo o protocolo do fabricante. As suspensões representativas das VEs foram diluídas com solução salina tamponada com fosfato (1: 1000). As amostras foram colocadas na câmara do Nanosight com uma seringa descartável e medidas em temperatura ambiente por 60 s com detecção automática. A suspensão foi irradiada por uma fonte de laser e espalhamento de luz. As imagens foram capturadas por uma câmera com dispositivo acoplado a carga. Esta técnica é baseada no rastreamento do movimento browniano de partículas individuais e na determinação do tamanho de acordo com a equação de Stokes Einstein.

4.4. Análise de microRNAs

4.4.1. Extração e amplificação dos microRNAs

O microRNA foi extraído de acordo com as instruções do kit mirVana™ PARIS™ RNA (Ambion; Life Technologies, Austin, TX, EUA). A extração foi iniciada a partir da adição de 500 µL de uma solução desnaturante a suspensão de VEs, seguido de agitação vigorosa e incubação em gelo por 5 min. Em seguida foi realizada a separação da fase orgânica e aquosa. Após esta etapa, 500µL da fase superior aquosa, foi recuperada e foi adicionado 625 µL de etanol absoluto (Merck, Massachusetts, EUA) para precipitação dos ácidos nucleicos. Esta mistura foi adicionada em uma coluna com filtro de sílica, fornecida pelo kit. Na sequência, foram realizadas lavagens conforme indicadas pelo fabricante. Os filtros foram transferidos para novos microtubos, adicionada água livre de RNase, para obter o RNA total eluído. O microRNA total obtido foi armazenado em freezer -80°C até utilização.

A conversão de RNA para cDNA foi realizada através do kit SeraMir™ Exosome RNA Amplification Kit (System Biosciences, Mountain View, CA), seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. Em seguida, a quantificação do microRNA foi determinada por Qubit (Life Technologies).

4.4.2. Análise de microarray

O miRNA foi marcado com o kit Affymetrix® FlashTag™ Biotin HSR RNA Labeling Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA) de acordo com procedimentos padrão do fabricante. O RNA marcado foi hibridizado na matriz Affymetrix GeneChip miRNA 4.0 e foi executado o Protocolo Fluidics Station 450 (FS450_002) (Affymetrix, Santa Clara, CA) para análise. Os dados resultantes foram avaliados no Expression Console usando RMA + DMBG (Affymetrix) e depois exportados para Partek Genomics Suite (Partek, St. Louis, MO) para as análises.

4.5. Western blot

O Western blot foi realizado para avaliar o conteúdo de gp91phox (subunidade NADPH oxidase), XO, CAT e FLOT1 das VEs (n = 6 animais por grupo). As alíquotas de VEs foram preparadas adicionando 100 µL de tampão RIPA gelado com inibidor de protease a 100 µL de amostras de VEs (Klein et al., 1995). As amostras foram incubadas com tampão Laemmli (2x) submetidas ao vórtex e armazenadas a -20 ° C até a análise. As proteínas (40 - 80µg) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10-12% (SDS-PAGE, 1,5 mm, 130 volts) e transferidas para membranas de PVDF (Millipore). A membrana foi bloqueada com leite desnatado a 5% em TBS-T e depois incubada com anticorpos primários anti-gp91phox (abcam, Cambridge, MA, EUA), anti-catalase, anti-xantina oxidase (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) e anti-FLOT1 (System Biosciences) durante a noite a 4 ° C. Depois, a membrana foi incubada com anticorpo secundário (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) por 2 horas em temperatura ambiente. Um marcador de peso molecular padrão (RPN 800 arco-íris gama completa Bio-Rad, CA, EUA) foi usado como referência para determinar os pesos moleculares das bandas. As proteínas foram quantificadas pela mensuração da intensidade da banda (área X OD) usando um

software Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) e normalizadas pelo método de Ponceau (Klein et al., 1995; Romero-Calvo et al., 2010).

4.6. Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

Para avaliar a atividade de MPO, as VEs isoladas foram lisadas com um detergente específico, Triton X-100, a uma concentração final de 0,1% (Osteikoetxea et al., 2015). Para a reação enzimática adicionou-se tampão fosfato de potássio (0,1M), 30µL de amostra, 10µL de orto-dianisidina 2% e logo antes da leitura foi adicionado 12µL de H₂O₂ (0,01%). A reação foi analisada por absorbância a 450nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de controle e o grupo controle (jovem adulto) foi considerado 100% da atividade enzimática.

4.7. Atividade da enzima xantina oxidase (XO)

Para avaliar a atividade de XO, VEs isolados foram lisados com um detergente específico, Triton X-100, a uma concentração final de 0,1% (Osteikoetxea et al., 2015). A atividade de XO (xantina oxidase, EC1.17.3.2) foi medida de acordo com o método de Prajda e Weber (1975), onde a atividade é medida pela determinação do ácido úrico da xantina. Alíquotas de VEs (15 µL) foram incubadas por 30 min a 37 ° C em tampão fosfato (pH 7,5, 50 mM) contendo xantina (4 mM). A reação foi interrompida adicionando 20 µL de ácido tricloroacético a 100%. A mistura foi então centrifugada a 4000 × g por 20 min. O ácido úrico foi determinado no sobrenadante por absorbância a 292nm.

4.8. Atividade da enzima catalase (CAT)

A atividade da enzima antioxidante CAT foi avaliada pelo método descrito por Aebi (1984). As amostras de VEs (50 µL) foram previamente lisadas (Osteikoetxea et al., 2015) e incubadas em etanol (10%) e triton X-100 (10%). A atividade foi avaliada a 25°C, a fim de determinar a taxa de degradação de H₂O₂ em 10mM de tampão fosfato a 240nm. A atividade de CAT foi expressa em porcentagem de controle e o grupo controle (jovem adulto) foi considerado 100% da atividade enzimática.

4.9. Análise estatística

Em todos os testes realizados o nível de significância aceito foi $p < 0,05$. As análises dos resultados das atividades e conteúdo enzimático foram realizadas no programa estatístico GraphPad Prism v.6.

A análise de componentes principais (PCA) e o agrupamento hierárquico não supervisionado (HC) foram realizados utilizando o software Partek Genomics Suite (versão 6.6; Partek, St. Louis, MO). A análise de variância foi realizada para identificar microRNAs diferentemente expressos nas VEs de ratos envelhecidos e jovens adultos; microRNAs com $p < 0,05$ e $fold\ change \geq | 1,1 |$ foram selecionados para análise posterior. Os microRNAs diferentemente expressos foram analisados pelo software Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Qiagen), a fim de investigar os efeitos dos microRNAs na regulação da expressão gênica durante o processo de envelhecimento. Os alvos dos microRNAs foram determinados usando o IPA microRNA Target Filter, que identifica as interações mRNA-miRNAs experimentalmente validadas das bases: TarBase, miRecords e literatura biomédica, bem como interações previstas de microRNA-mRNA do TargetScan. Utilizamos um filtro conservador, selecionando apenas mRNAs alvos experimentalmente validados e altamente conservados para cada microRNA. Realizamos a análise através do *Core Pathway Analyses* com os alvos dos microRNA para identificar associações entre os mRNAs em nosso conjunto de dados (Hasegawa et al., 2018). As vias canônicas com valor de $p < 0,05$ (teste exato de Fischer) foram consideradas estatisticamente significativas e o escore z de ativação foi calculado para prever a ativação ou inibição de reguladores transcricionais (Qiagen).

5. RESULTADOS

Os resultados estão expressos em forma de artigo e serão apresentados na versão completa da Tese.

Artigo 1

Submetido à revista *Molecular and Cellular Biochemistry*

Cechinel, LR, Batabyal, RA, Goldberg, M, Harmon, B, Belló-Klein, A, AR, Araujo, Freishtat, RJ Siqueira, IR. ***microRNA signature in circulating extracellular vesicles is associated with susceptibility to age-related cardiovascular diseases: preliminary exploratory results from microarray data***

Artigo 2

Será submetido à revista *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*

Cechinel, LR, Bertoldi, K, Corssac, GB, Bruch, GE, Carregal, VM, Massensini, AR, Araujo, AS, Belló-Klein, A, Batabyal, RA, Freishtat, RJ, Siqueira, IR. **The involvement of circulating total extracellular vesicle cargo on age-related oxidative stress**

6. DISCUSSÃO

A discussão dos resultados será apresentada na versão completa desta tese.

7. CONCLUSÕES

As conclusões do trabalho serão apresentadas na versão completa desta tese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abete, P., Napoli, C., Santoro, G., Ferrara, N., Tritto, I., Chiariello, M., ... & Ambrosio, G. (1999). Age-related decrease in cardiac tolerance to oxidative stress. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 31(1), 227-236.
- Adler, A. S., Sinha, S., Kawahara, T. L., Zhang, J. Y., Segal, E., & Chang, H. Y. (2007). Motif module map reveals enforcement of aging by continual NF- κ B activity. *Genes & development*, 21(24), 3244-3257
- Ai, X., Curran, J. W., Shannon, T. R., Bers, D. M., & Pogwizd, S. M. (2005). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in heart failure. *Circulation research*, 97(12), 1314-1322.
- Aleman, M.M., Gardiner, C., Harrison, P., Wolberg, A.S., 2011. Differential contributions of monocyte-and platelet-derived microparticles towards thrombin generation and fibrin formation and stability. *J. Thromb. Haemost.* 9, 2251–2261. Andreyev et al., 2005;
- Anrather, J., Racchumi, G., & Iadecola, C. (2006). NF- κ B regulates phagocytic NADPH oxidase by inducing the expression of gp91phox. *Journal of Biological Chemistry*, 281(9), 5657-5667.
- Aranda, R., Doménech, E., Diana Rus, A., Real, J. T., Sastre, J., Viña, J., & Pallardó, F. V. (2007). Age-related increase in xanthine oxidase activity in human plasma and rat tissues. *Free radical research*, 41(11), 1195-1200. <https://doi.org/10.1080/10715760701481461>
- Arbo, B. D., Cechinel, L. R., Palazzo, R. P., & Siqueira, I. R. (2020). Endosomal dysfunction impacts extracellular vesicle release: Central role in A β pathology. *Ageing Research Reviews*, 58, 101006.
- Archer, C. R., Robinson, E. L., Drawnel, F. M., & Roderick, H. L. (2017). Endothelin-1 promotes hypertrophic remodelling of cardiac myocytes by activating sustained signalling and transcription downstream of endothelin type A receptors. *Cellular signalling*, 36, 240-254.
- Arnhold, J. (2004). Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. *Biochemistry (Moscow)*, 69(1), 4-9.
- Arroyo, J. D., Chevillet, J. R., Kroh, E. M., Ruf, I. K., Pritchard, C. C., Gibson, D. F., ... & Tait, J. F. (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(12), 5003-5008.
- Ascensão, António & Magalhães, José & Soares, José & Oliveira, José & Duarte, José. (2020). R E S U M O Exercício e Stress Oxidativo Cardíaco [48].

- Azevedo, L. C. P., Janiszewski, M., Pontieri, V., de Almeida Pedro, M., Bassi, E., Tucci, P. J. F., & Laurindo, F. R. M. (2007). Platelet-derived exosomes from septic shock patients induce myocardial dysfunction. *Critical care*, 11(6), R120.
- Bang, C., Batkai, S., Dangwal, S., Gupta, S. K., Foinquinos, A., Holzmann, A., ... & Ponimaskin, E. (2014). Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy. *The Journal of clinical investigation*, 124(5), 2136-2146.
- Barteneva, N.S., Fasler-Kan, E., Bernimoulin, M., Stern, J.N., Ponomarev, E.D., Duckett, L., Vorobjev, I.A., 2013. Circulating microparticles: square the circle. *BMC Cell Biol.* 14, 23Beal, 2005;
- Bellingham, S. A., Guo, B., Coleman, B., & Hill, A. F. (2012). Exosomes: vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases?. *Frontiers in physiology*, 3, 124.
- Berenji, K., Drazner, M. H., Rothermel, B. A., & Hill, J. A. (2005). Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure?. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 289(1), H8-H16.
- Bernstein, D., Fajardo, G., & Zhao, M. (2011). The role of β -adrenergic receptors in heart failure: differential regulation of cardiotoxicity and cardioprotection. *Progress in pediatric cardiology*, 31(1), 35-38.
- Bertoldi, K., Cechinel, L. R., Schallenberger, B., Corssac, G. B., Davies, S., Guerreiro, I. C. K., ... & Siqueira, I. R. (2018). Circulating extracellular vesicles in the aging process: impact of aerobic exercise. *Molecular and cellular biochemistry*, 440(1-2), 115-125.
- Beyer, R. E. (1994). The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: interaction with vitamin E and coenzyme Q. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 26(4), 349-358.
- Boon, R. A., & Vickers, K. C. (2013). Intercellular transport of microRNAs. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 33(2), 186-192.
- Borchert, G. M., Lanier, W., & Davidson, B. L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature structural & molecular biology*, 13(12), 1097-1101.
- Bossuyt, J., Helmstadter, K., Wu, X., Clements-Jewery, H., Haworth, R. S., Avkiran, M., ... & Bers, D. M. (2008). Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II δ and protein kinase D overexpression reinforce the histone deacetylase 5 redistribution in heart failure. *Circulation research*, 102(6), 695-702.
- Brandes, R. P., & Schröder, K. (2008). Composition and functions of vascular nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. *Trends in cardiovascular medicine*, 18(1), 15-19.

- Brites, D., & Fernandes, A. (2015). Neuroinflammation and depression: microglia activation, extracellular microvesicles and microRNA dysregulation. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 476.
- Brodsky, S. V., Zhang, F., Nasjletti, A., & Goligorsky, M. S. (2004). Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 286(5), H1910-H1915. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01172.2003>
- Burger, D., Kwart, D. G., Montezano, A. C., Read, N. C., Kennedy, C. R., Thompson, C. S., & Touyz, R. M. (2012). Microparticles Induce Cell Cycle Arrest Through Redox-Sensitive Processes in Endothelial Cells: Implications in Vascular Senescence. *Journal of the American Heart Association*, 1(3), e001842. <https://doi.org/10.1161/JAHA.112.001842>.
- Cahill-Smith, S., & Li, J. M. (2014). Oxidative stress, redox signalling and endothelial dysfunction in ageing-related neurodegenerative diseases: a role of NADPH oxidase 2. *British journal of clinical pharmacology*, 78(3), 441-453.
- Camici, G. G., Savarese, G., Akhmedov, A., & Lüscher, T. F. (2015). Molecular mechanism of endothelial and vascular aging: implications for cardiovascular disease. *European heart journal*, 36(48), 3392-3403.
- Carreño, J. E., Apablaza, F., Ocaranza, M. P., & Jalil, J. E. (2006). Hipertrofia cardiaca: eventos moleculares y celulares. *Revista española de cardiología*, 59(5), 473-486.
- Chang J., Xie M., Shah V. R., Schneider M. D., Entman M. L., Wei L., et al. (2006). Activation of Rho-associated coiled-coil protein kinase 1 (ROCK-1) by caspase-3 cleavage plays an essential role in cardiac myocyte apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 14495–14500
- Chiao, Y. A., & Rabinovitch, P. S. (2015). The aging heart. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(9), a025148.
- Christensen, K., Doblhammer, G., Rau, R., & Vaupel, J. W. (2009). Ageing populations: the challenges ahead. *The lancet*, 374(9696), 1196-1208.
- Chung, E., & Leinwand, L. A. (2014). Pregnancy as a cardiac stress model. *Cardiovascular research*, 101(4), 561-570.
- Clark, A. L., Maruyama, S., Sano, S., Accorsi, A., Girgenrath, M., Walsh, K., & Naya, F. J. (2016). miR-410 and miR-495 are dynamically regulated in diverse cardiomyopathies and their inhibition attenuates pathological hypertrophy. *PLoS one*, 11(3).
- Colombo, M., Moita, C., van Niel, G., Kowal, J., Vigneron, J., Benaroch, P., Manel, N., Moita, L.F., Théry, C., Raposo, G., 2013. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J. Cell. Sci.* 126, 5553–5565. Dalli et al., 2013;

Csiszar, A., Wang, M., Lakatta, E. G., & Ungvari, Z. (2008). Inflammation and endothelial dysfunction during aging: role of NF- κ B. *Journal of applied physiology*, 105(4), 1333-1341.

Culley, K. L., Lessard, S. G., Green, J. D., Quinn, J., Chang, J., Khilnani, T., ... & Otero, M. (2019). Inducible knockout of CHUK/IKK α in adult chondrocytes reduces progression of cartilage degradation in a surgical model of osteoarthritis. *Scientific reports*, 9(1), 1-10

Dai, D. F., Chen, T., Johnson, S. C., Szeto, H., & Rabinovitch, P. S. (2012). Cardiac aging: from molecular mechanisms to significance in human health and disease. *Antioxidants & redox signaling*, 16(12), 1492-1526.

Dai, D. F., Johnson, S. C., Villarín, J. J., Chin, M. T., Nieves-Cintrón, M., Chen, T., ... & Santana, L. F. (2011). Mitochondrial oxidative stress mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and G α q overexpression-induced heart failure. *Circulation research*, 108(7), 837-846.

Dasuri, K., Zhang, L., & Keller, J. N. (2013). Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 62, 170-185.

Daugaard, I., & Hansen, T. B. (2017). Biogenesis and function of ago-associated RNAs. *Trends in genetics*, 33(3), 208-219.

Davidson, S. M., Takov, K., & Yellon, D. M. (2017). Exosomes and cardiovascular protection. *Cardiovascular drugs and therapy*, 31(1), 77-86

de Andrade, G. G., Cechinel, L. R., Bertoldi, K., Galvão, F., Worm, P. V., & Siqueira, I. R. (2018). 458 The Aging Process Alters IL-1 β and CD63 Levels Differently in Extracellular Vesicles 459 Obtained from the Plasma and Cerebrospinal Fluid. *Neuroimmunomodulation*, 25(1), 18-460
22.<https://doi.org/10.1159/000488943>

de Cabo, R., Carmona-Gutierrez, D., Bernier, M., Hall, M. N., & Madeo, F. (2014). The search for antiaging interventions: from elixirs to fasting regimens. *Cell*, 157(7), 1515-1526.

de Godoy, M. A., Saraiva, L. M., de Carvalho, L. R., Vasconcelos-dos-Santos, A., Beiral, H. J., Ramos, A. B., ... & de Araujo-Silva, C. A. (2018). Mesenchymal stem cells and cell-derived extracellular vesicles protect hippocampal neurons from oxidative stress and synapse damage induced by amyloid- β oligomers. *Journal of Biological Chemistry*, 293(6), 1957-1975.

de Lucia, C., Komici, K., Borghetti, G., Femminella, G. D., Bencivenga, L., Cannavo, A., ... & Rengo, G. (2017). microRNA in cardiovascular aging and age-related cardiovascular diseases. *Frontiers in medicine*, 4, 74.

del Conde, I., Shrimpton, C.N., Thiagarajan, P., López, J.A., 2005. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood* 106, 1604–1611. Diaz et al., 2010

Djuranovic, S., Nahvi, A., & Green, R. (2011). A parsimonious model for gene regulation by miRNAs. *Science*, 331(6017), 550-553.

Donato, A. J., Eskurza, I., Silver, A. E., Levy, A. S., Pierce, G. L., Gates, P. E., & Seals, D. R. (2007). Direct evidence of endothelial oxidative stress with aging in humans: relation to impaired endothelium-dependent dilation and upregulation of nuclear factor- κ B. *Circulation research*, 100(11), 1659-1666.

Drummond, G. R., & Sobey, C. G. (2014). Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in vascular disease?. *Trends in Endocrinology&Metabolism*, 25(9), 452-463.

Eiserich, J. P., Baldus, S., Brennan, M. L., Ma, W., Zhang, C., Tousson, A., ... & Freeman, B. A. (2002). Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. *Science*, 296(5577), 2391-2394.

Eitan E, Green J, Bodogai M, Mode NA, Bæk R, Jørgensen MM, Freeman DW, Witwer KW, Zonderman AB, Biragyn A, Mattson MP, Noren Hooten N, Evans MK: Age-Related Changes in Plasma Extracellular Vesicle Characteristics and Internalization by Leukocytes. *Sci Rep* 2017; 2;7(1):1342.

Eldh, M., Ekström, K., Valadi, H., Sjöstrand, M., Olsson, B., Jernås, M., & Lötval, J. (2010). Exosomes communicate protective messages during oxidative stress; possible role of exosomal shuttle RNA. *PLoS one*, 5(12), e15353.

Ellison, G. M., Waring, C. D., Vicinanza, C., & Torella, D. (2012). Physiological cardiac remodelling in response to endurance exercise training: cellular and molecular mechanisms. *Heart*, 98(1), 5-10.

Engedal, N., Žerovnik, E., Rudov, A., Galli, F., Olivieri, F., Procopio, A. D., ... & Albertini, M. C. (2018). From oxidative stress damage to pathways, networks, and autophagy via microRNAs. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018.

Enns, L. C., Morton, J. F., Treuting, P. R., Emond, M. J., Wolf, N. S., McKnight, G. S., ... & Ladiges, W. C. (2009). Disruption of protein kinase A in mice enhances healthy aging. *PLoS One*, 4(6).

Farthing, D. E., Farthing, C. A., & Xi, L. (2015). Inosine and hypoxanthine as novel biomarkers for cardiac ischemia: from bench to point-of-care. *Experimental Biology and Medicine*, 240(6), 821-831.

Fazi, F., & Nervi, C. (2008). MicroRNA: basic mechanisms and transcriptional regulatory networks for cell fate determination. *Cardiovascular research*, 79(4), 553-561.

Fevrier, B., & Raposo, G. (2004). Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Current opinion in cell biology*, 16(4), 415-421.

Franceschi, C., Garagnani, P., Morsiani, C., Conte, M., Santoro, A., Grignolio, A., ... & Salvioli, S. (2018). The continuum of aging and age-related diseases: common mechanisms but different rates. *Frontiers in Medicine*, 5, 61.

- Frank, D., Kuhn, C., Brors, B., Hanselmann, C., Lüdde, M., Katus, H. A., & Frey, N. (2008). Gene expression pattern in biomechanically stretched cardiomyocytes: evidence for a stretch-specific gene program. *Hypertension*, 51(2), 309-318.
- Friedman, R. C., Farh, K. K. H., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research*, 19(1), 92-105.
- Fröhlich, D., Kuo, W. P., Frühbeis, C., Sun, J. J., Zehendner, C. M., Luhmann, H. J., ... & Krämer-Albers, E. M. (2014). Multifaceted effects of oligodendroglial exosomes on neurons: impact on neuronal firing rate, signal transduction and gene regulation. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 369(1652), 20130510
- Fulzele, S., Mendhe, B., Khayrullin, A., Johnson, M., Kaiser, H., Liu, Y., ... & Hamrick, M. W. (2019). Muscle-derived miR-34a increases with age in circulating extracellular vesicles and induces senescence of bone marrow stem cells. *Aging (Albany NY)*, 11(6), 1791.
- Gambim, M. H., Do Carmo, A. D. O., Marti, L., Veríssimo-Filho, S., Lopes, L. R., & Janiszewski, M. (2007). Platelet-derived exosomes induce endothelial cell apoptosis through peroxynitrite generation: experimental evidence for a novel mechanism of septic vascular dysfunction. *Critical Care*, 11(5), R107.
- Gardiner, C., Ferreira, Y. J., Dragovic, R. A., Redman, C. W., & Sargent, I. L. (2013). Extracellular vesicle sizing and enumeration by nanoparticle tracking analysis. *Journal of extracellular vesicles*, 2(1), 19671. <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.19671>
- Gasser, O., & Schifferli, J. A. (2005). Microparticles released by human neutrophils adhere to erythrocytes in the presence of complement. *Experimental cell research*, 307(2), 381-387.
- GBD - Global Burden of Disease Collaborative Network. (2018). Global Burden of Disease Study 2017 (GBD 2017) Disability-Adjusted Life Years and Healthy Life Expectancy 1990-2017.
- Giuliani, C., Sazzini, M., Pirazzini, C., Bacalini, M. G., Marasco, E., Ruscone, G. A. G., ... & Crocco, P. (2018). Impact of demography and population dynamics on the genetic architecture of human longevity. *Aging (Albany NY)*, 10(8), 1947.
- Gomes, C., Keller, S., Altevogt, P., & Costa, J. (2007). Evidence for secretion of Cu, Zn superoxide dismutase via exosomes from a cell model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience letters*, 428(1), 43-46
- Goren, Y., Kushnir, M., Zafir, B., Tabak, S., Lewis, B. S., & Amir, O. (2012). Serum levels of microRNAs in patients with heart failure. *European journal of heart failure*, 14(2), 147-154.
- Gradinaru, D., Borsa, C., Ionescu, C., & Prada, G. I. (2015). Oxidized LDL and NO synthesis—Biomarkers of endothelial dysfunction and ageing. *Mechanisms of ageing and development*, 151, 101-113.

- Gupta, A., & Pulliam, L. (2014). Exosomes as mediators of neuroinflammation. *Journal of neuroinflammation*, 11(1), 68.
- Halliwell, B. A. R. R. Y., Gutteridge, J. M., & Cross, C. E. (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 119(6), 598-620.
- Halliwell, B., & Cross, C. E. (1994). Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environmental health perspectives*, 102(Suppl 10), 5.
- Haney, M. J., Klyachko, N. L., Zhao, Y., Gupta, R., Plotnikova, E. G., He, Z., ... & Batrakova, E. V. (2015). Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy. *Journal of Controlled Release*, 207, 18-30.
- Harman, D. (1955). *Aging—A Theory Based on Free Radical and Information Theory*. UCRL publication, 3078.
- Hartmann, S., Ridley, A. J., & Lutz, S. (2015). The function of Rho-associated kinases ROCK1 and ROCK2 in the pathogenesis of cardiovascular disease. *Frontiers in pharmacology*, 6, 276.
- Haudek, S. B., Gupta, D., Dewald, O., Schwartz, R. J., Wei, L., Trial, J., & Entman, M. L. (2009). Rho kinase-1 mediates cardiac fibrosis by regulating fibroblast precursor cell differentiation. *Cardiovascular research*, 83(3), 511-518.
- Heineke, J., & Molkenin, J. D. (2006). Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7(8), 589-600.
- Helwa, I., Cai, J., Drewry, M. D., Zimmerman, A., Dinkins, M. B., Khaled, M. L., ... & Hamrick, M. W. (2017). A comparative study of serum exosome isolation using differential ultracentrifugation and three commercial reagents. *PloS one*, 12(1), e0170628. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170628>.
- Hervera, A., De Virgiliis, F., Palmisano, I., Zhou, L., Tantardini, E., Kong, G., ... & Kapustin, A. N. (2018). Reactive oxygen species regulate axonal regeneration through the release of exosomal NADPH oxidase 2 complexes into injured axons. *Nature cell biology*, 20(3), 307. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0039-x>.
- Hoch, B., Meyer, R., Hetzer, R., Krause, E. G., & Karczewski, P. (1999). Identification and expression of δ -isoforms of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human myocardium. *Circulation research*, 84(6), 713-721.
- Hong, Y., Eleftheriou, D., Hussain, A. A., Price-Kuehne, F. E., Savage, C. O., Jayne, D., ... & Brogan, P. A. (2012). Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies stimulate release of neutrophil microparticles. *Journal of the American Society of Nephrology*, 23(1), 49-62.

Howitt, J., Hill, A.F., 2016. Exosomes in the pathology of neurodegenerative diseases. *J. Biol. Chem.* 291, 26589–26597.

Hsu, C., Morohashi, Y., Yoshimura, S., Manrique-Hoyos, N., Jung, S., Lauterbach, M.A., Bakhti, M., Grønborg, M., Möbius, W., Rhee, J., Barr, F.A., Simons, M., 2010. Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase activating proteins TBC1D10A-C. *J. Cell Biol.* 189, 223–232.

Huang, C. X., Lv, B., & Wang, Y. (2015). Protein phosphatase 2A mediates oxidative stress induced apoptosis in osteoblasts. *Mediators of inflammation*, 2015.

Hung, W. W., Ross, J. S., Boockvar, K. S., & Siu, A. L. (2011). Recent trends in chronic disease, impairment and disability among older adults in the United States. *BMC geriatrics*, 11(1), 47.

IBGE - Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística. Projeções e estimativas da população do Brasil e das Unidades da Federação. Brasília, 2020. Disponível em <https://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/>. Acesso em: 28 mar. 2020.

Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G., & Minick, C. R. (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *The Journal of clinical investigation*, 52(11), 2745-2756.

Janas, A.M., Sapoń, K., Janas, T., Stowell, M.H., Janas, T., 2016. Exosomes and other extracellular vesicles in neural cells and neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1858, 1139–1151.

Janiszewski, M., do Carmo, A. O., Pedro, M. A., Silva, E., Knobel, E., & Laurindo, F. R. (2004). Platelet-derived exosomes of septic individuals possess proapoptotic NAD (P) H oxidase activity: A novel vascular redox pathway. *Critical care medicine*, 32(3), 818-825.

Jansen, F., Yang, X., Franklin, B. S., Hoelscher, M., Schmitz, T., Bedorf, J., ... & Werner, N. (2013). High glucose condition increases NADPH oxidase activity in endothelial microparticles that promote vascular inflammation. *Cardiovascular research*, 98(1), 94-106. <https://10.1093/cvr/cvt013>.

Johnstone, R. M., Mathew, A., Mason, A. B., & Teng, K. (1991). Exosome formation during maturation of mammalian and avian reticulocytes: evidence that exosome release is a major route for externalization of obsolete membrane proteins. *Journal of cellular physiology*, 147(1), 27-36.

Kannel, W. B., Dannenberg, A. L., & Levy, D. (1987). Population implications of electrocardiographic left ventricular hypertrophy. *The American journal of cardiology*, 60(17), 85-93.

Kanninen, K.M., Bister, N., Koistinaho, J., Malm, T., 2016. Exosomes as new diagnostic

- Kennedy, B. K., Berger, S. L., Brunet, A., Campisi, J., Cuervo, A. M., Epel, E. S., ... & Rando, T. A. (2014). Aging: a common driver of chronic diseases and a target for novel interventions. *Cell*, 159(4), 709.
- Khalilimeybodi, A., Daneshmehr, A., & Sharif-Kashani, B. (2018). Investigating β -adrenergic-induced cardiac hypertrophy through computational approach: classical and non-classical pathways. *The Journal of Physiological Sciences*, 68(4), 503-520.
- Kirchhefer, U., Schmitz, W., Scholz, H., & Neumann, J. (1999). Activity of cAMP-dependent protein kinase and Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase in failing and nonfailing human hearts. *Cardiovascular research*, 42(1), 254-261.
- Klotz, L. O., Briviba, K., & Sies, H. (2000). Signaling by singlet oxygen in biological systems (pp. 3-20). Academic: San Diego, CA.
- Kovacic, J. C., Moreno, P., Nabel, E. G., Hachinski, V., & Fuster, V. (2011). Cellular senescence, vascular disease, and aging: part 2 of a 2-part review: clinical vascular disease in the elderly. *Circulation*, 123(17), 1900-1910.
- Kuller, L. H., Lopez, O. L., Mackey, R. H., Rosano, C., Edmundowicz, D., Becker, J. T., & Newman, A. B. (2016). Subclinical cardiovascular disease and death, dementia, and coronary heart disease in patients 80+ years. *Journal of the American College of Cardiology*, 67(9), 1013-1022.
- Kwon, S. H., Pimentel, D. R., Remondino, A., Sawyer, D. B., & Colucci, W. S. (2003). H_2O_2 regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 35(6), 615-621.
- Lakatta, E. G. (2015). So! What's aging? Is cardiovascular aging a disease?. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 83, 1-13.
- Lakatta, E. G., & Levy, D. (2003). Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease. *Circulation*, 107(1), 139-146.
- Lander, H. M. (1997). An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *The FASEB journal*, 11(2), 118-124.
- Larson, M. C., Hillery, C. A., & Hogg, N. (2014). Circulating membrane-derived microvesicles in redox biology. *Free Radical Biology and Medicine*, 73, 214-228.
- Laskowski, A., Woodman, O. L., Cao, A. H., Drummond, G. R., Marshall, T., Kaye, D. M., & Ritchie, R. H. (2006). Antioxidant actions contribute to the antihypertrophic effects of atrial natriuretic peptide in neonatal rat cardiomyocytes. *Cardiovascular research*, 72(1), 112-123.
- Lassègue, Bernard; San Martín, Alejandra; Griendling, Kathy K. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circulation research*, v. 110, n. 10, p. 1364-1390, 2012.

- Lee, B. R., Kim, J. H., Choi, E. S., Cho, J. H., & Kim, E. (2018). Effect of Young exosomes injected in aged mice. *International journal of nanomedicine*, 13, 5335.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., ... & Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956), 415-419.
- Lehmann, B. D., Paine, M. S., Brooks, A. M., McCubrey, J. A., Renegar, R. H., Wang, R., & Terrian, D. M. (2008). Senescence-associated exosome release from human prostate cancer cells. *Cancer research*, 68(19), 7864-7871.
- Lin, C. C., Chang, Y. M., Pan, C. T., Chen, C. C., Ling, L., Tsao, K. C., ... & Li, W. H. (2014). Functional evolution of cardiac microRNAs in heart development and functions. *Molecular biology and evolution*, 31(10), 2722-2734.
- Liu, J. C., Chan, P., Chen, J. J., Lee, H. M., Lee, W. S., Shih, N. L., ... & Cheng, T. H. (2004). The inhibitory effect of trilinolein on norepinephrine-induced β -myosin heavy chain promoter activity, reactive oxygen species generation, and extracellular signal-regulated kinase phosphorylation in neonatal rat cardiomyocytes. *Journal of biomedical science*, 11(1), 11-18.
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194-1217.
- Lu, N., Xie, S., Li, J., Tian, R., & Peng, Y. Y. (2015). Myeloperoxidase-mediated oxidation targets serum apolipoprotein AI in diabetic patients and represents a potential mechanism leading to impaired anti-apoptotic activity of high density lipoprotein. *Clinica Chimica Acta*, 441, 163-170.
- Macphee, C. H., Moores, K. E., Boyd, H. F., Dhanak, D., Ife, R. J., Leach, C. A., ... & Tew, D. G. (1999). Lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet-activating factor acetylhydrolase, generates two bioactive products during the oxidation of low-density lipoprotein: use of a novel inhibitor. *Biochemical Journal*, 338(2), 479-487.
- Mallat, Z., Hugel, B., Ohan, J., Leseche, G., Freyssinet, J. M., & Tedgui, A. (1999). Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation*, 99(3), 348-353.
- Martinelli, N. C., Cohen, C. R., Santos, K. G., Castro, M. A., Biolo, A., Frick, L., ... & Clausell, N. (2014). An analysis of the global expression of microRNAs in an experimental model of physiological left ventricular hypertrophy. *PloS one*, 9(4).
- Martins, T. S., Catita, J., Rosa, I. M., e Silva, O. A. D. C., & Henriques, A. G. (2018). Exosome isolation from distinct biofluids using precipitation and column-based approaches. *PloS one*, 13(6), e0198820
- Martín-Ventura, Jose & Rodrigues-Diez, Raquel & Martínez López, Diego & Salaices, Mercedes & Blanco-Colio, Luis & Briones, Ana. (2017). Oxidative Stress in Human Atherothrombosis: Sources, Markers and Therapeutic Targets. *International Journal of Molecular Sciences*. 18. 2315. 10.3390/ijms18112315.

- Masumoto, A., Hirooka, Y., Shimokawa, H., Hironaga, K., Setoguchi, S., & Takeshita, A. (2001). Possible involvement of Rho-kinase in the pathogenesis of hypertension in humans. *Hypertension*, 38(6), 1307-1310.
- Maulik, S. K., & Kumar, S. (2012). Oxidative stress and cardiac hypertrophy: a review. *Toxicology mechanisms and methods*, 22(5), 359-366.
- McCubrey, J. A., LaHair, M. M., & Franklin, R. A. (2006). Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antioxidants & redox signaling*, 8(9-10), 1775-1789.
- Mendelsohn, A. R., & Larrick, J. W. (2013). Sleep facilitates clearance of metabolites from the brain: glymphatic function in aging and neurodegenerative diseases. *Rejuvenation research*, 16(6), 518-523. <https://doi.org/10.1089/rej.2013.1530>.
- Miyano, K., & Sumimoto, H. (2012). Assessment of the role for Rho family GTPases in NADPH oxidase activation. In *Rho GTPases* (pp. 195-212). Springer, New York, NY.
- Moe, G. W., & Marín-García, J. (2016). Role of cell death in the progression of heart failure. *Heart failure reviews*, 21(2), 157-167.
- Molkentin, J. D. (2004). Calcineurin–NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs. *Cardiovascular research*, 63(3), 467-475.
- Molkentin, J. D. (2013). Parsing good versus bad signaling pathways in the heart: role of calcineurin–nuclear factor of activated T-cells. *Circulation research*, 113(1), 16-19.
- Morisco, C., Zebrowski, D. C., Vatner, D. E., Vatner, S. F., & Sadoshima, J. (2001). β -Adrenergic cardiac hypertrophy is mediated primarily by the β 1-subtype in the rat heart. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 33(3), 561-573.
- Mostefai, H. A., Agouni, A., Carusio, N., Mastronardi, M. L., Heymes, C., Henrion, D., ... & Martinez, M. C. (2008). Phosphatidylinositol 3-kinase and xanthine oxidase regulate nitric oxide and reactive oxygen species productions by apoptotic lymphocyte microparticles in endothelial cells. *The Journal of Immunology*, 180(7), 5028-5035. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.7.5028>
- Mozaffarian, D., Benjamin, E. J., Go, A. S., Arnett, D. K., Blaha, M. J., Cushman, M., ... & Huffman, M. D. (2015). Forecasting the future of cardiovascular disease in the United States: a policy statement from the American Heart Association. *Circulation*, 131(4), e29-e322.
- Murdoch, C. E., Zhang, M., Cave, A. C., & Shah, A. M. (2006). NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure. *Cardiovascular research*, 71(2), 208-215.
- Nakamura, M., & Sadoshima, J. (2018). Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nature Reviews Cardiology*, 15(7), 387-407.

Newman, A. B., Naydeck, B. L., Ives, D. G., Boudreau, R. M., Sutton-Tyrrell, K., O'Leary, D. H., & Kuller, L. H. (2008). Coronary artery calcium, carotid artery wall thickness, and cardiovascular disease outcomes in adults 70 to 99 years old. *The American journal of cardiology*, 101(2), 186-192.

Niccoli, T., & Partridge, L. (2012). Ageing as a risk factor for disease. *Current biology*, 22(17), R741-R752.

Nicholls, S. J., & Hazen, S. L. (2009). Myeloperoxidase, modified lipoproteins, and atherogenesis. *Journal of lipid research*, 50(Supplement), S346-S351.

Nicita-Mauro, V., Balbo, C. L., Mento, A., Nicita-Mauro, C., Maltese, G., & Basile, G. (2008). Smoking, aging and the centenarians. *Experimental gerontology*, 43(2), 95-101.

Nussbaum, C., Klinke, A., Adam, M., Baldus, S., & Sperandio, M. (2013). Myeloperoxidase: a leukocyte-derived protagonist of inflammation and cardiovascular disease. *Antioxidants & redox signaling*, 18(6), 692-713.

ONU - Organização das Nações Unidas. Ageing. Nova Iorque, 2020. Disponível em: <https://www.un.org/en/sections/issues-depth/ageing/>. Acesso em: 27 mar. 2020.

Paciaroni, E., & Fraticelli, A. (1995). Left Ventricular Hypertrophy. *Drugs & aging*, 6(4), 301-311.

Packer, L., Tritschler, H. J., & Wessel, K. (1997). Neuroprotection by the metabolic antioxidant α -lipoic acid. *Free radical biology and medicine*, 22(1-2), 359-378.

Pan, B. T., & Johnstone, R. M. (1983). Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell*, 33(3), 967-978.

Paneni, F., Cañestro, C. D., Libby, P., Lüscher, T. F., & Camici, G. G. (2017). The aging cardiovascular system: understanding it at the cellular and clinical levels. *Journal of the American College of Cardiology*, 69(15), 1952-1967.

Papaconstantinou, J. (2019). The role of signaling pathways of inflammation and oxidative stress in development of senescence and aging phenotypes in cardiovascular disease. *Cells*, 8(11), 1383.

Pitanga, T. N., de Aragão França, L., Rocha, V. C. J., Meirelles, T., Borges, V. M., Gonçalves, M. S., ... & dos-Santos, W. L. C. (2014). Neutrophil-derived microparticles induce myeloperoxidase-mediated damage of vascular endothelial cells. *BMC cell biology*, 15(1), 1-10.

Prattichizzo, F., Giuliani, A., Sabbatinelli, J., Mensà, E., De Nigris, V., La Sala, L., ... & Ceriello, A. (2019). Extracellular vesicles circulating in young organisms promote healthy longevity. *Journal of extracellular vesicles*, 8(1), 1656044.

Quek, C., & Hill, A. F. (2017). The role of extracellular vesicles in neurodegenerative diseases. *Biochemical and biophysical research communications*, 483(4), 1178-1186.

Rajendran, L., Honsho, M., Zahn, T. R., Keller, P., Geiger, K. D., Verkade, P., & Simons, K. (2006). Alzheimer's disease β -amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(30), 11172-11177.

Rane, S., He, M., Sayed, D., Yan, L., Vatner, D., Abdellatif, M., 2010. An antagonism between the AKT and beta-adrenergic signaling pathways mediated through their reciprocal effects on miR-199a-5p. *Cell. Signal.* 22, 1054–1062.

Reis, J. S., Veloso, C. A., Mattos, R. T., Purish, S., & Nogueira-Machado, J. A. (2008). Oxidative stress: a review on metabolic signaling in type 1 diabetes. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 52(7), 1096-1105

Samak, M., Fatullayev, J., Sabashnikov, A., Zeriuoh, M., Schmack, B., Farag, M., ... & Weymann, A. (2016). Cardiac hypertrophy: an introduction to molecular and cellular basis. *Medical science monitor basic research*, 22, 75.

Sano, M., Minamino, T., Toko, H., Miyauchi, H., Orimo, M., Qin, Y., ... & Shimizu, I. (2007). p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. *Nature*, 446(7134), 444-448.

Schwarzer, M., Osterholt, M., Lunkenbein, A., Schrepper, A., Amorim, P., & Doenst, T. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species production and respiratory complex activity in rats with pressure overload-induced heart failure. *The Journal of physiology*, 592(17), 3767-3782.

Seplag - Secretaria de Planejamento, Orçamento e Gestão. População de idosos irá duplicar em quatro décadas no Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2019. Disponível em <https://planejamento.rs.gov.br/populacao-de-idosos-ira-duplicar-em-quatro-decadas-no-rio-grande-do-sul>. Acesso em: 28 mar. 2020.

Serrano-Pertierra, E., Oliveira-Rodríguez, M., Rivas, M., Oliva, P., Villafani, J., Navarro, A., ... & Cernuda-Morollón, E. (2019). Characterization of Plasma-Derived Extracellular Vesicles Isolated by Different Methods: A Comparison Study. *Bioengineering*, 6(1), 8.

Shimizu, I., & Minamino, T. (2016). Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 97, 245-262.

Shimizu, I., Minamino, T., Toko, H., Okada, S., Ikeda, H., Yasuda, N., ... & Koh, G. Y. (2010). Excessive cardiac insulin signaling exacerbates systolic dysfunction induced by pressure overload in rodents. *The Journal of clinical investigation*, 120(5), 1506-1514.

Sies, H. (1985). Hydroperoxides and thiol oxidants in the study of oxidative stress in intact cells and organs. *Oxidative stress*, 73-90

Silva, A. P. M. (2018). Expressão do microRNA 184 em idosos com depressão maior: uma perspectiva translacional.

Siqueira, I. R., Fochesatto, C., de Andrade, A., Santos, M., Hagen, M., Bello-Klein, A., & Netto, C. A. (2005). Total antioxidant capacity is impaired in different structures from aged rat brain. *International journal of developmental neuroscience*, 23(8), 663-671.

Siwik, D. A., & Colucci, W. S. (2004). Regulation of matrix metalloproteinases by cytokines and reactive oxygen/nitrogen species in the myocardium. *Heart failure reviews*, 9(1), 43-51.

Slater, T. W., Finkielstein, A., Mascarenhas, L. A., Mehl, L. C., Butin-Israeli, V., & Sumagin, R. (2017). Neutrophil microparticles deliver active myeloperoxidase to injured mucosa to inhibit epithelial wound healing. *The Journal of immunology*, 198(7), 2886-2897.

Small, E. M., Frost, R. J., & Olson, E. N. (2010). MicroRNAs add a new dimension to cardiovascular disease. *Circulation*, 121(8), 1022-1032.

Smith, C. J., Santhanam, L., & Alexander, L. M. (2013). Rho-Kinase activity and cutaneous vasoconstriction is upregulated in essential hypertensive humans. *Microvascular research*, 87, 58-64.

Smith, M. A., & Schnellmann, R. G. (2012). Calpains, mitochondria, and apoptosis. *Cardiovascular research*, 96(1), 32-37.

Sredni, S. T., Gadd, S., Jafari, N., & Huang, C. C. (2011). A parallel study of mRNA and microRNA profiling of peripheral blood in young adult women. *Frontiers in genetics*, 2, 49.

Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10(8), 513-525.

Stiles, J. M., Kurisetty, V., Mitchell, D. C., & Bryan, B. A. (2013). Rho kinase proteins regulate global miRNA expression in endothelial cells. *Cancer Genomics-Proteomics*, 10(6), 251-263.

Strand, A. H., Gudmundsdottir, H., Os, I., Smith, G., Westheim, A. S., Bjørnerheim, R., & Kjeldsen, S. E. (2006). Arterial plasma noradrenaline predicts left ventricular mass independently of blood pressure and body build in men who develop hypertension over 20 years. *Journal of hypertension*, 24(5), 905-913.

Sun, D., Li, C., Liu, J., Wang, Z., Liu, Y., Luo, C., ... & Wen, S. (2019). Expression Profile of microRNAs in Hypertrophic Cardiomyopathy and Effects of microRNA-20 in Inducing Cardiomyocyte Hypertrophy Through Regulating Gene MFN2. *DNA and cell biology*, 38(8), 796-807.

Szatanek, R., Baj-Krzyworzeka, M., Zimoch, J., Lekka, M., Siedlar, M., & Baran, J. (2017). The methods of choice for extracellular vesicles (EVs) characterization. *International journal of molecular sciences*, 18(6), 1153.

- Takasugi, M. (2018). Emerging roles of extracellular vesicles in cellular senescence and aging. *Aging cell*, 17(2), e12734.
- Takimoto, E., & Kass, D. A. (2007). Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. *Hypertension*, 49(2), 241-248.
- Tanaka, K., Honda, M., & Takabatake, T. (2001). Redox regulation of MAPK pathways and cardiac hypertrophy in adult rat cardiac myocyte. *Journal of the American College of Cardiology*, 37(2), 676-685.
- Tang, C.M., Liu, F.Z., Zhu, J.N., Fu, Y.H., Lin, Q.X., Deng, C.Y., Hu, Z.Q., Yang, H., Zheng, X.L., Cheng, J.D., Wu, S.L., Shan, Z.X., 2016. Myocyte-specific enhancer factor 2C: a novel target gene of miR-214-3p in suppressing angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Sci. Rep.* 6, 36146.
- Terman, A., & Brunk, U. T. (2004). Aging as a catabolic malfunction. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(12), 2365-2375.
- Théry, C., Zitvogel, L., & Amigorena, S. (2002). Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature reviews immunology*, 2(8), 569-579.
- Thom, S. R., Milovanova, T. N., Bogush, M., Yang, M., Bhopale, V. M., Pollock, N. W., ... & Dujic, Z. (2013). Bubbles, microparticles, and neutrophil activation: changes with exercise level and breathing gas during open-water SCUBA diving. *Journal of Applied Physiology*, 114(10), 1396-1405.
- Touyz, R. M., & Schiffrin, E. L. (2001). Increased generation of superoxide by angiotensin II in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients: role of phospholipase D-dependent NAD (P) H oxidase-sensitive pathways. *Journal of hypertension*, 19(7), 1245-1254.
- Trams, E. G., Lauter, C. J., Salem, J. N., & Heine, U. (1981). Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 645(1), 63-70.
- Tytell, M., Lasek, R. J., & Gainer, H. (2016). Axonal maintenance, glia, exosomes, and heat shock proteins. *F1000Research*, 5.
- Urbanelli, L., Buratta, S., Sagini, K., Tancini, B., & Emiliani, C. (2016). Extracellular vesicles as new players in cellular senescence. *International journal of molecular sciences*, 17(9), 1408.
- USP – Universidade de São Paulo. Em 2030, Brasil terá a quinta população mais idosa do mundo. São Paulo, 2018. Disponível em <https://jornal.usp.br/atualidades/em-2030-brasil-tera-a-quinta-populacao-mais-idosa-do-mundo/>. Acesso em: 28 mar. 2020.
- Uttara, B., Singh, A. V., Zamboni, P., & Mahajan, R. T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current neuropharmacology*, 7(1), 65-74.

- Vickers, K. C., Palmisano, B. T., Shoucri, B. M., Shamburek, R. D., & Remaley, A. T. (2015). Corrigendum: MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature cell biology*, 17(1), 104-104.
- Wang, J., Zhang, J., Ding, X., Wang, Y., Li, Z., Zhao, W., ... & Ge, J. (2018). Differential microRNA expression profiles and bioinformatics analysis between young and aging spontaneously hypertensive rats. *International journal of molecular medicine*, 41(3), 1584-1594.
- Wenzel, S., Taimor, G., Piper, H. M., & SCHLÜTER, K. D. (2001). Redox-sensitive intermediates mediate angiotensin II-induced p38 MAP kinase activation, AP-1 binding activity, and TGF- β expression in adult ventricular cardiomyocytes. *The FASEB Journal*, 15(12), 2291-2293.
- Wilkins BJ, Molkentin JD. Calcineurin and cardiac hypertrophy: where have we been? Where are we going? *J Physiol*. 2002;541:1–8
- Witwer, K. W., &Théry, C. (2019). Extracellular vesicles or exosomes? On primacy, precision, and popularity influencing a choice of nomenclature.
- World Population Prospects – Organização das Nações Unidas. World population projected to reach 9.8 billion in 2050, and 11.2 billion in 2100. Nova Iorque, 2017. Disponível em <https://www.un.org/development/desa/en/news/population/world-population-prospects-2017.html>. Acesso em: 28 mar. 2020.
- Xiao, T., Zhang, W., Jiao, B., Pan, C. Z., Liu, X., & Shen, L. (2017). The role of exosomes in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Translational neurodegeneration*, 6(1), 3.
- Xue, J., Zhou, D., Poulsen, O., Hartley, I., Imamura, T., Xie, E. X., & Haddad, G. G. (2018). Exploring miRNA-mRNA regulatory network in cardiac pathology in Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 transgenic mice. *Physiological genomics*, 50(10), 846-861.
- Yamazaki, T., Kurihara, H., Kurihara, Y., Komuro, I., & Yazaki, Y. (1996). Endothelin-1 regulates normal cardiovascular development and cardiac cellular hypertrophy. *Journal of cardiac failure*, 2, S7-S12.
- Yang, Y., Ago, T., Zhai, P., Abdellatif, M., & Sadoshima, J. (2011). Thioredoxin 1 negatively regulates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy through upregulation of miR-98/let-7. *Circulation research*, 108(3), 305-313.
- Yoshida, M., Satoh, A., Lin, J. B., Mills, K. F., Sasaki, Y., Rensing, N., ... & Imai, S. I. (2019). Extracellular Vesicle-Contained eNAMPT Delays Aging and Extends Lifespan in Mice. *Cell metabolism*.
- Zhang, M., Perino, A., Ghigo, A., Hirsch, E., & Shah, A. M. (2013). NADPH oxidases in heart failure: poachers or gamekeepers?. *Antioxidants & redox signaling*, 18(9), 1024-1041.

- Zheng, M., & Storz, G. (2000). Redox sensing by prokaryotic transcription factors. *Biochemical pharmacology*, 59(1), 1-6.
- Zhou, X., Sun, F., Luo, S., Zhao, W., Yang, T., Zhang, G., ... & Zhuang, Y. (2017). Let-7a is an antihypertrophic regulator in the heart via targeting calmodulin. *International journal of biological sciences*, 13(1), 22.
- Zima, A. V., & Blatter, L. A. (2006). Redox regulation of cardiac calcium channels and transporters. *Cardiovascular research*, 71(2), 310-321.
- Zorov, D. B., Juhaszova, M., & Sollott, S. J. (2014). Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiological reviews*, 94(3), 909-950.
- Zou, Y., Yoon, S., Jung, K. J., Kim, C. H., Son, T. G., Kim, M. S., ... & Chung, H. Y. (2006). Upregulation of aortic adhesion molecules during aging. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 61(3), 232-244.