

MicroRNA circulantes como reguladores de la respuesta molecular al ejercicio en personas sanas

Manuel Fernández-Sanjurjo¹, David de Gonzalo-Calvo², Sergio Díez-Robles¹, Alberto Dávalos³, Eduardo Iglesias-Gutiérrez¹

¹Departamento de Biología Funcional (Área de Fisiología), Universidad de Oviedo, Asturias. ²Centro de Investigación Cardiovascular (CSIC-ICCC), Instituto de Investigación Biomédica (IIB Sant Pau), Barcelona. ³Grupo de Patologías del Metabolismo Lipídico y Nutrición (DISLIPID), IMDEA Alimentación, CEI UAM+CSIC, Madrid.

Recibido: 06.04.2016
Aceptado: 26.05.2016

Resumen

Los microRNAs circulantes (c-miRNAs) son reguladores de la expresión génica y mediadores de la comunicación intercelular, con un gran potencial como coordinadores de la respuesta molecular al ejercicio y, por tanto, con eventuales implicaciones prácticas para la salud y el rendimiento. Sin embargo, su respuesta al ejercicio agudo y al entrenamiento en personas sanas es poco conocida, principalmente porque hasta el momento se ha publicado un número reducido de artículos, con resultados dispares. El objetivo de esta revisión es agrupar y sintetizar el conocimiento disponible, analizar las causas de esta heterogeneidad en los resultados e identificar las principales perspectivas de futuro en esta área.

Los resultados de los trabajos incluidos en esta revisión muestran que el ejercicio agudo y el entrenamiento inducen una respuesta en el perfil de c-miRNAs influida por el modelo, duración, intensidad y dosis de ejercicio. Queda pendiente, no obstante, conocer su origen, forma de transporte, destino, así como validar sus dianas génicas. Sin embargo, estos estudios muestran entre sí numerosas diferencias metodológicas (técnica de detección, número y tipo de c-miRNAs analizados, estrategia de normalización), en el diseño experimental (puntos de muestreo) y en las características de los sujetos (edad, historial de entrenamiento), que hace difícil, tanto establecer comparaciones directas entre ellos, como extraer conclusiones generales sólidas. Finalmente, este papel del ejercicio, como modulador del perfil de c-miRNAs, podría constituir una alternativa viable y coadyuvante a las terapias farmacológicas y dietéticas basadas en miRNAs que actualmente se encuentran en desarrollo. Además, su validación como biomarcadores de ejercicio podría contribuir al desarrollo de recomendaciones de ejercicio más precisas, a optimizar su aplicación como herramienta preventiva o terapéutica y a explorar los límites máximos del ejercicio saludable.

Palabras clave:

MicroRNAs circulantes.
Ejercicio agudo.
Entrenamiento.
Biomarcadores de ejercicio.

Circulating microRNA as regulators of the molecular response in exercise in healthy people

Summary

Circulating microRNAs (c-miRNAs) are cell-to-cell communicators implicated in the regulation of molecular responses with strong potential in exercise and practical implications in health. Despite this fact, the number of papers published on this topic is scarce and with inconsistent results. Thus, the aim of this review was to summarize the information available, to analyze the heterogeneity of the results and to identify which are the future perspectives in this field of research.

The results of the studies included in this revision clearly show that acute exercise and training induce a response in c-miRNA profile. This response depends on the model, intensity and dose of exercise. However, there are some questions which must be answered: what are the secretory organs or tissues, the mechanisms of transport, and the tissue and gene targets. A number of differences between studies in the methodologies used (detection technique, number of c-miRNAs analyzed, normalization strategy), in the experimental design (sampling points) and in the characteristics of the participants (aging, exercise background, dietary intake) makes it difficult to establish direct comparisons and to draw firm conclusions. Finally, this role of exercise as c-miRNA profile modulator, could be considered a valuable alternative to upcoming pharmacological and nutritional interventions based on miRNAs. Moreover, the validation of c-miRNAs as biomarkers of exercise will allow the development of more specific recommendations, using training as a therapeutic and preventive tool, and exploring the maximal limits for a safe and healthy exercise.

Key words:

Circulating microRNAs.
Acute exercise.
Training. Exercise biomarkers.

Correspondencia: Eduardo Iglesias-Gutiérrez
E-mail: iglesiaseduardo@uniovi.es

Introducción

La práctica regular de ejercicio constituye uno de los principales determinantes de salud, asociándose de forma muy sólida con un menor riesgo de mortalidad por todas las causas así como con una menor incidencia de multitud de patologías altamente prevalentes en países desarrollados, como la enfermedad cardiovascular, el ictus, el síndrome metabólico, la diabetes tipo 2, los cánceres de colon y mama, la depresión y el riesgo de caídas¹⁻³.

La actividad física es algo intrínseco a nuestra propia evolución^{1,4}. A lo largo de los tiempos la especie humana ha mantenido un estilo de vida extremadamente activo, lo que contrasta con el sedentarismo implantado en la sociedad actual, tanto en lo referente a la baja frecuencia con que se practica ejercicio como al menor componente físico de la mayoría de las actividades laborales. Así, según los datos del Eurobarómetro 2010 sobre deporte y actividad física⁵, el 42% de la población española declara que nunca hace ejercicio o practica deporte y un 19% lo hace con una frecuencia de 1 a 3 veces al mes o menos. En la misma línea, los datos de la Encuesta de hábitos deportivos en España 2015⁶ muestran que el 46,5% de la población española mayor de 15 años no practicó deporte en el último año y que más del 26% de los que practicaron deporte lo hicieron menos de 1 vez al mes. Por ello el sedentarismo constituye un problema de salud pública de primer orden y la promoción de la práctica regular de ejercicio debe ser una pieza clave en las intervenciones para la salud a todos los niveles.

El efecto beneficioso del ejercicio sobre la salud orgánica es además sistémico y no está restringido a los tejidos y órganos más activamente implicados en la generación del movimiento^{4,7}. En este sentido, ya en 1961 Goldstein describió cómo las células musculares contribuían a la regulación humoral de la homeostasis de la glucosa durante el ejercicio⁸. A partir de este punto se han llevado a cabo innumerables investigaciones que ponen de manifiesto que la respuesta al ejercicio agudo y al entrenamiento involucra una compleja comunicación cruzada entre tejidos y tiene efectos profundos en la expresión génica^{9,10}. De esta forma se coordina la reparación del daño inducido por el ejercicio, la recuperación y las adaptaciones fisiológicas y metabólicas^{2,11} responsables de los efectos sistémicos del ejercicio sobre la salud^{4,12,13}. Por ello el estudio de la respuesta molecular al ejercicio ha emergido en los últimos años como una herramienta imprescindible para entender cómo se integra esta respuesta y cómo se relaciona con el estado de salud, permitiendo descubrir además nuevos mecanismos potenciales implicados en los procesos de enfermedad, así como nuevas dianas terapéuticas. Conocer en detalle la respuesta molecular al ejercicio se hace, por tanto, imprescindible para optimizar las recomendaciones de ejercicio y explorar los límites máximos del ejercicio saludable.

Las respuestas adaptativas moleculares al ejercicio vienen determinadas en gran medida por la alteración de la expresión génica⁴. Los mecanismos exactos mediante los que se regula la expresión de los genes implicados en la respuesta molecular al ejercicio siguen siendo, en gran parte, desconocidos^{7,14,15}. La regulación epigenética, que incluye no solo la metilación del DNA¹⁶, sino también la modificación de las histonas¹⁷ o la expresión de microRNAs (miRNAs)¹⁸, parece desempeñar un papel destacado. En este contexto, y considerando la naturaleza

sistémica de la respuesta al ejercicio, emerge con fuerza la necesidad de evaluar la respuesta y la función de nuevos mediadores de la comunicación intercelular como los miRNAs, en particular, los miRNAs circulantes (c-miRNAs)¹⁹.

Hasta el momento se ha publicado un número reducido de artículos sobre el efecto del ejercicio agudo y del entrenamiento en el perfil de c-miRNAs, con resultados dispares, lo que dificulta la obtención de conclusiones generales que permitan determinar el papel de estos reguladores de la expresión génica en la respuesta molecular al ejercicio, ni sus eventuales implicaciones prácticas para la salud y el rendimiento. Por ello el objetivo de esta revisión es agrupar y sintetizar el conocimiento disponible actualmente sobre el tema, analizar las causas de esta heterogeneidad en los resultados e identificar las principales perspectivas de futuro.

Material y método

Se usaron como motores de búsqueda bibliográfica PubMed (*US National Library of Medicine National Institutes of Health*), Scopus y Science Direct, utilizando como palabras claves distintas combinaciones de los siguientes términos: *circulating, microRNA, miRNA, miR, exercise, physical activity, training, acute exercise y nutrition*. De entre los artículos seleccionados de esta manera, se excluyeron aquellos que: a) eran revisiones; b) analizaban solos miRNAs en tejidos y no miRNAs circulantes; c) se habían analizado exclusivamente en otras especies distintas a la humana. Se identificaron 44 artículos, de los cuales, teniendo en cuenta los criterios anteriores, 16 fueron incluidos finalmente.

A partir del listado de referencias bibliográficas de los artículos seleccionados se identificaron artículos adicionales que también han sido consultados para llevar a cabo esta revisión.

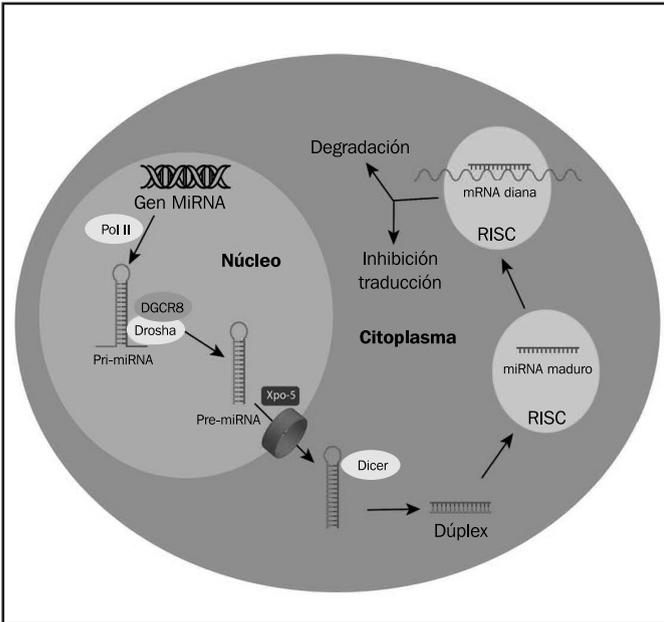
¿Qué son los microRNA?

Los miRNAs son pequeñas moléculas de RNA (19-25 nucleótidos) no codificantes que participan en la regulación epigenética a nivel post-transcripcional, actuando ya sea a través del bloqueo de la traducción del RNA mensajero (mRNA) o de la degradación del mRNA, disminuyendo en ambos casos la expresión proteica²⁰. La importancia de su papel regulador de la expresión génica queda de manifiesto por el hecho de que el conjunto de los miRNAs expresados en humanos, más de 2600 según miRBase, la principal base de datos de miRNAs²¹, tiene diana en aproximadamente el 60% de las secuencias codificantes del genoma²², jugando un papel fundamental en el desarrollo, el mantenimiento de la homeostasis y la respuesta al estrés fisiológico y fisiopatológico²³ incluido el ejercicio.

Los genes que contienen los miRNAs pueden estar localizados en zonas intergénicas, donde la regulación de su expresión es producida por sus propios elementos, o bien en regiones intrónicas o exónicas, donde la expresión del miRNA está íntimamente relacionada con la expresión del propio gen en cuestión²⁴.

La biogénesis de los miRNAs comienza en el núcleo celular y finaliza en el citoplasma (Figura 1). En el núcleo, la RNA polimerasa II genera un transcrito largo, de cientos de nucleótidos, denominado microRNA

Figura 1. Biogénesis de miRNA. Los miRNA son procesados en el núcleo y el citoplasma por enzimas con actividad RNAsa III, Drosha y Dicer respectivamente, para generar el producto maduro que actúa sobre su(s) mRNA(s) diana, inhibiendo su traducción o provocando su degradación^{25,28}.



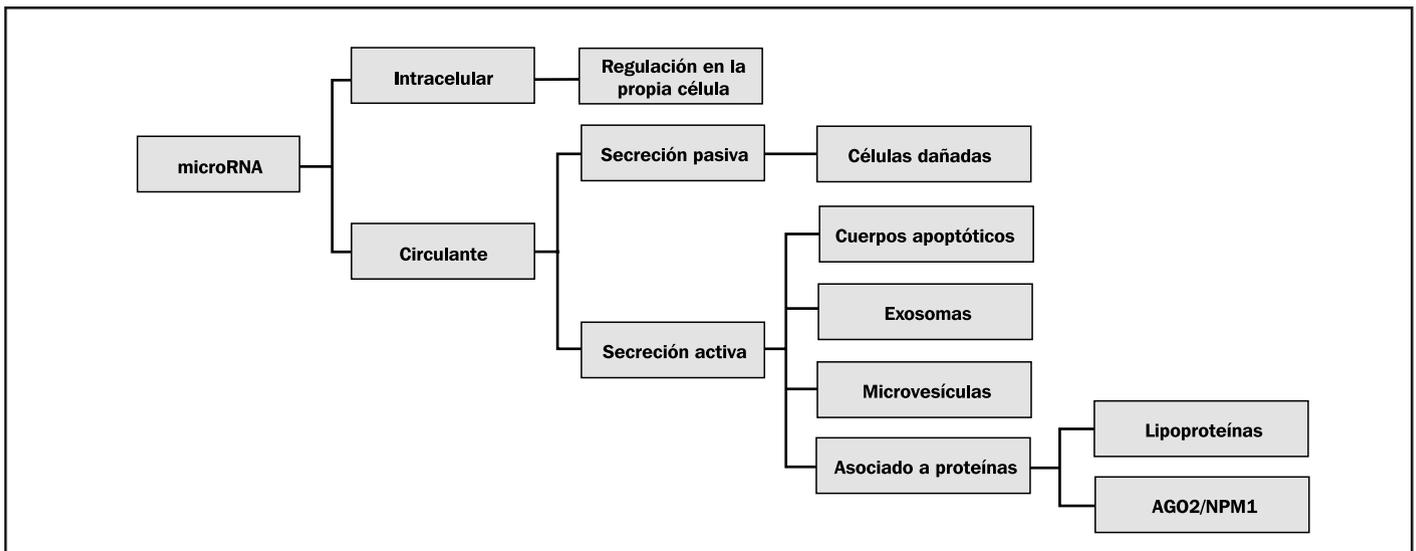
primario (pri-miR), con estructura secundaria, que tiene en el extremo 3' una cadena de poliA y en el extremo 5' una caperuza de 7-metilguanosa²⁴. El pri-miRNA es reconocido por un complejo formado por la ribonucleasa tipo III y su proteína de ligación DGCR8 (Región Crítica 8 del síndrome de DiGeorge) o Pasha. Dicho complejo procesa el pri-miR, dando lugar a un segundo precursor llamado pre-miR, de unos 70 nucleótidos, con estructura secundaria en forma de horquilla. Este

pre-miR es exportado hacia el citoplasma por la exportina-5 (Xpo-5) mediante un mecanismo dependiente de GTP²⁵. Una vez en el citoplasma, la horquilla se rompe por un complejo formado por RNAsa III o Dicer y TRBP (Proteína de unión a ARN en respuesta a trans-activación)²⁵. Se genera de esta forma una molécula de doble cadena o miRNA dúplex, que contiene el miRNA maduro y su cadena complementaria²⁶. El miRNA dúplex es desnaturalizado por una helicasa que deja libre el miRNA maduro que se une al complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) formando el complejo miRISC²⁶. La incorporación al complejo RISC de una u otra cadena depende de la estabilidad termodinámica del extremo 5', la que sea menos estable es la que es incorporada²⁷, si bien hay casos en los que ambas hebras del dúplex (miR-X-3p o miR-X-5p, donde "X" es cualquier miRNA) generan miRNA maduros. Finalmente, el miRNA guía el complejo RISC a los lugares complementarios (generalmente 3'-UTR) en el mRNA e inhibiendo la función del mismo mediante distintos mecanismos, en general dependiendo del grado de complementariedad entre las secuencias: degradación del mRNA si existe complementariedad total o represión de la traducción si la complementariedad es parcial. Dado que la mayoría de los sitios diana en el mRNA sólo tienen complementariedad de bases parcial con cada miRNA, un mismo miRNA puede interactuar con más de 100 mRNA diferentes. Además, cada mRNA puede contener múltiples sitios de unión para diferentes miRNAs, dando lugar a una compleja red de regulación de la expresión génica^{25,26}.

MicroRNA circulantes: mediadores de la comunicación intercelular

Aunque los miRNAs son reguladores intracelulares de la expresión génica, también se han detectado en forma estable en diferentes fluidos corporales (Figura 2), incluido el plasma²⁹, principalmente transporta-

Figura 2. Clasificación de los miRNAs según la localización, intracelular o extracelular, en la que pueden detectarse y la forma en la que son transportados.



dos en exosomas o microvesículas^{30,31}, asociados a proteínas (como Ago2 o Npm1)³², a lipoproteínas³³ e incluso a cuerpos apoptóticos²⁵. Esto sugiere que los c-miRNAs serían secretados de forma regulada en respuesta a una situación de estrés, actuando como un auténtico sistema de comunicación intercelular, autocrina, paracrina y endocrina regulando la expresión génica y el fenotipo de las células receptoras³⁴. Además pueden ser liberados de forma pasiva por células dañadas o necróticas^{23,25,35}.

En 1999 Kopeski *et al.*³⁶ describen por primera vez la presencia en suero de moléculas de RNA circulantes que tienen la capacidad de no ser degradados por las RNAsas presentes en el plasma. Los c-miRNAs, como tales, fueron descritos por primera vez en 2008 por Mitchell *et al.*²⁹ también en flujo sanguíneo, si bien posteriormente han sido descritos en los demás fluidos corporales^{19,37}.

De forma análoga a sus formas intracelulares, los c-miRNAs participan tanto en respuestas fisiológicas y adaptativas, como en el inicio y en el desarrollo de estados patológicos³⁸.

MicroRNA circulantes: ¿biomarcadores: útiles en el ámbito del ejercicio?

La liberación miRNA al medio extracelular en respuesta a estrés o al daño celular abre la puerta a su estudio como potenciales biomarcadores. De hecho, los c-miRNAs presentan las propiedades bioquímicas y fisiológicas óptimas para constituir excelentes biomarcadores³⁹: i) Existen perfiles de c-miRNAs específicos de distintas situaciones fisiológicas y patológicas, que son liberados desde los diferentes tipos celulares implicados en el proceso, ii) su secreción en microvesículas y complejos miRNA-proteína les otorga una gran estabilidad en circulación, iii) presentan secuencias evolutivamente muy conservadas que facilitan su análisis, iv) permiten una detección temprana y las muestras presentan una vida media larga, v) su determinación se realiza de forma relativamente económica con una alta sensibilidad y especificidad, superior a las mostradas por los biomarcadores actuales basados en proteínas, a través de técnicas ya estandarizadas en los laboratorios clínicos.

Son numerosos los trabajos que han propuesto la utilización de los miRNAs como biomarcadores diagnósticos, pronósticos y terapéuticos de diversos procesos patológicos, incluyendo cáncer, infecciones virales, trastornos del sistema nervioso, enfermedad cardiovascular, trastornos musculares y diabetes, entre otras⁴⁰. En algunos casos los miRNAs parecen presentar un valor clínico que se sitúa por encima del *gold standard* establecido, como ocurre por ejemplo con los biomarcadores cardíacos ampliamente utilizados hs-cTnT y NT-proBNP⁴¹. Su aplicación en la práctica clínica en corto o medio plazo ha sido propuesta por diversos autores⁴².

Algunos trabajos ponen de manifiesto una relación entre el perfil de c-miRNAs en respuesta al ejercicio agudo y al entrenamiento y adaptaciones específicas al ejercicio, lo que sugiere su valor como biomarcadores emergentes en este contexto⁴³. Así, Bye *et al.*⁴⁴ observaron en adultos sanos (40-45 años, hombres y mujeres) un perfil basal de c-miRNAs diferente en función de la capacidad aeróbica máxima (VO₂máx) y Mooren *et al.*⁴⁵ demostraron que los cambios en la concentración plasmática de algunos miRNAs, como miR-1, miR-133a y miR-206, en respuesta

a un ejercicio agudo (maratón) mostraban una fuerte correlación con parámetros clásicos de rendimiento, como VO₂máx. Además, Clauss *et al.*⁴⁶ describieron que el perfil plasmático de miRNAs relacionados con remodelación cardíaca (miR-1, miR-26a, miR-29b, miR-30 y miR-133a) en respuesta a un ejercicio agudo (maratón) era diferente en corredores de élite frente a corredores aficionados.

Por otro lado, Wardle *et al.*⁴⁷ observaron que los niveles basales de ciertos c-miRNAs, como miR-222, miR-21, miR-146a y miR-221 diferían entre deportistas de fuerza (deportes de combate y levantamiento de pesas) y resistencia (carreras de larga distancia y orientación). Asimismo, Banzet *et al.*⁴⁸, utilizando un diseño cruzado aleatorizado, describieron un perfil diferente de algunos c-miRNAs (miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-208a, miR-208b y miR-499) en respuesta a un ejercicio concéntrico vs. excéntrico y de Gonzalo-Calvo *et al.*⁴⁹ observaron que el número, tipo y cinética de c-miRNAs relacionados con procesos inflamatorios diferían significativamente después de dosis más bajas (carrera de 10 km) y más altas (maratón) de ejercicio agudo en varones activos. Estos resultados apuntan de nuevo a los c-miRNAs como biomarcadores candidatos en relación con la magnitud de la respuesta al modelo y a la dosis de ejercicio (regular y agudo).

Sin embargo, la información disponible hasta el momento no ha permitido todavía validar su uso potencial como biomarcadores emergentes en el contexto del ejercicio. Esta validación debe sustentarse en un conocimiento profundo de su respuesta al ejercicio agudo y al entrenamiento, así como de la influencia de factores de confusión, como otras variables biológicas o los métodos de procesamiento y normalización de datos^{50,51}.

MiRNAs circulantes plasmáticos en respuesta al ejercicio

El efecto del ejercicio agudo sobre el perfil de c-miRNAs fue descrito por primera vez por Baggish *et al.* en 2011⁵². Los pocos estudios disponibles hasta el momento coinciden en que el ejercicio agudo modifica el perfil de c-miRNAs, lo que pone de manifiesto su potencial como mediadores en los mecanismos de respuesta aguda al ejercicio, así como en la recuperación o la adaptación. Sin embargo, muestran resultados muy heterogéneos en cuanto al número, tipo y cinética de aparición y desaparición de c-miRNAs plasmáticos^{45,46,48,49,52-59}, tal y como puede observarse en la Tabla 1, que recoge las principales características y resultados de dichos trabajos.

Por otra parte, muy pocos estudios han analizado el perfil basal de c-miRNAs en personas activas frente a sedentarias o en respuesta a periodos largos de entrenamiento^{44,47,52,53,57}. En la Tabla 2 se recogen los estudios en los que se han realizado intervenciones de entrenamiento. Aunque los tres trabajos son heterogéneos en muchos aspectos, queda patente que el miR-21 se ve aumentado en respuesta al entrenamiento como describen Baggish *et al.*⁵² y Nielsen *et al.*⁵⁷. Estando dicho miRNA implicado en procesos de función muscular, hipoxia e inflamación, como se puede ver en la Tabla 3.

Los estudios de Wardle *et al.*⁴⁷ y Bye *et al.*⁴⁴ describen las diferencias basales de los c-miRNAs entre personas que realizan ejercicio habitualmente⁴⁴ o deportistas⁴⁷ frente a personas sedentarias. Los resultados en

Tabla 1. Estudios sobre el perfil de microRNAs circulantes en respuesta a ejercicio agudo en personas sanas.

Tipo de ejercicio	Características de los sujetos	miRs analizados	Aumento	Disminución	Referencia bibliográfica
Resistencia					
Ejercicio en cicloergómetro. Ejercicio incremental (25 W/min) hasta la extenuación, antes y después de un periodo de entrenamiento en equipo de remo (90 días, 5 km/día, 1-3 h a 20-24 paladas/min).	10 remeros universitarios (19,1 ± 0,6 años).	miR-20a miR-21 miR-133a miR-146a miR-210 miR-221 miR-222 miR-328	Pre-entrenamiento, inmediatamente después del ejercicio: miR-21, miR-146a, miR-221 y miR-222. Los niveles basales se recuperaron en menos de 1 h. Post-entrenamiento inmediatamente después del ejercicio: miR-146a y miR-222.		Baggish <i>et al.</i> ⁵²
Ejercicio en cicloergómetro. 60 min al 70% del VO ₂ máx.	11 varones no entrenados (21,5 ± 4,5 años).	miR-1 miR-133a miR-133b miR-206 miR-208b miR-486 miR-499		Inmediatamente después del ejercicio: miR-486. Los niveles basales se recuperaron en menos de 24 h.	Aoi <i>et al.</i> ⁵³
Ejercicio en cicloergómetro. 60 min al 65 % de la potencia máxima.	13 varones entrenados (28 ± 8 años).	752 miRNA (paneles miRNome).	1h después del ejercicio: miR-139-5p, miR-143, miR-223, miR-330-3p, miR-338-3p. 3h después del ejercicio: miR-1.	Inmediatamente después del ejercicio: miR-30b, miR-106a, miR-146, miR-151-3p, miR-151-5p, miR-221, miR-652 y let-7i.	Nielsen <i>et al.</i> ⁵⁷
Ejercicio en cicloergómetro. 4 h al 70 % del umbral anaeróbico individual.	12 varones entrenados (32,4 ± 2,3 años).	miR-126 miR-133	Durante el ejercicio, desde 30 min después de iniciado el ejercicio hasta el final: miR-126. Los niveles basales se recuperaron en menos de 1 h.		Uhleman <i>et al.</i> ⁵⁶
Maratón	14 corredores de resistencia varones (42,8 ± 6,0 años).	miR-1 miR-21 miR-133a miR-155 miR-206 miR-208b miR-499	Inmediatamente después del ejercicio: miR-1, miR-133a, miR-206, miR-208b y miR-499. Los niveles basales de miR-208b y miR-499 se recuperaron en menos de 24 h.		Mooren <i>et al.</i> ⁴⁵
Maratón	21 corredores de maratón varones (51,8 ± 1,4 años).	miR-1 miR-126 miR-133a miR-134 miR-146a miR-208a miR-422b miR-499-5p	Inmediatamente después del ejercicio: miR-1, miR-126, miR-133a, miR-134, miR-146a, miR-208a y miR-499-5p. Los niveles basales se recuperaron en menos de 24 h.		Baggish <i>et al.</i> ⁵⁸
Maratón	22 corredores de maratón varones (56,8 ± 5,2 años).	miR-126 miR-133	Inmediatamente después del ejercicio: miR-126 y miR-133.		Uhleman <i>et al.</i> ⁵⁶
Medio maratón	5 corredores aficionados (31,6 ± 4,4 años).	miR-1 miR-133a miR-206	Inmediatamente después del ejercicio: miR-1, miR-133a y miR-206.		Gomes <i>et al.</i> ⁵⁹
Carrera 10 km	9 corredores no profesionales (39,1 ± 2,2 años)	106 c-miR relacionados con respuesta inflamatoria	Inmediatamente después de la carrera: miR-150		de Gonzalo-Calvo <i>et al.</i> ⁴⁹

(continúa)

Tipo de ejercicio	Características de los sujetos	miRs analizados	Aumento	Disminución	Referencia bibliográfica
Resistencia					
Maratón	30 corredores de maratón, 15 aficionados ($40,1 \pm 1,4$ años) y 15 de élite ($40,0 \pm 1,7$ años)	miR-1 miR-26a miR-29b miR-30a miR-133a	Inmediatamente después del ejercicio: miR-1, miR-30a y miR-133a, de forma más acusada en los corredores de élite. Los niveles basales se recuperaron en menos de 24 h.	24 h después del ejercicio: miR-26a en corredores de élite.	Clauss <i>et al.</i> ⁴⁶
Fuerza					
Press de banca y Press de piernas. 5 series de 10 repeticiones al 70 % de 1 RM.	12 varones activos ($29,9 \pm 1,2$ años).	microarray y validación con qRT-PCR: miR-149*, miR-1908, miR-20a, miR-21, miR-133a, miR-146a, miR-210, miR-221, miR-222 y miR-328.	Tres días después del ejercicio: miR-149*.	Tres días después del ejercicio: miR-146a and miR-221.	Sawada <i>et al.</i> ⁵⁵
Jalón, Press de piernas y Mariposa. 3 series de 15 repeticiones, con un 25 % más de carga en la fase excéntrica que concéntrica.	11 sujetos entrenados, 4 varones y 7 mujeres (37 ± 2 años).	miR-126 miR-133	Inmediatamente del ejercicio: miRNA-133. Los niveles basales se recuperaron en menos de 1 h.		Uhleman <i>et al.</i> ⁵⁶
Concéntrico vs. Excéntrico					
Carrera a pie cuesta arriba y cuesta abajo. 30 min a 1 m/s, con 25 % de inclinación y sobrecarga del 12 % del peso corporal.	9 varones activos (27-36 años)	miR-1 miR-133a miR-133b miR-208a miR-208b miR-499	2 y/o 6 h después de la carrera cuesta abajo: miR-1, miR-133a, miR-133b y miR-208b. Los niveles basales se recuperaron en menos de 24 h. Inmediatamente después de la carrera cuesta arriba: miR-181b and miR-214. Los niveles basales se recuperaron en menos de 2 h.		Banzet <i>et al.</i> ⁴⁸
Potencia anaeróbica					
Test de Wingate	18 varones activos ($20,23 \pm 0,97$ años)	miR-1 miR-16 miR-122 miR-133a miR-133b miR-206 miR-499		Inmediatamente después del ejercicio: miR-1, miR-16, miR-122, miR-133a y miR-133b.	Cui <i>et al.</i> ⁵⁴

dichos estudios son contradictorios; mientras Wardle *et al.*⁴⁷, la concentración plasmática de miR-21, miR-221, miR-222 y miR-146a muestra niveles basales más elevados en deportistas de resistencia jóvenes frente a controles sedentarios. Sin embargo, contrariamente, Bye *et al.*⁴⁴, en un estudio con varones y mujeres adultos sanos, observaron que los niveles basales de miR-21 y miR-222 eran mayores aquellas personas con un menor VO_2 máx.

La dificultad para extraer conclusiones sólidas a partir de estos estudios puede deberse a diferencias metodológicas, en el diseño experimental, en el modelo de ejercicio o en las características de los sujetos (edad, historial de entrenamiento, etc.), entre otros, cuya influencia analizaremos a continuación.

Diferentes aproximaciones metodológicas y diseño experimental

Aunque existen numerosas técnicas para la detección de miRNAs⁶⁰, las más utilizadas para la identificación y cuantificación de c-miRNAs en plasma o suero son la secuenciación masiva, los microarray y la qRT-PCR^{60,61}. Cada una de estas técnicas tiene unas características diferenciadas y unas ventajas e inconvenientes específicos^{62,63} que deben considerarse en función del diseño experimental y de las características del estudio para que los resultados sean realmente informativos⁶⁴.

La técnica más utilizada en los estudios que han analizado c-miRNAs en respuesta al ejercicio ha sido la qRT-PCR^{44,45,47-49,52-54,56-59}, aunque

Tabla 2. Estudios sobre el perfil de microRNAs circulantes en respuesta al entrenamiento en personas sanas.

Modelo de ejercicio	Tiempo de entrenamiento	miRs modificados	Referencias
Ciclismo (cicloergómetro)	12 semanas 5 veces/semana 60 min al 65% Pmax	Aumento post-entrenamiento (3-5 días): miR-342-3p, let-7d, miR- 766, miR-25, miR-148a, miR-185, miR-21. Disminución post-entrenamiento (3-5 días): miR-103, miR-107	Nielsen <i>et al.</i> ⁵⁷
Ciclismo (cicloergómetro)	4 semanas 3 veces/semana 30 min al 70% VO ₂ max	Disminución post-entrenamiento: miR-486	Aoi <i>et al.</i> ⁵³
Remo	90 días entrenamiento para optimizar el rendimiento en 5 km	Aumento post-entrenamiento: miR-146a,miR-21, miR-221 y miR-222.	Baggish <i>et al.</i> ⁵²

Tabla 3. miRNA circulantes analizados en distintas publicaciones agrupados según los procesos biológicos en los que están implicados.

Ruta metabólica	Referencia bibliográfica	miRNAs analizados
Función muscular (cardíaca y esquelética)	Baggish <i>et al.</i> ⁵² Aoi <i>et al.</i> ⁵³ Uhleman <i>et al.</i> ⁵⁶ Mooren <i>et al.</i> ⁴⁵ Baggish <i>et al.</i> ⁵⁸ Gomes <i>et al.</i> ⁵⁹ Clauss <i>et al.</i> ⁴⁶ Banzet <i>et al.</i> ⁴⁸ Cui <i>et al.</i> ⁵⁴	miR-21, miR-133a miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-208b, miR-486, miR-499 miR-133 miR-1, miR-133a, miR-206, miR-208b, miR-499 miR-1, miR-133a, miR-499-5p, miR-208a miR-1, miR-133a, miR-206 miR-1, miR-26a, miR-29b, miR-30a, miR-133a miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-208a, miR-208b, miR-499 miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206, miR-499
Respuesta Inflamatoria	Baggish <i>et al.</i> ⁵² Mooren <i>et al.</i> ⁴⁵ Baggish <i>et al.</i> ⁵⁸ de Gonzalo-Calvo <i>et al.</i> ⁴⁹	miR-21, miR-146a miR-155, miR-21 miR-146a 106 c-miR relacionados con respuesta inflamatoria
Daño endotelial	Uhleman <i>et al.</i> ⁵⁶ Baggish <i>et al.</i> ⁵⁸	miR-126 miR-126
Angiogénesis	Baggish <i>et al.</i> ⁵²	miR-20a, miR-221, miR-222, miR-210, miR-328
Hipoxia	Baggish <i>et al.</i> ⁵²	miR-21, miR-210, miR-146a
Tejido cerebral	Baggish <i>et al.</i> ⁵⁸	miR-134
Proliferación celular	Cui <i>et al.</i> ⁵⁴	miR-16, miR-122

Sawada *et al.*⁵⁵ se decantaron por el uso de microarray, con posterior validación y cuantificación mediante qRT-PCR.

La mayoría de los autores ha analizado los niveles circulantes de una selección de uno o unos pocos miRNAs (típicamente entre 5 y 8), principalmente los denominados myomiRs, cuya expresión es específica del músculo estriado esquelético y/o cardíaco: miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-206a, miR-208b, miR-486 y miR-499^{45,48,53,54,58,59,65}. Otros autores, por su parte, han acompañado el análisis de myomiRs con algunos miRNAs descritos previamente como marcadores circulantes de procesos directamente relacionados con la respuesta al ejercicio agudo como queda recogido en la Tabla 3.

El tejido o tipo celular del que proceden estos c-miRNAs es potencialmente diverso tal y como proponen Nielsen *et al.*⁵⁷, aunque no ha sido analizado y es desconocido. Por ello, considerando la naturaleza

sistémica de la respuesta al ejercicio agudo, este tipo de análisis aporta una perspectiva incompleta de la respuesta de los c-miRNAs. Es más, incluso con estas aproximaciones limitadas los resultados obtenidos son heterogéneos, entre otras cosas porque no todos los autores han analizado los mismos myomiRs y muy pocos los han analizado todos. Así, Baggish *et al.*⁵² y Sawada *et al.*⁵⁵ no observan cambios en la expresión de ningún myomiR en respuesta a distintos modelos de ejercicio. Por el contrario, Uhleman *et al.*⁵⁶, Mooren *et al.*⁴⁵, Baggish *et al.*⁵⁸, Banzet *et al.*⁴⁸ y Clauss *et al.*⁴⁶, observan aumentos significativos postejercicio de miR-1, miR-133, miR-206, miR-208b y/o miR-499 y Cui *et al.*⁵⁴ solo observan una disminución significativa postejercicio en algunos de ellos. Sin embargo, la mayoría coincide en que la respuesta al ejercicio agudo de los myomiRs circulantes no es consecuencia de una liberación pasiva por parte del tejido muscular dañado, ya que ni sus niveles plasmáticos

ni su cinética muestra correlación con los de marcadores clásicos de daño muscular, como la concentración plasmática de creatina quinasa^{45,53,56,58,59}, por lo que podría tratarse de un proceso regulado. Sin embargo, no se conoce en qué forma son secretados ni si son captados por algún tejido. Sus dianas génicas tampoco han sido validadas.

Solo el estudio de de Gonzalo-Calvo *et al.*⁴⁹, en el que se analizaron 106 miRNAs inflamatorios, los de Bye *et al.*⁴⁴, Nielsen *et al.*⁵⁷ y Dávalos *et al.*⁶⁶, en los que se utilizó un panel comercial de más de 750 de los miRNAs expresados en diferentes tejidos humanos, y el de Sawada *et al.*⁵⁵, que utilizó microarray, llevaron a cabo una aproximación más amplia. Curiosamente, ninguno de estos autores observa cambios en la expresión de myomiRs en respuesta al ejercicio agudo. Tanto el análisis bioinformático como estadístico de estos datos difiere notablemente del de aproximaciones más limitadas, lo que dificulta las comparaciones directas entre estudios.

En este sentido, y con respecto al análisis de resultados de qRT-PCR, la estrategia utilizada para la normalización también varió entre los distintos estudios, especialmente debido a que hasta el momento no se ha establecido ni validado ningún miRNA constitutivo estable para normalizar la expresión de miRNAs, tampoco en el contexto de la respuesta al ejercicio⁴⁶. Así, varios autores se han decantado normalizar en función de los niveles de cel-miR-39, un miRNA de *Caenorhabditis elegans* añadido de forma externa y en igual cantidad a todas las muestras^{45,46,53,55,56,59}. Otros, por su parte, basándose en *software* específicos para detectar qué gen o grupo de genes se expresan de forma más estable en un conjunto de muestras, han utilizado dichos miRNAs, diferentes en cada caso, para normalizar sus datos de qRT-PCR^{47,48}. La elección de una estrategia inadecuada puede sesgar la capacidad para identificar diferencias entre los grupos de estudio y, desde luego, la falta de homogeneidad entre estudios representa una desventaja importante en la comparación de resultados^{51,67}. Aunque sería deseable una estrategia de normalización sólida y común, lo cierto es que la naturaleza del análisis de c-miRNAs no lo permite, por lo que lo ideal es identificar, validar y utilizar los normalizadores que mejor se adaptan a las características específicas de cada estudio⁵¹.

Finalmente, tal y como puede observarse en la Tabla 1, otro de los elementos de divergencia metodológicos son los diferentes modelos de ejercicio agudo a los que se sometieron a los voluntarios que participaron en los distintos estudios. Aunque los hemos agrupado en ejercicios de resistencia^{45,46,49,52,53,56,58,59}, fuerza^{55,56}, concéntrico vs. excéntrico⁴⁸ y potencia anaeróbica máxima⁵⁴, la diversidad dentro de algunos grupos, tanto en el modo como en la duración y la intensidad del ejercicio, es también importante. Incluso en aquellos estudios en los que el modelo de ejercicio fue el mismo, como ocurre en los que han analizado la respuesta aguda a un maratón^{45,46,49,56,58}, tanto las características de los sujetos (edad, género, años de entrenamiento), que analizaremos más adelante, como los puntos de toma de muestras o el control dietético podrían influir en la respuesta observada. Así, en algunos casos la muestra basal se extrajo justo antes del inicio del maratón^{49,56}, pero en otros se tomó uno⁵⁸, dos⁴⁵ o incluso entre dos y cinco días antes de la prueba⁴⁶. En estos casos, las diferencias observadas en la expresión de c-miRNAs entre la muestra basal y la tomada después de la prueba no permiten aislar el efecto del ejercicio, debido al potencial efecto de

variabilidad de factores no controlados, entre los que el más destacado es la alimentación.

En este sentido, cada vez hay más evidencias sobre la influencia de los componentes de la dieta en la expresión de miRNAs y en los niveles de c-miRNAs⁶⁸⁻⁷⁰, así como una nueva e intrigante relación entre la ingesta de miRNAs a partir de fuentes alimentarias, su absorción y su aparición en fluidos biológicos, como el plasma⁷¹. A pesar de esto, solo el artículo de de Gonzalo-Calvo *et al.*⁴⁹ ha llevado a cabo un control estricto de la ingesta de alimentos antes, durante y después del ejercicio.

Características de los sujetos de estudio

Como ya comentamos anteriormente, se observan grandes diferencias en las características de los sujetos incluidos en los distintos estudios, especialmente en lo que se refiere a la edad y la experiencia deportiva (Tabla 1). Así, mientras en el estudio de Baggish *et al.*⁵² participaron remeros universitarios de 19,1 años de media de edad, Uhleman *et al.*⁵⁶ reclutaron a varones adultos de 56,8 años que los autores consideran "corredores de maratón" y en el estudio de Gomes *et al.*⁵⁹ se analizó la respuesta a un medio maratón de corredores aficionados, obesos y con sobrepeso, algunos de los cuales llevaban practicando ejercicio menos de 6 meses. Ambos factores podrían introducir un elemento más de variabilidad que explique la heterogeneidad en la respuesta observada.

No existe demasiada información acerca del efecto de la edad en el perfil de c-miRNAs en humanos. Así, en un estudio pionero, Noren Hooten *et al.*⁷² observaron que la expresión de miR-151a-5p, miR-181a-5p and miR-1248 estaba reprimida significativamente en hombres y mujeres mayores (64 años de media) frente a jóvenes (30 años de media). Por su parte, Zhang *et al.*⁷³ sugieren que los perfiles circulantes de miR-29b y miR-92a deben cambiar gradualmente con el proceso de envejecimiento al observar diferencias entre sujetos de 22, 40, 59 y 70 años de media. Por ello, las diferencias en la edad de los sujetos podrían determinar diferencias, no solo en la respuesta al ejercicio, sino de partida, en los niveles basales de algunos c-miRNAs, introduciendo un elemento confusor.

Por su parte Baggish *et al.*⁵⁸ sugieren que el entrenamiento sistemático podría estar asociado a niveles basales elevados de c-miRNAs per se, particularmente algunos myomiRs, de acuerdo con lo observado por Nielsen *et al.*⁵⁷ a nivel intracelular en células musculares esqueléticas. Esto podría enmascarar el efecto del ejercicio agudo sobre estos c-miRNAs y explicaría por qué en algunos estudios con personas entrenadas no se observan cambios en los niveles circulantes de myomiRs^{49,52,53,55}.

Conclusiones

El ejercicio agudo induce una respuesta en el perfil de c-miRNAs que varía en función del modelo, intensidad o dosis de ejercicio y que pone de manifiesto su potencial papel regulador en los procesos sistémicos de recuperación y adaptación al ejercicio. Sin embargo, los perfiles descritos en los distintos estudios están muy influidos por factores confundidores biológicos, técnicos y metodológicos. Además, su respuesta durante el ejercicio sigue siendo desconocida.

Finalmente, los resultados de los trabajos incluidos en esta revisión sugieren que el ejercicio, como modulador del perfil de c-miRNAs, podría

constituir una alternativa viable y coadyuvante a las terapias farmacológicas y dietéticas basadas en miRNAs que actualmente se encuentran en desarrollo. En este sentido, la modulación terapéutica de la función de miRNAs implicados en procesos patológicos o degenerativos puede implicar tanto la inhibición como la ganancia de función de un miRNA en particular y ambas características se han observado en la respuesta de los c-miRNAs al ejercicio.

Perspectivas de futuro

Todos los estudios incluidos en esta revisión tienen un marcado carácter descriptivo, asociativo, y sigue pendiente, por lo tanto, conocer el origen, la forma de transporte, el destino y las dianas génicas de los c-miRNAs que responden al ejercicio. Esta información es imprescindible para conocer el papel funcional de estos reguladores epigenéticos en la respuesta molecular al ejercicio, la cual, en último término, coordina los efectos beneficiosos del ejercicio para la salud.

Su validación como biomarcadores de ejercicio podría contribuir también al desarrollo de recomendaciones de ejercicio más precisas o incluso personalizadas, a optimizar su aplicación como herramienta preventiva o terapéutica y a explorar los límites máximos del ejercicio saludable.

Bibliografía

- Booth FW, Lees SJ. Fundamental questions about genes, inactivity, and chronic diseases. *Physiol Genomics*. 2007;28(2):146-57.
- Fiuzza-Luces C, Garatachea N, Berger N a, Lucia A. Exercise is the real polypill. *Physiology (Bethesda)*. 2013;28(5):330-58.
- Li S, Laher I. Exercise Pills: At the Starting Line. *Trends Pharmacol Sci*. 2015;36(12):906-17.
- Hawley J a, Hargreaves M, Joyner MJ, Zierath JR. Review Integrative Biology of Exercise. *Cell*. 2014;159(4):738-49.
- Comisión Europea, Dirección General de Educación y Cultura. Special Eurobarometer "Sport and physical activity". Bruselas: TNS Opinion & Social. 2010.
- Ministerio de Educación, Cultura y Deporte, Subdirección General de Estadística y Estudios, Secretaría General Técnica. Encuesta de hábitos deportivos en España. Madrid: Subdirección General de Documentación y Publicaciones. 2015.
- Neufer PD, Bamman MM, Muoio DM, Bouchard C, Cooper DM, Goodpaster BH, et al. Understanding the Cellular and Molecular Mechanisms of Physical Activity-Induced Health Benefits. *Cell Metab*. 2015;22(1):4-11.
- Goldstein MD. Humoral nature of the hypoglycemic factor of muscular work. *Diabetes*. 1961;10(3):232-34.
- Coffey VG, Hawley J a. The Molecular Basis of Training Adaptation. *Sport Med*. 2007;37(9):737-63.
- Egan B, Zierath JR. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab*. 2013;17(2):162-84.
- Thompson PD, Crouse SF, Goodpaster B, Kelley D, Moyna N, Pescatello L. The acute versus the chronic response to exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2001;33(6 Suppl):S438-45; discussion S452-3.
- Lee I. Dose-response relation between physical activity and fitness: Even a little is good; more is better. *JAMA*. 2007;297(19):2137-9.
- Viña J, Sanchis-Gomar F, Martínez-Bello V, Gómez-Cabrera MC. Exercise acts as a drug: The pharmacological benefits of exercise. *Br J Pharmacol*. 2012;167(1):1-12.
- Pareja-Galeano H, Sanchis-Gomar F, García-Giménez JL. Physical exercise and epigenetic modulation: Elucidating intricate mechanisms. *Sport Med*. 2014;44(4):429-36.
- Denham J, Marques FZ, O'Brien BJ, Charchar FJ. Exercise: Putting action into our epigenome. *Sport Med*. 2014;44(2):189-209.
- Barrès R, Yan J, Egan B, Trebak JT, Rasmussen M, Fritz T, et al. Acute exercise remodels promoter methylation in human skeletal muscle. *Cell Metab*. 2012;15(3):405-11.
- McGee SL, Hargreaves M. AMPK-mediated regulation of transcription in skeletal muscle. *Clin Sci (Lond)*. 2010;118(8):507-18.
- Zacharewicz E, Lamon S, Russell AP. MicroRNAs in skeletal muscle and their regulation with exercise, ageing, and disease. *Front Physiol*. 2013;4:266. <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2013.00266>.
- Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*. 2008;18(10):997-1006.
- Ebert MS, Sharp P a. Roles for MicroRNAs in conferring robustness to biological processes. *Cell*; 2012;149(3):505-24.
- Kozomara A, Griffiths-Jones S. MiRBase: Annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(D1):68-73.
- Friedman RC, Farh KKH, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009;19(1):92-105.
- Mendell JT, Olson EN. MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell*. 2013;148(6):1172-87.
- Lugo-Trampe Á, Trujillo-Murillo KDC. MicroRNAs: reguladores clave de la expresión génica. *Med Univ*. 2009;11(44):187-92.
- Chen X, Liang H, Zhang J, Zen K, Zhang CY. Secreted microRNAs: A new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol*; 2012;22(3):125-32.
- Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*. 2004;116(2):281-97.
- Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*. 2003;115(2):209-16.
- Castanotto D, Rossi JJ. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Mol Biol*. 2009;457(7228):426-33.
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(30):10513-8.
- Hu G, Drescher KM, Chen XM. Exosomal miRNAs: Biological Properties and Therapeutic Potential. *Front Genet*. 2012;3:56. <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2012.00056>.
- Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Gutiérrez-Vázquez C, Sánchez-Madrid F, Mittelbrunn M. Sorting it out: Regulation of exosome loading. *Semin Cancer Biol*. 2014;28(1):3-13.
- Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108(12):5003-8.
- Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol*. 2011;13(4):423-33.
- Gupta SK, Bang C, Thum T. Circulating MicroRNAs as biomarkers and potential paracrine mediators of cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010;3(5):484-8.
- Etheridge A, Gomes CPC, Pereira RW, Galas D, Wang K. The complexity, function, and applications of RNA in circulation. *Front Genet*. 2013;4:115. <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2013.00115>.
- Kopreski MS, Benko FA, Kwak LW, Gocke CD. Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res*. 1999;5(8):1961-5.
- Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, How Huang K, Jen Lee M, et al. The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Clin Chem*. 2010;56(11):1733-41.
- Bang C, Batkai S, Dangwal S, Gupta SK, Foinquinos A, Holzmann A, et al. Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Invest*. 2014;124(5):2136-46.
- Creemers EE, Tjissen AJ, Pinto YM. Circulating MicroRNAs: Novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circ Res*. 2012;110(3):483-95.
- Keller A, Meese E. Can circulating miRNAs live up to the promise of being minimal invasive biomarkers in clinical settings? *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2016;7(2):148-56.
- Wang G-K, Zhu J-Q, Zhang J-T, Li Q, Li Y, He J, et al. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J*. 2010;31(6):659-66.
- Rayner K, Dimmeler S, Calin GA, Thum T, Raizman JE, Diamandis EP. Novel Biomarkers for Acute Myocardial Infarction: Is MicroRNA the New Kid on the Block? *Clin Chem*. 2014;60(6):812-7.
- Gomes CP, Kim T-K, Wang K, He Y. The implications on clinical diagnostics of using microRNA-based biomarkers in exercise. *Expert Rev Mol Diagn*. 2015;15(6):1-12.
- Bye A, Røsjø H, Aspenes ST, Condorelli G, Omland T, Wisløff U. Circulating MicroRNAs and Aerobic Fitness - The HUNT-Study. *PLoS One*. 2013;8(2):e57496.
- Mooren FC, Viereck J, Kruger K, Thum T. Circulating microRNAs as potential biomarkers of aerobic exercise capacity. *Am J Physiol Circ Physiol*. 2014;306(4):H557-63.

46. Claus S, Wakili R, Hildebrand B, Käbb S, Hoster E, Klier I, et al. MicroRNAs as Biomarkers for Acute Atrial Remodeling in Marathon Runners (The miRathon Study - A Sub-Study of the Munich Marathon Study). *PLoS One*. 2016;11(2):e0148599.
47. Wardle SL, Bailey MES, Kilikevicius A, Malkova D, Wilson RH, Venckunas T, et al. Plasma MicroRNA Levels Differ between Endurance and Strength Athletes. *PLoS One*. 2015;10(4):e0122107.
48. Banzet S, Chennaoui M, Girard O, Racinais S, Drogou C, Chalabi H, et al. Changes in circulating microRNAs levels with exercise modality. *J Appl Physiol*. 2013;115(9):1237-44.
49. de Gonzalo-Calvo D, Dávalos A, Montero A, García-González Á, Tyshkovska I, González Medina A, et al. Circulating inflammatory miRNA signature in response to different doses of aerobic exercise. *J Appl Physiol*. 2015;119(2):124-34.
50. Wang J, Chen J, Sen S. MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. *J Cell Physiol*. 2016;231(1):25-30.
51. Marabita F, de Candia P, Torri A, Tegnér J, Abrignani S, Rossi RL. Normalization of circulating microRNA expression data obtained by quantitative real-time RT-PCR. *Brief Bioinform*. 2016;17(2):204-12.
52. Baggish AL, Hale A, Weiner RB, Lewis GD, Systrom D, Wang F, et al. Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training. *J Physiol*. 2011;589(Pt 16):3983-94.
53. Aoi W, Ichikawa H, Mune K, Tanimura Y, Mizushima K, Naito Y, et al. Muscle-enriched microRNA miR-486 decreases in circulation in response to exercise in young men. *Front Physiol*. 2013;4:80. <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2013.00080>.
54. Cui SF, Li W, Niu J, Zhang CY, Chen X, Ma JZ. Acute responses of circulating microRNAs to low-volume sprint interval cycling. *Front Physiol*. 2015;6:311. <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2015.000311>.
55. Sawada S, Kon M, Wada S, Ushida T, Suzuki K, Akimoto T. Profiling of Circulating MicroRNAs after a Bout of Acute Resistance Exercise in Humans. *PLoS One*. 2013;8(7):1-8.
56. Uhlemann M, Möbius-Winkler S, Fikenzler S, Adam J, Redlich M, Möhlenkamp S, et al. Circulating microRNA-126 increases after different forms of endurance exercise in healthy adults. *Eur J Prev Cardiol*. 2014;21(4):484-91.
57. Nielsen S, Åkerström T, Rinnov A, Yfanti C, Scheele C, Pedersen BK, et al. The miRNA plasma signature in response to acute aerobic exercise and endurance training. *PLoS One*. 2014;9(2):e87308.
58. Baggish AL, Park J, Min P-K, Isaacs S, Parker B a, Thompson PD, et al. Rapid upregulation and clearance of distinct circulating microRNAs after prolonged aerobic exercise. *J Appl Physiol*. 2014;116(5):522-31.
59. Gomes CPC, Oliveira-Jr GP, Madrid B, Almeida JA, Franco OL, Pereira RW. Circulating miR-1, miR-133a, and miR-206 levels are increased after a half-marathon run. *Biomarkers*. 2014;19(7):585-9.
60. Tian T, Wang J, Zhou X. A review: microRNA detection methods. *Org Biomol Chem*. 2015;13(8):2226-38.
61. De Planell-Saguer M, Rodicio MC. Detection methods for microRNAs in clinic practice. *Clin Biochem*. 2013;46(10-11):869-78.
62. Tzimagiorgis G, Michailidou EZ, Kritis A, Markopoulos AK, Kouidou S. Recovering circulating extracellular or cell-free RNA from bodily fluids. *Cancer Epidemiol*. 2011;35(6):580-9.
63. Dong H, Lei J, Ding L, Wen Y, Ju H, Zhang X. MicroRNA: Function, Detection, and Bioanalysis. *Chem Rev*. 2013;113(8):6207-33.
64. Huang Y, Zou Q, Wang SP, Tang SM, Zhang GZ, Shen XJ. The discovery approaches and detection methods of microRNAs. *Mol Biol Rep*. 2011;38(6):4125-35.
65. Guller I, Russell AP. MicroRNAs in skeletal muscle: their role and regulation in development, disease and function. *J Physiol*. 2010;588(Pt 21):4075-87.
66. Dávalos A, Úbeda N, Montero A, García-González Á, Ramírez de Molina A, Casas-Agustench P, González-Medina A, Martínez-Cambor P, Rabadán M, Díaz-Martínez E, Iglesias-Gutiérrez E. Exercise dose affects the circulating microRNA profile in response to acute endurance exercise in middle-aged amateur runners. *PLoS one* (comunicación personal).
67. Schwarzenbach H, Da Silva AM, Calin G, Pantel K. Data normalization strategies for microRNA quantification. *Clin Chem*. 2015;61(11):1333-42.
68. Gil-Zamorano J, Martin R, Daimiel L, Richardson K, Giordano E, Nicod N, et al. Docosahexaenoic Acid Modulates the Enterocyte Caco-2 Cell Expression of MicroRNAs Involved in Lipid Metabolism. *J Nutr*. 2014;575-85.
69. Tomé-Carneiro J, Larrosa M, Yáñez-Gascón MJ, Dávalos A, Gil-Zamorano J, González M, et al. One-year supplementation with a grape extract containing resveratrol modulates inflammatory-related microRNAs and cytokines expression in peripheral blood mononuclear cells of type 2 diabetes and hypertensive patients with coronary artery disease. *Pharmacol Res*. 2013;72:69-82.
70. Ross SA, Davis CD. The Emerging Role of microRNAs and Nutrition in Modulating Health and Disease. *Annu Rev Nutr*. 2014;17:34(1):305-36.
71. Baier SR, Nguyen C, Xie F, Wood JR, Zemleni J. MicroRNAs Are Absorbed in Biologically Meaningful Amounts from Nutritionally Relevant Doses of Cow Milk and Affect Gene Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells, HEK-293 Kidney Cell Cultures, and Mouse Livers. *J Nutr*. 2014;144(10):1495-500.
72. Noren Hooten N, Fitzpatrick M, Wood WH, De S, Ejiogu N, Zhang Y, et al. Age-related changes in microRNA levels in serum. *Aging (Albany NY)*. 2013;5(10):725-40.
73. Zhang H, Yang H, Zhang C, Jing Y, Wang C, Liu C, et al. Investigation of MicroRNA Expression in Human Serum During the Aging Process. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2014;70(9):1-8.