



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). As análises de *microarray* detectaram 48 miRNAs diferentemente expressos entre animais envelhecidos e adultos jovens ($p < 0,05$; *fold change* de $| 1,1 |$). Após a aplicação de um filtro conservador, 25 miRNAs maduros foram mapeados. As análises *in silico* mostraram que a via canônica da hipertrofia cardíaca foi classificada como a principal via regulada positivamente pelos miRNAs diferentemente expressos em animais idosos quando comparados aos adultos jovens. Além disso, outras vias canônicas relevantes, relacionadas à idade,

como a endotelina-1 e a ativação intrínseca da protrombina são alvos destes miRNAs. As vias canônicas da ação antioxidante da vitamina C e da produção de espécies reativas em macrófagos também foram identificadas como alvo dos miRNAs no processo de envelhecimento. Ainda, let-7a-5-p foi o principal regulador das vias canônicas e moléculas alvo. Além disso, as VEs circulantes totais obtidas de animais envelhecidos apresentaram níveis significativamente elevados de NADPH oxidase e atividade de MPO; a atividade da catalase foi significativamente reduzida nas VEs circulantes totais dos animais idosos. Os dados aqui apresentados demonstram que o conteúdo de VEs circulantes totais, especificamente NADPH oxidase, MPO e os miRNAs, foram alterados pelo processo de envelhecimento. Nossos resultados indicam que o perfil do miRNA pode ter um papel relevante no envelhecimento cardiovascular e conseqüentemente 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. Microarray analyses detected 48 differentially expressed miRNAs between aged and young-adult animals ($p < 0.05$; fold change of $|1.1|$). After a conservative target filter was applied, the differentially expressed miRNAs mapped to 25 mature miRNAs based on currently available target annotation. Bioinformatic analyses showed that cardiac hypertrophy signaling is ranked as the top canonical pathway upregulated by the differentially expressed microRNAs in aged animals when compared to young adult ones. In addition, other relevant age-related canonical pathways, such as endothelin-1 and intrinsic prothrombin activation have predicted targets. Moreover, antioxidant

action of vitamin C and production reactive species in macrophages are ranked as significantly canonical pathway impacted miRNAs in aging process. let-7a-5-p was the top upstream regulator impacting main predicted canonical pathway targets. In addition, circulating total EVs obtained from aged rats had significantly higher NADPH oxidase levels and MPO activity; catalase activity was significantly reduced in EVs obtained from aged animals. The results presented here show that circulating total EVs cargo, specifically NADPH oxidase and MPO activities and miRNAs targeting different canonical pathways were altered by aging process. 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: Glutathione peroxidase
GSH: Glutathione 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.

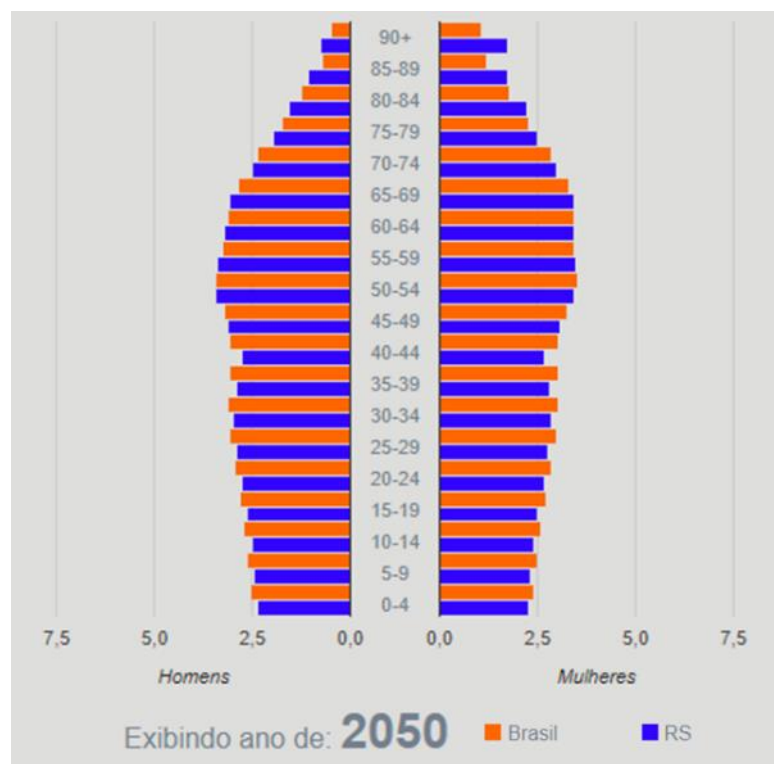


Figura 1: Pirâmide etária do Brasil e Rio Grande do Sul no ano de 2050. Fonte: IBGE, 2020

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.

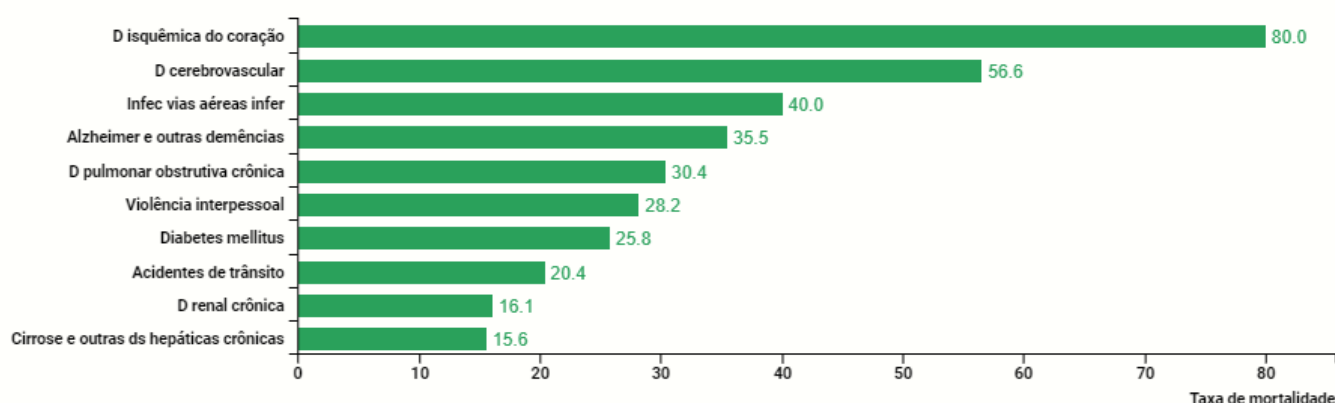


Figura 2: 10 principais causas de mortalidade no Brasil, em 2017. Fonte: GDB, 2018

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.

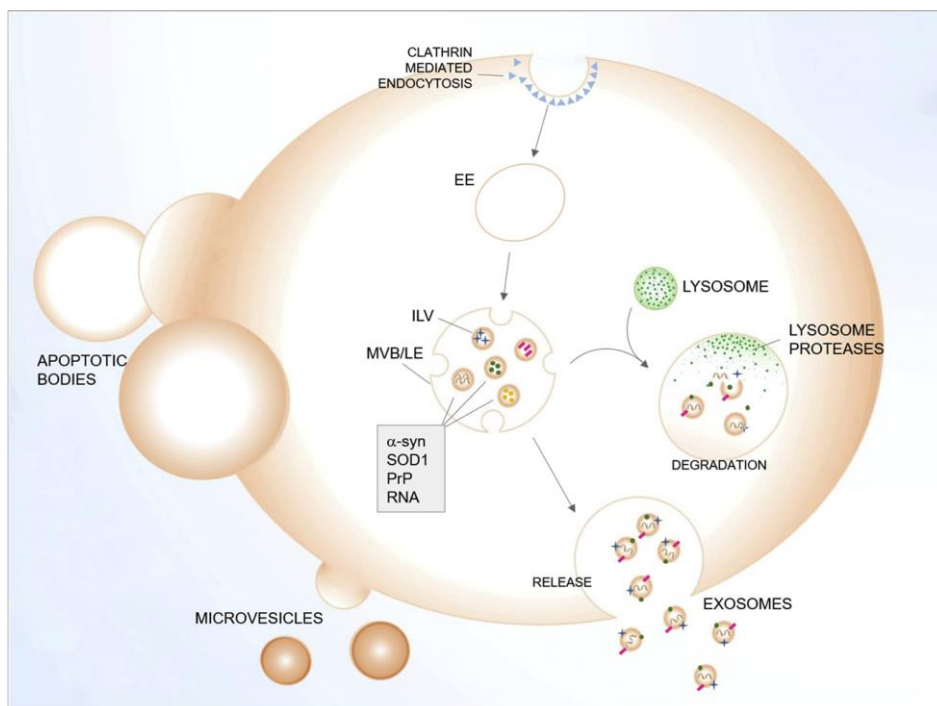


Figura 3. Biogênese das vesículas extracelulares. Fonte: Arbo et al., 2020.

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.

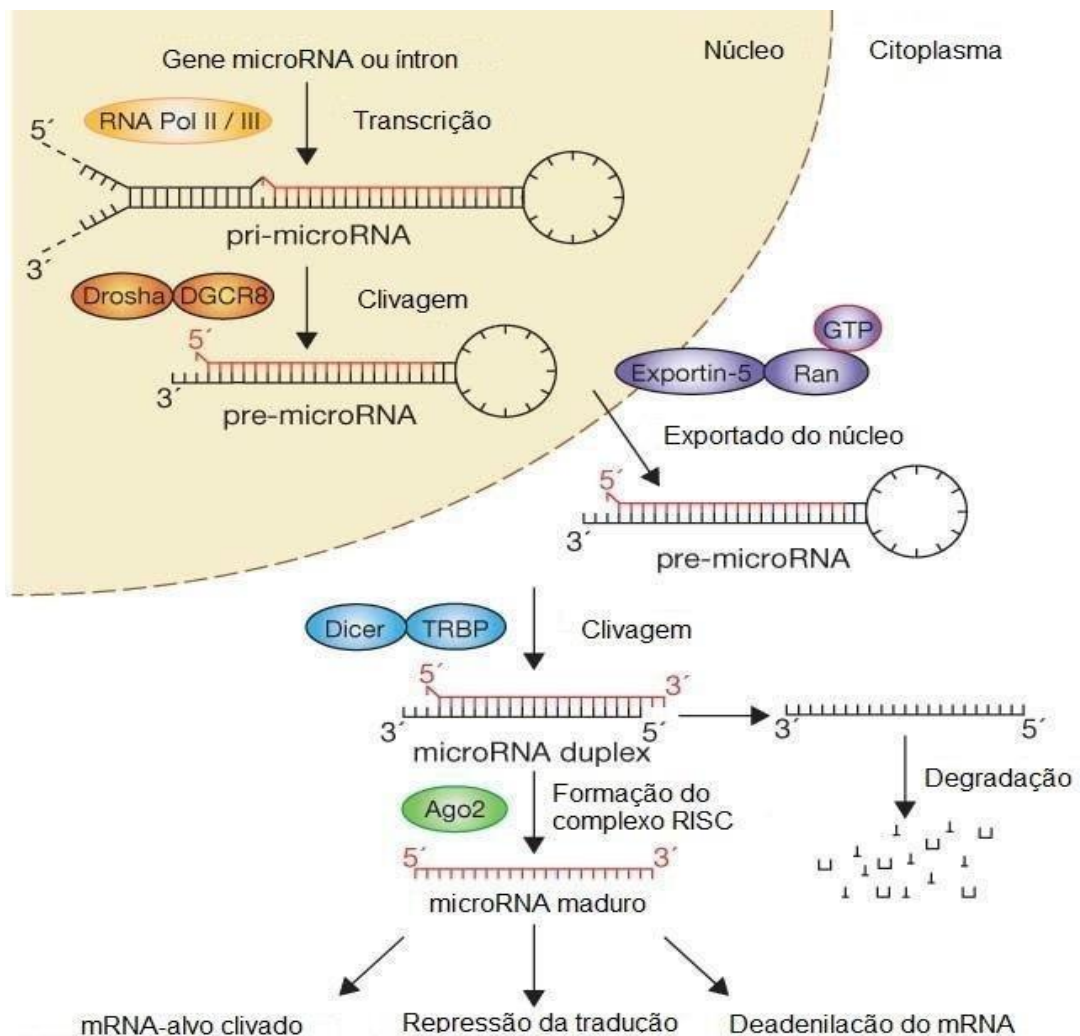


Figura 4. Biogênese dos miRNAs. Fonte: Silva, 2018.

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 alcoxil ($\text{RO}\cdot$), peroxil ($\text{ROO}\cdot$) 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.

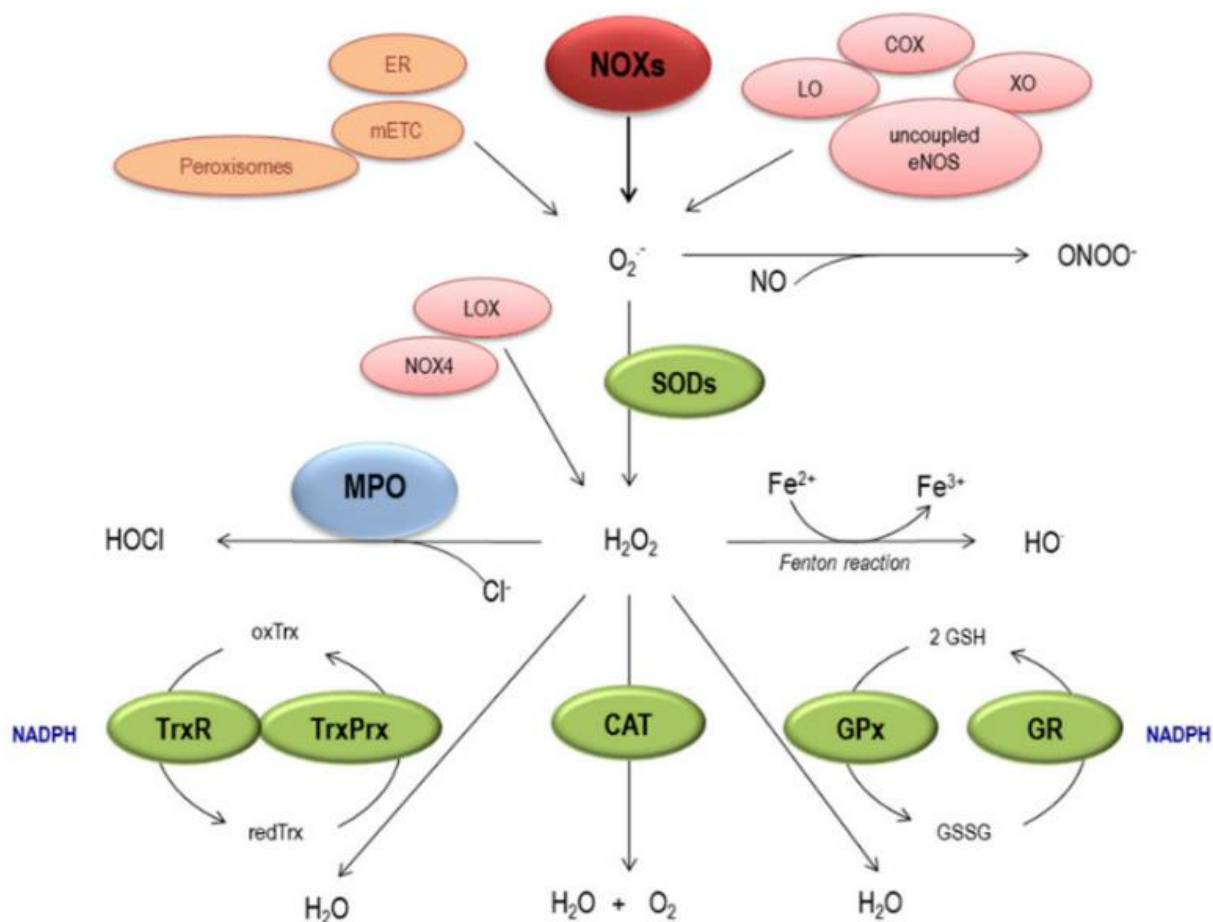


Figura 5: Geração e eliminação de espécies reativas, pelos sistemas pró-oxidativos e enzimas antioxidantes, respectivamente. $O_2^{\cdot-}$ é transformado em H_2O_2 e através de superóxido dismutases (SODs). $O_2^{\cdot-}$ pode reagir rapidamente com NO, levando à formação de $ONOO^{\cdot-}$. O H_2O_2 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.

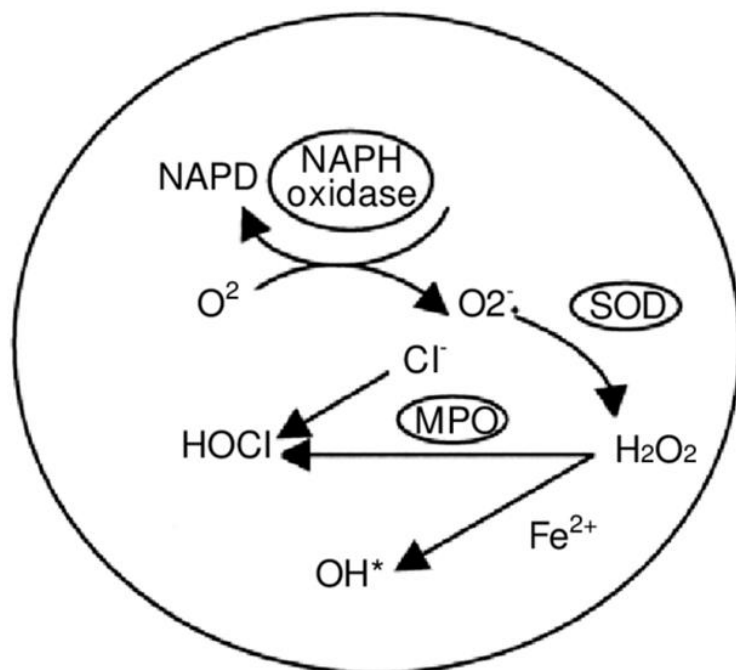


Figura 6: Formação de espécies reativas pela NADPH oxidase, MPO, em VE. Fonte:

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:

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**

Artigo 1

Perfil de miRNAs de vesículas extracelulares circulantes e sua associação com a susceptibilidade a doenças relacionadas a idade, especialmente as doenças cardiovasculares, a principal causa de morte entre os idosos.

A expressão de miRNAs das VEs circulantes é diferente entre animais envelhecidos e adultos jovens. As análises detectaram 48 miRNAs diferencialmente expressos entre animais envelhecidos e adultos jovens. Após a análise *in silico* foram identificados 25 miRNAs maduros com base em dados disponível no momento. Análises bioinformáticas mostraram que a sinalização da hipertrofia cardíaca é classificada em primeiro lugar como a via canônica regulada por esses microRNAs animais envelhecidos quando comparados aos adultos jovens. Além disso, outras vias canônicas cardiovasculares, como a endotelina-1 e a ativação intrínseca da protrombina, têm alvos previstos.

Artigo submetido para a 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***

microRNA signature in circulating extracellular vesicles is associated with susceptibility to age-related cardiovascular diseases: preliminary exploratory results from microarray data

Laura Reck Cechinel^a, Rachael A Batabyal^{b,d}, Madeleine Goldberg^b, Brennan Harmon^b, Adriane Belló-Klein^{a,c}, Alex Sander Araujo^{a,c}, Robert J Freishtat^{b,d}, Ionara Rodrigues Siqueira^{*a,e}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^bCenter for Genetic Medicine Research, Children's National Research Institute, Washington, DC, USA.

^cLaboratório de Fisiologia Cardiovascular e Espécies Reativas do Oxigênio, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

^dDivision of Emergency Medicine, Children's National Hospital, Washington, DC, USA.

^ePrograma de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

*Corresponding author: Ionara Rodrigues Siqueira, Laboratório de Neuropsicofarmacologia, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500, sala 327, 90050-170, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Tel/Fax: + 55 51 3308 3121; e-mail: ionara@ufrgs.br

29 **Abstract**

30 Aging represents a risk factor for many non-communicable diseases such as
31 cardiovascular and neurodegenerative diseases. In this context, the role of microRNAs
32 expression profile in age-related diseases was suggested. Extracellular vesicles (EV)
33 can protect microRNAs from endogenous RNAses and can function as means of
34 intercellular communication, through delivery of nucleic acid and proteins to distant cells.
35 However, the relationship between EV microRNAs and age-related diseases needs to
36 be better analyzed. We hypothesize that circulating EVs contribute to age-related non-
37 communicable diseases via their microRNA cargo. Our aim was to investigate
38 the microRNA profiles of circulating EVs from aged and young adult animals and
39 perform *in silico* prediction of their downstream signaling effects. Plasma was obtained
40 from *Wistar* rats (3 and 21 months-old) and total EVs were isolated. EV microRNA
41 isolation and microarray expression analysis was performed to determine the predicted
42 regulation of targeted mRNAs. We detected 48 differentially expressed microRNAs
43 between aged and young-adult animals ($p < 0.05$; fold change $\geq |1.1|$). After a
44 conservative filter was applied, the differentially expressed microRNAs mapped 25
45 mature microRNAs and 11,008 mRNAs targets based on currently available target
46 annotation. Bioinformatic analyses showed that cardiac hypertrophy signaling was
47 upregulated by these differentially expressed microRNAs in aged animals when
48 compared to young adult ones. Other relevant cardiovascular canonical pathways, such
49 as endothelin-1 and intrinsic prothrombin activation, were also targeted. The data of this
50 exploratory study revealed that microRNAs in circulating EVs potentially drive
51 cardiovascular aging and consequent cardiac diseases. Nevertheless, further
52 experimental studies are needed to confirm our findings.

53

54 **Keywords:** cardiac aging, microRNAs signature, extracellular vesicles, apoptosis
55 signaling, cardiac hypertrophy

56

57 **1. Introduction**

58 Aging is an important risk factor for most diseases, including cardiovascular
59 diseases, neurodegenerative diseases, and various cancers [1]. Aging shares basic
60 physiological mechanisms with chronic age-related diseases and geriatric syndromes
61 [2]. An emerging idea is that extracellular vesicles (EVs) are an important mechanism to
62 spread circulating factors related to age-associated diseases and geriatric syndromes. It
63 is via small extracellular vesicles, often known as exosomes, that microRNAs can be
64 carried between cells and organs. EVs facilitate intercellular communication by
65 protecting microRNAs from endogenous RNases and carry them through circulation to
66 distant tissues, where they are internalized by recipient cells. These microRNAs then
67 promote mRNA degradation or inhibit translation via base-pairing between
68 complementary microRNA and target mRNA sequences [3]. Consequently, a single of
69 these regulatory molecules can impact multiple steps in multiple pathways in a recipient
70 cell [4].

71 *In vitro* and *in vivo* studies have explored the effect of aging on circulating EV
72 microRNAs [5-8]. For example, Lee and colleagues [6] reported that mmu-miR-126b-5p,
73 mmu-miR-184-3p and mmu-miR-200b-5p are differentially expressed microRNAs in
74 exosomes from 12-month-old healthy mice compared to 3-month-old healthy mice. In
75 addition, the authors injected “young” exosomes into aged mice and observed that age-
76 related microRNA changes reverted after administration. Therefore, EVs and their
77 contents may play an important role in both normal aging and age-related pathologies.
78 We hypothesized that the circulating EVs microRNAs differ between aged and young-
79 adult animals, and that these microRNAs target age-related signaling pathways.

80

81 **2. Material and methods**

82 **2.1. Animals**

83 3-month-old and 21-month old Male *Wistar* rats were used. The animals were
84 provided by the Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório
85 (CREAL) and maintained under standard conditions (12-h light/dark, $22 \pm 2^\circ$) with food
86 and water *ad libitum*. The NIH “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” [9]
87 was followed in all experiments. The Local Ethics Committee (CEUA – Comissão de
88 Ética no Uso de Animais – UFRGS; nr.29818) approved all animal procedures and
89 experimental conditions. The animals were decapitated; the trunk blood was collected in
90 tubes with EDTA as an anticoagulant and processed within 30 min of collection. Blood
91 was centrifuged at $1000 \times g$ for 10 min to obtain plasma. Plasma samples were stored
92 at -80°C for further isolation of EV.

93

94 **2.2. Circulating Extracellular Vesicles Isolation**

95 The isolation was performed using commercial exosome precipitation solution
96 (ExoQuick™ System Bioscience) following the manufacturer’s instructions.

97

98 **2.3. RNA Extraction and microRNA**

99 Total RNA was extracted from total EVs using the mirVana microRNA isolation kit
100 (ThermoFisher Scientific) and amplified with the SeraMir Exosome RNA Amplification Kit
101 (System Biosciences, Mountain View, CA) according to manufacturer’s instructions.
102 RNA was labeled with Affymetrix® FlashTag™ Biotin HSR RNA Labeling Kit (Affymetrix,
103 Santa Clara, CA) according to standard procedures. Labeled RNA was hybridized
104 to Affymetrix GeneChip microRNA 4.0 arrays. The arrays were washed and stained on
105 a GeneChip Fluidics Station 450 and scanned on a GeneChip Scanner 3000
106 (Affymetrix). Resulting data were analyzed in Expression Console using RMA+DMBG
107 normalization (Affymetrix), then exported to Partek Genomics Suite (Partek, St. Louis,
108 MO) for the analyses.

109

110 **2.4. Statistical analysis**

111 Principal component analysis (PCA) and unsupervised hierarchical clustering (HC)
112 were performed with Partek Genomics Suite (version 6.6; Partek, St. Louis, MO).
113 Analysis of Variance was performed to identify microRNAs that were differentially
114 expressed in the EVs of aged and young adult rats, and microRNAs that were statistically
115 significant between the groups ($p < 0.05$) and had fold changes $\geq |1.1|$ were selected for
116 further analysis. Differentially expressed microRNAs were analyzed with Ingenuity
117 Pathway Analysis (IPA, Qiagen) in order to investigate the effects of the microRNAs on
118 gene expression regulation during the aging process. The putative targets of the
119 microRNAs were determined using the IPA microRNA Target Filter, which identifies
120 experimentally validated microRNA–mRNA interactions from TarBase, miRecords, and
121 biomedical literature, as well as predicted microRNA–mRNA interactions
122 from TargetScan. We used a conservative filter, selecting only experimentally validated
123 and highly conserved predicted mRNA targets for each microRNA. We performed a Core
124 Pathway Analyses using these microRNA targets to identify relationships among the
125 mRNAs in our data set [10]. The canonical pathways with $p\text{-value} < 0.05$ (Fischer’s exact
126 test) were considered statistically significant, and the activation z-score was calculated
127 to predict activation or inhibition of transcriptional regulators based on published findings
128 accessible through Ingenuity Knowledge Base (Qiagen).

129

130 **3. Results**

131 **3.1. Circulating total EV microRNA expression is altered by aging**

132 The analysis of microRNA expression showed 728 microRNAs present in the
133 circulating EVs. To assess the quality of biological variation between experimental
134 groups, principal component analysis (PCA) was performed using Partek Genomics
135 Suite. Each dot on the plot represents a sample, and the percentage of the total variation
136 by each principal component is listed on its axis. Our samples did not present a clustered

137 distribution (PCA #1=13.4%; PCA #2=12.3%; PCA #3=7.81%) but instead were loosely
138 segregated (Figure 1a).

139 Of the detected circulating EV microRNAs, 48 were differentially expressed between
140 the aged and young-adult groups ($p < 0.05$; fold change $\geq |1.1|$). 18 were up-regulated
141 and 30 were down-regulated in aged compared to young adult animals (Online Resource
142 1). The unsupervised hierarchical cluster heatmap shows the relative intensity of
143 differential expression for these 48 microRNAs (Figure 1b).

144

145 **3.2. Cardiovascular signaling pathways are predicted to be upregulated by** 146 **circulating total EV microRNA**

147 The predicted effects of age-related microRNA differences on target mRNAs were
148 investigated using Ingenuity Pathways Analysis (Qiagen). A conservative target filter was
149 applied (i.e., only experimentally validated and highly conserved predicted mRNA targets
150 for each microRNA were included). IPA mapped the 48 differentially expressed
151 microRNAs to 25 mature microRNAs based on current available target annotations
152 (Table 1). We found that these 25 mature microRNAs putatively target 11,008 mRNAs.
153 175 canonical pathways were identified as significantly up- or down-regulated in the aged
154 compared to young adult groups ($p < 0.05$ and z-score (measure of pathway
155 activation/inhibition) $\neq 0$) [11]. The table in Online Resource 2 ranks the canonical
156 pathways according to the value of $-\log p\text{-value}$.

157 Cardiac hypertrophic signaling (Online Resource 1; Figure 2) was ranked as a top
158 canonical pathway impacted by microRNAs that were differentially expressed between
159 aged and young groups. Given that cardiac hypertrophic signaling was a top pathway
160 and that cardiovascular diseases are the leading causes of death worldwide, we focused
161 our attention on signaling pathways related to cardiovascular disease. Figure 2 presents
162 the top cardiovascular signaling canonical pathways as predicted targets of differentially
163 expressed EV microRNAs between aged and young animals (Figure 2).

164 Approximately 90% of mapped microRNAs (22 of 25 microRNA) were predicted to
165 target molecules in cardiac hypertrophy during aging (Table 1). In this scenario, let-7a-
166 5p was the top upstream regulator, targeting all cardiovascular signaling canonical
167 pathways altered by aging. Let-7a-5p was predicted to regulate 83 mRNAs related to
168 relevant cardiac signaling, such as hypertrophy (66 molecules), endothelin-1 (19
169 molecules), β -adrenergic (13 molecules), apoptosis (21 molecules), and death receptor
170 (14 molecules). Figure 3 highlights important components of the cardiac hypertrophic
171 signaling pathway, such as β -adrenergic receptor signaling and nuclear factor of
172 activated T cells (NFAT). Different microRNAs involved with β -adrenergic receptors (β -
173 AR), including let-7a-5p, miR-199a and miR92a were also impacted by aging.
174 Additionally, proinflammatory cytokines are predicted to be upregulated by differential
175 expression of let-7a, miR-143, miR22 and miR-31 in circulating total EVs (Figure 3; Table
176 1). G protein subunit gamma (G γ) can also be upregulated by diminished let-7a and miR-
177 743a-5p levels. cAMP dependent protein kinase A (PKA, specifically PRKAR2A), a key
178 enzyme for cardiac function [12] also appears to be upregulated by let-7a, miR-22-3p
179 and miR-3120. miR-199a, miR-30c and miR-34a were differentially expressed between
180 aged and young animals and were also associated with NFAT in cardiac hypertrophy
181 signaling (Online Resource 3; Table 1).

182 Endothelin-1 (ET-1) signaling, is ranked as the third cardiac canonical pathway
183 impacted, since changes induced by aging in circulating EVs microRNAs can induce an
184 upregulation of this pathway in both endothelial and vascular smooth cells. A remarkable
185 finding of our study is an upregulation of important signal transduction molecules by let-
186 7a-5p, such as G-proteins and phospholipases (Online Resource 3).

187 microRNAs in circulating total EVs, especially let-7a-5p, are predicted to upregulate
188 the intrinsic prothrombin activation pathway in aged animals (Online Resource 3). These
189 microRNAs also seem to modulate key steps of atherosclerosis (Online Resource 3).
190 The effect of aging on microRNAs, namely let-7a-5p, miR-3064 and miR-34a, was

191 predicted to upregulate phospholipase A2 and low density lipoprotein (LDL), as well as
192 destabilize arterial plaques, affect cytokine modulation (miR-150, miR-153, miR-3064,
193 miR-410, let-7a-5p) and increase matrix metalloproteinases (MMP1; let-7a-5p, miR-
194 488).

195

196 **3.3. Programmed cell death pathways are predicted to be modulated by** 197 **circulating total EV microRNA**

198 Pathway analysis also showed that apoptosis and death receptor signaling pathways
199 are predicted to be upregulated by differentially expressed microRNAs (Online Resource
200 1). The programmed cell death pathways represent complex and intricate mechanisms
201 relevant to chronic age-related diseases and geriatric syndromes, such as
202 cardiovascular disease. The death receptors (extrinsic) pathway was impacted by the
203 circulating EV microRNAs let-7a-5p, miR-3585-5p, miR-410-5p, miR-153 and miR-30c-
204 1-3p. The different targets of these microRNA, such as FASLG, FAS, ROCK1 and
205 caspase 3 are described in Online Resource 1 and 3. The intrinsic apoptotic pathway is
206 impacted by let-7a-5p, that acts targeting DIABLO protein (Online Resource 3; Table 1).

207

208 **4. Discussion**

209 Our results support the hypothesis that aging impacts the microRNA profiles of
210 circulating EVs. Our *in-silico* study identified predicted targets, canonical pathways and
211 cellular processes that are influenced by aging-induced differential expression of
212 microRNAs in EVs.

213 Cardiac hypertrophic signaling was the top canonical pathway impacted by
214 differentially expressed microRNAs in circulating total EVs from aged rats. Interestingly,
215 even in healthy individuals without any cardiovascular disease, the prevalence of left
216 ventricular hypertrophy is increased with age, independent of any predictable risk factors
217 [13-15] and thus cardiac hypertrophy is considered a hallmark of cardiac aging [14].

218 It is notable that EVs might be the circulating factors described in a study performed
219 by Loffredo and colleagues [16] using heterochronic parabiosis, where circulating factors
220 seem to be involved with aging-induced pathological cardiac hypertrophy. In addition to
221 cardiac hypertrophy signaling, the aging process impacts EV microRNAs that are
222 predicted to regulate several genes and pathways associated with endothelin-1 and β -
223 adrenergic signaling. This regulation can contribute to the cardiovascular dysfunction
224 observed with old age.

225 Hypertrophic myocardium and normal myocardium have different microRNA
226 expression profiles [17]. In both human and rodent models of hypertrophic
227 cardiomyopathy, several microRNAs associated with cardiomyocyte hypertrophic
228 signaling have been identified, including miR-214 [18], miR-199a [19], and let-7 [20]. It
229 is interesting to note that microRNA profiling in circulating total EVs can reflect the tissue
230 and cellular microRNA signatures. However, a different pattern of global circulating
231 microRNA expression, but not gene expression profiling, between young and adult
232 women was described, showing that microRNA profiling changes induced by aging could
233 precede gene expression of predicted targets [21]. In this scenario, let-7a-5p in
234 circulating total EVs seems to have a central role in cardiovascular aging. Interestingly,
235 in our analysis let-7a-5p was identified as downregulated in aged animals. Since this
236 microRNA has a relevant anti-hypertrophic action [22], it is likely widely involved with
237 age-induced cardiac hypertrophy. Downregulation of let-7a-5p also has a predicted
238 effect on endothelin-1, β -adrenergic, apoptosis and death receptor pathways.

239 Additionally, nuclear factor of activated T cells (NFAT) appears as a frequent
240 component of cardiac hypertrophy signaling pathways, and its activation is observed in
241 aged mice [23]. NFAT is a transcription factor that has been described to induce a
242 hypertrophic response in several rodent models [24]. Our results showed the miR-30c is
243 downregulated in circulating EVs, which is relevant since this microRNA appears to
244 target and inhibit the NFAT hypertrophic and cardiac hypertrophy signaling pathway [25].

245 Cardiac hypertrophy signaling was also previously associated with miR-199a and miR-
246 34a [25], which we found to be differentially expressed between aged and young adult
247 circulating total EVs microRNA. In addition, our data showed that the microRNA
248 signature in circulating total EVs, namely let-7a-5p, is predicted to cause age-induced
249 modifications of cardiac β -adrenergic signaling and its regulation of calcium handling in
250 cardiomyocytes. In this context, downregulation of let-7a-5p and miR-743a-5p promote
251 an activation of G protein subunit gamma ($G\gamma$). Additionally, a key enzyme for cardiac
252 function: cAMP dependent protein kinase A (PKA, specifically PRKAR2A) [12] is
253 predicted to be upregulated by let-7a-5p, miR-22-3p and miR-3120 in circulating total
254 EVs during aging process. Interestingly, PKA induces phosphorylation of serine and
255 threonine residues on intracellular domains of β AR, resulting in a downregulation
256 response that may be involved in cardiac aging. Enns et al. [26] suggested that reduced
257 PKA function mediates anti-aging effects, demonstrating that wild C57BL/6 mice have
258 continually increasing cardiac dysfunction as early as 10-12 months of age, while male
259 mutant mice lacking the PKA regulatory $II\alpha$ subunit (PRKAR2A) have delayed cardiac
260 decline and an increased lifespan. Concomitantly, microRNAs induce abnormal protein
261 phosphatase 1 and 2A (PP1 and PP2A) control, resulting in dephosphorylation of L-type
262 Ca^{2+} channels and phospholamban. In this context, dysregulation of the adrenergic
263 system may induce the cellular environment to pro-apoptotic signaling.

264 Interestingly, apoptosis and death receptors, which are relevant to several age-
265 related conditions, including cardiovascular diseases, were signaling pathways predicted
266 to be significantly upregulated in this study. The microRNA profile of circulating total EVs
267 seems to facilitate programmed myocyte cell death through mitochondrial (intrinsic) and
268 death receptor (extrinsic) pathways during the aging process, which can be related to a
269 dilated cardiac phenotype [27]. miR-3585-5p, let-7a-5p and miR-92a-3p can impact
270 death receptor signaling with different predicted targets (FASLG; FAS). In accordance
271 with our total EV findings, Ding and collaborators [28] showed that miR-3585-5p was

272 altered in the myocardium of lipopolysaccharide-treated rats. Additionally, the intrinsic
273 apoptotic pathway was also modulated by let-7a-5p, specifically DIABLO protein that
274 inhibit the inhibitor of apoptosis proteins (IAP), beginning the caspase cascade. A
275 complex relationship between the microRNA profile of circulating total EVs and caspase
276 3 regulation is observed, as reduced let-7a-5p may lead to enzymatic activation of
277 caspases, an essential step for apoptosis. Moreover, calpains are key candidate targets
278 involved directly with the apoptotic pathway. Calpains act as pro-apoptotic proteases by
279 activating caspase and inducing the cleavage of apoptosis-inducing factor (AIF) after
280 Ca^{2+} overload [29]. Since microRNAs in total EVs, specifically let-7a-5p, target calpains,
281 this interaction may be highly relevant in cardiovascular aging.

282 The release of mitochondrial factors, such as AIF, also contributes to cardiac cell
283 death. Cleaved AIF translocates to the nucleus and provokes DNA fragmentation [30],
284 let-7a-5p, miR-410-5p modulate this apoptosis step. Upregulated miR-410-5p was found
285 in several models of heart disease and is associated with hypertrophy and pathological
286 cardiac remodeling [31]. ROCK1 signaling, a serine/threonine kinase effector of GTPase
287 RhoA, seems to be impacted by miR-30c-1-3p [for review in 32]. ROCK1 was involved
288 with cardiac fibrosis and apoptosis in cardiomyocytes [33, 34]. In accordance, patients
289 with heart failure and/or hypertensive patients have higher activity of RhoA/ROCK
290 pathway [35,36]. ROCK signaling acts through direct phosphorylation of the target
291 proteins and changes the global microRNA expression as well [37]. Taken together, let-
292 7a-5p, miR-3585-5p, miR-410-5p and miR-30c-1-3p seem to represent key candidate
293 elements of the highly complex programmed cell death, apoptosis, creating an
294 environment more susceptible to cardiac disease.

295 The establishment of chronic heart failure may depend on ETA/B receptor-mediated
296 endothelin-1 (ET-1) signaling. The prolonged activation of ET-1 system provokes
297 maladaptive cardiac remodeling and elevated mortality [38]. Augmented serum ET-1
298 levels are associated with chronic stable heart failure patients [39]. In our study we

299 observed an ET-1 signaling upregulation that may be induced by circulating total EVs
300 microRNAs. In addition, this microRNA profile can be related to MAPK activation at
301 vascular smooth muscle cells and consequent vasoconstriction in aging [40]. Kinases
302 are interconnected and have overlapping components common to different canonical
303 pathways. Our data indicates that mitogen activated protein kinase (MAPK) enzymes,
304 such as MAPK kinase kinases (MAPKKKs) and MAPK are predicted to be regulated by
305 let-7a-5p, miR-22-3p and miR-410-5p. An increased activation of MAPK activity is
306 associated with cellular senescence and accelerated aging, which result in different
307 patterns of gene expression [41].

308 Target genes of microRNAs also can control platelet function and might represent
309 the mechanism by which circulating cells, via total EVs, communicate with vascular
310 endothelium. This interaction can impact the development and progression of
311 cardiovascular diseases, such as atherosclerosis. The microRNAs let-7a-5p, miR-3064,
312 miR-34a and miR-214, upregulate phospholipase A2(PLA2)/LDL, which can be relevant
313 since PLA2 is an atherogenic. PLA2 acts by hydrolyzing oxidized LDL, as a result
314 atherogenic and proinflammatory mediators are produced in atherosclerotic plaques
315 [42]. Interestingly, inflammation and degradation of the extracellular matrix are involved
316 with destabilization of arterial plaques, suggesting an impact of cytokines (miR-150,
317 miR-153, miR-3064, miR-410, let-7a) and matrix metalloproteinases (MMP1; let-7a, miR-
318 488) on the development of acute thromboembolic conditions. The contribution of
319 microRNAs to thrombotic disorders was previously described [43, 44]. Our findings
320 highlight the possible role of circulating total EV microRNAs on age-induced changes in
321 hemostasis due to an upregulation of intrinsic prothrombin activation pathway. Taken
322 together, circulating total EV microRNAs may be related to atherothrombosis,
323 including atherosclerotic lesion disruption and thrombus formation.

324 In this study we reported that aging modifies the microRNA profile of circulating EVs
325 and provide *in silico* analyses showing that differentially expressed microRNAs in EVs in

326 aged rats are predicted to contribute to cardiovascular dysfunction. It is important to note
327 that the beneficial or deleterious cardiac effects of specific microRNAs are still unclear,
328 and that signaling pathways comprise a complex network. However, our results indicate
329 that let-7a-5p might be a key element in cardiovascular aging, regulating several
330 cardiovascular canonical pathways as well as apoptosis signaling. Our data give insights
331 into the role of circulating EV microRNAs in the aging process and open new avenues
332 for further studies to confirm our *in-silico* findings.

333

334 **Declarations**

335 **Funding**

336 This was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
337 (CNPq) fellowships (Dr. I.R. Siqueira – 307980/2018-9; Dr. A. Belló-Klein; Dr.
338 A.S.Araujo; L.R. Cechinel) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
339 Superior (CAPES) Finance Code 001 – 88881.189257/2018-01.

340

341 **Conflicts of interest/Competing interests**

342 The authors declare that they have no conflicts of interest.

343

344 **Ethics approval**

345 All institutional and national guidelines for the care and use of laboratory animals were
346 followed. The Local Ethics Committee (CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
347 – UFRGS; nr.29818) approved all animal procedures and experimental conditions.

348

349 **Consent to participate**

350 Not applicable

351 **Consent for publication**

352 Not applicable

353

354 **Availability of data and material (data transparency)**

355 The data underlying this article will be shared on reasonable request to the
356 corresponding author.

357

358 **References**

- 359 1. Niccoli T, Partridge L. (2012). Ageing as a risk factor for disease. *Curr Biol.*
360 22(17):R741-R752. <https://doi:10.1016/j.cub.2012.07.024>
- 361 2. Franceschi C, Garagnani P, Morsiani C et al (2018). The continuum of aging and
362 age-related diseases: common mechanisms but different rates. *Front Med*
363 (Lausanne) 5:61. <https://doi:10.3389/fmed.2018.00061>
- 364 3. Friedman RC, Farh KKH, Burge CB, Bartel DP. (2009). Most mammalian mRNAs
365 are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19(1):92-105.
366 <https://doi:10.1101/gr.082701.108>.
- 367 4. Kaneto CM, Nascimento JS, Prado MSJG, Mendonça LSO. (2019) Circulating
368 miRNAs as biomarkers in cardiovascular diseases. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*
369 23(5):2234-2243. https://doi:10.26355/eurrev_201903_17271
- 370 5. Bang C, Batkai S, Dangwal S, et al. (2014) Cardiac fibroblast-derived microRNA
371 passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin*
372 *Invest* 124(5):2136-2146. <https://doi:10.1172/JCI70577>
- 373 6. Lee BR, Kim JH, Choi ES, Cho JH, Kim E. (2018) Effect of young exosomes injected
374 in aged mice. *Int J Nanomedicine* 13:5335-5345. <https://doi:10.2147/IJN.S170680>
- 375 7. Kulkarni R, Bajaj M, Ghode S, Jalnapurkar S, Limaye L, Kale VP. (2018) Intercellular
376 Transfer of Microvesicles from Young Mesenchymal Stromal Cells Rejuvenates
377 Aged Murine Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cells* 36(3):420-433.
378 <https://doi:10.1002/stem.2756>

- 379 8. Ye Z, Sun B, Mi X, Xiao Z. (2020) Gene co-expression network for analysis of plasma
380 exosomal miRNAs in the elderly as markers of aging and cognitive decline. PeerJ
381 8:e8318. <https://doi:10.7717/peerj.8318>
- 382 9. National Institutes of Health. (2011). Guide for the care and use of laboratory animals.
383 National Academies.
- 384 10. Hasegawa K, Pérez-Losada M, Hoptay CE, et al. (2018) RSV vs. rhinovirus
385 bronchiolitis: difference in nasal airway microRNA profiles and NFκB signaling.
386 *Pediatr Res* 83(3):606-614. <https://doi:10.1038/pr.2017.309>
- 387 11. Lv L, Li C, Zhang X, et al. (2017) RNA Profiling Analysis of the Serum Exosomes
388 Derived from Patients with Active and Latent Mycobacterium tuberculosis Infection.
389 *Front Microbiol* 8:1051. <https://doi:10.3389/fmicb.2017.01051>.
- 390 12. Bernstein D, Fajardo G, Zhao M. (2011) The role of β-adrenergic receptors in heart
391 failure: differential regulation of cardiotoxicity and cardioprotection. *Prog Pediatr*
392 *Cardiol* 31(1):35-38. <https://doi:10.1016/j.ppedcard.2010.11.007>
- 393 13. Paciaroni E, Fraticelli A. (1995) Left ventricular hypertrophy. Prevalence in older
394 patients and management. *Drugs Aging* 6(4):301-311.
395 <https://doi:10.2165/00002512-199506040-00005>
- 396 14. Chiao YA, Rabinovitch PS. (2015) The Aging Heart. *Cold Spring Harb Perspect Med*
397 5(9):a025148. <https://doi:10.1101/cshperspect.a025148>
- 398 15. Leibowitz, D. (2014). Left ventricular hypertrophy and chronic renal insufficiency in
399 the elderly. *Cardiorenal medicine*, 4(3-4), 168-175.
- 400 16. Loffredo, F. S., Steinhäuser, M. L., Jay, S. M., Gannon, J., Pancoast, J. R.,
401 Yalamanchi, P., ... & Miller, C. M. (2013). Growth differentiation factor 11 is a
402 circulating factor that reverses age-related cardiac hypertrophy. *Cell*, 153(4), 828-
403 839.
- 404 17. Sun, D., Li, C., Liu, J., Wang, Z., Liu, Y., Luo, C., ... & Wen, S. (2019). Expression
405 Profile of microRNAs in Hypertrophic Cardiomyopathy and Effects of microRNA-20

406 in Inducing Cardiomyocyte Hypertrophy Through Regulating Gene MFN2. *DNA*
407 *and cell biology*, 38(8), 796-807.

408 18. Tang, C.M., Liu, F.Z., Zhu, J.N., Fu, Y.H., Lin, Q.X., Deng, C.Y., Hu, Z.Q., Yang, H.,
409 Zheng, X.L., Cheng, J.D., Wu, S.L., Shan, Z.X., 2016. Myocyte-specific enhancer
410 factor 2C: a novel target gene of miR-214-3p in suppressing angiotensin II-induced
411 cardiomyocyte hypertrophy. *Sci. Rep.* 6, 36146.

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

415 20. Yang, Y., Ago, T., Zhai, P., Abdellatif, M., Sadoshima, J., 2011. Thioredoxin 1
416 negatively regulates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy through upregulation
417 of miR-98/ let-7. *Circ. Res.* 108, 305–313.

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

421 22. Zhou, X., Sun, F., Luo, S., Zhao, W., Yang, T., Zhang, G., ... & Zhuang, Y. (2017).
422 Let-7a is an antihypertrophic regulator in the heart via targeting calmodulin.
423 *International journal of biological sciences*, 13(1), 22.

424 23. Dai DF, Chen T, Johnson SC, Szeto H, Rabinovitch PS. Cardiac aging: from
425 molecular mechanisms to significance in human health and disease. *Antioxid Redox*
426 *Signal* (2012) 16(12):1492–526. doi:10.1089/ars.2011.4179

427 24. Wilkins BJ, Molkenin JD. Calcineurin and cardiac hypertrophy: where have we
428 been? Where are we going? *J Physiol.* 2002;541:1–8

429 25. Xue, J., Zhou, D., Poulsen, O., Hartley, I., Imamura, T., Xie, E. X., & Haddad, G. G.
430 (2018). Exploring microRNA-mRNA regulatory network in cardiac pathology in
431 Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 transgenic mice. *Physiological genomics*, 50(10), 846-
432 861.

- 433 26. Enns, L. C., Morton, J. F., Treuting, P. R., Emond, M. J., Wolf, N. S., McKnight, G.
434 S., ... & Ladiges, W. C. (2009). Disruption of protein kinase A in mice enhances
435 healthy aging. *PLoS One*, 4(6).
- 436 27. Moe, G. W., & Marín-García, J. (2016). Role of cell death in the progression of heart
437 failure. *Heart failure reviews*, 21(2), 157-167.
- 438 28. Ding, T., Li, Y., Tang, R., Zhang, X., Yun, Y., Li, J., & Wang, D. (2015). Differential
439 expression of microRNAs in myocardial tissues of rats with lipopolysaccharide-
440 induced endotoxemia. *Journal of Southern Medical University*, 35(2), 213-217.
- 441 29. Smith, M. A., & Schnellmann, R. G. (2012). Calpains, mitochondria, and apoptosis.
442 *Cardiovascular research*, 96(1), 32-37.
- 443 30. Ye, H., Cande, C., Stephanou, N. C., Jiang, S., Gurbuxani, S., Larochette, N., ... &
444 Wu, H. (2002). DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis
445 inducing factor. *Nature structural biology*, 9(9), 680-684.
- 446 31. Clark, A. L., Maruyama, S., Sano, S., Accorsi, A., Girgenrath, M., Walsh, K., & Naya,
447 F. J. (2016). miR-410 and miR-495 are dynamically regulated in diverse
448 cardiomyopathies and their inhibition attenuates pathological hypertrophy. *PloS one*,
449 11(3).
- 450 32. Hartmann, S., Ridley, A. J., & Lutz, S. (2015). The function of Rho-associated kinases
451 ROCK1 and ROCK2 in the pathogenesis of cardiovascular disease. *Frontiers in*
452 *pharmacology*, 6, 276.
- 453 33. Haudek, S. B., Gupta, D., Dewald, O., Schwartz, R. J., Wei, L., Trial, J., & Entman,
454 M. L. (2009). Rho kinase-1 mediates cardiac fibrosis by regulating fibroblast
455 precursor cell differentiation. *Cardiovascular research*, 83(3), 511-518.
- 456 34. Chang J., Xie M., Shah V. R., Schneider M. D., Entman M. L., Wei L., et al. (2006).
457 Activation of Rho-associated coiled-coil protein kinase 1 (ROCK-1) by caspase-3
458 cleavage plays an essential role in cardiac myocyte apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
459 *U.S.A.* 103, 14495–14500.

- 460 35. Masumoto, A., Hirooka, Y., Shimokawa, H., Hironaga, K., Setoguchi, S., & Takeshita,
461 A. (2001). Possible involvement of Rho-kinase in the pathogenesis of hypertension
462 in humans. *Hypertension*, 38(6), 1307-1310.
- 463 36. Smith, C. J., Santhanam, L., & Alexander, L. M. (2013). Rho-Kinase activity and
464 cutaneous vasoconstriction is upregulated in essential hypertensive humans.
465 *Microvascular research*, 87, 58-64.
- 466 37. Stiles, J. M., Kurisetty, V., Mitchell, D. C., & Bryan, B. A. (2013). Rho kinase proteins
467 regulate global microRNA expression in endothelial cells. *Cancer Genomics-
468 Proteomics*, 10(6), 251-263.
- 469 38. Archer, C. R., Robinson, E. L., Drawnel, F. M., & Roderick, H. L. (2017). Endothelin-
470 1 promotes hypertrophic remodelling of cardiac myocytes by activating sustained
471 signalling and transcription downstream of endothelin type A receptors. *Cellular
472 signalling*, 36, 240-254.
- 473 39. Valero-Munoz, M., Li, S., Wilson, R. M., Boldbaatar, B., Iglarz, M., & Sam, F. (2016).
474 Dual endothelin-A/endothelin-B receptor blockade and cardiac remodeling in heart
475 failure with preserved ejection fraction. *Circulation: Heart Failure*, 9(11), e003381.
- 476 40. Paneni, F., Cañestro, C. D., Libby, P., Lüscher, T. F., & Camici, G. G. (2017). The
477 aging cardiovascular system: understanding it at the cellular and clinical levels.
478 *Journal of the American College of Cardiology*, 69(15), 1952-1967.
- 479 41. Papaconstantinou, J. (2019). The role of signaling pathways of inflammation and
480 oxidative stress in development of senescence and aging phenotypes in
481 cardiovascular disease. *Cells*, 8(11), 1383.
- 482 42. Macphee, C. H., Moores, K. E., Boyd, H. F., Dhanak, D., Ife, R. J., Leach, C. A., ...
483 & Tew, D. G. (1999). Lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet-activating
484 factor acetylhydrolase, generates two bioactive products during the oxidation of low-
485 density lipoprotein: use of a novel inhibitor. *Biochemical Journal*, 338(2), 479-487.

486 43. Alarcon, M., Espinosa-Parrilla, Y., Gonzalez-Billault, C., Fuentes, E., & Palomo, I.
487 (2019). Decoding the role of Platelets and related microRNAs in Aging and
488 Neurodegenerative Disorders. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11, 151.
489 44. Plé, H., Landry, P., Benham, A., Coarfa, C., Gunaratne, P. H., & Provost, P. (2012).
490 The repertoire and features of human platelet microRNAs. *PloS one*, 7(12).

491

492 **Figure legends.**

493 **Fig. 1 Principal coordinates analysis plot and hierarchical cluster of differently**
494 **expressed microRNAs** (a) Principal coordinates analysis plot comparing the microRNA
495 profiles from aged and young adults. Each dot represents the overall microRNA
496 expression in each animal. The distance between dots indicates their dissimilarity. (b)
497 Hierarchical clustering of the expression of differently expressed microRNAs from aged
498 and young-adult rats. The color bar indicates the standardized expression of each
499 microRNA to a mean of 0. Upregulated microRNAs have positive values and are
500 displayed as red. Downregulated microRNAs have negative values and are displayed as
501 green. The microRNA fold-change of differently expressed microRNAs between aged
502 and young-adult rats are summarized in Table 1. The heatmap of microRNAs that were
503 differently expressed in total EVs and the PCA plot were generated using Partek
504 Genomics software

505

506 **Fig. 2 Cardiovascular signaling canonical pathways** The top cardiovascular signaling
507 canonical pathways as predicted target for differentially expressed total EVs microRNAs
508 between aged and young animals identified by Ingenuity pathway analysis (IPA).
509 Canonical pathways are displayed along the x-axis and the $-\log(p\text{-value})$, calculated by
510 Fisher's exact test right-tailed, on the y-axis. The threshold line indicates the minimum
511 significance level $-\log(p\text{-value})$. Height of the bars represents significance with taller bars

512 representing more significant associations and the orange color indicated that those
513 pathways are predicted to be upregulated (z-score >0)

514

515 **Fig.3 Cardiac Hypertrophy Signaling pathway in the extracellular vesicles**

516 **comparing aged and young adult animals** Predicted up- and downregulation of target

517 transcripts in the cardiac hypertrophy signaling pathway. The canonical pathway for

518 cardiac hypertrophy signaling was highly ranked as a target for the microRNAs in

519 extracellular vesicles from aged animals compared to those from young adult ones. The

520 red color indicates predicted upregulation. Genes are targeted by multiple microRNAs,

521 listed in each box. Pathway analyses created using ingenuity pathway analysis software

522 (Qiagen, Inc.)

523

524 **Online Resource 1.** The 48 differentially expressed microRNA between the aged and

525 young-adult groups ($p < 0.05$; fold change $\geq |1.1|$) observed in Partek Analysis.

526

527 **Online Resource 2.** Canonical pathways as predicted target for differentially expressed

528 microRNAs in total SEVs from aged animals compared to those from young adult ones.

529

530 **Online Resource 3. Canonical pathways and molecules predicted to be targeted**

531 **by the microRNAs in total SEVs identified as differentially expressed between**

532 **aged and young animals.** Predicted up- and downregulation of target transcripts in

533 signaling pathways. The canonical pathways relevant and highly ranked as targets for

534 the microRNAs in total SEVs from aged animals compared to those from young adult

535 ones. The red color indicates predicted upregulation. Genes are targeted by multiple

536 microRNAs, listed in each box. (a) apoptosis signaling (; (b) endothelin-1 signaling; (c)

537 death receptor signaling; (d) intrinsic prothrombin activation pathway; (e) role of NFAT in

538 cardiac hypertrophy; (f) cardiac β -adrenergic signaling; (g) atherosclerosis signaling.

539 Pathway analyses created using ingenuity pathway analysis software (Qiagen, Inc.)

540

541

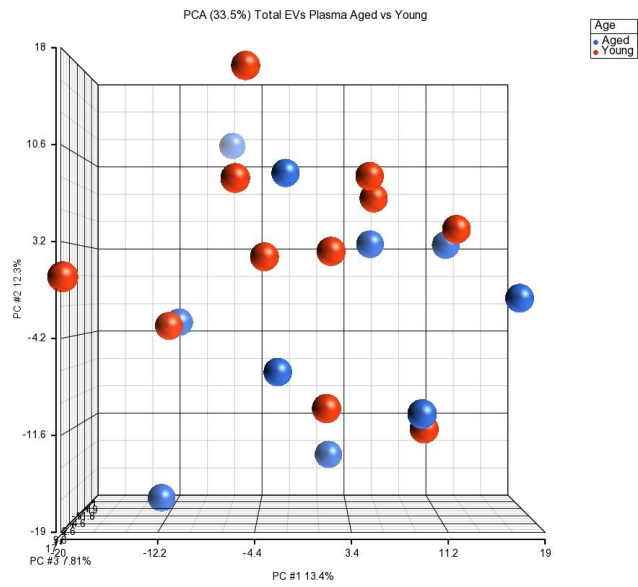
542

543

544

545 Figure 1.

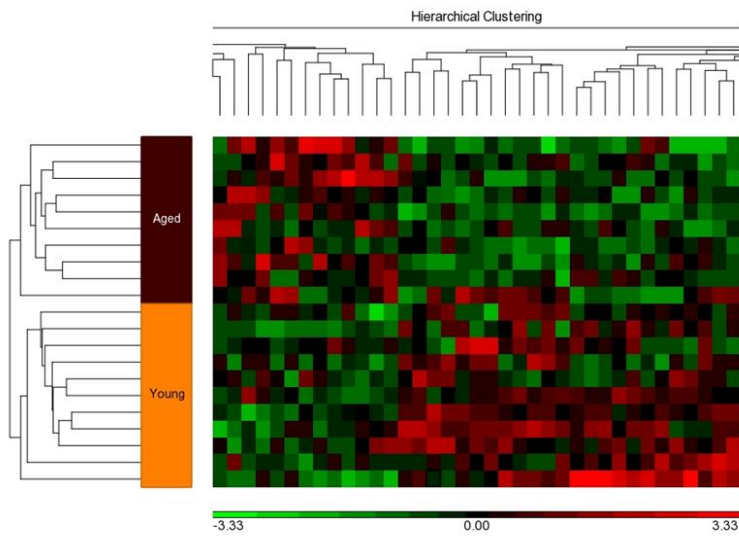
546 a.



547

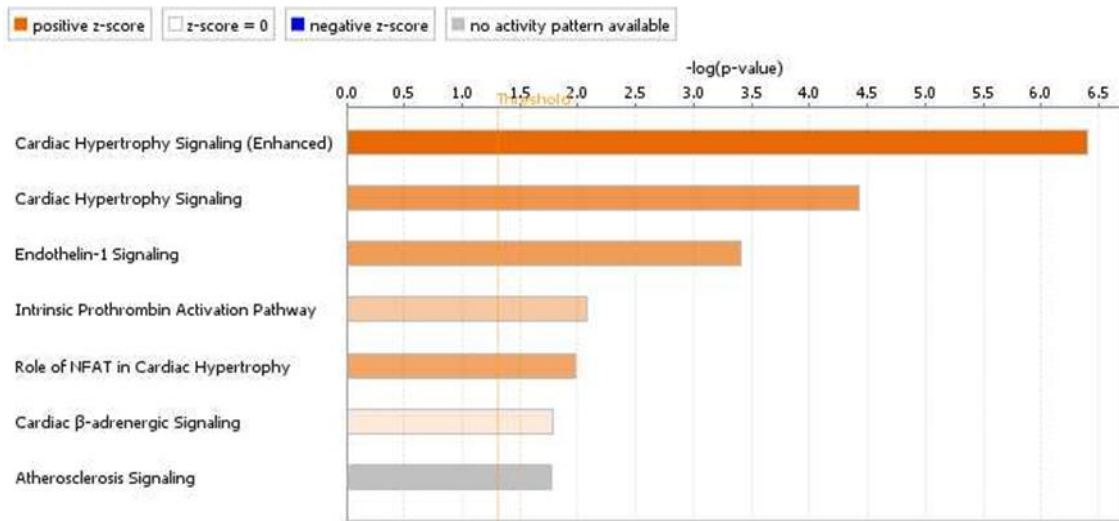
548 b.

549



550

551 Figure 2.



552 © 2000-2019 QIAGEN. All rights reserved.

553

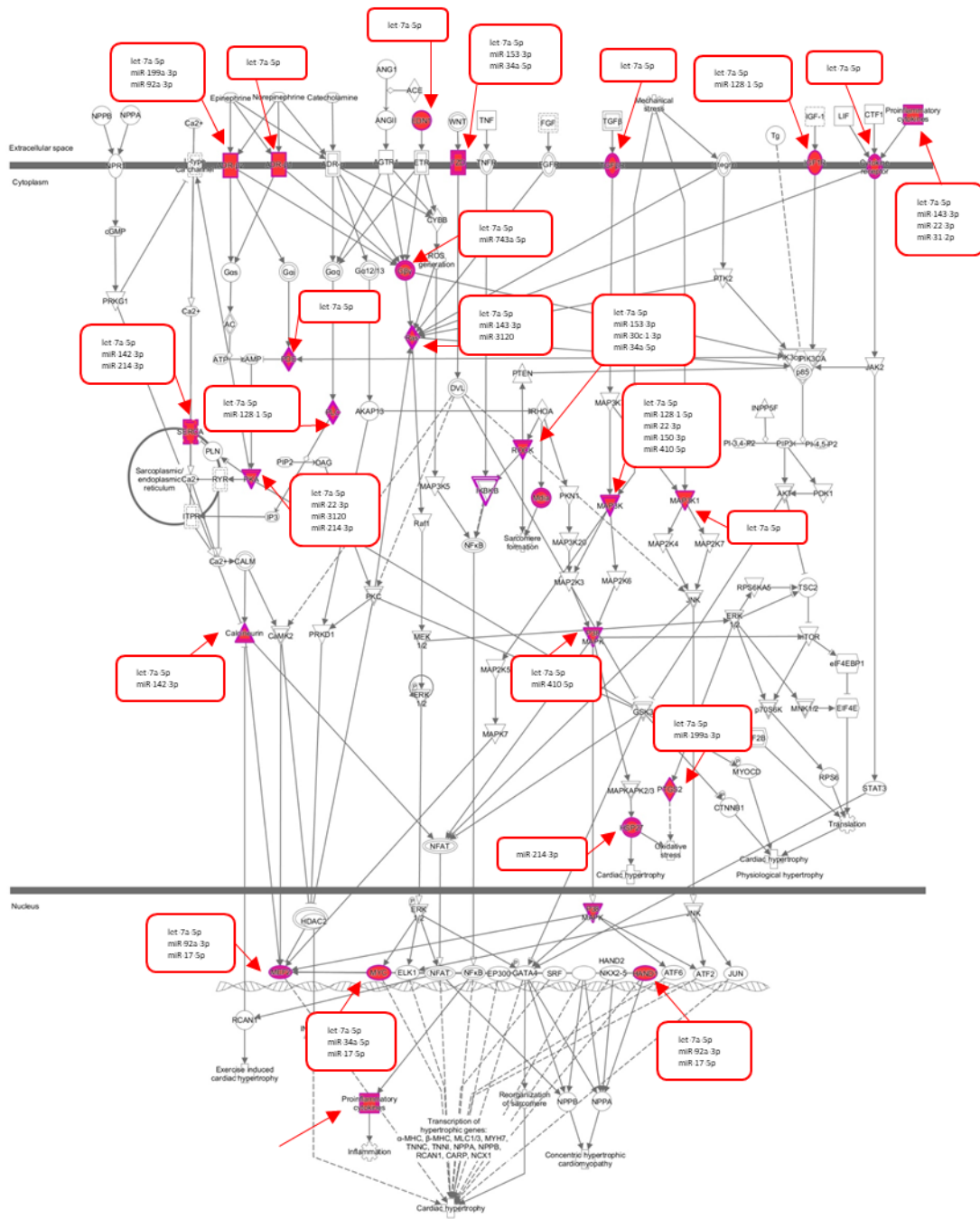
554

555

556

557

558 Figure 3.



559

© 2000-2019 GAGEN. All rights reserved.

560

Table 1.

ID	Symbol (miRNA Target Filter)	microRNA fold change	Predicted targets in Cardiac Hypertrophy Signaling	Predicted targets in Apoptosis Signaling	Predicted targets in Endothelin-1 Signaling	Predicted targets in Death Receptor Signaling	Predicted targets in Intrinsic Prothrombin Activation Pathway	Predicted targets of NFAT in Cardiac Hypertrophy	Predicted targets in Cardiac β -adrenergic Signaling	Predicted targets in Atherosclerosis Signaling
rno-let-7c-5p	let-7a-5p (and other miRNAs w/seed GAGGUAG)	-1,16	ACVR1B; ACVR1C; ACVR2B; ADRB1; ADRB2; ATP2A2; CHUK; CXCL8; DIAPH2; EDN1; FASLG; FZD3; FZD4; GDDP1; GHR; GNG5; HAND1; HSPB2; HSPB7; IFNLR1; IGF1R; IKBKE; IL6; IL13; IL12RB2; IL22RA1; IL36G; KRAS; MAP3K1; MAP3K2; MAP3K3; MAP3K13; MAPK11; MEF2D; MYC; NRAS; OSM; PDE12; PDE5A; PLCB2; PLCD4; PPP3CA; PRKAR2A; PTGS2; RALB; ROCK1	AIFM1; BCL2L1; CAPN3; CASP3; CHUK; DIABLO; FAS; FASLG; IKBKE; KRAS; NRAS; RALB; ROCK1	CASP3; CASP5; EDN1; GNAL; GNAT1; HMOX; KRAS; MAPK6; MAPK11; MYC; NRAS; PLA2G3; PLA2G2F; PLCB2; PLCD4; PTGS2; RALB	ACTA1; CASP3; CHUK; DIABLO; FAS; FASLG; HSPB2; HSPB7; IKBKE; PARP8; PARP16; ROCK1	COL1A1; COL1A2; F2; KLK2; KLK6; KLK10	CACNA1I; CACNG4; GNG5; HAND1; IGF1R; IL6; KRAS; MAP3K1; MAPK11; MEF2D; NRAS; PLCB2; PLCD4; PPP3CA; PRKAR2A; RALB	ADRB1; AKAP6; AKAP8; ATP2A2; GDDP1; GNG5; PDE12; PDE5A; PKIA; PPP1R7; PPP2R2A; PRKAR2A	PLA2G3; PLA2G2F; MMP1; PDGF; COL1A1; COL1A2; IL6
rno-miR-106b-5p	miR-17-5p (and other miRNAs w/seed AAAGUGC)	1,249	MEF2D; OSM					MEF2D	PKIA; PPP2R2A	
rno-miR-128-2-5p	miR-128-1-5p (and other miRNAs w/seed GGGGCCG)	1,906	IFNLR1; IGF1R; IL13; MAP3K2; MAP3K3; PLCB2		GNAT1; PLCB2; PLD3; PTGS2			CACNG4; IGF1R; PLCB2		PDGF
rno-miR-1298	miR-1298-5p (and other miRNAs w/seed UCAUUCG)	1,166	GHR				KLK6			
rno-miR-142-3p	miR-142-3p (and other miRNAs w/seed GUAGUGU)	-1,233	ATP2A2; GHR; DIAPH2; PPP3CA	BCL2L1				PPP3CA	ATP2A2	
rno-miR-143-3p	miR-143-3p (and other miRNAs w/seed GAGAUGA)	1,212	IL36G; KRAS	KRAS	CASP5; KRAS		COL1A1; KLK10	KRAS		COL1A1
rno-miR-150-3p	miR-150-3p (miRNAs w/seed UGGUACA)	1,401	CXCL8; MAP3K13		GNAL					IL1
rno-miR-153-3p	miR-153-3p (miRNAs w/seed UGCAUAG)	1,382	ACVR1B; FZD3; HSPB7; IL6; ROCK1	CASP3; ROCK1	CASP3	CASP3; HSPB7; ROCK1		IL6; PPP3CA	AKAP6	IL6
rno-miR-181c-3p	miR-181a-1-3p (and other miRNAs w/seed CCAUCGA)	-1,241	ACVR1B							
rno-miR-190b-5p	miR-190a-5p (and other miRNAs w/seed GAUAUGU)	-1,335	RALB	RALB	RALB			CACNB4; RALB		
rno-miR-199a-3p	miR-199a-3p (and other miRNAs w/seed CAGUAGU)	1,233	ACVR1C; ADRB1; PTGS2		PTGS2				ADRB1; PPP2R2A	
rno-miR-218a-2-3p	miR-218-2-3p (and other miRNAs w/seed AUGGUUC)	1,198								
rno-miR-22-3p	miR-22-3p (miRNAs w/seed AGCUGCC)	-1,272	ACVR1B; IL36G; MAP3K13; OSM; PRKAR2A		CASP14; HMOX			PRKAR2A	PRKAR2A	
rno-miR-25-3p	miR-92a-3p (and other miRNAs w/seed AUUGCAC)	1,416	ADRB1; FASLG; HAND1; MEF2D	FASLG		FAS; FASLG	COL1A2	CACNA1I; HAND1; MEF2D	ADRB1	COL1A2
rno-miR-296-3p	miR-296-3p (miRNAs w/seed AGGGUUG)	1,288	HAND1; CXCL8				KLK6	HAND1		
rno-miR-3085	miR-3064-5p (and other miRNAs w/seed CUGGCUG)	1,148	ADRB1; IL13; RALB	RALB	CASP5; PLA2G2F; RALB	PARP16		RALB	ADRB1	PLA2G2F; IL1
rno-miR-30c-1-3p	miR-30c-1-3p (and other miRNAs w/seed UGGGAGA)	-1,298	ACVR1B; HSPB2; HSPB7; IFNLR1; ROCK1; RALB	RALB; ROCK1	CASP14; RALB	HSPB2; HSPB7; ROCK1		RALB	PKIA	
rno-miR-3120	miR-3120 (and other miRNAs w/seed ACAGCAA)	-1,286	ACVR1B; NRAS; PRKAR2A	NRAS	NRAS; PTGS2			NRAS; PRKAR2A	AKAP8; PKIA; PRKAR2A	PDGF
rno-miR-31a-3p	miR-31-3p (and other miRNAs w/seed GCUAUGC)	-1,339	IL36G							
rno-miR-3585-5p	miR-3585-5p (and other miRNAs w/seed UCACAAG)	-1,251		BCL2L1; CASP3; FASLG	CASP3; PTGS2	CASP3; FA2; FASLG				
rno-miR-449a-5p	miR-34a-5p (and other miRNAs w/seed GGCAGUG)	-1,276	FZD3; IKBKE; MYC; ROCK1	IKBKE; ROCK1	MYC; PLA2G2F	IKBKE; ROCK1		CACNG4	PKIA	PLA2G2F
rno-miR-488-3p	miR-488-3p (miRNAs w/seed UGAAAGG)	-1,233								MMP1
rno-miR-496-5p	miR-410-5p (and other miRNAs w/seed GGUUGUC)	1,154	MAPK11	AIFM1	MAPK11			MAPK11		IL1
rno-miR-761	miR-214-3p (and other miRNAs w/seed CAGCAGG)	1,265	ACVR1B; ATP2A2; PRKAR2A		GNAL; PLA2G3	PARP16	KLK2; KLK10		ATP2A2; PRKAR2A	PLA2G3
rno-miR-881-5p	miR-743a-5p (and other miRNAs w/seed AUUCAGA)	-1,395	GNG5					GNG5	GNG5	

Online Resource 1

Probeset ID	Fold-Change (Aged vs. Young-Adult)	Fold-Change (Aged vs. Young-Adult)
rno-let-7c-5p	-1,16028	Aged down vs Young-Adult
rno-miR-106b-5p	1,24874	Aged up vs Young-Adult
rno-miR-128-2-5p	1,90585	Aged up vs Young-Adult
rno-miR-1298	1,16639	Aged up vs Young-Adult
rno-miR-142-3p	-1,23301	Aged down vs Young-Adult
rno-miR-143-3p	1,21171	Aged up vs Young-Adult
rno-miR-150-3p	1,40147	Aged up vs Young-Adult
rno-miR-153-3p	1,38177	Aged up vs Young-Adult
rno-miR-181a-1-3p	-1,2052	Aged down vs Young-Adult
rno-miR-181c-3p	-1,24133	Aged down vs Young-Adult
rno-miR-190b-5p	-1,33542	Aged down vs Young-Adult
rno-miR-199a-3p	1,23322	Aged up vs Young-Adult
rno-miR-214-5p	-1,30019	Aged down vs Young-Adult
rno-miR-218a-2-3p	1,19794	Aged up vs Young-Adult
rno-miR-22-3p	-1,27173	Aged down vs Young-Adult
rno-miR-25-3p	-1,41609	Aged down vs Young-Adult
rno-miR-296-3p	1,28763	Aged up vs Young-Adult
rno-miR-3085	1,14837	Aged up vs Young-Adult
rno-miR-30c-1-3p	-1,29773	Aged down vs Young-Adult
rno-miR-3102	1,28118	Aged up vs Young-Adult
rno-miR-3120	-1,28576	Aged down vs Young-Adult
rno-miR-31a-3p	-1,33894	Aged down vs Young-Adult
rno-miR-31b	-1,25732	Aged down vs Young-Adult
rno-miR-320-5p	-1,17829	Aged down vs Young-Adult
rno-miR-34b-5p	-1,26043	Aged down vs Young-Adult
rno-miR-351-3p	1,54788	Aged up vs Young-Adult
rno-miR-3559-5p	-1,28751	Aged down vs Young-Adult
rno-miR-3580-3p	-1,35608	Aged down vs Young-Adult
rno-miR-3580-5p	-1,23411	Aged down vs Young-Adult
rno-miR-3583-5p	-1,25473	Aged down vs Young-Adult
rno-miR-3585-5p	-1,25096	Aged down vs Young-Adult
rno-miR-3590-5p	-1,2942	Aged down vs Young-Adult
rno-miR-379-3p	-1,24993	Aged down vs Young-Adult
rno-miR-409b	1,20213	Aged up vs Young-Adult
rno-miR-421-5p	-1,17373	Aged down vs Young-Adult
rno-miR-448-5p	-1,29741	Aged down vs Young-Adult
rno-miR-449a-5p	-1,27571	Aged down vs Young-Adult
rno-miR-451-3p	-1,21042	Aged down vs Young-Adult
rno-miR-488-3p	-1,23306	Aged down vs Young-Adult
rno-miR-496-5p	1,1538	Aged up vs Young-Adult
rno-miR-6330	-1,3321	Aged down vs Young-Adult
rno-miR-6332	1,31066	Aged up vs Young-Adult
rno-miR-673-5p	-1,24319	Aged down vs Young-Adult
rno-miR-743a-3p	-1,22295	Aged down vs Young-Adult
rno-miR-761	1,26548	Aged up vs Young-Adult
rno-miR-878	1,21965	Aged up vs Young-Adult
rno-miR-881-5p	-1,39481	Aged down vs Young-Adult
rno-miR-92a-3p	1,19759	Aged up vs Young-Adult

Online Resource 2.

Ingenuity Canonical Pathways	p-value	-log(p-value)	Ratio	z-score
Cardiac Hypertrophy Signaling (Enhanced)	4,1E-07	6,39	0,0947	6,633
Molecular Mechanisms of Cancer	8,9E-07	6,05	0,0995	#NÚM!
Neuroinflammation Signaling Pathway	1,9E-06	5,71	0,107	3,413
Estrogen-mediated S-phase Entry	8,3E-06	5,08	0,308	1,414
Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	1,5E-05	4,82	0,118	#NÚM!
Glioblastoma Multiforme Signaling	2,6E-05	4,59	0,121	2,5
Axonal Guidance Signaling	2,8E-05	4,56	0,0844	#NÚM!
Chronic Myeloid Leukemia Signaling	3,1E-05	4,51	0,146	#NÚM!
Cardiac Hypertrophy Signaling	3,7E-05	4,43	0,104	4,69
IL-8 Signaling	4,4E-05	4,36	0,111	4,583
Ephrin Receptor Signaling	8,9E-05	4,05	0,111	3,5
GP6 Signaling Pathway	0,00017	3,78	0,126	3,873
Ephrin B Signaling	0,00022	3,65	0,153	1,414
Glucocorticoid Receptor Signaling	0,00027	3,57	0,0863	#NÚM!
Apoptosis Signaling	0,0003	3,53	0,131	0,277
Superpathway of Inositol Phosphate Compounds	0,00032	3,49	0,101	4,472
PKCθ Signaling in T Lymphocytes	0,00034	3,47	0,11	3,606
NGF Signaling	0,00035	3,45	0,123	3,606
CD27 Signaling in Lymphocytes	0,00036	3,44	0,17	2,333
D-myo-inositol-5-phosphate Metabolism	0,00037	3,43	0,109	4,123
Endocannabinoid Neuronal Synapse Pathway	0,00037	3,43	0,117	3,357
Endothelin-1 Signaling	0,00039	3,41	0,102	4,359
Death Receptor Signaling	0,00048	3,32	0,132	2,309
p38 MAPK Signaling	0,0005	3,3	0,119	2,496
Cell Cycle: G1/S Checkpoint Regulation	0,00051	3,29	0,149	-1,897
IL-17A Signaling in Fibroblasts	0,00059	3,23	0,2	#NÚM!
Role of Tissue Factor in Cancer	0,0006	3,22	0,117	#NÚM!
G-Protein Coupled Receptor Signaling	0,00062	3,21	0,0886	#NÚM!
PEDF Signaling	0,00071	3,15	0,134	2,111
3-phosphoinositide Biosynthesis	0,00071	3,15	0,103	4,123
cAMP-mediated signaling	0,00076	3,12	0,0925	2,065
Pancreatic Adenocarcinoma Signaling	0,00076	3,12	0,119	3
Role of NFAT in Regulation of the Immune Response	0,00076	3,12	0,0994	4,123
Glioma Signaling	0,00081	3,09	0,118	2,236
Cell Cycle Regulation by BTG Family Proteins	0,00083	3,08	0,189	1,633
IL-6 Signaling	0,00089	3,05	0,112	3,742
PTEN Signaling	0,00098	3,01	0,111	-1,941
Protein Kinase A Signaling	0,001	3	0,0777	-0,557
D-myo-inositol (1,4,5,6)-Tetrakisphosphate Biosynthesis	0,00102	2,99	0,106	3,873
D-myo-inositol (3,4,5,6)-tetrakisphosphate Biosynthesis	0,00102	2,99	0,106	3,873

PPARα/RXRα Activation	0,00132	2,88	0,0947	-2
Ceramide Degradation	0,00141	2,85	0,5	#NÚM!
ILK Signaling	0,00141	2,85	0,0942	2,668
ERK/MAPK Signaling	0,00158	2,8	0,0933	1,886
Acute Phase Response Signaling	0,00174	2,76	0,095	3,464
STAT3 Pathway	0,00191	2,72	0,104	3,464
Cyclins and Cell Cycle Regulation	0,00229	2,64	0,123	1,265
B Cell Receptor Signaling	0,00245	2,61	0,0919	4
IL-10 Signaling	0,00257	2,59	0,13	#NÚM!
3-phosphoinositide Degradation	0,00263	2,58	0,0968	3,873
HGF Signaling	0,00275	2,56	0,108	2,53
Bladder Cancer Signaling	0,00282	2,55	0,113	2,236
HER-2 Signaling in Breast Cancer	0,00302	2,52	0,119	#NÚM!
Tumoricidal Function of Hepatic Natural Killer Cells	0,00302	2,52	0,208	#NÚM!
Type II Diabetes Mellitus Signaling	0,00302	2,52	0,0986	-0,707
GNRH Signaling	0,00302	2,52	0,0925	3,606
Nur77 Signaling in T Lymphocytes	0,00339	2,47	0,136	#NÚM!
ERK5 Signaling	0,00347	2,46	0,125	3
Sphingosine and Sphingosine-1-phosphate Metabolism	0,00372	2,43	0,375	#NÚM!
T Helper Cell Differentiation	0,0038	2,42	0,123	#NÚM!
Graft-versus-Host Disease Signaling	0,00398	2,4	0,146	#NÚM!
SAPK/JNK Signaling	0,00417	2,38	0,108	2,714
Induction of Apoptosis by HIV1	0,00417	2,38	0,131	2,121
Dopamine-DARPP32 Feedback in cAMP Signaling	0,00427	2,37	0,092	2,333
RhoGDI Signaling	0,00447	2,35	0,0889	-2,496
Systemic Lupus Erythematosus In T Cell Signaling Pathway	0,00479	2,32	0,0749	1,8
Thyroid Cancer Signaling	0,00562	2,25	0,137	#NÚM!
Th2 Pathway	0,00575	2,24	0,0949	1,155
G Beta Gamma Signaling	0,00589	2,23	0,0984	3,464
Antioxidant Action of Vitamin C	0,00589	2,23	0,103	-3
Myc Mediated Apoptosis Signaling	0,00617	2,21	0,123	#NÚM!
Differential Regulation of Cytokine Production in Macrophages and T Helper Cells by IL-17A and IL-17F	0,00617	2,21	0,222	#NÚM!
Pyridoxal 5'-phosphate Salvage Pathway	0,00617	2,21	0,123	2,828
Paxillin Signaling	0,00676	2,17	0,101	2,828
Role of Macrophages, Fibroblasts and Endothelial Cells in Rheumatoid Arthritis	0,00794	2,1	0,0737	#NÚM!
T Cell Exhaustion Signaling Pathway	0,00813	2,09	0,0857	2,714
Endocannabinoid Cancer Inhibition Pathway	0,00832	2,08	0,0909	0,277
PAK Signaling	0,00832	2,08	0,103	3
Intrinsic Prothrombin Activation Pathway	0,00832	2,08	0,143	2,449
Salvage Pathways of Pyrimidine Ribonucleotides	0,00832	2,08	0,103	3,162
p53 Signaling	0,00891	2,05	0,102	1,134
UVA-Induced MAPK Signaling	0,00891	2,05	0,102	2,236
Oncostatin M Signaling	0,00933	2,03	0,14	2,449

AMPK Signaling	0,00955	2,02	0,0802	1,807
Role of NFAT in Cardiac Hypertrophy	0,01047	1,98	0,0794	4
Integrin Signaling	0,01047	1,98	0,0794	3,638
IL-15 Signaling	0,01047	1,98	0,113	#NÚM!
Small Cell Lung Cancer Signaling	0,01047	1,98	0,113	1,89
PDGF Signaling	0,01096	1,96	0,105	2,333
Sphingosine-1-phosphate Signaling	0,01148	1,94	0,094	0,707
Dendritic Cell Maturation	0,01202	1,92	0,082	3,207
Breast Cancer Regulation by Stathmin1	0,01202	1,92	0,08	#NÚM!
Circadian Rhythm Signaling	0,0123	1,91	0,152	#NÚM!
RANK Signaling in Osteoclasts	0,01259	1,9	0,102	3
Cholecystokinin/Gastrin-mediated Signaling	0,01288	1,89	0,0924	3,317
Role of Oct4 in Mammalian Embryonic Stem Cell Pluripotency	0,01288	1,89	0,13	#NÚM!
FAT10 Cancer Signaling Pathway	0,01288	1,89	0,13	2,449
Regulation of IL-2 Expression in Activated and Anergic T Lymphocytes	0,01349	1,87	0,101	#NÚM!
Synaptic Long Term Depression	0,01445	1,84	0,0802	3,357
Phospholipase C Signaling	0,01445	1,84	0,0739	3,638
Altered T Cell and B Cell Signaling in Rheumatoid Arthritis	0,01445	1,84	0,1	#NÚM!
Macropinocytosis Signaling	0,01549	1,81	0,105	#NÚM!
Th1 and Th2 Activation Pathway	0,01549	1,81	0,0814	#NÚM!
Ovarian Cancer Signaling	0,01585	1,8	0,0863	1,89
Assembly of RNA Polymerase III Complex	0,01585	1,8	0,231	#NÚM!
CREB Signaling in Neurons	0,01622	1,79	0,0773	2,828
RhoA Signaling	0,01622	1,79	0,0894	2,53
Cardiac β -adrenergic Signaling	0,0166	1,78	0,0857	1
CCR3 Signaling in Eosinophils	0,01698	1,77	0,0887	2,646
CDK5 Signaling	0,01698	1,77	0,0926	1,265
Atherosclerosis Signaling	0,01698	1,77	0,0887	#NÚM!
Autoimmune Thyroid Disease Signaling	0,01738	1,76	0,122	#NÚM!
Role of MAPK Signaling in the Pathogenesis of Influenza	0,01778	1,75	0,103	#NÚM!
Melanoma Signaling	0,01905	1,72	0,12	0,816
Role of JAK family kinases in IL-6-type Cytokine Signaling	0,02042	1,69	0,16	#NÚM!
D-myo-inositol (1,4,5)-Trisphosphate Biosynthesis	0,02042	1,69	0,16	2
Role of BRCA1 in DNA Damage Response	0,02042	1,69	0,1	0,707
IL-17 Signaling	0,02042	1,69	0,1	#NÚM!
Communication between Innate and Adaptive Immune Cells	0,02138	1,67	0,0938	#NÚM!
Opioid Signaling Pathway	0,02138	1,67	0,072	3,3
Notch Signaling	0,02188	1,66	0,132	#NÚM!
Regulation of Cellular Mechanics by Calpain Protease	0,02188	1,66	0,106	1,633
Apelin Adipocyte Signaling Pathway	0,02188	1,66	0,0988	2,121
Apelin Liver Signaling Pathway	0,02344	1,63	0,154	2

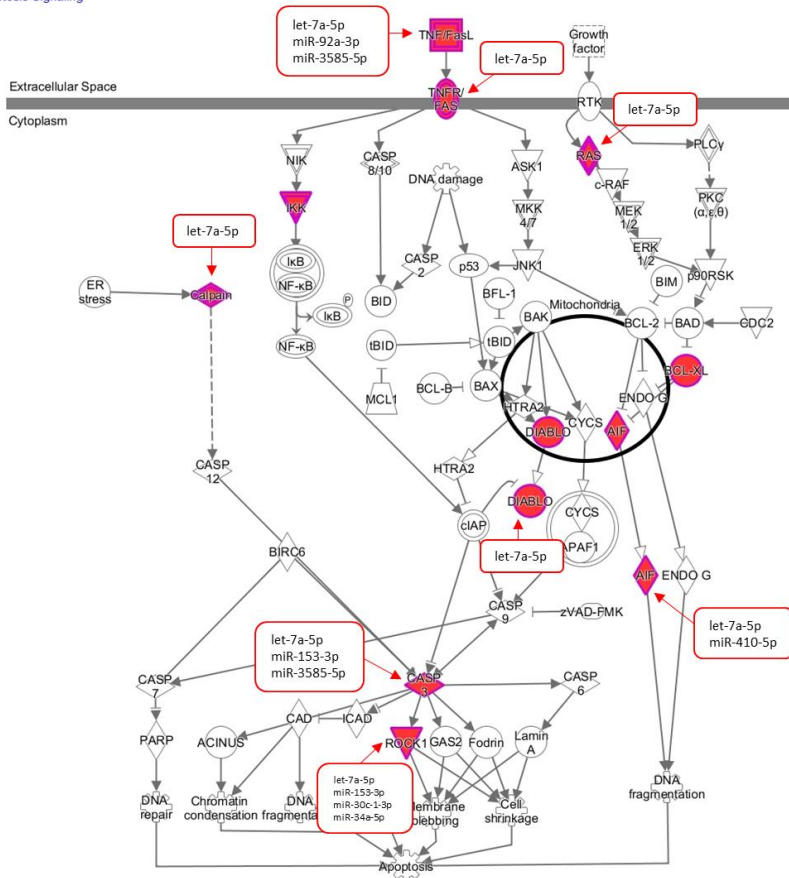
NF-κB Activation by Viruses	0,02344	1,63	0,0976	2,828
Glycogen Biosynthesis II (from UDP-D-Glucose)	0,02455	1,61	0,333	#NÚM!
Lymphotoxin β Receptor Signaling	0,02455	1,61	0,113	2,236
Endocannabinoid Developing Neuron Pathway	0,02512	1,6	0,087	3
PI3K/AKT Signaling	0,0257	1,59	0,0833	2,111
B Cell Activating Factor Signaling	0,02951	1,53	0,122	2,236
GM-CSF Signaling	0,02951	1,53	0,1	2,449
Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Macrophages	0,0309	1,51	0,0745	2,138
EIF2 Signaling	0,0309	1,51	0,0714	2,53
Pyrimidine Ribonucleotides Interconversion	0,03236	1,49	0,119	2,236
Germ Cell-Sertoli Cell Junction Signaling	0,03311	1,48	0,0756	#NÚM!
Actin Nucleation by ARP-WASP Complex	0,03388	1,47	0,0972	2,449
PPAR Signaling	0,03388	1,47	0,0865	-3
PI3K Signaling in B Lymphocytes	0,03388	1,47	0,0797	2,53
T Cell Receptor Signaling	0,03548	1,45	0,0857	#NÚM!
Caveolar-mediated Endocytosis Signaling	0,03548	1,45	0,0959	#NÚM!
Th1 Pathway	0,03548	1,45	0,082	2,333
Agranulocyte Adhesion and Diapedesis	0,03631	1,44	0,0729	#NÚM!
Crosstalk between Dendritic Cells and Natural Killer Cells	0,03631	1,44	0,0899	#NÚM!
Gαq Signaling	0,03631	1,44	0,0764	2,309
Hereditary Breast Cancer Signaling	0,03715	1,43	0,0786	#NÚM!
Estrogen-Dependent Breast Cancer Signaling	0,03802	1,42	0,0946	2,646
Pyrimidine Ribonucleotides De Novo Biosynthesis	0,03802	1,42	0,114	2,236
Virus Entry via Endocytic Pathways	0,0389	1,41	0,0841	#NÚM!
Gαs Signaling	0,0389	1,41	0,0841	3
Xenobiotic Metabolism Signaling	0,0389	1,41	0,0662	#NÚM!
Prostate Cancer Signaling	0,04074	1,39	0,0879	#NÚM!
IL-1 Signaling	0,04074	1,39	0,0879	2,236
TREM1 Signaling	0,04074	1,39	0,0933	2,646
FcγRIIB Signaling in B Lymphocytes	0,04074	1,39	0,0933	2
Angiopoietin Signaling	0,04074	1,39	0,0933	0,378
Semaphorin Signaling in Neurons	0,04169	1,38	0,1	#NÚM!
SPINK1 Pancreatic Cancer Pathway	0,04169	1,38	0,1	-2,449
Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling	0,04266	1,37	0,0769	0,333
UDP-N-acetyl-D-galactosamine Biosynthesis I	0,04266	1,37	1	#NÚM!
Airway Pathology in Chronic Obstructive Pulmonary Disease	0,04266	1,37	0,25	#NÚM!
Granulocyte Adhesion and Diapedesis	0,04365	1,36	0,0726	#NÚM!
Colorectal Cancer Metastasis Signaling	0,04365	1,36	0,0672	3,638
GADD45 Signaling	0,04467	1,35	0,158	#NÚM!
Phospholipases	0,04467	1,35	0,0984	2,449

P2Y Purigenic Receptor Signaling Pathway	0,04571	1,34	0,0787	3
4-1BB Signaling in T Lymphocytes	0,04571	1,34	0,125	2
CCR5 Signaling in Macrophages	0,04677	1,33	0,0851	#NÚM!
Type I Diabetes Mellitus Signaling	0,04786	1,32	0,0811	2,449
Systemic Lupus Erythematosus In B Cell Signaling Pathway	0,04786	1,32	0,0655	3,3
Wnt/Ca+ pathway	0,04786	1,32	0,0968	2,449
Agrin Interactions at Neuromuscular Junction	0,04786	1,32	0,0897	2,646
Synaptic Long Term Potentiation	0,04898	1,31	0,0775	2,53
FAK Signaling	0,05012	1,3	0,0842	#NÚM!
Role of Osteoblasts, Osteoclasts and Chondrocytes in Rheumatoid Arthritis	0,05012	1,3	0,0682	#NÚM!
HMGB1 Signaling	0,05012	1,3	0,0727	3,162

Online Resource 3.

a.

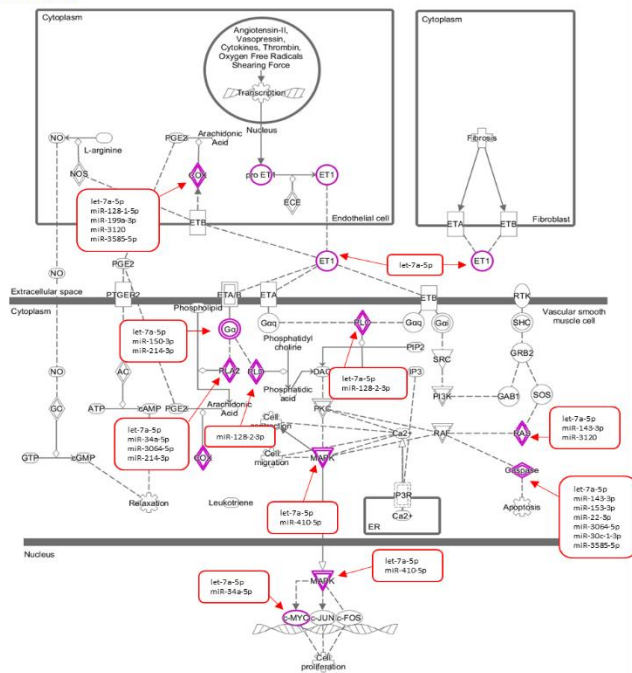
Apoptosis Signaling



© 2000-2019 OIA GEN. All rights reserved.

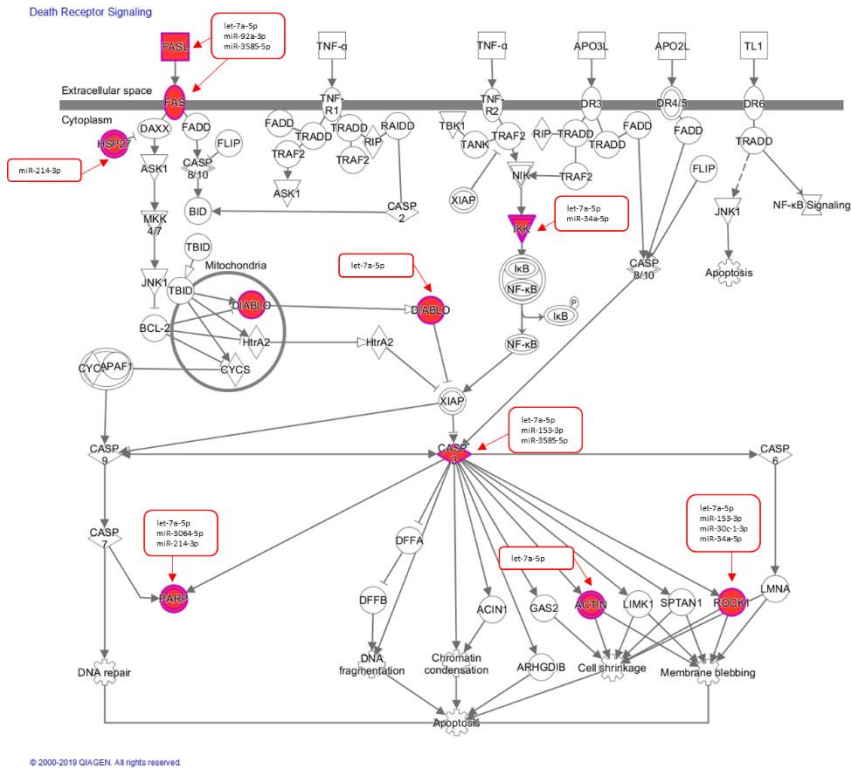
b.

Endothelin-1 Signaling

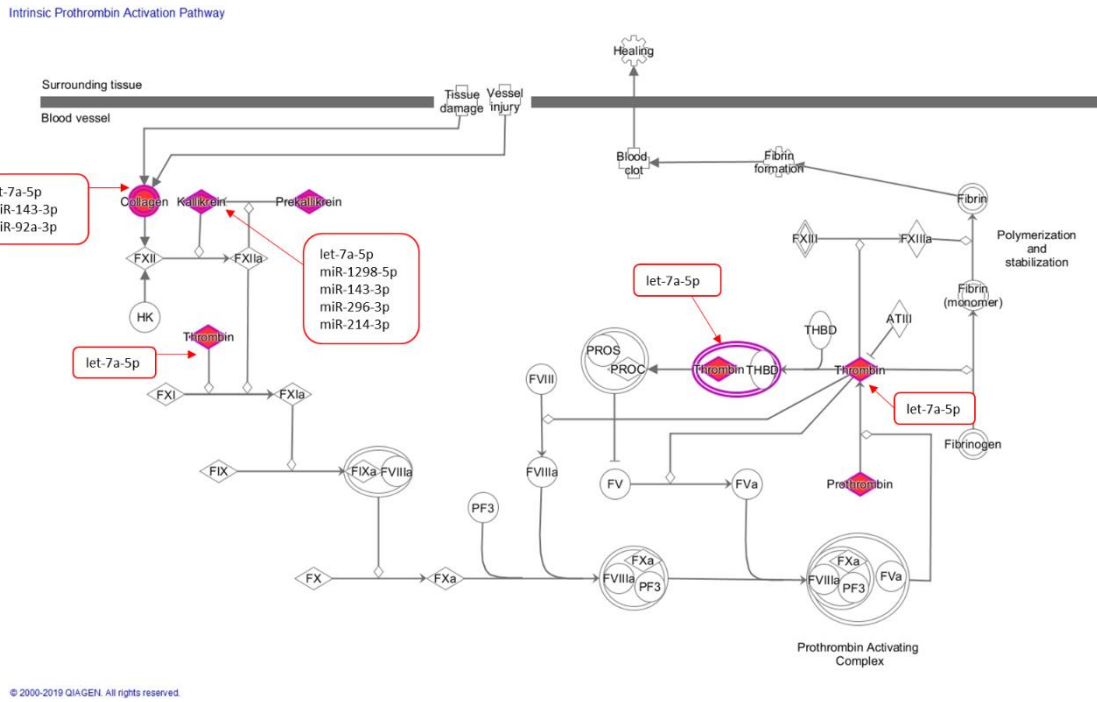


© 2000-2019 OIA GEN. All rights reserved.

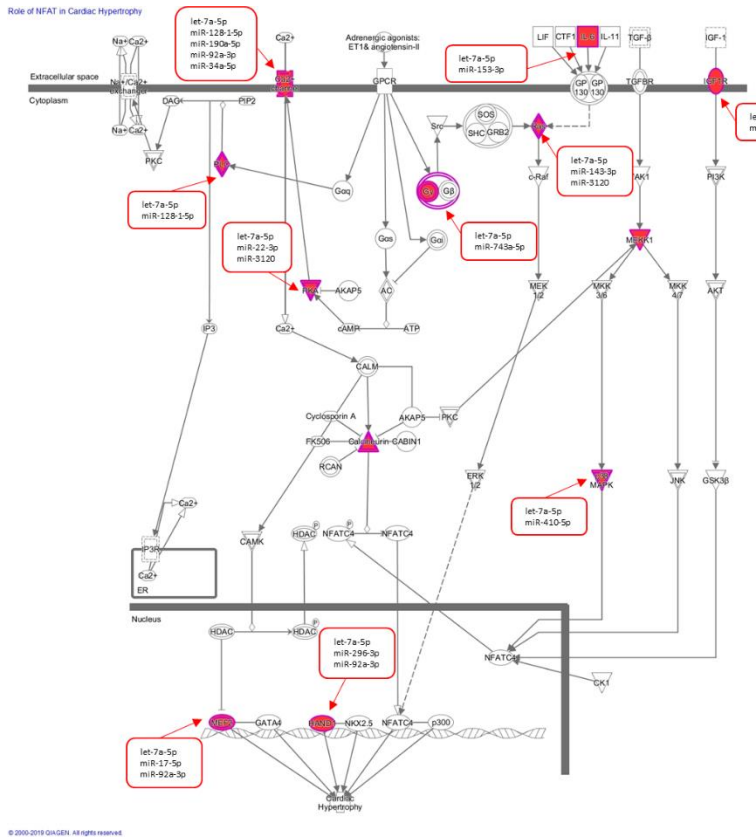
C.



d.

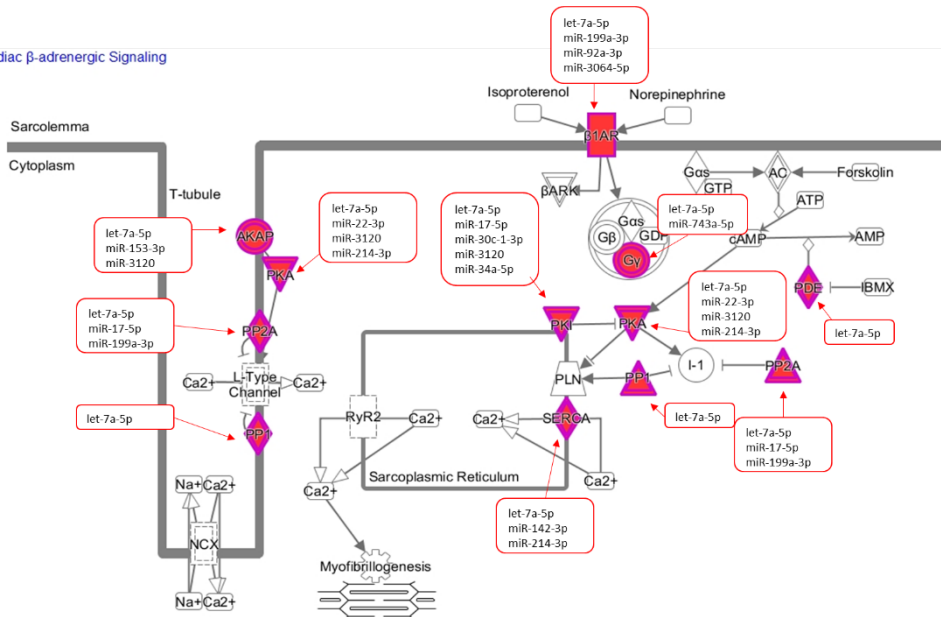


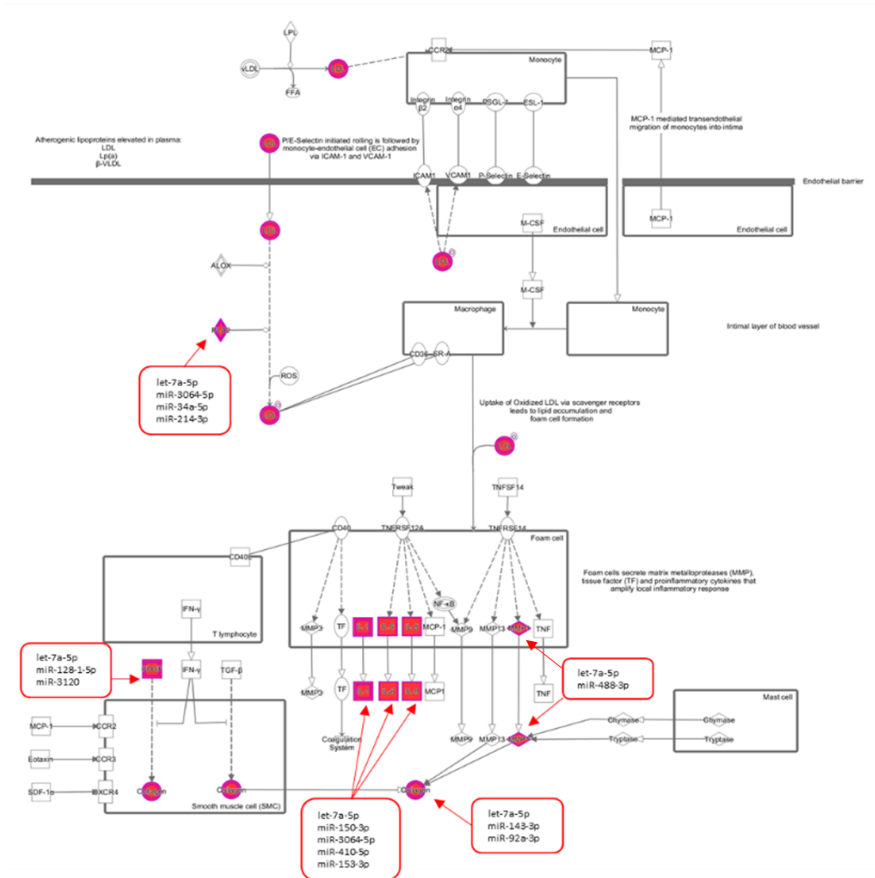
e.



f.

Cardiac β -adrenergic Signaling





Artigo 2

Efeito do envelhecimento no conteúdo das vesículas extracelulares circulantes, envolvimento da carga total de vesículas extracelulares em circulação e o impacto no estresse oxidativo relacionado à idade

Neste trabalho observamos que o conteúdo de NADPH oxidase e atividade de MPO estavam aumentados; enquanto a atividade da CAT estava reduzida. Na análise *in silico* foi possível identificar que 25 miRNAs maduros das VEs circulantes estavam diferentemente expressos em animais envelhecidos. Estes miRNAs têm como alvo moléculas de vias canônicas relacionadas ao estresse oxidativo, como via antioxidante da vitamina C e produção de espécies reativas em macrófagos. Os dados da análise bioinformática indicam um envolvimento dos miRNAs diferentemente expressos no desequilíbrio redox durante o envelhecimento.

Artigo a ser submetido na 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 vesicles cargo on age-related oxidative stress.**

The involvement of circulating total extracellular vesicles cargo on age-related oxidative stress

Laura Reck Cechinel^a, Karine Bertoldi^b, Giana Blume Corssac^{a,c}, Gisele Eva Bruch^d, Virgínia Mendes Carregal^d, André Ricardo Massensini^d, Alex Sander Araujo^{a,c}, Adriane Belló-Klein^{a,c}, Rachael Batabyal^{e,f}, Robert J Freishtat^{e,f}, Ionara Rodrigues Siqueira^{*a,b}

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^bDepartamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

^cLaboratório de Fisiologia Cardiovascular e Espécies Reativas do Oxigênio, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

^dDepartamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

^eDivision of Emergency Medicine, Children's National Hospital, Washington, DC, USA.

^fCenter for Genetic Medicine Research, Children's National Research Institute, Washington, DC, USA.

*Corresponding author: Ionara Rodrigues Siqueira, Laboratório de Neuropsicofarmacologia, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, sala 327, 90050-170, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Tel/Fax: + 55 51 3308 3121; e-mail: ionara@ufrgs.br

27 **Abstract**

28 The involvement of extracellular vesicles (EVs) on age-related oxidative stress has been
29 raised, we hypothesized that aging process is able to impact reactive species generating systems
30 and miRNA profile with predicted targets on oxidative stress in circulating total EVs. The aim of
31 this study was to evaluate the sources of reactive species generation, NADPH oxidase 2 (NOX2,
32 its catalytic subunit gp91phox), myeloperoxidase (MPO) and xanthine oxidase (XO), and
33 antioxidant defense (catalase), in circulating total EVs from young-adult and aged Wistar rats. In
34 addition, we identified miRNAs with predicted oxidative stress-modulated mRNA targets and
35 canonical pathways related to oxidative status. Plasma from 3- and 21-month-old male Wistar
36 rats was collected and circulating total EVs were isolated. Circulating total EVs obtained
37 from aged rats had significantly higher NADPH oxidase levels and MPO activity; catalase activity
38 was significantly reduced in total EVs obtained from aged animals. 25 mature miRNAs in
39 circulating EVs impacted by age are predicted to target molecules in canonical pathways directly
40 related to oxidative status. Antioxidant action of vitamin C and production of reactive species in
41 macrophages are ranked as significantly canonical pathway impacted by differentially expressed
42 miRNAs in aging process. let-7a-5-p was the top upstream regulator impacting main predicted
43 canonical pathway targets. Circulating total EVs cargo, specifically NADPH oxidase and MPO
44 activities and miRNAs that target oxidative stress pathways, were altered by aging process,
45 showing their involvement on redox imbalance in aging process.

46

47 **Keywords:** aging, extracellular vesicles, plasma, oxidative stress, Wistar rats

48

49 Introduction

50 The involvement of oxidative stress - an imbalance between the reactive species production
51 and scavenging systems - on physiological aging processes and age-related diseases has been
52 widely accepted (Davies et al., 2001; Dođru-Abbasođlu et al., 1007; Evans, 1993; Siqueira et al.,
53 2005). Recently, it has been pointed out that circulating extracellular vesicles (EVs) are potential
54 mechanisms for spreading molecules involved with oxidative stress in aging process. Higher
55 reactive species levels in circulating total EVs obtained from aged rats were detected (Bertoldi
56 et al., 2018), however the age-related imbalance of EVs pro- or antioxidant cargo has been rarely
57 evaluated.

58 Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-oxidase (NOX) subunits have been
59 recognized in circulating EVs (Janiszewski et al., 2004; Brodsky et al., 2004; Mostefai et al., 2008)
60 and seem to be related to increased superoxide anion levels in blood-derived EVs of septic
61 patients (Janiszewski et al., 2004). Among NADPH oxidase isoforms expressed in the
62 cardiovascular tissues (Drummond and Sobey, 2014), leukocyte and vascular NOX2 seems to
63 have a central role in cardiovascular diseases (Zhang et al., 2013; Brandes and Schröder, 2008).
64 There is evidence supporting that EVs derived from macrophages can deliver NOX2 from
65 parental to target cells (Hervera et al., 2018). Taken together, it is reasonable to hypothesize
66 that NADPH oxidases can be linked to higher age-induced reactive species content previously
67 found in circulating EVs (Bertoldi et al., 2018). Besides NOX2, phagocytes-
68 derived myeloperoxidase (MPO) has an important role to generate reactive species during a
69 'respiratory burst' through production of hypochlorous acid, using H₂O₂ to oxidize chloride (Lu
70 et al., 2015; Nussbaum et al., 2013; Eiserich et al., 2002). Neutrophil-derived EVs have several
71 inflammatory molecules, such as adhesion molecules (Nicholls and Hazen, 2009; Jaffe et al.,
72 1973) and active myeloperoxidase (MPO) (Hong et al., 2012, Jaffe et al., 1973, Pitanga et al.,
73 2014). In addition, another enzyme source of reactive species, xanthine oxidase (XO) that

74 catalyzes the oxidation of hypoxanthine to xanthine and xanthine to uric acid, generating
75 superoxide anion radical, can be exploited. Despite these evidences, little is known regarding
76 whether age-induced increased reactive species content in circulating total EVs are generated
77 as an intrinsic production. In order to determine the role of intrinsic production, it is possible to
78 focus systems related to reactive species generation, such as NOX2, XO and myeloperoxidase.

79 EVs can be a potential tool of spreading molecules involved with oxidative stress, beyond
80 sources of reactive species generation, microRNAs (miRNA) can be involved with aging-related
81 oxidative stress (Friedman et al., 2009). A growing body of evidence, specially using cell models,
82 demonstrated that oxidative stress is able to alter miRNA expression that can promote mRNA
83 degradation or inhibit translation. An interesting work performed by Engedal and colleagues
84 (2018) reviewed the published findings about oxidative stress-dependent miRNAs expression
85 and, using *in silico* tools, identified several oxidative stress-modulated miRNAs, their predicted
86 mRNA gene targets and affected canonical pathways. These authors described that 13 miRNAs,
87 let-7, miR-9, miR-16, miR-21, miR-22, miR-29b, miR-99a, miR-125b, miR-128, miR-143, miR-144,
88 miR-155, and miR-200c, seem to be modulated by oxidative stress. The authors showed that
89 these miRNAs have common gene targets with potential involvement with oxidative stress, such
90 as CDC14 cell division cycle 14 homolog B (CDC14B), a protein tyrosine phosphatase family
91 member, SH3 and PX domains 2A (SH3PXD2A), Cas-Br-M murine ecotropic retroviral
92 transforming sequence (CBL) and chloride channel 5 (CLCN5) (Engedal et al., 2018). Interestingly,
93 SH3PXD2A (also called Tks5) appears to facilitate the NOX system and thereby reactive species
94 production, as well as reactive species can control tyrosine phosphorylation of Tks5 in a positive
95 feedback loop (Diaz et al., 2010). Taken together, pro-oxidant machinery and predicted miRNA
96 targets of age-related circulating EV can have a central role in oxidative stress related to aging
97 process.

98 The aim of this study was to investigate the sources of reactive species generation, NOX2
99 (its catalytic subunit gp91phox), MPO and XO, and antioxidant defense, CAT, in circulating total
100 EVs from young-adult and aged Wistar rats. In addition, we identified miRNAs and their
101 predicted oxidative stress-modulated mRNA gene targets and canonical pathways related to
102 oxidative status.

103

104 **2. Material and methods**

105 **2.1. Animals**

106 Male *Wistar* rats of different ages, 3-month-old and 21-month-old were used. The animals
107 were provided by the Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório
108 (CREAL) and maintained under standard conditions (12-h light/dark, $22 \pm 2^\circ\text{C}$) with food and
109 water *ad libitum*. The NIH “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (NIH Publication
110 No. 80-23, revised 1996) was followed in all experiments. The Local Ethics Committee (CEUA –
111 Comissão de Ética no Uso de Animais – UFRGS; nr.29818) approved all animal procedures and
112 experimental conditions. The animals were decapitated; the trunk blood was collected in tubes
113 with EDTA as anticoagulant and processed within 30 min of collection. Blood was centrifuged at
114 $1000 \times g$ for 10 min to obtain plasma. Plasma samples were stored at -80°C for further analysis.

115

116 **2.2. Circulating Extracellular Vesicles Isolation**

117 The isolation was performed using a commercial kit based on vesicles precipitation
118 (ExoQuick™ System Bioscience) following the manufacturer’s instructions. Plasma (500µL) was
119 thawed on ice and centrifuged at $3000 \times g$ for 15 min at 4°C . The supernatant was collected and
120 then incubated with thrombin at room temperature to remove fibrinogen. Plasma was then
121 centrifuged at $10,000 \times g$ for 5 minutes. The supernatant was collected and incubated with
122 ExoQuick™ for 60 minutes at 4°C . The mixture of ExoQuick™/samples was centrifuged twice at

123 1,500 x *g* for 30 and 5 minutes, respectively, in order to remove the supernatant. The remained
124 pellet was resuspended in PBS (300µL) and store at -20°C. The total protein content of circulating
125 EVs was measured by the Coomassie blue method using bovine serum albumin as standard
126 (Bradford, 1976).

127 Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) and flotillin1 (FLOT1) content -a membrane-associated
128 protein that is enriched in EVs and commonly used as an EV marker -were used in order to better
129 characterize the isolated population of EVs (Théry et al., 2018). Maximizing the information
130 obtained *per* animal in compliance with ethical principles, in the present work we used the same
131 samples described in Andrade and colleagues (2018), where CD63 levels were detected. Aged
132 rats had decreased CD63 levels in plasma EVs (Student's t-test; $p < 0.05$) (de Andrade et al., 2018).

133

134 **2.3. Sizing and Quantification of Exosomes with Nanoparticle Tracking Analysis**

135 The size distributions and concentration of isolated EVs were determined using
136 Nanoparticle Tracking Analysis (NTA); NTA experiments were performed using NanoSightLM14
137 & NTA 3.2 Analytical Software (Nanosight Ltd., Amesbury, UK), following manufacturer's
138 protocol. Representative suspensions of extracellular vesicles were diluted with phosphate-
139 buffered saline solution (1:1000). The samples were put into the Nanosight sample chamber
140 with a disposable syringe and measured at room temperature for 60 s with automatic detection.
141 The suspension was irradiated by a laser source and light scattering. Images were captured by a
142 charge-coupled device camera using the same camera gain. This technique is based on the
143 tracking of Brownian motion of individual particles and determination of size according to the
144 Stokes Einstein equation.

145

146 **2.4. Western Blot for gp91phox subunit of NADPH oxidase, XO, CAT and FLOT1**

147 Western blot was performed to evaluate the gp91phox (NADPH oxidase subunit), XO, CAT
148 and FLOT1 content of the EVs (n=6 animals per group). Protein samples were prepared by adding
149 100 µl ice-cold RIPA buffer with protease inhibitor to 100 µl EVs samples (Klein et al., 1995). 2x
150 Laemmli buffer was added, and samples were vortexed and stored at -20°C until analysis.
151 Proteins (40-80µg) were separated by 10-12% polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE,
152 1.5 mm, 130 volts) and transferred to PVDF membranes (Millipore). The membrane was blocked
153 with 5% nonfat dry milk in TBS-T and then blotted with primary antibodies anti-gp91phox
154 (abcam, Cambridge, MA, USA), anti-catalase, anti-xanthine oxidase (Santa Cruz Biotechnology,
155 Santa Cruz, CA) and anti-FLOT1 (System Biosciences) overnight at 4°C. After, the membrane was
156 incubated with a secondary antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) for 2 hours at
157 room temperature. A standard molecular weight marker (RPN 800 rainbow full range Bio-Rad,
158 CA, USA) was used as a reference to determine the molecular weights of the bands. Ponceau
159 method was used for normalization (Klein et al., 1995; Romero-Calvo et al., 2010).

160

161 **2.5. Determination of Myeloperoxidase**

162 To analyze MPO activity, we used a specific detergent, Triton X-100, with a final
163 concentration of 0.1% (Osteikoetxea et al., 2015). For the reaction, a mixture of potassium
164 phosphate buffer (0.1M), 30µL of lysed EVs and 10µL of 2% ortho-dianisidine was prepared, after
165 12µL of H₂O₂ (0.01%) was added. MPO activity was determined by absorbance at 450nm. The
166 results were expressed in percentage of control and control group (young adult) was considered
167 100% of the enzymatic activity.

168

169 **2.6. Determination of Xanthine Oxidase Activity**

170 In order to evaluate XO activity, isolated EVs were lysed with a specific detergent, Triton X-
171 100, at a final concentration of 0.1% (Osteikoetxea et al., 2015). XO activity (xanthine oxidase,

172 EC1.17.3.2) was measured according to the method of Prajda and Weber (1975), where activity
173 is measured by determining uric acid from xanthine. Aliquots of lysed EVs (15µL) were incubated
174 for 30 min at 37°C in phosphate buffer (pH 7.5, 50 mM) containing xanthine (4 mM). The
175 reaction was stopped adding 20 µL 100% TCA. The mixture was then centrifuged at 4000 ×g for
176 20 min. Uric acid was determined in the supernatant by absorbance at 292 nm against a blank.

177

178 **2.7. Determination of Catalase Activity**

179 Catalase activity was measured using the method described by Aebi (1984). Previously lysed
180 EVs samples (50µL) (Osteikoetxea et al., 2015) were incubated in ethanol (10%) and triton (10%).
181 The activity was assayed at 25°C by determining the degradation rate of H₂O₂ at 240nm in 10mM
182 potassium phosphate buffer (pH 7.0). CAT activity was expressed as percentage of control and
183 the control group was considered 100% of enzyme activity.

184

185 **2.8. RNA Extraction and miRNA analysis**

186 As previously described (Cechinel et al., 2020), total RNA was extracted from total EVs using
187 SeraMir Exosome RNA Amplification Kit (System Biosciences, Mountain View, CA) according to
188 manufacturer's instructions. RNA was labeled with Affymetrix® FlashTag™ Biotin HSR RNA
189 Labeling Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA) according to standard procedures. Labeled RNA was
190 hybridized to Affymetrix GeneChip miRNA 4.0 arrays. miRNAs differentially expressed were
191 evaluated and their modulation on gene targets and canonical pathways were investigated by
192 Ingenuity Pathway Analysis (IPA). A conservative filter was applied on IPA and only
193 experimentally validated and highly conserved predicted mRNA targets for each microRNA was
194 used. In a previous work from our group IPA analysis mapped 25 differentially expressed mature
195 miRNAs based on current available target annotations, these mature miRNAs differently
196 expressed target 11,008 mRNAs (Cechinel et al., 2020). In the present study, miRNAs and their

197 predicted oxidative stress-modulated mRNA gene targets and canonical pathways related to
198 oxidative status were identified.

199

200 **2.9. Statistical analysis**

201 For data analysis we used GraphPad Prism v.6. Statistical analysis was performed using
202 Student's t-test. Differences with p-values lesser than 0.05 were considered significant. To
203 identify miRNAs that are differentially expressed between the two groups, we performed
204 analysis of variance with p-value < 0.05 and fold change of |1.1|. The canonical pathways with
205 p-value < 0.05 (Fischer's exact test) were considered statistically significant, in addition the
206 activation z-score was calculated to predict activation or inhibition of transcriptional regulators
207 (z-score > 2 or < -2).

208

209 **3. Results**

210 **3.1. Pro-oxidant machinery in circulating total EVs**

211 Circulating total EVs obtained from aged rats had significantly higher NADPH oxidase levels,
212 evaluated by gp91phox subunit content, when compared to young-adult ones (Student's t-test;
213 p=0.043, Figure 1A). In addition, aged animals showed significant higher MPO activity (Student's
214 t-test; p= 0.008, Figure 1B). Lower content and activity of XO were observed in total EVs obtained
215 from aged rats compared to young-adult ones (Student's t-test; respectively, p= 0.040, Figure
216 2A; p=0.024, Figure 2B).

217

218 **3.2. Antioxidant machinery in circulating total EVs**

219 Total EVs obtained from 21-month-old rats had reduced CAT activity (Student's t-test;
220 p<0.01, Figure 3A). However, there was no significant difference in CAT content (Student's t-
221 test; p=0.338, Figure 3B). This might indicate that a diminished antioxidant activity in EVs from

222 aged rats contributes to a global oxidative stress, suggesting an imbalance between production
223 of reactive species and antioxidant defense activity in EVs during aging process.

224

225 **3.3.Oxidative stress signaling pathways are predicted to be impacted by age-associated** 226 **circulating total EVs miRNA profile**

227 The effects of age-related EV miRNA profile on oxidative stress signaling pathways were
228 investigated using IPA. In this context, canonical pathways predicted to be modified in aged
229 animals when compared to young adult group are shown in Table 1. IPA analysis showed that
230 antioxidant action of vitamin C ($p=0.0059$, $z\text{-score}=-3$) and production of reactive species in
231 macrophages ($p=0.0309$, $z\text{-score}= 2,138$) are ranked as canonical pathway impacted by
232 differentially expressed miRNAs in aging process. Moreover, those canonical pathways are
233 downregulated and upregulated, respectively (Table 1).

234 25 differentially expressed mature miRNAs are predicted to target molecules in canonical
235 pathways directly related to oxidative status. We observed that 22 miRNAs putatively target 59
236 different components in antioxidant action of vitamin C (Table S1A) while in production of
237 reactive species in macrophages signaling pathway, 25 miRNAs target 120 molecules (Table
238 S1B). Interestingly, let-7a-5p was the top upstream regulator impacting main predicted
239 canonical pathway targets by IPA, except directly MPO (Table 2; Table S2). Figure 4 highlights
240 important targets of both signaling pathway discussed here.

241 Main predicted targets of let-7a-5p in antioxidant action of vitamin C pathway, are
242 glutaredoxin (GLRX), phospholipases (PLA, PLC, PLD) and p38 MAPK, which is also a miR-410-5p
243 target (Figure 4A). In addition, kinases, such as IKK (CHUK) are listed in both canonical pathways
244 as targets of different miRNAs, namely, let-7a-5p and miR-34a-5p. Notably, these molecules can
245 be related to NF- κ B cascade what contribute to a pro-oxidant status in aged animals.

246 Regarding production of reactive species in macrophages canonical pathway we observe
247 that let-7a-5p and miR-199a-3p target arginase 2 (ARG2). Besides that, PPP1R7 and PPP2R2A
248 control cellular process and are predicted targets of let7a-5p, miR-17-5p, miR-199a-3p (Figure
249 4B).

250

251 **3.4. Characterization of isolated EVs**

252 The characterization of isolated extracellular vesicles was performed using specific marker,
253 FLOT1 (Lee et al., 2011; Fröhlich et al., 2014), and NTA parameters, such as size distribution and
254 concentration. There was no significant difference between EVs obtained from young-adult and
255 aged rats in relation to FLOT1 content (Student's t-test; $p=0.485$, Figure 5A). The size distribution
256 data indicated that isolated EVs contain a heterogeneous population by NTA analysis (Figure 5B,
257 5C). No significant differences in EVs size distribution or concentration were observed between
258 EVs obtained from young-adult and aged rats (respectively; $p=0.698$, $p=0.407$, Student's t-test;
259 Table 3).

260

261 **4. Discussion**

262 Our results support the hypothesis that the aging process alters redox machinery in
263 circulating total EVs and suggest an imbalance between pro- and antioxidant molecules,
264 including miRNAs changes, in favor of oxidative stress that has been widely linked to
265 physiological aging and age-related diseases. EVs have gained attention as emerging players in
266 cell-cell communication in several biological process, and their role has been considered in
267 several pathophysiological conditions. However, the impact of aging process on circulating EVs
268 cargo is rarely exploited.

269 NADPH oxidase levels were increased in circulating total EVs obtained from aged rats,
270 suggesting that NADPH oxidase superoxide-generating system is involved with previous findings,

271 specifically higher reactive species levels, evaluated by DCF assay, in circulating EVs from 21- and
272 26-month-old rats compared to young-adults ones (Bertoldi et al., 2018). Considering that
273 NADPH oxidase levels were augmented, it is possible to suggest superoxide anion production as
274 the major reactive species in circulating total EVs from aged animals. Although we cannot
275 exclude the oxidative stress in tissues and organs as a circulating reactive species source in EVs,
276 its intrinsic production, specifically NADPH oxidase, seems to play a central role in age-related
277 oxidative status. Our results can be associated, at least in part, to age-related diseases linked
278 to oxidative stress, therefore, we can suggest that EVs cargo could contribute to worsening
279 or spreading several physiopathology, including NADPH oxidase and myeloperoxidase, in aging
280 process. In this context, exosomes derived from macrophages containing functional NOX2 were
281 incorporated in axons via endocytosis, affecting the axonal signaling (Hervera et al., 2018),
282 supporting that EVs can distribute and provide NADPH oxidase to target cells.

283 Different approaches have indicated MPO as cargo into polymorphonuclear (PMN) cells-
284 derived EVs; it depends on their content and target tissue, both anti- and pro-inflammatory
285 functions have been reported, modulating adjacent tissue function and immune factors (Slater
286 et al., 2017). Activated neutrophils seem to mobilize and then release MPO in EVs (Hiemstra et
287 al., 2014; Slater et al., 2017). Pitanga and colleagues (2014) showed that activated neutrophils-
288 derived EVs, when incubated with cultivated human umbilical vein endothelial cells in presence
289 of hydrogen peroxide and chloride ion, induced endothelial cell damage with a similar pattern
290 of conditions of neutrophil activation, such as vasculitis and sepsis, showing the central role of
291 these EVs in tissue injury induced by PMN. In accordance, PMN-derived EVs are able to produce
292 reactive oxygen species and pro-inflammatory mediators, such as leukotriene B4 (Pitanga et al.,
293 2014). Considering that both NADPH oxidase and myeloperoxidase are involved with production
294 of reactive oxygen species in PMN cells, called as respiratory burst (or oxidative burst), it is

295 possible to infer the role of circulating EVs spreading respiratory burst machinery in aging
296 process.

297 In addition, although it is impossible to determine exactly the circulating EVs source, since
298 EVs are able to travel large distances, MPO cargo can indicate that PMN are potential cellular
299 source. However, endothelial cells can be related to our findings; *in vitro* ischemia increased
300 NADPH oxidase in endothelial-derived EVs (Jansen et al., 2013) and NADPH oxidase subunits
301 were previously showed in platelet-derived EVs (Janiszewski et al., 2004), indicating that several
302 cells are all potential sources of EVs in our work.

303 XO machinery seems not be involved with previously reported higher reactive species levels
304 (Bertoldi et al., 2018), because XO activity and content were reduced in circulating EVs from
305 aged rats. Besides, we could suggest that XO in total EVs is not related to aging-induced
306 hyperuricemia, a well-known risk factor for gout, hypertension, and diabetes. To our knowledge,
307 XO content and activity in circulating EVs were directly analyzed here for the first time; a
308 pharmacological approach (inhibitors) has been used to identify the XO system role on reactive
309 species generation in EVs. Some works have refused the central role of XO as reactive species
310 generating system in EVs (Janiszewski et al., 2004; Burger et al., 2012); XO inhibitors did not
311 impact the profile of platelet-derived EVs from septic patients (Janiszewski et al., 2004). In
312 contrast, the concomitant incubation of endothelial cells with XO inhibitor and apoptotic T cells-
313 derived EVs altered reactive oxygen species production (Mostefai et al., 2008). It is relevant to
314 point out the aging effect on total XO activity, Aranda and colleagues (2007) reported an
315 increase in plasma, skeletal muscle and aorta from aged rats, as well as in plasma of elderly.
316 Taken that, EVs seems to be involved in biomolecule clearance systems (Mendelsohn and
317 Larrick, 2013), a failure of cellular waste disposal processes can be considered (Terman and
318 Brunk, 2004; Johnstone et al., 1991).

319 In order to better comprehend the impact of aging process on redox machinery in circulating
320 EVs, antioxidant defense was evaluated as well. It was previously reported the SOD content and
321 activity in circulating total EVs from 21- and 26-month-old rats (Bertoldi et al., 2018). Lower CAT
322 activity in circulating EVs from aged animals is another remarkable finding; we can infer a lesser
323 protective molecules exchange. To our knowledge this is the first work describing CAT activity
324 and content in circulating EVs during normal aging process. It is important to note that all
325 mentioned studies evaluated EVs from *in vitro* and pathological models. Interestingly, a growing
326 body of evidence has identified CAT in EVs of different cell types, such as, mesenchymal stem
327 cells (MSCs), macrophage and oligodendrocytes (Fröhlich et al., 2014; de Godoy et al., 2018;
328 Haney et al., 2015). A recent work evaluated the neuroprotective potential of EVs from MSCs
329 using an *in vitro* model of Alzheimer Disease and reported that MSC-derived EVs were able to
330 reduce reactive oxygen species levels in neuronal cell culture (de Godoy et al., 2018). It is
331 possible that our result can reflect the tissue CAT activity (Siqueira et al., 2005; Haney et al.,
332 2015). Therefore, we suggest that impaired antioxidant enzymes activities contribute to global
333 oxidative stress in older animals.

334 In addition, differently expressed microRNAs in circulating total EVs have a potential to
335 impact oxidative stress signaling pathways. Antioxidant action of Vitamin C pathway is predicted
336 to be downregulated, what contribute to the pro-oxidant status observed in aged animals, since
337 its antioxidant action to protect cellular components from free radical damages is reduced
338 (Beyer et al., 1994). let 7a-5p impact main predicted targets in this pathway, such as glutaredoxin
339 (GLRX), phospholipases (PLA, PLC, PLD). Considering that let 7a-5p is downregulated we can infer
340 an upregulation of phospholipases. Touyz and Schiffrin (2001) showed that activation of PLD was
341 associated with Ang II-induced generation of vascular reactive oxygen species, mainly due to
342 NOX activity. It was reported that reactive species can mediate the activation of p38 MAPK in
343 different cell types, such as fibroblasts, and endothelial cells (McCubrey et al., 2006; Klotz et al.,

344 2000), notably, let7a-5p and miR-410-5p target p38 MAPK. Interestingly, Wenzel and colleagues
345 (2001) showed that angiotensin II-dependent activation of p38 MAPK was inhibited by vitamin
346 C, in addition, authors reported that inhibition of NADPH oxidase complex was unable to induce
347 p38 MAPK.

348 It is interesting to point out that kinases, such as IKK (CHUK) are listed in both canonical
349 pathways as targets of different miRNAs, namely, let-7a-5p and miR-34a-5p. Predicted
350 upregulation of IKK, the core element of the NF- κ B cascade, can be relevant since increased
351 vascular IKK-NF- κ B activation was observed with aging in previous studies (Csiszar et al., 2008;
352 Zou et al., 2006; Adler et al., 2007), and NF- κ B activation also have a pro-oxidant role (Anrather
353 et al. 2006). Additionally, upregulation of CHUK might be related to chondrocyte hypertrophy
354 and matrix remodeling, which contribute to osteoarthritis, a known aging-related disorder
355 (Culley et al., 2019).

356 The modulation of heme oxygenase 1 (HMOX1), a key cytoprotective enzyme, has been
357 predicted by age-induced let-7 changes in circulating total EVs. Interestingly, let-7 directly
358 regulates Bach1 mRNA that translationally represses HMOX1 expression; consequently let-7
359 leads to HMOX1 up-regulation (Hou et al., 2012). Circulating total EVs miRNA, especially let-7a-
360 5p downregulation, predicted to upregulate the repressor of HMOX1, in aged animals. Moreover
361 let7a-5p and miR-199a-3p target arginase 2 (ARG2) in production of reactive species in
362 macrophages canonical pathway. It was already reported that miR-199a-3p and let-7a-5p
363 regulate ARG2 gene expression in in vitro models. Other main targets in production of reactive
364 species in macrophages canonical pathway are phosphatases, which are known to control
365 diverse cellular process, kinase cascade, cell growth, and apoptosis (Huang et al., 2015); PPP1R7
366 and PPP2R2A are predicted to be regulated by let-7a-5p, miR-17-5p, miR-199a-3p. Besides that,
367 Rho family small GTPases (RHOB, RHOG), predicted to be upregulate, are essential for activation
368 of NOX family in animals (Miyano and Sumimoto, 2012). Engedal and colleagues (2018) reviewed

369 the published findings about oxidative stress-dependent miRNAs expression and described that
370 13 miRNAs are modulated by oxidative stress, specially using culture cells exposed to oxidants,
371 among them let-7, miR-22, miR-128, miR-143 have been impacted in circulating total EVs by
372 aging.

373 EVs cargo seems to be influenced by aging process, instead of size distribution profile
374 evaluated by NTA parameters in accordance with Eitan et al. (2017). An important point to be
375 noted is that despite NTA has been widely used to characterize EVs; some limitations have been
376 described, such as sample adherence to the chamber and tubing (Gardiner et al., 2013),
377 overlaying effect, where larger vesicles can cover smaller ones and, related to that, NTA is unable
378 to distinguish EV aggregates from large EVs (Gardiner et al., 2013; Szatanek et al., 2017).
379 Although it is hard to determine the purity of isolated EVs, several studies proposed that the
380 isolation method here utilized is one of the best methods (Helwa et al., 2017; Martins et al.,
381 2018; Serrano-Pertierra et al., 2019). In this scenario, it is impossible to exclude the possibility
382 of co-isolation of EVs containing some degree of larger vesicles and other blood components
383 such as lipoproteins of similar size. However, Davidson et al. (2017) proposed that there is no
384 perfect method to isolate and purify exosomes.

385 Our data about pro-oxidant machineries and miRNAs profile in circulating EVs can be
386 involved with hypothesis that EVs fraction is associated with age-related phenotypes
387 (Prattichizzo et al., 2019). Circulating EVs isolated from young animals have been injected in
388 aged ones; EVs obtained from young female mice increased the lifespan of 26-month-old ones
389 (Yoshida et al., 2019). In addition, Lee and colleagues (2018) showed that the administration of
390 exosomes obtained from young mice altered aging-associated molecules expression pattern in
391 aged mice. Interestingly, these authors used a commercially available isolation kit as well;
392 consequently, we could suggest a similar EVs population in our work.

393 In this study, we provide evidence that the aging process can impact pro-oxidant and
394 antioxidant molecules in circulating total EVs, specifically impaired NADPH oxidase content,
395 MPO activity and miRNAs that target oxidative stress pathways. Moreover, EVs cargo, instead
396 of size distribution profile, seems to be altered by aging process. Our results give insights and
397 provide exciting lines of evidence about the redox imbalance in EVs during aging process; in
398 addition, it might open new avenues for further studies such as the role of EVs subpopulations.

399

400 **Compliance with Ethical Standards**

401 All institutional and national guidelines for the care and use of laboratory animals were
402 followed. The Local Ethics Committee (CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais – UFRGS;
403 nr.29818) approved all animal procedures and experimental conditions.

404

405 **Acknowledgements**

406 This was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
407 fellowships (I.R. Siqueira; A. Belló-Klein; Dr. A.S. Araujo; L.R. Cechinel; G.B. Corssac; A.R.
408 Massensini) and in part, by grant 401216/2014-4. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal
409 de Nível Superior (CAPES) fellowships: G.E.Bruch; L.R. Cechinel (Finance Code 001 –
410 88881.189257/2018-01).

411

412 **Conflict of Interest**

413 The authors declare that they have no conflict of interest.

414

415 **References**

416 Adler, A. S., Sinha, S., Kawahara, T. L., Zhang, J. Y., Segal, E., & Chang, H. Y. (2007). Motif module
417 map reveals enforcement of aging by continual NF- κ B activity. *Genes & development*,
418 21(24), 3244-3257.

419 Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-6. <https://doi.org/10.1016/S0076->
420 6879(84)05016-3

421 Anrather, J., Racchumi, G., & Iadecola, C. (2006). NF- κ B regulates phagocytic NADPH oxidase by
422 inducing the expression of gp91phox. *Journal of Biological Chemistry*, 281(9), 5657-5667.

423 Aranda, R., Doménech, E., Diana Rus, A., Real, J. T., Sastre, J., Viña, J., & Pallardó, F. V. (2007).
424 Age-related increase in xanthine oxidase activity in human plasma and rat tissues. *Free*
425 *radical research*, 41(11), 1195-1200. <https://doi.org/10.1080/10715760701481461>

426 Bertoldi, K., Cechinel, L. R., Schallenger, B., Corssac, G. B., Davies, S., Guerreiro, I. C. K., ... &
427 Siqueira, I. R. (2018). Circulating extracellular vesicles in the aging process: impact of
428 aerobic exercise. *Molecular and cellular biochemistry*, 440(1-2), 115-
429 125. <https://doi.org/10.1007/s11010-017-3160-4>.

430 Beyer, R. E. (1994). The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: interaction
431 with vitamin E and coenzyme Q. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 26(4), 349-
432 358.

433 Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
434 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*,
435 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

436 Brandes, R. P., & Schröder, K. (2008). Composition and functions of vascular nicotinamide
437 adenine dinucleotide phosphate oxidases. *Trends in cardiovascular medicine*, 18(1), 15-
438 19.

439 Brodsky, S. V., Zhang, F., Nasjletti, A., & Goligorsky, M. S. (2004). Endothelium-derived
440 microparticles impair endothelial function in vitro. *American Journal of Physiology-Heart*
441 *and Circulatory Physiology*, 286(5), H1910-
442 H1915. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01172.2003>

443 Burger, D., Kwart, D. G., Montezano, A. C., Read, N. C., Kennedy, C. R., Thompson, C. S., & Touyz,
444 R. M. (2012). Microparticles Induce Cell Cycle Arrest Through Redox-Sensitive Processes
445 in Endothelial Cells: Implications in Vascular Senescence. *Journal of the American Heart*
446 *Association*, 1(3), e001842. <https://doi.org/10.1161/JAHA.112.001842>.

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

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

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

454 Davies, S. M., Poljak, A., Duncan, M. W., Smythe, G. A., & Murphy, M. P. (2001). Measurements
455 of protein carbonyls, ortho-and meta-tyrosine and oxidative phosphorylation complex
456 activity in mitochondria from young and old rats. Free Radical Biology and Medicine,
457 31(2), 181-190.

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

462 de Godoy, M. A., Saraiva, L. M., de Carvalho, L. R., Vasconcelos-dos-Santos, A., Beiral, H. J.,
463 Ramos, A. B., ... & de Araujo-Silva, C. A. (2018). Mesenchymal stem cells and cell-derived
464 extracellular vesicles protect hippocampal neurons from oxidative stress and synapse
465 damage induced by amyloid- β oligomers. Journal of Biological Chemistry, 293(6), 1957-
466 1975. <https://10.1074/jbc.M117.807180>.

467 Diaz, B., Shani, G., Pass, I., Anderson, D., Quintavalle, M., & Courtneidge, S. A. (2010). Tks5-
468 dependent, nox-mediated generation of reactive oxygen species is necessary for
469 invadopodia formation. Sci. Signal., 2(88), ra53-ra53.

470 Dođru-Abbasođlu, S., Tamer-Toptani, S., Uđurnal, B., Kocak-Toker, N., Aykac-Toker, G., &Uysal,
471 M. (1997). Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in livers and brains of aged rats.
472 Mechanisms of ageing and development, 98(2), 177-180.

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

475 Eiserich, J. P., Baldus, S., Brennan, M. L., Ma, W., Zhang, C., Tousson, A., ... & Freeman, B. A.
476 (2002). Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. Science, 296(5577),
477 2391-2394.

478 Eitan E, Green J, Bodogai M, Mode NA, Bæk R, Jørgensen MM, Freeman DW, Witwer KW,
479 Zonderman AB, Biragyn A, Mattson MP, Noren Hooten N, Evans MK: Age-Related Changes
480 in Plasma Extracellular Vesicle Characteristics and Internalization by Leukocytes. Sci Rep
481 2017; 2;7(1):1342.

482 Engedal, N., Źerovnik, E., Rudov, A., Galli, F., Olivieri, F., Procopio, A. D., ... & Albertini, M. C.
483 (2018). From oxidative stress damage to pathways, networks, and autophagy via
484 microRNAs. Oxidative medicine and cellular longevity, 2018.

485 Evans, P. H. (1993). Free radicals in brain metabolism and pathology. *British medical bulletin*,
486 49(3), 577-587.

487 Friedman, R. C., Farh, K. K. H., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are
488 conserved targets of microRNAs. *Genome research*, 19(1), 92-105.

489 Fröhlich, D., Kuo, W. P., Frühbeis, C., Sun, J. J., Zehendner, C. M., Luhmann, H. J., ... & Krämer-
490 Albers, E. M. (2014). Multifaceted effects of oligodendroglial exosomes on neurons:
491 impact on neuronal firing rate, signal transduction and gene regulation. *Philosophical*
492 *Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1652),
493 20130510. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0510>.

494 Gardiner, C., Ferreira, Y. J., Dragovic, R. A., Redman, C. W., & Sargent, I. L. (2013). Extracellular
495 vesicle sizing and enumeration by nanoparticle tracking analysis. *Journal of extracellular*
496 *vesicles*, 2(1), 19671. <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.19671>

497 Haney, M. J., Klyachko, N. L., Zhao, Y., Gupta, R., Plotnikova, E. G., He, Z., ... & Batrakova, E. V.
498 (2015). Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy. *Journal of*
499 *Controlled Release*, 207, 18-30. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.03.033>.

500 Helwa, I., Cai, J., Drewry, M. D., Zimmerman, A., Dinkins, M. B., Khaled, M. L., ... & Hamrick, M.
501 W. (2017). A comparative study of serum exosome isolation using differential
502 ultracentrifugation and three commercial reagents. *PloS one*, 12(1),
503 e0170628. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170628>.

504 Hervera, A., De Virgiliis, F., Palmisano, I., Zhou, L., Tantardini, E., Kong, G., ... & Kapustin, A. N.
505 (2018). Reactive oxygen species regulate axonal regeneration through the release of
506 exosomal NADPH oxidase 2 complexes into injured axons. *Nature cell biology*, 20(3),
507 307. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0039-x>.

508 Hiemstra, T. F., Charles, P. D., Gracia, T., Hester, S. S., Gatto, L., Al-Lamki, R., ... & Frankl, F. E. K.
509 (2014). Human urinary exosomes as innate immune effectors. *Journal of the American*
510 *Society of Nephrology*, 25(9), 2017-2027.

511 Hou, W., Tian, Q., Steuerwald, N. M., Schrum, L. W., & Bonkovsky, H. L. (2012). The let-7
512 microRNA enhances heme oxygenase-1 by suppressing Bach1 and attenuates oxidant
513 injury in human hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory*
514 *Mechanisms*, 1819(11-12), 1113-1122.

515 Hong, Y., Eleftheriou, D., Hussain, A. A., Price-Kuehne, F. E., Savage, C. O., Jayne, D., ... & Brogan,
516 P. A. (2012). Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies stimulate release of neutrophil
517 microparticles. *Journal of the American Society of Nephrology*, 23(1), 49-62.

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

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

523 Janiszewski, M., do Carmo, A. O., Pedro, M. A., Silva, E., Knobel, E., & Laurindo, F. R. (2004).
524 Platelet-derived exosomes of septic individuals possess proapoptotic NAD (P) H oxidase
525 activity: A novel vascular redox pathway. *Criticalcare medicine*, 32(3), 818-825.[https://](https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000114829.17746.19)
526 [10.1097/01.CCM.0000114829.17746.19](https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000114829.17746.19)

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

531 Johnstone, R. M., Mathew, A., Mason, A. B., & Teng, K. (1991). Exosome formation during
532 maturation of mammalian and avian reticulocytes: evidence that exosome release is a
533 major route for externalization of obsolete membrane proteins. *Journal of cellular*
534 *physiology*, 147(1), 27-36.<https://doi.org/10.1002/jcp.1041470105>

535 Klein, D., Kern, R. M., & Sokol, R. Z. (1995). A method for quantification and correction of proteins
536 after transfer to immobilization membranes. *Biochemistry and molecular biology*
537 *international*, 36(1), 59-66.

538 Klotz, L. O., Briviba, K., & Sies, H. (2000). Signaling by singlet oxygen in biological systems (pp. 3-
539 20). Academic: San Diego, CA.

540 Lee, B. R., Kim, J. H., Choi, E. S., Cho, J. H., & Kim, E. (2018). Effect of young exosomes injected in
541 aged mice. *International journal of nanomedicine*, 13, 5335.

542 Lee, T. H., D'Asti, E., Magnus, N., Al-Nedawi, K., Meehan, B., & Rak, J. (2011). Microvesicles as
543 mediators of intercellular communication in cancer—the emerging science of cellular
544 'debris'. In *Seminars in immunopathology* (Vol. 33, No. 5, pp. 455-467). Springer-
545 Verlag.[https://10.1007/s00281-011-0250-3](https://doi.org/10.1007/s00281-011-0250-3).

546 Lu, N., Xie, S., Li, J., Tian, R., & Peng, Y. Y. (2015). Myeloperoxidase-mediated oxidation targets
547 serum apolipoprotein AI in diabetic patients and represents a potential mechanism
548 leading to impaired anti-apoptotic activity of high density lipoprotein. *Clinica Chimica*
549 *Acta*, 441, 163-170.

550 Martins, T. S., Catita, J., Rosa, I. M., e Silva, O. A. D. C., & Henriques, A. G. (2018). Exosome
551 isolation from distinct biofluids using precipitation and column-based approaches. *PLoS*
552 *one*, 13(6), e0198820.

553 McCubrey, J. A., LaHair, M. M., & Franklin, R. A. (2006). Reactive oxygen species-induced
554 activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antioxidants & redox signaling*, 8(9-10),
555 1775-1789.

556 Mendelsohn, A. R., & Larrick, J. W. (2013). Sleep facilitates clearance of metabolites from the
557 brain: glymphatic function in aging and neurodegenerative diseases. *Rejuvenation*
558 *research*, 16(6), 518-523. <https://10.1089/rej.2013.1530>.

559 Miyano, K., & Sumimoto, H. (2012). Assessment of the role for Rho family GTPases in NADPH
560 oxidase activation. In *Rho GTPases* (pp. 195-212). Springer, New York, NY.

561 Mostefai, H. A., Agouni, A., Carusio, N., Mastronardi, M. L., Heymes, C., Henrion, D., ... &
562 Martinez, M. C. (2008). Phosphatidylinositol 3-kinase and xanthine oxidase regulate nitric
563 oxide and reactive oxygen species productions by apoptotic lymphocyte microparticles in
564 endothelial cells. *The Journal of Immunology*, 180(7), 5028-
565 5035. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.7.5028>

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

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

571 Osteikoetxea, X., Sódar, B., Németh, A., Szabó-Taylor, K., Pálóczi, K., Vukman, K. V., ... & Buzás,
572 E. I. (2015). Differential detergent sensitivity of extracellular vesicle subpopulations.
573 *Organic & biomolecular chemistry*, 13(38), 9775-9782. <https://10.1039/c5ob01451d>.

574 Pitanga, T. N., de Aragão França, L., Rocha, V. C. J., Meirelles, T., Borges, V. M., Gonçalves, M. S.,
575 ... & dos-Santos, W. L. C. (2014). Neutrophil-derived microparticles induce
576 myeloperoxidase-mediated damage of vascular endothelial cells. *BMC cell biology*, 15(1),
577 1-10.

578 Prajda, N., & Weber, G. (1975). Malignant transformation-linked imbalance: decreased xanthine
579 oxidase activity in hepatomas. *FEBS letters*, 59(2), 245-249. [https://doi.org/10.1016/0014-](https://doi.org/10.1016/0014-5793(75)80385-1)
580 [5793\(75\)80385-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(75)80385-1)

581 Prattichizzo, F., Giuliani, A., Sabbatinelli, J., Mensà, E., De Nigris, V., La Sala, L., ... & Ceriello, A.
582 (2019). Extracellular vesicles circulating in young organisms promote healthy longevity.
583 *Journal of extracellular vesicles*, 8(1), 1656044.

584 Romero-Calvo, I., Ocón, B., Martínez-Moya, P., Suárez, M. D., Zarzuelo, A., Martínez-Augustin,
585 O., & de Medina, F. S. (2010). Reversible Ponceau staining as a loading control alternative
586 to actin in Western blots. *Analytical biochemistry*, 401(2), 318-320.[https://](https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.02.036)
587 10.1016/j.ab.2010.02.036.

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

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

594 Slater, T. W., Finkielstein, A., Mascarenhas, L. A., Mehl, L. C., Butin-Israeli, V., & Sumagin, R.
595 (2017). Neutrophil microparticles deliver active myeloperoxidase to injured mucosa to
596 inhibit epithelial wound healing. *The Journal of immunology*, 198(7), 2886-2897.

597 Szatanek, R., Baj-Krzyworzeka, M., Zimoch, J., Lekka, M., Siedlar, M., & Baran, J. (2017). The
598 methods of choice for extracellular vesicles (EVs) characterization. *International journal*
599 *of molecular sciences*, 18(6), 1153. <https://doi.org/10.3390/ijms18061153>

600 Terman, A., &Brunk, U. T. (2004). Aging as a catabolic malfunction. *The international journal of*
601 *biochemistry & cell biology*, 36(12), 2365-2375.
602 <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.03.009>

603 Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., ...
604 &Ayre, D. C. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018
605 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles
606 and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of extracellular vesicles*, 7(1), 1535750.

607 Touyz, R. M., & Schiffrin, E. L. (2001). Increased generation of superoxide by angiotensin II in
608 smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients: role of
609 phospholipase D-dependent NAD (P) H oxidase-sensitive pathways. *Journal of*
610 *hypertension*, 19(7), 1245-1254.

611 Wenzel, S., Taimor, G., Piper, H. M., & Schlüter, K. D. (2001). Redox-sensitive intermediates
612 mediate angiotensin II-induced p38 MAP kinase activation, AP-1 binding activity, and TGF-
613 β expression in adult ventricular cardiomyocytes. *The FASEB Journal*, 15(12), 2291-2293.

614 Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R. M., Andreu, Z., BedinaZavec, A., Borràs, F. E., Buzas, E. I., ... &Colás,
615 E. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions.
616 *Journal of extracellular vesicles*, 4(1), 27066.[https://10.3402/jev.v4.27066](https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066).

617 Yoshida, M., Satoh, A., Lin, J. B., Mills, K. F., Sasaki, Y., Rensing, N., ... & Imai, S. I. (2019).
618 Extracellular Vesicle-Contained eNAMPT Delays Aging and Extends Lifespan in Mice. Cell
619 metabolism.
620 Zhang, M., Perino, A., Ghigo, A., Hirsch, E., & Shah, A. M. (2013). NADPH oxidases in heart failure:
621 poachers or gamekeepers?. Antioxidants & redox signaling, 18(9), 1024-1041.
622 Zou, Y., Yoon, S., Jung, K. J., Kim, C. H., Son, T. G., Kim, M. S., ... & Chung, H. Y. (2006).
623 Upregulation of aortic adhesion molecules during aging. The Journals of Gerontology
624 Series A: Biological Sciences and Medical Sciences, 61(3), 232-244.

625

626 **Figures legends.**

627 **Fig. 1.** Effect of aging process on pro-oxidant markers in circulating extracellular vesicles from
628 *Wistar* rats, of 3- and 21-month-old. Columns represent the mean \pm SD; representative images
629 from gel of Western Blot experiments, showing 3 bands for each experimental group. Student's
630 t-test; *significantly different from young-adults, $p < 0.05$. (A) NADPH oxidase content (n=6); (B)
631 MPO activity (n=9).

632 **Fig. 2.** Effect of aging process on xanthine oxidase (A) content (n=6) and (B) activity (n=9) in
633 circulating extracellular vesicles from *Wistar* rats, of 3- and 21-month-old. Columns represent
634 the mean \pm SD; representative images from gel of Western Blot experiments, showing 3 bands
635 for each experimental group. Student's t-test; *significantly different from young-adults, $p < 0.05$.

636 **Fig. 3.** Effect of aging process on catalase (A) content (n=6) and (B) activity (n=9) in circulating
637 extracellular vesicles from *Wistar* rats, of 3- and 21-month-old. Columns represent the mean \pm
638 SD; representative images from gel of Western Blot experiments, showing 3 bands for each
639 experimental group. Student's t-test; *significantly different from young-adults, $p < 0.05$.

640 **Fig. 4.** Canonical pathways predicted to be targeted by the differently expressed miRNAs in total
641 circulating EVs. The canonical pathways relevant and ranked as targets for the miRNAs in total
642 EVs from aged animals compared to those from young adult ones. miRNAs targeting the main
643 genes are listed in each box. (A) antioxidant action of vitamin C; (B) production of reactive

644 species in macrophages. Pathway analyses adapted from ingenuity pathway analysis software
645 (Qiagen, Inc.)

646 **Fig. 5.** (A) Effect of aging process on FLOT1 content in circulating extracellular vesicles from
647 *Wistar* rats, of 3- and 21-month-old. The columns represent the mean \pm SD. Representative
648 images from gel of Western Blot experiments, showing 3 bands for each experimental group.
649 Student's t-test; $p < 0.05$ ($n=6$). Representative data of NTA analysis showing size distribution
650 profile and concentration of circulating EVs from (B) young-adult (3-month-old) and (C) aged
651 (21-month-old) *Wistar* rats ($n=9$). Student's t-test; $p < 0.05$

652

653 **Table caption**

654 **Table 1.** Oxidative stress related signaling canonical pathways.

655 **Table 2.** Main predicted targets in canonical pathways for the 25 differently expressed miRNAs.

656 **Table 3.** Characterization of Circulating Extracellular Vesicles.

657

658 **Supplemental Material**

659 **Table S1.** Predicted targets in canonical pathways related to oxidative stress impacted by the
660 differently expressed miRNAs.

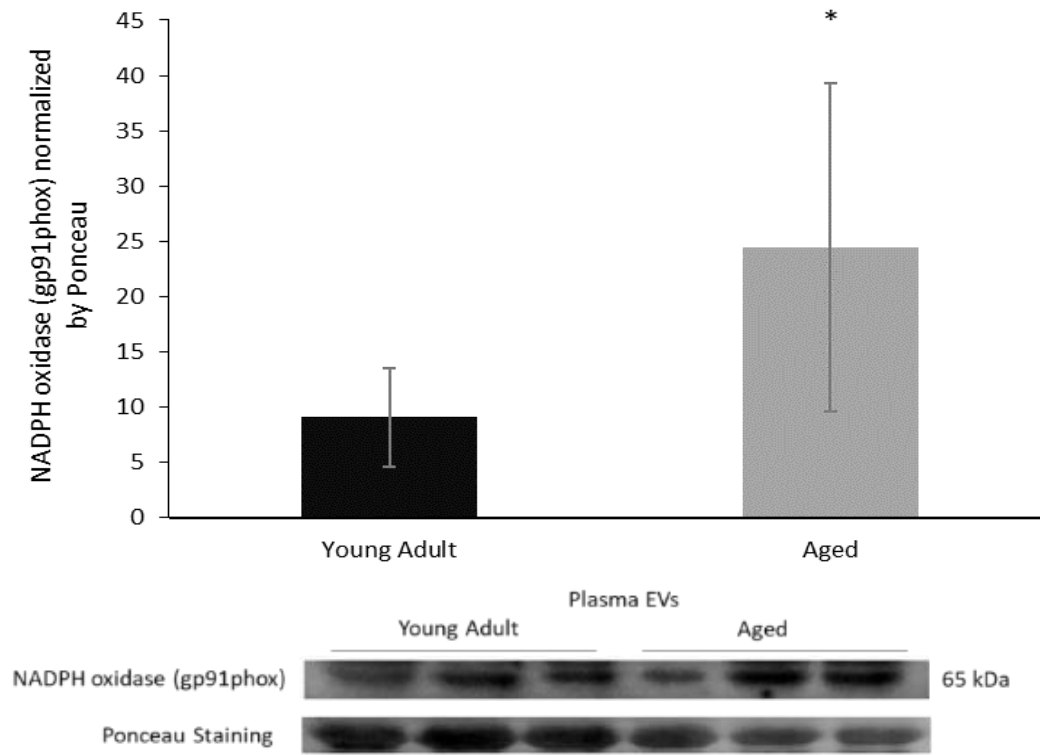
661 **Table S2.** Canonical pathways and characteristics of main targets of differently expressed
662 miRNAs.

663

664

Fig. 1.

A.



B.

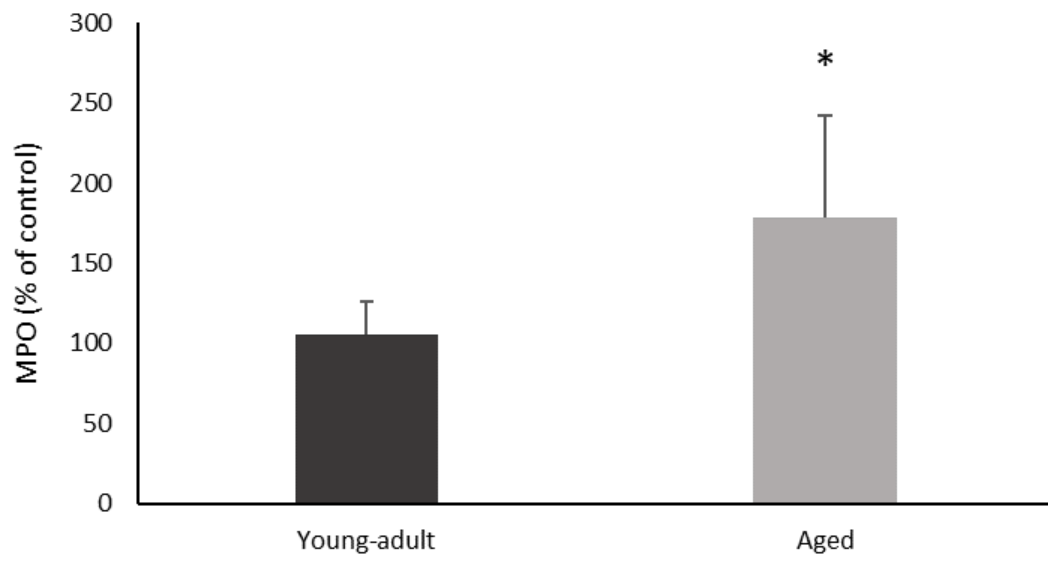
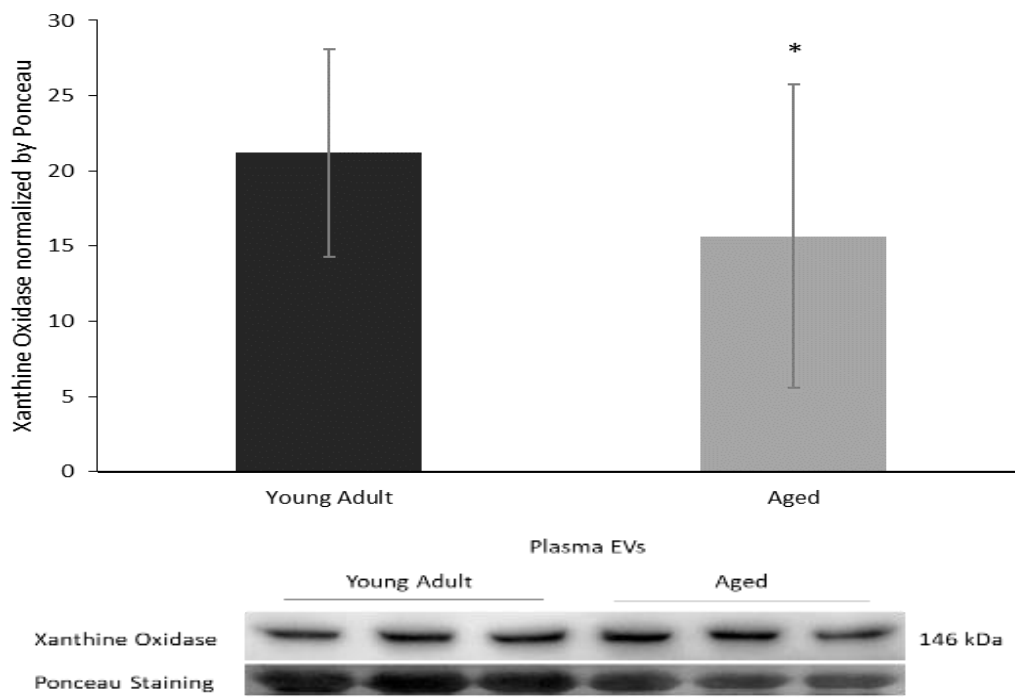


Fig. 2.

A.



B.

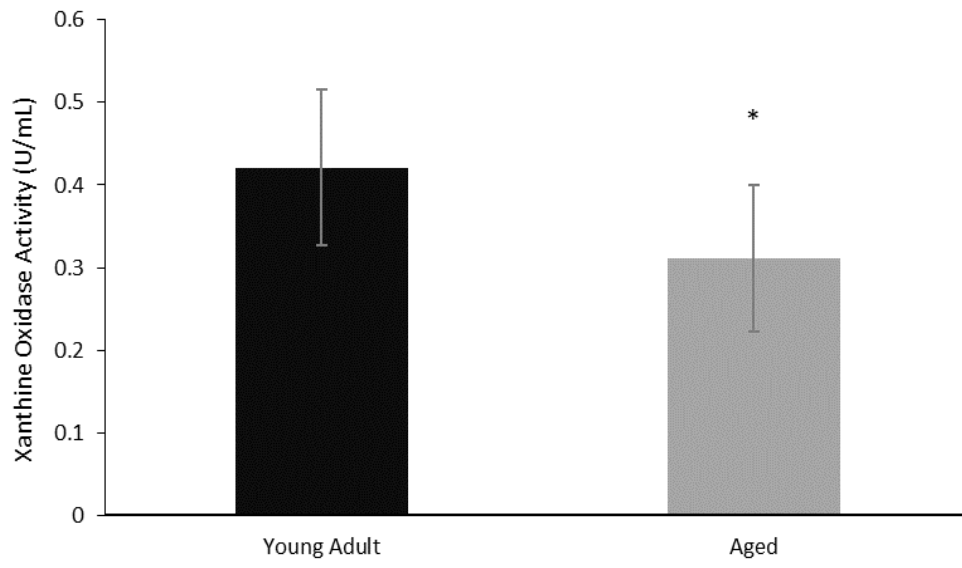
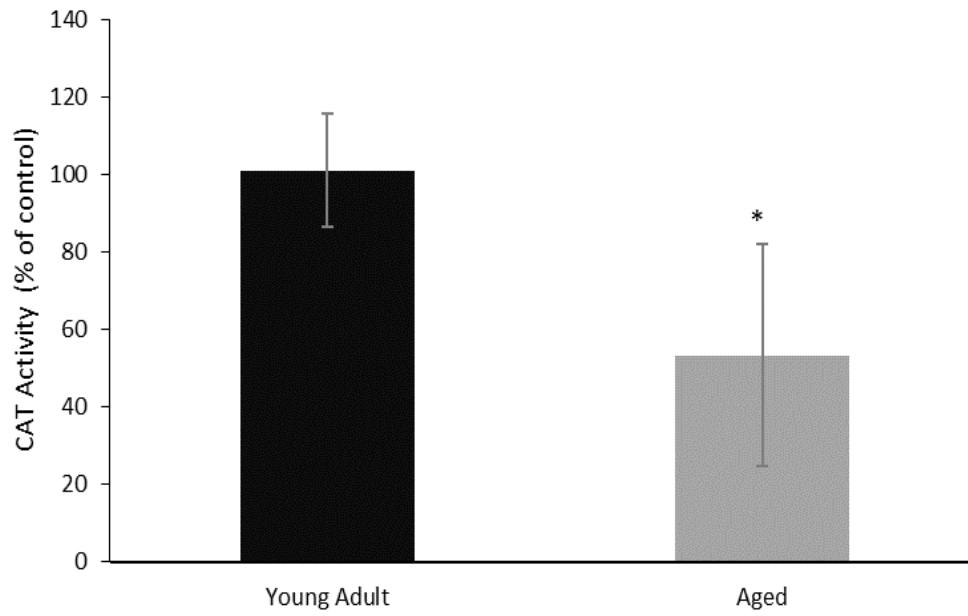


Fig 3.

A.



B.

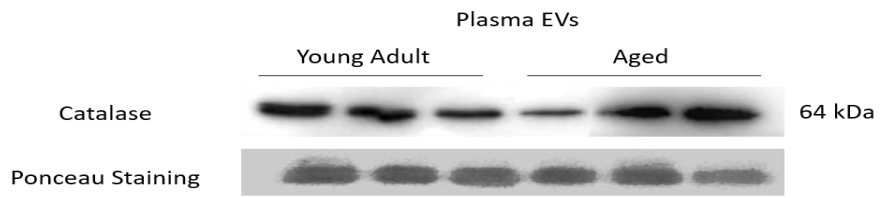
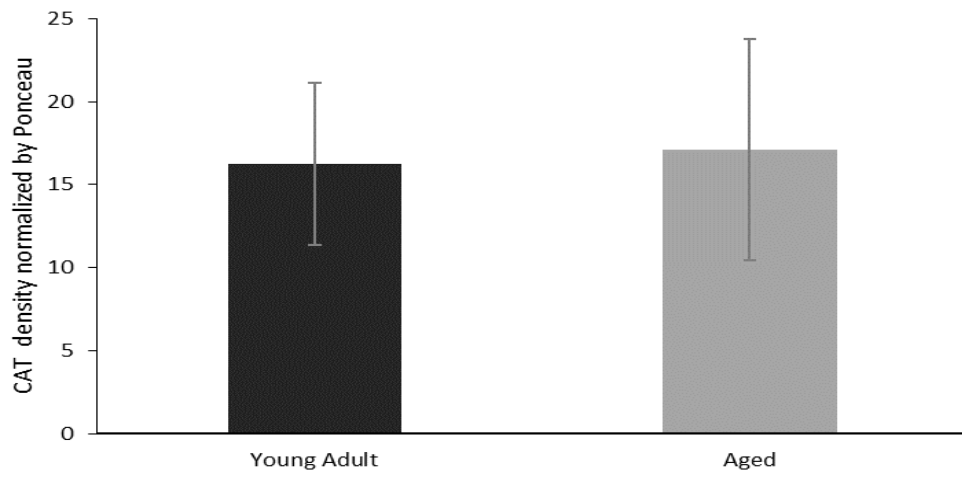
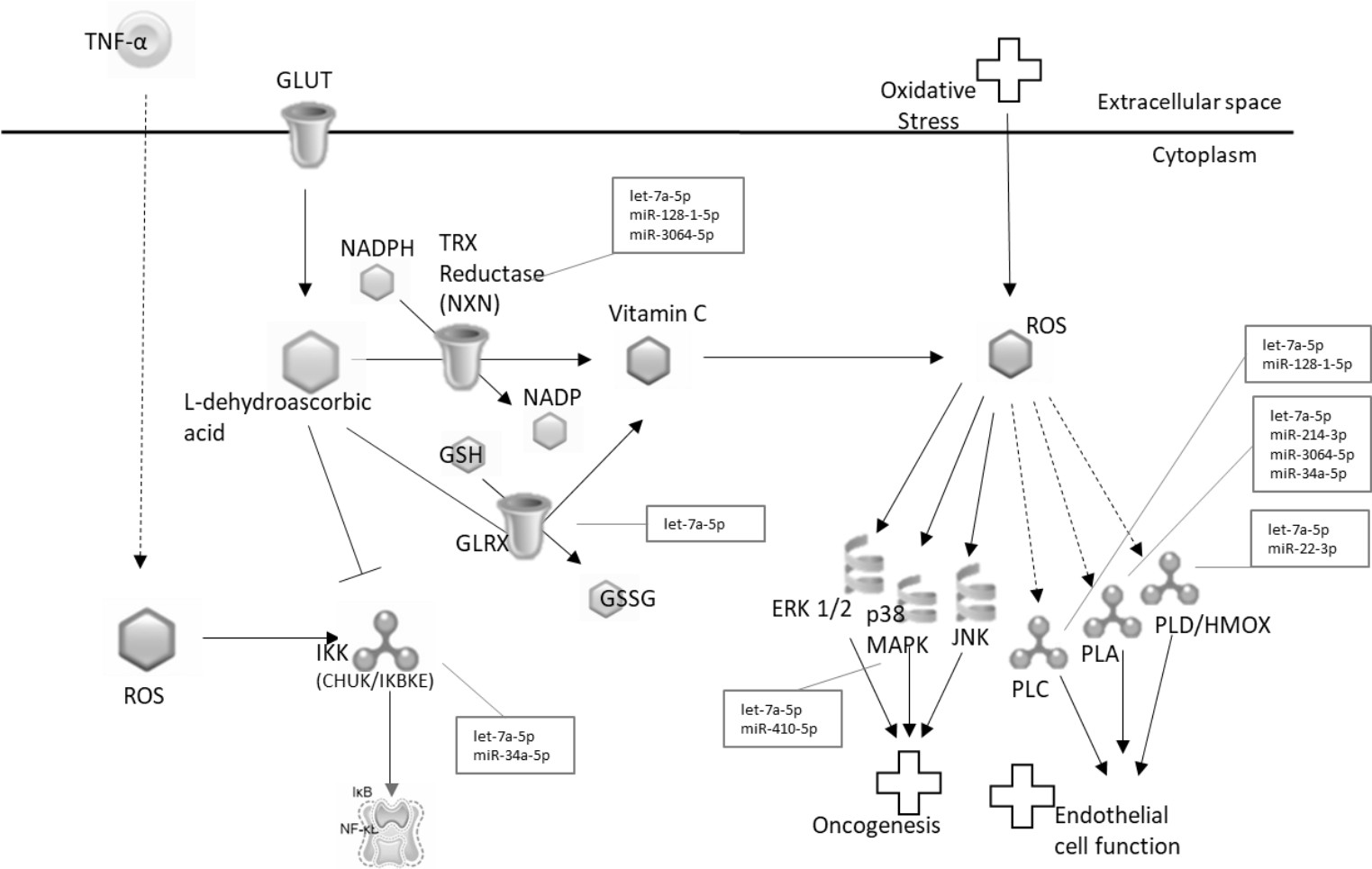


Figure 4.

A.



B.

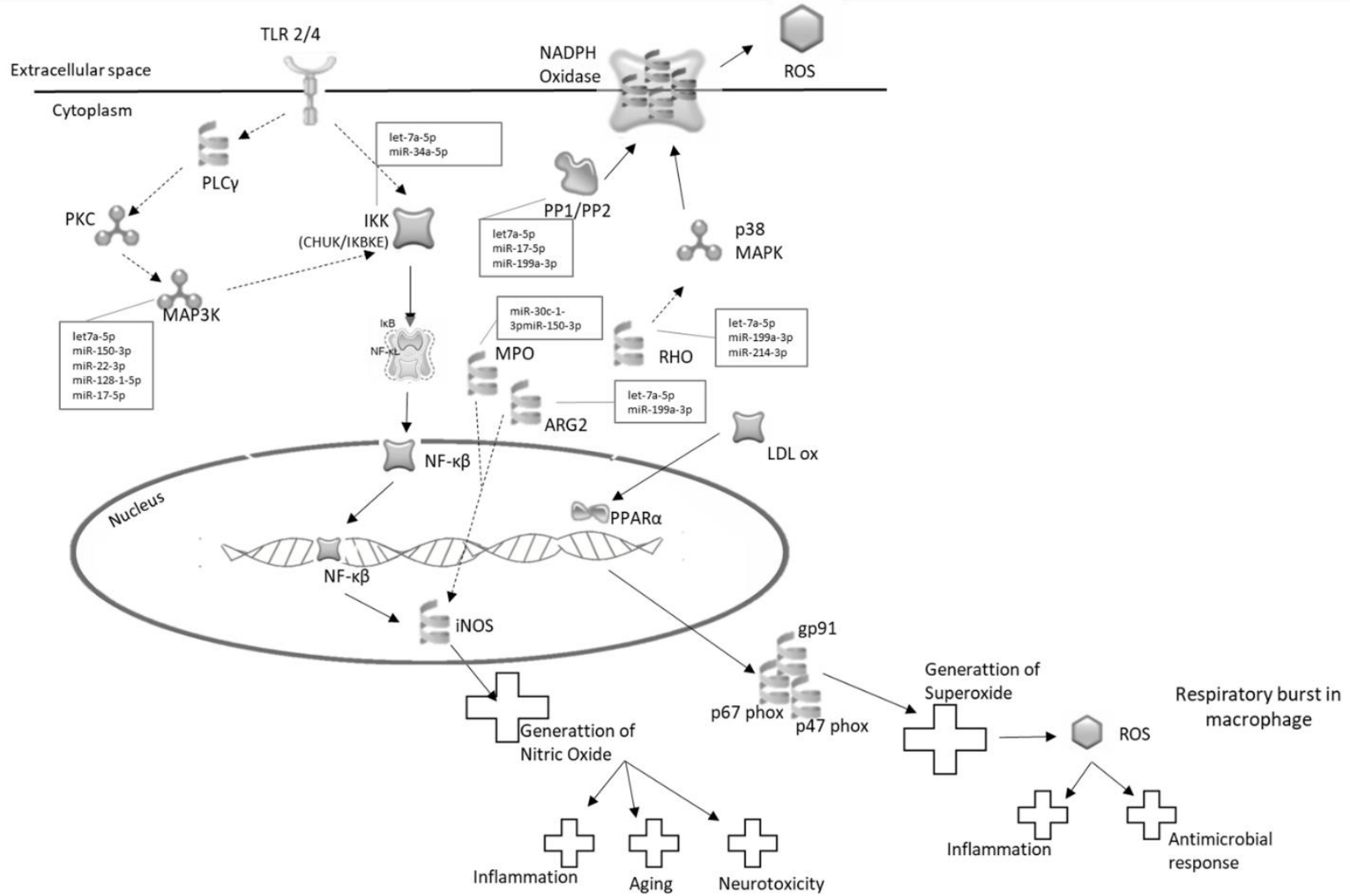
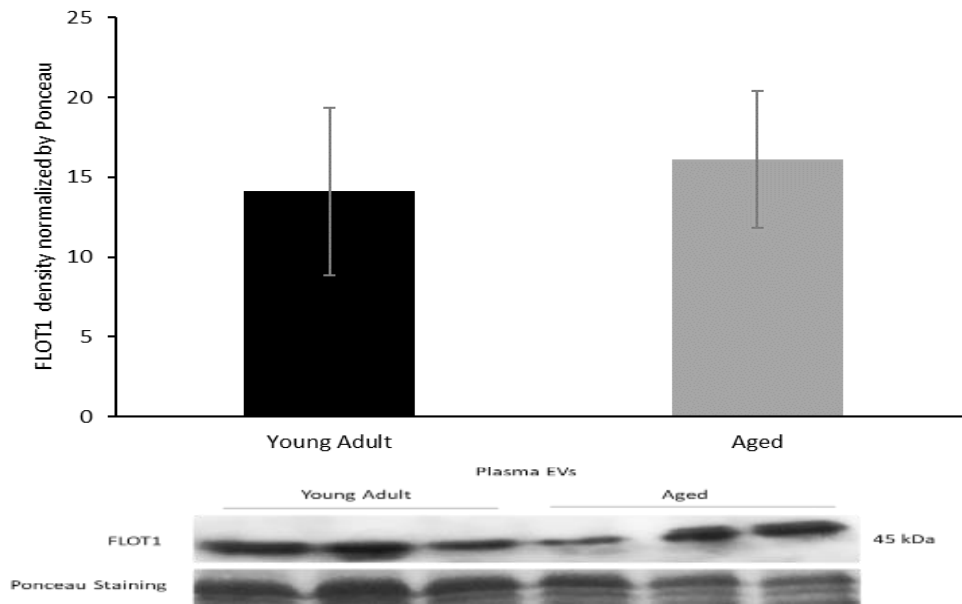


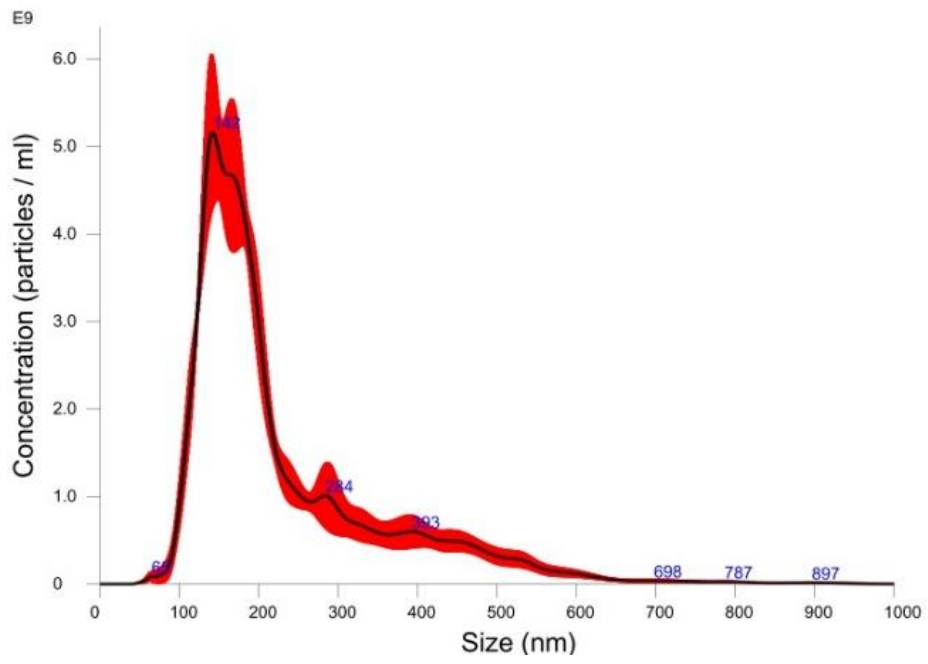
Figure 5.

A.



B.

Young-adult (3-month-old)



C.

Aged (21-month-old)

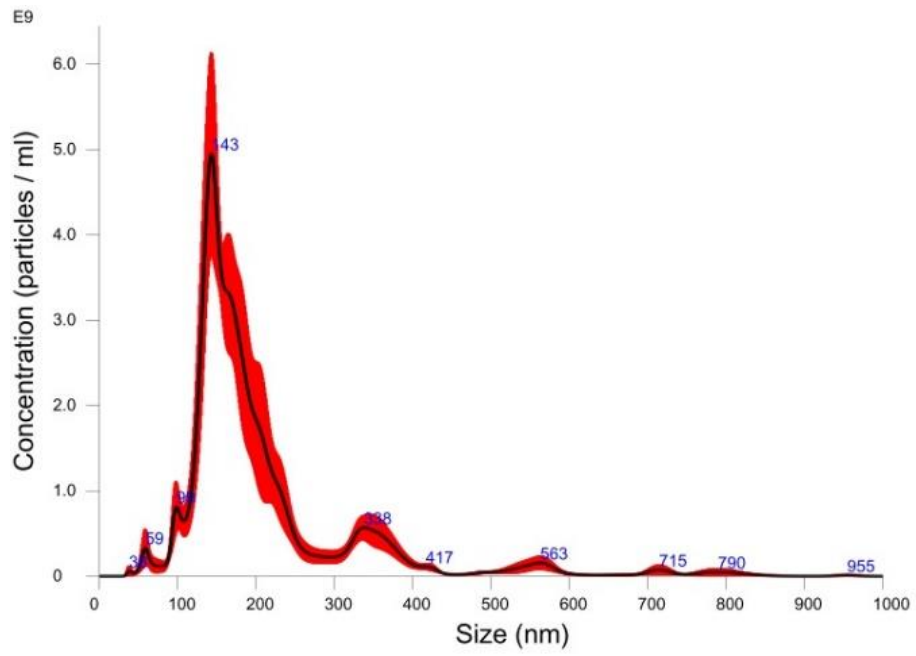


Table 1. Canonical Pathways predicted to be impacted by differently expressed miRNA

Ingenuity Canonical Pathways	p-value	-Log(p-value)	Ratio	z-score
Antioxidant Action of Vitamin C	0.005888	2.23	0.103	-3
Production of Reactive Species in Macrophages	0.030903	1.51	0.0745	2.138
Glutathione Redox Reactions I	0.081283	1.09	0.125	#NÚM!
nNOS Signaling in Skeletal Muscle Cells	0.095499	1.02	0.0976	#NÚM!
NAD Phosphorylation and Dephosphorylation	0.103992	0.983	0.154	#NÚM!
Mitochondrial Dysfunction	0.11508	0.939	0.0643	#NÚM!
iNOS Signaling	0.12388	0.907	0.0889	#NÚM!
Vitamin-C Transport	0.146893	0.833	0.125	#NÚM!
Ascorbate Recycling (Cytosolic)	0.159956	0.796	0.25	#NÚM!
α -tocopherol Degradation	0.159956	0.796	0.25	#NÚM!
Glutathione Redox Reactions II	0.159956	0.796	0.25	#NÚM!
NRF2-mediated Oxidative Stress Response	0.188799	0.724	0.0579	2.121
Nitric Oxide Signaling in the Cardiovascular System	0.247172	0.607	0.0606	0.447
Superoxide Radicals Degradation	0.293765	0.532	0.125	#NÚM!
nNOS Signaling in Neurons	0.32434	0.489	0.0638	#NÚM!
Oxidative Phosphorylation	0.497737	0.303	0.0459	2.236

Canonical pathways are ranked according to $-\log(p\text{-value})$, calculated by Fisher's exact test right-tailed. The threshold line indicates the minimum significance level $-\log(p\text{-value})$. Z-score indicated that pathways are predicted to be upregulated (z-score >0) and downregulated (z-score < 0)

Table 2.

microRNA symbol	Seed	microRNA fold change	Main Targets of differently expressed miRNA
let-7a-5p	GAGGUAG	-1,16	ARG2; CHUK; IKBKE; MAP3K1; MAP3K13; MAP3K2; MAP3K3; MAPK11; ORM1; ORM2; PPP1R7; PPP2R2A; RHOB; RHOG; GLRX; HMOX1; NXN; PLA2G3; PLA2G2F; PLCB2; PLCD4; PLD3
miR-17-5p	AAAGUGC	1,249	MAP3K2; MAP3K3; PPP2R2A
miR-128-1-5p	GGGGCCG	1,906	MAP3K2; MAP3K3; NXN; PLCB2
miR-1298-5p	UCAUUCG	1,166	
miR-142-3p	GUAGUGU	-1,233	
miR-143-3p	GAGAUGA	1,212	
miR-150-3p	UGGUACA	1,401	MAP3K13
miR-153-3p	UGCAUAG	1,382	
miR-181a-1-3p	CCAUCGA	-1,241	
miR-190a-5p	GAUAUGU	-1,335	
miR-199a-3p	CAGUAGU	1,233	ARG2; PPP2R2A; RHOG
miR-218-2-3p	AUGGUUC	1,198	
miR-22-3p	AGCUGCC	-1,272	MAP3K13; HMOX1
miR-92a-3p	AUUGCAC	1,416	
miR-296-3p	AGGGUUG	1,288	
miR-3064-5p	CUGGCUG	1,148	NXN; PLA2G3F
miR-30c-1-3p	UGGGAGA	-1,298	
miR-3120	ACAGCAA	-1,286	
miR-31-3p	GCUAUGC	-1,339	
miR-3585-5p	UCACAAG	-1,251	
miR-34a-5p	GGCAGUG	-1,276	IKBKE; PLA2G3F
miR-488-3p	UGAAAGG	-1,233	
miR-410-5p	GGUUGUC	1,154	MAPK11
miR-214-3p	CAGCAGG	1,265	RHOB; PLA2G3
miR-743a-5p	AUUCAGA	-1,395	

Table 3.

NTA characterization of extracellular vesicles		
	Mean Diameter (nm)	Concentration (particles/mL)
Young Adult	223.11 ± 28.62	1.07 x 10 ¹² ± 5.07 x10 ¹¹
Aged	218.5 ± 23.37	1.36 x 10 ¹² ± 8.50 x10 ¹¹

NTA data on EVs size distribution and concentration from Wistar rats, of 3- and 21-month-old. Student's t-test; p<0.05 (n=9/group).

Table S1**A.**

Production of Reactive Species in Macrophages	
miRNA Targets	microRNAs
AKT2	miR-128-1-5p
AKT3	miR-22-3p
ALB	miR-143-3p
APOA4	miR-128-1-5p; miR-214-3p
APOC1	miR-128-1-5p
APOC2	miR-128-1-5p; miR-3064-5p; miR-30c-1-3p
APOC3	miR-30c-1-3p
APOC4	miR-3064-5p; miR-30c-1-3p; miR-34a-5p
ARG2	let-7a-5p; miR-199a-3p
CAT	miR-190a-5p
CDC42	miR-488-3p; miR-92a-3p
CHUK	let-7a-5p
CLU	miR-128-1-5p; miR-3585-5p
DIRAS3	miR-31-3p
FOS	miR-199a-3p; miR-34a-5p
HOXA10	miR-3585-5p
IKBKB	miR-128-1-5p; miR-214-3p; miR-22-3p
IKBKE	let-7a-5p; miR-34a-5p
IKBKG	miR-128-1-5p; miR-3064-5p; miR-30c-1-3p
IRF1	miR-17-5p; miR-34a-5p
IRF8	miR-190a-5p; miR-30c-1-3p; miR-3585-5p
JAK1	miR-17-5p; miR-410-5p
JAK3	miR-30c-1-3p
LYZ	miR-142-3p; miR-143-3p; miR-3120
MAP2K1	miR-34a-5p
MAP2K4	miR-22-3p; miR-92a-3p
MAP3K1	let-7a-5p
MAP3K11	miR-128-1-5p; miR-142-3p; miR-17-5p; miR-214-3p; miR-3064-5p
MAP3K12	miR-17-5p; miR-22-3p
MAP3K13	let-7a-5p; miR-150-3p; miR-22-3p
MAP3K2	let-7a-5p; miR-128-1-5p; miR-17-5p
MAP3K3	let-7a-5p; miR-128-1-5p; miR-17-5p
MAP3K4	miR-199a-3p; miR-214-3p
MAP3K5	miR-17-5p; miR-181a-1-3p; miR-199a-3p
MAP3K6	miR-22-3p
MAP3K7	miR-143-3p; miR-153-3p; miR-31-3p
MAP3K8	miR-153-3p; miR-17-5p
MAP3K9	miR-17-5p; miR-214-3p; miR-3064-5p

MAPK1	miR-143-3p; miR-17-5p; miR-17-5p; miR-22-3p
MAPK10	miR-128-1-5p; miR-22-3p
MAPK11	let-7a-5p; miR-410-5p
MAPK12	miR-143-3p
MAPK13	miR-128-1-5p; miR-30c-1-3p; miR-34a-5p
MAPK14	miR-22-3p; miR-30c-1-3p
MAPK3	miR-128-1-5p; miR-143-3p; miR-214-3p
MAPK8	miR-199a-3p; miR-3120
MPO	miR-150-3p; miR-30c-1-3p
NCF2	miR-218-2-3p
NFKBIA	miR-3064-5p; miR-34a-5p
NFKBID	miR-128-1-5p; miR-3064-5p
NFKBIE	miR-34a-5p
NGFR	miR-128-1-5p; miR-296-3p; miR-34a-5p; miR-410-5p
ORM1	let-7a-5p
ORM2	let-7a-5p
PIK3C2A	miR-150-3p
PIK3CB	miR-199a-3p; miR-214-3p; miR-3064-5p; miR-92a-3p
PIK3CD	miR-22-3p
PIK3CG	miR-142-3p; miR-143-3p; miR-31-3p
PIK3R1	miR-153-3p
PIK3R2	miR-128-1-5p; miR-34a-5p
PIK3R3	miR-150-3p; miR-3585-5p; miR-410-5p; miR-92a-3p
PIK3R4	miR-3064-5p
PIK3R5	miR-3120
PIK3R6	miR-142-3p; miR-22-3p; miR-3064-5p; miR-30c-1-3p
PPARA	miR-17-5p; miR-22-3p
PPM1L	miR-22-3p; miR-34a-5p
PPP1R10	miR-142-3p; miR-34a-5p
PPP1R11	miR-34a-5p
PPP1R12A	miR-92a-3p
PPP1R14C	miR-3585-5p
PPP1R14D	miR-34a-5p
PPP1R3A	miR-488-3p
PPP1R3D	miR-214-3p; miR-3064-5p
PPP1R7	let-7a-5p
PPP2CA	miR-218-2-3p; miR-31-3p; miR-3585-5p
PPP2CB	miR-143-3p; miR-214-3p
PPP2R1A	miR-214-3p
PPP2R2A	let-7a-5p; miR-17-5p; miR-199a-3p
PPP2R2C	miR-128-1-5p; miR-190a-5p
PPP2R3A	miR-150-3p; miR-34a-5p
PPP2R5C	miR-150-3p; miR-190a-5p; miR-30c-1-3p
PPP2R5D	miR-410-5p
PPP2R5E	miR-199a-3p

PRKCA	miR-142-3p
PRKCB	miR-22-3p; miR-34a-5p
PRKCE	miR-199a-3p; miR-34a-5p; miR-410-5p; miR-92a-3p
PRKCG	miR-30c-1-3p
PRKCH	miR-34a-5p
PRKCQ	miR-128-1-5p; miR-34a-5p
PRKD1	miR-34a-5p
PTPA	miR-30c-1-3p
PTPN6	miR-128-1-5p; miR-181a-1-3p
RAC1	miR-1298-5p; miR-142-3p
RAC2	miR-181a-1-3p
RAP1A	miR-218-2-3p; miR-92a-3p
RAP1B	miR-3120; miR-92a-3p
RELA	miR-128-1-5p
RHOA	miR-128-1-5p; miR-31-3p; miR-3585-5p
RHOB	let-7a-5p; miR-214-3p
RHOBTB1	miR-181a-1-3p; miR-30c-1-3p
RHOBTB2	miR-410-5p
RHOC	miR-17-5p
RHOD	miR-128-1-5p
RHOG	let-7a-5p; miR-199a-3p
RHOJ	miR-3064-5p; miR-30c-1-3p; miR-34a-5p; miR-743a-5p
RHOQ	miR-34a-5p
RHOT1	miR-199a-3p; miR-30c-1-3p; miR-488-3p
RHOU	miR-410-5p
RHOV	miR-22-3p; miR-34a-5p
RND1	miR-218-2-3p; miR-31-3p
RND2	miR-22-3p
RND3	miR-17-5p
S100A8	let-7a-5p
SIRPA	miR-128-1-5p; miR-92a-3p
STAT1	miR-214-3p; miR-30c-1-3p; miR-3120; miR-410-5p
TLR2	miR-143-3p; miR-743a-5p
TLR4	let-7a-5p; miR-34a-5p; miR-410-5p
TNF	miR-17-5p; miR-3585-5p
TNFRSF11B	miR-34a-5p; miR-743a-5p
TNFRSF1B	miR-150-3p; miR-22-3p

B.

Antioxidant Action of Vitamin C	
miRNA Targets	microRNAs
ABHD3	miR-22-3p
CHUK	let-7a-5p
GLRX	let-7a-5p
HMOX1	let-7a-5p; miR-22-3p
IKBKB	miR-128-1-5p; miR-214-3p; miR-22-3p
IKBKE	let-7a-5p; miR-34a-5p
IKBKG	miR-128-1-5p; miR-3064-5p; miR-30c-1-3p
MAP2K4	miR-22-3p; miR-92a-3p
MAPK1	miR-143-3p; miR-17-5p; miR-214-3p
MAPK10	miR-128-1-5p; miR-22-3p
MAPK11	let-7a-5p; miR-410-5p
MAPK12	miR-143-3p
MAPK13	miR-128-1-5p; miR-30c-1-3p; miR-34a-5p
MAPK14	miR-22-3p; miR-30c-1-3p
MAPK3	miR-128-1-5p; miR-143-3p; miR-214-3p
MAPK8	miR-199a-3p; miR-3120
NAPEPLD	miR-17-5p; miR-34a-5p
NFKBIA	miR-3064-5p; miR-34a-5p
NFKBID	miR-128-1-5p; miR-3064-5p
NFKBIE	miR-34a-5p
NOTUM	miR-128-1-5p; miR-3064-5p
NXN	let-7a-5p; miR-128-1-5p; miR-3064-5p
PDIA3	miR-743a-5p
PLA2G1B	miR-143-3p
PLA2G2A	miR-743a-5p
PLA2G2C	miR-153-3p; miR-22-3p; miR-30c-1-3p; miR-34a-5p
PLA2G2D	miR-30c-1-3p; miR-34a-5p
PLA2G2E	miR-743a-5p
PLA2G2F	let-7a-5p; miR-3064-5p; miR-34a-5p
PLA2G3	let-7a-5p; miR-214-3p
PLA2G6	miR-128-1-5p; miR-34a-5p
PLCB1	miR-142-3p; miR-153-3p; miR-199a-3p; miR-31-3p; miR-34a-5p
PLCB2	let-7a-5p; miR-128-1-5p
PLCD3	miR-128-1-5p
PLCD4	let-7a-5p
PLCH2	miR-128-1-5p
PLCZ1	miR-153-3p; miR-190a-5p; miR-218-2-3p
PLD1	miR-128-1-5p; miR-143-3p; miR-190a-5p; miR-22-3p; miR-31-3p
PLD2	miR-214-3p
PLD3	let-7a-5p
PLD5	miR-3064-5p; miR-488-3p

PLD6	miR-743a-5p
PNPLA3	miR-30c-1-3p; miR-34a-5p
PNPLA8	miR-31-3p
RELA	miR-128-1-5p
SELENOT	let-7a-5p; miR-143-3p; miR-92a-3p
SLC23A1	miR-150-3p
SLC23A3	miR-214-3p; miR-30c-1-3p; miR-34a-5p
SLC2A1	miR-22-3p; miR-3064-5p
SLC2A14	miR-92a-3p
SLC2A2	miR-190a-5p
SLC2A3	miR-92a-3p
SLC2A4	miR-17-5p; miR-30c-1-3p
SLC2A8	miR-214-3p
STAT5A	miR-22-3p
TNF	miR-17-5p; miR-3585-5p
TXN	miR-743a-5p
TXNDC2	miR-218-2-3p
TXNRD3	miR-214-3p; miR-22-3p

Table S2.

Main Targets of Differently Expressed miRNAs				
Canonical Pathway	Symbol (microRNA target)	Entrez Gene Name	Location	Type
Production of Reactive Species in Macrophages	ARG2	arginase 2	Cytoplasm	enzyme
	CHUK	conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	Cytoplasm	kinase
	IKBKE	inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit epsilon	Cytoplasm	kinase
	MAP3K1	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	Cytoplasm	kinase
	MAP3K13	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 13	Cytoplasm	kinase
	MAP3K2	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3	Cytoplasm	kinase
	MAP3K3	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2	Cytoplasm	kinase
	MAPK11	mitogen-activated protein kinase 11	Cytoplasm	kinase
	ORM1	orosomuroid 1	Extracellular Space	other
	ORM2	orosomuroid 2	Extracellular Space	other
	PPP1R7	protein phosphatase 1 regulatory subunit 7	Nucleus	phosphatase
	PPP2R2A	protein phosphatase 2 regulatory subunit Balpha	Cytoplasm	phosphatase
	RHOB	ras homolog family member B	Cytoplasm	enzyme
	RHOG	ras homolog family member G	Cytoplasm	enzyme
Antioxidant Action of Vitamin C	CHUK	conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase	Cytoplasm	kinase
	GLRX	glutaredoxin	Cytoplasm	enzyme
	HMOX1	heme oxygenase 1	Cytoplasm	enzyme
	IKBKE	inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit epsilon	Cytoplasm	kinase
	MAPK11	mitogen-activated protein kinase 11	Cytoplasm	kinase
	NXN	nucleoredoxin	Nucleus	enzyme
	PLA2G3	phospholipase A2 group III	Extracellular Space	enzyme
	PLA2G2F	phospholipase A2 group IIF	Extracellular Space	enzyme
	PLCB2	phospholipase C beta 2	Cytoplasm	enzyme
	PLCD4	phospholipase C delta 4	Cytoplasm	enzyme
PLD3	phospholipase D family member 3	Cytoplasm	enzyme	

6. DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho trazem perspectivas interessantes sobre o envelhecimento cardíaco e o papel dos miRNAs das VEs circulantes totais. Primeiramente, é importante ressaltar que para os trabalhos que avaliam o papel das VEs é essencial realizar a caracterização das mesmas. Neste trabalho, nós observamos que o conteúdo de FLOT1, marcador de VEs, e os parâmetros do NTA, como concentração e distribuição de tamanho, não foram alterados pelo envelhecimento. Em 2017, Eitan e colaboradores (2017) propuseram que o conteúdo proteico das VEs passa por uma relativa alteração durante o envelhecimento (Eitan et al., 2017). Neste sentido, é possível sugerir que as modificações ocorrem no conteúdo das VEs circulantes durante o processo de envelhecimento de modo específico e individual, uma vez que nosso grupo já descreveu que níveis de CD63 e atividade da acetilcolinesterase (AChE) foram alterados nas VEs circulantes de animais envelhecidos (Bertoldi et al., 2018). Um ponto que deve ser considerado é que, apesar do NTA ser amplamente utilizado para caracterizar VEs, algumas limitações foram descritas e devem ser consideradas: aderência da amostra à câmara e tubulação (Gardiner et al., 2013), efeito de sobreposição, em que vesículas maiores podem cobrir as menores; deste modo a análise do NTA seria incapaz de distinguir agregados grandes de VEs (Gardiner et al., 2013; Szatanek et al., 2017).

A pureza das VEs é um fator difícil de determinar, vários estudos propuseram que o método de isolamento aqui utilizado (kit de precipitação) é um dos métodos mais adequados para os ensaios realizados (Helwa et al., 2017; Martins et al., 2018; Serrano-Pertierra et al., 2019). Além disso, neste estudo, foi considerado usar o termo “vesícula extracelular”, não exossomos. De acordo com o último relatório de Witwera e Théry (2019) a comunidade científica internacional acordou que VEs é um termo genérico para partículas delimitadas por bicamadas lipídicas liberadas. Neste cenário, é impossível excluir a possibilidade de co-isolamento de VEs contendo algum grau de vesículas maiores e outros componentes do sangue, como lipoproteínas de tamanho semelhante. No entanto, Davidson et al. (2017) propuseram que não existe um método perfeito para isolar e purificar VEs. Apesar disso, a hipótese de que as VEs estejam envolvidas com fenótipos relacionados à idade já foi discutida (Prattichizzo et al., 2019). VEs isolados de camundongos fêmeas jovens aumentaram a expectativa

de vida saudável dos animais de 26 meses (Yoshida et al., 2019); além disso, Lee e colegas (2018) sugerem que o padrão de expressão das moléculas associadas ao envelhecimento é alterado após a administração de exossomos de camundongos jovens em camundongos idosos. Os autores também usaram um kit de isolamento, assim, podemos sugerir uma população semelhante de VEs em nosso trabalho.

Os dados apresentados nesta tese corroboram a hipótese de que o processo de envelhecimento altera o perfil de miRNAs derivado de vesículas extracelulares. Análises bioinformáticas identificaram os alvos preditos dos miRNAs, além de identificarem as vias canônicas e os processos celulares que são influenciados pelos miRNAs de VEs circulantes diferentemente expressos entre animais envelhecidos e jovens. Ainda observamos que o envelhecimento altera a maquinaria redox nas VEs circulantes indicando um desequilíbrio entre os sistemas pró e antioxidantes.

Considerando os dados relacionados ao envelhecimento cardíaco e o papel dos miRNAs das VEs circulantes, observamos aqui que a via canônica da hipertrofia cardíaca ocupa o primeiro lugar nas vias de sinalização impactadas pelo perfil de miRNAs das VEs circulantes totais de ratos envelhecidos. É importante destacar que os autores do *Framingham Heart Study* e do *Baltimore Longitudinal Study on Aging* relataram que no coração envelhecido, diversas alterações complexas podem induzir prejuízo cardíaco. Em indivíduos saudáveis, sem doenças cardiovasculares prévias, o envelhecimento pode acarretar aumento na prevalência de hipertrofia do ventrículo esquerdo, um declínio na função diastólica e função sistólica relativamente preservada em repouso, bem como um aumento na prevalência de fibrilação atrial (Lakatta, 2015; Lakatta e Levy 2003). Ainda, estas alterações citadas são independentes de fatores de risco conhecidos para doenças cardiovasculares, como tabagismo, diabetes, obesidade, entre outras.

Neste contexto a hipertrofia cardíaca é considerada uma característica do envelhecimento cardíaco (Chiao & Rabinovitch, 2015). A fisiopatologia da hipertrofia é complexa e multifatorial, pois afeta vários sistemas celulares e moleculares. É essencial compreender os mecanismos moleculares da hipertrofia cardíaca para proteger o miocárdio da remodelação patológica ou retardar a progressão à insuficiência cardíaca. A hipertrofia cardíaca, fisiológica ou patológica, ocorre para diminuir o estresse da parede ventricular em resposta a vários estímulos. A hipertrofia

fisiológica pode acontecer durante a gravidez e/ou exercício físico e é identificada principalmente por um aumento leve (10 a 20%) do volume ventricular e crescimento individual de cardiomiócitos, tanto no comprimento quanto na largura. Após o alívio do estímulo o coração retorna às suas dimensões originais. Na hipertrofia patológica observa-se uma redução na dimensão da câmara ventricular com aumento da espessura da parede (hipertrofia concêntrica), onde os cardiomiócitos normalmente aumentam a espessura mais do que o comprimento. A hipertrofia patológica leva à dilatação da câmara ventricular (hipertrofia excêntrica), com alongamento individual dos cardiomiócitos. A hipertrofia patológica geralmente resulta em insuficiência cardíaca (Nakamura & Sadoshima, 2018).

É interessante destacar que o perfil de miRNA de VEs circulantes totais pode refletir o perfil de miRNA dos tecidos e células, por exemplo o coração (Sredni et al., 2011). Foi descrito que miocárdio hipertrófico e miocárdio saudável apresentam diferentes perfis de expressão de miRNA (Sun et al., 2019). Nesse contexto, Bang e colegas (2014) mostraram que os fibroblastos cardíacos expostos a moléculas pró-hipertróficas liberam exossomos contendo miRNA-21-3p o qual induz hipertrofia do cardiomiócito. Ainda, estudos com pacientes hipertróficos e modelos animais de hipertrofia cardíaca identificaram alguns miRNAs associados à sinalização hipertrófica de cardiomiócitos, como miR-214 (Tang et al., 2016), miR-199a (Rane et al., 2010) e let-7 (Yang et al., 2011).

Outro ponto que vale a pena destacar é a associação de um estado pró-oxidativo com a fisiopatologia da hipertrofia. Mostrou-se que espécies reativas ativam uma infinidade de vias de sinalização envolvidas no crescimento e na remodelação hipertrófica, incluindo tirosina-quinases, proteína quinase C e MAPK (do inglês mitogen activated protein kinases), entre outras (Kwon et al., 2003; Tanaka et al., 2001). Além disso, as espécies reativas contribuem para a disfunção contrátil por modificação direta de proteínas centrais no acoplamento excitação-contração (Zima & Blatter, 2006). É importante ressaltar que as espécies reativas estão envolvidas no remodelamento cardíaco devido à sua interação com a matriz extracelular e à ativação de metaloproteinases da matriz extracelular (Siwik & Colucci, 2004). Ainda, as espécies reativas podem contribuir para a perda de massa miocárdica após a remodelação cardíaca, induzindo apoptose de cardiomiócitos (Kwon et al., 2003). No

entanto, vale a pena pontuar que não há um consenso sobre quais fatores influenciariam para a progressão da hipertrofia fisiológica para patológica, deste modo nossos dados podem abrir perspectivas de estudo, sugerindo que o perfil de miRNAs das VEs possa ter um papel relevante.

No que se refere a análise bioinformática dos miRNAs de VEs circulantes de animais envelhecidos e adultos jovens observou-se que o miRNA let-7a-5p é o principal regulador das vias canônicas impactadas. Além disso, este miRNA está regulado negativamente (*downregulated*) em animais envelhecidos, o que pode estar amplamente relacionado à hipertrofia cardíaca induzida pela idade, uma vez que esse miRNA tem uma ação anti-hipertrófica (Zhou et al., 2017). Além da hipertrofia cardíaca, a regulação negativa do let-7a-5p impacta as vias canônicas da endotelina-1, β -adrenérgica, além das vias de apoptose e receptores de morte.

De acordo com os dados disponíveis na literatura diversas outras vias de sinalização podem participar no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca relacionada à idade. Nesse contexto, o NFAT (do inglês Nuclear Factor of Activated T cells) é um elemento que aparece, com frequência, nessas vias de sinalização e sua ativação é observada em camundongos idosos (Dai et al., 2012; Wilkins e Molkenin, 2002). O NFAT é um fator de transcrição que já foi descrito como indutor de uma resposta hipertrófica em modelo animal (Wilkins e Molkenin, 2002). Além disso, já foi descrito na literatura uma correlação entre o papel do NFAT na hipertrofia e os níveis de miR-30c (Xue et al., 2018), o que é relevante uma vez que observamos alteração na expressão deste miRNA nas VEs circulantes no processo de envelhecimento. Alguns estudos já relataram níveis reduzidos do miR-30c em condições patológicas, como em cardiomiócitos diabéticos e cânceres (Irani e Hussain, 2015; Hirt et al., 2015; Raut et al., 2015; Raut et al., 2016) Ainda, a sinalização da hipertrofia cardíaca foi previamente associada ao miR-199a e miR-34a (Xue et al., 2018), os quais são diferentemente expressos entre animais envelhecidos e adultos jovens neste estudo. Neste sentido, é possível sugerir que os miRNAs (miR-30c, miR-199a e miR-34a) encontrados nas VEs circulantes totais possuem um papel relevante na via do NFAT na hipertrofia cardíaca.

O let-7a-5p, como mencionado previamente, é o principal regulador das vias canônicas identificadas neste estudo. Neste contexto, a expressão negativa deste

miRNA pode estar associada a modificações induzidas pela idade na sinalização β -adrenérgica cardíaca e no manejo do cálcio em cardiomiócitos. Além do let-7a-5p, o miR-743a-5p também apresentou uma expressão negativa o que pode indicar uma ativação da subunidade gama da proteína G (G γ). Ainda, uma enzima chave para a função cardíaca, a proteína quinase A dependente de cAMP (PKA, especificamente PRKAR2A) (Bernstein et al., 2011) pode sofrer uma regulação positiva induzida pelo let-7a-5p, miR-22-3p e miR-3120 das VEs circulantes totais durante o processo de envelhecimento. Em acordo com este achado, Enns et al. (2010) sugeriram que a redução na atividade da PKA pode produzir efeitos antienvhecimento, uma vez que os problemas cardíacos em camundongos selvagens aumentam continuamente de 10 a 12 meses de idade; enquanto que os camundongos mutantes, sem PRKAR2A, atrasaram o declínio cardíaco, aumentando a expectativa de vida. É interessante mencionar que durante a hipertrofia cardíaca observa-se que o sistema adrenérgico está hiperativo, a qual pode direcionar o ambiente celular para a sinalização pró-apoptótica.

Neste cenário, a análise bioinformática indicou que as vias de sinalização de morte: apoptose e receptor de morte são vias canônicas as quais foram previstas como alteradas pelos miRNAs das VEs circulantes totais de animais envelhecidos. O perfil de miRNA das VEs circulantes totais parece facilitar a apoptose de cardiomiócitos através da via mitocondrial (intrínseca) e da via de receptores de morte (extrínseca) durante o processo de envelhecimento; estas vias são relevantes para várias doenças relacionadas à idade, como doenças cardiovasculares, podendo estar associadas ao fenótipo cardíaco dilatado (Moe e Marín-García, 2016). Os miRNAs miR-3585-5p, let-7a-5p e miR-92a-3p podem afetar a sinalização de receptores de morte (extrínseca) (FASLG; FAS).

A via apoptótica (intrínseca) pode ser modulada por let-7a-5p através proteína Diablo. Este elemento da via apoptótica inibe o inibidor de proteínas da apoptose (IAP), iniciando a cascata das caspases. Ainda, nós observamos uma relação complexa entre o perfil de miRNAs e a regulação da caspase 3, uma vez que a redução de let-7a-5p pode levar à ativação enzimática das caspases, um passo essencial para a apoptose. Outra molécula relevante da via apoptótica é a calpaina, também regulada pelo let-7a-5p. Esta molécula chave pode ser relevante no

envelhecimento cardiovascular, uma vez que atua como protease pró-apoptóticas ativando a caspase e induzindo a clivagem do fator indutor de apoptose após sobrecarga de cálcio (Smith e Schnellmann, 2012). Além do let-7a-5p, o miR-410-5p também é capaz de modular a via da apoptose; este miRNA já foi descrito em alguns modelos de doenças cardíacas, como infarto do miocárdio e sua expressão negativa pode ser associada à hipertrofia e remodelação cardíaca patológica (Clark et al., 2016).

Outro componente importante para as vias de morte celular é o ROCK1. Neste contexto é importante destacar que a sinalização de ROCK1 pode estar relacionada à fibrose cardíaca e apoptose em cardiomiócitos (Haudek et al., 2009; Chang et al., 2006), e neste estudo parece ser impactada pelos miRNAs das VEs circulantes totais, por exemplo o miR-30c-1-3p (para revisão Hartmann et al., 2015). Corroborando estes dados, pacientes com insuficiência cardíaca e/ou hipertensos apresentam maior atividade da via RhoA/ROCK (Masumoto et al., 2001; Smith et al., 2013). A sinalização ROCK atua através da fosforilação direta das proteínas alvo e altera também a expressão global do miRNA (Stiles et al., 2013). Os dados apresentados indicam que let-7a-5p, miR-3585-5p, miR-410-5p e miR-30c-1-3p são os principais candidatos a reguladores da morte celular programada, promovendo a manutenção de um ambiente susceptível a doenças cardíacas.

Outro ponto que chama atenção ao estudar o envelhecimento cardíaco é o fato de que a ativação prolongada do sistema da endotelina-1 pode provocar a remodelação cardíaca inadequada e aumento da mortalidade (Archer et al., 2017). Os dados apresentados neste trabalho indicam uma regulação positiva da sinalização de ET-1 que pode ser mediada pelos miRNAs das VEs circulantes totais, além disso, esse perfil de miRNA pode estar relacionado à ativação de MAPK em células da musculatura lisa, promovendo a vasoconstrição durante o envelhecimento (Paneni et al. 2017). É importante destacar que as quinases são componentes interrelacionados, comuns a diferentes vias canônicas, associadas à hipertrofia cardíaca e ao estresse oxidativo, que ainda será discutido neste trabalho. A MAPK, e também as MAPK quinase quinase (MAPKKKs), parecem ser reguladas pelo let-7a-5p, miR-22-3p e miR-410-5p. Um aumento da atividade da MAPK foi associado à senescência celular e a um processo de envelhecimento acelerado, além disso, alterações na via das

MAPK durante o envelhecimento resultam em diferentes padrões na expressão gênica (Papaconstantinou, 2019).

Além das vias previamente discutidas associadas à hipertrofia cardíaca, os miRNAs das VEs circulantes totais de animais envelhecidos têm alvos de mRNA associados a vias de sinalização que contribuem para diversas outras disfunções crônicas relacionadas à idade. Há evidências sugerindo que os miRNAs desempenhem papéis críticos em muitos processos biológicos importantes durante o envelhecimento, como a manutenção da homeostasia, bem como em distúrbios trombóticos (Alarcon et al., 2019; Plé et al., 2012). Neste cenário, os mRNAs alvo dos miRNAs podem controlar a função plaquetária e podem representar o mecanismo pelo qual as VEs totais e o endotélio vascular se comunicam. Essa interação pode impactar o desenvolvimento e a progressão de doenças cardiovasculares, como a aterosclerose. Os miRNAs, let-7a-5p, miR-3064, miR-34a e miR-214, podem alterar a fosfolipase A2 (PLA2) e o LDL, o que é relevante, pois a PLA2 é um fator aterogênico e está ativada nas placas ateroscleróticas (Macphee et al., 1999). Além disso, foi observada uma regulação positiva da interleucina-6 (IL-6) na via canônica da aterosclerose; essa interleucina é alvo de miRNAs e já foi descrito que ela pode ser regulada positivamente na placa aterosclerótica, em monócitos sanguíneos e também soro de pacientes com aterosclerose (Lin et al., 2016). Curiosamente, inflamação e degradação da matriz extracelular estão envolvidas na desestabilização das placas ateroscleróticas; desse modo o impacto dos miRNAs (miR-150, miR-153, miR-3064, miR-410, let-7a-5p, miR-488) nas citocinas e metaloproteinases pode estar associado ao desenvolvimento de disfunções tromboembólicas. Ainda, o papel do perfil de miRNA das VEs circulantes totais nas alterações induzidas pela idade na resposta à homeostasia foi identificado neste trabalho, considerando a regulação positiva prevista da via intrínseca de ativação da protrombina.

Este trabalho também abordou o impacto dos miRNAs das VEs circulantes nas vias canônicas relacionadas ao estresse oxidativo. As análises indicaram que a via da ação antioxidante da vitamina C está regulada negativamente. Este dado indica que os miRNAs das VEs circulantes contribuem para manutenção do status pró-oxidativo, conforme resultados de estudo prévio do grupo (Bertoldi et al., 2018), uma vez que a ação antioxidante que protege os componentes celulares dos danos causados pelos

radicais livres está reduzida (Beyer et al., 1994). O miRNA, considerado como protagonista deste estudo, let-7a-5p tem como alvo elementos chave nesta via, como glutaredoxina (GLRX) e fosfolipases (PLA, PLC, PLD). Considerando que let-7a-5p apresenta uma expressão negativa, podemos inferir um aumento na atividade das fosfolipases. Touyz e Schiffrin (2001) mostraram que a ativação da PLD estava associada à geração de espécies reativas de oxigênio induzida por Ang II, principalmente por um aumento na atividade da NADPH oxidase. Já foi relatado que espécies reativas podem mediar a ativação de p38 MAPK em diferentes tipos celulares, como fibroblastos e células endoteliais (McCubrey et al., 2006; Klotz et al., 2000); neste trabalho observou-se que p38 MAPK é alvo de let7a-5p e miR-410-5p. Curiosamente, Wenzel e colegas (2001) mostraram que a ativação da p38 MAPK dependente da Ang II foi inibida pela vitamina C; além disso, os autores relataram que a inibição do complexo NADPH oxidase não era capaz de induzir p38 MAPK.

Já foi descrito neste trabalho que quinases podem estar envolvidas com diversas vias canônicas discutidas. As quinases, como IKK (CHUK), são listadas não somente na via canônica da ação antioxidante da vitamina C, mas também na via canônica de produção de espécies reativas em macrófagos. Diferentes miRNAs, let-7a-5p e miR-34a-5p, tem estas quinases como alvo em ambas as vias. Notavelmente, a regulação positiva prevista do IKK, elemento central da cascata de sinalização do NF- κ B, pode ser relevante, uma vez que foi observado em estudos anteriores maior ativação vascular de IKK-NF- κ B com o envelhecimento (Csiszar et al., 2008; Zou et al., 2006 ; Adler et al., 2007). Ainda a ativação de NF- κ B também tem um papel pró-oxidante (Anrather et al. 2006). Além do mais, a regulação positiva de CHUK pode estar relacionada à hipertrofia de condrócitos e remodelação da matriz, alterações que contribuem para a osteoartrite, um distúrbio relacionado ao envelhecimento (Culley et al., 2019).

A arginase 2 (ARG2) é um candidato a alvo do let-7a-5p e miR-199a-3p na via canônica da produção de espécies reativas em macrófagos. Em acordo, já foi relatado que miR-199a-3p e let-7a-5p regulam a expressão do gene da ARG2 em modelos *in vitro*. Outros candidatos a alvo relevantes na via canônica da produção de espécies reativas em macrófagos são as fosfatases (como PPP1R7 e PPP2R2A). As fosfatases são conhecidas por controlar diversos processos celulares, como crescimento celular

e apoptose (Huang et al., 2015); neste sentido a PPP1R7 e PPP2R2A são moléculas reguladas por let-7a-5p, miR-17-5p, miR-199a-3p. Além disso, GTPases da família Rho (RHOB, RHOG), tem regulação positiva prevista e são essenciais para a ativação da família da NADPH oxidase em animais (Miyano e Sumimoto, 2012).

Em relação à análise do perfil oxidativo das VEs circulantes, foi observado neste trabalho que os níveis de NADPH oxidase (gp91phox) estão aumentados nas VEs circulantes totais obtidas de ratos envelhecidos. Portanto, é possível sugerir que a NADPH oxidase participa de modo significativo como sistema gerador de espécies reativas, especificamente, nos níveis elevados de espécies reativas observados em VEs circulantes de animais 21 e 26 meses (Bertoldi et al., 2018). Considerando a elevação no conteúdo de NADPH oxidase observado, é possível sugerir que o ânion superóxido possa ser a principal espécie reativa encontrada nas VEs circulantes totais de animais envelhecidos. Deste modo estes dados nos permitem inferir que a atividade da enzima NADPH oxidase desempenha um papel central no estresse oxidativo relacionado à idade. No entanto, é importante ressaltar que tecidos e órgãos podem contribuir de modo diferente para o conteúdo de espécies reativas encontradas nas VEs circulantes.

Os resultados apresentados neste estudo podem estar associados aos déficits observados durante o envelhecimento, considerando que estes dados podem explicar, pelo menos em parte, alguns mecanismos moleculares e o envolvimento do estresse oxidativo no aparecimento e/ou propagação dos prejuízos relacionados à idade. É possível, neste contexto, sugerir que o conteúdo das VEs circulantes contribui com as condições patológicas, especialmente por difundir enzimas oxidativas como NADPH oxidase e MPO para diversos tecidos durante o processo de envelhecimento. Além disso, evidências disponíveis apoiam a hipótese de que as VEs circulantes totais fornecem NADPH oxidase das células originárias para as células-alvo; já foi identificado que exossomos derivados de macrófagos contendo NOX2 são incorporados pelos axônios, afetando a sinalização axonal (Hervera et al., 2018). Alguns trabalhos propõem que neutrófilos mobilizam e liberam MPO das VEs (Hiemstra et al., 2014; Slater et al., 2017). Pitanga e colaboradores (2014) demonstraram que a incubação de VEs derivadas de neutrófilos com células endoteliais da veia umbilical previamente cultivadas na presença de peróxido de

hidrogênio e íon cloreto, induzem danos às células endoteliais, de modo semelhante à sepse o que indica um papel das VEs na lesão tecidual. Considerando que a NADPH oxidase e a MPO estão envolvidas na produção de espécies reativas de oxigênio nas células polimorfonucleares através de um mecanismo chamado de “respiratory burst” (explosão oxidativa), é possível inferir que as VEs circulantes estejam intimamente relacionadas à propagação deste mecanismo.

Outro ponto relevante a ser destacado neste estudo refere-se a origem das VEs, a qual, neste estudo, não pôde ser determinada e ainda que as VEs circulantes totais são capazes de percorrer grandes distâncias. No entanto, considerando a presença de NADPH oxidase e MPO nas vesículas é possível sugerir que as VEs sejam oriundas das células polimorfonucleares. Apesar disso, as células endoteliais podem estar relacionadas aos nossos achados uma vez que Jansen e colegas (2013) demonstraram que a isquemia *in vitro* aumentou a NADPH oxidase nas VEs derivadas de células endoteliais (Jansen et al., 2013). Ainda, subunidades da NADPH oxidase foram previamente identificadas nas VEs derivadas de plaquetas (Janiszewski et al., 2004), portanto é possível inferir que neste trabalho as VEs circulantes totais isoladas possam ser derivadas de diferentes tipos celulares.

Ainda, os resultados indicam que a maquinaria da enzima XO parece não estar envolvida com níveis elevados de espécies reativas relatados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (Bertoldi et al., 2018), uma vez que os níveis reduzidos de atividade e de conteúdo de XO foram observados em VEs circulantes, quando comparados ratos envelhecidos e adultos jovens. É importante destacar que a análise da atividade e conteúdo de XO em VEs foi realizada pela primeira vez neste estudo. Estudos prévios avaliaram o papel da XO na geração de espécies reativas através da utilização de inibidores da enzima (Janiszewski et al., 2004; Burger et al., 2012). Nestes estudos observou-se que os inibidores de XO não alteram seus níveis em VEs derivadas de plaquetas de pacientes sépticos (Janiszewski et al., 2004; Burger et al., 2012). Ainda, não podemos ignorar o efeito do envelhecimento na atividade total de XO; Aranda e colaboradores (2007) relataram um aumento nos níveis de XO no plasma, músculo esquelético e aorta de ratos idosos, bem como no plasma de idosos. Considerando que as VEs parecem estar envolvidas nos sistemas de remoção de biomoléculas (Mendelsohn e Larrick, 2013), esta diferença observada nos níveis de

XO livre e encapsulada em vesículas pode ser explicado por uma falha nos processos de eliminação de resíduos celulares (Terman e Brunnk, 2004; Johnstone et al., 1991).

Além de avaliarmos as fontes de espécies reativas, neste trabalho nós estudamos a defesa antioxidante enzimática, através da quantificação da enzima catalase, para ser possível realizar uma análise mais completa do estado oxidativo no envelhecimento. Observou-se que a atividade da CAT foi reduzida em VEs circulantes de animais envelhecidos. Curiosamente diversos trabalhos estudaram o papel da CAT em VEs através avaliação dos níveis enzimáticos em modelos *in vitro* e patológicos. Os estudos mostram que a CAT está presente em VEs de diferentes tipos celulares, como células-tronco mesenquimais, macrófagos e oligodendrócitos (Fröhlich et al., 2014; de Godoy et al., 2018; Haney et al. 2015). Um trabalho recente avaliou o potencial neuroprotetor das VEs de células-tronco mesenquimais usando um modelo *in vitro* da doença de Alzheimer; os autores observaram que as VEs foram capazes de reduzir os níveis de espécies reativas de oxigênio na cultura de células neuronais (de Godoy et al., 2018). Além disso, Fröhlich e colegas (2014) observaram que os exossomos oligodendrogliais podem proteger os neurônios do estresse oxidativo, através de uma transferência de CAT dos oligodendrócitos para os neurônios. Contudo, é possível sugerir que o nosso resultado reflète a atividade tecidual da CAT (Siqueira et al., 2005; Haney et al., 2015). Portanto, sugerimos que as atividades prejudicadas de enzimas antioxidantes contribuem para o aumento do estresse oxidativo global em animais envelhecidos.

7. CONCLUSÕES

Foi relatado neste estudo que o processo de envelhecimento modifica o perfil de VEs circulantes totais em animais envelhecidos quando comparados aos animais adultos jovens. Fornecemos evidências da análise *in silico*, mostrando que os miRNA diferentemente expressos em VEs circulantes totais de animais envelhecidos podem impactar a sinalização hipertrófica cardíaca, além de vias relacionadas ao estresse oxidativo entre outras vias relevantes que podem influenciar as disfunções associadas à idade. Ainda, evidências de que o processo de envelhecimento pode impactar os sistemas antioxidantes e pró-oxidantes nas VEs circulantes foram reportadas. Essas evidências sugerem mecanismos que favorecem a manutenção do estado oxidativo nos animais envelhecidos.

É importante observar que os efeitos benéficos ou deletérios dos miRNAs específicos ainda não são claros e que as vias de sinalização compreendem uma rede complexa; no entanto, os resultados indicam que o miRNA let-7a-5p pode ser um elemento-chave no envelhecimento, regulando todas as vias canônicas aqui discutidas: cardiovasculares, de estresse oxidativo e também a sinalização de apoptose.

Os dados deste trabalho fornecem informações sobre o papel dos miRNAs e sobre o desequilíbrio redox das VEs circulantes totais durante o processo de envelhecimento. Os resultados aqui apresentados abrem novos caminhos para estudos adicionais, a fim de explorar e confirmar nossas descobertas *in silício*.

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 Ca²⁺/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). H₂O₂ 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.