

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

Caracterização do Perfil de microRNAs e Genes Alvo Muscular
Esquelético Envolvidos na Rarefação Microvascular de Ratos
Espontaneamente Hipertensos: Papel do Treinamento Físico

Tiago Fernandes

São Paulo
2015

TIAGO FERNANDES

Caracterização do Perfil de microRNAs e Genes Alvo Muscular
Esquelético Envolvidos na Rarefação Microvascular de Ratos
Espontaneamente Hipertensos: Papel do Treinamento Físico

Tese apresentada à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Estudos
Biodinâmicos da Educação Física e
Esporte

Orientador: Profa. Dra. Edilamar Menezes
de Oliveira

São Paulo

2015

Catálogo da Publicação
Serviço de Biblioteca
Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo

Fernandes, Tiago

Caracterização do perfil de microRNAs e genes alvo muscular
esquelético envolvidos na rarefação microvascular de ratos
espontaneamente hipertensos: papel do treinamento físico /
Tiago Fernandes. – São Paulo : [s.n.], 2015.
247p.

Tese (Doutorado) - Escola de Educação Física e
Esporte da Universidade de São Paulo.

Orientadora: Profa. Dra. Edilamar Menezes de Oliveira.

1. Hipertensão 2. Treinamento físico 3. Músculo
esquelético 4. microRNA I. Título.

*Dedico este trabalho aos meus pais José e Laura (in memoriam)
que sempre me apoiaram em todas as etapas da minha vida
e que são responsáveis pela concretização desse sonho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram para que a minha trajetória acadêmica se tornasse uma busca prazerosa. Muito obrigado!

Aos meus pais Jose e Laura (*in memoriam*) pelo apoio incondicional; e a minha irmã Mônica e madrastra Marlene pelo cuidado incessante e por todo carinho e convivência.

Aos meus tios, Ana e Antônio, pela atenção e zelo que sem dúvida nenhuma traduz o significado de família. Aos meus primos Carlos, Marcos e Elaine pelo apoio e cuidado de “irmãos”. Agradeço incansavelmente a todos da minha família por cada atitude de apoio diante da minha caminhada.

À minha orientadora, Profa. Dra. Edilamar Menezes de Oliveira, por proporcionar a oportunidade de trabalhar com ela ao longo desses mais de 10 anos, pela confiança depositada em meu trabalho, pela amizade e compreensão, pelo grande apoio, incentivo e inestimável ajuda profissional e intelectual, que possibilitaram a realização deste e dos demais trabalhos.

Ao Prof. Dr. M. Ian Phillips pela colaboração científica e intelectual nos trabalhos, pelo apoio e amizade. Agradeço ao convite e a hospitalidade em me receber em seu Laboratório e sua casa.

Ao Prof. Dr. Paulo R. Ramires e a Profa. Dra. Patrícia C. Brum por contribuírem para meu amadurecimento científico, pelas experiências compartilhadas, além da disponibilidade e atenção que tem me dado ao longo desses anos de vida acadêmica.

À Prof. Dra. Luciana V. Rossoni pela colaboração no trabalho, por permitir a utilização do espaço físico e equipamentos de seu laboratório, além da amizade, compreensão e grande incentivo nesta longa caminhada científica.

Aos amigos Fernanda, Vander, Aline, Úrsula, Stéphanos e Natan por estarem sempre dispostos a me socorrer nos momentos mais críticos, por todo apoio e ajuda na realização deste trabalho, paciência e amizade.

Aos eternos ICs João, André e Lilian pela ajuda imensurável no treinamento físico dos animais e pela amizade.

Aos amigos Suliana, Camila e Rodrigo pela ajuda experimental e intelectual.

Aos integrantes e ex-integrantes do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica: Fernanda, Vander, Úrsula, Stéphanos, Natan, Cléber, João, André, Lilian, Clara, Camila, Cho, Edu, Marco, Luiz, Juliane, Bozi, Rodrigo, Dani, Aline, Vanessa, Paulo, Fafá, Chris, Igor, Lígia, Willian, Telma, Nathalie, Carmão, Ale, Júlio e Valério pelo auxílio e por tornarem o ambiente de trabalho mais alegre e produtivo.

Aos técnicos: Glória, Katt, Marcelle, Úrsula, Luciano e Ney pelo imenso apoio diário na realização dos experimentos e pela amizade.

Aos meus amigos Wil, Sidney, Iva, Renato, Marcão, Renata, Luciana, Aline, Wanil, Ricks e Dani pelo incentivo, torcida e pelos momentos de descontração.

À secretária de Pós-graduação da EEFE: Ilza, Márcio, Mariana e Paulo por toda ajuda no trabalho burocrático.

A todos os funcionários da EEFE-USP.

À FAPESP, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro e incentivo a pesquisa.

*“A ciência progride de duas maneiras:
adicionando fatos novos e simplificando os existentes...”*

Claude Bernard

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 - Classificação diagnóstica da PA (indivíduos adultos ≥ 18 anos).....	7
TABELA 2 - Especificidade dos receptores ao ligante VEGF e efeitos biológicos.....	15
TABELA 3 - Visão esquemática do protocolo de treinamento físico de natação para ratos. PC: peso corporal.....	47
TABELA 4 - Tabela de genes analisados no músculo sóleo via <i>real-time PCR</i>	65
TABELA 5 - Massa muscular esquelética e cardíaca. Resultados expressos como média \pm EPM. VE: ventrículo esquerdo. * $p < 0,05$ vs. WKY.....	80
TABELA 6 - Massa tecidual. Resultados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. WKY, WKY-T e SHR-T, ** $p < 0,01$ vs. WKY e WKY-T, # $p < 0,05$ vs. WKY, † $p < 0,05$ vs. WKY e SHR, ‡ $p < 0,05$ vs. WKY e WKY-T.....	103
TABELA 7 - Dados ecocardiográficos. Resultados expressos como média \pm EPM. ‡ $p < 0,05$ vs. WKY e WKY-T, # $p < 0,05$ vs. SHR, † $p < 0,05$ vs. WKY. DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo, DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo, ERP: espessura relativa da parede.....	104
TABELA 8 - Função sistólica e diastólica ventricular esquerda. Resultados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. WKY, WKY-T e SHR-T, ‡ $p < 0,05$ vs. WKY e WKY-T, # $p < 0,05$ vs. SHR. FE: fração de ejeção, VSF: volume sistólico final, VDF: volume diastólico final, TD: tempo de desaceleração da onda E, TE: tempo de ejeção, TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico, IPM: índice de performance miocárdica.....	106
TABELA 9 - Número de miRNAs validados e preditos dos miRNAs diferencialmente expressos pela HA e corrigidos pelo TF	

	aeróbio.....	144
TABELA 10 -	mRNAs co-desregulado por 3 ou mais miRNAs diferencialmente expressos pela HA e corrigidos pelo TF aeróbio.....	145
TABELA 11 -	Vinte e seis vias foram agrupadas em quatro grandes grupos de processos biológicos a partir de alvos validados dos miRNAs-1-3p, 99b*, -205, -146b-5p, -96, -182, -499, -140-3p e -208b-3p....	147
TABELA 12 -	Expressão relativa de genes angiogênicos reduzidos no grupo SHR comparado ao grupo WKY e não modificados pelo TF no músculo sóleo. Resultados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. WKY.....	151
TABELA 13 -	Expressão relativa de genes aumentados no grupo SHR e não modificados pelo TF no músculo sóleo. Resultados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. WKY.....	153

LISTA DE FIGURAS

Página

- FIGURA 1 - A sinalização de VEGF/ VEGFR2 promove a síntese de NO. Em curto prazo, a produção de NO é mediada pelo aumento do Ca^{2+} citosólico, resultante da ativação de PLC- γ e geração de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). A ativação de Akt conduz a fosforilação e ativação da eNOS, proporcionando um mecanismo para a síntese sustentada de NO independente de Ca^{2+} . A PKC também é relatada por mediar a regulação positiva de eNOS induzida por VEGF, um outro mecanismo que leva a síntese de NO a longo prazo..... 17
- FIGURA 2 - Visão esquemática das vias de sinalização de VEGF/ VEGFR2 na sobrevivência celular e angiogênese. A sobrevivência da célula endotelial dependente de VEGF é mediada, em parte, por meio da ativação de PI3K/ Akt e desativação das vias apoptóticas. O aumento da fosforilação de FAK é um ponto de convergência de diversos estímulos de sobrevivência de células endoteliais, incluindo o VEGF, as interações de matriz-integrina e *shear stress*. A interação entre a integrina $\alpha\beta 3$ e o VEGFR2 também pode desempenhar um papel de sobrevivência em função de VEGF. Os efeitos anti-apoptóticos de longo prazo de VEGF podem envolver a regulação positiva de proteínas anti-apoptóticas, tais como Bcl-2 e A1. Alvos *downstreams* da ativação da Akt na inibição da apoptose são Bad e caspase-9. Bcl-2 e A1 podem inibir os membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 e as XIAP têm como alvo as caspases efetoras terminais (caspases 3 e 7). FAK: proteína de adesão focal, MEC: matriz extracelular, SS: *shear stress*, PI3K: fosfoinositídeo 3 quinase; Akt: proteína quinase B; eNOS: óxido nítrico sintase endotelial, Bcl-2 e BAD: proteínas anti e pró-apoptóticas respectivamente; A1: proteína anti-apoptótica, XIAP: inibidores de apoptose; S6K:

	p70S6 quinase.....	20
FIGURA 3 -	Esquema representativo da via de sinalização mediada por IGF-I na regulação da massa muscular. O IGF-I ao ligar no seu receptor IGF-IR ativa duas principais vias: MAPK que permite a proliferação celular por meio da ativação de ERK1/2 e a da PI3K/ Akt/ mTOR que promove a diferenciação celular e hipertrofia por meio da ativação de síntese protéica muscular e inibição da proteólise muscular.....	28
FIGURA 4 -	Localizações genômicas dos miRNAs (Adaptado de KIM et al., 2009).....	34
FIGURA 5 -	Biogênese dos miRNAs e seu mecanismo de ação (HE & HANNON, 2004).....	36
FIGURA 6 -	MiRNAs e angiogênese. Vários miRNAs pró-angiogênicos estimulam a angiogênese regulando fatores pró-angiogênicos como o VEGF. Isto resulta em uma maior e acelerada formação de vasos sanguíneos, portanto, em um aumento do suporte de oxigênio (pontos azuis) e nutrientes (pontos laranja), promovendo o metabolismo oxidativo. Inversamente, os miRNAs anti-angiogênicos inibem a formação de vasos através da indução de fatores anti-angiogênicos como a trombospondina-1 (TSP-1) e outras proteínas relacionadas (adaptado de FRAISL et al., 2009).....	38
FIGURA 7 -	Representação esquemática da localização genômica dos miRNAs presentes em diferentes genes da MHC e suas sequências nucleotídicas (VAN ROOIJ et al., 2009).....	44
FIGURA 8 -	MiRNAs muscular esquelético e genes alvo selecionados que regulam a proliferação celular, diferenciação e hipertrofia / atrofia em resposta ao exercício físico e as patologias.....	45
FIGURA 9 -	Aparato de treinamento físico de natação para rato.....	48
FIGURA 10 -	Sistema em esteira rolante para avaliação do esforço físico máximo.....	49
FIGURA 11 -	Congelamento e cortes do tecido. (A) Isopentano refrigerado em nitrogênio líquido. Quando o isopentano fica com a base	

	congelada é o ponto ótimo para imersão do tecido. (B) Tecido é introduzido no isopentano durante 10 segundos (C) e posteriormente transferido para tubo de 50 ml contendo nitrogênio líquido. (D) Conservação em nitrogênio líquido a aproximadamente -196°C (E) Criostato Mícron HM505E (Zeiss, Walldorf, Germany), onde foram realizados os cortes do tecido...	53
FIGURA 12 -	Análise microscópica do corte histológico do músculo sóleo por histoquímica no pH 10,3 de um rato controle. I corresponde as fibras do tipo I, IIa fibras do tipo IIa e Int as fibras intermediárias. Barra: 30 µm.....	54
FIGURA 13 -	Análise histológica da capilarização no músculo sóleo em rato controle, pH 10,3. As setas indicam os capilares. Barra: 30 µm...	55
FIGURA 14 -	Análise microscópica do corte histológico do músculo sóleo avaliado por imunohistoquímica. Laminina marcada em verde identifica a lâmina basal da fibra muscular, MHC-Iβ marcada em vermelho identifica as fibras do tipo I, as escuras tipo II e as mescladas as intermediárias e o Hoechst marcado em azul identifica os núcleos das fibras.....	57
FIGURA 15 -	Esquema representativo do miógrafo de arame para pequenos vasos utilizado para o experimento de reatividade vascular na artéria femoral.....	60
FIGURA 16 -	Análise da integridade do RNA do músculo sóleo por eletroforese em gel de agarose.....	62
FIGURA 17 -	Resultado da massa corporal pré e pós TF de natação (A) representado em gramas (g) e da medida da gordura reto peritoneal pós-período de TF (B) representado em gramas corrigido pelo comprimento da tíbia (g/mm). Os dados estão representados na forma de média ± EPM. * p< 0,01 vs. Pré-TF e WKY-T e SHR-T Pós-TF; ** p< 0,01 vs. WKY e SHR e # p< 0,05 vs. WKY.....	73
FIGURA 18 -	Parâmetros hemodinâmicos. Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Diastólica (PAD), Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC) de repouso Pré TF (A) e Pós TF (B)	

de ratos WKY e SHR submetidos ao protocolo experimental. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0,001$ vs. WKY e WKY-T; # $p < 0,01$ vs. WKY e SHR; † $p < 0,001$ vs. SHR.....	75
FIGURA 19 - Teste de esforço físico máximo. Velocidade (A), Tempo (B) e Distância Percorrida (C) Pré e Pós TF. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. Pré TF e WKY e SHR Pós TF; † $p < 0,05$ vs. Pré TF e WKY-T e SHR-T Pós TF.....	77
FIGURA 20 - Consumo de oxigênio pico pré e pós TF. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. Pré TF e WKY-T e SHR-T Pós TF; † $p < 0,05$ vs. Pré TF e WKY e SHR Pós TF.....	78
FIGURA 21 - Atividade da enzima citrato sintase no músculo sóleo representada em valores de $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$. Resultados expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. WKY e SHR.....	79
FIGURA 22 - Histoquímica do sóleo pela reação ATPase miosínica. As setas são os capilares, I as fibras tipo I, A as fibras tipo IIa e Inter as intermediárias.....	81
FIGURA 23 - Área de secção transversa das fibras musculares do tipo I, IIa e Intermediárias (Inter) (A) e distribuição dos tipos de fibra (B) pelo método de histoquímica. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM. * $p < 0,001$ vs. WKY, WKY-T e SHR-T; † $p < 0,01$ vs. WKY-T.....	82
FIGURA 24 - Imagens representativas da caracterização imunohistoquímica do músculo sóleo.....	83
FIGURA 25 - Área de secção transversa das fibras musculares do tipo I, II e Intermediárias (Inter) (A) e distribuição dos tipos de fibra (B) pelo método de imunohistoquímica. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM. * $p < 0,001$ vs. WKY, WKY-T e SHR-T; † $p < 0,01$ vs. WKY-T.....	85
FIGURA 26 - Expressão do miRNA-208b (A) e do miRNA-499 (B) no músculo sóleo. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM. ** $p < 0,01$ vs. WKY, WKY-T e SHR-T; †† $p < 0,01$ vs. WKY	

e WKY-T.....	86
FIGURA 27 - Razão capilar por fibra no músculo sóleo. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. WKY, SHR e SHR-T; † $p < 0,05$ vs. WKY, WKY-T e SHR-T, ‡ $p < 0,05$ vs. WKY-T e SHR.....	87
FIGURA 28 - Expressão do miRNA-16 (A), miRNA-21 (B) e miRNA-126 no músculo sóleo. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. WKY e SHR; † $p < 0,05$ vs. WKY, WKY-T e SHR-T.....	89
FIGURA 29 - Expressão do miRNA-221 (A) e miRNA-222 (B) no músculo sóleo. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. WKY e SHR.....	90
FIGURA 30 - Efeito do TF aeróbio sobre os fatores angiogênicos na HA. Blots representativos de VEGF, VEGFR1, VEGFR2, eNOS e GAPDH (A). Níveis protéicos de VEGF, VEGFR1, VEGFR2 e eNOS no músculo sóleo analisados por western blot, respectivamente (B-E). Expressão gênica de PI3KR2 (F). As bandas alvo foram normalizadas pela proteína GAPDH. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. WKY, SHR e SHR-T; † $p < 0,05$ vs. WKY, WKY-T e SHR-T; ‡ $p < 0,05$ vs. WKY-T e SHR; § $p < 0.05$ vs. WKY e SHR.....	92
FIGURA 31 - Efeito do TF aeróbio sobre as proteínas regulatórias da apoptose no músculo esquelético na HA. Blots representativos de Bcl-2, Bcl-x, Bad, p-Badser112 e GAPDH de WKY, WKY-T, SHR, SHR-T (A). Níveis protéicos de Bcl-2, Bcl-x, Bad e p-Badser112 no músculo sóleo analisados por western blot, respectivamente (B-F). As bandas alvo foram normalizadas pela proteína GAPDH. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. WKY, WKY-T e SHR-T; † $p < 0,05$ vs. WKY e WKY-T.....	94
FIGURA 32 - Massa corporal e gordura reto peritoneal. Resultados da massa corporal pré e pós TF de natação (A) representado em gramas (g) e da medida da gordura reto peritoneal pós período de TF	

	(B) corrigido pelo comprimento da tíbia (mg/mm). Os dados estão representados na forma de média \pm EPM. * vs. Pré-TF, WKY-T e SHR-T Pós-TF, $p < 0,05$; ** vs. WKY, $p < 0,01$ e *** vs. WKY, $p < 0,001$	97
FIGURA 33 -	Parâmetros Hemodinâmicos. Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Diastólica (PAD), Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC) de repouso Pré TF (A) e Pós TF (B). Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0,001$ vs. WKY e WKY-T; † $p < 0,01$ vs. SHR; # $p < 0,01$ vs. WKY e SHR.....	99
FIGURA 34 -	Consumo de oxigênio pico pré e pós TF. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * vs. Pré TF e WKY, WKY-T e SHR-T Pós TF, $p < 0,05$; † vs. Pré e WKY e SHR Pós TF.....	100
FIGURA 35 -	Atividade da enzima citrato sintase no músculo sóleo representada em valores de nmol. min ⁻¹ . mg de proteína ⁻¹ . Resultados expressos como média \pm EPM. * vs. WKY e SHR, $p < 0,05$	101
FIGURA 36 -	Histoquímica do sóleo pela reação ATPase miosínica. As setas são os capilares, I as fibras tipo I, A as fibras tipo IIa e Inter as intermediárias.....	107
FIGURA 37 -	Área de secção transversa das fibras musculares do tipo I, IIa e Intermediárias (Inter) (A) e distribuição dos tipos de fibra (B) pelo método de histoquímica. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM. * $p < 0,001$ vs. WKY, WKY-T e SHR-T; † $p < 0,01$ vs. WKY-T.....	108
FIGURA 38 -	Curva força específica (A) e curva de porcentagem de força tetânica máxima (B) no músculo EDL. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM. * $p < 0,01$ vs. WKY e WKY-T; † $p < 0,05$ vs. SHR.....	109
FIGURA 39 -	Força específica corrigida pelo peso (A), força específica corrigida pela área de secção transversa (B), <i>time to peak</i> (C) e TR50 (D) do músculo EDL no <i>twitch</i> 1Hz. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. WKY e	

	WKY-T; † p<0,05 vs. WKY, WKY-T e SHR-T.....	111
FIGURA 40 -	Força específica corrigida pelo peso (A), força específica corrigida pela área de secção transversa (B), <i>time to peak</i> (C) e TR50 (D) do músculo EDL no tétano 80Hz. Os dados estão representados na forma de média ± EPM. * p< 0,05 vs. WKY, WKY-T e SHR-T.....	112
FIGURA 41 -	Curva força específica (A) e curva de percentagem de força tetânica máxima (B) no músculo sóleo. Os dados estão representados na forma de média ± EPM. * p< 0,01 vs. WKY, WKY-T e SHR-T.....	113
FIGURA 42 -	Força específica corrigida pelo peso (A), força específica corrigida pela área de secção transversa (B), <i>time to peak</i> (C) e TR50 (D) do músculo sóleo no <i>twitch</i> 1Hz. Os dados estão representados na forma de média ± EPM. * p< 0,05 vs. WKY e WKY-T; † p<0,05 vs. WKY, WKY-T e SHR-T.....	115
FIGURA 43 -	Força específica corrigida pelo peso (A), força específica corrigida pela área de secção transversa (B), <i>time to peak</i> (C) e TR50 (D) do músculo sóleo no tétano 80Hz. Os dados estão representados na forma de média ± EPM. * p< 0,05 vs. WKY, WKY-T e SHR-T.....	116
FIGURA 44 -	Curva fadiga (A) e curva de percentagem de força tetânica máxima referente ao primeiro tétano (B) no músculo EDL. Os dados estão representados na forma de média ± EPM.....	117
FIGURA 45 -	<i>Time to peak</i> no primeiro tétano da fadiga (A), <i>time to peak</i> no último tétano da fadiga (B), TR50 no primeiro tétano da fadiga (C), TR50 no último tétano da fadiga (D) do músculo EDL. Os dados estão representados na forma de média ± EPM. * p< 0,05 vs. WKY, WKY-T e SHR-T.....	119
FIGURA 46 -	Curva fadiga (A) e curva de percentagem de força tetânica máxima referente ao primeiro tétano (B) no músculo sóleo. Os dados estão representados na forma de média ± EPM.....	120
FIGURA 47 -	<i>Time to peak</i> no primeiro tétano da fadiga (A), <i>time to peak</i> no último tétano da fadiga (B), TR50 no primeiro tétano da fadiga	

	(C), TR50 no último tétano da fadiga (D) do músculo sóleo. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM.....	122
FIGURA 48 -	Imagens representativas da estrutura da artéria femoral marcadas com hematoxilina-eosina.....	123
FIGURA 49 -	Diâmetro da luz (A) e do vaso (B), espessura da parede (C), razão parede/ luz (D) e área de secção transversa (E) da artéria femoral. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM (n=6-7). * $p < 0,01$ vs. WKY, WKY-T e SHR-T; † $p < 0,01$ vs. WKY e WKY-T.....	124
FIGURA 50 -	Resposta contrátil induzida por fenilefrina (FE) na artéria femoral. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM (n=4-5).....	125
FIGURA 51 -	Curva concentração-resposta à acetilcolina (ACh) em artéria femoral pré-contraídas com fenilefrina. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM (n=4-5).....	126
FIGURA 52 -	Efeito do bloqueio da síntese de NO com L-NAME (100 μ M) e do KCl (60mM) sobre a resposta de relaxamento induzido por acetilcolina (ACh) em artéria femoral pré-contraídas com FE. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM (n=4-5). * $p < 0,001$ vs. L-NAME e KCl.....	127
FIGURA 53 -	Curva concentração-resposta ao doador de óxido nítrico nitroprussiato de sódio (NPS) em artéria femoral pré-contraídas com FE. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM (n=7-8).....	128
FIGURA 54 -	Imagens representativas da estrutura da arteríola muscular marcadas pela ATPase miosínica.....	129
FIGURA 55 -	Diâmetro da luz (A) e do vaso (B), espessura da parede (C), razão parede/ luz (D) e área de secção transversa (E) da arteríola muscular. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM (n=6-7). * $p < 0,01$ vs. WKY, WKY-T e SHR-T; † $p < 0,01$ vs. WKY e WKY-T.....	130
FIGURA 56 -	Razão capilar por fibra no músculo sóleo. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. WKY,	

	SHR e SHR-T; † p< 0,05 vs. WKY, WKY-T e SHR-T, ‡ p< 0,05 vs. WKY-T e SHR.....	131
FIGURA 57 -	<i>Heatmap</i> dos 228 miRNAs expressos no sóleo via <i>microarray</i>	132
FIGURA 58 -	<i>Heatmap</i> dos 64 miRNAs diferencialmente expressos no grupo hipertenso comparado ao grupo controle no sóleo via <i>microarray</i>	133
FIGURA 59 -	Perfil de miRNAs diferencialmente expressos no grupo SHR comparado ao grupo WKY e efeito do TF avaliados por <i>microarray</i> no sóleo. MiRNAs com padrão de expressão reduzido no grupo SHR e sem alteração com TF (A) e com redução acentuada com TF (B). MiRNAs com padrão de expressão aumentado no grupo SHR e sem alteração com TF (A) e com aumento acentuado com TF (B). Os dados estão representados na forma de média ± EPM. * p< 0,05 vs. WKY, # p< 0,05 vs. SHR.....	135
FIGURA 60 -	Perfil de miRNAs diferencialmente expressos no grupo SHR comparado ao grupo WKY e efeito do TF avaliados por <i>microarray</i> no sóleo. MiRNAs com padrão de expressão reduzido no grupo SHR e aumentados pelo TF e aumentado no grupo SHR e reduzido pelo TF. Resultado expresso como porcentagem da média do controle. * p< 0,05 vs. WKY, # p< 0,05 vs. SHR.....	137
FIGURA 61 -	Perfil de miRNAs diferencialmente expressos no grupo SHR comparado ao grupo WKY e efeito do TF avaliados por <i>microarray</i> no sóleo. MiRNAs com padrão de expressão reduzido no grupo SHR e prevenido com TF (A) e aumentado no grupo SHR e prevenido com TF (B). Os dados estão representados na forma de porcentagem da média ± EPM. * p< 0,05 vs. WKY e SHR-T, # p< 0,05 vs. WKY.....	139
FIGURA 62 -	Perfil de miRNAs diferencialmente expressos no grupo WKY-T comparado ao grupo WKY avaliados por <i>microarray</i> no músculo sóleo (A e B). Os dados estão representados como porcentagem da média do controle ± EPM. * p< 0,05 vs. WKY...	141
FIGURA 63 -	Perfil de miRNAs diferencialmente expressos no grupo SHR	143

comparado ao grupo WKY e efeito do TF avaliados por *real-time PCR*. MiRNAs com padrão de expressão inalterado (A), com padrão reduzido no grupo SHR e prevenido com TF (A) e aumentado no grupo SHR e prevenido com TF (B). Os dados estão representados na forma de porcentagem da média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. WKY, WKY-T e SHR-T, # $p < 0,05$ vs. WKY, \$ $p < 0,05$ vs. WKY e WKY-T e & $p < 0,05$ vs. SHR.....

- FIGURA 64 - Via de regulação angiogênica. Alvos validados dos miRNAs selecionados estão marcados em vermelho na via de sinalização angiogênica mediada por VEGF gerada pelo KEGG. O programa também nos mostra as vias de sinalização envolvidas pelo conjunto dos miRNAs como a da PI3K/ Akt, MAPK, de sinalização de cálcio, adesão focal e metabolismo do ácido araquidônico..... 146
- FIGURA 65 - Via de regulação de morte celular. Alvos validados dos miRNAs selecionados estão marcados em vermelho na via de sinalização de morte celular gerada pelo KEGG. O programa também nos mostra as vias de sinalização envolvidas pelo conjunto dos miRNAs como a de fatores de sobrevivência, via PI3K/ Akt, vias de sinalização extrínseca e intrínseca de morte, ciclo celular, morte celular induzida por cálcio, sinalização de p53 e via de sinalização de NF-kB..... 148
- FIGURA 66 - Via de regulação do crescimento celular. Alvos validados dos miRNAs selecionados estão marcados em vermelho na via de sinalização de crescimento celular mediada pela via IGF-I gerada pelo KEGG. O programa também nos mostra as vias de sinalização envolvidas pelo conjunto dos miRNAs como a via da insulina, MAPK e VEGF..... 149
- FIGURA 67 - Expressão de genes angiogênicos reduzidos no grupo SHR comparado ao grupo WKY e normalizados pelo TF no sóleo. Os dados estão representados como média \pm EPM (n=4). * $p < 0,05$ vs. WKY e SHR-T, # vs. WKY, \$ vs. SHR-T..... 152
- FIGURA 68 - Expressão de genes aumentados no grupo SHR comparado ao 154

grupo WKY e normalizados pelo TF no músculo sóleo. Os dados estão representados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. WKY e SHR-T.....

- FIGURA 69 - Expressão de proteínas da via de sinalização IGF-I/ Akt/ mTOR envolvidas no anabolismo muscular (sóleo) de animais WKY, WKY-T, SHR e SHR-T. IGF-I (A), IGF-IR (B), PI3K_{p110 α} (C), PTEN (D), p-Akt_{Ser473}/ Akt (E), p-GSK-3_{Ser9}/ GSK-3 β (F), p-mTOR_{Ser2448}/ mTOR (G), p-p70S6k_{Thr389}/ p70S6k (H), p-4E-BP1_{Thr37/46}/ 4E-BP1 (I), p-eIF4E_{Ser209}/ eIF4E (J) e os seus respectivos blots representativos (K). Os dados estão representados na forma de porcentagem da média \pm EPM (n=7 por grupo). * $p < 0,05$ vs. WKY, WKY-T e SHR-T, # $p < 0,05$ vs. WKY e WKY-T, † $p < 0,05$ vs. WKY, SHR e SHR-T..... 155
- FIGURA 70 - Expressão de proteínas envolvidas no catabolismo muscular (sóleo) de animais WKY, WKY-T, SHR e SHR-T. p-FoxO1_{Ser256}/ FoxO1(A), FoxO3a (B), p38 (C), MAFbx/Atrogin-1 (D), MuRF-1 (E), FSTL-1 (F) e os seus respectivos blots representativos (G). Os dados estão representados na forma de porcentagem da média \pm EPM (n=7 por grupo)..... 157
- FIGURA 71 - Expressão de proteínas envolvidas na angiogênese no músculo sóleo de animais WKY, WKY-T, SHR e SHR-T. VEGF-A (A), VEGF-B (B), VEGFR1 (C), VEGFR2 (D), eNOS (E), p-Erk_{Thr202/Tyr204}/ Erk (F), Angpt-2 (G), TGF α (H), p-FAK_{Tyr397}/ FAK (I), Bcl-2 (J) e os seus respectivos blots representativos (K). Os dados estão representados na forma de porcentagem da média \pm EPM (n=7 por grupo). * $p < 0,05$ vs. WKY, WKY-T e SHR-T, # $p < 0,05$ vs. WKY e WKY-T, † $p < 0,05$ vs. WKY e SHR..... 159
- FIGURA 72 - Expressão de proteínas envolvidas no perfil de fibras e metabolismo muscular (sóleo) de animais WKY, WKY-T, SHR e SHR-T. PUR β (A), SOX6 (B), SP3 (C), PPAR α (D), PPAR β/δ (E), p-AMPK_{Thr172}/ AMPK (F) e os seus respectivos blots representativos (G). Os dados estão representados na forma de porcentagem da média \pm EPM (n=7 por grupo). * $p < 0,05$ vs.

WKY, WKY-T e SHR-T, † $p < 0,05$ vs. WKY, SHR e SHR-T..... 161

FIGURA 73 - Representação esquemática de miRNAs envolvidos na regulação da sinalização mediada por IGF-I. IGF-I aumenta a atividade da Akt. Esta ativação da Akt pode ser atenuada por PTEN. O estado ativado de Akt estimula a síntese protéica por meio da mTOR via p70S6k e eIF4E. A Akt também inibe a degradação protéica por meio da supressão da atividade de GSK-3 β e FoxO1/3a, que induz a degradação protéica por meio da ativação da expressão de MuRF1 e Atrogin-1. O presente estudo têm mostrado que os miRNAs-1, -96, -146b, -182 e -205 regulam negativamente a via IGF-I / Akt/ mTOR por alvejarem diversos genes da via. A HA crônica foi mostrada aumentar significativamente a expressão desses miRNAs selecionados com base na análise do perfil de expressão por *microarray* de miRNA. Portanto, o aumento na expressão desses miRNAs levou a redução da via de sinalização IGF-I/ Akt/ mTOR pela HA crônica promovendo a atrofia muscular por redução da síntese protéica e proliferação celular, ao passo que, o TF corrigiu esta sinalização restabelecendo a massa muscular. As linhas vermelhas indicam a função inibidora dos miRNAs identificados no músculo esquelético. Os miRNAs identificados em vermelho representam miRNAs com alvos já validados na literatura, enquanto os miRNAs identificados em azul representam miRNAs com alvos ainda preditos..... 192

FIGURA 74 - Representação esquemática de miRNAs envolvidos na regulação da sinalização angiogênica. Fatores de crescimento como VEGF, FGF2, Angpt, TGF- α e IGF-I e componentes da matriz como Fn (fibronectina) e Col IV (colágeno IV) aumentam a atividade das vias de sinalização mediada por FAK, p38, PI3K/ Akt e RAS contribuindo para a angiogênese. A via mais conhecida é medida por VEGF/ VEGFR2 ativando a via da PI3K/ Akt. O estado ativado de Akt estimula a síntese de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2, aumenta a expressão de

eNOS estimulando a permeabilidade e a sobrevivência celular e ativa a p70S6k estimulando a proliferação endotelial. Concomitantemente, a via sinalizada por VEGF/ VEGFR2 também ativa a FAK contribuindo para a sobrevivência e migração da célula endotelial, podendo também ser ativada por componentes da matriz. O presente estudo têm mostrado que os miRNAs-1, -96, -140, -146b-5p, -182, -205 e -665 regulam negativamente a via angiogênica por alvejarem diversos genes da via. A HA crônica foi mostrada aumentar significativamente a expressão desses miRNAs selecionados com base na análise do perfil de expressão por *microarray* de miRNA. Portanto, o aumento na expressão desses miRNAs levou a redução desta via de sinalização pela HA crônica promovendo a rarefação capilar, ao passo que, o TF corrigiu esta sinalização restabelecendo a rede microvascular. As linhas vermelhas indicam a função inibidora dos miRNAs identificados na célula endotelial. Os miRNAs identificados em vermelho representam miRNAs com alvos já validados na literatura, enquanto os miRNAs identificados em azul representam miRNAs com alvos ainda preditos..... 212

LISTA DE QUADROS

	Página
QUADRO 1 - Resumo dos principais resultados descritos na 1ª etapa do estudo.....	95
QUADRO 2 - Resumo das alterações morfofuncionais e hemodinâmicas na 2ª etapa do estudo.....	162
QUADRO 3 - Resumo das alterações musculares e vasculares na 2ª etapa do estudo.....	163
QUADRO 4 - Resumo das expressões de miRNAs e mRNAs na 2ª etapa do estudo.....	165
QUADRO 5 - Resumo das expressões protéicas descritas na 2ª etapa do estudo.....	167

LISTA DE SIGLAS, ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

4E-BP1	Proteína 1 ligante do fator de iniciação eucariótico 4E
AC	Adenilato ciclase
ACh	Acetilcolina
ADP	Adenosina difosfato
Akt	Proteína quinase B
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
Ang	Angiogenina
Angpt	Angiopietina
ANOVA	Análise de variância
AST	Área de secção transversa
ATP	Adenosina trifosfato
Atrogin-1	<i>Atrophy gene-1</i>
Bai1	Inibidor angiogênico específico cerebral 1
Bcl-2	Linfoma de células B2
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
BK _{Ca}	Canais de potássio ativados por cálcio
Ca ²⁺	Cálcio
CaM	Calmodulina
Ccl2	Ligante de quimiocina 2 (C-C motif)
CCR	Curvas concentração-resposta
Cdh5	Caderina 5
CMVL	Células do músculo liso vascular
CoA	Coenzima A
Col18a1	Colágeno tipo XVIII, alpha 1
Col4a3	Colágeno tipo IV, alpha 3
Ctgf	Fator de crescimento de tecido conectivo
Cxcl1	Ligante de quimiocina 1 (C-X-C motif)
Cxcl2	Ligante de quimiocina 2 (C-X-C motif)
Cxcl9	Ligante de quimiocina 9 (C-X-C motif)
DAG	Diacylglicerol

DC	Débito cardíaco
DCV	Doenças cardiovasculares
DDVE	Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region gene 8</i>
dKO	Duplo <i>knockout</i>
DSVE	Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo
DTNB	Ácido 5,5´ditio-bis 2 nitrobenzóico
E3	Proteína ligase
EDCF	Fatores contráteis derivados do endotélio
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
Edn1	Endotelina 1
EDRF	Fatores de relaxamento derivados do endotélio
eEF2	Fator de elongação eucariótico 2
Efna1	Efrina A1
Egf	Fator de crescimento epidermal
eiF2B	Fator de iniciação de tradução eucariótico 2B
Eng	Endoglina
eNOS	NOS endotelial
Epas1	Domínio PAS da proteína endotelial 1
ERP	Espessura relativa da parede
F2	Fator de coagulação II (trombina)
F3	Fator de coagulação III (tromboplastina)
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FAK	Proteína quinase de adesão focal
FC	Frequência cardíaca
FE	Fenilefrina
FEj	Fração de ejeção
FeO ₂	Fração expirada de oxigênio
Fgf	Fator de crescimento de fibroblasto
Fgfr3	Receptor de FGF3
Figf	Fator de crescimento induzido por C-fos
Flt1	Receptor 1 de VEGF
FMN	Flavina mononucleotídeo

Fn1	Fibronectina 1
FoxO	Fatores de transcrição forkhead box O
FSTL-1	Folistatina 1
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GMPc	3`5`-monofosfato cíclico de guanosina
GSK-3β	Glicogênio sintase quinase
GTP	5`-trifosfato de guanosina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HA	Hipertensão arterial
Hgf	Fator de crescimento de hepatócito
Hif1a	Fator induzido por hipóxia 1 subunidade alfa
IAP	Inibidores de apoptose
Id1	Inibidor de ligação 1 do DNA
Ifna1	Interferon alfa 1
Ifnb1	Interferon beta 1
Ifng	Interferon gama
IGF-I	Fator de crescimento similar a insulina
IGF-IR	Receptor tirosina quinase do IGF-I
Il1b	Interleucina 1 beta
Il6	Interleucina 6
iNOS	NOS induzível
IP ₃	1,4,5-trifosfato de inositol
IPM	Índice de performance miocárdica
IRS1	Substrato 1 do receptor da insulina
Itgav e b3	Integrinas alfa v e beta 3
K ⁺	Potássio
K ⁺ KHS	KHS com alta concentração de potássio
KB	<i>Krebs-Henseleit</i>
KCl	Cloreto de potássio
KHS	<i>Krebs Henseleit</i>
Lect1	Proteína quimiotáctica derivada de leucócitos1
Lep	Leptina
L-NAME	L-NG-nitro-arginina metil éster

lncRNAs	RNAs longos não codificantes
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
Mapk14	Proteína-quinase Ativada por Mitógenos
MEC	Matriz extracelular
MHC	Miosina de cadeia pesada
miRNAs	microRNAs
MLC ₂₀	Cadeia leve de miosina
MLCK	Quinase de MLC
MLCP	Fosfatase de MLC
Mmp	Matriz metaloproteinase
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MuRF1	<i>Muscle ring finger 1</i>
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
nNOS	NOS neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NPS	Nitroprussiato de sódio
Nrp	Neuropilina
p70S6k	<i>p70 ribosomal S6 kinase</i>
PAM	Pressão arterial média
PC	Peso corporal
Pdgf	Fator de crescimento derivado de plaqueta
PKC	Quinase dependente de fosfoinosítídeos
Pecam1	Molécula de adesão celular endotelial/plaquetária
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
PGI ₂	Prostaciclina
PH	<i>Pleckstrin homology</i>
PI3K	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato
PI3KR2	Subunidade reguladora 2 do fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato
PIGF	Fator de crescimento placentário
PIP2	Fosfatidilinositol 2 fosfato
PIP3	Fosfatidilinositol 3 fosfato
PKA	Proteína quinase A

PKC	Proteína quinase C
PKG	Proteína quinase G
Plau	Ativador do plasminogênio, urokinase
PLC	Fosfolipase C
Plg	Plasminogênio
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
Ptgs1	Prostaglandina-endoperóxido sintase 1
PUR β	<i>Purine-rich negative regulatory element</i>
RISC	<i>RNA-induced silence complex</i>
SERCA	Cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático
Serpin	Serpina, inibidor de peptidase
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SHR-T	SHR treinados
siRNA	RNA de interferência
SOD	Superóxido desmutase
SOX6	Membro da família SOX de fatores de transcrição
SPRED1	Proteína relacionada ao brotamento 1
TD	Tempo de desaceleração da onda E
TE	Tempo de ejeção
TF	Treinamento físico
TGF α	Fator de crescimento transformante- α
Thbs1	Trombospondina 1
Tie1	Tirosina quinase com imunoglobulina
Timp	Inibidor tecidual de metaloproteinase 1
Tnf	Fator de necrose tumoral
TRIV	Tempo de relaxamento isovolumétrico
TSC2	<i>Tuberous sclerosis complex 2</i>
Tymp	Timidina fosforilase
VDF	Volume diastólico final
VE	Ventrículo esquerdo
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
VEGFR1	Receptor 1 do VEGF

VEGFR2	Receptor 2 do VEGF
VO ₂	Consumo de oxigênio
VS	Volume sistólico
WKY	Ratos Wistar Kyoto
WKY-T	WKY treinados

Unidades

bpm	Batimento por minuto
mm Hg	Milímetros de mercúrio
C	Celsius
Min	Minuto
M	Metro
m/min	Metro por minuto
µm	Micrômetro
G	Grama
Mg	Miligrama (10 ⁻³)
L	Litro
mL	Mililitro (10 ⁻³)
µL	Microlitro (10 ⁻⁶)
M	Molar
mM	Milimolar (10 ⁻³)
µM	Micromolar (10 ⁻⁶)
nM	Nanomolar (10 ⁻⁹)

RESUMO

FERNANDES, T. **Caracterização do perfil de microRNAs e genes alvo muscular esquelético envolvidos na rarefação microvascular de ratos espontaneamente hipertensos:** papel do treinamento físico. 2015. 247 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2015.

A hipertensão arterial (HA) é uma síndrome multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA). O treinamento físico (TF) aeróbio tem sido utilizado como um importante tratamento não farmacológico da HA, uma vez que ele corrige a rarefação microvascular e o perfil de fibras muscular e reduz a PA; entretanto, os mecanismos envolvidos são pouco conhecidos. Uma nova classe de pequenos RNAs, denominados de microRNAs (miRNAs), vem sendo muito estudados por regularem pós-transcricionalmente a expressão de seus genes alvo. Estudos avaliando o papel dos miRNAs na regulação do processo angiogênico e trofismo muscular tanto na HA quanto induzidos pelo TF são desconhecidos. Portanto, nosso objetivo é caracterizar o perfil de miRNAs e genes alvo do músculo esquelético envolvidos nos processos de rarefação microvascular e dano muscular na HA e verificar o papel terapêutico do TF de natação na correção desses parâmetros. Na primeira etapa do projeto, ratos espontaneamente hipertensos (SHR) com 3 meses de idade (HA recém estabelecida) e seus controles Wistar Kyoto (WKY) foram divididos em 4 grupos: SHR, SHR treinado (SHR-T), WKY e WKY treinado (WKY-T). O TF promoveu redução da PA em SHR e bradicardia de repouso acompanhando por um aumento VO_2 nos animais treinados. O TF corrigiu a mudança na distribuição dos tipos de fibra muscular em SHR paralelamente a correção na expressão do miRNA-208b. A rarefação capilar foi prevenida em animais SHR-T concomitante a correção na expressão dos miRNAs-16, -21 e -126 envolvidos na promoção das vias angiogênicas e desativação de vias apoptóticas por alvejarem VEGF, Bcl-2 e PI3KR2. Na segunda etapa do projeto, SHR com 6 meses de idade (HA crônica) e seus controles WKY foram divididos nos mesmos 4 grupos da primeira etapa. Similares resultados foram observados nas respostas hemodinâmicas, mudança no perfil de fibras muscular e rarefação capilar. Em contraste, foi observado uma redução do VO_2 acompanhado por uma atrofia e disfunção muscular em SHR. Além disso, estes animais apresentavam disfunção cardíaca e aumento na relação parede-lúmen da artéria femoral e arteríola muscular. O TF corrigiu estas alterações no vaso e no músculo. Curiosamente, o *microarray* de miRNAs muscular revelou um perfil de miRNAs envolvidos no remodelamento microvascular e muscular esquelético (miRNAs-96, -205, -182, -140, -328a, -665, -1, -499, -208b e -99b) possibilitando identificar genes alvo modificados pela HA e TF. Assim, alvos envolvidos na mudança do perfil de fibras, síntese protéica via IGF-I/ Akt/ mTOR e da via de sinalização angiogênica dependente e independente de VEGF foram prejudicadas na HA e corrigidos pelo TF. Juntos, os resultados apoiam a hipótese de que as alterações estruturais e funcionais advindas da progressão da HA possa ser regulada por um conjunto de miRNAs e genes alvo; e que o TF participa no restabelecimento muscular e da rede microvascular. Assim, há perspectiva do potencial terapêutico do uso de miRNAs no tratamento da HA.

Palavras-chave: Hipertensão arterial; treinamento físico; microRNA; angiogênese.

ABSTRACT

FERNANDES, T. **MicroRNA profiles and their target genes involved in skeletal muscle microvascular rarefaction of spontaneously hypertensive rats: role of exercise training.** 2015. 247 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2015.

Hypertension is a multifactorial syndrome characterized by sustained high levels of blood pressure (BP). Aerobic exercise training (ET) has been used as an important non-pharmacological treatment of hypertension, since it corrects microvascular rarefaction, muscle fiber type profile and reduces BP; however, the mechanisms involved are poorly understood. A new class of small RNAs, called microRNAs (miRNAs), has been extensively studied because they regulate their target gene expression at the post-transcriptional level. Studies evaluating the role of miRNAs in the angiogenic process and muscle trophism both in hypertension and exercise training are unknown. Therefore, our goal is to characterize the skeletal muscle miRNA profiles and their target genes involved in microvascular rarefaction and muscle damage in hypertension and check the therapeutic role of swimming ET in correcting these parameters. In the first stage of the project, spontaneously hypertensive rats (SHR) aged 3 months (hypertension newly established) and their controls Wistar Kyoto (WKY) were divided into 4 groups: SHR, trained SHR (SHR-T), WKY and WKY training (WKY-T). ET promoted reduction in BP in SHR and resting bradycardia with subsequent increase in VO_2 in trained animals. ET corrected the change in proportion of muscle fiber types in SHR parallel with the correction in miRNA-208b expression. Capillary rarefaction was prevented in SHR-T group concomitant with the correction in the expression of miRNAs-16, -21 and -126 involved in promoting angiogenesis and deactivation of apoptotic pathways by targeting VEGF, Bcl-2 and PI3KR2. In the second stage of the project, 6-month-old SHR (chronic hypertension) and their controls WKY were divided into the same four groups as those in the first stage. Similar results were observed in hemodynamic responses, muscle fiber profile and capillary rarefaction. In contrast, we observed a reduction in VO_2 accompanied by muscle atrophy and dysfunction in SHR. Moreover, these animals showed cardiac dysfunction and an increase in wall:lumen ratio of the femoral artery and muscle arteriole. ET corrected these changes in the vessel and muscle. Interestingly, the muscle miRNA microarray revealed a profile of miRNAs involved in microvascular and muscle remodeling (miRNAs-96, -205, -182, -140, -328a, -665, -1, -499, -208b and -99b) making it possible to identify target genes modified by hypertension and ET. Thus, targets involved in changing the fiber profile, protein synthesis by the IGF-I/ Akt /mTOR pathway, and the VEGF-dependent and independent angiogenic signaling pathway, were impaired in hypertension and corrected by ET. Together, these results support the hypothesis that the structural and functional changes arising from the progression of hypertension may be regulated by a set of miRNAs and target genes; and ET participates in restoring the muscle and microvascular network. Thus, there are perspectives for the potential therapeutic use of miRNAs in the treatment of hypertension.

Keywords: Hypertension; exercise training; microRNA; angiogenesis.

SUMÁRIO

Página

	LISTA DE TABELAS	
	LISTA DE FIGURAS	
	LISTA DE QUADROS	
	LISTA DE SIGLAS, ABREVIACÕES E SÍMBOLOS	
	RESUMO	
	ABSTRACT	
1	INTRODUÇÃO.....	1
2	JUSTIFICATIVA.....	3
3	OBJETIVOS.....	4
3.1	Geral.....	4
3.2	Específicos.....	5
4	REVISÃO DE LITERATURA.....	7
4.1	Hipertensão arterial.....	7
4.2	Hipertensão arterial e treinamento físico aeróbio.....	10
	4.2.1 Papel da eNOS e do VEGF na angiogênese.....	13
	4.2.2 Sobrevivência e apoptose das células endoteliais.....	17
4.3	Hipertensão arterial e treinamento físico: alterações no músculo esquelético.....	21
	4.3.1 Síntese protéica muscular esquelética via IGF/ Akt/ mTOR.....	24
	4.3.2 Degradação protéica muscular esquelética.....	29
4.4	MiRNA.....	30
	4.4.1 Localização.....	33
	4.4.2 Biogênese e mecanismo de ação.....	34
	4.4.3 MiRNA e angiogênese.....	36
	4.4.4 MiRNA e músculo esquelético.....	41
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	46
5.1	Animais experimentais.....	46
5.2	Identificação dos animais.....	46
5.3	Protocolo de treinamento físico aeróbio.....	47

5.4	Avaliação das respostas hemodinâmicas.....	48
5.5	Avaliação da tolerância ao esforço físico máximo.....	49
5.6	Avaliação do consumo máximo de oxigênio.....	50
5.7	Avaliação da função e estrutura ventricular- ecocardiografia.....	51
5.8	Coleta das amostras.....	52
5.9	Avaliação da atividade da enzima citrato sintase.....	52
5.10	Avaliação histoquímica do músculo esquelético.....	53
	5.10.1 Determinação da área de secção transversa e tipos de fibras musculares.....	54
	5.10.2 Análise da razão capilar por fibra e morfologia arteriolar.....	55
5.11	Avaliação imunohistoquímica do músculo esquelético.....	55
5.12	Avaliação da função muscular esquelética <i>ex vivo</i>	57
5.13	Reatividade vascular em artérias femorais.....	58
	5.13.1 Avaliação das respostas de relaxamento: 1) dependente e independente do endotélio, 2) dependente do endotélio com uso do inibidor não-seletivo da síntese de óxido nítrico (L-NAME) e 3) dependente do endotélio sob pré-contracção ao KCl (60 mM).....	59
	5.13.2 Avaliação da resposta vasoconstritora à fenilefrina.....	59
5.14	Avaliação morfológica da artéria femoral.....	60
5.15	Extração de RNA total para análise de mRNA e miRNA.....	61
5.16	miRNA <i>microarray</i>	62
5.17	Predição bioinformática.....	63
	5.17.1 Análise funcional de enriquecimento de ontologias gênicas..	63
5.18	Expressão de miRNAs.....	64
	5.18.1 Síntese de cDNA para miRNAs.....	64
	5.18.2 Reação de polimerase em cadeia em tempo real (<i>real-time PCR</i>) para expressão de miRNAs.....	64
5.19	mRNA <i>array</i> - via angiogênica.....	65
5.20	Expressão de mRNAs.....	68
	5.20.1 Síntese de cDNA para expressão gênica.....	68
	5.20.2 <i>real-time PCR</i>	68
5.21	Determinação da expressão de proteínas.....	69
5.22	Análise estatística.....	70

6	RESULTADOS- 1ª ETAPA.....	72
6.1	Massa corporal.....	72
6.2	Parâmetros hemodinâmicos: pressão arterial e frequência cardíaca..	74
6.3	Teste de esforço físico máximo.....	76
6.4	Medida do consumo de oxigênio de pico.....	78
6.5	Atividade da enzima citrato sintase.....	79
6.6	Massa muscular esquelética e cardíaca.....	79
6.7	Determinação da área de seção transversa e tipos de fibra muscular esquelética- histoquímica.....	81
6.8	Determinação da área de seção transversa e tipos de fibra muscular esquelética- imunohistoquímica.....	83
6.9	MiRNAs-208b e -499 muscular: efeito sobre o perfil de fibras.....	86
6.10	Razão capilar por fibra muscular esquelética.....	87
6.11	MiRNAs-16, -21 e -126 muscular esquelético: efeito no balanço entre a angiogênese e a apoptose.....	87
6.12	MiRNAs-221 e -222 muscular esquelético: efeito na eNOS e c-Kit.....	90
6.13	Fatores angiogênicos na hipertensão arterial: papel do treinamento físico.....	91
6.14	Fatores anti- e pró-apoptóticos na hipertensão arterial: papel do treinamento físico.....	93
7	RESULTADOS- 2ª ETAPA.....	96
7.1	Massa corporal.....	96
7.2	Parâmetros hemodinâmicos: pressão arterial e frequência cardíaca..	98
7.3	Medida do consumo de oxigênio de pico.....	100
7.4	Atividade da enzima citrato sintase.....	101
7.5	Massa dos tecidos.....	101
7.6	Avaliação ecocardiográfica.....	104
7.7	Determinação da área de seção transversa e tipos de fibra muscular esquelética- histoquímica.....	107
7.8	Avaliação da função muscular esquelética.....	109
	7.8.1 Curva força-frequência do EDL.....	109
	7.8.1.1 Parâmetros da força-frequência do EDL- <i>twitch</i> 1Hz.....	110
	7.8.1.2 Parâmetros da força-frequência do EDL- tétano 80 Hz.....	111

7.8.2	Curva força-frequência do sóleo.....	113
7.8.2.1	Parâmetros da força-frequência do sóleo- <i>twitch</i> 1Hz.....	114
7.8.2.2	Parâmetros da força-frequência do sóleo- tétano 80 Hz.....	115
7.8.3	Curva fadiga do músculo EDL.....	117
7.8.3.1	Parâmetros da fadiga- primeiro e último tétano no EDL.....	118
7.8.4	Curva fadiga do músculo sóleo.....	120
7.8.4.1	Parâmetros da fadiga- primeiro e último tétano no sóleo.....	121
7.9	Avaliação morfológica da artéria femoral.....	123
7.10	Propriedades funcionais da artéria femoral.....	125
7.10.1	Resposta vasoconstritora da artéria femoral.....	125
7.10.1.1	Resposta vascular contrátil induzida por KCl (120 mM).....	125
7.10.1.2	Resposta vasoconstritora à fenilefrina.....	125
7.10.2	Resposta vasodilatadora da artéria femoral.....	126
7.10.2.1	Resposta de relaxamento dependente do endotélio.....	126
7.10.2.2	Papel do óxido nítrico e do potássio na resposta vasodilatadora dependente do endotélio.....	126
7.10.2.3	Resposta de relaxamento independente do endotélio.....	128
7.11	Avaliação morfológica da arteríola muscular.....	128
7.12	Razão capilar por fibra muscular esquelética.....	131
7.13	<i>Microarray</i> de miRNA- sóleo.....	131
7.14	Confirmação de miRNA por <i>real-time PCR</i> no sóleo.....	142
7.15	Estudo de predição de alvos <i>in silico</i>	144
7.16	<i>Array</i> angiogênico- sóleo.....	150
7.17	Expressão protéica.....	154
7.17.1	Síntese protéica muscular mediado pela via IGF-I/ Akt/ mTOR na hipertensão arterial: papel do treinamento físico.....	154
7.17.2	Degradação protéica muscular na hipertensão arterial: papel do treinamento físico.....	156
7.17.3	Proteínas envolvidas no processo angiogênico na hipertensão arterial: papel do treinamento físico.....	158
7.17.4	Reguladores do metabolismo e perfil de fibras muscular na hipertensão arterial: papel do treinamento físico.....	160
8	DISCUSSÃO.....	169

	8.1	Marcadores de treinamento aeróbio e respostas hemodinâmicas	171
	8.2	Efeito do treinamento aeróbio sobre as alterações estruturais e funcionais cardíacas associadas à hipertensão.....	175
	8.3	Efeito do treinamento aeróbio no perfil de expressão de miRNAs e alterações metabólicas, estruturais e funcionais da musculatura esquelética associadas à hipertensão.....	178
	8.4	Efeito do treinamento aeróbio no perfil de expressão de miRNAs e alterações estruturais, funcionais e moleculares do vaso associadas à hipertensão.....	195
9		CONCLUSÃO	213
10		PERSPECTIVAS	213
		REFERÊNCIAS	214
		ANEXOS	246

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial (HA) é uma doença complexa e de causa multifatorial. Seu desenvolvimento é determinado por uma combinação de fatores ambientais associados à susceptibilidade genética. Muitos mecanismos têm sido implicados na patogênese da HA, tais como, hiperatividade do sistema nervoso simpático, alteração do sistema renina angiotensina, disfunção endotelial e anormalidades da estrutura microvascular com prejuízo no processo angiogênico (LÉVY et al., 2001; VASAN et al., 2001; SAFAR, 2005; FEIHL et al., 2006, 2008; BÁTKAI & THUM, 2012). O aumento da atividade simpática e do débito cardíaco no estágio inicial da HA contribui para a elevação da pressão arterial (PA), entretanto, com o estabelecimento da patologia, o aumento da resistência vascular periférica parece ser a principal causa para a manutenção da PA elevada (LÉVY, 2005; FEIHL et al., 2006, 2008; MULVANY, 2012).

Estudos mostram que o óxido nítrico (NO) (LEE et al., 1999; KUBIS et al., 2002) e o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (TANG et al., 2004; BYRNE et al., 2005) são cruciais para manutenção da homeostase vascular. De fato, um prejuízo nos níveis de NO, VEGF e seus receptores na HA foram descritos, e relacionados com a disfunção endotelial e rarefação microvascular (KUBIS et al., 2002; WANG et al., 2004). Além disso, uma ativação na sinalização apoptótica mediada pela família Bcl-2 ocorre em células endoteliais durante a rarefação microvascular induzida pela HA, sugerindo um equilíbrio entre os fatores angiogênicos e apoptóticos para promoção da integridade e função vascular (GOBE et al., 1997; KOBAYASHI et al., 2005; DE RESENDE et al., 2006).

Curiosamente, os músculos esqueléticos com alteração no suporte capilar e conseqüentemente prejuízo na oferta de oxigênio e nutrientes, sob influência de doenças cardiovasculares (DCV), estão atrelados a uma mudança na distribuição dos tipos de fibra muscular em direção ao aumento na porcentagem de fibras do tipo II, com predomínio do metabolismo glicolítico. Em animais com insuficiência cardíaca, obesidade e HA crônica, além da transição do perfil de fibras, se observa perda de massa muscular, denominada de atrofia, associada ao prejuízo da função muscular (CARVALHO et al., 2003; NAGATOMO et al., 2009; BACURAU et al., 2009; CUNHA et al., 2012, DAMATTO et al., 2013; SOUZA et al., 2014).

Embora grandes avanços tenham sido feitos no entendimento da HA essencial, os mecanismos envolvidos nas anormalidades microvascular e muscular esquelética permanecem não completamente elucidados. Com as novas descobertas no âmbito da genética nas últimas décadas, várias áreas da comunidade científica têm voltado suas atenções para uma nova classe de reguladores da expressão gênica denominados de microRNAs (miRNAs). Essa nova classe de pequenos RNAs codificados pelo genoma regulam vários processos celulares sendo descritos por participarem de um amplo espectro de doenças humanas (MARQUES et al., 2011; DICKINSON et al., 2013).

Os miRNAs tem ganhado grande destaque por regularem pós-transcricionalmente a expressão de seus genes alvo (mRNAs) (AMBROS, 2004; BARTEL, 2004). Desde 2007, uma série de estudos demonstraram que miRNAs específicos estão envolvidos no desenvolvimento de DCV contribuindo para a repressão/ ativação de genes biologicamente importantes, no entanto, os miRNAs envolvidos na HA são pouco conhecidos (VAN ROOIJ & OLSON, 2007; URBICH et al., 2008; QIN & ZHANG, 2011; BÁTKAI & THUM, 2012; QUIAT & OLSON, 2013). Dessa forma, muitos aspectos do desenvolvimento da HA no nível molecular ainda são desconhecidos e a elucidação desses processos regulados por miRNAs e identificação de novos alvos de miRNA na patogênese da doença é uma estratégia muito valiosa que pode, eventualmente, levar ao desenvolvimento de novas abordagens para o diagnóstico precoce e/ ou tratamento da HA. Os miRNAs trabalham de forma orquestrada para controlar uma via ou função biológica comum; essa característica única dos miRNAs os tornam ferramentas eficientes para determinação de vias específicas envolvidas em doenças ou processos biológicos. (URBICH et al., 2008; QIN & ZHANG, 2011; BÁTKAI & THUM, 2012; QUIAT & OLSON, 2013).

Evidências mostram que o treinamento físico (TF) aeróbio reduz os níveis de PA e melhora a função endotelial e a rarefação microvascular na HA (AMARAL et al., 2000; HAGBERG et al., 2000; AMARAL et al., 2001; WHELTON et al., 2002; PESCATELLO et al., 2004; CORNELISSEN & FAGARD, 2005, FERNANDES et al., 2012; ROQUE et al., 2013). Apesar dos progressos obtidos nesta área de pesquisa os mecanismos envolvidos nessas alterações não são totalmente compreendidos.

Estudos recentes relatam que o TF regula a expressão de miRNAs em diferentes tecidos como o músculo esquelético e o cardíaco promovendo angiogênese, melhora da função e integridade vascular, hipertrofia cardíaca e muscular esquelética (NIELSEN et al., 2010; FERNANDES et al., 2011; SOCI et al., 2011; Da SILVA Jr et al., 2012), o que sugere que o TF pode recuperar a homeostase vascular e muscular por meio da ação de miRNAs específicos. Entretanto, estudos avaliando o papel dos miRNAs na regulação desses processos tanto na HA quanto induzidos pelo TF são desconhecidos. Portanto, a proposta para essa investigação é verificar: 1) miRNAs e genes alvo do músculo esquelético associados ao dano vascular e muscular na HA pré estabelecida de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) com 3 meses de idade no início do protocolo experimental e crônica com 6 meses de idade no início do protocolo experimental e 2) verificar o papel terapêutico do TF aeróbio sobre a rarefação microvascular e alterações do perfil de fibras e massa muscular associadas à HA, particularmente sobre a regulação de miRNAs e genes alvo em SHR.

2 JUSTIFICATIVA

A HA representa um fator de risco contínuo para DCV, afetando em média 32,5% da população brasileira adulta (VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2010). Em nosso país, as DCV têm sido a principal causa de morte. Em 2007 ocorreram 308.466 óbitos por doenças do aparelho circulatório. Segundo os dados do Ministério da Saúde, em 2009 ocorreram 91.970 internações por DCV, com custo global de R\$165.461.644,33. Além da alta prevalência, seu aparecimento está cada vez mais precoce e estima-se que cerca de 4% das crianças e adolescentes sejam portadoras de HA.

A carga de doenças representada pela morbi-mortalidade devido à HA é muito alta e por isso é considerada um grave problema de saúde pública, responsável por um grande ônus para os órgãos de saúde para tratamentos e prevenção. Considerando os fatos, o estudo se justifica devido à investigação com uso do TF ser não somente fundamental na prevenção primária da HA e redução dos gastos públicos, mas, como uma intervenção não farmacológica, diminuindo a

incidência de diagnósticos relacionados à patologia e melhorando o prognóstico para os próximos eventos cardiovasculares.

Embora haja crescente interesse a respeito do papel dos miRNAs na HA, ainda muito pouco se sabe sobre a influência deles na patologia. Dessa forma, o entendimento dos mecanismos reparatórios induzidos pelo TF sobre a expressão de miRNAs em SHR poderá elucidar grandes eventos do quadro patológico associados à HA, contribuindo para o tratamento do dano vascular e muscular esquelético.

Dados prévios do nosso laboratório corroboram com os da literatura na tentativa de explicar os efeitos benéficos do TF sobre a expressão de miRNAs alvejando genes relacionados com a angiogênese, o controle do tônus vascular e a hipertrofia cardíaca fisiológica (FERNANDES et al., 2011; SOCI et al., 2011; Da SILVA Jr et al., 2012). Entretanto, entendemos que o próximo passo seria relacioná-lo de forma direta no tratamento da HA; visto que, embora de suma importância, nada se tem publicado a respeito desse preâmbulo contendo miRNA, HA e TF. Além disso, é razoável supor que o conhecimento dos miRNAs induzidos pelo TF, os quais podem oferecer uma proteção vascular frente à HA, poderão servir de base para o desenvolvimento de futuras estratégias terapêuticas visando à prevenção das anormalidades vascular e muscular esquelética, aumentando assim a sobrevida e a melhora da qualidade de vida dos pacientes com HA.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Caracterizar o perfil de miRNAs com expressão alterada e genes alvo envolvidos na rarefação microvascular, mudança no perfil de fibras e no trofismo do músculo esquelético de SHR. Ainda, investigar o papel terapêutico do TF aeróbio na tentativa de prevenir os danos vascular e muscular associados a HA, e, portanto, colaborar para a redução da lesão de órgãos alvo, da resistência vascular e consequentemente da PA.

3.2 Específicos

A partir do objetivo geral do estudo foram formulados alguns objetivos específicos relacionados a cada etapa do projeto:

1ª etapa: Avaliar o efeito da HA em um modelo animal geneticamente hipertenso (SHR) de 3 meses de idade no início do protocolo, em que a HA foi recém estabelecida, e do TF de natação por 10 semanas sobre os parâmetros abaixo.

- a evolução da massa corporal;
- o comportamento da PA e da frequência cardíaca de repouso por plestimografia de cauda;
- a capacidade de realização do esforço físico máximo e do consumo de oxigênio de pico;
- a capacidade oxidativa muscular esquelética;
- a morfologia muscular esquelética avaliada pela razão capilar:fibra, a área de secção transversa e a distribuição dos tipos de fibra muscular esquelética;
- análise dos miRNAs relacionados com a resposta angiogênica, função e integridade vascular; tais como, miRNAs-16, -21, -126, -221 e -222 avaliados por *real-time PCR*;
- análise dos miRNAs relacionados com a resposta do perfil de fibras e metabolismo muscular esquelético; tais como, miRNAs-208b e -499, avaliados por *real-time PCR*;
- avaliação dos genes alvos por meio da expressão protéica de VEGF, PI3KR2, eNOS e Bcl-2 relacionados com a angiogênese, função e integridade vascular.

2ª etapa: Avaliar o efeito da HA em um modelo animal geneticamente hipertenso (SHR) de 6 meses de idade no início do protocolo, HA crônica, e do TF de natação por 10 semanas sobre os parâmetros abaixo.

- a evolução da massa corporal;
- o comportamento da PA e da frequência cardíaca de repouso por plestimografia de cauda;
- a capacidade de realização do esforço físico máximo e do consumo de oxigênio de pico;

- a função muscular esquelética em banho de órgãos;
- a função vascular por meio da reatividade da artéria femoral em banho de órgãos;
- a capacidade oxidativa muscular esquelética;
- a morfologia muscular esquelética avaliada pela razão capilar:fibra, a área de secção transversa e a distribuição dos tipos de fibra muscular esquelética;
- a morfologia da artéria femoral e da arteríola muscular avaliadas pelo diâmetro do vaso e do lúmen, a espessura da parede, a área de secção transversa e a relação parede- lúmen;
- *microarray* de miRNA para o sóleo;
- miRNAs diferencialmente expressos que apresentaram maior ou menor expressão no grupo hipertenso comparado ao grupo normotenso e que foram prevenidos pelo TF aeróbio foram selecionados e os genes alvos foram investigados por intermédio dos programas de bioinformática Target Scan, miRDB, miRanda, Pic Tar e miRWalk.
- os miRNAs mais diferencialmente expressos foram confirmados por *real-time PCR*;
- mRNA *array* com avaliação de 84 genes para via de angiogênese;
- análise dos genes alvo avaliados por meio da expressão protéica por *Western blot* relacionados com a angiogênese e integridade vascular e alterações no perfil de fibras e trofismo muscular.

Com base na literatura e nos dados prévios da 1ª etapa do projeto, os animais SHR adultos jovens com 3 meses de idade no início do protocolo, embora apresentem rarefação microvascular, a função arterial periférica e a estrutura muscular se mantêm preservadas. A utilização de animais hipertensos com o dobro de idade (6 meses no início do protocolo) nos possibilita comparar a progressão da doença na musculatura esquelética, além desta idade se assemelhar ao homem adulto de meia idade, população esta com grande prevalência de HA comparado ao adulto jovem.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Hipertensão arterial

A HA é uma síndrome multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de PA que afeta aproximadamente um bilhão de indivíduos em todo mundo, sendo considerada, portanto, um grave problema de saúde pública, representando um dos fatores de risco mais relevantes na etiologia das DCV, tais como, doença arterial coronariana e insuficiência cardíaca (VASAN et al., 2001; CHOBANIAN et al., 2003; SAFAR, 2005; PEREIRA et al., 2009).

No Brasil, de acordo com os dados epidemiológicos, as doenças cardiovasculares constituem importante causa de mortalidade, sendo que a HA atinge acima de 30% da população urbana adulta (com mais de 18 anos), chegando a 65% nos indivíduos mais idosos. Os valores de PA que permitem classificar como hipertensos os indivíduos acima de 18 anos são pressão sistólica ≥ 140 mm Hg e/ou pressão diastólica ≥ 90 mm Hg (VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2010). Na TABELA 1 apresenta-se a classificação diagnóstica da HA. Tanto o grupo limítrofe como o hipertenso estágio 1 são os mais prevalentes na população como um todo e os que mais podem se beneficiar com medidas preventivas como o TF (BRUM et al., 2006).

TABELA 1 – Classificação diagnóstica da PA (indivíduos adultos ≥ 18 anos) (VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2010).

Classificação	Pressão sistólica (mmHg)	Pressão diastólica (mmHg)
Ótima	< 120	< 80
Normal	< 130	< 85
Limítrofe*	130–139	85–89
Hipertensão estágio 1	140–159	90–99
Hipertensão estágio 2	160–179	100–109
Hipertensão estágio 3	≥ 180	≥ 110
Hipertensão sistólica isolada	≥ 140	< 90
Quando as pressões sistólica e diastólica situam-se em categorias diferentes, a maior deve ser utilizada para classificação da pressão arterial.		

* Pressão normal-alta ou pré-hipertensão são termos que se equivalem na literatura.

A HA pode ser classificada em primária ou essencial e secundária. Os 95% dos casos de HA é classificada como essencial e consiste em uma alteração multifatorial condicionada por fatores genéticos e ambientais. Quando os níveis de

PA estão associados a outras situações patológicas como a insuficiência renal, hipertensão gestacional, doenças endócrinas, entre outras, se denomina de hipertensão secundária (SEVER & POULTER, 1989). Dessa forma, a HA, como a maioria das doenças crônicas cuja incidência aumenta com a idade, envolve tanto componentes etiológicos ambientais como hereditários, sendo, portanto, classificada como uma doença poligênica e multifatorial, estando relacionada a mudanças morfológicas e funcionais no sistema cardiovascular e no controle autonômico em humanos e animais (TIPTON, 1991; IRIGOYEN et al., 2003; BÁTKAI & THUM, 2012).

A PA é o produto do débito cardíaco e da resistência periférica total. Em condições normais, a PA deve ser mantida em uma estreita faixa de variação, permitindo uma adequada perfusão tecidual. Este controle envolve grande número de substâncias e de sistemas fisiológicos que interagem de maneira complexa para manter a PA em níveis adequados, nas mais diversas situações fisiológicas. Dessa forma, o controle da PA envolve mecanismos neurais, humorais e renais que, em curtos e longos prazos, modulam não só a atividade do sistema nervoso autônomo para o coração e para os vasos, como também o volume sangüíneo e a secreção de vários hormônios (KRIEGER & MICHELINI, 1992; IRIGOYEN et al., 2003).

A HA essencial em adultos pode ser explicada fundamentalmente por uma elevada resistência vascular periférica ao fluxo sangüíneo sem alterações no débito cardíaco (LÉVY et al., 2001; SAFAR, 2005; FEIHL et al., 2006; MULVANY, 2012). A microcirculação composta por arteríolas e capilares, primariamente localizadas na parte distal da vasculatura arterial, constitui o maior local de origem da resistência vascular (CHRISTENSEN & MULVANY, 2001; LÉVY, 2005; MULVANY, 2012) e a fundamental causa de aumento desta resistência é devido à diminuição no diâmetro da luz do vaso bem como a perda dos mesmos. De acordo com a Lei de Poiseuille (Lei de Poiseuille – $R = 8\eta L / \pi r^4$, nos quais η = viscosidade; L = comprimento; r = raio), a resistência varia inversamente à quarta potência do raio do vaso sangüíneo, isto significa dizer que uma pequena diminuição na luz do vaso aumenta marcadamente a resistência (SUTERA & SKALAK, 1993). Além disso, uma redução no número de vasos arteriolar e capilar dispostos em paralelo contribui consideravelmente para o aumento da resistência periférica total (LÉVY et al., 2001; SAFAR, 2005; FEIHL et al., 2006, 2008).

Admite-se, portanto, que alterações da PA, como as encontradas na HA, resultam no desajuste dos mecanismos de controle da macro e microcirculação. Assim, a HA aparece amplamente associada com um desequilíbrio do tônus vasomotor, participando ativamente no aumento da vasoconstrição, repercutindo num aumento da resistência vascular periférica, culminando com a oclusão arteriolar e capilar na microcirculação (LÉVY et al., 2001; FEIHL et al., 2006, 2008).

A literatura mostra que a HA altera o funcionamento normal na microcirculação arteriolar e capilar, aumentando a resistência vascular periférica e diminuindo o número de vasos por unidade de volume tecidual. Este fenômeno é chamado de rarefação microvascular e foi primeiramente notificado por RUEDEMANN (1933) em que pacientes hipertensos tinham um reduzido número de pequenos vasos, sendo posteriormente replicados os dados com outro grupo de pesquisadores com um equipamento de visualização mais sofisticado (SULLIVAN et al., 1983). HUTCHINS et al. (1974) foram os primeiros a descreverem a rarefação microvascular em modelo animal, onde eles reportaram 50% de rarefação no músculo cremaster de SHR. Desde então, tem sido confirmado por diferentes autores, tanto em humanos quanto em modelos animais de experimentação para hipertensão (GREENE et al., 1989; ANTONIOS et al., 1999; AMARAL et al., 2000; LÉVY et al., 2001; AMARAL et al., 2001; MELO et al., 2003; FEIHL et al., 2006, 2008; FERNANDES et al., 2012).

Evidências experimentais sugerem que a rarefação microvascular, manifestada com um aumento na distância intercapilar, é responsável por uma perfusão tecidual não uniforme, o que remete para áreas pouco oxigenadas, podendo restringir a atividade metabólica local (AMBROSIO et al., 2003). Curiosamente, DEBBABI et al. (2006) mostraram que o escore de Framingham para risco cardiovascular foi negativamente correlacionado com a densidade capilar em indivíduos hipertensos, indicando a necessidade de uma adequada estrutura microvascular para manutenção da homeostase corporal.

Vários fatores e mecanismos têm sido propostos para explicar a rarefação microvascular e a disfunção endotelial na HA. Embora não se conheça completamente a causa, ela parece estar associada a uma falha no processo angiogênico (LÉVY et al., 2001; FEIHL et al., 2006, 2008).

4.2 Hipertensão arterial e treinamento físico aeróbio

Tratamentos medicamentosos e não-medicamentosos são utilizados com o objetivo de reaver os valores normais de PA e restaurar a função endotelial e a rede microvascular, bem como prevenir a lesão de órgãos alvo. O exercício físico aeróbio lidera a lista de tratamentos não-medicamentosos possibilitando múltiplos efeitos, principalmente hipotensor, em indivíduos hipertensos (FAGARD, 2005).

A incidência de DCV pode ser reduzida por um estilo de vida ativo. Dados epidemiológicos, clínicos e experimentais confirmam que a prática regular de exercício físico reduz a progressão das DCV e, portanto a morbidade e mortalidade cardiovascular (HIGASHI & YOSHIZUMI, 2004). Além disso, estudo publicado por MYERS et al. (2002) mostraram que indivíduos que apresentam fatores de risco para DCV, incluso histórico de HA, e um nível de capacidade física superior aos indivíduos apenas ativos comprovaram ter um risco ainda menor de morte.

O TF aeróbio conduz a importantes adaptações autonômicas, hemodinâmicas e estruturais que influenciam, sobremaneira, o sistema cardiovascular e muscular esquelético. A bradicardia de repouso (NEGRÃO et al., 1992), o aumento do volume sistólico (BRANDÃO et al., 1993) e a atenuação da atividade nervosa simpática renal (NEGRÃO et al., 1993) e muscular (GRASSI et al., 1992) estão entre as mais importantes alterações provocadas pelo TF no sistema cardiovascular. Já as adaptações periféricas promovidas pelo TF proporcionam aumento da extração de oxigênio pelo músculo esquelético em atividade, tais como aumento da atividade das enzimas do metabolismo oxidativo (HOLLOSZY & COYLE, 1984; WIBOM et al., 1992), aumento da capilarização muscular (POOLE & MATHIEU-COSTELLO, 1996), aumento da condutância vascular sistêmica (ROWELL et al., 1986) e aumento do fluxo sanguíneo periférico (FRANCHINI, 1999).

Hoje, há consenso sobre os efeitos benéficos do exercício físico aeróbio nos estágios 1 e 2 da HA (FAGARD, 2005). Muitos ensaios clínicos e metanálises têm demonstrado que o TF provoca redução nos níveis de PA em indivíduos hipertensos (HAGBERG et al., 2000; WHELTON et al., 2002; PESCATELLO et al., 2004). Estudos com animais de experimentação também tem mostrado redução significativa na PA de SHR (VERAS-SILVA et al., 1997; SILVA et al., 1997; AMARAL et al., 2001; MELO et al., 2003; FERNANDES et al., 2012; ROQUE et al., 2013). No

entanto, é importante ressaltar que, nem todo tipo de exercício é efetivo em reduzir a PA em hipertensos.

VERAS-SILVA et al. (1997) demonstraram que a intensidade do TF aeróbio é fundamental para a queda pressórica pós-treinamento em SHR. Isto é, somente o treinamento de baixa intensidade (55% do VO_2 pico) foi efetivo em diminuir a PAS (pressão arterial sistólica) e PAD (pressão arterial diastólica), nesses animais. Ao contrário, o TF em alta intensidade (85% do VO_2 pico) não modificou a hipertensão nesses animais. Resultados semelhantes foram observados em humanos. HAGBERG et al. (1989) verificaram que em idosos hipertensos, o treinamento de baixa intensidade (50% do VO_2 pico) foi mais eficaz em reduzir a PA de repouso que o treinamento de intensidade moderada (70% do VO_2 pico), apesar dos dois grupos terem apresentado queda significativa da PA.

Embora se conheça que o TF aeróbio promova a redução da PA em hipertensos, os mecanismos envolvidos ainda não estão totalmente esclarecidos.

Um dos mecanismos bastante discutidos para explicar a queda da PA induzida pelo TF está relacionado à atenuação da atividade nervosa simpática periférica (LATERZA et al., 2007). Além disso, uma melhora na sensibilidade do reflexo pressorreceptor também foi associada à diminuição na atividade nervosa simpática (BRUM et al., 2000).

Ainda no que concerne a redução da PA, diversos estudos apontam importantes efeitos do TF aeróbio sobre a microcirculação em SHR, tais como aumento na densidade capilar e da razão capilar por fibra no músculo esquelético e cardíaco, promovendo uma completa reversão da rarefação capilar ocorrida na hipertensão; além disso, o exercício aeróbio normalizou a resistência vascular periférica para a musculatura esquelética e a razão parede: luz arteriolar (AMARAL et al., 2000). Estes resultados sugerem que o aumento da densidade capilar é uma adaptação específica da musculatura esquelética em SHR, quando induzido pelo TF aeróbio. A recuperação da rede microvascular pode contribuir para o efeito da diminuição da PA por meio da redução da resistência vascular periférica, a qual vem sendo intitulada como a responsável pela HA essencial em adultos (AMARAL et al., 2001; MELO et al., 2003; FERNANDES et al., 2012; ROQUE et al., 2013).

Todos os tecidos do corpo humano demandam oxigênio e nutrientes, que são transportados através do sistema de vasos sanguíneos (RISAU, 1997). Para que

este transporte seja adequado, é necessário um sistema vascular altamente desenvolvido. Esta eficiência é mantida por meio da integridade da rede vascular e angiogênese. Uma vez que HA promove rarefação arteriolar e capilar, este suporte de oxigênio está prejudicado, o que danifica os tecidos conduzindo a apoptose celular (GOBE et al., 1997; KOBAYASHI et al., 2005).

Diversos fatores têm sido apontados como responsáveis pela correção da disfunção endotelial e da defeituosa angiogênese na HA. Entre eles podemos destacar o crucial papel do NO (KUBIS et al., 2002) e do VEGF (BYRNE et al., 2005), bem como o balanço de estimuladores e inibidores de apoptose, uma vez que esses componentes já foram comprovados estarem imbricados nestes processos (DE RESENDE et al., 2006).

O aumento no fluxo sanguíneo para a musculatura esquelética promovido pelo TF aeróbio, e o conseqüente aumento do estresse de cisalhamento, ou *shear stress*, apresentam correlação direta com o aumento na liberação de NO e VEGF, que também contribui para o aumento do fluxo, pois leva não somente à vasodilatação dependente do endotélio, como a angiogênese; sendo considerados por muitos pesquisadores o sinal primário para o remodelamento vascular (ARAKAWA, 1993; MOYNA & THOMPSON, 2004). Em condições fisiológicas, a manutenção, a formação e/ ou a perda de capilares é dependente de um fino balanço de reguladores positivos e negativos de angiogênese (fatores pró-angiogênicos e angiostáticos, respectivamente) (POLVERINI, 1995).

Evidências sugerem que uma redução da sobrevivência das células endoteliais, ou seja, uma maior apoptose na microcirculação pode causar rarefação em indivíduos hipertensos; embora os mecanismos das vias pró e/ ou anti-apoptóticas não tenham ainda sido bem investigadas (GOBE et al., 1997). Estudos mostram que o estresse oxidativo promove apoptose de célula endotelial na microcirculação e induz rarefação em SHR. De fato, estudos posteriores comprovaram que o tratamento crônico com antioxidantes reduziu a apoptose das células endoteliais em microvasos e preveniu a rarefação estrutural em SHR (KOBAYASHI et al., 2005). Entretanto, estudos com abordagem não farmacológica, como o TF, no que concerne a regulação das proteínas pró e anti-apoptóticas, ainda não foram estudadas.

A seguir discutiremos um pouco melhor cada um desses principais mediadores de angiogênese no intuito de compreender como estão concatenados no processo de dano e reparo vascular na HA e seus efeitos com o TF.

4.2.1 Papel da eNOS e do VEGF na angiogênese

O NO é produzido pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) em uma reação que implica a conversão do aminoácido L-arginina para L-citrulina e NO. Para que ocorra esta reação é necessário a presença de oxigênio e NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) e co-fatores como FAD (flavina adenina dinucleotídeo), FMN (flavina mononucleotídeo) e BH₄ (tetrahidrobiopterina) (ALDERTON et al., 2001).

Existe 3 isoformas de NOS, codificadas por 3 genes distintos com diferente localização, regulação, propriedades catalíticas e sensibilidade a inibidores. A nNOS (NOS-1), conhecida como NOS neuronal, é uma isoforma constitutiva predominante no tecido neuronal e renal; a iNOS (NOS-2) é induzível, e pode se expressar em grande variedade de células e tecidos, especialmente nos macrófagos estimulados por citocinas e outros agentes pró-inflamatórios, além de também estar presente em células endoteliais e músculo liso vascular; e a eNOS (NOS-3), conhecida como NOS endotelial, foi descoberta inicialmente nas células endoteliais e se expressa de maneira constitutiva (KATUSIC & COSENTINO, 1994).

A eNOS, dependente em grande parte do complexo Ca²⁺-CaM (cálcio-calmodulina) para sua ativação, é a responsável pela produção do NO endotelial que desempenha uma função fisiológica importante no sistema vascular (FLEMING, 1987; NISHIDA et al., 1992). Diversos estímulos, como o *shear stress*, fatores de crescimento e hormônios podem promover um aumento na expressão da eNOS e conseqüentemente na produção de NO (LI et al., 2002), atuando principalmente na vasodilatação, na angiogênese, na inibição da agregação plaquetária e do crescimento da musculatura lisa, assim como na inibição da adesão de monócitos e leucócitos no endotélio. Como conseqüência, o NO participa fundamentalmente na manutenção da função, estrutura e integridade vascular (COHEN et al., 1983; DUBEY & OVERBECK, 1994; KUBIS et al., 2002).

Melhores entendimentos sobre o papel das isoformas da NOS foram possíveis com o uso dos camundongos *Knockout* para esses genes. De fato, o

animal *Knockout* para o gene da eNOS (eNOS^{-/-}) mostrou HA sistêmica com disfunção endotelial, comprovando o papel chave da NO endotelial na redução do tônus vascular (HUANG et al., 1995), além de mostrar prejuízo na angiogênese (LEE et al., 1999; KUBIS et al., 2002). Consistente com os dados, outros estudos mostraram que a inibição crônica da síntese de NO endotelial resultou em HA, aumento da resistência vascular periférica e rarefação microvascular, ressaltando um importante papel da microcirculação na regulação da PA (STRUJIKER BOUDIER et al., 1992; KRIEFER et al., 2002). Além disso, SUN et al. (1999) demonstraram que em músculo esquelético de camundongos eNOS^{-/-} o diâmetro arterial basal estava significativamente reduzido comparado aos animais controle, implicado no desenvolvimento da rarefação microvascular. Por outro lado, o TF vem se mostrando eficaz em promover elevação nos níveis de NO tanto em humanos (MAEDA et al., 2001), como em animais experimentais (GREEN et al., 2004; Da SILVA Jr et al., 2012; ROQUE et al., 2013), demonstrando seu papel benéfico na indução de vasodilatação e angiogênese, sendo uma terapia atrativa para doenças vasculares.

Muitas moléculas angiogênicas possuem propriedades vasodilatadoras, sendo que a existência de um *link* molecular entre vasodilatação, produção de NO e angiogênese tem sido estabelecida (ZICHE et al., 1994). O NO é o mediador final da angiogênese estimulada pelo VEGF, o principal fator implicado na vasculogênese e angiogênese (ZICHE et al., 1997; PARENTI et al., 1998).

Estudos mostram que o VEGF é um potente fator de crescimento endotelial induzido pelo exercício (PRIOR et al., 2004), tanto em animais (AMARAL et al., 2001; BIROT, 2003) quanto em humanos (GUSTAFSSON et al., 2002), sendo não só importante por seu efeito angiogênico, mas também pelo efeito anti-apoptótico (FERRARA, 2001).

O VEGF é um dímero protéico, sinalizador com ação autócrina e parácrina que ativa receptores transmembranares expressos, principalmente, em células endoteliais. Esta proteína se caracteriza como um dos membros da superfamília de fatores de crescimento, formado por oito resíduos de cisteínas ligados por pontes dissulfeto (HOLMES & ZACHARY, 2005). Em humanos, foram identificados seis membros: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e PlGF (fator de crescimento placentário), tendo VEGF-A, comumente referenciado como VEGF, um papel mais ativo no processo angiogênico.

Até o presente momento, três diferentes receptores para o VEGF, receptores do tipo tirosina quinase, têm sido descritos: VEGFR1 ou Flt-1, VEGFR2 ou flk-1 (KDR) e VEGFR3 ou Flt-4, sendo que a ativação de cada receptor induz efeitos distintos (GUSTAFSSON & KRAUS, 2001). A TABELA 2 apresenta o resumo das isoformas de VEGF e seus receptores.

TABELA 2 – Especificidade dos receptores ao ligante VEGF e efeitos biológicos.

Membro da família VEGF	Receptor	Função
VEGF (VEGF-A)	VEGFR1 e VEGFR2	angiogênese manutenção vascular
VEGF-B	VEGFR1	não estabelecida
VEGF-C	VEGFR2 e VEGFR3	linfangiogênese
VEGF-D	VEGFR2 e VEGFR3	linfangiogênese
VEGF-E (fator viral)	VEGFR2	angiogênese
PIGF	VEGFR1	angiogênese inflamação

O VEGFR2 é o receptor de maior importância no processo de angiogênese e aumento dos efeitos da permeabilidade do VEGF, estando o mesmo envolvido no processo de diferenciação das células endoteliais (NEUFELD et al., 1999; FERRARA, 1999), quimiotaxia e sobrevivência celular (FERRARA et al., 2003). O VEGFR2 tem uma menor atividade com o VEGF quando comparado ao VEGFR1, porém uma maior atividade sinalizadora. O VEGFR2 sofre uma fosforização da tirosina e desencadeia a mitogênese, a migração celular e a permeabilidade vascular ao VEGF, enquanto que o VEGFR1 apresenta fraca e indetectável resposta (FERRARA et al., 2003).

A principal função que os receptores de VEGF (VEGFR1 e 2) possuem no desenvolvimento do sistema vascular foi demonstrada em estudos de animais *Knockout* para estes 2 genes, em que mostraram a morte dos animais antes do

nascimento, devido ao fato das células endoteliais terem ausência do processo de diferenciação e pela prejuízo na formação de vasos sanguíneos (FERRARA, 2002).

Dessa forma, o VEGF é reconhecido como uma proteína reguladora chave da angiogênese fisiológica tanto na fase embriogênica como pós-natal, envolvido na formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes. Funciona também como um potente fator pró-sobrevivência (anti-apoptótico) para células endoteliais. Além disso, o VEGF induz a expressão de proteínas anti-apoptóticas nas células endoteliais, auxiliando sobremaneira na formação de capilares ao passo que inibe os processos que envolvem sua perda (FERRARA, 1999).

Para promoção de suas funções como descritas acima é necessário a ativação das vias de sinalização mediadas pela interação do VEGF com o VEGFR2. Resumidamente, a transdução de sinais dos receptores do tipo tirosina quinase tem várias etapas bioquímicas: (1) interação do ligante com receptor; (2) dimerização do receptor; (3) ativação da porção tirosina quinase; (4) auto fosforilação do receptor; (5) ligação e ativação de proteínas adaptadoras aos sítios de auto fosforilação. O entendimento desses mecanismos de sinalização intracelular mediados pelo VEGF possibilita intervenções terapêuticas para controlar o processo fisiopatológico da angiogênese (SCHLESSINGER, 2000).

A estimulação da eNOS pelo VEGF é mediada por vários mecanismos, indicando que outras vias estão atreladas a alteração na produção de NO, independente da concentração intracelular de cálcio. Entre os mecanismos mais importantes podemos destacar o aumento na expressão gênica e protéica da eNOS, permitindo à célula endotelial produzir maiores quantidades de NO. O aumento na expressão da eNOS envolve a via de sinalização da PI3K (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato) e subsequente ativação da Akt (PKB, proteína quinase B) (FIGURA 1) (FULTON et al., 1999; DAHER et al., 2010). Além disso, há estudos que comprovam que o NO estimula a expressão de fatores de crescimento, tal como o VEGF (DULAK et al., 2000), o que demonstra uma ação sinérgica entre os 2 fatores requerido para um apropriado crescimento vascular.

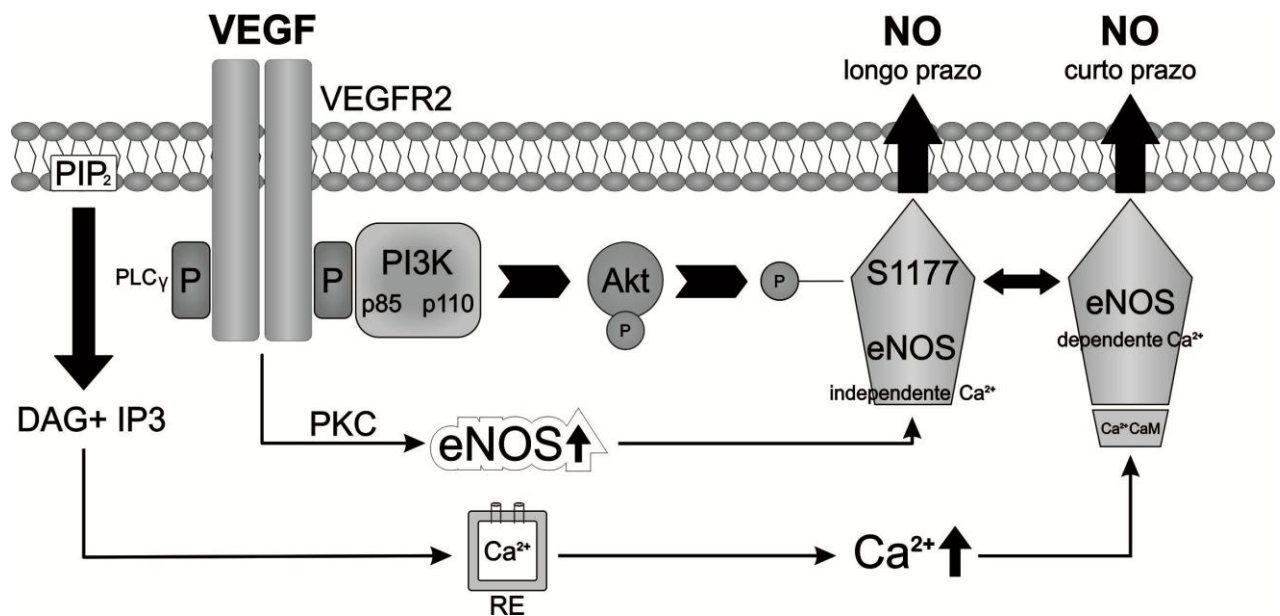


FIGURA 1 – A sinalização de VEGF/ VEGFR2 promove a síntese de NO. Em curto prazo, a produção de NO é mediada pelo aumento do Ca^{2+} citosólico, resultante da ativação de PLC- γ e geração de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). A ativação de Akt conduz a fosforilação e ativação da eNOS, proporcionando um mecanismo para a síntese sustentada de NO independente de Ca^{2+} . A PKC também é relatada por mediar a regulação positiva de eNOS induzida por VEGF, um outro mecanismo que leva a síntese de NO a longo prazo.

Sabe-se que os mecanismos de controle do processo angiogênico dependem de um balanço de proteínas que regulam a apoptose. Conforme demonstrado, a ativação de VEGF e eNOS tem um importante papel no controle da sobrevivência celular por estarem envolvidos diretamente na regulação das proteínas apoptóticas, revelando, de fato, que estes fatores estão intimamente concatenados para a promoção da homeostase vascular (DE RESENDE et al., 2006).

4.2.2 Sobrevivência e apoptose das células endotéliais

Um mecanismo chave pelo qual o VEGF promove a formação de novos vasos sanguíneos e mantém a sua integridade é a ativação da sobrevivência de

células endoteliais e da sinalização anti-apoptótica (ZACHARY & GLIKI, 2001) (FIGURA 2).

A sinalização apoptótica por meio da via intrínseca envolve a ativação da pró-caspase 9 a qual é ativada por eventos de transição da permeabilidade mitocondrial, com liberação de citocromo c para o meio intracitoplasmático (SALVESEN & DUCKETT, 2002). O *link* de interação entre a mitocôndria e as caspases ocorre por meio da família das proteínas Bcl-2 (“linfoma de células B2”). A família Bcl-2 vem sendo intensivamente investigada por ser uma família de proteínas indutoras e repressoras de morte por apoptose que participam ativamente da regulação da sinalização apoptótica (BORNER, 2003). Os membros da família Bcl-2 como Bcl-2 e Bcl-xL inibem a apoptose, pois previnem a liberação de citocromo c e são chamados de reguladores anti-apoptóticos. Por outro lado, Bad, Bax e Bak são proteínas pró-apoptóticas por induzirem a liberação de citocromo c (HENGARTNER, 2000). O citocromo c liga-se com o fator de ativação das proteases pró-apoptóticas 1 (Apaf-1) o qual, por meio de alterações conformacionais dependentes de ATP, oligomeriza-se e forma o aptossomo, um complexo que ativará a pró-caspase 9. Esta pró-caspase 9 ativada, desencadeia o sinal para a ativação das caspases 3, 6 e 7 resultando num processo amplificado e catalítico resultando no processo apoptótico (EARNSHAW et al., 1999; SLEE, 1999).

VEGF foi mostrado pela primeira vez ser um fator de sobrevivência para as células endoteliais da retina (ALON et al., 1995). VEGF inibe a apoptose de células endoteliais em parte por ativação da via anti-apoptótica mediada por Akt via ação dependente de PI3K (GERBER et al., 1998). Entretanto, os efeitos em longo prazo de VEGF sobre a sobrevivência de células endoteliais são provavelmente mediados por meio da regulação positiva de componentes da maquinaria celular anti-apoptótica. VEGF induz a expressão das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e A1 (NOR et al., 1999; NOR & POLVERINI, 1999), as quais inibem a ativação de caspases, e regulam positivamente membros da família IAP (inibidores de apoptose) (TRAN et al., 1999). Além disso, esta cascata de ativação mediada por VEGF/VEGR2/ Akt pode inibir a atividade pró-apoptótica de Bad que resulta na fosforilação de Bad_{Ser112} e Ser136, mantendo o peptídeo em forma inativa (fosforilado), impedindo assim a sinalização apoptótica (DATTA et al., 1997). Dessa forma, fica evidente a

interação e a importância desses fatores no combate a apoptose microvascular em prol da indução angiogênica (FIGURA 2).

Curiosamente, a proteína quinase de adesão focal (FAK), desempenha um papel chave na sinalização dependente de integrina (ZACHARY & ROZENGURT, 1992) e está fortemente implicada na manutenção de sinais de sobrevivência em vários tipos de células aderentes, incluindo as células endoteliais (ABEDI & ZACHARY, 1997; LEVKAU et al., 1998). Esta molécula sinalizadora foi originalmente descrita em cultura celular como uma proteína tirosina quinase localizada nos sítios de adesão ao substrato, o que despertou o interesse por ser um sinalizador envolvido na mecano-transdução entre o ambiente e as células (HANKS et al., 1992). FAK é ativada após estímulo de VEGF/ VEGFR2 sinalizada pela Src quinase que fosforila a FAK regulando a migração e a sobrevivência da célula endotelial (ABU-GHAZALEH et al., 2001). Dessa forma, VEGF aumenta a fosforilação da tirosina de FAK e a ativação local da FAK também promove recrutamento e agregação ("clusters") de outras moléculas de FAK, como a paxilina em HUVECs (ABEDI & ZACHARY, 1997; ZACHARY & GLIKI, 2001), o que contribui para o ancoramento das células endoteliais e manutenção de sinais de sobrevivência celular (BRAREN et al., 2006) (FIGURA 2).

A FAK também tem sido implicada como um modulador importante da angiogênese. Estudos tem mostrado que a deleção de FAK nas células endoteliais gera falhas no processo angiogênico e na formação de novas redes de vasos sanguíneos durante o desenvolvimento embrionário, indicando um papel essencial de FAK nestes processos (SHEN et al., 2005; BRAREN, et al., 2006). Sabe-se que a integrina $\alpha\beta3$ é uma via de sobrevivência importante para os vasos sanguíneos durante a angiogênese (BROOKS et al., 1994). *Cross-talk* entre este sistema e receptores de VEGF tem sido documentado, uma vez que o VEGFR2 pode se associar seletivamente a integrina $\alpha\beta3$, considerado um mecanismo atrativo por integrar a sobrevivência das células e funções angiogênicas de VEGF (ZACHARY & GLIKI, 2001). Corroborando, o NO também tem sido descrito por regular a integridade de adesão focal e a fosforilação da tirosina FAK em células endoteliais, indicando a integração da via NO e FAK na regulação da migração da célula endotelial (GOLIGORSKY et al., 1999; ZACHARY & GLIKI, 2001).

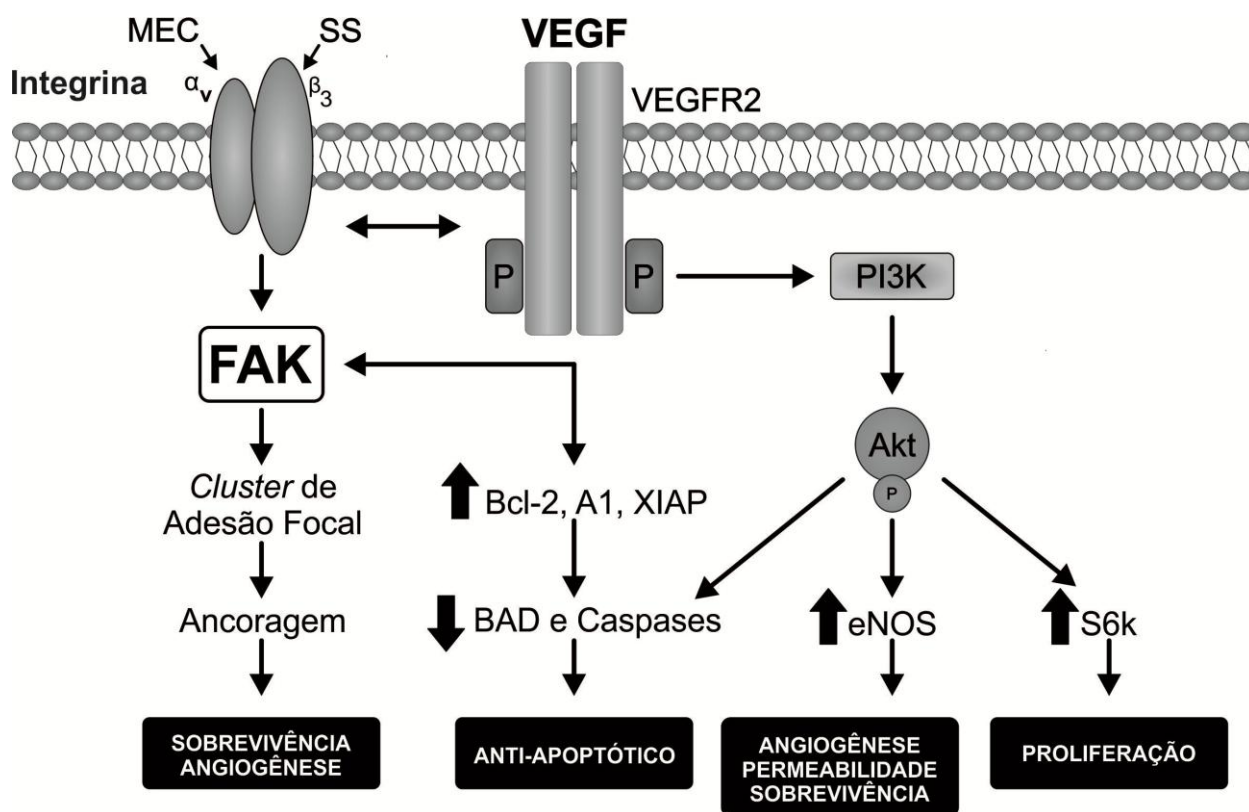


FIGURA 2 – Visão esquemática das vias de sinalização de VEGF/ VEGFR2 na sobrevivência celular e angiogênese. A sobrevivência da célula endotelial dependente de VEGF é mediada, em parte, por meio da ativação de PI3K/ Akt e desativação das vias apoptóticas. O aumento da fosforilação de FAK é um ponto de convergência de diversos estímulos de sobrevivência de células endoteliais, incluindo o VEGF, as interações de matriz-integrina e *shear stress*. A interação entre a integrina $\alpha_v\beta_3$ e o VEGFR2 também pode desempenhar um papel de sobrevivência em função de VEGF. Os efeitos anti-apoptóticos de longo prazo de VEGF podem envolver a regulação positiva de proteínas anti-apoptóticas, tais como Bcl-2 e A1. Alvos *downstreams* da ativação da Akt na inibição da apoptose são Bad e caspase-9. Bcl-2 e A1 podem inibir os membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 e as XIAP têm como alvo as caspases efetoras terminais (caspases 3 e 7). FAK: proteína de adesão focal, MEC: matriz extracelular, SS: *shear stress*, PI3K: fosfoinositídeo 3 quinase; Akt: proteína quinase B; eNOS: óxido nítrico sintase endotelial, Bcl-2 e BAD: proteínas anti e pró-apoptóticas respectivamente; A1: proteína anti-apoptótica, XIAP: inibidores de apoptose; S6K: p70S6 quinase.

O desequilíbrio apoptótico é uma característica marcante de numerosas patologias humanas e desempenha um crítico papel em várias DCV incluindo insuficiência cardíaca, isquemia cardíaca, aterosclerose e HA (HAUNSTETTER & IZUMO, 1998; FORTUNO et al., 2003). A apoptose tem sido observada em diferentes tecidos em SHR comparado ao seu controle WKY. Interessantemente, várias anormalidades da musculatura esquelética incluindo aumento de níveis de noradrenalina, elevação intracelular de Ca^{2+} livre, redistribuição de tipos de fibra, apoptose, redução de densidade capilar, entre outras, tem sido demonstrada em SHR (QUADRILATERO & RUSH, 2006). Em SHR, como mencionado, a rarefação capilar pode ser produzida pela apoptose endotelial, mediada em grande parte pelo prejuízo na ativação de VEGF/ VEGFR2 (WANG et al., 2004). Nessas células, o sistema renina angiotensina, particularmente a angiotensina II, ativa a enzima NADPH oxidase, aumentando a produção de superóxido e diminuindo a produção de NO na HA. O endotélio microvascular de SHR é exposto ao aumento do estresse oxidativo repercutindo em maior apoptose celular, em grande parte devido ao aumento na atividade da xantina oxidase (SUZUKI et al., 1998) e NADPH oxidase (WU et al., 2001) e/ ou uma redução na atividade da superóxido desmutase (ITO et al., 1995). Entretanto, até o momento poucos estudos foram desenvolvidos com esta temática na HA, principalmente no que concernem as vias de sinalização intracelular. Além disso, a apoptose e o perfil de várias proteínas relacionadas a apoptose e a sobrevivências das células endoteliais não tem sido examinadas no músculo esquelético de animais hipertensos quando induzidos pelo TF.

4.3 Hipertensão arterial e treinamento físico: alterações no músculo esquelético

Sabidamente, a angiogênese representa uma resposta adaptativa essencial do músculo esquelético ao TF aeróbio, contribuindo para a melhora da capacidade aeróbia muscular (transporte, fornecimento e extração de oxigênio) (AMARAL et al., 2001; LAUFS et al., 2004; WAHL et al., 2007). Por outro lado, músculos esqueléticos com alteração do suporte capilar e consequentemente prejuízo na oferta de oxigênio e nutrientes, sob várias condições, tais como, fatores de risco cardiovascular e DCV, apresentam uma mudança na distribuição dos tipos de fibra muscular em direção ao aumento de fibras do tipo II. A origem da transição

de fibras do tipo I para II em músculo sóleo de SHR ainda permanece pouco conhecida, porém estudos mostram associação com a rarefação capilar acompanhada de mudanças nas propriedades metabólicas (NAGATOMO et al., 2009; BACURAU et al., 2009; SOUZA et al., 2014).

De acordo com os pressupostos acima, estudos mostram que quando ocorre a transição das fibras do músculo esquelético, as diferentes propriedades morfológicas da fibra muscular são transformadas em uma típica sequência temporal: a densidade capilar e as atividades das enzimas do metabolismo energético são alteradas precocemente durante a transformação e precedem a mudança na atividade da ATPase miofibrilar e as características contráteis do músculo (BROWN et al., 1976; BENBACHIR-LAMRINI et al., 1990).

Em mamíferos, as fibras do músculo esquelético são geralmente classificadas em fibras do tipo I e tipo II de acordo com as diferentes atividades da ATPase miosínica, após pré incubação em diferentes pH, podendo as do tipo II ser subclassificadas em IIA, IIX/D e IIB. As fibras do tipo II são caracterizadas por serem fibras de contração rápida com predominância do metabolismo glicolítico, ao passo que as fibras do tipo I são caracterizadas por serem fibras de contração lenta com predominância do metabolismo oxidativo (ARMSTRONG & PHELPS, 1984; HORI et al., 1998; NAKATANI et al., 2003).

Estudos na literatura mostram que o músculo esquelético de indivíduos hipertensos, assim como de SHR, contém uma maior porcentagem de fibras de contração rápida e glicolítica, ou seja, as do tipo II comparados aos seus controles normotensos (BENBACHIR-LAMRINI et al., 1990; LEWIS et al., 1994; BORTOLOTTTO et al., 1999; NAGATOMO et al., 2009). Interessantemente, os resultados obtidos na composição dos tipos de fibra do músculo esquelético sóleo realizado tanto pela técnica de histoquímica pela reação da ATPase miosínica quanto pela técnica de eletroforese em gel SDS-PAGE para detecção das miosinas de cadeia pesada (MHC) para cada tipo de fibra, foram positivamente correlacionadas independente da técnica empregada (BORTOLOTTTO et al., 1999).

Segundo BORTOLOTTTO et al.(1999), o principal resultado obtido em seu estudo foi que em todos os estágios de hipertensão (4, 16 e 24 semanas), o músculo sóleo de SHR continha uma maior proporção de fibras do tipo II do que o músculo sóleo de ratos WKY, bem como de fibras híbridas, fibras estas que contêm dois tipos

de MHC em uma mesma fibra muscular isolada, no caso do SHR maior proporção de fibras híbridas IIA+IIX. A presença de maior proporção de fibras híbridas é um indicador de transição do tipo de fibra muscular no músculo em questão.

Recentemente, MINAMI et al. (2007) mostraram os efeitos do TF, associado ou não ao tratamento com perindopril (inibidor da enzima conversora de angiotensina), sobre a capilaridade e os tipos de fibra no músculo sóleo de SHR. Os autores observaram que o tratamento crônico com perindopril aumenta a capacidade de exercício em animais não treinados, enquanto ela não afeta a capacidade de exercício adquiridos como resultado de TF. Além disso, os autores descobriram que perindopril em resposta ao TF promove mudanças adaptativas no músculo sóleo, como aumento da densidade capilar e da porcentagem de fibras do tipo I. Interessantemente, os autores não observaram alteração na composição dos tipos de fibra nos grupos SHR treinado e SHR tratado com perindopril quando comparado ao grupo SHR sedentário, embora tenham observado uma maior capilarização nestes grupos. Por outro lado, um estudo mais recente do mesmo grupo, mostrou que o tratamento farmacológico com um bloqueador de canal de cálcio (Azelnidipine), ou um antagonista do receptor de angiotensina II tipo I (Olmesartan) ou mesmo o TF significativamente aumentaram a densidade capilar e a porcentagem de fibras do tipo I no músculo sóleo de SHR (GUO et al., 2008). Embora os resultados na literatura ainda estejam um pouco controversos no que se refere às alterações na proporção dos tipos de fibra em resposta ao TF na HA, também não foi possível observar a comparação entre o perfil dos tipos de fibra no grupo SHR treinado comparado ao seu controle normotenso WKY, com intuito de averiguar uma normalização perante a composição nos tipos de fibra muscular.

Embora os estudos relatem uma mudança no perfil de fibras musculares esqueléticas na HA, nenhum deles observou alteração na massa muscular em animais hipertensos até 24 semanas de idades (BENBACHIR-LAMRINI et al., 1990; LEWIS et al., 1994; BORTOLOTTTO et al., 1999; NAGATOMO et al., 2009). Curiosamente, CARVALHO et al. (2003) determinaram, no músculo sóleo, mudanças na expressão das isoformas de MHC, o diâmetro dos tipos de fibras e o índice de atrofia muscular durante a transição da hipertrofia ventricular para insuficiência cardíaca induzida por estenose aórtica. Os animais desenvolveram uma miopatia no músculo sóleo, caracterizada por diminuição na porcentagem das fibras

do tipo I e aumento da frequência das fibras do tipo IIa, na hipertrofia cardíaca (após 18 semanas) e na insuficiência cardíaca (após 28 semanas). Entretanto, a atrofia das fibras do tipo IIa ocorreu somente durante a insuficiência cardíaca.

Recentemente, DAMATTO et al. (2012) relataram, pela primeira vez na literatura, mudanças nas isoformas de MHC e atrofia do músculo sóleo induzida pela insuficiência cardíaca em SHR. Foi observado o quadro de insuficiência cardíaca em SHR por volta dos 18 meses de idade e as alterações musculares foram associadas aos fatores de regulação miogênica e expressão de miostatina e follistatina.

Diversos estudos da literatura mostram o efeito benéfico do TF na correção da atrofia muscular e mudanças dos tipos de fibras em animais com insuficiência cardíaca por diversas etiológicas, tais como, infarto do miocárdio, transgênicos com hiperatividade simpática e estenose aórtica (BACURAU et al., 2009, CUNHA et al., 2012; MOREIRA et al., 2013; SOUZA et al., 2014, BRUM et al., 2014), entretanto nenhum estudo até o momento reporta os efeitos do TF sobre estas alterações em animais com disfunção cardíaca de etiologia hipertensiva como os SHR.

O remodelamento do músculo esquelético é um processo dinâmico e responsivo a sinais extracelulares mediados pelo TF, atividade neural, hormônios, fatores de crescimento e citocinas. O aumento da massa muscular é entendido como balanço positivo entre a síntese e a degradação protéica, realizado pela coordenação integrada da complexa rede de vias de sinalização intracelular. Estudos empregando animais transgênicos com deleção ou superexpressão de agentes hipertróficos contribuem, sobremaneira, para a investigação destas vias reguladoras do trofismo muscular; entretanto, ainda existe muito a ser compreendido a respeito (SCHIAFFINO et al., 2013).

4.3.1 Síntese protéica muscular esquelética via IGF-I/ Akt/ mTOR

Nos últimos anos, um grande número de estudos tem mostrado que algumas doenças, tais como, câncer, diabetes, AIDS e DCV (LECKER et al., 1999; TISDALE, 2005), e condições ambientais não favoráveis, como a imobilização e jejum podem levar à redução da massa muscular esquelética, conhecida como atrofia muscular (BODINE et al., 2001, SCHIAFFINO et al., 2013). Em contraste, o TF (resistido, aeróbio ou intervalado) pode induzir um aumento da massa muscular

esquelética, conhecida como hipertrofia muscular (FRY, 2004). Tais interações sugerem que a dinâmica na regulação da massa muscular esquelética compreende um balanço entre a síntese e a degradação protéica, um processo finamente regulado.

Os avanços científicos na área molecular favoreceram o entendimento das vias de sinalização intracelular responsáveis pela regulação trófica da musculatura esquelética, bem como suas adaptações a diferentes tipos de TF; assim, diversos estudos têm sido publicados abordando este tema com elevada riqueza de detalhes (GOLDSPINK, 2003; RENNIE et al., 2004; GLASS, 2003, 2005; NADER, 2005; BASSEL-DUBY & OLSO, 2003, 2006; BACURAU et al., 2009, CUNHA et al., 2012; MOREIRA et al., 2013; SOUZA et al., 2014).

A síntese protéica é regulada em muitos níveis e envolve vários mecanismos de sinalização intracelular. Entre os mecanismos intracelulares que controlam a síntese protéica, a via sinalizada pelo fator de crescimento similar a insulina (IGF-I), originado de fontes autócrinas e/ou parácrinas, promove ação anabólica e anticatabólica por se ligar ao seu receptor tirosina quinase IGF-IR, desencadeando a ativação de quinases intracelulares como a Akt (FIGURA 3) (GOLDSPINK, 2003; PARKINGTON et al., 2004; GLASS, 2005; NADER, 2005; ATHERSON et al., 2005; BODINE, 2006; LÉGER et al., 2006b; FUJITA et al., 2007).

A família da Akt é composta por três membros: Akt1 (PKB- α), Akt2 (PKB- β) e Akt3 (PKB- γ). Estas três isoformas compartilham mais de 80% de homologia e são expressas de maneira específica nos tecidos; assim, as isoformas Akt1 e Akt2 são predominantemente expressas no músculo-esquelético, cérebro, coração e pulmão e a isoforma Akt3 é predominante no cérebro e testículo (COFFER & WOODGETT, 1991; JONES et al., 1991).

A fosforilação e ativação da Akt são conhecidas por uma variedade de estímulos, como fatores de crescimento (DATTA et al., 1999), citocinas e hormônios, de maneira dependente da fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) (FRANKE et al., 1995), sugerindo um importante papel da Akt na função mitogênica celular. De fato, estudos genéticos com camundongos *knockout* para o gene Akt1 (Akt1^{-/-}) mostram deficiência no crescimento muscular (CHO et al., 2001) e camundongos que superexpressam Akt1 resultam num fenótipo hipertrófico, caracterizado com aumento do tamanho tecidual (MATSUI et al., 2002). Especificamente no músculo

esquelético, a expressão da isoforma ativa de Akt1 resulta na hipertrofia de miotúbulos *in vitro* (ROMMEL et al., 2001) bem como em ratos *in vivo*, além de prevenir atrofia de músculos denervados (BODINE et al., 2001).

Estudos mostram que o TF resistido, tanto agudo quanto crônico, é capaz de ativar a Akt (LÉGER et al., 2006b; ATHERTON et al., 2005; BOLSTER et al., 2003; NADER & ELSER, 2001). Vale ressaltar que esta via de sinalização também é uma via chave na hipertrofia cardíaca fisiológica de camundongos submetidos ao TF aeróbio (McMULLEN et al., 2003).

O TF, como já bem estabelecido, corresponde a um potente agente trófico para a musculatura esquelética, o qual aumenta os níveis locais de IGF-I. Segundo ATHERSON et al. (2005), o TF aumenta a produção de IGF-I, conduzindo para uma cascata de ativação seqüencial, ordenada por PI3K, PDK1 e 2 (quinase dependente de fosfoinosítídeos-1 e 2) e Akt. Em seguida, Akt promove ativação de duas vias independentes como mTOR (*mammalian target of rapamycin*) e GSK-3 β (glicogênio sintase quinase-3 β), direcionadas para o controle do trofismo muscular esquelético (FIGURA 3). Estas vias de sinalização intracelular também foram descritas por outros autores em detrimento aos efeitos do TF (HERNANDEZ et al., 2000; BOLSTER et al., 2003; PARKINGTON et al., 2004; LEGER et al., 2006b).

A PI3K é uma enzima amplamente expressa cuja atividade enzimática primária é a fosforilação de fosfatidilinositol (PI-fosfolipídeos de membrana) na posição D3 do grupo inositol. A família PI3K medeia uma gama de efeitos biológicos por meio da ação de segundos mensageiros por ela gerados, os PI fosforilados na posição D3, que se ligam as moléculas que possuem domínios PH (*Pleckstrin Homology*), recrutando-as para a membrana (CANTRELL, 2001).

A ativação da Akt é um processo que envolve várias etapas e proteínas adicionais. A ativação e translocação da PI3K por IGF-I induzida pelo TF promove a fosforilação do fosfatidilinositol 2 fosfato (PIP2) em fosfatidilinositol 3 fosfato (PIP3), que leva a translocação da Akt para a membrana e uma modificação conformacional que permite que a PDK1 e a PDK2 fosforilem os resíduos Ser473 e Thr308, ativando totalmente a Akt (CHAN & TSICHLIS, 2001; ALESSI et al., 1996). Sugere-se que o resíduo Thr308 seja fosforilado pela PDK1 e o resíduo Ser473 pela própria Akt, outras quinases ou pela PDK2 (CHAN & TSICHLIS, 2001). A proteína PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) é conhecida como um regulador negativo da via

de Akt, porque ela desfosforila substratos de fosfatidilinositol, especificamente PIP3, resultando em PIP2, o que inibe a via de sinalização de Akt (SONG et al., 2012).

Uma vez ativada, Akt fosforila uma seqüência de substratos, incluindo mTOR no resíduo Ser2448 e GSK-3 β no resíduo Ser9, que regulam a síntese protéica, transcrição gênica e proliferação celular (GLASS, 2003).

Estudos mostram que a mTOR atua na tradução global de proteínas, visto que três dos alvos conhecidos da mTOR - p70S6k (*p70 ribosomal S6 kinase*), 4E-BP1 (*eukaryotic initiation fator 4E [eIF4E] binding protein 1*) e o eEF2 (*eukaryotic elongation fator 2*)- contribuem para a tradução protéica, por meio da facilitação do início deste processo e pela biogênese dos ribossomos. A fosforilação do polipeptídeo ribossômico S6 induz, por um mecanismo desconhecido, na tradução do 5'TOP (*5'-terminal oligopyrimidine sequence*) mRNA, uma região contendo seqüências de oligo-pirimidinas na região 5' UTR (*5' untranslated region - 5' UTR*) adjacente ao CAP (m7GpppG). O 5'TOP mRNA codifica componentes da maquinaria de tradução, tais como, fatores de elongação, proteínas ribossomal e proteínas ligadas a poli (A) e, portanto, desempenha um papel chave na modulação da eficiência de tradução. De maneira mais direta, a mTOR fosforila a proteína 4E-BP1 liberando o fator da iniciação de tradução eIF4E, impedindo que este iniba o início da tradução protéica por meio do acoplamento com a extremidade CAP dos mRNAs. Uma vez liberado, eIF4E uni-se ao eIF4G e ao eIF4A formando o complexo eiF4F, o que contribui para a continuação da etapa da tradução do mRNA em proteína. Além disso, mTOR sinaliza para p70S6K inibir eEF2K, a qual reduz a fosforilação sobre eEF2 direcionando para o processo de alongamento muscular (WANG & PROUD, 2006; FUJITA et al., 2007).

A Akt, por uma via de síntese protéica independente de mTOR, fosforila GSK-3 β na Ser9, promovendo a sua inibição no músculo esquelético (CROSS et al., 1995). A GSK-3 tem como seu substrato a glicogênio sintetase, uma enzima que regula a síntese de glicogênio. Uma vez fosforilada por Akt, GSK-3 β se torna inibida, favorecendo a síntese de glicogênio. O eiF2B (*eukaryotic translation initiation fator 2B*) é alvo do GSK-3 β , inibindo sua atividade em favor do catabolismo protéico. Por outro lado, GSK-3 β inativa, ou seja, fosforilada, promove uma redução na fosforilação da eiF2B na Ser535, promovendo o início da tradução (VYAS et al., 2002).

Estudos têm mostrado que a depleção do ATP celular pode regular mTOR mediada pela via da fosforilação da proteína quinase ativada por AMP (*adenosine monophosphate-activated protein kinase-AMPK*), fosforilando diretamente TSC2 (*tuberous sclerosis complex 2*), o que induz a inibição da mTOR. Sabe-se que AMPK pode ser ativada em situações de estresse energético, tais como exercício, hipóxia e hipoglicemia, inibindo vias de síntese e estimulando a de degradação protéica para a manutenção da homeostase energética (ATHERSON et al., 2005).

A progressão e o desenvolvimento da atrofia muscular se deve por uma inibição da via de síntese protéica podendo ser suplantada pelo aumento da via de degradação protéica (SCHIAFFINO et al., 2013).

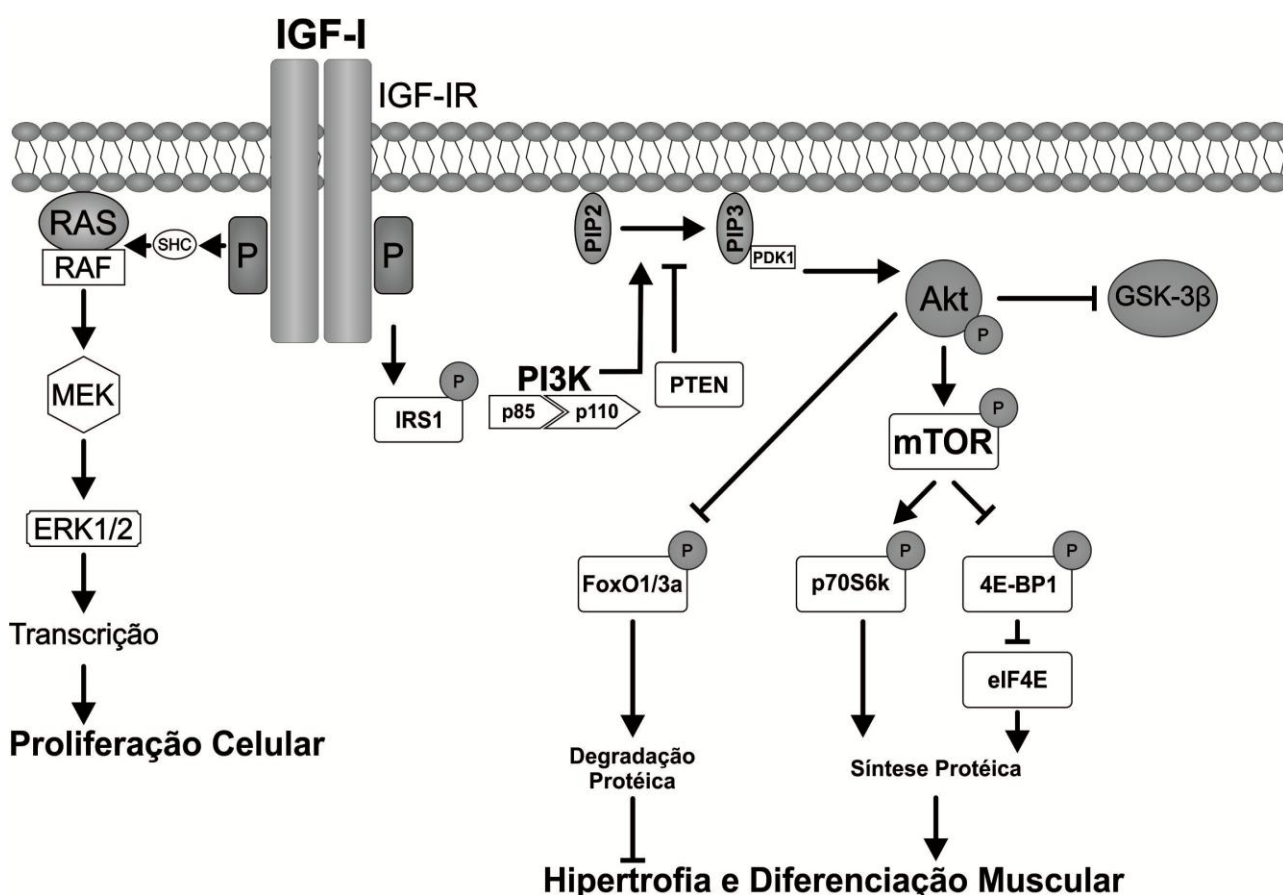


FIGURA 3 – Esquema representativo da via de sinalização mediada por IGF-I na regulação da massa muscular. O IGF-I ao ligar no seu receptor IGF-IR ativa duas principais vias: MAPK que permite a proliferação celular por meio da ativação de ERK1/2 e a da PI3K/ Akt/ mTOR que promove a diferenciação celular e hipertrofia por meio da ativação de síntese protéica muscular e inibição da proteólise muscular.

4.3.2 Degradação protéica muscular esquelética

Uma importante ação da Akt no controle do trofismo muscular esquelético se deve a regulação da transcrição gênica via inativação de FoxO (Fatores de Transcrição da Forquilha), também conhecido por FKHR, um fator de transcrição responsável pela transativação de genes envolvidos com componentes do sistema proteolítico coordenado pelo sistema ubiquitina-proteossoma (FIGURA 3) (BIRKENKAMP & COFFER, 2003, VAN DER HEIDE, et al., 2004).

Três isoformas da FoxO têm sido amplamente investigadas e relativamente bem caracterizadas, a FoxO1, FoxO3a e FoxO4 (BIGGS et al., 2001). As isoformas FoxO são predominantemente localizadas no compartimento nuclear onde estão expressas na forma ativa, porém, quando fosforiladas nos resíduos Thr24 e Ser256 para FoxO1 e Thr32 e Ser193 para FoxO3a, principalmente pela Akt1, as proteínas FoxO são seqüestradas para o citosol ligando-se a proteína 14-3-3, onde são incapazes de transcrever genes envolvidos no processo de atrofia muscular. Portanto, em situações de atrofia muscular, a diminuição da via de sinalização da Akt permite a transcrição da MAFbx/ atrogin-1 (*atrophy gene-1*) e MuRF1 (*muscle ring finger 1*), dois específicos componentes das E3 ligases (BODINE et al., 2001; SANDRI et al., 2004; STITT et al., 2004; LATRES et al., 2005). O sistema ubiquitina-proteossoma é conhecido como sendo o principal mecanismo de degradação protéica em estado atrófico (LECKER et al., 1999, CUNHA et al., 2012; GIELEN et al., 2012). Estas E3 ligases aumentam muito sua expressão na atrofia muscular induzida por DCV, como a insuficiência cardíaca (CUNHA et al., 2012; GIELEN et al., 2012; SOUZA et al., 2014; BRUM et al., 2014). Além disso, estudos tem mostrado que MAFbx/ atrogin-1 pode inibir a tradução de proteínas por degradar, via sistema ubiquitina-proteossoma, o eIF3f, impedindo a sinalização mTOR-p70S6k (SANCHEZ et al., 2013).

Curiosamente, tem sido demonstrado em modelos de animais atróficos que o aumento da expressão de MuRF1 pode ser mediado por NF-kB, e a regulação positiva de MAFbx/ atrogin-1 mediada por p38 MAPK, sendo independente da via de sinalização Akt/ FoxO (ZHANG & LI, 2012).

Portanto, com base na literatura apresentada, muito se tem esclarecido sobre os mecanismos envolvidos na regulação da massa muscular esquelética, entretanto, as vias de sinalização envolvidas na alteração da massa muscular pela

HA são desconhecidas. É possível observar que a sinalização da Akt é capaz de sincronizar vias anabólicas e catabólicas, tornando-se uma proteína alvo no âmbito terapêutico.

Apesar desse importante papel do exercício na prevenção e no tratamento da HA, os mecanismos envolvidos nestas alterações vasculares e musculares também não são totalmente compreendidos. Além disso, muitos aspectos do desenvolvimento da HA no nível molecular ainda são desconhecidos. O advento do perfil transcricional usando *microarrays* de RNAs mensageiros (mRNA) e RNA-seq (*RNA sequencing*) tem rendido importantes *insights* sobre a função dos diferentes tecidos, assim como a identificação de marcadores sistêmicos sob diversas condições patológicas. Porém, na última década, as atenções dos pesquisadores tem se voltado, principalmente, para outros tipos de mecanismos de regulação gênica em DCV: os mecanismos pós-transcricionais. A descoberta de pequenos RNAs, incluindo miRNAs e a utilização de pequenos RNA de interferência (siRNA), proporcionaram um avanço científico e técnico para a genética em sistemas biológicos.

Dessa forma, a análise de miRNAs tem possibilitado o entendimento do desenvolvimento de diversas DCV e a elucidação desses processos regulados por miRNAs e identificação de novos alvos de miRNA na patogênese da doença é uma estratégia muito valiosa tanto para prevenção quanto para o tratamento das DCV.

4.4 MiRNA

Os miRNAs são moléculas de ácido ribonucleico (RNA) de fita simples, com um tamanho de aproximadamente 22 nucleotídeos, não codificadores de proteínas, atuando principalmente na repressão da tradução de proteínas em plantas e animais (KIM, 2005; GUO et al., 2010). Estudos de bioinformática mostram que um terço de todos os genes codificadores de proteína e, essencialmente, todas as vias biológicas estão sob o controle de miRNAs (HARTMANN & THUM, 2011). Dessa forma, não é surpreendente que esta classe de pequenos RNAs desempenhe papéis na progressão da doença vascular e muscular esquelética.

O lin-4 (do inglês *lineage-deficient-4*) foi descoberto em 1993 como o primeiro miRNA, sendo nesta época associado à regulação do desenvolvimento larval em *Caenorhabditis elegans* (nematódes) (LEE et al., 1993). Mais tarde, foi

demonstrado que o lin-4 atuava no nível pós-transcricional e apresentava complementaridade parcial com a região 3'-UTR (região não traduzida) do mRNA da proteína lin-14 (LAU et al., 2001; AMBROS, 2004). O segundo miRNA, denominado let-7, foi descoberto somente 7 anos após a descrição do lin-4. Verificou-se então que o let-7 também atuava no nível pós-transcricional e apresentava complementaridade parcial com a região 3'-UTR do mRNA da proteína lin-41 (REINHART et al., 2000; LEE & AMBROS, 2001). Essa descoberta possibilitou o levantamento da hipótese de que pequenos RNAs pudessem estar presentes e desempenhar funções similares em outras espécies, além dos nematódeos. Foi constatado que lin-7 e lin-41 são evolutivamente conservados em metazoários, com homólogos que foram prontamente detectados em moluscos, ouriços do mar, moscas, camundongos e humanos. Essa conservação evolutiva fortemente indicou um papel mais geral de pequenos RNAs na regulação desenvolvimental, o que abriu perspectivas para a descoberta de novos miRNAs e de outros processos biológicos que incluíam seu mecanismo de regulação (PASQUINELLI et al., 2000).

A partir de então, novos miRNAs foram descobertos e hoje já existem mais de 35.000 sequências de miRNAs maduros, de mais de 220 tipos de organismos diferentes, catalogados no banco de dados de bioinformática (miRBase) (URBICH, KUEHBACHER & DIMMELER 2008; KINGWELL, 2011). Até o início de 2014, de acordo com o site do miRBase 21.0, identificou-se mais de 2.500 miRNAs na espécie humana comparado aos mais de 1.900 em camundongos e 700 em ratos, indicando que o número de miRNAs parece correlacionar à maior complexidade do organismo (LIU et al., 2012). Dessa forma, é possível que este número seja muito maior, e que esta classe seja uma das maiores reguladoras gênicas endógenas encontradas até hoje (OLENA & PATTON, 2009).

Em humanos, aproximadamente um terço dos miRNAs são organizados em clusters. É provável que um dado cluster seja uma única unidade transcricional, sugerindo uma regulação coordenada de miRNAs em cluster. Análise *in silico*, revelou que mais da metade dos clusters contêm duas ou mais sequências de miRNAs semelhantes. No entanto, é muito raro miRNAs que apresentem sequências idênticas quando maduro serem repetidos em um cluster. Esta organização genômica confere expressão simultânea de miRNAs semelhante, possivelmente levando a diversidade combinatória e sinergia dos efeitos biológicos. No entanto,

todos os miRNAs derivados de um mesmo cluster não são expressos em níveis iguais, sugerindo que os miRNAs são regulados também em nível pós-transcricional. Além disso, uma parcela significativa de miRNAs estão localizados na região intrônicas de genes codificadores de proteínas, podendo atuar de forma sinérgica a esta (LEE & DUTTA, 2009).

Os miRNAs exercem seus efeitos regulatórios ligando-se à região 3'-UTR de mRNAs alvo. Este mecanismo de atuação permite a redução dos níveis protéicos de seus genes alvo, raramente afetando o nível de expressão transcricional (KIM, 2005).

A regulação pós-transcricional exercida pelos miRNAs na região 3' UTR depende do grau de complementaridade com o mRNA alvo, podendo ocorrer por inibição da tradução ou degradação do mRNA. O pareamento de modo imperfeito com o mRNA acarreta a inibição da tradução do alvo, sendo o principal mecanismo de atuação dos miRNAs em mamíferos. Em função dos miRNAs possuírem seqüências pequenas e agirem sem a necessidade de pareamento completo, um único miRNA pode regular muitos mRNAs alvo, além de cooperarem no controle de um único mRNA (BRENNECKE et al., 2005, GUO et al., 2010). Alguns estudos indicam que um miRNA possa regular 200 mRNAs apresentando funções totalmente diversas. Desta forma, os miRNAs constituem uma enorme e complexa rede regulatória da sinalização celular. Em plantas, a regulação dos miRNAs ocorre principalmente por meio de sua interação perfeita com o mRNA, levando-o à sua degradação (mecanismo de siRNA). No entanto, já se têm exemplos da ocorrência deste tipo de silenciamento gênico também em mamíferos (HAMMOND, 2005, VALENCIA-SANCHES et al., 2006; GUO et al., 2010).

Estudos recentes do transcriptoma e de bioinformática sugerem a existência de milhares de outros tipos de RNAs não codificadores de proteína, porém o número deles codificados dentro do genoma humano é desconhecido. Diferentemente do miRNA, muitos dos RNAs não codificadores recentemente identificados não foram validados para a sua função; é possível que muitos não sejam funcionais (HANGAUER et al., 2013). Os RNAs longos não codificantes (lncRNAs) fazem parte dos RNAs não codificadores que interagem com as principais vias de crescimento celular, proliferação, diferenciação e sobrevivência. Recentemente descoberto, os lncRNAs têm sido descritos por regularem a

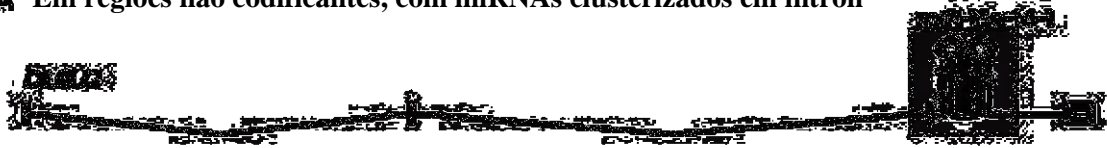
expressão de gene, e pode agir como esponjas de miRNA para reduzir os níveis de miRNA (HANSEN, et al., 2013; WANG et al., 2014). Assim, o entendimento dos mecanismos regulados por diferentes RNAs não codificantes revelam uma área promissora de investigação que podem contribuir futuramente para o entendimento dos processos moleculares induzido por condições fisiológicas e patológicas.

4.4.1 Localização

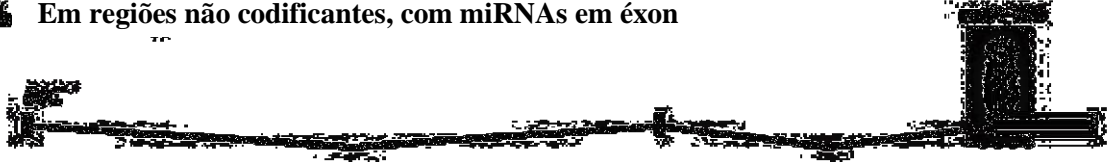
Os miRNAs em mamíferos são expressos a partir de diversas regiões do genoma, podendo estar presentes em regiões intergênicas, em íntrons codificadores e em éxons de regiões codificadoras e não codificadoras (FIGURA 4) (OLENA & PATTON, 2009).

Além disso, aproximadamente 50% dos miRNAs encontrados em mamíferos são localizados em estreita proximidade com outros miRNAs, e são chamados de clusters (MUKHERJI et al., 2011). Esses aglomerados são transcritos a partir de uma única unidade transcricional, forma também conhecida como policistrônica (THUM et al., 2010). Não obstante, há miRNAs que podem ser transcritos a partir de promotores separados, sugerindo que estes possuam suas próprias unidades de transcrição (MONTGOMERY & VAN ROOIJ, 2010). Alguns miRNAs são gerados a partir de regiões que não são codificantes, ao passo que outros são (OLENA & PATTON, 2009). Aproximadamente 40% dos *loci* de miRNAs estão localizados em regiões intrônicas, não codificantes, enquanto aproximadamente 10% são encontrados em região exônica não codificantes (MUKHERJI et al., 2011). Alguns miRNAs podem ser classificados como intrônicos ou exônicos dependendo dos padrões de splicing alternativo que seus genes hospedeiros são submetidos (VASUDEVAN et al., 2007).

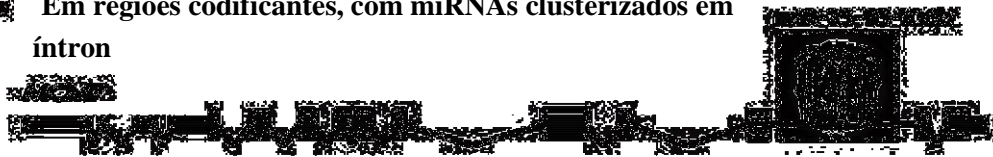
■ Em regiões não codificantes, com miRNAs clusterizados em íntron



■ Em regiões não codificantes, com miRNAs em éxon



■ Em regiões codificantes, com miRNAs clusterizados em íntron



■ Em regiões codificantes, com miRNA em éxon

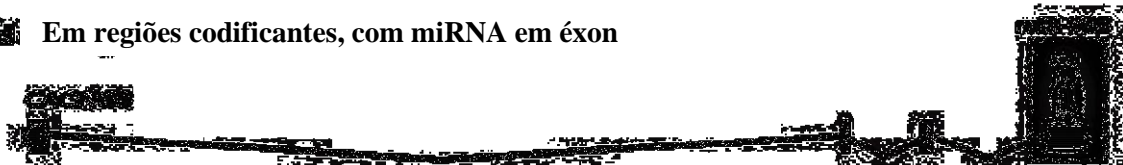


FIGURA 4 – Localizações genômicas dos miRNAs (Adaptado de KIM et al., 2009).

4.4.2 Biogênese e mecanismo de ação

A maioria dos miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II gerando um transcrito primário chamado pri-miRNA (CZECH & HANNON, 2011). Esses miRNAs primários, foram transcritos como se fossem um gene codificador de proteínas, por isso apresentam a estrutura cap 5' e a cauda de poli (A) (WILLIAMS et al., 2009). A geração do miRNA maduro é precedida de eventos de clivagens realizados por complexos enzimáticos (HE & HANNON, 2004).

O processo de formação dos miRNAs tem início a partir do pri-miRNA, o qual apresenta uma estrutura de dupla hélice do tipo *hairpin* (~300 nucleotídeos), sendo processado no núcleo por uma ribonuclease do tipo III denominada Drosha, e seu cofator DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*). A molécula resultante do processamento da Drosha é denominada de precursor do miRNA (pré-miRNA), o qual é exportado do núcleo para o citoplasma pela exportina 5, uma proteína de exportação nuclear dependente de Ran-GTP como cofator. No citoplasma, o pré-miRNA sofre a ação de outra ribonuclease do tipo III denominada

Dicer e dá origem a um pequeno e imperfeito duplex (dupla fita) de RNA que contém tanto a fita de miRNA maduro quanto sua fita anti-sense (KIM, 2005; OLENA & PATTON, 2009; THUM & VAN ROOIJ, 2010; KINGWELL, 2011).

O produto da Dicer é incorporado por um complexo multimérico denominado RISC (*RNA-induced silence complex*), o qual contém proteínas da família Argonauta como principais componentes de atuação na catálise a qual realiza (CZECH & HANNON, 2011). Apenas uma das fitas do duplex de miRNA permanece no complexo RISC para controlar a expressão pós-transcricional de genes alvos. Geralmente a parte do duplex com menor estabilidade será selecionada para ser elemento do complexo RISC (KHVOROVA et al., 2003; SCHWARZ et al., 2003; VASQUES et al., 2012). A quantidade expressa do miRNA pode ser controlada na transcrição do pri-miRNA, nos passos da biogênese, e também no *turnover* do miRNA maduro (SCHWARZ et al., 2008).

A expressão endógena dos genes pode ser regulada de duas formas pelos miRNAs maduros. A primeira é pela clivagem ou degradação total do miRNA com o seu mRNA induzida pelo pareamento perfeito dos nucleotídeos do miRNA com seu mRNA alvo (RHOADES et al., 2002). A segunda forma de regulação, mais comum em animais, ocorre por intermédio de repressão traducional, por complementariedade parcial (DOENCH & SHARP, 2004). Nesse tipo de regulação há apenas total complementariedade com o mRNA alvo de uma região do miRNA que abrange do segundo ao oitavo nucleotídeos. Essa sequência é denominada como região *seed*, ou semente, e é responsável pela especificidade do miRNA (LEWIS et al., 2005; VASQUES et al., 2012). Os animais possuem regiões de complementariedade ao *seed* em regiões 3' UTR dos seus mRNA alvos sendo essa região do mRNA preferencial para o acoplamento dos miRNAs e a efetivação do seu mecanismo de ação de regulação negativa (LAU et al., 2001; VASQUES et al., 2012). O miRNA maduro de fita simples, incorporado ao complexo protéico RISC, direciona o miRNA para a região de complementariedade na região 3'-UTR do mRNA alvo, para efetuar a regulação negativa da expressão de genes por repressão traducional (SCHWARZ et al., 2008) (FIGURA 5).

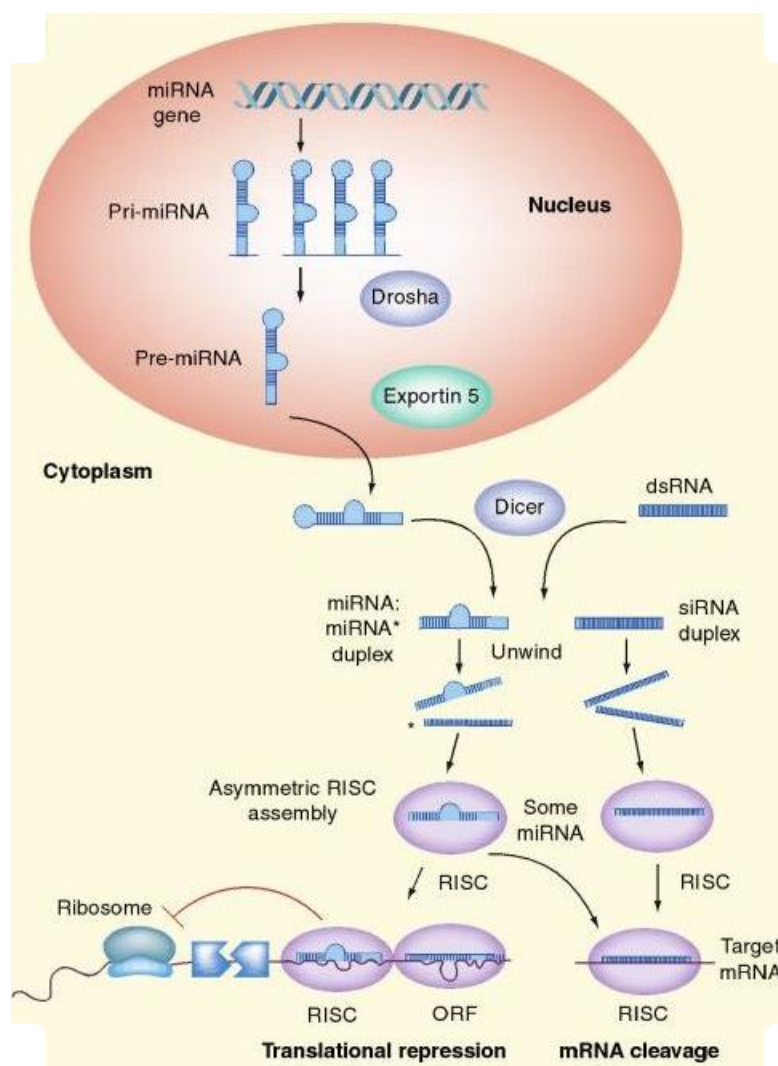


FIGURA 5 – Biogênese dos miRNAs e seu mecanismo de ação (HE & HANNON, 2004).

4.4.3 MiRNA e angiogênese

MiRNAs específicos regulam a função das células endoteliais, sendo que estes miRNAs estão envolvidos principalmente com a regulação dos processos de apoptose, angiogênese e inflamação vascular (URBICH et al., 2008; SUÁREZ & SESSA, 2009; QUINTAVALLE et al., 2011).

A importância dos miRNAs em células endoteliais foi demonstrado por meio de estudos com modelo *knockout* para Dicer, o qual demonstrou que a presença desta enzima é necessária para a angiogênese embrionária e o desenvolvimento normal do camundongo (YANG et al., 2005). Em analogia, o

modelo *knockdown* para a enzima Dicer resultou em reduzida proliferação da célula endotelial e formação vascular (SUÁREZ et al., 2007). Além disso, o modelo *knockdown* de ambas Dicer e Drosha resultou em prejuízo no desenvolvimento capilar e na formação de tubos das células endoteliais (KUEHBACHER et al., 2007). Dessa forma, os resultados demonstram o papel determinante dos miRNAs sobre a regulação da célula endotelial e angiogênese pós natal via seu processamento pelas enzimas Drosha e Dicer.

O perfil de expressão de miRNAs em células endoteliais foi documentado e vários miRNAs altamente expressos foram relacionados com fatores pró e anti-angiogênicos (miRNAs pro-angiogênicos-17-92 cluster, -23/-27, -126, -130a, -210, -296, -378 e let-7f; miRNAs anti-angiogênicos -15b, -16, -20, -21, 92a, -221, -222, e -328) (FIGURA 6) (POLISENO et al., 2006; URBICH et al., 2008; SUÁREZ & SESSA, 2009; QUINTAVALLE et al., 2011), de acordo com a previsão dos mRNAs alvo pelos algoritmos. Entretanto, alvos específicos validados e funções nas células endoteliais relacionadas com a angiogênese, inflamação, apoptose e função vascular têm sido caracterizadas por apenas alguns destes miRNAs. Entre os miRNAs envolvidos nestes processos, os miRNAs-16, -21, -126, -155, -221 e -222 tem papel de destaque (WANG et al., 2008; URBICH et al., 2008; SUÁREZ & SESSA, 2009; SEM et al., 2009; WEBER et al., 2010; QUINTAVALLE et al., 2011; CHAMORRO-JORGANES ET AL., 2011; SUN et al., 2012).

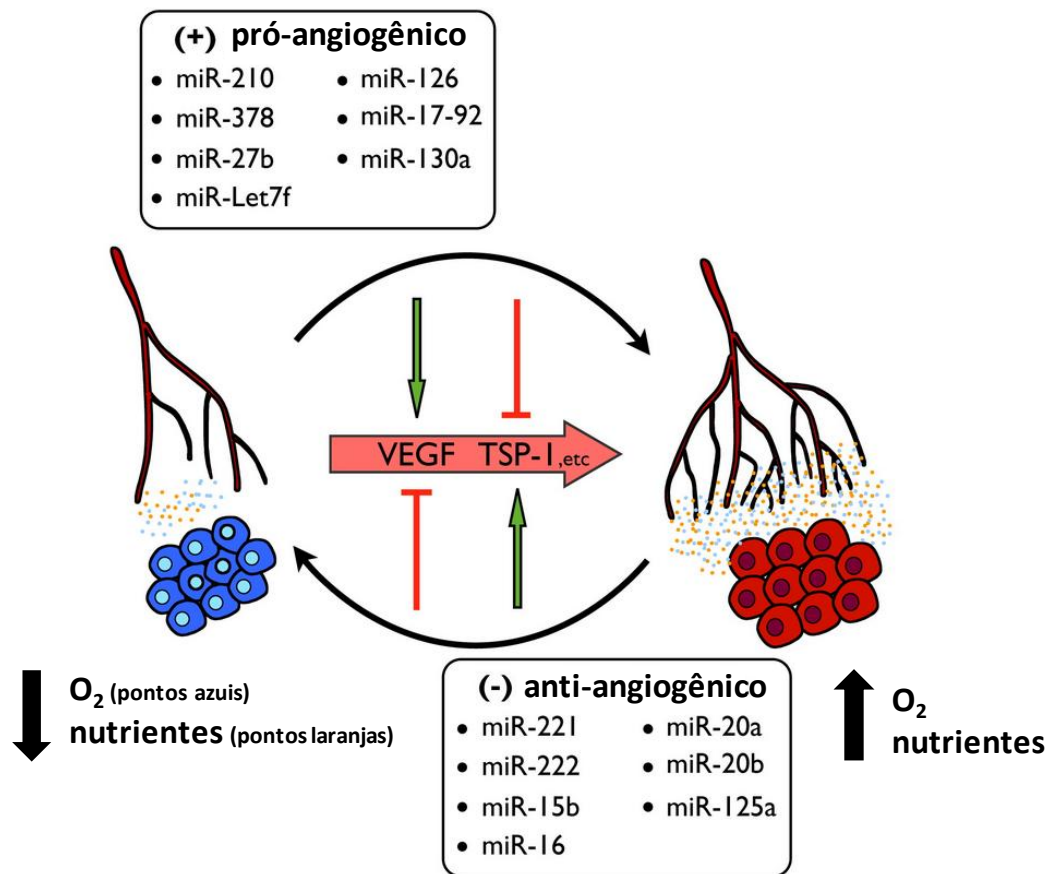


FIGURA 6 – MiRNAs e angiogênese. Vários miRNAs pró-angiogênicos estimulam a angiogênese regulando fatores pró-angiogênicos como o VEGF. Isto resulta em uma maior e acelerada formação de vasos sanguíneos, portanto, em um aumento do suporte de oxigênio (pontos azuis) e nutrientes (pontos laranja), promovendo o metabolismo oxidativo. Inversamente, os miRNAs anti-angiogênicos inibem a formação de vasos através da indução de fatores anti-angiogênicos como a trombospondina-1 (TSP-1) e outras proteínas relacionadas (adaptado de FRAISL et al., 2009).

O miRNA-126 é o único sugerido como sendo especificamente expresso em células endoteliais e células progenitoras hematopoiéticas. Expresso de forma abundante, o miRNA-126 foi descrito por regular a migração de células inflamatórias, a formação da rede de capilares e a sobrevivência celular envolvido, portanto, na disfunção, inflamação e rarefação vascular em patologias (FISH et al., 2008; STASZEL et al., 2011; NAZARI-JAHANTIGH et al., 2012, Da SILVA Jr et al., 2012). Importantes estudos que utilizaram animais *knockdown* para o miRNA-126

mostraram prejuízo na migração de células endoteliais durante o crescimento dos vasos, ruptura do lúmen vascular, comprometimento na formação do tubo endotelial e processos hemorrágicos (WANG et al., 2008; FISH et al., 2008; STASZEL et al., 2011; NAZARI-JAHANTIGH et al., 2012). As análises ao nível molecular revelaram que o miRNA-126 inibe a proteína relacionada ao brotamento 1 (SPRED1) e a subunidade reguladora 2 do fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIK3R2, também conhecida como p85- β), os quais regulam negativamente a sinalização de VEGF por inibir as vias MAPK e PI3K/ Akt (WANG et al., 2008; FISH et al., 2008; Da SILVA Jr et al., 2012).

Interessantemente, o VEGF e a proteína anti-apoptótica Bcl-2 foram identificados por abordagens de bioinformática e validados como alvos para o miRNA-16 em células endoteliais, mostrando que miméticos deste miRNA promoveu redução na expressão de VEGF e Bcl-2, enquanto que os antagonistas específicos aumentaram sua expressão (URBICH et al., 2008; SUÁREZ & SESSA, 2009; QUINTAVALLE et al., 2011; CHAMORRO-JORGANES et al., 2011; SUN et al., 2012). Além disso, estudos mostram que a superexpressão do miRNA-16 promoveu menor proliferação, migração e formação de tubos de células endoteliais *in vitro*, e a superexpressão por lentivírus de miRNA-16 reduziu a capacidade das células endoteliais para formar vasos sanguíneos *in vivo* (CIMMINO et al., 2005; DEJEAN et al., 2011). Corroborando, o miRNA-21 também é um miRNA apoptótico alvejando Bcl-2, sugerindo seu importante papel na regulação da atividade angiogênica intrínseca da célula (URBICH et al., 2008; SUÁREZ & SESSA, 2009; SEM et al., 2009; WEBER et al., 2010; QUINTAVALLE et al., 2011)

Diversos estudos tem mostrado, por meio de predição bioinformática, que os miRNAs- 221 e -222 alvejam a eNOS e o c-kit, um marcador de célula tronco, presente também em células progenitoras endoteliais. (URBICH et al., 2008; SUÁREZ & SESSA, 2009; QUINTAVALLE et al., 2011; BÁTKAI & THUM, 2012). Interessantemente, em recente estudo, foi mostrado que o miRNA-155 é um regulador essencial da expressão da eNOS e da vasodilatação dependente do endotélio. Eles sugerem que a inibição do miRNA-155 possa ser uma nova abordagem terapêutica para melhorar a disfunção endotelial durante o desenvolvimento de DCV (SUN et al., 2012). Entretanto, a expressão de miRNAs e sua regulação na fisiologia vascular e em DCV são pouco conhecidas.

Além da participação de miRNAs no controle da célula endotelial, alguns miRNAs foram descritos por regularem o fenótipo das células do músculo liso vascular (CMLV). Entre eles podemos destacar os miRNAs-1, -133a, -10a, -21, -143/145, -100, -204 e let-7d (BOETTGER et al., 2009; ALBINSSON et al., 2010; NAZARI-JAHANTIGH et al., 2012). Evidências de que os miRNAs também são essenciais para o desenvolvimento, diferenciação e função contrátil das CMLV foram demonstradas pelo modelo *knockout* para Dicer, apresentando remodelamento hipotrófico e alteração na organização da lâmina elástica de aorta, perda da função contrátil da artéria umbilical, bem como a redução da expressão de genes específicos das CMLV (ALBINSSON et al., 2010). Curiosamente, o cluster de miRNAs-143/145 é requerido para a manutenção do fenótipo contrátil das CMLV, para a contratilidade normal das artérias, e para o controle da PA (BOETTGER et al., 2009; NAZARI-JAHANTIGH et al., 2012).

Embora o tema seja inquietante e com grande perspectiva no entendimento molecular de diversas DCV, poucos são os estudos com a temática HA, sendo que estudos avaliando miRNAs pró e/ou anti-angiogênicos em SHR são desconhecidos. Com base na descrição dos estudos citados, diversas evidências sugerem que a ação de específicos miRNAs são muito importantes para a manutenção da homeostase microvascular, uma vez que estão envolvidos especificamente na regulação de diversos processos celulares como proliferação, diferenciação, migração celular, inflamação e apoptose podendo, portanto, contribuir para a disfunção endotelial, reduzida capacidade angiogênica e o remodelamento vascular amplamente observados na HA (BÁTKAI & THUM, 2012; DANGWAL et al., 2012; THUM, 2012, NAZARI-JAHANTIGH et al., 2012).

Oligonucleotídeos conhecidos como anti-miRs têm sido desenvolvidos para silenciar miRNAs endógenos específicos, de modo que administração sistêmica por via intravenosa destes oligonucleotídeos tem mostrado eficácia na inibição de miRNAs alvos em vários tipos de tecidos. Por outro lado, miRNAs com diminuída expressão em tecidos afetados por patologias, uma possível estratégia terapêutica é aumentar os níveis destes por meio da introdução de miR-mímicos (OOI et al., 2014). Embora grandes avanços tenham sido feitos no tratamento farmacológico via inibição ou superexpressão de miRNAs em DCV, anti-miRs e miR-mímicos ainda

não foram utilizados para o tratamento da HA, assim como o tratamento não farmacológico induzido pelo TF na normalização de miRNAs envolvidas na HA.

4.4.4 MiRNA e músculo esquelético

O desenvolvimento do músculo cardíaco e esquelético é orquestrado por redes evolutivamente conservadas de fatores de transcrição que regulam a expressão de genes envolvidos no crescimento, diferenciação e contratilidade muscular (WILLIAMS et al., 2009). Estudos recentes revelaram que, além de ativar os genes envolvidos na diferenciação e contração muscular, estes fatores de transcrição miogênico ativam a expressão de um conjunto de miRNAs com a função de "ajustar" a saída dessas redes de transcrição, resultando em respostas celulares precisas para os sinais de desenvolvimento, fisiologia e patologia. A integração destes pequenos RNAs no programa transcricional muscular expande ainda mais a precisão e a complexidade da regulação de genes nas células musculares, uma vez que miRNAs são capazes de regular vários mRNAs e mRNAs podem ser alvo de muitos miRNAs (RAO et al., 2006; ZHAO et al., 2007; WILLIAMS et al., 2009).

Os miRNAs-1, -133a e b, -206, -208b e -499 são específicos do músculo e tem sido estudados por contribuírem para o desenvolvimento muscular. Curiosamente, estes miRNAs chegam a representar 25% dos miRNAs expressos no músculo esquelético; reconhecidos por controlarem o crescimento, a diferenciação e a contratilidade muscular (CHEN et al., 2006; CALLIS et al., 2007; CHEN et al., 2010; KOUTSOULIDOU et al., 2011; LIU et al., 2012).

Os miRNAs-1 e -133 são expressos no músculo cardíaco e esquelético e são regulados transcricionalmente pelos fatores de regulação miogênica, tais como, MyoD, miogenina, Mef2 e SRF (*serum response factor*) (RAO et al., 2006; CHEN et al., 2006; CHEN et al., 2010). O miRNA-1 promove a diferenciação de células progenitoras cardíacas e esqueléticas com sua saída do ciclo celular em mamíferos (ZHAO et al., 2007), enquanto o miRNA-133 inibe sua diferenciação mantendo as células em estado proliferativo (CHEN et al., 2006).

O aumento na expressão do miRNA-1 no músculo esquelético de camundongos após 3 horas de uma única sessão de exercício físico aeróbio foi observado por SAFDAR et al. (2009). Este aumento foi associado à redução na expressão do seu alvo histona deacetilase 4 (HDAC4), um repressor transcricional

da expressão gênica muscular, assim como pelo aumento dos fatores de regulação miogênica como MyoD, e desse modo, promoveriam o remodelamento da lesão ocasionado pela sessão de treinamento (SAFDAR et al., 2009; CHEN et al., 2010).

Por outro lado, o efeito crônico do exercício levou a uma diminuição na expressão do miRNA-1 associada a hipertrofia muscular em favorecimento a expressão de genes importantes no crescimento muscular, como, c-Met, HGF e IGF-I (MCCARTHY & ESSER, 2007). Além disso, o treinamento resistido com a ingestão de aminoácidos também diminuiu a expressão do miRNA-1 em homens jovens (DRUMMOND et al., 2008). O IGF-I é um alvo do miRNA-1, o que pode explicar, em parte, o fenótipo hipertrófico durante as respostas iniciais de sobrecarga advindas do TF (MCCARTHY & ESSER, 2007, ELIA et al., 2009).

O miRNA-206 é o único especificamente expresso na musculatura esquelética, e sua expressão parece ser induzida por MyoD e miogenina durante a miogênese, promovendo a diferenciação muscular (MCCARTHY, 2008; CHEN et al., 2010; KOUTSOULIDOU et al., 2011). HDAC4, PAX7 (marcador de célula satélite), MET (codifica o receptor de membrana c-Met, essencial para o desenvolvimento embrionário e cicatrização muscular) e Notch3 são alguns dos genes alvo do miRNA-206 relacionados ao processo de diferenciação muscular. (MCCARTHY, 2008; CHEN et al., 2010; LIU et al., 2012).

O miRNA-128a é altamente expresso no cérebro e músculo esquelético e a sua expressão é aumentada durante a diferenciação de mioblastos (CHEN et al., 2006, 2010). MOTOHASHI et al. (2013) identificaram o substrato 1 do receptor da insulina (IRS1) como um alvo do miRNA-128a. Os autores mostraram que a superexpressão do miRNA-128a reprime a proliferação de mioblastos com uma diminuição do IRS1 e da atividade da Akt. Por outro lado, a inibição do miRNA-128a aumentou o tamanho dos miotubos das células musculares C2C12, com um aumento na expressão protéica de IRS1 e na atividade da Akt. Notavelmente, a administração de *antisense* de miRNA-128a por 4 semanas induziu significativamente a hipertrofia do músculo esquelético em camundongo, sugerido como um regulador negativo contra componentes da via anabólica IGF-I/ Akt.

O miRNA-486 também foi descrito ser expresso no músculo esquelético envolvido na regulação do trofismo muscular. O miRNA-486 participa da regulação da atividade da Akt, visando diretamente a região 3' UTR da PTEN e FoxO1 em

miotubos (SMALL et al., 2010; XU et al., 2012). Além disso, a inibição do miRNA-486 *in vivo* induziu atrofia da fibra muscular (HITACHI et al., 2014). XU et al. (2012) mostraram que o miRNA-486 foi suficiente para impedir a atrofia do músculo esquelético induzido pela doença renal crônica em camundongo.

Esses miRNAs do músculo esquelético também parecem participar de doenças musculares incluindo hipertrofia cardíaca e distrofia muscular, tal como a distrofia muscular de Duchenne (YUASA et al., 2008; CHEN et al., 2010; LIU et al., 2012).

As fibras do músculo esquelético também são caracterizadas pela expressão de isoformas de MHC e outras proteínas contráteis que determinam a eficiência da contração (BASSEL-DUBY & OLSON, 2006). Nas fibras do tipo I de contração lenta e predomínio do metabolismo oxidativo associadas à alta resistência aeróbia, o tipo β -MHC é o predominante, enquanto a fibra do tipo II expressa miosina rápida, de predomínio do metabolismo glicolítico e suscetíveis à fadiga (BASSEL-DUBY & OLSON, 2006). Interessantemente, foi relatado que um íntron do gene α -MHC (*Myh6*) codifica um miRNA, o miRNA-208a, que é necessário para o aumento de β -MHC (*Myh7*) no coração de animais adultos em resposta ao estresse e o hipotireoidismo (VAN ROOIJ et al., 2007). Dado que o miRNA-208a e da sua miosina hospedeira, α -MHC, são apenas expressas no coração, estes resultados levantaram questões interessantes como a que outros miRNAs poderiam controlar o tipo de fibra e o programa gênico de proteínas contráteis em músculo esquelético (VAN ROOIJ et al., 2009).

VAN ROOIJ et al., (2009) mostraram a existência de mais dois miRNAs em genes de MHC. O gene da β -MHC codifica o miRNA-208b, o qual tem uma sequência *seed* idêntica ao do miRNA-208a; e difere dele por apenas 3 nucleotídeos na região 3'. Um terceiro membro dessa família é o miRNA-499, codificado pelo gene *Myh7b*, uma miosina pouco estudada que compartilha grande homologia com o gene β -MHC. Estes dois miRNAs são bastante expressos em músculo com perfil oxidativo, como o sóleo, por apresentam fibras do tipo I com predominância de β -MHC (FIGURA 7).

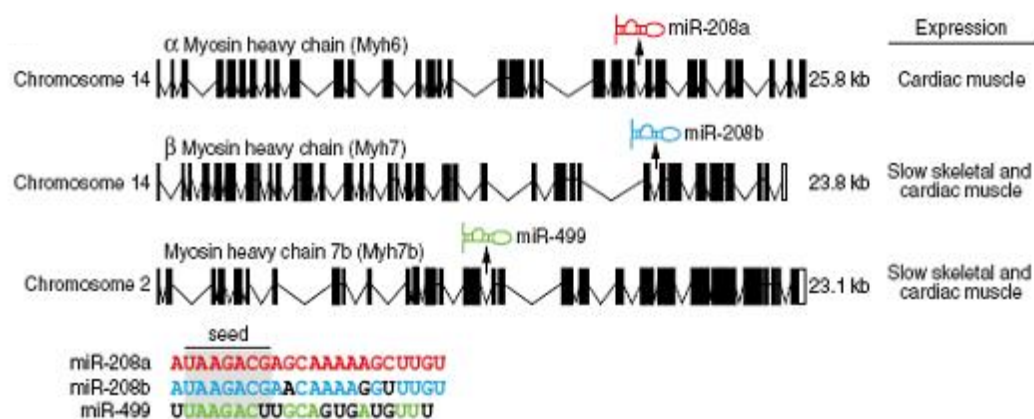


FIGURA 7 – Representação esquemática da localização genômica dos miRNAs presentes em diferentes genes da MHC e suas sequências nucleotídicas (VAN ROOIJ et al., 2009).

Curiosamente, a deleção do miRNA-208b ou do miRNA-499 não alterou a expressão do outro miRNA no sóleo, e a análise do tipo de fibra apresentou pouca ou nenhuma diferença no número de fibras musculares do tipo I, em qualquer um dos animais mutantes em comparação com o tipo selvagem. Porém, com a geração do animal duplo *knockout* (dKO) para os miRNAs-208b e -499 verificou-se uma perda substancial de fibras musculares do tipo I no sóleo dos dKO. A perda de fibras lentas nos camundongos dKO também foi evidenciado pela redução da expressão protéica e gênica de β -MHC, e um concomitante aumento na expressão de isoformas de miosina rápida tipo IIa e IIx e tipo IIb (VAN ROOIJ et al., 2009).

Por outro lado, a superexpressão do miRNA-499 foi suficiente para induzir uma completa conversão de todas as fibras rápidas no sóleo para um perfil de fibras lentas do tipo I. Notavelmente, quando os animais foram submetidos a um teste de tolerância ao esforço físico em esteira, os que superexpressavam o miRNA-499 correram 50% a mais do que os controles tipo selvagem, indicando uma maior resistência aeróbia resultante da reprogramação de fibras musculares com indução de predomínio de fibras do tipo I, contração lenta e metabolismo oxidativo. Além disso, os autores investigaram possíveis alvos desses miRNAs relacionadas ao controle de β -MHC. Os achados mostram que os fatores de transcrição SOX6 (um membro da família SOX de fatores de transcrição), PUR β (*purine-rich negative regulatory element*) e SP3 são alvos dos miRNA-208b e -499 no músculo

esquelético, e que animais dKO tem aumento na expressão desses fatores (VAN ROOIJ et al., 2009). Outros estudos também mostraram que SOX6, PUR β e SP3 inibem a expressão de β -MHC no músculo esquelético implicado na mudança do perfil de fibras musculares (HAGIWARA et al., 2007; JI et al., 2007).

A FIGURA 8 retrata os miRNAs e seus principais genes alvos validados envolvidos na proliferação celular, diferenciação e hipertrofia/ atrofia muscular podendo ser regulados pelo exercício físico e por patologias.

Estudos ainda não foram realizados avaliando a expressão desses miRNAs e a mudança de tipo de fibra em DCV, e em especial na HA. Uma vez que na HA e DCV há uma mudança no perfil de fibras musculares, seria pertinente pensar que os miRNAs-208b e -499 estariam participando dessa alteração e que o TF aeróbio seria um forte candidato para a normalização desses parâmetros, uma vez que ele conhecidamente aumenta o metabolismo oxidativo associada ao predomínio de fibras do tipo I.

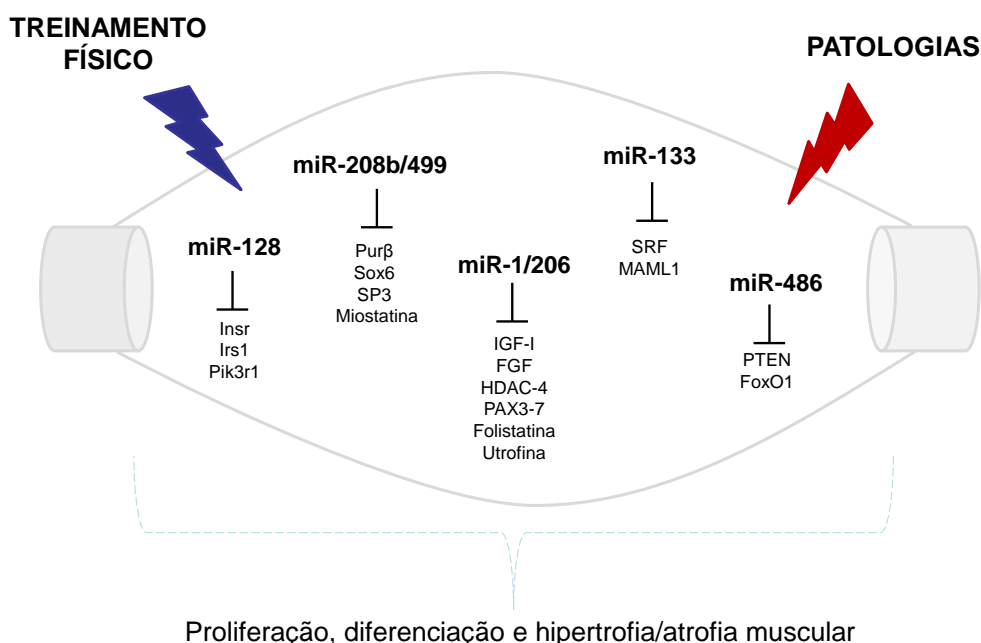


FIGURA 8 – MiRNAs muscular esquelético e genes alvo selecionados que regulam a proliferação celular, diferenciação e hipertrofia/ atrofia em resposta ao exercício físico e as patologias. miR= miRNA.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais experimentais

Para realização da 1ª etapa do estudo foram utilizados 28 ratos machos espontaneamente hipertensos (SHR), com 3 meses de idade no início do protocolo experimental com o quadro de HA pré estabelecido e 28 ratos machos Wistar Kyoto (WKY), como controles do SHR. Para realização da 2ª etapa do estudo foram utilizados 42 ratos machos espontaneamente hipertensos (SHR), com 6 meses de vida no início do protocolo experimental com o quadro de HA crônica e 42 ratos machos Wistar Kyoto (WKY), como controles do SHR. Os animais foram provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Os animais utilizados neste estudo foram mantidos em gaiolas plásticas em grupos de 3 ou 4 animais por caixa e separados por grupo experimental. A temperatura ambiente do biotério foi mantida entre 22º-24ºC com luz controlada em ciclo invertido de claro-escuro de 12 em 12 horas. Água e comida foram administradas *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, sendo este projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (2014/01) conforme mostrado no ANEXO A.

5.2 Identificação dos animais

O projeto foi dividido em duas etapas. Para a realização deste projeto de pesquisa os animais foram aleatoriamente divididos nos grupos abaixo, conforme o protocolo experimental:

1ª etapa: Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais (n=7 para cada grupo) de ratos com 3 meses de idade:

- ratos Wistar-Kyoto (WKY);
- ratos Wistar-Kyoto treinados (WKY-T);
- ratos espontaneamente hipertensos (SHR);
- ratos espontaneamente hipertensos treinados (SHR-T)

Os ratos foram inicialmente identificados por números, pesados e adaptados ao protocolo de medida da PA e o consumo de oxigênio (VO_2). Foram utilizados dois lotes de animais conforme subdivisão acima.

2ª etapa: Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais (n=7 para cada grupo) de ratos com 6 meses de idade:

- ratos Wistar-Kyoto (WKY);
- ratos Wistar-Kyoto treinados (WKY-T);
- ratos espontaneamente hipertensos (SHR);
- ratos espontaneamente hipertensos treinados (SHR-T)

Os ratos foram inicialmente identificados por números, pesados e adaptados ao protocolo de medida da PA e o VO_2 . Foram utilizados três lotes de animais conforme subdivisão acima para realização de todas as análises previstas.

5.3 Protocolo de treinamento físico aeróbio

O TF de natação foi realizado segundo protocolo de MEDEIROS et al. (2004). Os animais foram treinados durante 10 semanas, sessões de 60 min, 1 vez ao dia, 5 vezes por semana, com aumento gradual da sobrecarga de trabalho (peso na cauda em porcentagem do peso corporal) até atingir 4 % do peso corporal (TABELA 3).

TABELA 3 – Visão esquemática do protocolo de treinamento físico de natação para ratos. PC: peso corporal.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	semanas
0	2	3	4	4	4	4	4	4	4	Carga (%PC)
30 40 50 60	40 50 60	60	60	60	60	60	60	60	60	Tempo (min)

O protocolo utilizado foi caracterizado como treinamento de baixa a moderada intensidade e longa duração, sendo efetivo na promoção de adaptações cardiovasculares e no aumento da capacidade oxidativa muscular. Os ratos foram identificados e pesados semanalmente, para a correção da sobrecarga de

treinamento em função do aumento do peso corporal. O treinamento foi realizado em um sistema de natação específico para ratos, com água aquecida a 30-32° C (FIGURA 9).



FIGURA 9 – Aparato de treinamento físico de natação para ratos.

Pré e pós o período de TF os animais foram submetidos a análises hemodinâmicas, ao teste de tolerância ao esforço físico máximo e a medidas do VO_2 pico; e posteriormente foram mortos por decapitação, e as amostras necessárias foram coletadas e armazenadas adequadamente para análises funcionais, histológicas, bioquímicas e moleculares.

5.4 Avaliação das respostas hemodinâmicas

A PA foi realizada por pletismografia de cauda (sistema da IITC Life Science para ratos e camundongos, CA, USA) nos 4 grupos de animais. Os animais estavam acordados, em repouso e mantidos sob restrição de movimentos para que as medidas fossem realizadas. Para evitar erros de medida e análise, os ratos foram submetidos a um período de uma semana de ambientação com a técnica de medida.

O equipamento de registro da PA de cauda consiste em um manguito de borracha que é adaptado a região proximal da cauda, que está ligado ao pletismógrafo para insuflar e desinsuflar gradualmente o manguito de 1 a 250/300 mmHg. Numa região mais distal da cauda é acoplado um transdutor de pulso pneumático para detecção dos sinais de passagem da onda de pulso de PA na artéria caudal e registrado no sistema de aquisição de sinais.

Este método de medida indireta da PA permite quantificar a PA e a frequência cardíaca.

5.5 Avaliação da tolerância ao esforço físico máximo

Para realização do protocolo de avaliação do esforço físico máximo, os animais dos 4 grupos WKY, WKY-T, SHR e SHR-T foram posicionados individualmente sobre a esteira rolante. Imediatamente após o posicionamento do animal foi iniciado o teste de esforço. A velocidade inicial foi de 6m/min (sem inclinação), que constitui em um protocolo escalonado com incrementos de velocidade de 3m/min a cada 3 min, até que fosse atingida a velocidade máxima suportada pelos animais. O critério para a determinação da exaustão do animal e interrupção do teste foi o momento em que o rato não foi mais capaz de correr dentro da caixa metabólica mediante o incremento de velocidade da esteira.

Esta avaliação foi feita pré e pós o período de treinamento, para comparar a resposta de desempenho do animal entre os grupos. Embora o teste em esteira não seja específico ao TF realizado no presente estudo, utilizamos esse teste para auxiliar na verificação da eficácia do treinamento como predição de uma melhora na capacidade de realização de esforço. Foi comparado o tempo (min), a velocidade (m/min) e a distância (m) percorrida para cada rato.



FIGURA 10 – Sistema em esteira rolante para avaliação do esforço físico máximo.

5.6 Avaliação do consumo de oxigênio pico

Após a semana de adaptação à caixa metabólica, os ratos foram submetidos a um teste progressivo de esforço máximo em esteira rolante adaptado de BROOKS & WHITE (1978), com incremento de carga de 3m/min a cada 3 min, até a exaustão, para a obtenção do VO_2 pico.

O VO_2 pico foi mensurado por determinação da fração expirada de oxigênio (FeO_2) durante o teste de exercício progressivo até exaustão.

Neste protocolo os ratos foram colocados numa caixa metabólica sobre a esteira rolante, que serviu como câmara de mistura dos gases expirados. Esta câmara é conectada a um tubo na forma de “T”, para a retirada de amostras de ar (1.000 mL/min) para ser analisada a FeO_2 em um analisador de gases. A outra via do tubo em “T” é utilizada para a aspiração do ar em fluxo contínuo (2.500 mL/min), regulável por bomba aspiradora. A parte da frente da caixa metabólica possui uma abertura de 2 mm da superfície, que permite a entrada de ar ambiente unidirecional sugado pela bomba aspiradora. O fluxo de ar na caixa metabólica é de 3.500 mL/min.

O rato foi colocado dentro da caixa metabólica por um período de repouso de 30 minutos para o registro do estado basal e, em seguida, o teste foi iniciado com velocidade de 3 m/min. Durante cada estágio (3min) de exercício realizado, foram analisadas as FeO_2 dos gases contidos no ar da caixa metabólica. Foram consideradas as frações expiradas dos trinta últimos segundos de cada estágio para a determinação do VO_2 pico de cada estágio.

Ao atingir a exaustão o rato foi mantido na caixa metabólica por aproximadamente 3 min e as frações expiradas foram registradas para verificar a recuperação do animal e o funcionamento dos analisadores.

O VO_2 foi calculado através da seguinte fórmula matemática:

$$\text{VO}_2 = \text{fluxo de ar} \times (\text{FiO}_2 - \text{FeO}_2) / \text{peso corporal}$$

Onde: $\text{VO}_2 = \text{mL.Kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$

Fluxo de ar = 1000 mL/min (analisador) + 2500 mL/min (bomba de aspiração) = 3500 mL/min.

FiO_2 = fração de oxigênio inspirada (ar ambiente).

FeO_2 = fração de oxigênio expirada (caixa de mistura).

Peso corporal = Kg.

Para a análise dos dados foi utilizado o maior valor do VO_2 .

5.7 Avaliação da função e estrutura ventricular- ecocardiografia

Com a finalidade de avaliar a função e a estrutura do ventrículo esquerdo, de forma não invasiva, foi realizado o exame ecocardiográfico transtorácico. Esse foi realizado nos animais WKY e SHR sedentários e treinados com 9 meses de idade ao final do protocolo experimental com intuito de averiguar se animais com HA crônica desenvolveria disfunção cardíaca. As medidas ecocardiográficas seguiram as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia (LANG et al., 2005). O exame ecocardiográfico foi realizado com os animais anestesiados com uma mistura contendo ketamina e xilasina (50 e 10 mg/Kg, respectivamente, i.p.). O animal anestesiado foi colocado em decúbito dorsal em uma mesa cirúrgica apropriada. Foi utilizado o equipamento Vivid 9 (GE Healthcare) com transdutor de 4 a 12 MHz, que permite imagens com 2 ou 3 cm de profundidade. As imagens foram armazenadas em CD-DVD, para análise posterior. As dimensões e massa do ventrículo esquerdo foram adquiridas pelo modo-M. A função sistólica foi avaliada pela fração de ejeção utilizando o método de Simpson modificado visualizando as câmaras a partir do eixo longo paraesternal. A função diastólica foi avaliada pelos valores derivados da curva de velocidade do enchimento na diástole realizado pelo Doppler. Foi realizado um total de três medidas para cada variável, sendo calculadas posteriormente as médias dessas medidas. A frequência cardíaca sob anestesia foi mantida em valores similares nos animais de ambos os grupos WKY e SHR para que alterações na mesma não interferissem na contratilidade miocárdica *per se* (efeito escada ou Bowditch).

As medidas realizadas foram diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE), diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DSVE), espessura do septo, da parede posterior e espessura relativa da parede (ERP), fração de ejeção (FEj), volume sistólico final (VSF), volume diastólico final (VDF), tempo de desaceleração da onda E (TD), pico da onda A e da onda E, razão E/A, tempo de ejeção (TE), tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) e índice de performance miocárdica (IPM).

5.8 Coleta das amostras

Finalizado o período dos protocolos experimentais os animais foram sacrificados por decapitação vinte quatro horas após a última sessão de TF. Neste momento amostras de sangue foram coletadas para separação de soro e plasma. O sangue, mantido em gelo, foi centrifugado a 1.500g durante 10 minutos a uma temperatura de 4°C. Após centrifugação os sobrenadantes foram armazenados a -70°C.

Após o sacrifício a artéria femoral e os músculos EDL e sóleo foram coletados e imediatamente armazenados em solução de *Krebs Henseleit* a 4°C (composição em mM: NaCl 118; KCl 4,7; NaHCO₃ 25; CaCl₂ 2,5; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄.7H₂O 1,2; EDTA 0,01; glicose 11; pH 7,4) para limpeza e retirada de tecidos adjacentes para análise da função vascular e muscular esquelética. Os músculos sóleo, plantáris, gastrocnêmio e tibial anterior e os tecidos como coração, pulmão, fígado, adrenais e gordura reto peritoneal foram cuidadosamente dissecados, pesados e congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -70°C para serem utilizados nas análises de histológica, bioquímica e biologia molecular. Pulmões e tibial anterior foram submetidos à secagem em estufa (37°C) e pesados depois de 72 horas, momento este sem alteração de massa, permitindo o cálculo da razão massa úmida por massa seca, como índice de edema pulmonar e muscular.

5.9 Avaliação da atividade da enzima citrato sintase

O aumento da atividade das enzimas oxidativas presentes na mitocôndria é um indicativo da otimização do metabolismo aeróbio. A citrato sintase catalisa a primeira reação do ciclo de Krebs, onde ocorre a condensação do acetil coenzima A (acetil-CoA) com o oxaloacetato para formar citrato e coenzima A (CoA).

Para avaliar a atividade da citrato sintase o músculo sóleo foi homogeneizado a 4°C em tampão de extração (pH 7,4) contendo Tris-base (50 mM) e EDTA (1 mM). As amostras foram centrifugadas a 3.000 g durante 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para a realização da cinética enzimática. A quantificação da proteína no homogenato foi realizada segundo o método de BRADFORD (1976).

A atividade máxima da enzima foi determinada segundo ALP & NEWSHOLME (1976) a partir de quantificação do complexo formado entre a

coenzima A com o ácido 5,5'-ditio-bis 2 nitrobenzóico (DTNB), adicionado ao meio, formando um complexo amarelo. O tampão de ensaio consistiu de Tris-base (100 mM), DTNB (0,4 mM), acetil-CoA (1,24 mM), Triton X-100 1% (v/v) e o homogeneizado. A reação foi iniciada pela adição de oxaloacetato (18,9 mM) ao meio e o registro da cinética enzimática foi realizada a 25°C durante um intervalo de 10 minutos, em 412 nm com o uso do Victor (Victor3 1420 Multilabel Counter/PerkinElmer, MA, USA). O resultado da atividade da enzima foi expresso em valores de $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$.

5.10 Avaliação histoquímica do músculo esquelético

Vinte quatro horas após a última sessão de treino os animais foram mortos como já descrito anteriormente e o músculo sóleo foi dissecado, extraído cuidadosamente e fixado em uma massa de montagem à base de *tissue tek* (para manter o tecido na posição correta pré-congelamento) pela região tendinosa.

Posteriormente à fixação na massa de montagem à base de *tissue tek*, o sóleo foi mergulhado em isopentano (crioprotetor que evita artefatos nas amostras) e em seguida em nitrogênio líquido para o congelamento, onde foram mantidos até que os cortes fossem realizados (FIGURA 11).

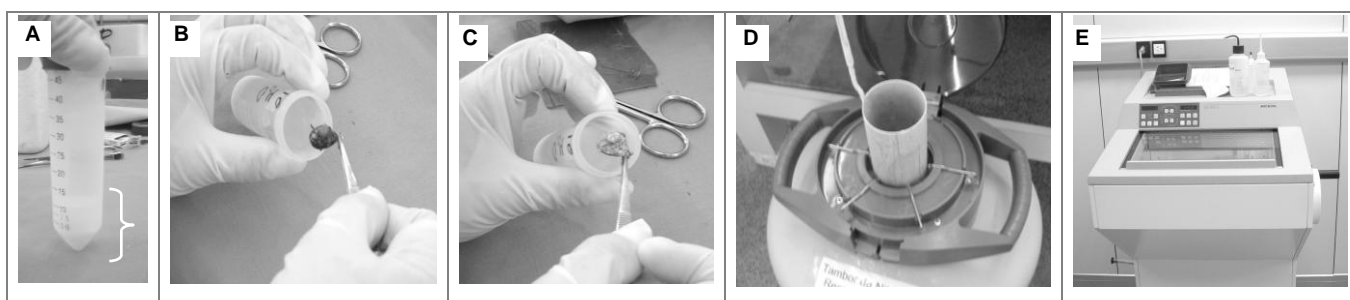


FIGURA 11 – Congelamento e cortes do tecido. (A) Isopentano refrigerado em nitrogênio líquido. Quando o isopentano fica com a base congelada é o ponto ótimo para imersão do tecido. (B) Tecido é introduzido no isopentano durante 10 segundos (C) e posteriormente transferido para tubo de 50 ml contendo nitrogênio líquido. (D) Conservação em nitrogênio líquido a aproximadamente -196°C (E) Criostato Mícron HM505E (Zeiss, Walldorf, Germany), onde foram realizados os cortes do tecido (Imagens concedidas pela Dra. Aline V. Bacurau).

Após a obtenção dos cortes de 10 μm foram realizadas reações adaptadas de BROOKE & KAISER (1970), que permitiram a avaliação da atividade da enzima miosina ATPase por meio de soluções com diferentes pHs (4,6 e 10,3), com o intuito de realizar a tipagem das fibras.

5.10.1 Determinação da área de secção transversa e tipos de fibras musculares

A captura das imagens foi realizada com amplificação de 200x em objetiva de 20x. A aquisição das imagens foi processada em computador acoplado a um sistema de vídeo por meio de um programa de imagens (Image-Pro Plus; Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Foram analisados 10 campos de cada corte histológico, na tentativa de avaliar o tecido por inteiro. Foi calculada a área de secção transversa por cada tipo de fibra muscular em μm^2 .

Para a identificação dos tipos de fibras pela técnica ATPase miosínica em pH 10,3 (alcalino) (FIGURA 12), as fibras escuras foram caracterizadas de tipo IIa, as claras de tipo I e cinza de intermediárias no músculo sóleo. Já no pH 4,6 (ácido), as fibras escuras são do tipo I, as claras do tipo IIa e as cinzas do tipo intermediárias.

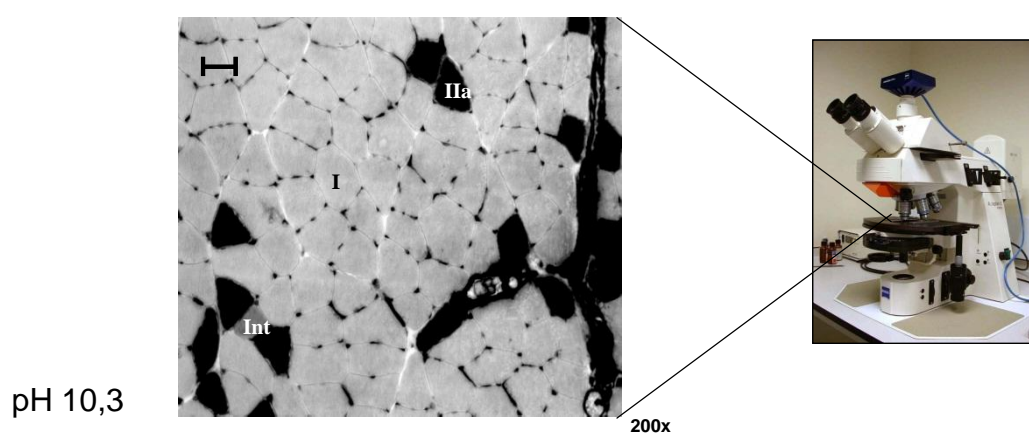


FIGURA 12 – Análise microscópica do corte histológico do músculo sóleo por histoquímica no pH 10,3 de um rato controle. I corresponde as fibras do tipo I, IIa fibras do tipo IIa e Int as fibras intermediárias. Barra: 30 μm .

5.10.2 Análise da razão capilar por fibra e morfologia arteriolar

A razão capilar por fibra e a morfologia arteriolar do músculo sóleo foi avaliada por meio da reação histoquímica para miosina ATPase no pH 10,3, como descrito anteriormente (SILLAU & BANCHERO, 1977). Para razão capilar por fibra foi quantificada pela análise de 10 campos não sobrepostos, com uma amplificação de 200x, distribuídos de uma maneira randômica usando um sistema computacional morfométrico (Leica Quantimet 500, Cambridge, UK). Para calcular a razão capilar por fibra, o número total de capilares foi dividido pelo número total de fibras contabilizadas no mesmo campo. Somente vasos com um diâmetro menor que 12 μm foram contabilizados (FIGURA 13). Para morfologia da arteríola muscular foi quantificada com amplificação de 400x e usando o mesmo sistema computacional descrito acima. Os parâmetros morfológicos da arteríola muscular analisados foram o diâmetro do vaso (μm) e do lúmen (μm), a espessura da parede (μm), a área de secção transversa (μm^2) e a relação parede: lúmen entre os grupos estudados. A forma de cálculo foi semelhante ao descrito na avaliação morfológica da artéria femoral na seção 5.14.

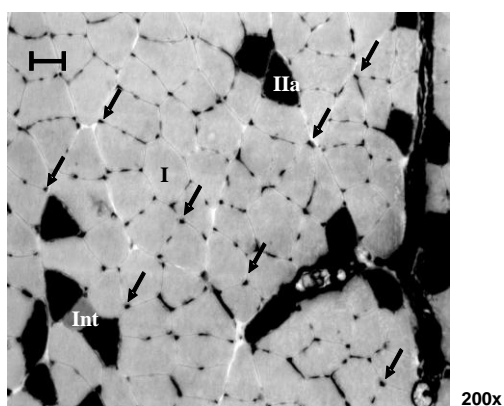


FIGURA 13 – Análise histológica da capilarização no músculo sóleo em rato controle, pH 10,3. As setas indicam os capilares. Barra: 30 μm .

5.11 Avaliação imunohistoquímica do músculo esquelético

O músculo sóleo foi dissecado e extraído cuidadosamente e fixado em uma massa de montagem à base de *tissue tek* e posteriormente cortado

transversalmente no aparelho criostato (Leica CM1850, Leica Microsystems, Germany) na espessura de 10 μ m como descrito na seção 5.10.

Foi feita a imunofluorescência para MHCII β conhecida como a isoforma da fibra muscular esquelética do tipo I. Brevemente, as secções musculares colocadas em laminas histológicas foram previamente fixadas com formalina (Sigma-Aldrich, HT501128, Brasil) 10% por 10 minutos em temperatura ambiente, permeabilizadas em 0,2% de Triton X-100 (Bio-rad, 01-0407, EUA) e 1% albumina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich, A2153, Brasil) diluídos em PBS (*Phosphate Buffer Saline*, Tampão Fosfato Salino, Sigma-Aldrich, P4417, Brasil) por 10 minutos. O bloqueio foi feito em 10% goat serum (Sigma-Aldrich, G9023, Brasil) em PBS por 45 minutos. As lâminas foram incubadas com solução contendo os anticorpos primários para MHC-II β (diluição 1:5000, *Anti-Slow Skeletal Myosin Heavy chain*, Abcam, ab11083, EUA) para marcação das fibras do tipo I; e para Laminina (diluição 1:100, *Anti-Laminin*, L9393, Sigma-Aldrich, EUA) para a marcação das membranas basais propiciando a análise da área de secção transversa das fibras musculares e possibilitando a marcação das demais fibras musculares negativas para tipo I; com 1,5% de goat serum, os respectivos anticorpos secundários fluorescentes para MHC-II β (diluição 1:500; Alexa Fluor 568 goat anti-mouse, Life Technologies, A11004, EUA) e Laminina (diluição 1:500; Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit, Life Technologies, A11008, EUA) e Hoechst (diluição 1:1000, Hoechst 33258, Pentahydrate (bis-Benzimide), Life Technologies, EUA) para marcação dos núcleos (FIGURA 14). Após 30 minutos de lavagem com 0,2% de Triton X-100 em PBS as lâminas foram cobertas com lamínulas utilizando-se glicerol tamponado (60% Glicerol, 40% Tris-HCL 0.1M pH 9,3).

A captura das imagens foi realizada com amplificação de 200x em objetiva de 20x. A aquisição das imagens foi processada em computador acoplado a um microscópio de fluorescência e conectado a um sistema de vídeo por meio de um programa de imagens (Leica Qwin, Leica Microsystems, Alemanha). Foi calculada a área de secção transversa das fibras musculares em μ m² e o percentual de fibras do tipo I e tipo II por meio do programa Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Foram analisados 10 campos de cada corte histológico, na tentativa de avaliar o tecido por inteiro.

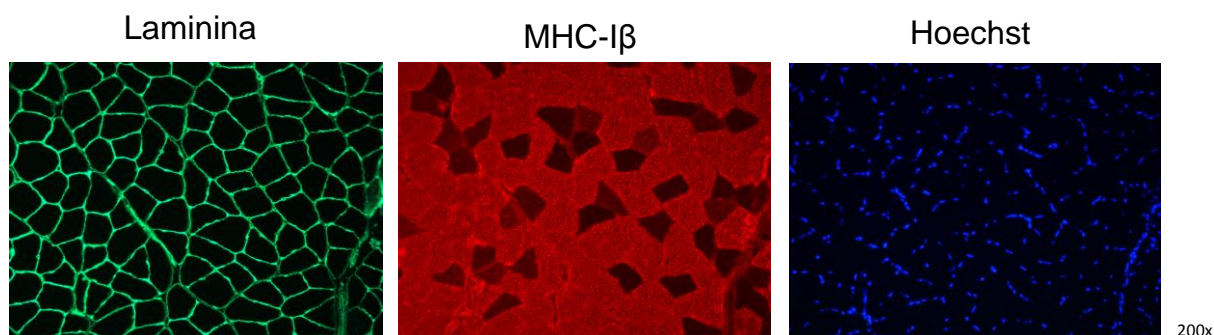


FIGURA 14 – Análise microscópica do corte histológico do músculo sóleo avaliado por imunohistoquímica. Laminina marcada em verde identifica a lâmina basal da fibra muscular, MHC-I β marcada em vermelho identifica as fibras do tipo I, as escuras tipo II e as mescladas as intermediárias e o Hoechst marcado em azul identifica os núcleos das fibras.

5.12 Avaliação da função muscular esquelética *ex vivo*

Imediatamente após a eutanásia dos animais, os músculos EDL e sóleo foram cuidadosamente removidos e fixados entre dois eletrodos de platina em um banho de órgãos contendo solução de Krebs-Ringer (em mM: 137 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 KH₂PO₄, 1 MgSO₄, 24 NaHCO₃, 11 C₆H₁₂O₆; 22°C; pH 7.4) e aerada com solução carbogênica (95% O₂ - 5% CO₂). O tendão distal do músculo foi amarrado e fixado na base da cuba enquanto que o tendão proximal foi amarrado e acoplado a um transdutor de força.

Durante trinta minutos de estabilização, o comprimento ótimo de cada músculo foi avaliado a partir de estímulos elétricos (0,2ms; 80v) aplicados ao músculo com frequência de 1Hz a cada dois minutos, com incremento de 1mm de estiramento entre cada estímulo. Após a estabilização, os músculos em seus comprimentos ótimos foram avaliados quanto a sua capacidade de gerar força sendo submetidos a um protocolo de força-frequência, com pulsos (0,2ms; 80v) distribuídos aos músculos a cada três minutos em frequências crescentes (1, 10, 20, 30, 50, 80, 100 e 150Hz) com trens de pulso de 350ms. A força máxima registrada em cada estímulo foi avaliada. A força específica foi calculada dividindo a força absoluta gerada pelo músculo pela sua massa (mg) e também pela sua área de secção transversa (AST), a qual é estimada a partir do seguinte cálculo: $AST = [Massa \text{ do músculo (g)} / [Comprimento \text{ ótimo das fibras musculares (mm, obtido através do$

produto do valor do comprimento ótimo do músculo por 0,44 para o sóleo e 0,71 para o EDL) x Densidade do músculo esquelético (valor assumido de 1,06 mg/mm³)]. Foi avaliado o *time to peak* (ms) que é o tempo que o músculo leva para atingir o pico de força para cada estímulo gerado e o TR50 (ms) que é o tempo que o músculo leva para relaxar a 50 % da força máxima gerada. Foi avaliado estes parâmetros no *twistch* que é o primeiro estímulo de 1 Hz e no tétano (máxima força gerada) no 80 Hz.

Os músculos também foram avaliados quanto a sua capacidade de tolerar a fadiga sendo submetido a um protocolo de fadiga, com pulsos (0,2ms; 80v) distribuídos aos músculos a cada cinco segundos com frequência constante máxima de 150Hz. A força máxima registrada em cada estímulo foi avaliada. Os mesmos parâmetros de análise acima foram avaliados. Os parâmetros de *time to peak* e TR50 foram avaliados no primeiro tétano (primeiro estímulo- 1s) e no último tétano (último estímulo-270s).

5.13 Reatividade vascular em artérias femorais

A presente metodologia tem como objetivo avaliar a reatividade vascular em anéis de artérias femorais. As artérias femorais direita e esquerda foram dissecadas, livres do tecido conectivo, e colocadas em uma placa de petri contendo solução de *Krebs-Henseleit* (KB) a 4° C (composição em mM: NaCl 118; KCl 4,7; NaHCO₃ 25; CaCl₂.2H₂O 2,5; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄.7H₂O 1,2; EDTA 0,01 e glicose 11). Em seguida, as artérias foram cortadas transversalmente em formato de anéis de aproximadamente 2 mm de comprimento. Cabe ressaltar que de cada animal obtemos pelo menos quatro anéis de artéria femoral.

Os experimentos de reatividade vascular foram realizados de acordo com o método descrito por MULVANY & HALPERN (1977). Dessa forma, os segmentos das artérias femorais foram montados em um miógrafo para registro de tensão isométrica (Modelo 610M, Danish Myo Tech, Dinamarca), o qual estava conectado a um sistema de aquisição e registro de dados (PowerLab Chart 5.5.6, ADInstruments, Sydney, Austrália) (FIGURA 15).

Após um período de estabilização de 15 min em solução de KB (pH 7,4, gaseificadas por borbulhamento com mistura carbogênica de 95% O₂, 5% CO₂ e a 37°C), iniciou-se a normalização das artérias, que consiste no estiramento das

mesmas a uma tensão de repouso considerada ótima em relação ao seu diâmetro interno. Essa tensão foi determinada pela razão circunferência interna/ tensão de parede de cada segmento, e a circunferência interna (L) foi ajustada para 90% daquela que os vasos seriam submetidos se estivessem a uma pressão transmural de 100 mm Hg (MULVANY & HALPERN, 1977). O diâmetro luminal efetivo (D) foi determinado de acordo com a equação $D=L/\pi$, onde π é uma constante que equivale à aproximadamente 3,14.

Após a normalização, as artérias permaneceram em repouso por 30 min e, em seguida, foi testada sua integridade funcional por meio de duas exposições à cloreto de potássio (KCl, 120 mM). A média da diferença entre a tensão máxima desenvolvida e a tensão de repouso, após atingido um platô, correspondeu à tensão ativa máxima (mN/mm) desenvolvida por cada anel.

5.13.1 Avaliação das respostas de relaxamento: 1) dependente e independente do endotélio, 2) dependente do endotélio com uso do inibidor não-seletivo da síntese de óxido nítrico (L-NAME) e 3) dependente do endotélio sob pré-contração ao KCl (60mM)

Após 30 minutos de acomodação das preparações no nível basal, foram realizadas curvas concentração-resposta (CCR) ao agonista α 1-adrenérgico fenilefrina (FE, a partir da concentração de 10^{-9} M) até atingir 50-75% de contração em relação à tensão ativa máxima desenvolvida por cada anel ao KCl. A função endotelial foi avaliada por meio do relaxamento induzido pelo agonista muscarínico acetilcolina (ACh, 1 η M à 10 μ M) na ausência e na presença de L-NAME (10^{-4} M), um inibidor não-seletivo da NOS. O relaxamento independente do endotélio foi avaliado por meio de uma CCR mediada pelo doador de NO, nitroprussiato de sódio (NPS, 0,1 η M à 10 μ M). Além disso, foi ainda realizada uma CCR à ACh sob pré-contração ao KCl (60 mM) a fim de avaliar a resposta vasodilatadora sob ação de um mecanismo de pré-contração eletromecânica.

5.13.2 Avaliação da resposta vasoconstritora à fenilefrina

Após 30 min da curva de relaxamento à ACh, foi realizada, em alguns anéis vasculares, uma CCR à FE (1 η M à 10 μ M).

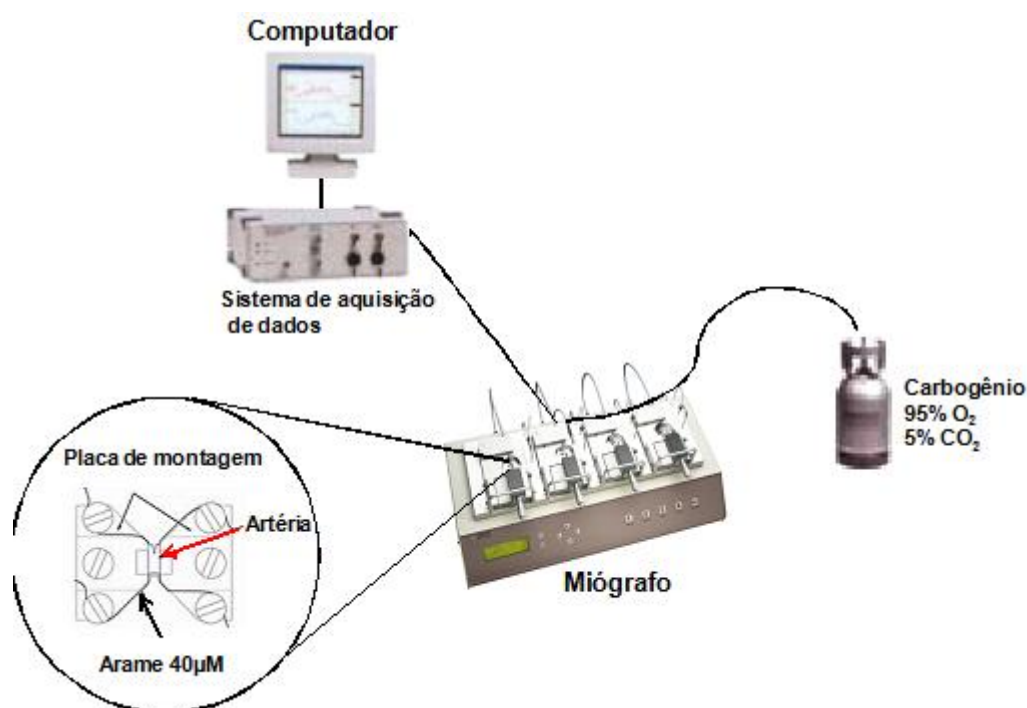


FIGURA 15 – Esquema representativo do miógrafo de arame para pequenos vasos utilizado para o experimento de reatividade vascular na artéria femoral.

5.14 Avaliação morfológica da artéria femoral

Segmentos de artéria femoral foram fixados em paraformaldeído a 4% em solução fosfato (pH 7,2 - 7,4) durante 1 hora. Em seguida as artérias foram transferidas a um molde com meio de congelamento para tecidos *Tissue Tek* – OCT (Bayer), congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até a sua utilização. Cortes transversais de 10 µm de espessura foram realizados em um criostato e colocados sobre uma lâmina de vidro. Os cortes foram corados com hematoxilina - eosina (HE). As imagens foram capturadas e analisadas utilizando um sistema computacional morfométrico (Leica Quantimet 500, Cambridge, UK) com uma objetiva de 10x. Os parâmetros morfológicos da artéria femoral analisados foram o diâmetro do vaso (µm) e do lúmen (µm), a espessura da parede (µm), a área de secção transversa (µm²) e a relação parede: lúmen entre os grupos estudados.

As medidas de diâmetro interno e externo (D_i e D_e) foram utilizadas para o cálculo dos seguintes parâmetros estruturais da artéria:

1) Espessura da Parede (EP)

$$EP = \frac{(D_e - D_i)}{2}$$

2) Área de Secção Transversal (AST)

$$AST = \frac{\pi}{4} \times (D_e^2 - D_i^2)$$

3) Relação Parede/ Lúmen (P/ L)

$$P/L = \frac{(D_e - D_i)}{(2 \times D_i)}$$

5.15 Extração de RNA total para análise de mRNA e miRNA

Foi homogeneizado 50 mg de músculo sóleo em 1 ml de Trizol (Invitrogen) e a extração seguida conforme instruções do fabricante. O RNA precipitado foi lavado com etanol 70% para eliminar resíduos de fenol e sal, e solubilizado em água tratada com DEPC. A concentração das amostras de RNA total foi quantificada usando o espectrofotômetro NanoDrop (NanoDrop Technologies, USA).

A integridade foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 0.5 µg/mL de brometo de etídeo. O gel foi imerso em tampão TAE 1X e a eletroforese realizada a 100 Volts por aproximadamente 40 minutos. A viabilidade das amostras foi avaliada pela análise da intensidade das bandas correspondentes às subunidades do RNA ribossomal 28S e 18S. Amostras que apresentaram algum grau de degradação foram descartadas (FIGURA 16). A análise da qualidade do RNA por um sistema de análise microfluídica foi feita pela própria companhia LC Sciences (Houston, TX) antes de realizar a técnica de *microarray* de miRNA.

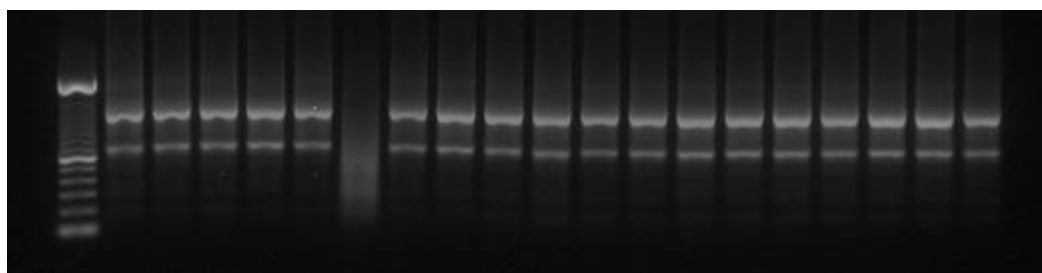


FIGURA 16 – Análise da integridade do RNA do músculo sóleo por eletroforese em gel de agarose.

5.16 miRNA *microarray*

O miRNA *microarray* foi realizado pela companhia LC Sciences (Houston, TX, USA) a partir de 5 µg de RNA total utilizando a tecnologia microfluídica µParaflo®. Para cada grupo experimental foi utilizado 2 amostras do músculo sóleo. Brevemente, a hibridização foi feita overnight em um *chip* microfluídico. No *chip* microfluídico, cada probe consiste de um nucleotídeo modificado quimicamente que codifica segmentos complementares ao miRNA alvo e um segmento espaçador de propilenoglicol para estender o segmento codificante a partir do substrato. O *array* abrange todos os miRNAs transcritos disponíveis na última versão do sistema Sanger miRBase (*Release* 20.0). A detecção pós-hibridização foi realizada utilizando um fluoróforo diferente para cada amostra. A hibridização das imagens foi coletada utilizando um scanner laser GenePix 4000B (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA) e digitalizada usando o software de análise de imagem Array-Pro (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA).

Os dados gerados foram analisados primeiro subtraindo o background e então normalizando os sinais para balancear as intensidades dos fluoróforos de forma que a razão da expressão diferencial possa ser calculada. O perfil de miRNAs expressos no sóleo dos animais hipertensos (SHR) foi comparado com o perfil de expressão do sóleo de animais normotensos controle (WKY) e SHR treinados por natação por ANOVA de 2 vias e foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$. Desta forma os dados foram recebidos da companhia LC Sciences e nesses dados avaliamos primeiramente os miRNAs diferencialmente expressos no grupo hipertenso comparado ao normotenso; a partir disso, verificamos os efeitos do TF sobre a expressão desses miRNAs. Os miRNAs

diferencialmente expressos estatisticamente e com padrão de expressão equivalente a -0.5 a 0.5 *fold change* de Log₂ para linha de corte foram considerados.

Na sequência das análises foram utilizados sites de bioinformática (miRBase Targets, TargetScan, MiRanda, PicTar, miRWalk) para busca dos alvos destes miRNAs, os quais devem estar relacionados com as anormalidades microvasculares e musculares. A partir destes, foram selecionados miRNAs mais diferencialmente expressos para ter sua expressão inicialmente confirmada por *real-time PCR* e então iniciar os estudo da via molecular.

Se na predição de bioinformática for identificado mais de um alvo para os miRNAs selecionados na análise por *array* ou se for identificado uma assinatura de miRNAs para as condições analisadas, nós selecionamos, para ser estudado, aquele miRNA que foi mais diferencialmente expresso nesta assinatura de miRNAs e aquele alvo que apresentou maior número de sítios de pareamento conservados na região 3'-UTR entre várias espécies (pelo menos em ratos, camundongos e humanos). Os alvos devem estar relacionados com a HA, mais especificamente com alterações morfofuncionais vascular e muscular.

5.17 Predição bioinformática

Foram utilizados 5 sites de bioinformática [miRBase Targets (<http://microrna.sanger.ac.uk/targets/v4/>), TargetScan (<http://www.targetscan.org/>), MiRanda (<http://www.microrna.org>), PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/>) e miRWalk (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>)] para realizar a predição dos alvos dos miRNAs selecionados. Uma predição positiva foi incluída somente se ela foi detectada ao menos por três programas.

5.17.1 Análise funcional de enriquecimento de ontologias gênicas

Para a análise funcional de enriquecimento de ontologias gênicas foi realizado primeiramente a identificação dos possíveis alvos dos 10 miRNAs mais diferencialmente regulados em nosso estudo por meio da utilização dos alvos validados experimentalmente e depositados no miRWalk (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>). Posteriormente, para entender melhor a relevância biológica das interações entre os miRNAs e os mRNA, análises de anotação funcional GO (*Gene Ontology*) e das vias KEGG envolvidas nessa interação (*Kyoto*

Encyclopedia of Genes and Genomes) foram realizadas utilizando a ferramenta DAVID (*Database for Annotation, Visualization of Integrated Discovery*, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) (HUANG et al., 2009). As análises foram realizadas usando o "algoritmo de agrupamento difuso", a fim de reduzir a redundância entre as vias funcionalmente relacionadas e que compartilham genes alvo semelhantes. Os valores de p enriquecidos corrigidos por Benjamini menores que 0,01 e FDR menores que 0,05 foram apresentados nos resultados.

5.18 Expressão de miRNAs

Foi realizado análise da expressão dos miRNAs-16 (MIMAT0000785), -21 (MIMAT0000790), -126 (MIMAT0000832), -208b (MIMAT0017844), -221 (MIMAT0000890), -222 (MIMAT0000891) e -499 (MIMAT0017227) no músculo sóleo dos 4 grupos experimentais para a primeira etapa do projeto. Na segunda etapa do projeto, foi realizado análise na expressão dos miRNAs que foram selecionados pelo *microarray*. A análise de miRNA foi de acordo com o protocolo descrito por TaqMan MicroRNA Assay (Applied Biosystem). Foi também utilizado o kit TaqMan MicroRNA Reverse Transcriptase da Applied Biosystem.

5.18.1 Síntese de cDNA para miRNAs

cDNA para análise de miRNAs foi sintetizado a partir do RNA total utilizando primers específicos para cada miRNA analisado de acordo com o protocolo TaqMan microRNA Assay (Applied Biosystems, CA, USA). Foram utilizados 10 ng de RNA em 1 µl. Foi preparada uma RT master mix com dNTPs 100mM, multiscibe reverse transcriptase 50U/ml, tampão 10x para a enzima, inibidores de RNase 20U/ml, totalizando 7µl. Foi adicionado 3 µl de primer e água livre de nuclease para completar o volume de 15µl de reação. A reação de PCR foi realizada a 16 °C por 30 min, 42 °C por 30 min, 85 °C por 5 min e após as amostras foram mantidas a 4 °C.

5.18.2 Reação de polimerase em cadeia em tempo real (*real-time PCR*) para expressão de miRNAs

Para 20 µl da reação de PCR foram incluídos 1,33 µl do produto RT, 10 µl de TaqMan 2X Universal PCR master mix II (No AmpErase UNG), 1 µl de primer

(TaqMan microRNA Assay 20X) e 7,67 µl de água livre de nucleases. As reações foram incubadas a 95 °C por 10 min, seguidos por 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 min. As fluorescências foram lidas em detector ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems). Foi utilizado o U6 snRNA como normalizador para análise de cada miRNA testado.

5.19 mRNA array –via angiogênica

O *array* de genes compreende a expressão de 84 genes envolvidos na modulação de processos biológicos de angiogênese. Este *array* contém os fatores de crescimento e receptores que desempenham um papel na angiogênese. Também estão incluídas as moléculas de adesão e as proteínas de matriz envolvidas, bem como proteases e seus inibidores. Citocinas e quimiocinas relacionadas com angiogênese também estão contidos no *array*, juntamente com os fatores de transcrição e outros genes relacionados. Usando o *real-time PCR* poderemos analisar a expressão de um painel focado de genes relacionados à angiogênese a partir do RNA total extraído do músculo sóleo, segundo protocolo descrito pelo fabricante (*Rat Angiogenesis PCR Array*, PARN-024Z, Qiagen) (<http://www.sabiosciences.com/genetable.php?pcatn=PARN-024Z>). Abaixo, segue a tabela dos genes que foram analisados (TABELA 4).

TABELA 4 – Tabela de genes analisados no músculo sóleo via *real-time PCR*.

Genebank	Sigla	Descrição
NM_033230	Akt1	Proteína quinase B
NM_001012359	Ang	Angiogenina
NM_053546	Angpt1	Angiopietina 1
NM_134454	Angpt2	Angiopietina 2
NM_031012	Anpep	Alanil aminopeptidase
XM_343260	Bai1	Inibidor angiogênico específico cerebral 1
NM_031530	Ccl2	Ligante de quimiocina 2 (C-C motif)
NM_001107407	Cdh5	Caderina 5
XM_241632	Col18a1	Colágeno tipo XVIII, alpha 1
NM_001135759	Col4a3	Colágeno tipo IV, alpha 3

NM_022266	Ctgf	Fator de crescimento do tecido conectivo
NM_030845	Cxcl1	Ligante de quimiocina 1 (C-X-C motif)
NM_053647	Cxcl2	Ligante de quimiocina 2 (C-X-C motif)
NM_145672	Cxcl9	Ligante de quimiocina 9 (C-X-C motif)
NM_012548	Edn1	Endotelina 1
NM_053599	Efna1	Efrina A1
NM_012842	Egf	Fator de crescimento epidermal
NM_001010968	Eng	Endogлина
NM_023090	Epas1	Domínio PAS da proteína endotelial 1
NM_017003	ErbB2	<i>V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i>
NM_022924	F2	Fator de coagulação II (trombina)
NM_013057	F3	Fator de coagulação III (tromboplastina)
NM_012846	Fgf1	Fator de crescimento de fibroblasto 1
NM_019305	Fgf2	Fator de crescimento de fibroblasto 2
NM_131908	Fgf6	Fator de crescimento de fibroblasto 6
NM_053429	Fgfr3	Receptor de FGF3
NM_031761	Figf	Fator de crescimento induzido por C-fos
NM_019306	Flt1	Receptor 1 de VEGF
NM_019143	Fn1	Fibronectina 1
NM_017017	Hgf	Fator de crescimento de hepatócito
NM_024359	Hif1a	Fator induzido por hipóxia 1 subunidade alfa
NM_012797	Id1	Inibidor de ligação 1 do DNA
NM_001014786	Ifna1	Interferon alfa 1
NM_019127	Ifnb1	Interferon beta 1
NM_138880	Ifng	Interferon gama
NM_178866	Igf1	Fator de crescimento similar a insulina 1
NM_031512	Il1b	Interleucina 1 beta
NM_012589	Il6	Interleucina 6
NM_001108118	Itga5	Integrina, alfa 5 (receptor fibronectina alfa)
NM_001106549	Itgav	Integrina, alfa v
NM_153720	Itgb3	Integrina, beta 3
NM_019147	Jag1	<i>Jagged 1</i>
NM_013062	Kdr	Receptor 2 de VEGF
NM_030854	Lect1	Proteína quimiotática derivada de leucócitos1

NM_013076	Lep	Leptina
NM_031020	Mapk14	Proteína-quinase Ativada por Mitógenos 14
NM_030859	Mdk	fator de promoção do crescimento neurite 2 (<i>Midkine</i>)
NM_031056	Mmp14	Matriz metaloproteinase 14
NM_001107159	Mmp19	Matriz metaloproteinase 19
NM_031054	Mmp2	Matriz metaloproteinase 2
NM_133523	Mmp3	Matriz metaloproteinase 3
NM_031055	Mmp9	Matriz metaloproteinase 9
NM_021838	Nos3	Óxido nítrico sintase endotelial 3
NM_145098	Nrp1	Neuropilina 1
NM_030869	Nrp2	Neuropilina 2
NM_012801	Pdgfa	Fator de crescimento derivado de plaqueta alfa
NM_031524	Pdgfb	Fator de crescimento derivado de plaqueta beta
NM_031591	Pecam1	Molécula de adesão celular endotelial/plaquetária
NM_053595	Pgf	Fator de crescimento placentário
NM_013085	Plau	Ativador do plasminogênio, urokinase
NM_053491	Plg	Plasminogênio
NM_017043	Ptgs1	Prostaglandina-endoperóxido sintase 1
NM_013081	Ptk2	Proteína tirosina quinase 2
NM_017301	S1pr1	<i>Sphingosine-1-phosphate receptor 1</i>
NM_057108	Serpina5	Serpina, inibidor de peptidase, clade B, membro 5
NM_012620	Serpine1	Serpina, inibidor de peptidase, clade E, membro 1
NM_177927	Serpinf1	Serpina, inibidor de peptidase membro, clade F, member 1
NM_133386	Sphk1	<i>Sphingosine kinase 1</i>
NM_001105737	Tek	Tirosina quinase endotelial TEK
NM_012671	Tgfa	Fator de crescimento transformante alfa
NM_021578	Tgfb1	Fator de crescimento transformante beta 1
NM_031131	Tgfb2	Fator de crescimento transformante beta 2
NM_013174	Tgfb3	Fator de crescimento transformante beta 3
NM_012775	Tgfb1	Receptor 1 de TGFb
NM_001013062	Thbs1	Trombospondina 1
NM_053545	Tie1	Tirosina quinase com imunoglobulina
NM_053819	Timp1	Inibidor tecidual de metaloproteinase 1
NM_021989	Timp2	Inibidor tecidual de metaloproteinase 2

NM_012886	Timp3	Inibidor tecidual de metaloproteinase 3
NM_012675	Tnf	Fator de necrose tumoral
NM_001012122	Tymp	Timidina fosforilase
NM_031836	Vegfa	Fator de crescimento vascular endotelial A
NM_053549	Vegfb	Fator de crescimento vascular endotelial B
NM_053653	Vegfc	Fator de crescimento vascular endotelial C

5.20 Expressão de mRNAs

5.20.1 Síntese de cDNA para expressão gênica

Foram utilizados 2 µg de RNA total, extraídos a partir do músculo sóleo dos ratos. As amostras foram incubadas com 0,5 µg/mL de oligo dT(12-18) a 65°C por 5 min, para obtenção da primeira fita de cDNA. A transcrição reversa das amostras foi realizada em volume total de 20 µL contendo 3U de RNAsin (Promega, Madison, USA), 10 mM de dNTPs, 0.1 M de DTT, 1X tampão de enzima, e 2.5U de SuperScript Reverse Transcriptase II (Invitrogen, Brasil). Após incubação por 1 hora a 42 °C, a temperatura foi elevada a 95 °C por 5 minutos e o cDNA obtido foi estocado em freezer – 20 °C.

5.20.2 *real-time PCR*

A análise da expressão gênica foi feita pelo sistema de detecção do produto específico amplificado no equipamento 7500 *real-time PCR System* (Applied-Biosystems) na presença do composto fluorescente SYBR-Green PCR Master Mix. A otimização da reação do *real-time PCR* foi feita conforme as instruções do fabricante, corrigido para volume final de 20 µL por reação. As condições de PCR foram padrão (protocolo do kit SYBR-Green master mix) e todos os reagentes foram fornecidos pelo kit, inclusive a enzima polimerase AmpliTaq-Gold (Applied-Biosystems). Depois da otimização, os primers foram utilizados na concentração de 200 nM para detecção e o gene da ciclofilina como controle interno.

A expressão dos genes PI3KR2 (NM_022185.2) e ciclofilina (XM_006222073.1) foram utilizados na primeira etapa do projeto. Seqüência dos primers utilizados no *real-time PCR*: PI3KR2 (sense: 5'- TGT CTG TCT TCT AAT

CCC TTC CCC TGG TG -3', antisense: 5'- GTA GTA CCA AAG CAG GCT CCC CCA GG -3'), e ciclofilina (sense: 5'-AAT GCT GGA CCA AAC ACA AA -3', antisense: 5'-CCT TCT TTC ACC TTC CCA AA -3').

O produto da geração do PCR foi monitorizado por medição do aumento da fluorescência provocada pela ligação de *SYBR green* na cadeia dupla de DNA em cada fase de anelamento. A curva de dissociação observada na análise de *SYBR green* foi gerada no final da reação para verificar se um único produto foi amplificado. Cada amostra foi analisada em triplicata. Quantidades relativas de expressão do gene alvo foram comparadas após a normalização dos valores de controlo interno (ΔCT). Mudanças em vezes na expressão dos mRNAs foram calculados utilizando as diferenças em valores dos ΔCT entre os grupos ($\Delta\Delta CT$) e a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

5.21 Determinação da expressão de proteínas

O músculo sóleo foi homogeneizado em tampão de lise hipotônico contendo tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), sacarose 0,3 M, DTT 0,5 mM, EDTA 1 mM (pH 8,0), PMSF 0,3 mM, NaF 10 mM e coquetel de inibidor de protease e fosfatase (1:100). O homogenato foi centrifugado por 10 minutos à 4°C com 12.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para tubos de 1,5 ml e a concentração de proteína das amostras foram analisadas por meio do método de BRADFORD (1976). As amostras foram armazenadas em freezer -80°C até o momento da utilização.

Alíquotas do homogeneizado, 30 µg de proteína foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl pH 6,8 240 mM; SDS 0,8%; β-mercaptoetanol 200 mM; Glicerol 40% e Azul de bromofenol 0,02 %). A análise dos níveis protéicos foi realizada pela técnica de *western blotting*. Para isso, foi utilizada a técnica de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE, 6 - 12%: dependendo do peso molecular da proteína), que consiste na migração de moléculas com carga, numa solução, decorrente da aplicação de um campo elétrico no aparelho para minigel (Mini Protean, BioRad, EUA). Posteriormente, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences, NJ, EUA), do mesmo modo que foram separadas no SDS-PAGE. As membranas foram coradas com *Ponceau S*, para a verificação das bandas protéicas obtidas pela eletroforese.

A fim de bloquear ligações inespecíficas, a membrana foi incubada em solução contendo caseína, proteína que compete com os sítios de ligação e reduz a absorção inespecífica de conjugados da peroxidase.

Em seguida, a membrana de nitrocelulose foi incubada com o anticorpo primário que se liga à proteína que se pretende detectar, formando um complexo anticorpo-proteína. Depois de lavar a membrana para remover o anticorpo não ligado, ela foi exposta ao anticorpo secundário conjugado a *horseadish peroxidase* (HRP), direcionado a porções espécies-específicas do anticorpo primário.

Foram utilizados como anticorpos primários para a primeira etapa do projeto o VEGF, VEGFR1, VEGFR2 e eNOS (1:1000, Santa Cruz, CA, EUA); Bcl-x, Bcl-2, Bad e p-Bad_{Ser112} (1:1000, Cell Signaling Tech., MA, EUA). Para a segunda etapa do projeto foram utilizados os seguintes anticorpos: IGF-I, IGF-IR, MAFbx/Atrogin-1, FSTL-1, VEGF-A, VEGF-B, Angpt-2, TGF α , PUR β , SOX6 e SP3 (1:1000, Abcam, MA, EUA); PI3Kp110 α , PTEN, p-Akt_{Ser473}, Akt, p-GSK-3_{Ser9}, GSK-3 β , p-mTOR_{Ser2448}, mTOR, p-p70S6k_{Thr389}, p70S6k, p-4E-BP1_{Thr37/46}, 4E-BP1, p-eIF4E_{Ser209}, eIF4E, p-FoxO1_{Ser256}, FoxO1, FoxO3a, MuRF-1, eNOS, p-Erk_{Thr202/Tyr204}, Erk, p-FAK_{Tyr397}, FAK, p-AMPK_{Thr172} (1:1000, Cell Signaling Tech., MA, EUA); p38, VEGFR1, VEGFR2, Bcl-2, PPAR α , PPAR β/δ e AMPK (1:1000, Santa Cruz, CA, EUA). Em seguida, as mesmas foram lavadas 3x10 min com TBS-T, incubadas por 2 horas com os respectivos anticorpos secundários (Amersham Biosciences, NJ, EUA) conjugados à peroxidase. Posteriormente o complexo foi detectado mediante reação de quimiluminescência (ECL) usando o aparelho ChemiDoc (BioRad, CA, USA) e os blots foram visualizados e quantificados (número de *pixels*) pelo sistema *Scion Image*, fornecido gratuitamente pela NIH (EUA) via internet. O gliceroaldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi utilizado como normalizador.

5.22 Análise estatística

Inicialmente a distribuição dos dados foi testada por meio do teste de *Shapiro-Wilk* e a homoscedasticidade por meio do teste de *Levene*. Como os dados são independentes, devem apresentar distribuição normal e variâncias homogêneas, os pressupostos para o alcance de análises paramétricas.

Os dados foram analisados utilizando a análise de variância ANOVA de duas vias (TF e HA como fatores independentes), para comparar os valores dos grupos e teste de *Tukey* como post-hoc (Statistica software, StatSoft, Inc., Tulsa, OK, EUA). Para análise de correlação entre as variáveis foram utilizada a análise de regressão linear. Foi adotado para todos os experimentos um $p < 0,05$ de significância. Todos os resultados foram apresentados na forma de média \pm erro padrão da média (EPM).

6 RESULTADOS- 1ª ETAPA

Nesta seção descreveremos os resultados da 1ª etapa do projeto com animais de 3 meses de idade no início do protocolo.

Parte dos resultados obtidos nesta 1ª etapa do projeto foram publicados no *Hypertension*, conforme mostrado no ANEXO B.

6.1 Massa corporal

A FIGURA 17A mostra a massa corporal (MC) dos grupos pré e pós protocolo de TF aeróbio em animais com 3 meses de idade no início do protocolo. Não houve diferença da MC no início do protocolo entre os grupos. Entretanto, foi observado uma manutenção da MC nos grupos treinados (WKY-T e SHR-T) ao final de 10 semanas de TF em comparação aos grupos sedentários (WKY e SHR), em que apresentaram um aumento de maneira significativa e semelhante ao final do protocolo experimental (Pós TF - WKY: 334 ± 7 , WKY-T: 268 ± 8 , SHR: 340 ± 9 , SHR-T: 279 ± 8 g).

Os dados encontrados na literatura com relação à alteração na MC em resposta ao TF aeróbio são em sua maioria realizados com humanos e animais de experimentação e mostram resultados bem diversos, devido aos diferentes protocolos de treinamento que são utilizados com modificações em frequência, intensidade, duração e tipo de exercício. Porém, estudos que utilizaram o mesmo modelo de animal genético, SHR e WKY, vão ao encontro com os dados obtidos neste estudo, em que os grupos treinados chegam ao final do protocolo com um menor ganho de MC comparado aos grupos sedentários (SILVA et al., 1997; MELO et al., 2003).

Os estudos que mostram diminuição da MC ou menor ganho pós TF aeróbio atribuem esses resultados ao fato do exercício elevar o metabolismo basal devido a um aumento do gasto calórico com uso predominante do metabolismo oxidativo. Esse aumento do gasto calórico somado ao longo de semanas ou meses pode explicar essa diferença em relação aos indivíduos sedentários, principalmente por uma redução do tecido adiposo (TOTH & POCHLMAN, 1996). Portanto, após o sacrifício foi feita a remoção da gordura reto peritoneal dos animais sendo pesada e corrigida pelo comprimento da tíbia, conforme ilustrado na FIGURA 17B. Foi

observado uma reduzida quantidade de tecido adiposo nos animais treinados comparados aos sedentários, explicando em parte esse menor ganho da MC ao final do período experimental.

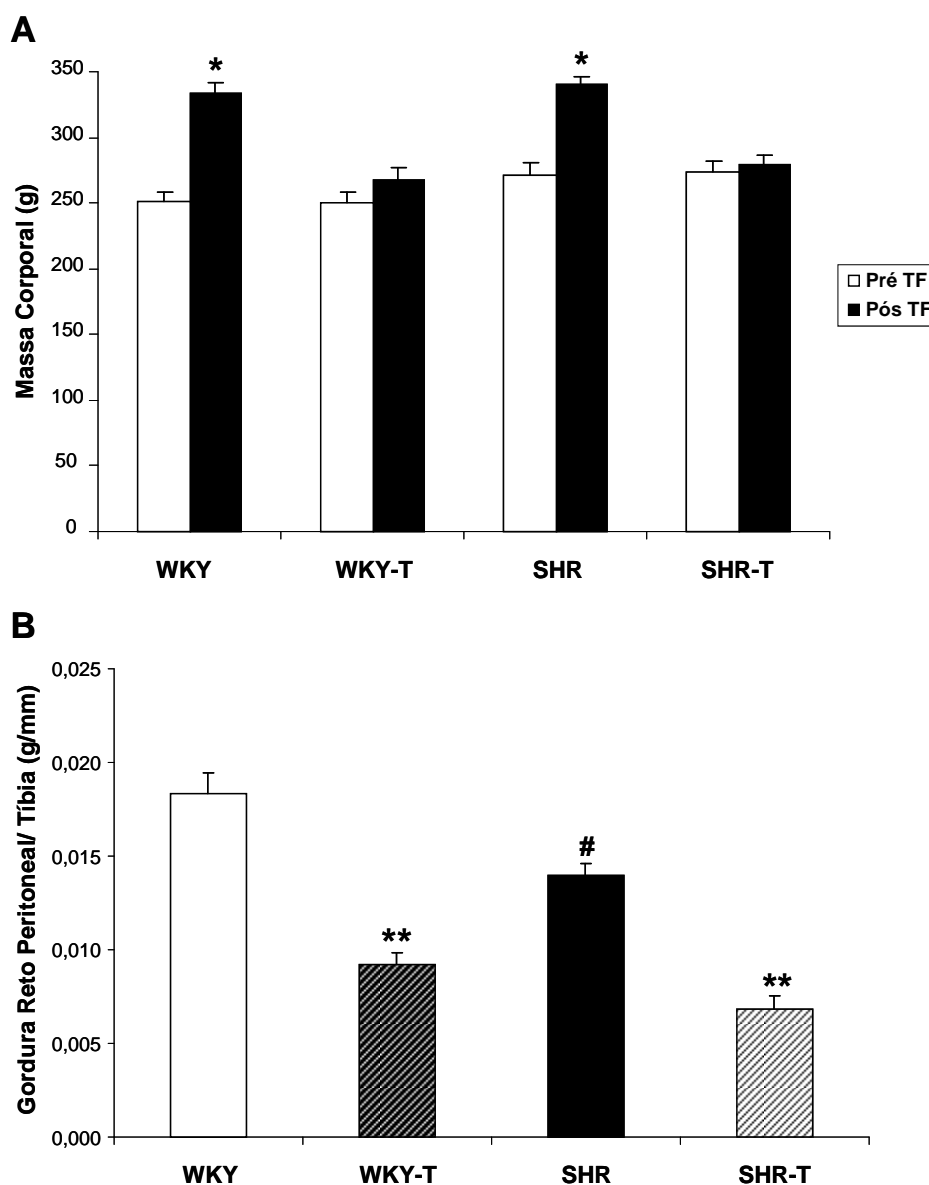


FIGURA 17 - Resultado da massa corporal pré e pós TF de natação (A) representado em gramas (g) e da medida da gordura reto peritoneal pós-período de TF (B) representado em gramas corrigido pelo comprimento da tíbia (g/mm). Os dados estão representados na forma de média \pm EPM (n=14). * $p < 0,01$ vs. Pré-TF e WKY-T e SHR-T Pós-TF; ** $p < 0,01$ vs. WKY e SHR e # $p < 0,05$ vs. WKY.

6.2 Parâmetros hemodinâmicos: pressão arterial e frequência cardíaca

A cepa de SHR desenvolvida por OKAMOTO & AOKI (1963) é um modelo de HA determinada geneticamente e com grandes semelhanças ao curso de desenvolvimento da hipertensão essencial humana, razão pela qual têm sido um modelo amplamente utilizado na avaliação da HA essencial.

Os valores de PA expressos em milímetros de mercúrio (mmHg) e da frequência cardíaca (FC) expressos em batimentos por minuto (bpm) pré e pós TF estão representados na FIGURA 18.

Na FIGURA 18A, pré TF, podemos observar que os grupos de SHR apresentavam níveis elevados de PAS ($184 \pm 3,9$ mmHg), PAD ($150 \pm 4,7$ mmHg) e PAM ($167 \pm 5,3$ mmHg) comparados aos grupos controle, WKY (127 ± 3 ; $99 \pm 2,4$; $110 \pm 3,2$ mmHg, respectivamente), indicando que a HA estava estabelecida. Não foi encontrado alterações da FC entre os grupos pré TF (WKY: 390 ± 12 ; WKY-T: 393 ± 8 ; SHR: 409 ± 8 ; SHR-T: 416 ± 6 bpm).

Pós TF, representado pela FIGURA 18B, observa-se que o TF de natação reduziu a PAS, PAD e a PAM do grupo SHR-T ($162 \pm 4,4$; 131 ± 2 ; $147 \pm 7,8$ mmHg, respectivamente) comparado ao grupo SHR ($207 \pm 5,5$; $160 \pm 2,5$; $175 \pm 3,6$ mmHg, respectivamente), sem nenhuma alteração da PAS, PAD e PAM nos grupos de animais controle, WKY (133 ± 4 ; 104 ± 3 ; $114 \pm 2,5$ mmHg, respectivamente) e WKY-T ($132 \pm 3,7$; $104 \pm 4,4$; $116 \pm 5,6$ mmHg, respectivamente). Além disso, observamos uma bradicardia de repouso nos grupos de animais treinado quando comparado aos grupos mantidos sedentário no mesmo período experimental (Pós TF- WKY: 393 ± 12 ; WKY-T: 322 ± 14 ; SHR: 407 ± 11 ; SHR-T: 338 ± 8 bpm).

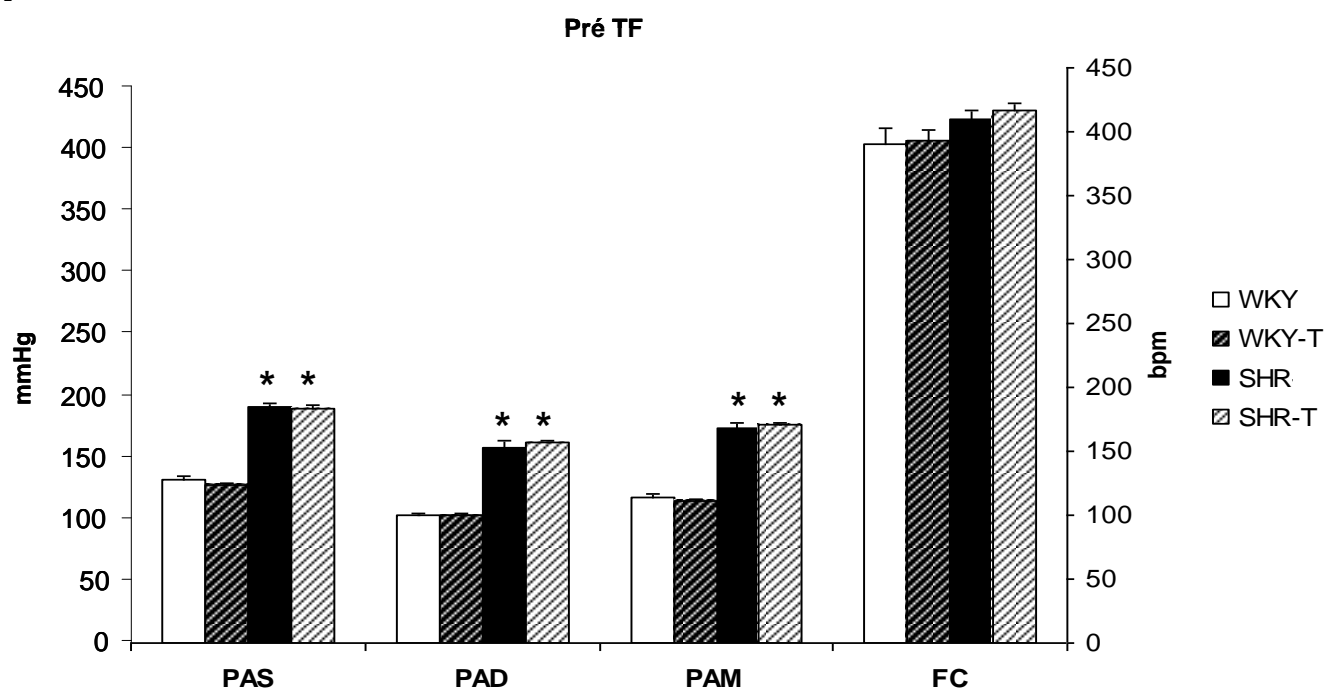
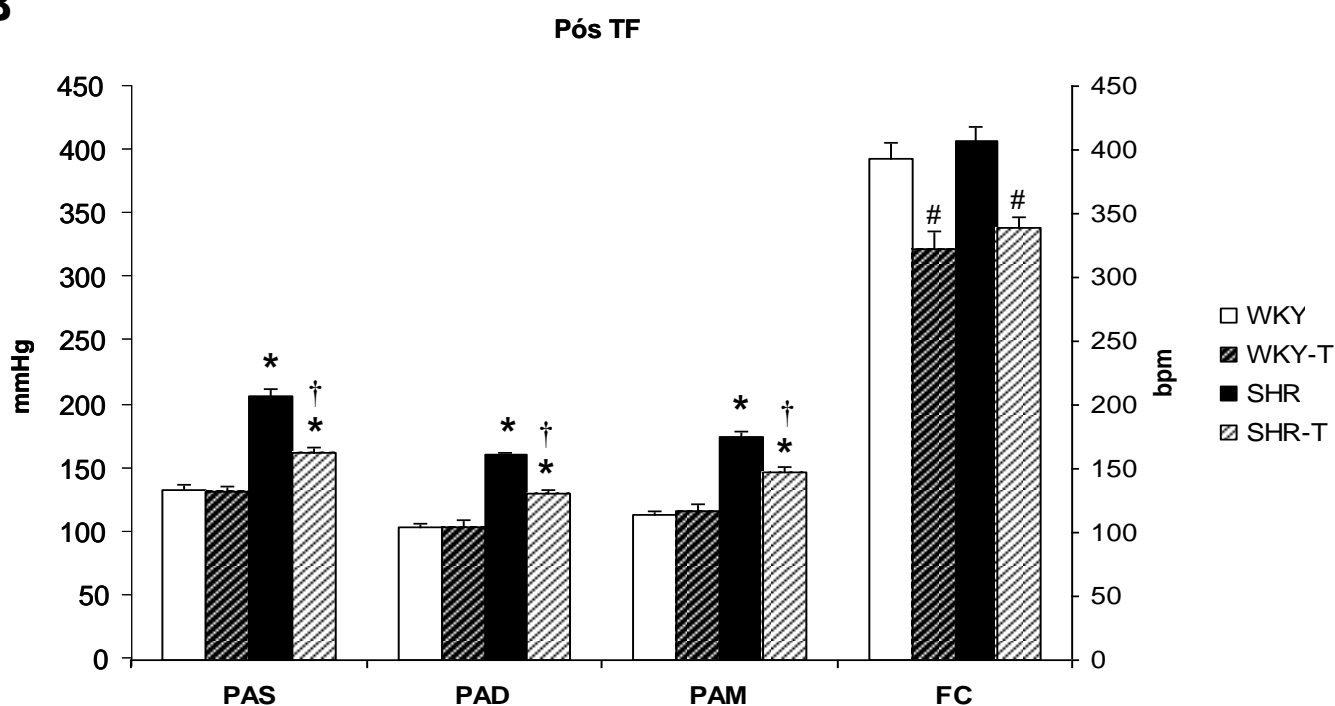
A**B**

FIGURA 18 – Parâmetros hemodinâmicos. Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Diastólica (PAD), Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC) de repouso Pré TF (A) e Pós TF (B) de ratos WKY e SHR submetidos ao protocolo experimental. Os resultados estão expressos como média \pm EPM (n=14). * $p < 0,001$ vs. WKY e WKY-T; # $p < 0,01$ vs. WKY e SHR; † $p < 0,001$ vs. SHR.

6.3 Teste de esforço físico máximo

O teste de tolerância ao esforço foi um dos parâmetros avaliados para comprovarmos a eficácia do TF. Os animais foram submetidos ao teste em esteira rolante até a exaustão pré e pós o período de TF de natação. Foram avaliadas as variáveis distância percorrida (m), tempo (min) e velocidade ($\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$).

Os resultados do teste realizado antes e após as 10 semanas de protocolo experimental estão representados na FIGURA 19. As Figuras 19A, 19B e 19C mostram que os valores de velocidade (WKY: $30 \pm 1,5$; WKY-T: $30,5 \pm 0,9$; SHR: $31,8 \pm 0,7$; SHR-T: $31,5 \pm 1 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$), tempo (WKY: $27 \pm 0,5$; WKY-T: $27 \pm 0,6$; SHR: $28 \pm 0,6$; SHR-T: $27 \pm 0,3 \text{ min}$) e distância percorrida (WKY: $475 \pm 17,5$; WKY-T: 467 ± 22 ; SHR: 508 ± 28 ; SHR-T: $478 \pm 10 \text{ m}$), respectivamente, foram semelhantes entre os grupos Pré TF. Entretanto, os animais treinados aumentaram significativamente a velocidade (WKY: $28,5 \pm 0,7$; WKY-T: 37 ± 1 ; SHR: $31 \pm 1,2$; SHR-T: $39,5 \pm 0,9 \text{ m} \cdot \text{min}^{-1}$), o tempo (WKY: $24 \pm 0,4$; WKY-T: $31 \pm 0,9$; SHR: 26 ± 1 ; SHR-T: $35 \pm 0,6 \text{ min}$) e a distância percorrida (WKY: 381 ± 15 ; WKY-T: $601 \pm 3,5$; SHR: 449 ± 32 ; SHR-T: $739 \pm 36,8 \text{ m}$) no teste Pós TF.

É importante ressaltar que embora o teste não tenha sido modalidade específica ao tipo de treinamento realizado, o mesmo pode proporcionar bons indícios da melhora da capacidade máxima de realização de esforço físico aeróbio, tais como, melhora do metabolismo oxidativo e cardiopulmonar.

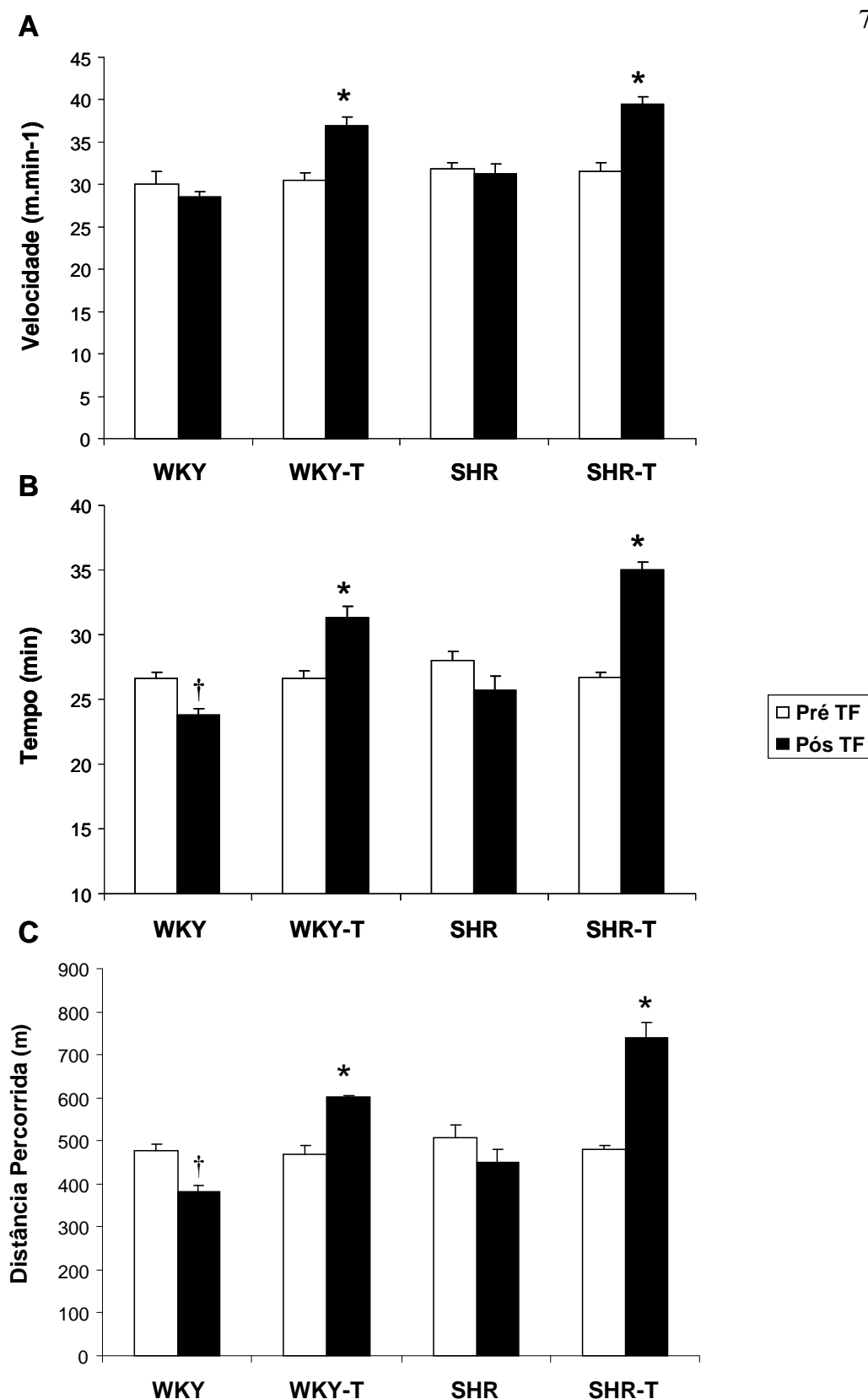


FIGURA 19 – Teste de esforço físico máximo. Velocidade (A), Tempo (B) e Distância Percorrida (C) Pré e Pós TF. Os resultados estão expressos como média \pm EPM (n=14). * p < 0,05 vs. Pré TF e WKY e SHR Pós TF; † p < 0,05 vs. Pré TF e WKY-T e SHR-T Pós TF.

6.4 Medida do consumo de oxigênio de pico

O VO_2 retrata a capacidade máxima do organismo de extrair oxigênio. Esta medida é considerada como a que melhor avalia a potência aeróbia, ou seja, a quantidade máxima de energia que pode ser transformada em trabalho aeróbio das fibras musculares por unidade de tempo (DENADAI et al., 2004).

A FIGURA 20 mostra o VO_2 pico dos animais pré e pós o protocolo experimental. No período Pré TF observa-se que todos os grupos tinham o mesmo nível médio de VO_2 pico (Pré TF- WKY: $69 \pm 3,5$; WKY-T: $69 \pm 2,5$; SHR: 72 ± 2 ; SHR-T: $73 \pm 36 \text{ mL. kg}^{-1}. \text{min}^{-1}$), entretanto Pós TF observa-se a eficácia do treinamento com uma resposta maior de VO_2 para os grupos que treinaram (WKY-T e SHR-T) e uma redução para os grupos sedentário controle (WKY e SHR) (Pós TF- WKY: $58 \pm 2,5$; WKY-T: 78 ± 4 ; SHR: 61 ± 2 ; SHR-T: $84,5 \pm 2 \text{ mL. kg}^{-1}. \text{min}^{-1}$).

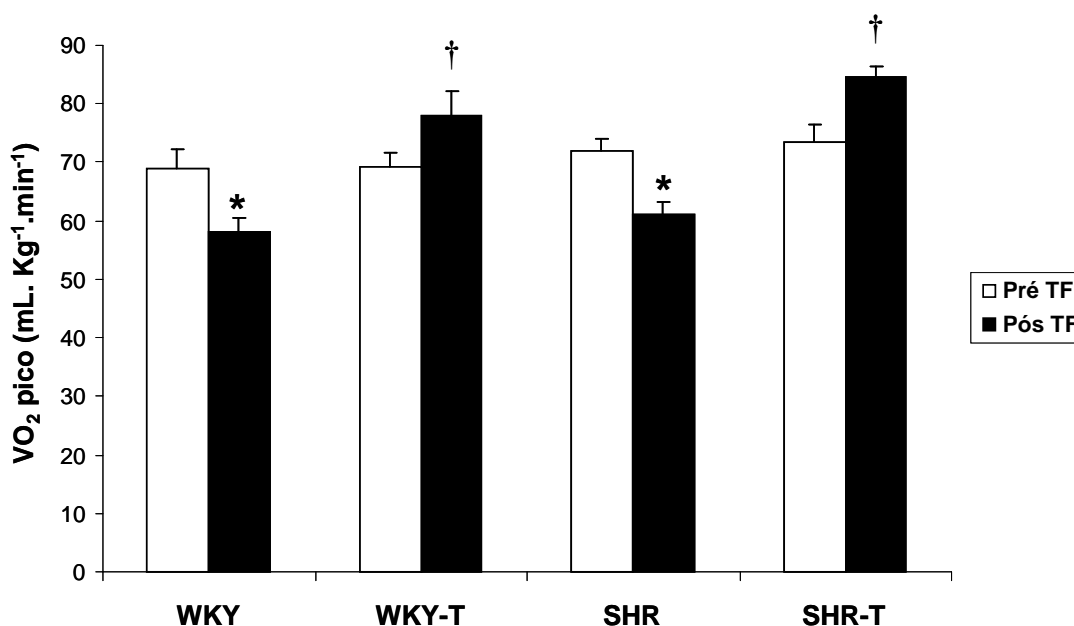


FIGURA 20 – Consumo de oxigênio pico pré e pós TF. Os resultados estão expressos como média \pm EPM (n=14). * $p < 0,05$ vs. Pré TF e WKY-T e SHR-T Pós TF; † $p < 0,05$ vs. Pré TF e WKY e SHR Pós TF.

6.5 Atividade da enzima citrato sintase

O aumento da atividade das enzimas oxidativas presentes na mitocôndria é um indicativo da otimização do metabolismo aeróbio, por isso, este parâmetro também foi analisado para comprovarmos a eficiência do TF. A FIGURA 21 demonstra que houve um aumento da atividade da enzima citrato sintase no músculo sóleo de ratos do grupo controle e hipertenso treinado em relação aos grupos controles que se mantiveram sedentários (WKY: 86 ± 12 , WKY-T: 120 ± 11 , SHR: 76 ± 9 e SHR-T: 144 ± 15 nmol. min⁻¹. mg proteína⁻¹).

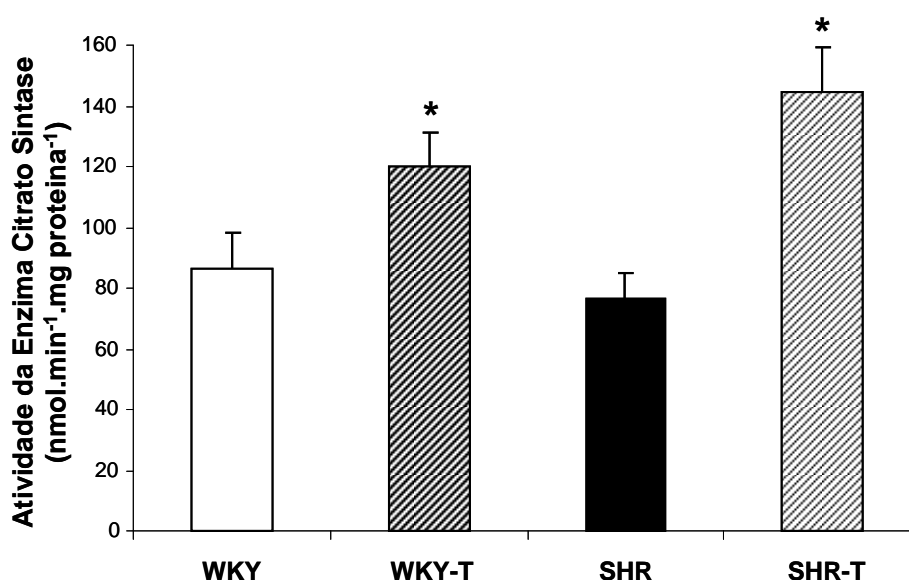


FIGURA 21 – Atividade da enzima citrato sintase no músculo sóleo representada em valores de nmol. min⁻¹. mg de proteína⁻¹. Resultados expressos como média \pm EPM (n=7). * p< 0,05 vs. WKY e SHR.

6.6 Massa muscular esquelética e cardíaca

A TABELA 5 mostra a massa dos músculos sóleo, plantáris e gastrocnêmio e a massa do ventrículo esquerdo (VE). Os valores de massa (mg) foram corrigidos pelo comprimento da tíbia (mm).

Não houve modificação da massa muscular esquelética nos 3 tipos de músculos estudados, porém observamos uma hipertrofia cardíaca induzida tanto

pelo TF quanto pela HA. Em animais experimentais e humanos, o aumento do tamanho do músculo cardíaco como adaptação ao TF aeróbio é oriundo de aumentos da sobrecarga de volume ocasionando uma hipertrofia excêntrica do tipo fisiológica, sem aumento de marcadores moleculares de hipertrofia patológica (fator natriurético atrial, α -actina esquelética e β -MHC) e disfunção cardíaca (FERNANDES et al., 2011). Por outro lado, a hipertrofia do VE em SHR é descrita em grande parte dos trabalhos como uma compensação que ocorre em primeiro momento para manter normal a função do VE e a mecânica miocárdica em resposta a sobrecarga pressórica. De fato, não observamos alteração na função cardíaca em SHR adultos comparado ao grupo WKY; entretanto, o TF aeróbio melhorou a função cardíaca no grupo SHR-T comparado aos animais SHR e WKY sedentários (CAMPOS et al., 2015). Em contraste, a HA crônica está associada a uma descompensação da função cardíaca (DAMATTO et al., 2013; PAGAN et al., 2015).

TABELA 5 – Massa muscular esquelética e cardíaca. Resultados expressos como média \pm EPM (n=7). VE: ventrículo esquerdo. * p < 0,05 vs. WKY.

Parâmetros	WKY	WKY-T	SHR	SHR-T
Sóleo (mg/mm)	3,52 \pm 0,05	3,23 \pm 0,07	3,59 \pm 0,07	3,41 \pm 0,1
Plantáris (mg/mm)	7,77 \pm 0,36	7,14 \pm 0,13	7,71 \pm 0,08	7,47 \pm 0,2
Gastrocnêmio (mg/mm)	35,7 \pm 0,6	33,5 \pm 0,5	35,9 \pm 0,6	33,4 \pm 0,7
VE (mg/mm)	20,5 \pm 0,6	23,9 \pm 0,2*	26,5 \pm 0,6*	26,3 \pm 0,4*

6.7 Determinação da área de secção transversa e tipos de fibra muscular esquelética- histoquímica

A FIGURA 22 mostra as imagens representativas da caracterização histoquímica do músculo sóleo pela reação ATPase miosínica.

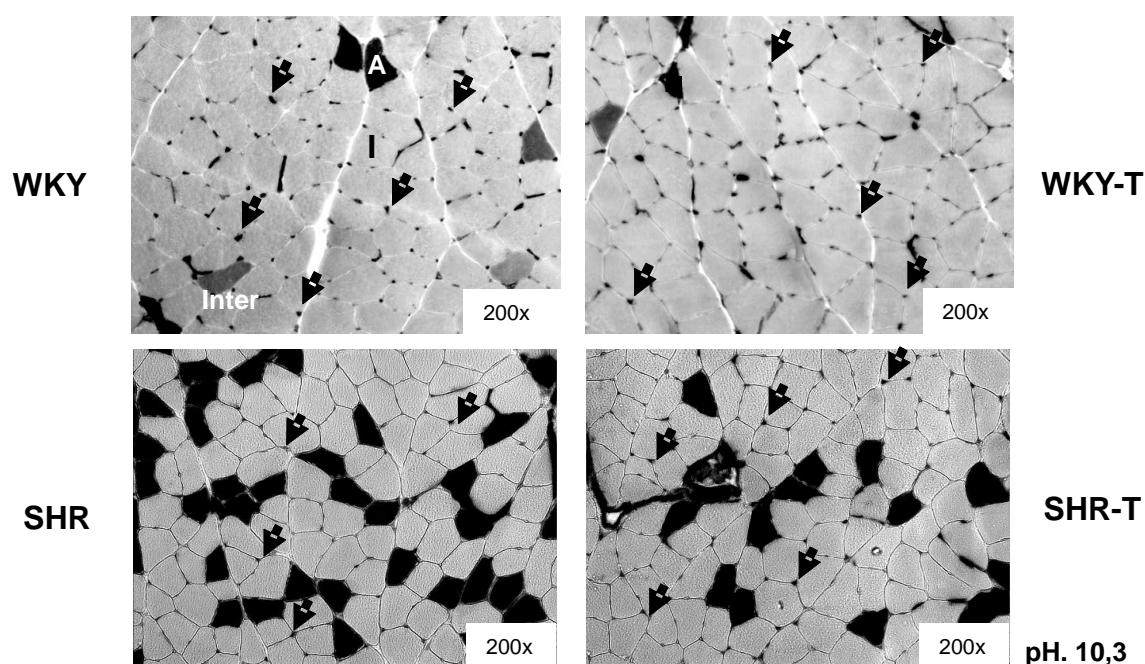


FIGURA 22 – Histoquímica do sóleo pela reação ATPase miosínica. As setas são os capilares, I as fibras tipo I, A as fibras tipo IIa e Inter as intermediárias.

Não foi observado alteração da área de secção transversa nos diferentes tipos de fibra, como as do tipo I (WKY: 2987 ± 52 , WKY-T: 3053 ± 152 , SHR: 2884 ± 145 e SHR-T: $2939 \pm 109 \mu\text{m}^2$), tipo IIa (WKY: 2171 ± 44 , WKY-T: 2167 ± 20 , SHR: 1982 ± 107 e SHR-T: $2149 \pm 47 \mu\text{m}^2$) e Intermediárias (WKY: 1846 ± 169 , WKY-T: 1851 ± 65 , SHR: 1770 ± 160 e SHR-T: $1731 \pm 144 \mu\text{m}^2$) (FIGURA 23A). Entretanto, o TF foi efetivo em recuperar a proporção na distribuição dos tipos de fibras no grupo SHR-T, reduzindo a porcentagem de fibras do tipo IIa (WKY: $4,8 \pm 1,5$; WKY-T: $2,7 \pm 1$; SHR: $18,5 \pm 1,4$ e SHR-T: $11 \pm 0,9$ %) e Intermediárias (WKY: $1,1 \pm 0,2$; WKY-T: $0,88 \pm 0,1$; SHR: $3,9 \pm 0,4$ e SHR-T: $1,9 \pm 0,5$ %) em detrimento ao aumento na porcentagem de fibras do tipo I (WKY: $92,7 \pm 1,5$; WKY-T: $96,5 \pm 1,1$; SHR: $77,5 \pm 1,8$ e SHR-T: $87,2 \pm 1,3$ %), se equiparando ao animal controle (FIGURA 23B).

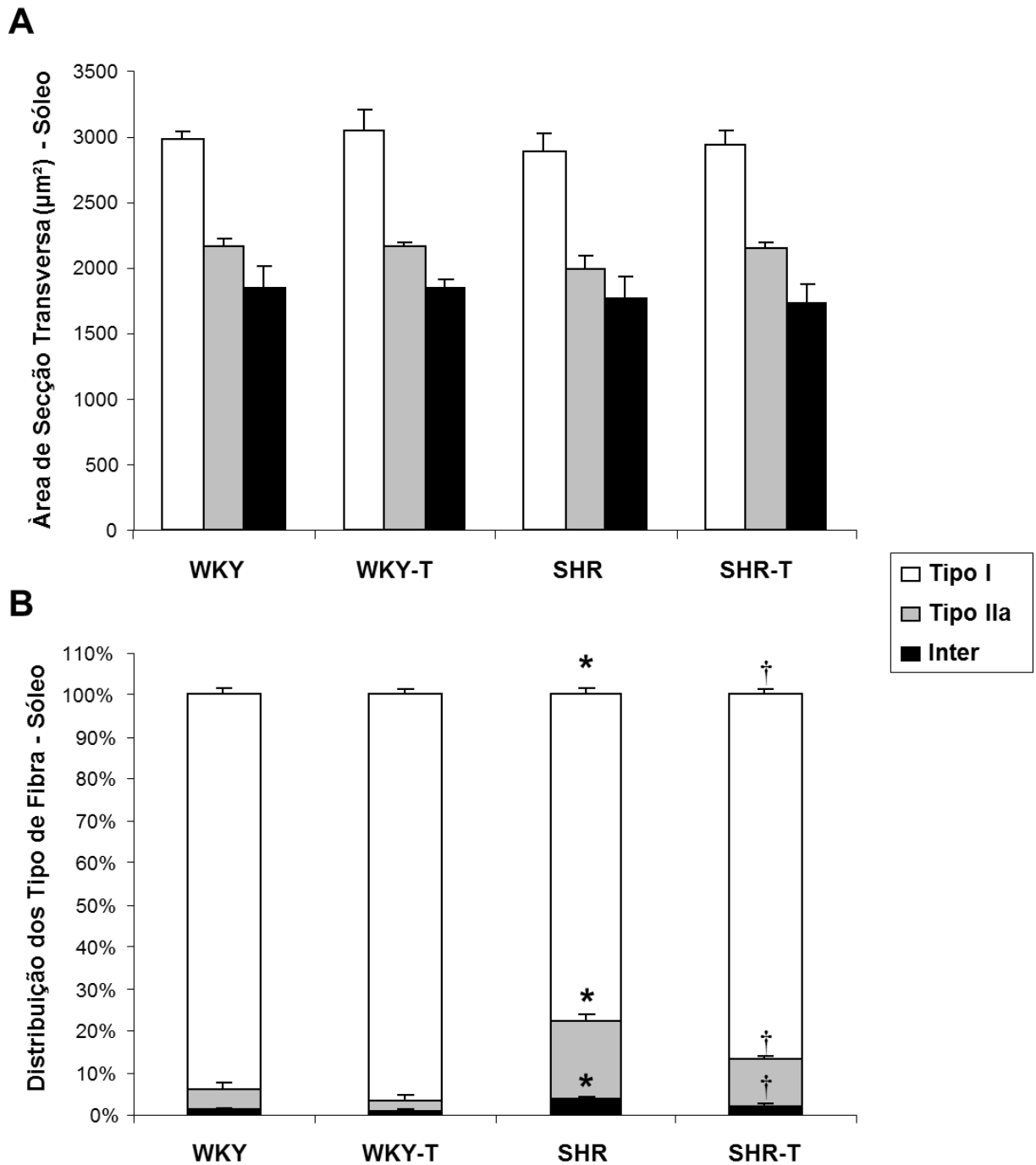


FIGURA 23 – Área de secção transversa das fibras musculares do tipo I, IIa e Intermediárias (Inter) (A) e distribuição dos tipos de fibra (B) pelo método de histoquímica. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM (n=7). * $p < 0,001$ vs. WKY, WKY-T e SHR-T; † $p < 0,01$ vs. WKY-T.

6.8 Determinação da área de secção transversa e tipos de fibra muscular esquelética- imunohistoquímica

Os resultados apresentados acima foram confirmados pela análise de imunohistoquímica. Anticorpo para marcação de laminina possibilitou a análise da área de secção transversa e MHC-I β a análise da proporção de fibras do tipo I do músculo sóleo. O uso de *hoechst* possibilitou a marcação dos núcleos das fibras. Após aquisição das imagens foi possível realizarmos um *merged* das imagens selecionadas (FIGURA 24).

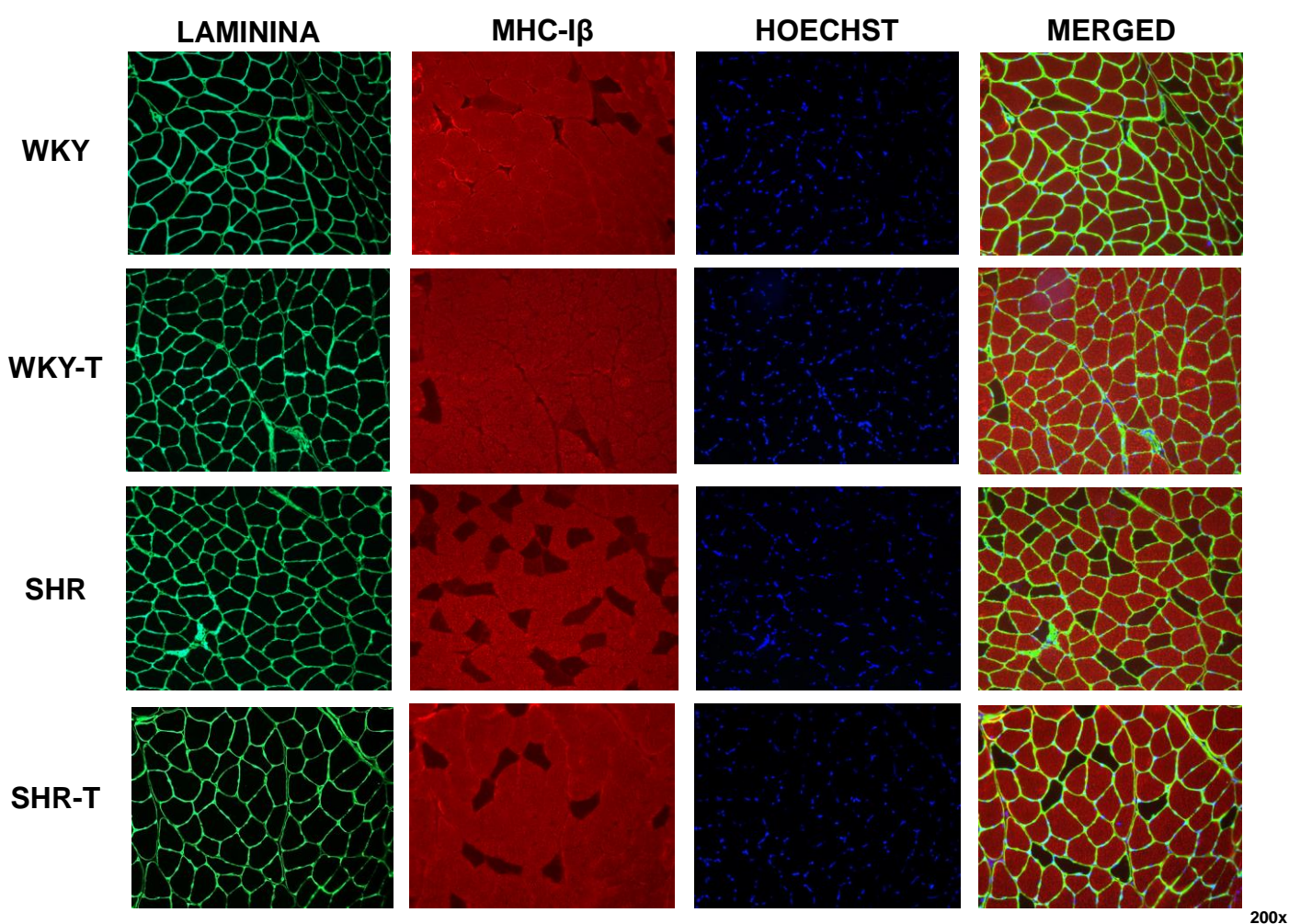


FIGURA 24 – Imagens representativas da caracterização imunohistoquímica do músculo sóleo.

Não foi observado alteração da área de secção transversa nos diferentes tipos de fibra, como as do tipo I (WKY: 3282 ± 72 , WKY-T: 3351 ± 132 , SHR: 3189 ± 115 e SHR-T: $3238 \pm 101 \mu\text{m}^2$), tipo II (WKY: 2390 ± 83 , WKY-T: 2385 ± 81 , SHR: 2203 ± 116 e SHR-T: $2361 \pm 77 \mu\text{m}^2$) e Intermediárias (WKY: 2024 ± 119 , WKY-T: 2033 ± 94 , SHR: 1997 ± 134 e SHR-T: $1938 \pm 123 \mu\text{m}^2$) no músculo sóleo dos 4 grupos estudados (FIGURA 25A). Entretanto, o TF foi efetivo em recuperar a proporção na distribuição dos tipos de fibras no grupo SHR-T, reduzindo a porcentagem de fibras do tipo II (Tipo II - WKY: $4,9 \pm 1,2$; WKY-T: $2,9 \pm 1$; SHR: $19,1 \pm 1,2$ e SHR-T: $9,7 \pm 0,9$ %) e Intermediárias (Inter - WKY: $1,0 \pm 0,1$; WKY-T: $1,3 \pm 0,1$; SHR: $2,8 \pm 0,5$ e SHR-T: $1,3 \pm 0,6$ %) em detrimento ao aumento na porcentagem de fibras do tipo I (Tipo I - WKY: $94,0 \pm 1,2$; WKY-T: $95,8 \pm 1,0$; SHR: $78,1 \pm 1,3$ e SHR-T: $89,0 \pm 1,4$ %), se equiparando ao animal controle (FIGURA 25B).

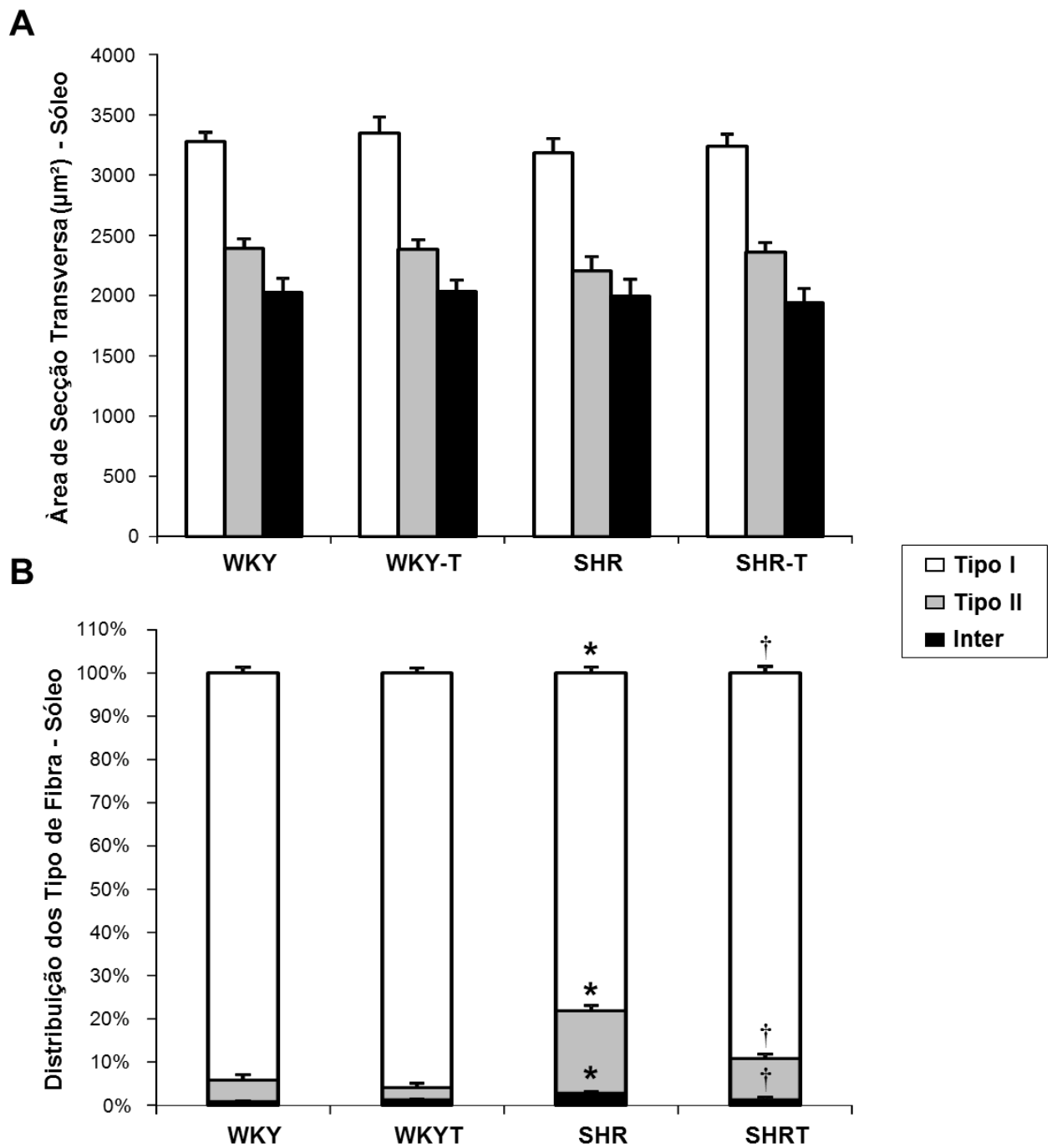


FIGURA 25 – Área de secção transversa das fibras musculares do tipo I, II e Intermediárias (Inter) (A) e distribuição dos tipos de fibra (B) pelo método de imunohistoquímica. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM ($n=7$). * $p < 0,001$ vs. WKY, WKY-T e SHR-T; † $p < 0,01$ vs. WKY-T.

6.9 MiRNAs-208b e -499 muscular: efeito sobre o perfil de fibras

A FIGURA 26A mostra uma redução de 56% na expressão do miRNA-208b no músculo sóleo de SHR comparado ao grupo WKY. Por outro lado, o TF normalizou estes valores no grupo SHR-T, trazendo para valores similares ao do WKY. Similarmente, observa-se uma redução de 34% na expressão do miRNA-499 no músculo sóleo de SHR comparado ao grupo WKY, entretando o TF não foi capaz de reverter estes valores no grupo SHR-T (FIGURA 26B).

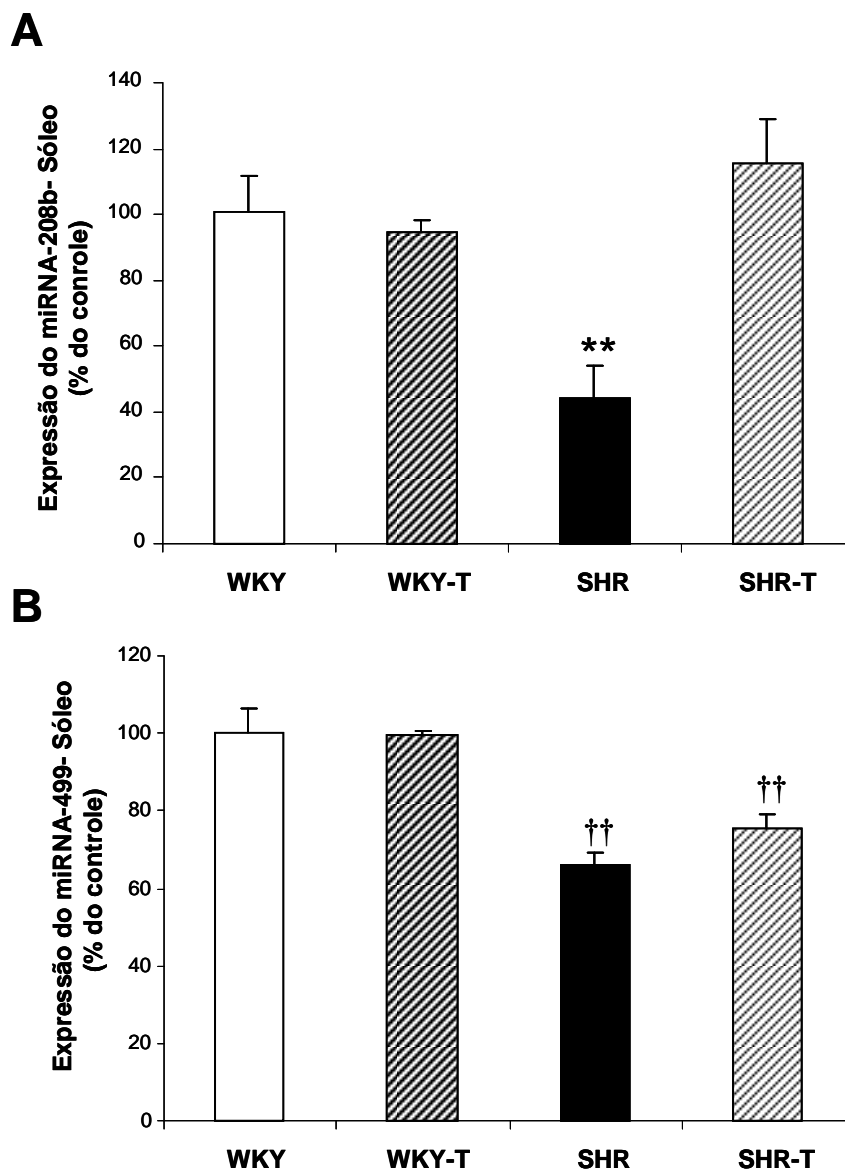


FIGURA 26 – Expressão do miRNA-208b (A) e do miRNA-499 (B) no músculo sóleo. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM (n=7). ** $p < 0,01$ vs. WKY, WKY-T e SHR-T; †† $p < 0,01$ vs. WKY e WKY-T.

6.10 Razão capilar por fibra muscular esquelética

Como esperado, a rarefação capilar foi observada no grupo SHR comparado ao grupo WKY. Por outro lado, o TF foi efetivo em aumentar 47% o número de capilares pela análise da razão capilar por fibra no grupo WKY-T e corrigir a rarefação capilar no grupo SHR-T quando comparados ao grupo WKY (WKY: $1,2 \pm 0,06$; WKY-T: $1,8 \pm 0,04$; SHR: $0,7 \pm 0,02$ e SHR-T: $1,1 \pm 0,04$ nº de capilares/ fibra muscular) (FIGURA 27).

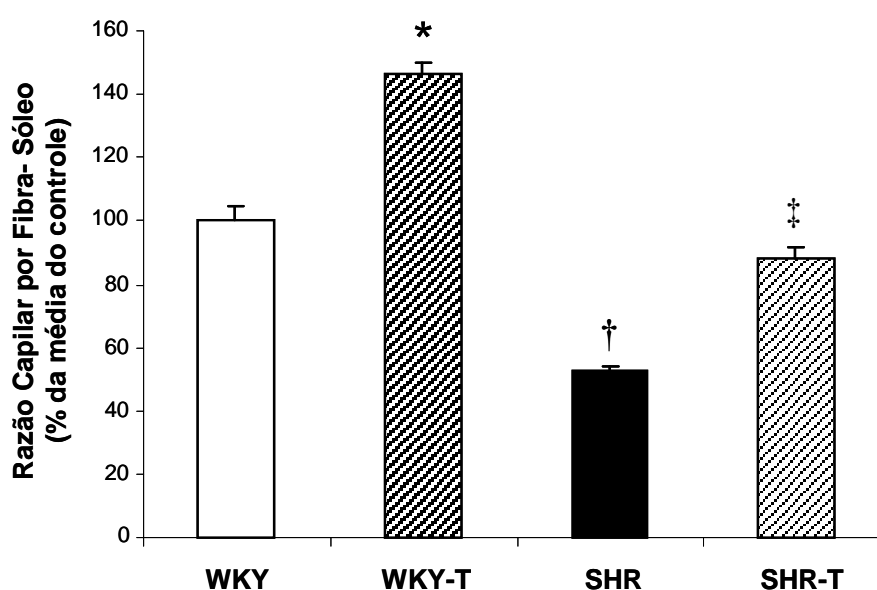


FIGURA 27 – Razão capilar por fibra no músculo sóleo. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM (n=7). * p < 0,05 vs. WKY, SHR e SHR-T; † p < 0,05 vs. WKY, WKY-T e SHR-T, ‡ p < 0,05 vs. WKY-T e SHR.

6.11 MiRNAs-16, -21 e -126 muscular esquelético: efeito no balanço entre a angiogênese e a apoptose

A FIGURA 28A mostra um aumento de 30% nos níveis do miRNA-16 no sóleo de SHR comparado ao grupo WKY. Por outro lado, o TF reduziu 27% a expressão do miRNA-16 no grupo WKY-T e 32% no grupo SHR-T quando comparado ao grupo WKY. Similarmente, observa-se um aumento de 36% nos níveis do miRNA-21 no sóleo de SHR comparado ao grupo WKY, e o TF reduziu os

níveis desse miRNA no grupo SHR-T para níveis semelhantes ao do controle (FIGURA 28B). Além disso, os níveis do miRNA-126 foi reduzido 29% no grupo SHR e o TF elevou estes níveis no grupo SHR-T para níveis controles como o do grupo WKY (FIGURA 28C).

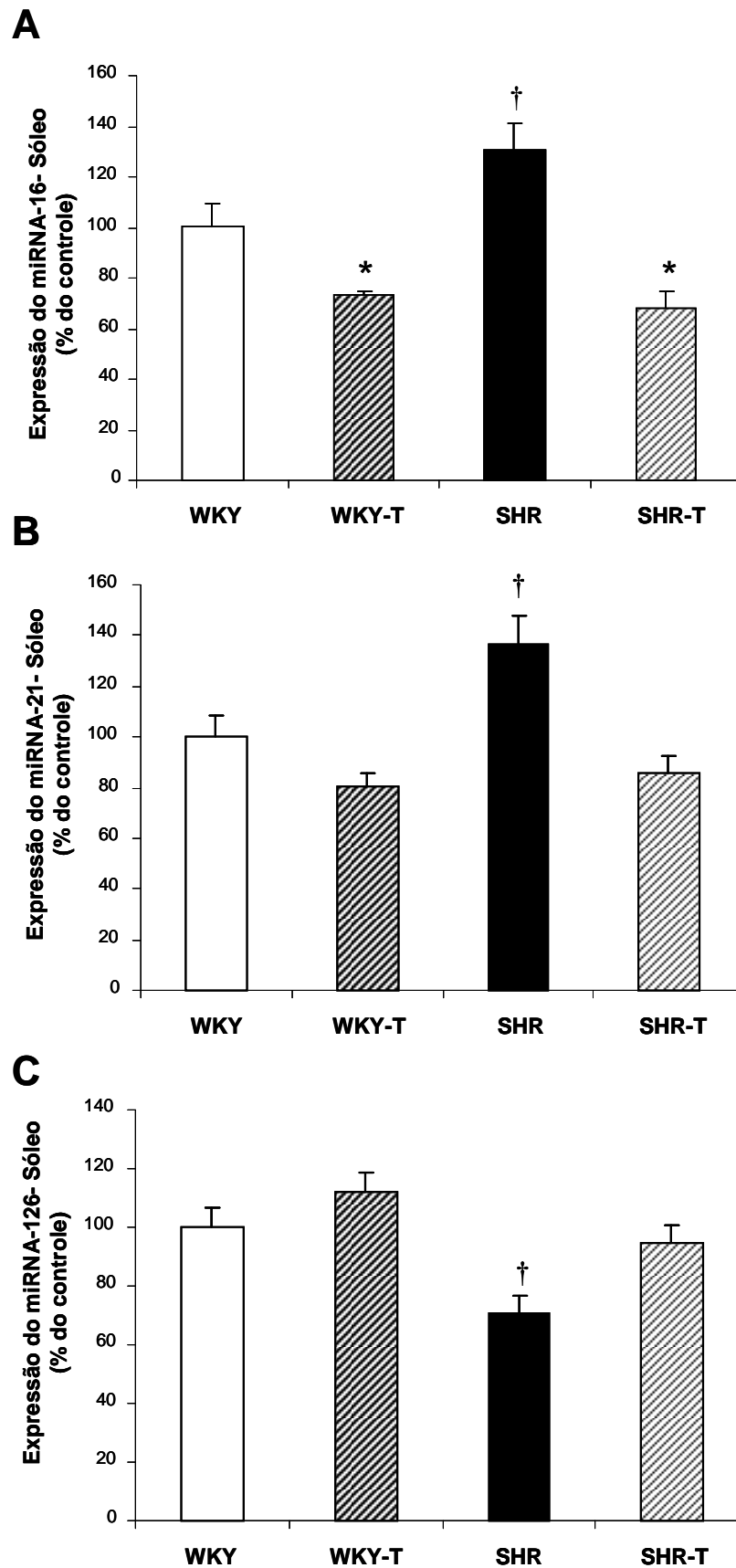


FIGURA 28 – Expressão do miRNA-16 (A), miRNA-21 (B) e miRNA-126 no músculo sóleo. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM (n=7). * $p < 0,05$ vs. WKY e SHR; † $p < 0,05$ vs. WKY, WKY-T e SHR-T.

6.12 MiRNAs-221 e -222 muscular esquelético: efeito na eNOS e c-Kit

Não foi observado alteração na expressão dos miRNAs-221 e -222 no grupo SHR comparado ao grupo WKY. Entretanto, o TF foi eficaz em reduzir a expressão desses dois miRNAs nos grupos WKY-T e SHR-T, mostrando responsividade ao TF independente da patologia (FIGURA 29A e B).

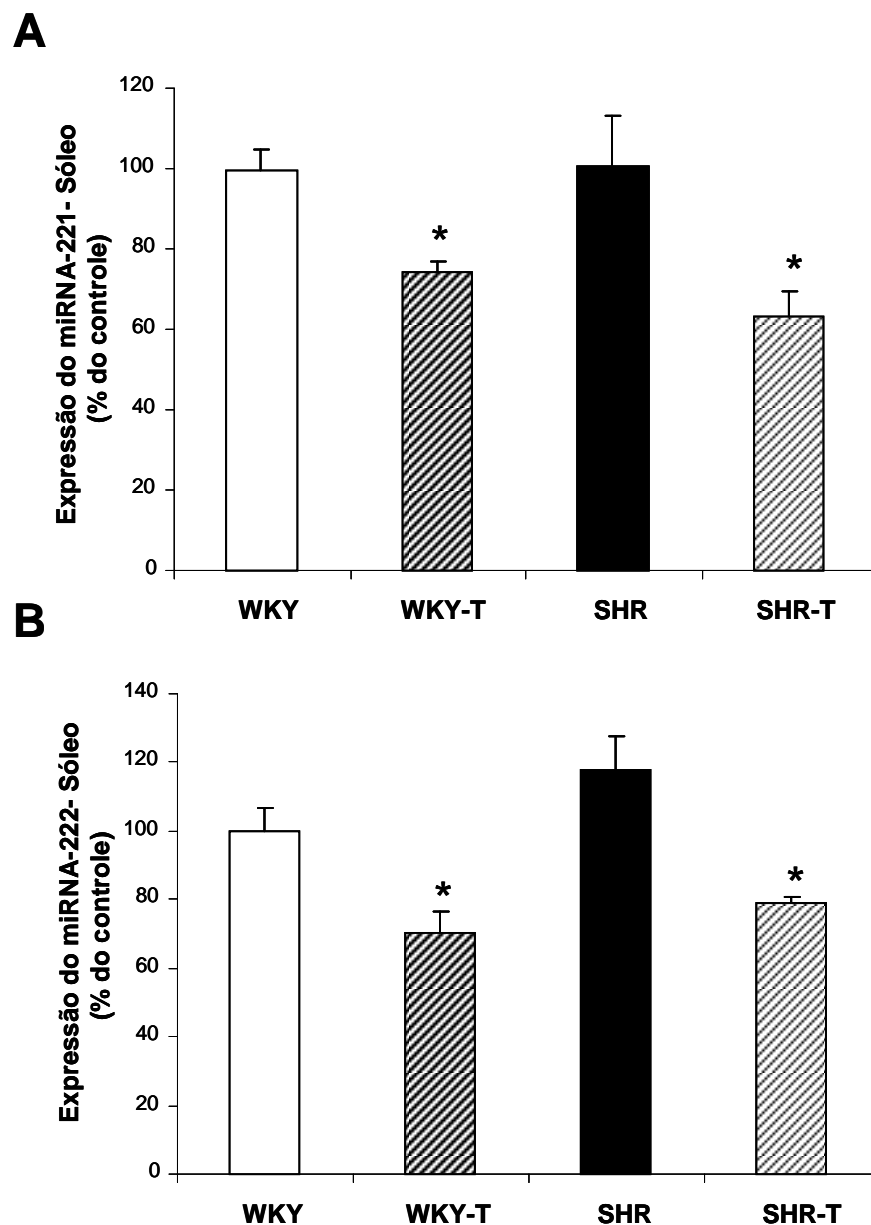


FIGURA 29 – Expressão do miRNA-221 (A) e miRNA-222 (B) no músculo sóleo. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM (n=7). * $p < 0,05$ vs. WKY e SHR.

6.13 Fatores angiogênicos na hipertensão arterial: papel do treinamento físico

A FIGURA 30 mostra os níveis protéicos avaliados por *western blot* de VEGF, VEGFR1, VEGFR2 e eNOS no músculo sóleo; além da expressão gênica de PI3KR2. Comparado ao grupo WKY sedentário, o TF aumentou os níveis protéicos periféricos de VEGF e VEGFR2 no grupo WKY-T (FIGURA 30B e C, respectivamente). Por outro lado, os níveis protéicos de VEGF no grupo SHR foram significativamente menores comparado aos níveis protéicos do grupo WKY, porém o TF conseguiu restaurar os níveis de VEGF no grupo SHR-T (FIGURA 30B). Além disso, a recuperação de VEGF no grupo SHR-T foi acompanhado por um aumento nos níveis protéicos do VEGFR2 (FIGURA 30C). Entretanto, não existiu nenhuma diferença significativa nos níveis protéicos do VEGFR1 entre todos os grupos estudados (FIGURA 30D).

Interessantemente, como mostrado na FIGURA 30E, e similar ao comportamento dos níveis protéicos de VEGF, foram os resultados obtidos para os níveis protéicos de eNOS, indicando que VEGF e eNOS poderiam atuar sinergicamente para um apropriado crescimento vascular. O alvo do miRNA-126, o gene da PI3KR2, foi aumentado em 51% no grupo SHR comparado ao grupo WKY, porém o TF reduziu os níveis de PI3KR2 no grupo SHR-T para níveis controles. Além disso, o TF reduziu 39% a expressão de PI3KR2 quando comparado ao grupo WKY (FIGURA 30F).

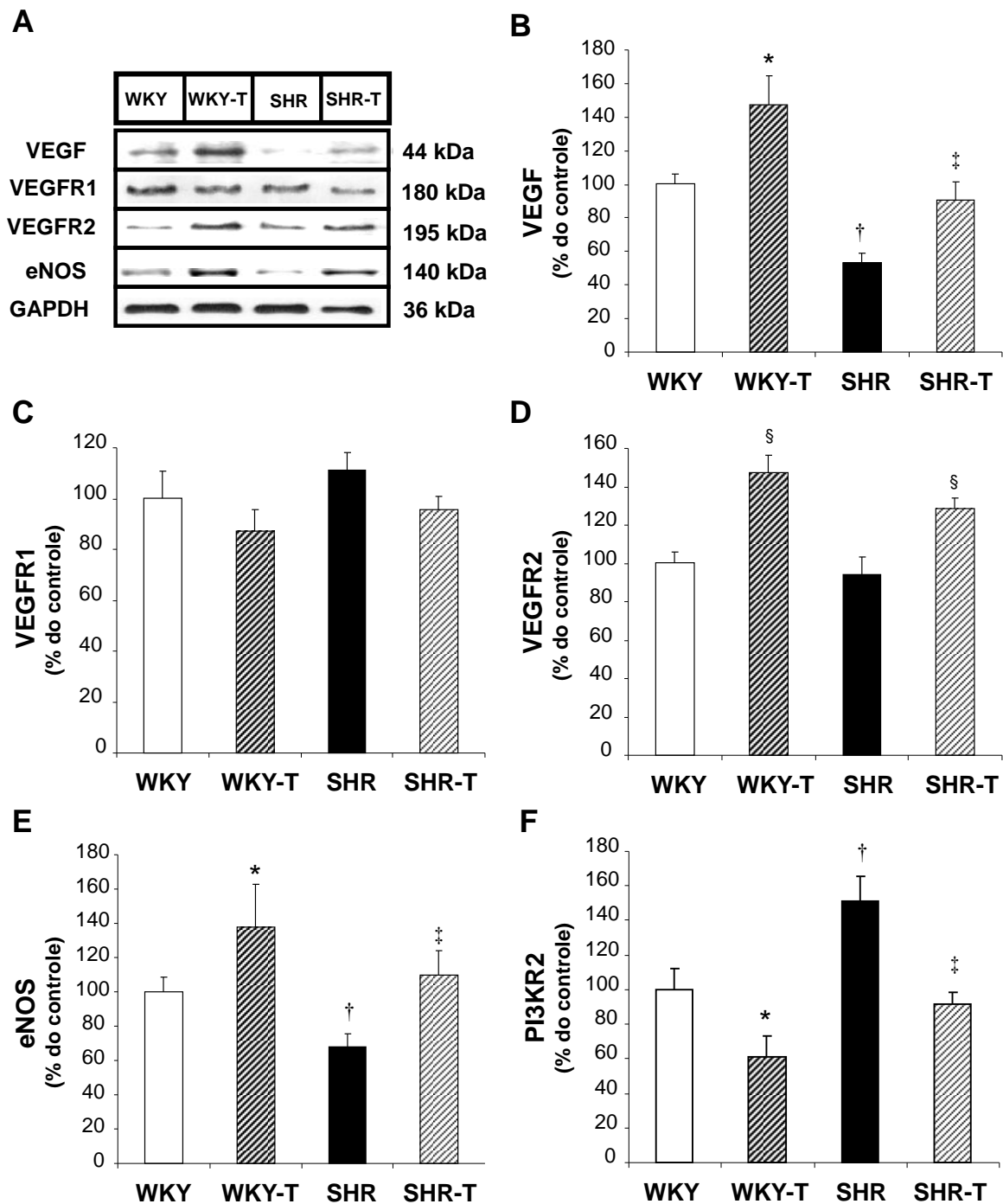


FIGURA 30 – Efeito do TF aeróbio sobre os fatores angiogênicos na HA. Blots representativos de VEGF, VEGFR1, VEGFR2, eNOS e GAPDH (A). Níveis protéicos de VEGF, VEGFR1, VEGFR2 e eNOS no músculo sóleo analisados por western blot, respectivamente (B-E). Expressão gênica de PI3KR2 (F). As bandas alvo foram normalizadas pela proteína GAPDH. Os resultados estão expressos como média \pm EPM (n=7). * p < 0,05 vs. WKY, SHR e SHR-T; † p < 0,05 vs. WKY, WKY-T e SHR-T; ‡ p < 0,05 vs. WKY-T e SHR; § p < 0,05 vs. WKY e SHR.

6.14 Fatores anti e pró-apoptóticos na hipertensão arterial: papel do treinamento físico

A FIGURA 31 mostra os níveis protéicos avaliados por *western blot* de Bcl-2, Bcl-x, Bad e p-Bad_{ser112} no músculo sóleo. Os níveis protéicos das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-x foram similares entre os grupos WKY e WKY-T (FIGURA 31B e C, respectivamente). Além disso, nenhuma mudança nos níveis protéicos da proteína pró-apoptótica Bad assim como no seu sítio de fosforilação na Serina 112 foram observadas no grupo WKY-T comparado ao seu controle sedentário WKY (FIGURA 31D e E, respectivamente). Em contraste, o grupo SHR apresentou um pronunciado aumento nos níveis protéicos da proteína pró-apoptótica Bad e diminuição desses níveis no seu sítio de fosforilação Serina 112, bem como da razão p-Bad_{ser112}/Bad comparados ao grupo WKY (FIGURA 31D, E e F, respectivamente); acompanhados por uma redução dos níveis protéicos das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-x (FIGURA 31B e C, respectivamente). Interessantemente, como mostrado pelas FIGURAS 31A-F, o TF restaurou os níveis protéicos das proteínas anti e pró-apoptóticas no grupo SHR-T, trazendo para valores similares ao grupo controle.

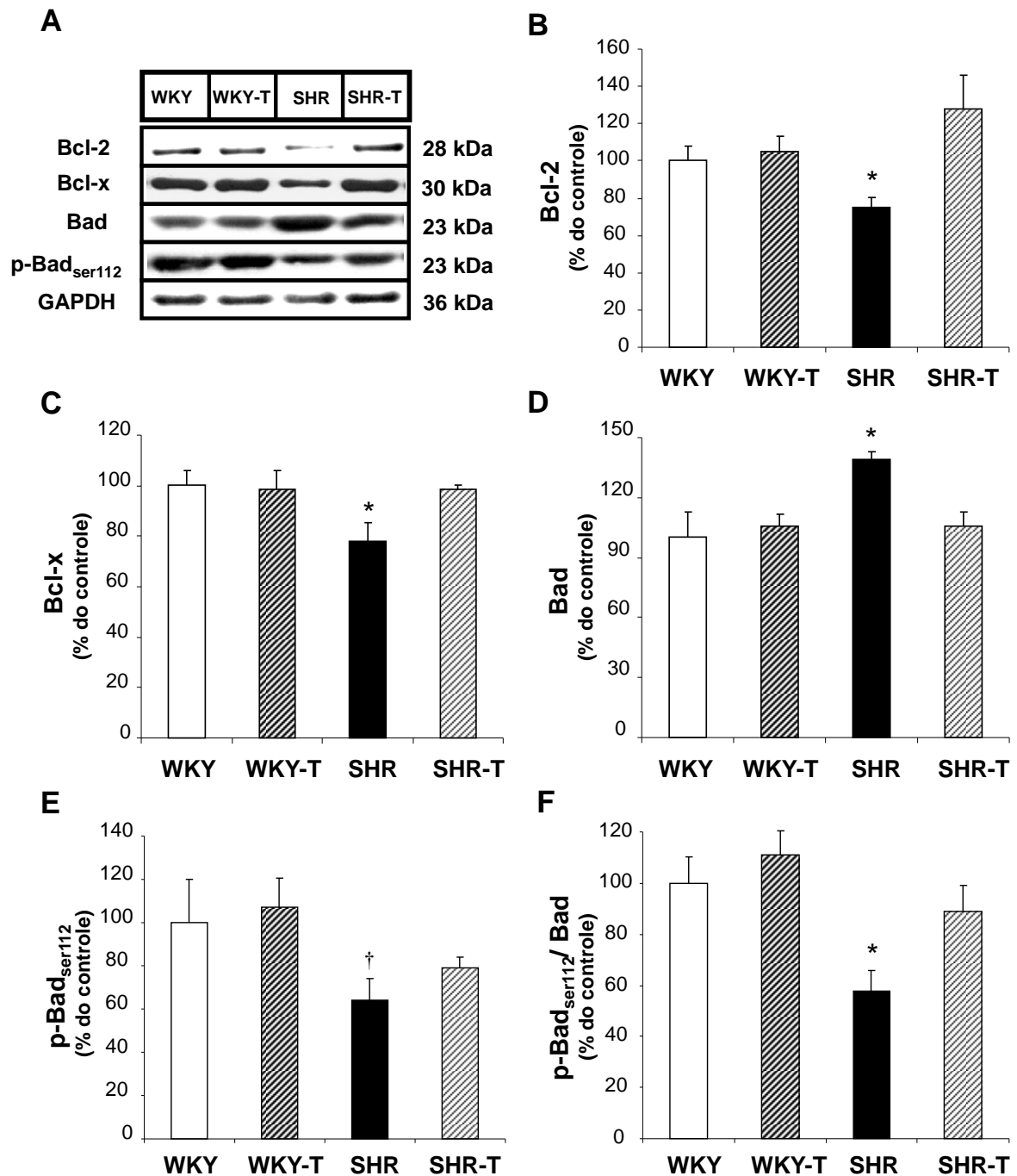


FIGURA 31 – Efeito do TF aeróbio sobre as proteínas regulatórias da apoptose no músculo esquelético na HA. Blots representativos de Bcl-2, Bcl-x, Bad, p-Bad_{ser112} e GAPDH de WKY, WKY-T, SHR, SHR-T (A). Níveis protéicos de Bcl-2, Bcl-x, Bad e p-Bad_{ser112} no músculo sóleo analisados por western blot, respectivamente (B-F). As bandas alvo foram normalizadas pela proteína GAPDH. Os resultados estão expressos como média \pm EPM (n=7). * p< 0,05 vs. WKY, WKY-T e SHR-T; † p< 0,05 vs. WKY e WKY-T.

QUADRO 1- Resumo dos principais resultados descritos na 1ª etapa do estudo

Respostas Morfofuncionais e Hemodinâmicas			
Variáveis	WKY-T	SHR	SHR-T
Função Cardíaca	↔	↔	↑ ↑
Massa Cardíaca	↑	↑	↑ ↔
Pressão Arterial	↔	↑	↑ ↓
Frequência Cardíaca	↓	↔	↓ ↓
Tolerância aos esforços e VO ₂	↑	↔	↑ ↑
Respostas Musculares e Vasculares induzidas pela HA e TF aeróbio			
Variáveis	WKY-T	SHR	SHR-T
Atividade da citrato sintase	↑	↔	↑ ↑
Massa muscular	↔	↔	↔ ↔
AST fibras tipo I	↔	↔	↔ ↔
AST fibras tipo II	↔	↔	↔ ↔
AST fibras Intermediárias	↔	↔	↔ ↔
% de fibras tipo I	↔	↓	↔ ↑
% de fibras tipo II	↔	↑	↔ ↓
% de fibras Intermediárias	↔	↑	↔ ↓
Expressão miRNA-208b	↔	↓	↔ ↑
Expressão miRNA-499	↔	↓	↓ ↔
Razão capilar por fibra	↔	↓	↔ ↑
Expressão miRNA-16	↓	↑	↔ ↓
Expressão miRNA-21	↔	↑	↔ ↓
Expressão miRNA-126	↔	↓	↔ ↑
Expressão protéica VEGF	↑	↓	↔ ↑
Expressão protéica VEGFR1	↔	↔	↔ ↔
Expressão protéica VEGFR2	↑	↔	↑ ↑
Expressão protéica eNOS	↑	↓	↔ ↑
Expressão gênica PI3KR2	↓	↑	↔ ↓
Expressão protéica Bcl-2	↔	↓	↔ ↑
Expressão protéica Bcl-x	↔	↓	↔ ↑
Expressão protéica pBad/Bad	↔	↓	↔ ↑

↔ não muda, ↓ reduz e ↑ aumenta vs. WKY
 ↔ não muda, ↓ reduz e ↑ aumenta vs. SHR

7 RESULTADOS- 2ª ETAPA

Nesta seção descreveremos os resultados da 2ª etapa do projeto com animais de 6 meses de idade no início do protocolo.

7.1 Massa corporal

A FIGURA 32A mostra a MC dos grupos pré e pós protocolo de TF aeróbio em animais com 6 meses de idade no início do protocolo. Não houve diferença da MC no início do protocolo entre os grupos (Pré TF - WKY: $334 \pm 5,3$; WKY-T: $322 \pm 4,2$; SHR: $316 \pm 5,8$; SHR-T: $321 \pm 6,5$ g). Entretanto, foi observado uma manutenção da MC nos grupos WKY-T e SHR-T ao final de 10 semanas de TF em comparação aos grupos sedentários WKY e SHR; em que apresentaram um aumento de maneira significativa ao final do protocolo experimental (Pós TF - WKY: $357,9 \pm 7,8$; WKY-T: $335 \pm 5,3$; SHR: $334 \pm 9,2$; SHR-T: $322 \pm 6,0$ g).

Similar ao observado com os animais de 3 meses de idade no início do protocolo, o menor ganho de MC pós TF aeróbio pode ser atribuído ao fato do exercício elevar o metabolismo basal devido a um aumento do gasto calórico com uso predominante do metabolismo oxidativo e redução do tecido adiposo (TOTH & POCHLMAN, 1996). Após o sacrifício foi feita a remoção da gordura reto peritoneal dos animais, sendo pesada e corrigida pelo comprimento da tíbia, conforme ilustrado na FIGURA 32B. Foi observado uma redução na quantidade de tecido adiposo nos animais treinados e em SHR comparado ao grupo WKY, explicando em parte esse menor ganho da MC ao final do período experimental (Pós TF - WKY: 154 ± 11 , WKY-T: 82 ± 7 , SHR: 74 ± 9 , SHR-T: 45 ± 8 mg/mm).

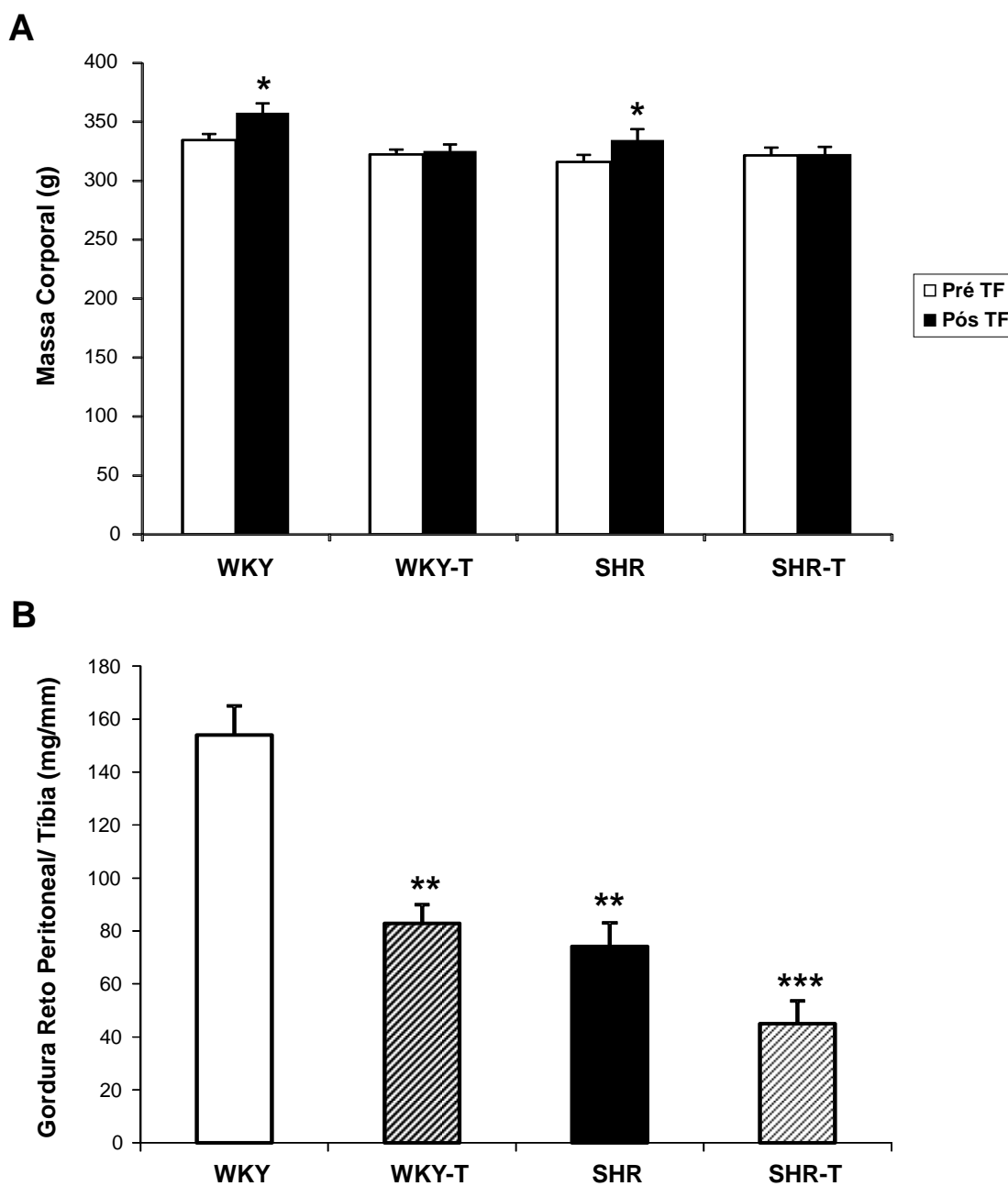


FIGURA 32 - Massa corporal e gordura reto peritoneal. Resultados da massa corporal pré e pós TF de natação (A) representado em gramas (g) e da medida da gordura reto peritoneal pós período de TF (B) corrigido pelo comprimento da tibia (mg/mm). Os dados estão representados na forma de média \pm EPM (n=14). * vs. Pré-TF, WKY-T e SHR-T Pós-TF, $p < 0,05$; ** vs. WKY, $p < 0,01$ e *** vs. WKY, $p < 0,001$.

7.2 Parâmetros hemodinâmicos: pressão arterial e frequência cardíaca

Na FIGURA 33A, pré TF, podemos observar que os grupos de SHR apresentavam níveis elevados de PAS ($207 \pm 5,5$ mmHg), PAD ($159 \pm 2,5$ mmHg) e PAM ($173 \pm 3,6$ mmHg) comparados ao grupo controle, WKY ($133 \pm 3,9$; $104 \pm 2,9$; $114 \pm 2,4$ mmHg, respectivamente). Não foi encontrada alterações da FC entre os grupos pré TF (WKY: 393 ± 11 ; WKY-T: 397 ± 9 SHR: 404 ± 11 ; SHR-T: 405 ± 11 bpm).

Pós TF, representado pela FIGURA 33B, observa-se que o TF de natação reduziu a PAS, PAD e a PAM do grupo SHR-T ($178 \pm 1,2$; $120 \pm 2,2$; $142 \pm 2,7$ mmHg, respectivamente) comparado ao grupo SHR ($197 \pm 3,3$; $140 \pm 6,8$; $159 \pm 5,6$ mmHg, respectivamente), sem nenhuma alteração da PAS, PAD e PAM nos grupos de animais controle, WKY ($131 \pm 2,2$; $91 \pm 2,5$; $105 \pm 2,3$ mmHg, respectivamente). Além disso, observamos uma bradicardia de repouso nos grupos WKY-T e SHR-T quando comparados aos grupos mantidos sedentário no mesmo período experimental (Pós TF- WKY: 438 ± 6 ; WKY-T: $401 \pm 4,1$; SHR: $437 \pm 5,5$; SHR-T: $403 \pm 3,3$ bpm).

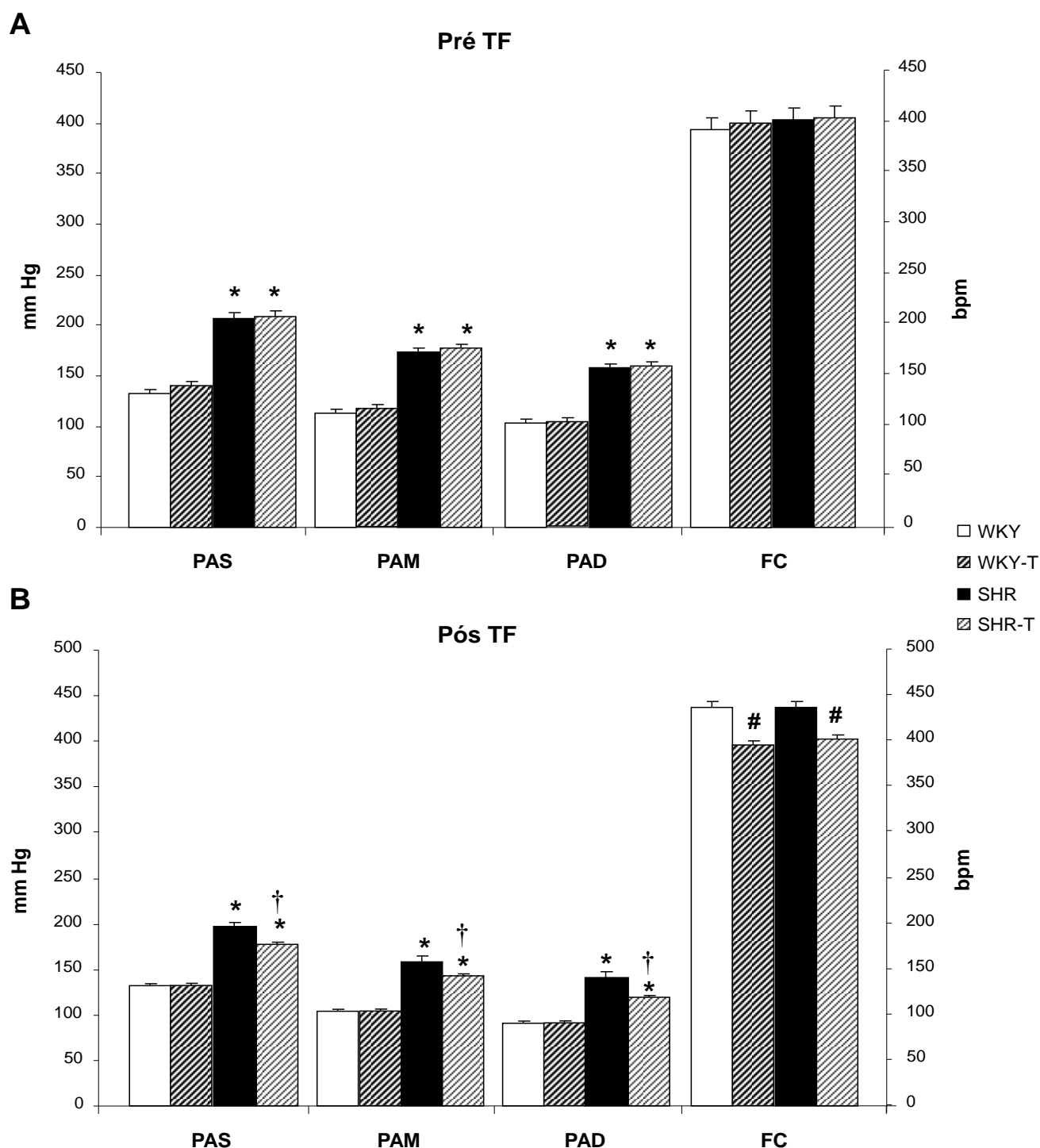


FIGURA 33 – Parâmetros Hemodinâmicos. Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Diastólica (PAD), Pressão Arterial Média (PAM) e Frequência Cardíaca (FC) de repouso Pré TF (A) e Pós TF (B). Os resultados estão expressos como média \pm EPM (n=14). * $p < 0,001$ vs. WKY e WKY-T; † $p < 0,01$ vs. SHR; # $p < 0,01$ vs. WKY e SHR.

7.3 Medida do consumo de oxigênio de pico

A FIGURA 34 mostra o VO_2 pico dos animais pré e pós o protocolo experimental. No período Pré TF observa-se que todos os grupos tinham o mesmo nível de VO_2 pico, entretanto, pós período experimental, observa-se uma redução do VO_2 pico no grupo SHR, mostrando que a HA crônica com 9 meses de idade ao final do protocolo promove uma intolerância a realização do esforço físico máximo, não observado nos animais hipertensos jovens com 6 meses de idade ao final do protocolo. Pós TF observa-se a eficácia do treinamento em aumentar os níveis de VO_2 pico no grupo WKY-T e normalizar os valores no grupo SHR-T comparados ao grupo WKY (Pós TF- WKY: $62 \pm 1,5$; WKY-T: $69 \pm 2,1$; SHR: $53 \pm 2,5$; SHR-T: $68 \pm 2,6 \text{ mL. kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

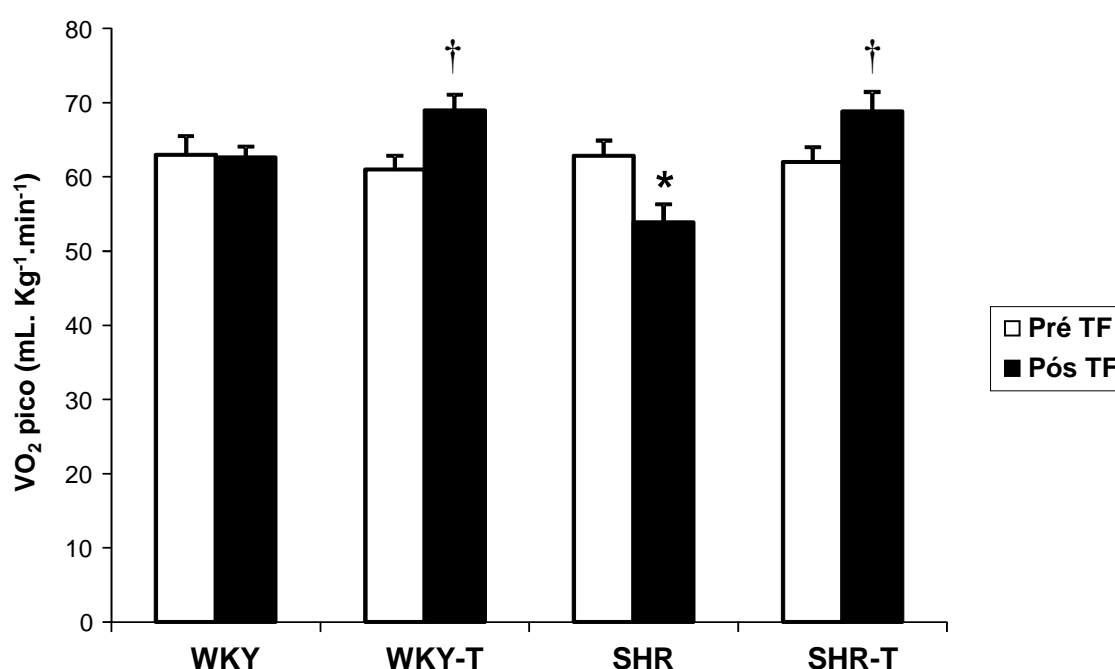


FIGURA 34 – Consumo de oxigênio pico pré e pós TF. Os resultados estão expressos como média \pm EPM (n=14). * vs. Pré TF e WKY, WKY-T e SHR-T Pós TF, $p < 0,05$; † vs. Pré e WKY e SHR Pós TF.

7.4 Atividade da enzima citrato sintase

A FIGURA 35 mostra que houve um aumento da atividade da enzima citrato sintase no músculo sóleo de WKY-T e SHR-T em relação aos grupos controle que se mantiveram sedentários (WKY: $83,3 \pm 4$, WKY-T: 117 ± 9 ; SHR: $71,7 \pm 6$ e SHR-T: $93,3 \pm 8$ nmol. min⁻¹. mg proteína⁻¹). Embora não estatístico, observamos uma redução de 14% na atividade da enzima em SHR comparado ao WKY, o que poderia contribuir para redução do metabolismo oxidativo muscular e do VO₂ pico em SHR.

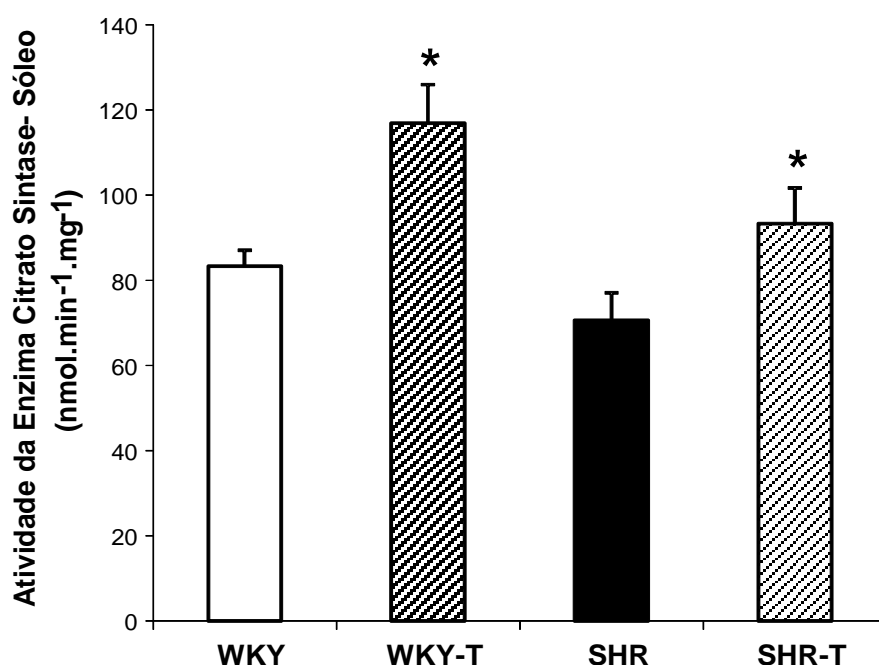


FIGURA 35 – Atividade da enzima citrato sintase no músculo sóleo representada em valores de nmol. min⁻¹. mg de proteína⁻¹. Resultados expressos como média ± EPM (n=7). * vs. WKY e SHR, p< 0,05.

7.5 Massa dos tecidos

A TABELA 6 mostra a massa de diferentes tecidos dos 4 grupos estudados, tais como, músculos sóleo, plantáris, gastrocnêmio e tibial anterior, do VE e do ventrículo direito (VD), do átrio, do pulmão, do fígado e das adrenais. Os valores de massa (mg) foram corrigidos pelo comprimento da tíbia (mm) e para o

músculo tibial anterior e o pulmão também foi calculado a razão peso úmido pelo peso seco dos tecidos.

Diferente do observado nos animais ao final dos 6 meses de idade em que não houve modificação da massa muscular esquelética nos 3 tipos de músculos estudados, ao final de 9 meses de HA já observamos uma atrofia muscular no sóleo, plantáris, gastrocnêmio e tibial anterior. Interessantemente, o TF corrigiu a perda de massa muscular em todos os músculos. Além disso, observa-se nessa idade uma hipertrofia ventricular esquerda de maior magnitude. Não observamos alteração de massa no VD. Entretanto, o TF levou uma hipertrofia dos átrios no grupo SHR-T comparados aos outros grupos.

Foi verificado aumento da massa do pulmão, fígado e adrenais nos grupos SHR e SHR-T quando comparados ao grupo controle WKY. Além disso, foi observado um aumento da razão do peso úmido pelo peso seco de pulmão indicando um quadro de edema pulmonar em SHR de 9 meses de idade.

TABELA 6 – Massa tecidual. Resultados expressos como média \pm EPM (n=7). * $p < 0,05$ vs. WKY, WKY-T e SHR-T, ** $p < 0,01$ vs. WKY e WKY-T, # $p < 0,05$ vs. WKY, † $p < 0,05$ vs. WKY e SHR, ‡ $p < 0,05$ vs. WKY e WKY-T.

Parâmetros	WKY	WKY-T	SHR	SHR-T
Sóleo (mg/mm)	3,92 \pm 0,1	3,98 \pm 0,1	3,23 \pm 0,3*	3,93 \pm 0,1
Plantáris (mg/mm)	8,23 \pm 0,2	8,56 \pm 0,2	7,13 \pm 0,2*	8,16 \pm 0,2
Gastrocnêmio (mg/mm)	39,21 \pm 0,4	38,82 \pm 0,6	36,13 \pm 0,6*	38,94 \pm 0,9
Tibial Anterior (mg/mm)	16,66 \pm 0,6	16,32 \pm 0,2	15,06 \pm 0,4*	16,22 \pm 0,4
Tibial Anterior (peso úmido/peso seco)	3,65 \pm 0,1	3,65 \pm 0,02	3,32 \pm 0,05	3,64 \pm 0,03
Ventrículo Esquerdo (mg/mm)	21,6 \pm 0,5	23,58 \pm 0,5#	29,19 \pm 0,4**	29,15 \pm 0,3**
Ventrículo Direito (mg/mm)	6,62 \pm 0,4	7,08 \pm 0,4	6,1 \pm 0,4	6,73 \pm 0,2
Átrios (mg/mm)	1,45 \pm 0,1	1,65 \pm 0,1#	1,37 \pm 0,05	2 \pm 0,2†
Pulmão (mg/mm)	45,48 \pm 1,8	49,97 \pm 2	59 \pm 2‡	61,8 \pm 3‡
Pulmão (peso úmido/peso seco)	4,04 \pm 0,09	4,14 \pm 0,07	4,74 \pm 0,07‡	4,72 \pm 0,12‡
Fígado (mg/mm)	248,8 \pm 7	240,9 \pm 6	371,7 \pm 8‡	358,4 \pm 9‡
Adrenais (mg/mm)	0,97 \pm 0,05	1,0 \pm 0,03	1,37 \pm 0,12‡	1,22 \pm 0,11‡

7.6 Avaliação ecocardiográfica

Os parâmetros estruturais cardíacos são mostrados na TABELA 7. O diâmetro diastólico (DDVE) e o diâmetro sistólico (DSVE) do VE foram similares entre os grupos. A parede septal e posterior e a espessura relativa da parede (ERP) do VE foram maiores no SHR e SHR-T comparados ao grupo WKY. O TF reduziu parte do tamanho da parede septal e posterior no grupo SHR-T comparado ao grupo SHR.

TABELA 7 – Dados ecocardiográficos. Resultados expressos como média \pm EPM (n=7). \ddagger p < 0,05 vs. WKY e WKY-T, # p < 0,05 vs. SHR, \dagger p < 0,05 vs. WKY. DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo, DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo, ERP: espessura relativa da parede.

Parâmetros	WKY	WKY-T	SHR	SHR-T
Septo (mm)	1,74 \pm 0,07	1,69 \pm 0,06	2,21 \pm 0,12 \ddagger	1,91 \pm 0,04 \ddagger #
Parede Posperior (mm)	1,64 \pm 0,09	1,65 \pm 0,05	2,27 \pm 0,11 \ddagger	2,06 \pm 0,05 \ddagger #
DDVE (mm)	5,76 \pm 0,12	5,37 \pm 0,20	5,39 \pm 0,14	5,45 \pm 0,13
DSVE (mm)	2,86 \pm 0,24	2,89 \pm 0,28	2,58 \pm 0,11	2,59 \pm 0,17
ERP	0,55 \pm 0,03	0,62 \pm 0,02 \dagger	0,81 \pm 0,07 \ddagger	0,82 \pm 0,06 \ddagger

Os resultados da avaliação funcional do VE são mostrados na TABELA 8. A fração de ejeção (FEj) foi reduzida no grupo SHR comparado ao grupo controle. O volume sistólico final (VSF) e o volume diastólico final (VDF) foram aumentados no

grupo SHR comparados ao grupo WKY. O TF conseguiu normalizar os valores de FE e VDF no grupo SHR-T, melhorando a função sistólica.

Os valores referentes a onda A e a onda E e a razão E/A estavam alterados no SHR comparados ao WKY. Além disso, também foi observado uma redução no tempo de ejeção (TE), um aumento no tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) e um aumento no índice de performance miocárdica (IPM) no SHR comparado ao WKY. Notavelmente, o TF aeróbio conseguiu normalizar os valores de E/A, TE, TRIV e IPM no grupo SHR-T, trazendo para valores similares ao grupo WKY, contribuindo para uma melhora da complacência ventricular e uma melhora global nas funções sistólica e diastólica do VE.

TABELA 8 – Função sistólica e diastólica ventricular esquerda. Resultados expressos como média \pm EPM (n=7). * $p < 0,05$ vs. WKY, WKY-T e SHR-T, ‡ $p < 0,05$ vs. WKY e WKY-T, # $p < 0,05$ vs. SHR. FEj: fração de ejeção, VSF: volume sistólico final, VDF: volume diastólico final, TD: tempo de desaceleração da onda E, TE: tempo de ejeção, TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico, IPM: índice de performance miocárdica.

Parâmetros	WKY	WKY-T	SHR	SHR-T
FEj (%)	79,1 \pm 2,4	80,3 \pm 2,1	68,7 \pm 1,3*	79,6 \pm 1,5
VSF (cm ³)	0,06 \pm 0,006	0,05 \pm 0,004	0,09 \pm 0,01‡	0,09 \pm 0,01‡
VDF (cm ³)	0,26 \pm 0,02	0,27 \pm 0,03	0,38 \pm 0,02*	0,29 \pm 0,02
Onda E (cm/s)	82,9 \pm 2,5	81,0 \pm 3,1	61,8 \pm 3,4‡	59,6 \pm 2,4‡
Onda A (cm/s)	36,9 \pm 2,8	35,9 \pm 1,6	24,0 \pm 3,3‡	26,9 \pm 3,9‡
E/A	2,2 \pm 0,1	2,2,0 \pm 0,1	3,1 \pm 0,3*	2,2 \pm 0,2
TDE (ms)	58,6 \pm 1,8	58,8 \pm 2,5	52,7,0 \pm 4,0	57,7 \pm 3,2
TE (ms)	79,0 \pm 1,8	79,1 \pm 0,8	72,8 \pm 1,4*	81,0 \pm 2,0
TRIV (ms)	26,1 \pm 1,9	28,4 \pm 1,1	43,2 \pm 2,2‡	36,7,±2,0‡#
IPM	0,56 \pm 0,02	0,55 \pm 0,02	0,75 \pm 0,04*	0,65 \pm 0,04

7.7 Determinação da área de secção transversa e tipos de fibra muscular esquelética- histoquímica

A FIGURA 36 mostra as imagens representativas da caracterização histoquímica do músculo sóleo pela reação ATPase miosínica.

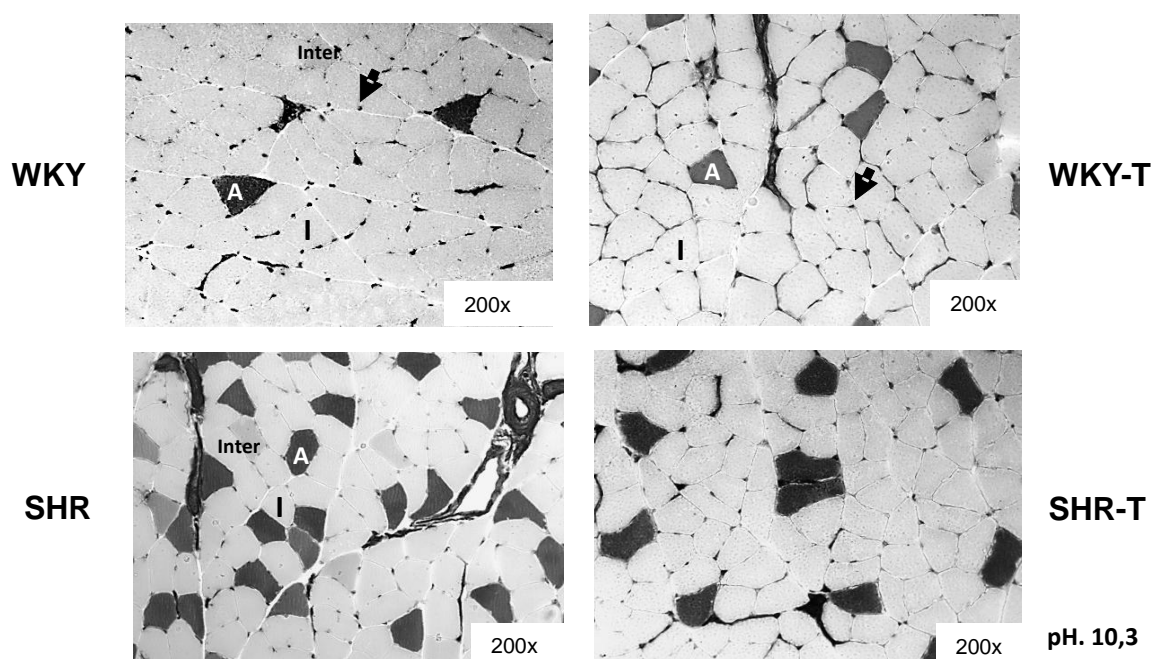


FIGURA 36 – Histoquímica do sóleo pela reação ATPase miosínica. As setas são os capilares, I as fibras tipo I, A as fibras tipo IIa e Inter as intermediárias.

Os SHR com o dobro do tempo de HA apresentaram uma redução na área de secção transversa nos diferentes tipos de fibra do músculo sóleo quando comparados ao animal WKY. Notavelmente, o TF aeróbio conseguiu corrigir a atrofia muscular se equiparando aos valores do animal controle (tipo I - WKY: 4039 ± 195 , WKY-T: 4090 ± 188 , SHR: 2658 ± 53 e SHR-T: $3724 \pm 102 \mu\text{m}^2$; tipo IIa - WKY: 2903 ± 182 , WKY-T: 2746 ± 178 , SHR: 2050 ± 68 e SHR-T: $2741 \pm 91 \mu\text{m}^2$ e Intermediárias WKY: 2663 ± 136 , WKY-T: 2145 ± 153 , SHR: 1967 ± 95 e SHR-T: $2288 \pm 80 \mu\text{m}^2$) (FIGURA 37A). Além disso, o TF foi efetivo em recuperar a proporção na distribuição dos tipos de fibras no grupo SHR-T, reduzindo a porcentagem de fibras do tipo IIa e Intermediárias em detrimento ao aumento na porcentagem de fibras do tipo I (FIGURA 37B).

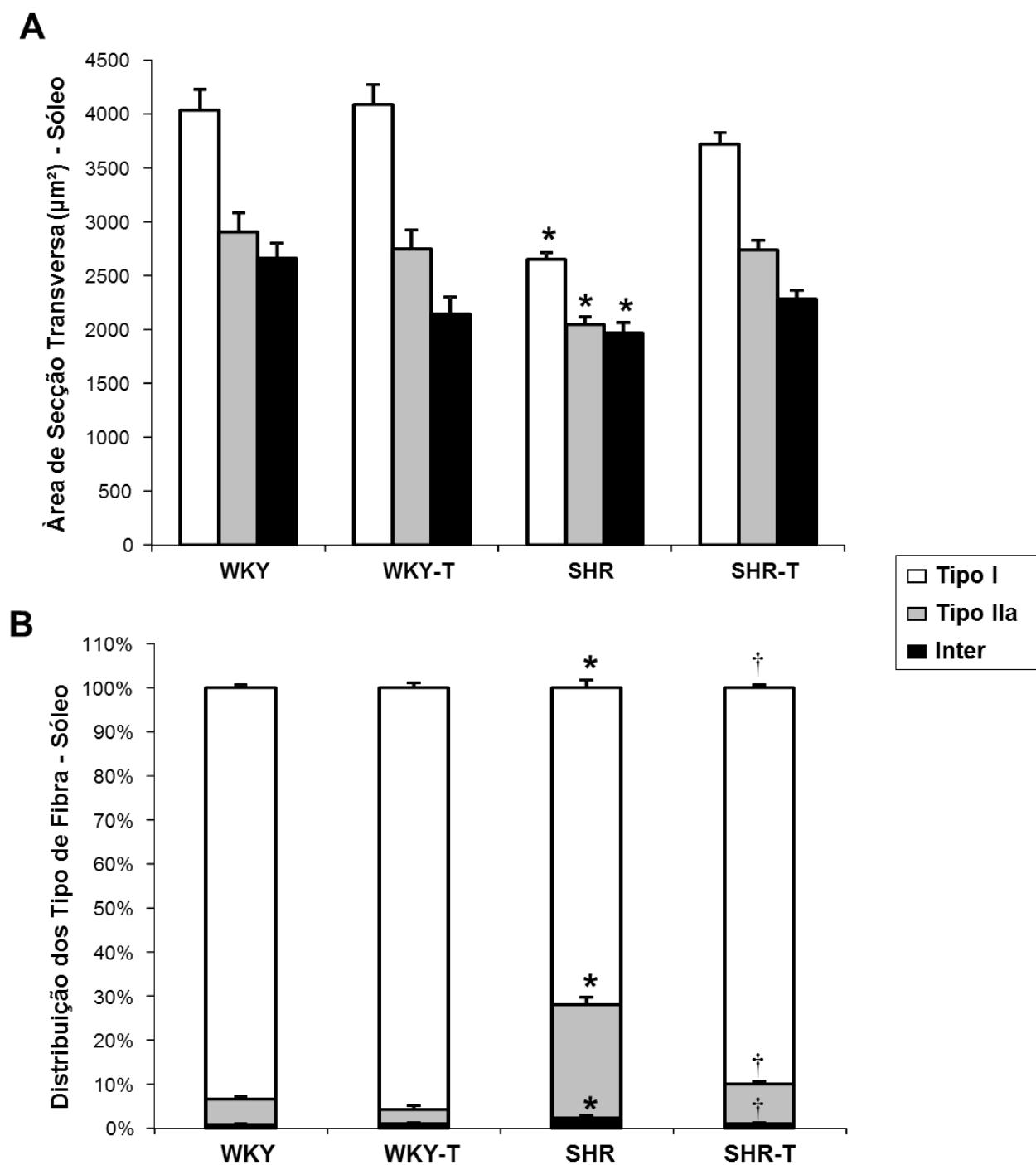


FIGURA 37 – Área de secção transversa das fibras musculares do tipo I, IIa e Intermediárias (Inter) (A) e distribuição dos tipos de fibra (B) pelo método de histoquímica. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM (n=7). * $p < 0,001$ vs. WKY, WKY-T e SHR-T; † $p < 0,01$ vs. WKY-T.

7.8 Avaliação da função muscular esquelética

7.8.1 Curva força- frequência do EDL

A FIGURA 38A mostra uma redução da força do músculo EDL no SHR comparado ao WKY avaliado pela curva força-frequência. O TF aeróbio recuperou parcialmente a perda de força no grupo SHR-T. Os valores de porcentagem de força tetânica máxima foram similares entre os grupos (FIGURA 38B).

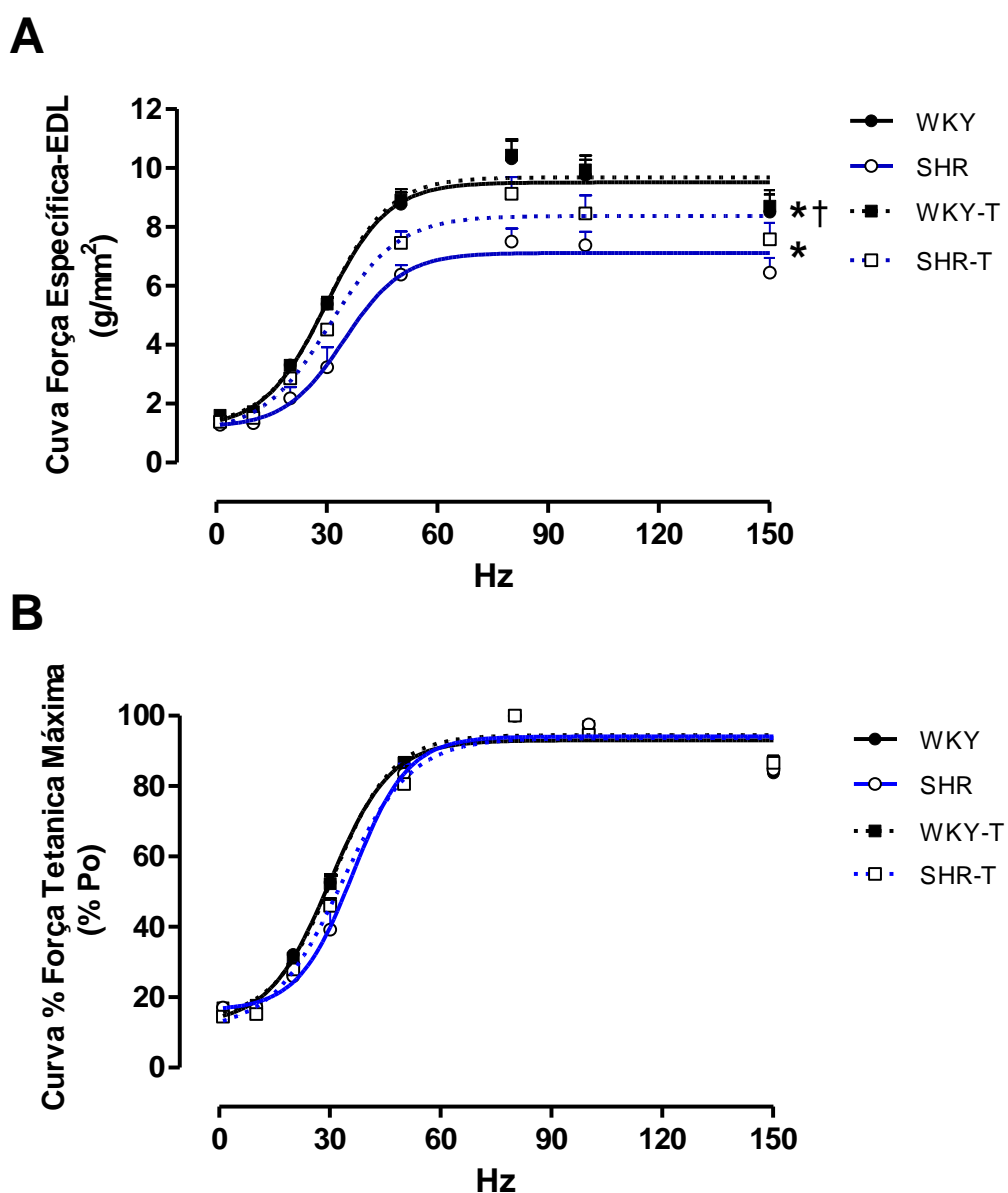


FIGURA 38 – Curva força específica (A) e curva de porcentagem de força tetânica máxima (B) no músculo EDL. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM (n=6-7). * $p < 0,01$ vs. WKY e WKY-T; † $p < 0,05$ vs. SHR.

7.8.1.1 Parâmetros da força- frequência do EDL- *twitch* 1Hz

As FIGURAS 39A e B mostram, respectivamente, uma redução da força do músculo EDL tanto corrigido pelo peso do tecido quanto pela área de secção transversa no grupo SHR comparado ao grupo WKY no *twitch* 1Hz avaliado pela curva força-frequência. Foi observado um aumento do *time to peak* no grupo SHR comparado ao grupo WKY, indicando um maior tempo para alcançar o pico da contração muscular no *twitch* comparado ao controle. O TF aeróbio recuperou este tempo de contração muscular no grupo SHR-T (FIGURA 39C). Os valores do tempo de relaxamento para 50% da contração máxima (TR50) foram similares entre os grupos (FIGURA 39D).

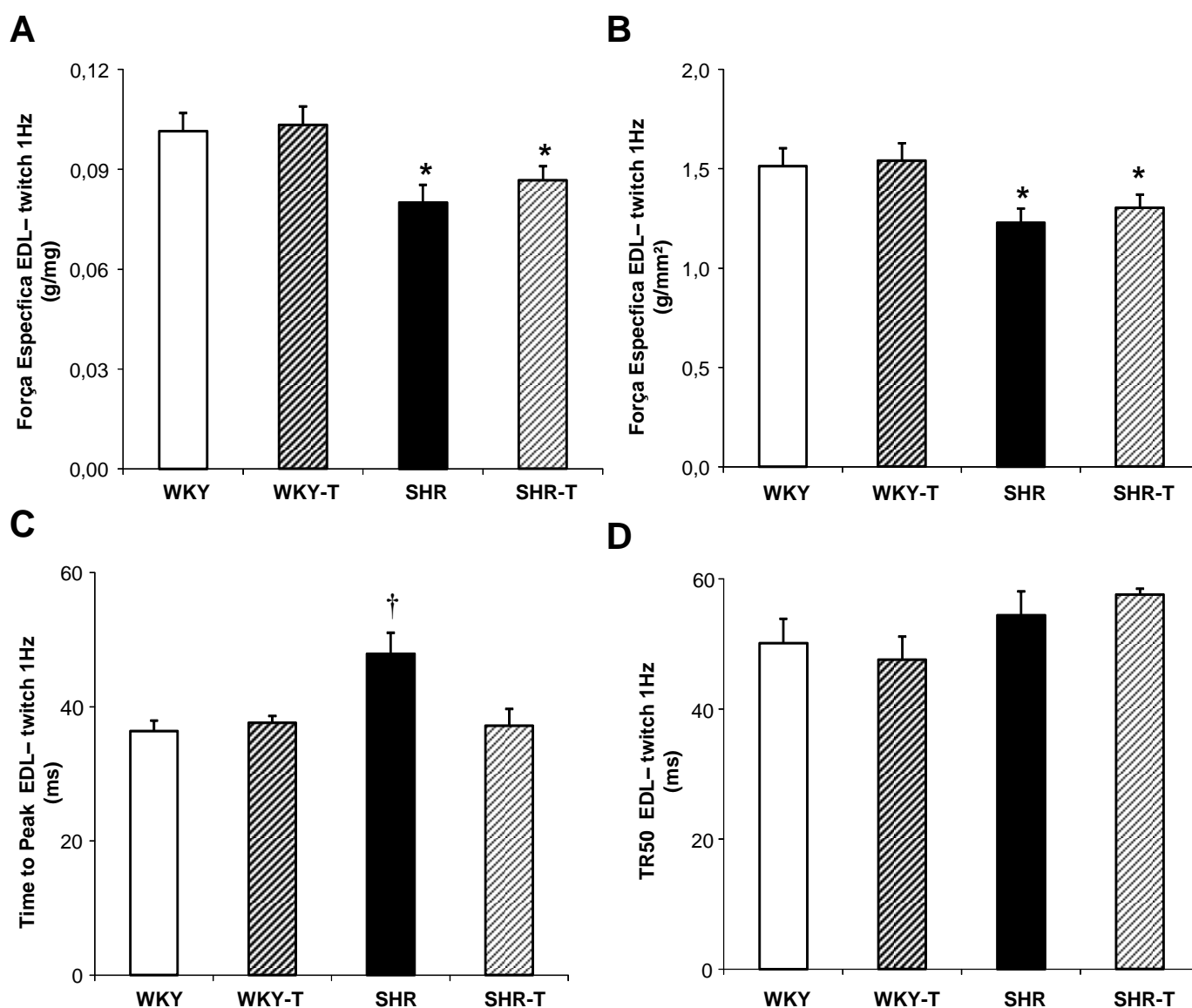


FIGURA 39 – Força específica corrigida pelo peso (A), força específica corrigida pela área de secção transversa (B), *time to peak* (C) e TR50 (D) do músculo EDL no *twitch* 1Hz. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM (n=6-7). * $p < 0,05$ vs. WKY e WKY-T; † $p < 0,05$ vs. WKY, WKY-T e SHR-T.

7.8.1.2 Parâmetros da força- frequência do EDL- tétano 80Hz

As FIGURAS 40A e B também mostram, respectivamente, uma redução da força do músculo EDL tanto corrigido pelo peso do tecido quanto pela área de secção transversa do grupo SHR comparado ao grupo WKY no tétano 80Hz avaliado pela curva força-frequência. Interessantemente, o TF aeróbio conseguiu

normalizar esta perda de força muscular no tétano do músculo EDL no grupo SHR-T. Os valores de *time to peak* foram similares entre os grupos (FIGURA 40C). Foi observado um aumento do TR50 no grupo SHR comparado ao grupo WKY, resultando em um maior tempo para o relaxamento do músculo esquelético no tétano da contração comparado ao controle, prejudicando o processo de contração muscular. O TF aeróbio recuperou este tempo de relaxamento muscular no grupo SHR-T (FIGURA 40D).

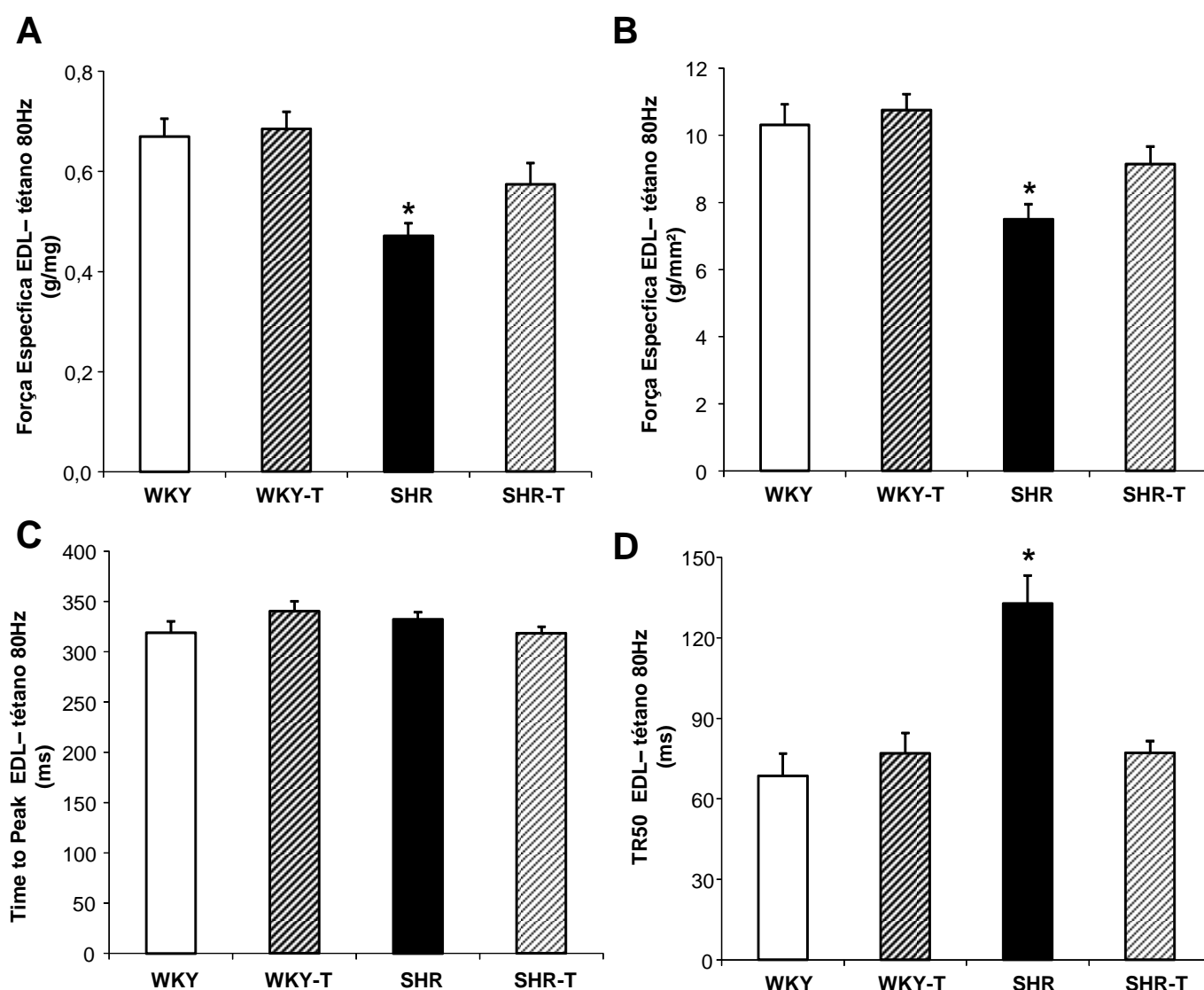


FIGURA 40 – Força específica corrigida pelo peso (A), força específica corrigida pela área de secção transversa (B), *time to peak* (C) e TR50 (D) do músculo EDL no tétano 80Hz. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM (n=6-7). * $p < 0,05$ vs. WKY, WKY-T e SHR-T.

7.8.2 Curva força- frequência do sóleo

A FIGURA 41A mostra uma redução da força do músculo sóleo no grupo SHR comparado ao grupo WKY avaliado pela curva força-frequência. O TF aeróbio normalizou a perda de força muscular no grupo SHR-T. Os valores de porcentagem de força tetânica máxima foram similares entre os grupos (FIGURA 41B).

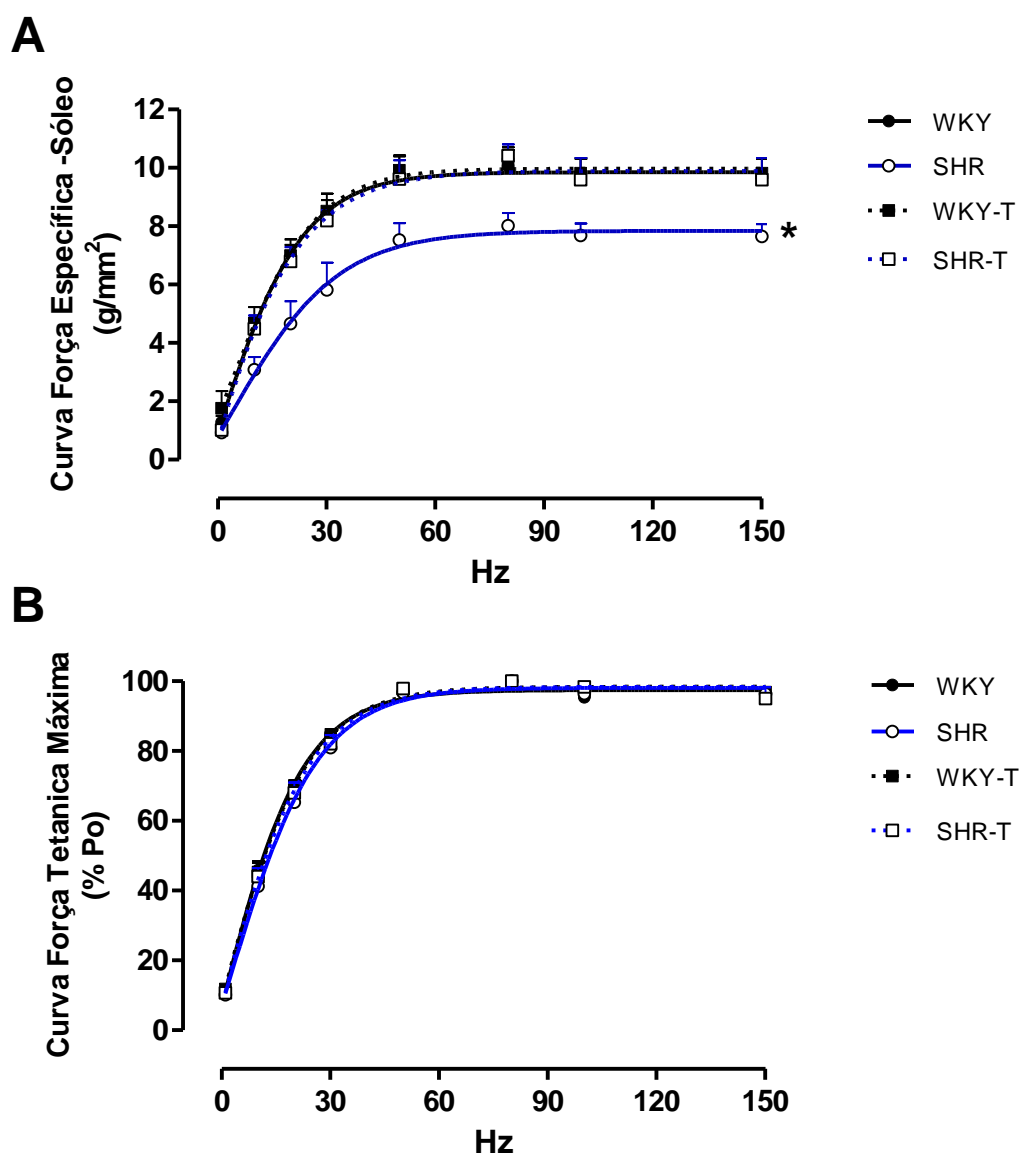


FIGURA 41 – Curva força específica (A) e curva de porcentagem de força tetânica máxima (B) no músculo sóleo. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM (n=6-7). * $p < 0,01$ vs. WKY, WKY-T e SHR-T.

7.8.2.1 Parâmetros da força- frequência do sóleo- *twitch* 1Hz

As FIGURAS 42A e B mostram, respectivamente, uma redução da força do músculo sóleo tanto corrigido pelo peso do tecido quanto pela área de secção transversa no grupo SHR comparado ao grupo WKY no *twitch* 1Hz avaliado pela curva força-frequência. Interessantemente, o TF aeróbio conseguiu normalizar esta perda de força muscular no *twitch* do músculo EDL no grupo SHR-T. Os valores de *time to peak* e TR50 foram similares entre os grupos (FIGURA 42C e D, respectivamente).

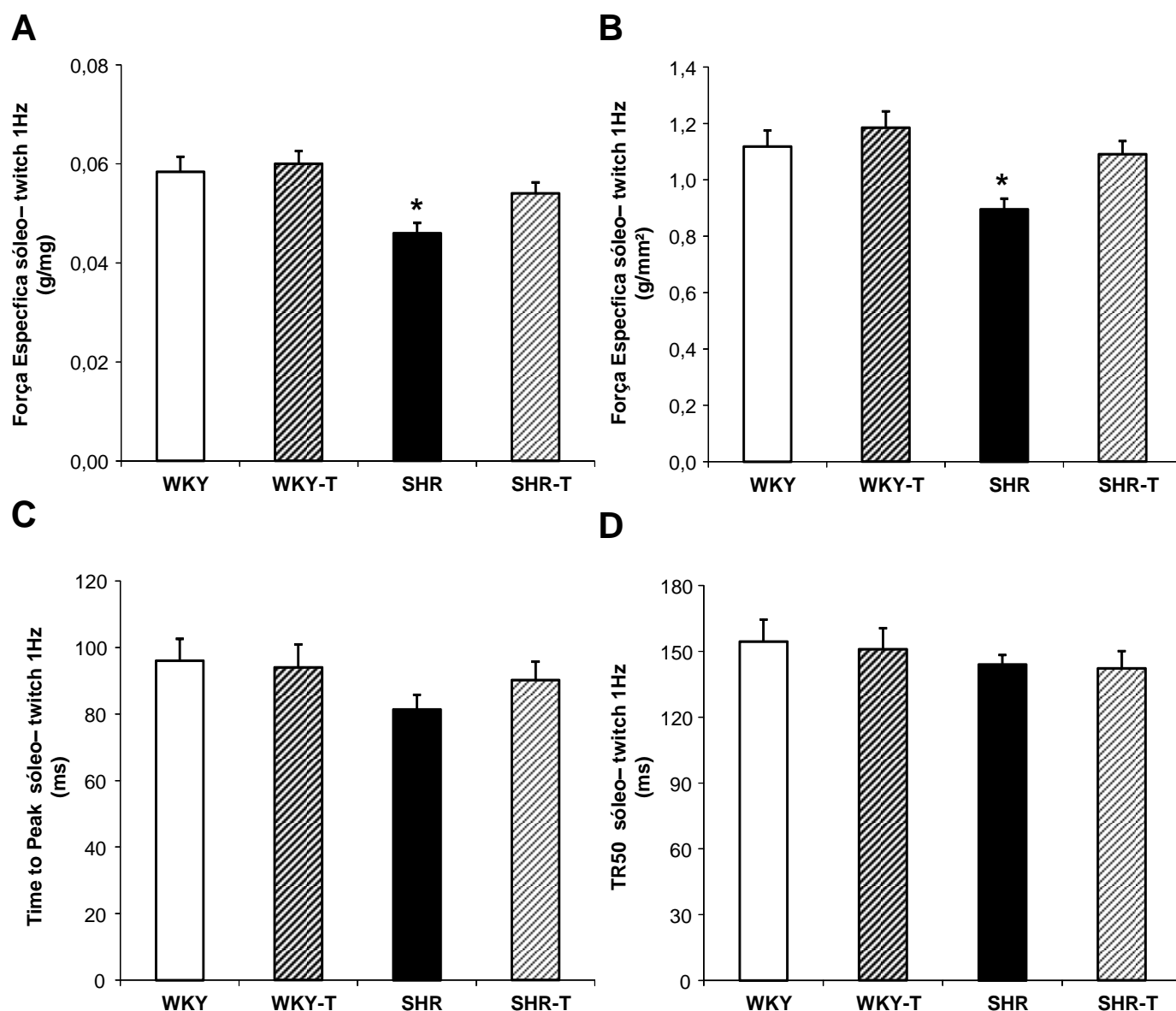


FIGURA 42 – Força específica corrigida pelo peso (A), força específica corrigida pela área de secção transversa (B), *time to peak* (C) e TR50 (D) do músculo sóleo no *twitch* 1Hz. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM (n=6-7). * $p < 0,05$ vs. WKY e WKY-T; † $p < 0,05$ vs. WKY, WKY-T e SHR-T.

7.8.2.2 Parâmetros da força- frequência do sóleo- tétano 80Hz

As FIGURAS 43A e B também mostram, respectivamente, uma redução da força do músculo sóleo tanto corrigido pelo peso do tecido quanto pela área de secção transversa do grupo SHR comparado ao grupo WKY no tétano 80Hz avaliado pela curva força-frequência. Interessantemente, o TF aeróbio conseguiu

normalizar esta perda de força muscular no tétano do músculo sóleo no grupo SHR-T. Os valores de *time to peak* foram similares entre os grupos (FIGURA 43C). Foi observado um aumento do TR50 no grupo SHR comparado ao grupo WKY, resultando em um maior tempo para o relaxamento do músculo esquelético no tétano da contração muscular comparado ao controle. O TF aeróbio recuperou este tempo de relaxamento muscular no grupo SHR-T (FIGURA 43D).

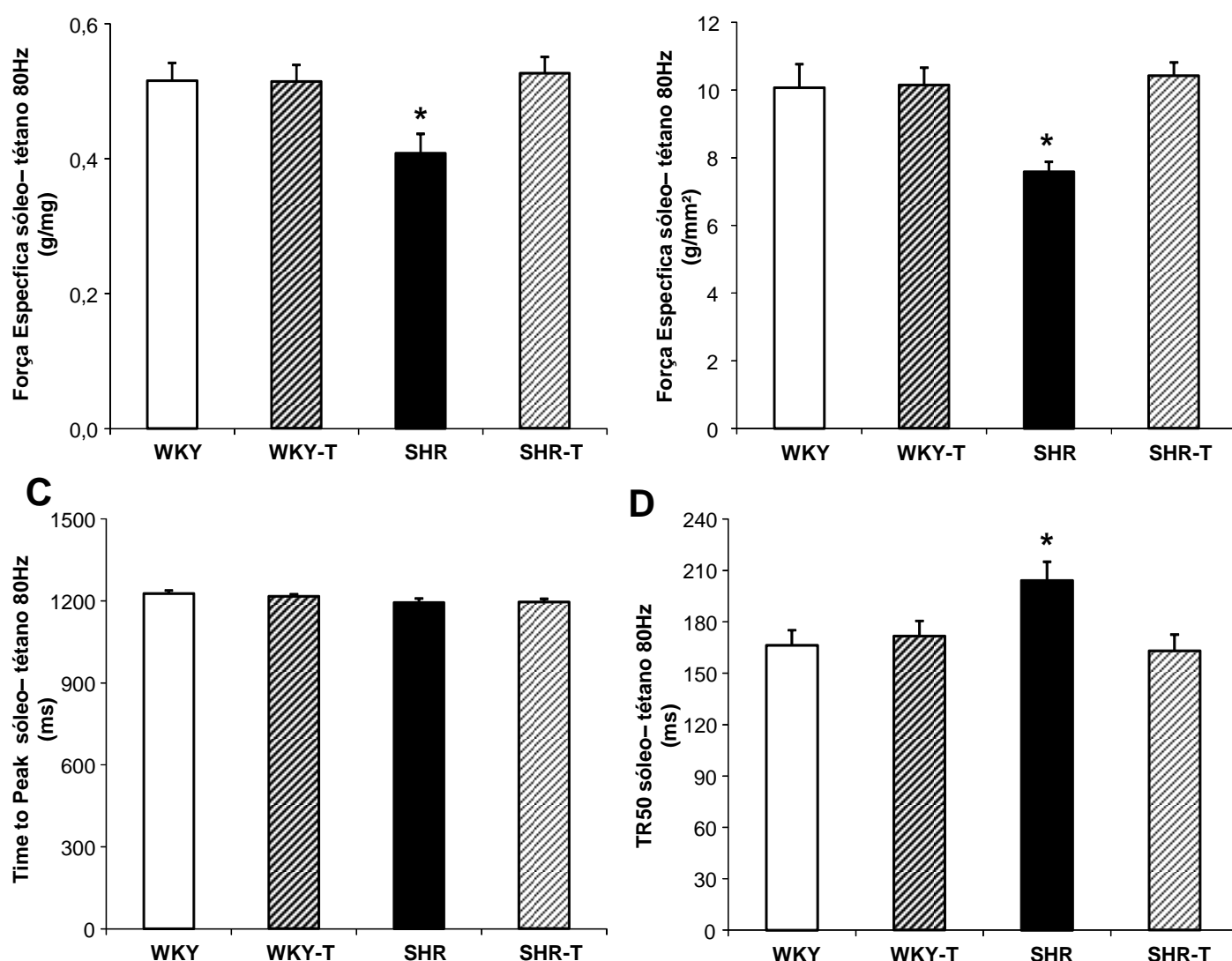


FIGURA 43 – Força específica corrigida pelo peso (A), força específica corrigida pela área de secção transversa (B), *time to peak* (C) e TR50 (D) do músculo sóleo no tétano 80Hz. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM (n=6-7). * $p < 0,05$ vs. WKY, WKY-T e SHR-T.

7.8.3 Curva fadiga do músculo EDL

As FIGURAs 44A e B mostram, respectivamente, que a curva de fadiga e os valores de porcentagem de força tetânica máxima referente ao primeiro tétano do músculo EDL foram similares entre os grupos.

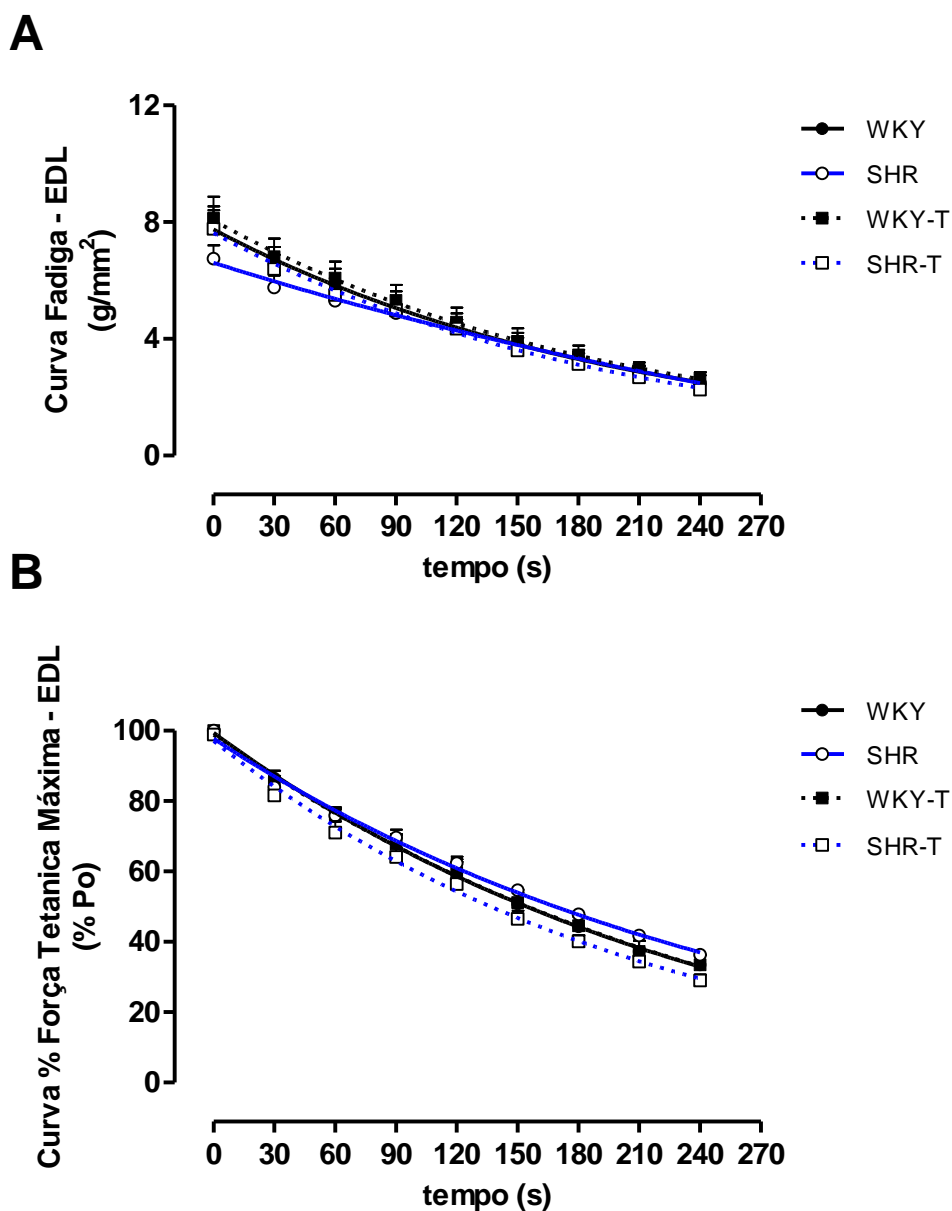


FIGURA 44 – Curva fadiga (A) e curva de porcentagem de força tetânica máxima referente ao primeiro tétano (B) no músculo EDL. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM (n=6-7).

7.8.3.1 Parâmetros da fadiga- primeiro e último tétano no EDL

As FIGURAS 45A e B mostram, respectivamente, o *time to peak* no primeiro tétano e no último tétano da fadiga. Os valores de *time to peak* foram similares entre os grupos no primeiro tétano da fadiga. Em contraste, foi observado um aumento no *time to peak* no último tétano do grupo SHR comparado ao grupo WKY. O TF normalizou os valores no grupo SHR-T.

Já nas FIGURAS 45C e D mostram, respectivamente, o TR50 do primeiro tétano e do último tétano da fadiga. Foi observado um aumento no TR50 no primeiro tétano da fadiga comparado ao grupo WKT, entretanto o TF normalizou estes valores. Os valores de TR50 foram similares entre os grupos no último tétano da fadiga.

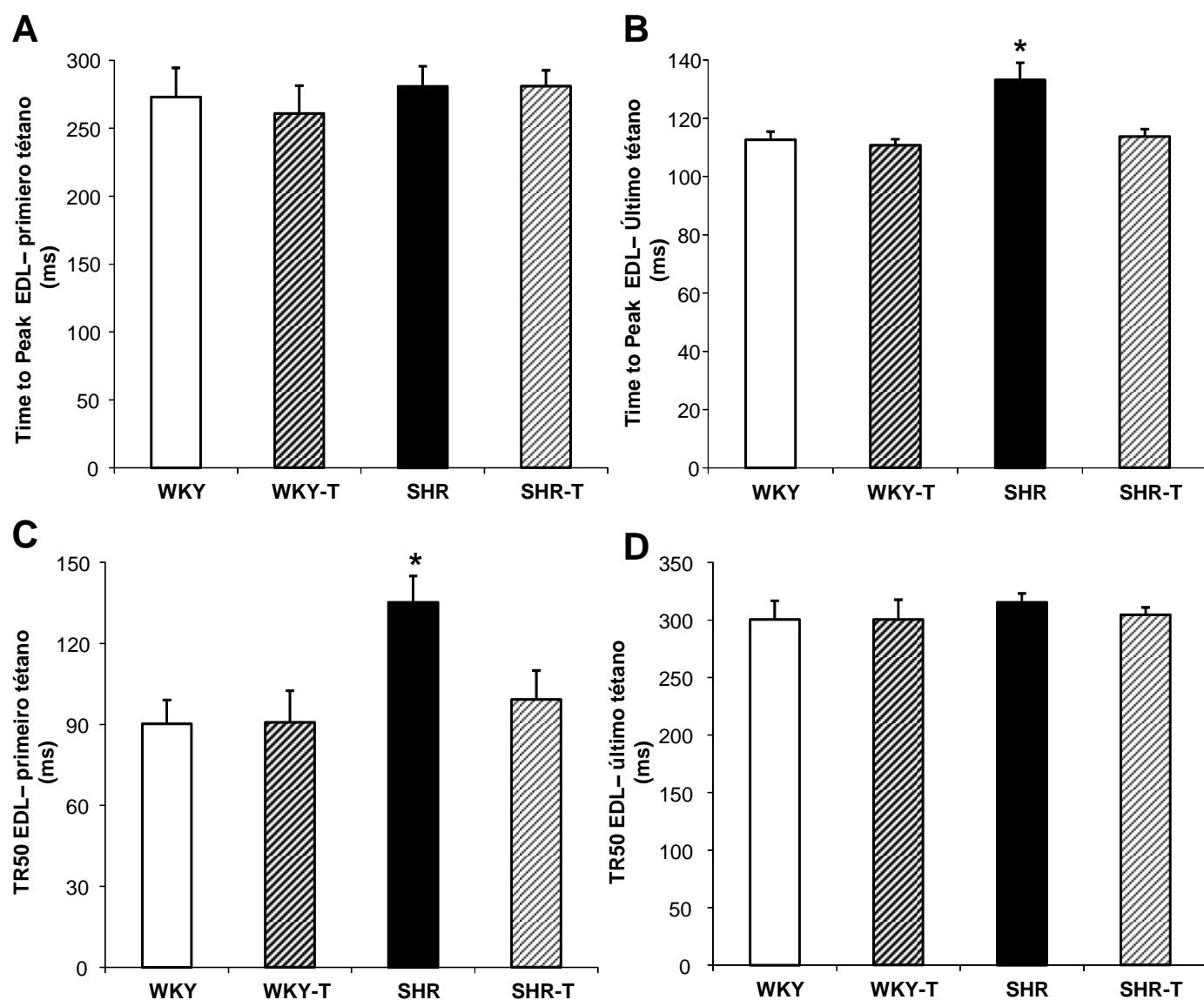


FIGURA 45 – *Time to peak* no primeiro tétano da fadiga (A), *time to peak* no último tétano da fadiga (B), TR50 no primeiro tétano da fadiga (C), TR50 no último tétano da fadiga (D) do músculo EDL. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM ($n=6-7$). * $p < 0,05$ vs. WKY, WKY-T e SHR-T.

7.8.4 Curva fadiga do músculo sóleo

As FIGURAS 46A e B mostram, respectivamente, que a curva de fadiga e os valores de porcentagem de força tetânica máxima referente ao primeiro tétano do músculo sóleo foram similares entre os grupos.

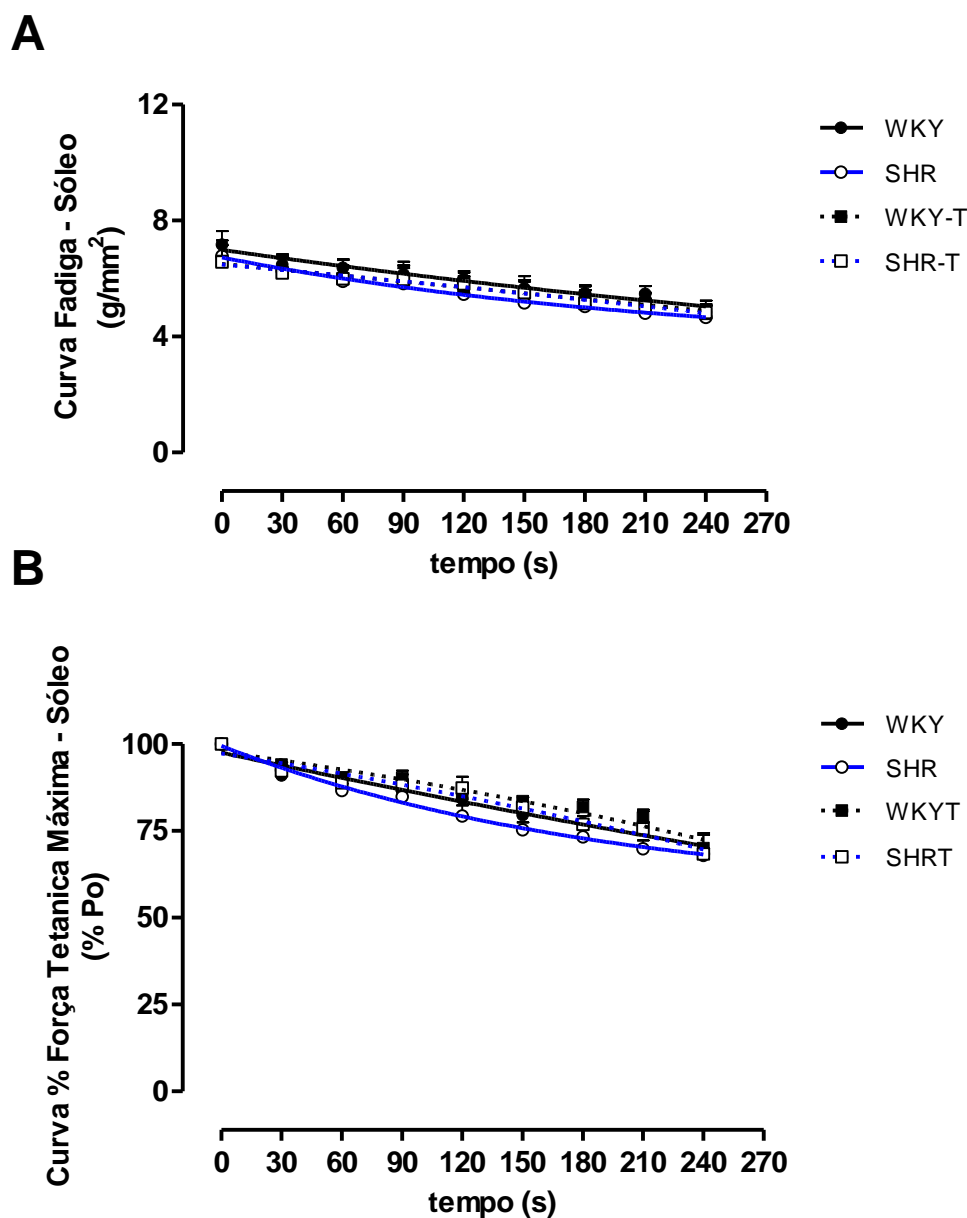


FIGURA 46 – Curva fadiga (A) e curva de porcentagem de força tetânica máxima referente ao primeiro tétano (B) no músculo sóleo. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM (n=6-7).

7.8.4.1 Parâmetros da fadiga- primeiro e último tétano no sóleo

As FIGURAS 47A e B mostram, respectivamente, o *time to peak* no primeiro tétano e no último tétano da fadiga. Os valores de *time to peak* foram similares entre os grupos no primeiro e no último tétano da fadiga.

Já nas FIGURAS 47C e D mostram, respectivamente, o TR50 do primeiro tétano e do último tétano da fadiga. Os valores de TR50 também foram similares entre os grupos no primeiro e último tétano da fadiga.

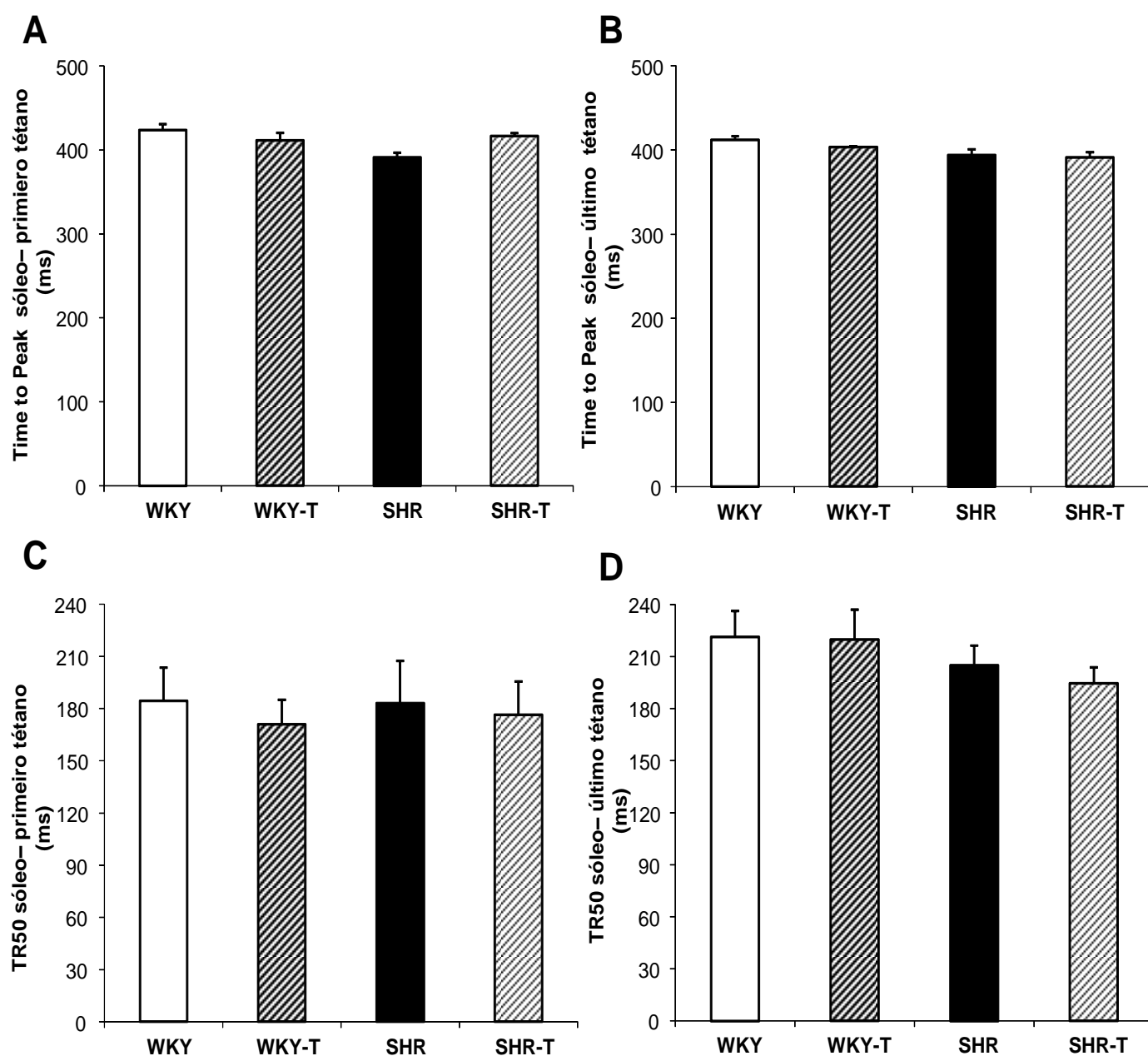


FIGURA 47 – *Time to peak* no primeiro tétano da fadiga (A), *time to peak* no último tétano da fadiga (B), TR50 no primeiro tétano da fadiga (C), TR50 no último tétano da fadiga (D) do músculo sóleo. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM (n=6-7).

7.9 Avaliação morfológica da artéria femoral

O parâmetro morfológico da artéria femoral foi determinado por meio de vários parâmetros estruturais como o diâmetro do vaso e do lúmen, a espessura da parede, a área de secção transversa e a relação parede: lúmen. As imagens representativas da estrutura da artéria femoral são mostradas na FIGURA 48.

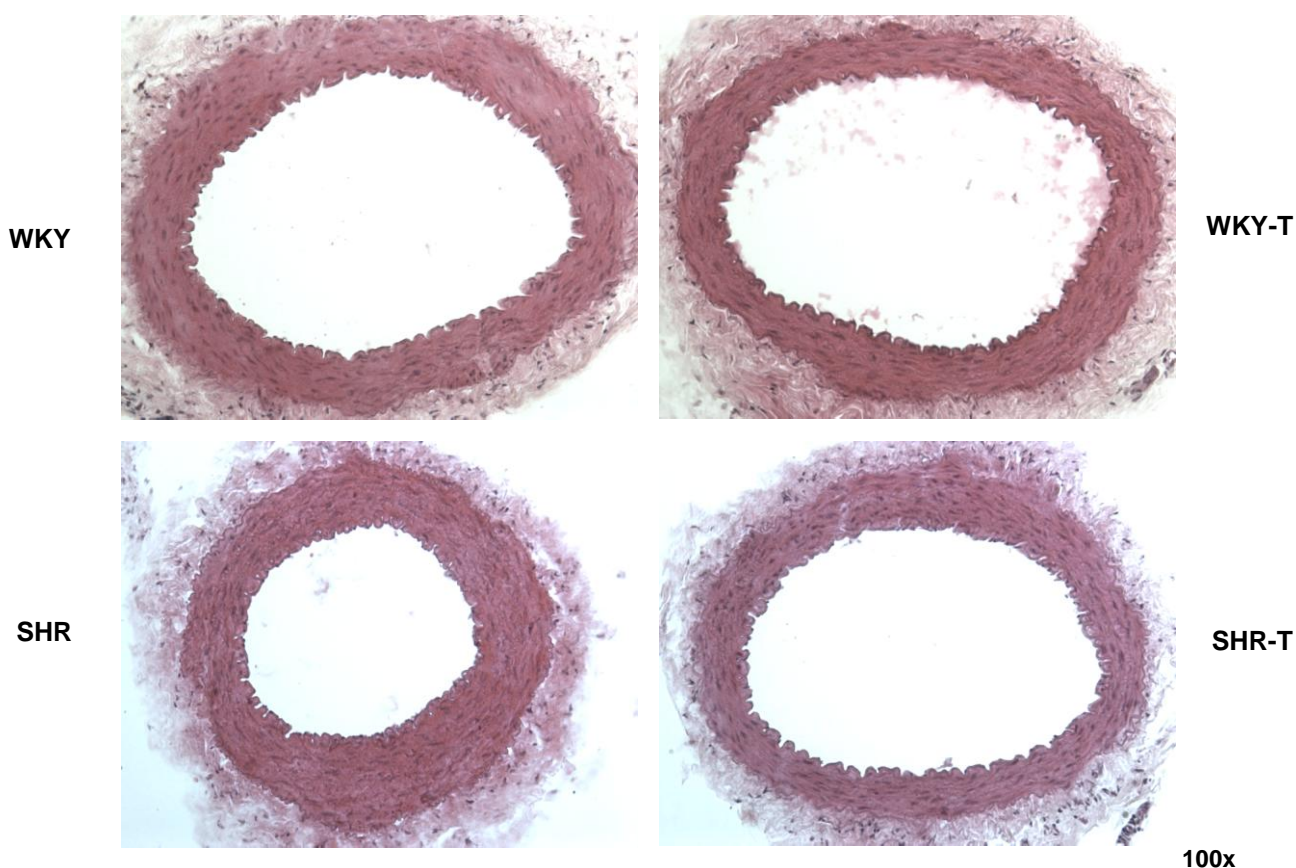


FIGURA 48 – Imagens representativas da estrutura da artéria femoral marcadas com hematoxilina-eosina.

Os parâmetros morfológicos da artéria femoral estão demonstrados na FIGURA 49. O diâmetro da luz do vaso foi reduzido no SHR comparado ao WKY (A). Por outro lado, o diâmetro do vaso não foi alterado em nenhum dos grupos (B). Foi observado um aumento da espessura da parede (C), da razão parede/ luz (D) e da área de secção transversa (E) da artéria femoral no SHR comparado ao WKY. O TF foi efetivo em normalizar estes parâmetros.

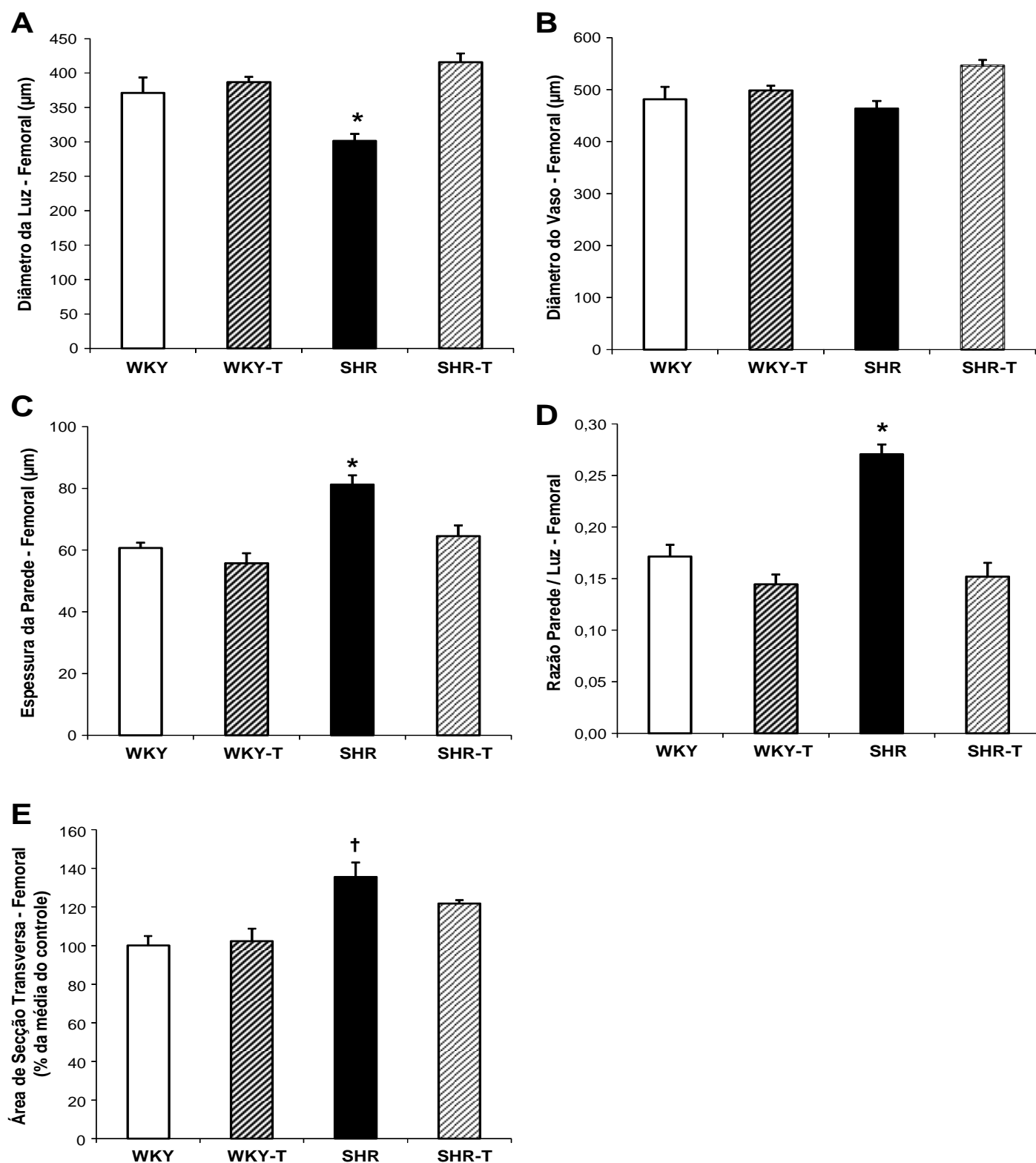


FIGURA 49 – Diâmetro da luz (A) e do vaso (B), espessura da parede (C), razão parede/ luz (D) e área de secção transversa (E) da artéria femoral. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM ($n=6-7$). * $p < 0,01$ vs. WKY, WKY-T e SHR-T; † $p < 0,01$ vs. WKY e WKY-T.

7.10 Propriedades funcionais da artéria femoral

7.10.1 Resposta vasoconstritora da artéria femoral

A resposta de contração na artéria femoral foi avaliada por meio da resposta máxima de contração induzida por KCl e da CCR à FE.

7.10.1.1 Resposta vascular contrátil induzida por KCl (120 mM)

Para avaliar a integridade funcional da artéria, após o período inicial de estabilização, alta concentração de KCl (120 mM) foi adicionado ao banho de órgãos. A contração máxima induzida por KCl (120 mM) foi maior em ambos os grupos treinados quando comparados aos grupos sedentários (WKY: $4,3 \pm 0,2$ (n=8); WKY-T: $4,9 \pm 0,2^*$ (n=8); SHR: $4,5 \pm 0,5$ (n=7) e SHR T: $4,9 \pm 0,1^*$ (n=7) mN/mm; diferença significativa (*) WKY-T e SHR-T vs. WKY e SHR, $P < 0,05$).

7.10.1.2 Resposta vasoconstritora à fenilefrina

A FE promoveu uma resposta vasoconstritora dependente de concentração na artéria femoral (FIGURA 50). A resposta vasoconstritora destas artérias foi similar entre os grupos.

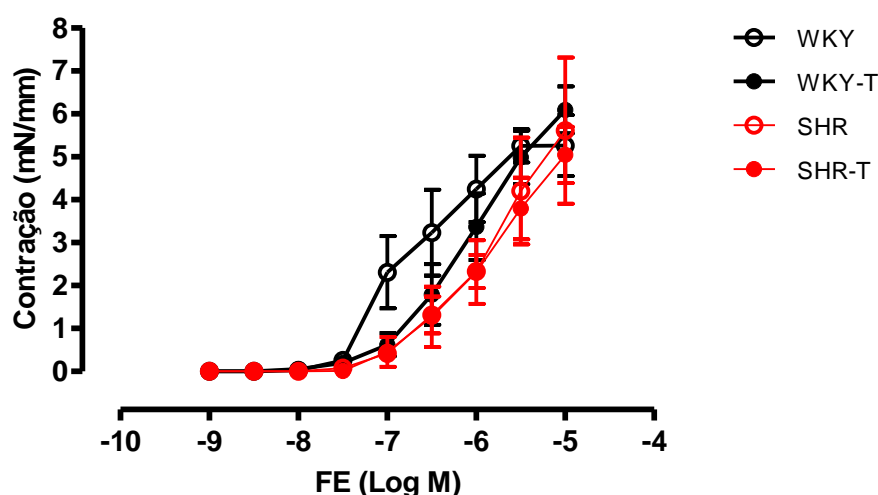


FIGURA 50 - Resposta contrátil induzida por fenilefrina (FE) na artéria femoral. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM (n=4-5).

7.10.2 Resposta vasodilatadora da artéria femoral

O efeito da HA e do TF sobre o relaxamento dependente e independente do endotélio foi avaliado por meio de CCR à ACh (1 nM – 10 μ M) e ao doador de óxido nítrico, NPS (0,1 nM – 10 μ M) respectivamente, em artéria femoral pré-contráidas com FE.

7.10.2.1 Resposta de relaxamento dependente do endotélio

A ACh promoveu um efeito vasodilatador dependente de concentração na artéria femoral (FIGURA 51). A resposta vasodilatadora destas artérias foi similar entre os grupos. Estes resultados demonstram que a HA e o TF não induziram alterações da função endotelial em artéria femoral.

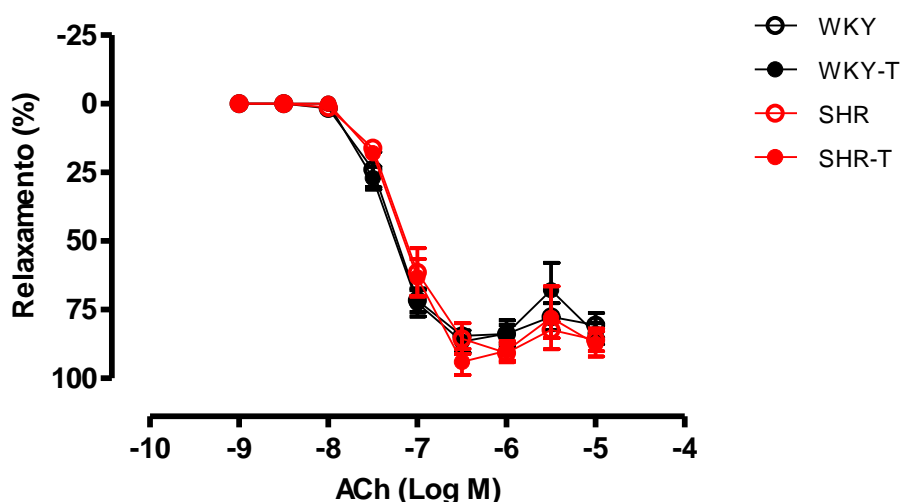


FIGURA 51 - Curva concentração-resposta à acetilcolina (ACh) em artéria femoral pré-contráidas com fenilefrina. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM (n=4-5).

7.10.2.2 Papel do óxido nítrico e do potássio na resposta vasodilatadora dependente do endotélio

Embora o TF aeróbio e a HA não tenham alterado a resposta vasodilatadora em artéria femoral, investigamos alguns possíveis mecanismos que poderiam influenciar na vasodilatação. O inibidor não-seletivo da síntese de óxido nítrico, L-NAME (100 μ M), impediu a resposta vasodilatadora induzida por ACh em

artéria femoral tanto dos grupos normotensos quanto dos grupos hipertensos de maneira similar, conforme demonstrado na FIGURA 52. Além disso, a pré-contracção com KCl (60 mM), também impediu a resposta vasodilatadora induzida por ACh em artéria femoral tanto dos grupos normotensos quanto dos grupos hipertensos de maneira similar, conforme demonstrado na FIGURA 52. Estes resultados demonstram que tanto o óxido nítrico quanto os canais para potássio são importantes para a vasodilação dependente do endotélio nos grupos estudados.

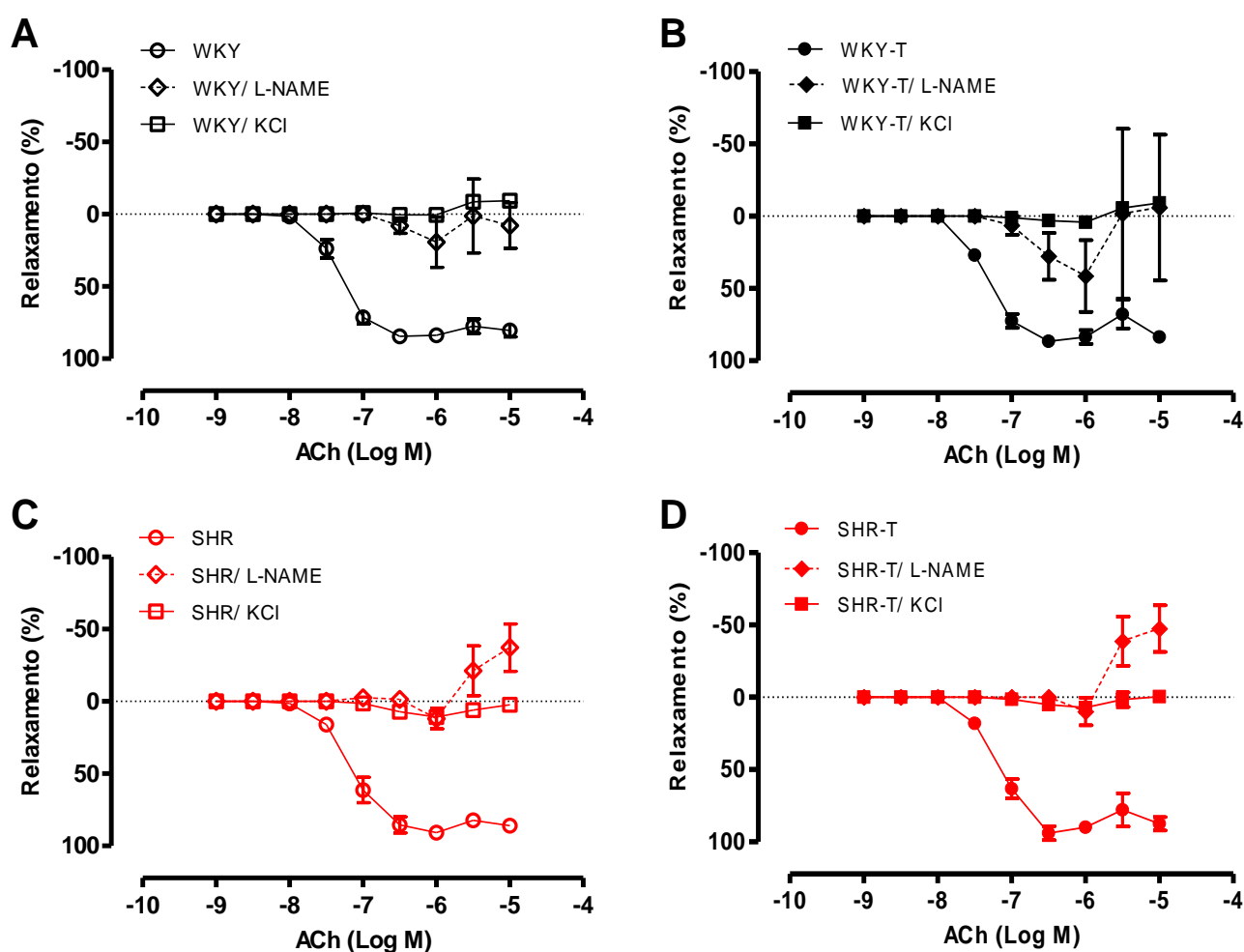


FIGURA 52 – Efeito do bloqueio da síntese de NO com L-NAME (100 μ M) e do KCl (60mM) sobre a resposta de relaxamento induzido por acetilcolina (ACh) em artéria femoral pré-contráidas com FE. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM (n=4-5). * $p < 0,001$ vs. L-NAME e KCl.

7.10.2.3 Resposta de relaxamento independente do endotélio

A resposta vasodilatadora independente do endotélio em artéria femoral foi similar entre os grupos como demonstrado por meio da CCR ao NPS (1 nM – 10 μ M) na FIGURA 53.

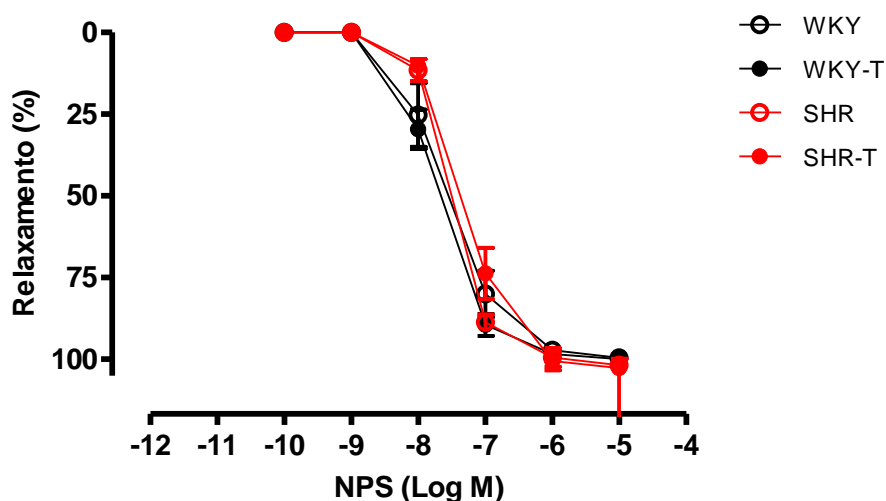


FIGURA 53 - Curva concentração-resposta ao doador de óxido nítrico nitroprussiato de sódio (NPS) em artéria femoral pré-contraídas com FE. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM (n=7-8).

7.11 Avaliação morfológica da arteríola muscular

O parâmetro morfológico da arteríola muscular foi determinado por meio de vários parâmetros estruturais como o diâmetro do vaso e do lúmen, a espessura da parede, a área de secção transversa e a relação parede: lúmen entre os grupos estudados. As imagens representativas da estrutura da arteríola muscular são mostradas na FIGURA 54.

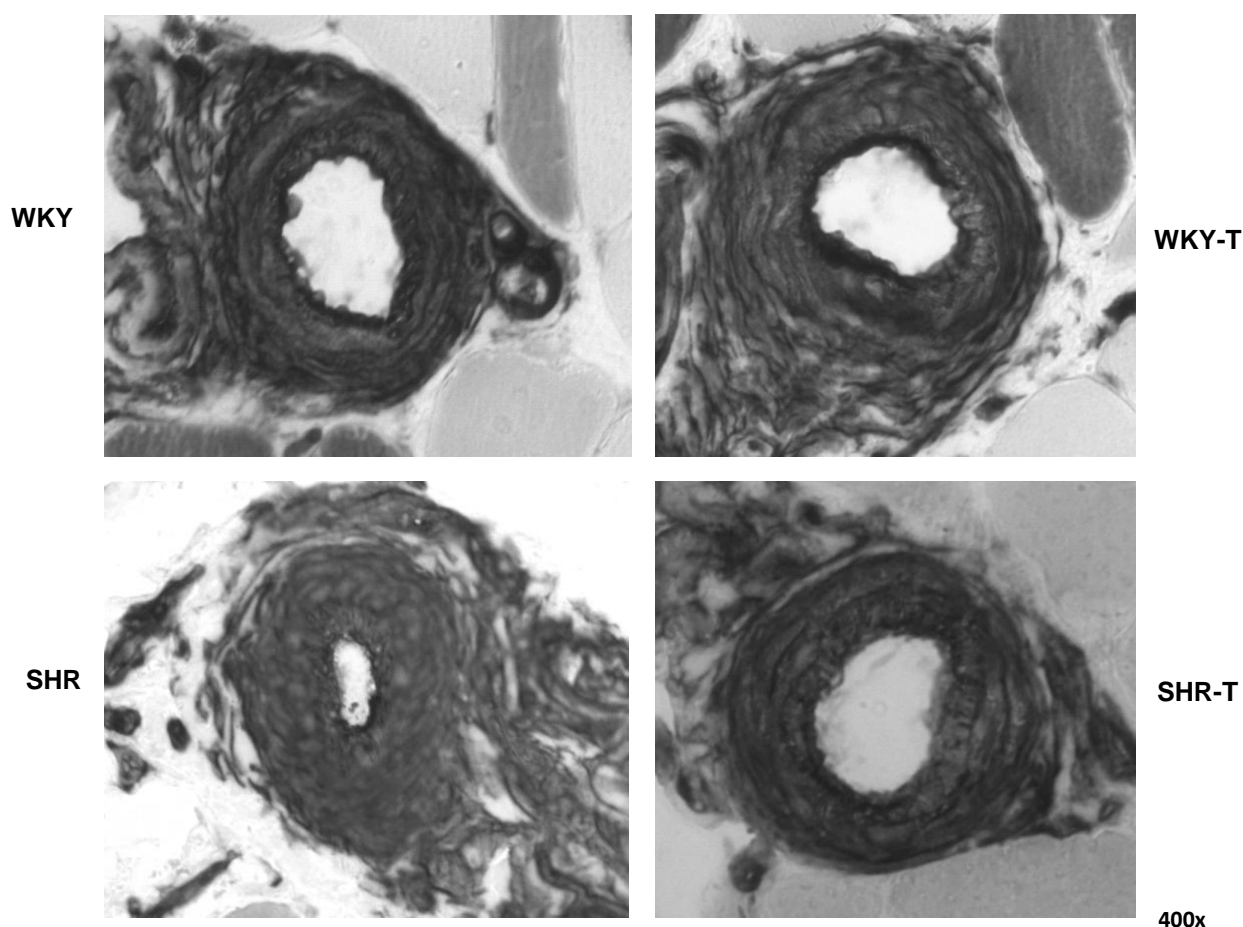


FIGURA 54 – Imagens representativas da estrutura da arteríola muscular marcadas pela ATPase miosínica.

Os parâmetros estruturais da arteríola muscular são mostrados na FIGURA 55. Similar aos dados estruturais da artéria femoral, o diâmetro da luz do vaso foi reduzido no SHR comparado ao WKY (A). Por outro lado, o diâmetro do vaso não foi alterado em nenhum dos grupos (B). Foi observado um aumento da espessura da parede (C), da razão parede/ luz (D) e da área de secção transversa (E) da arteríola muscular no SHR comparado ao WKY. O TF foi efetivo em normalizar estes parâmetros, o que poderia contribuir para a redução da resistência vascular periférica e consequentemente maior perfusão tecidual e queda da PA.

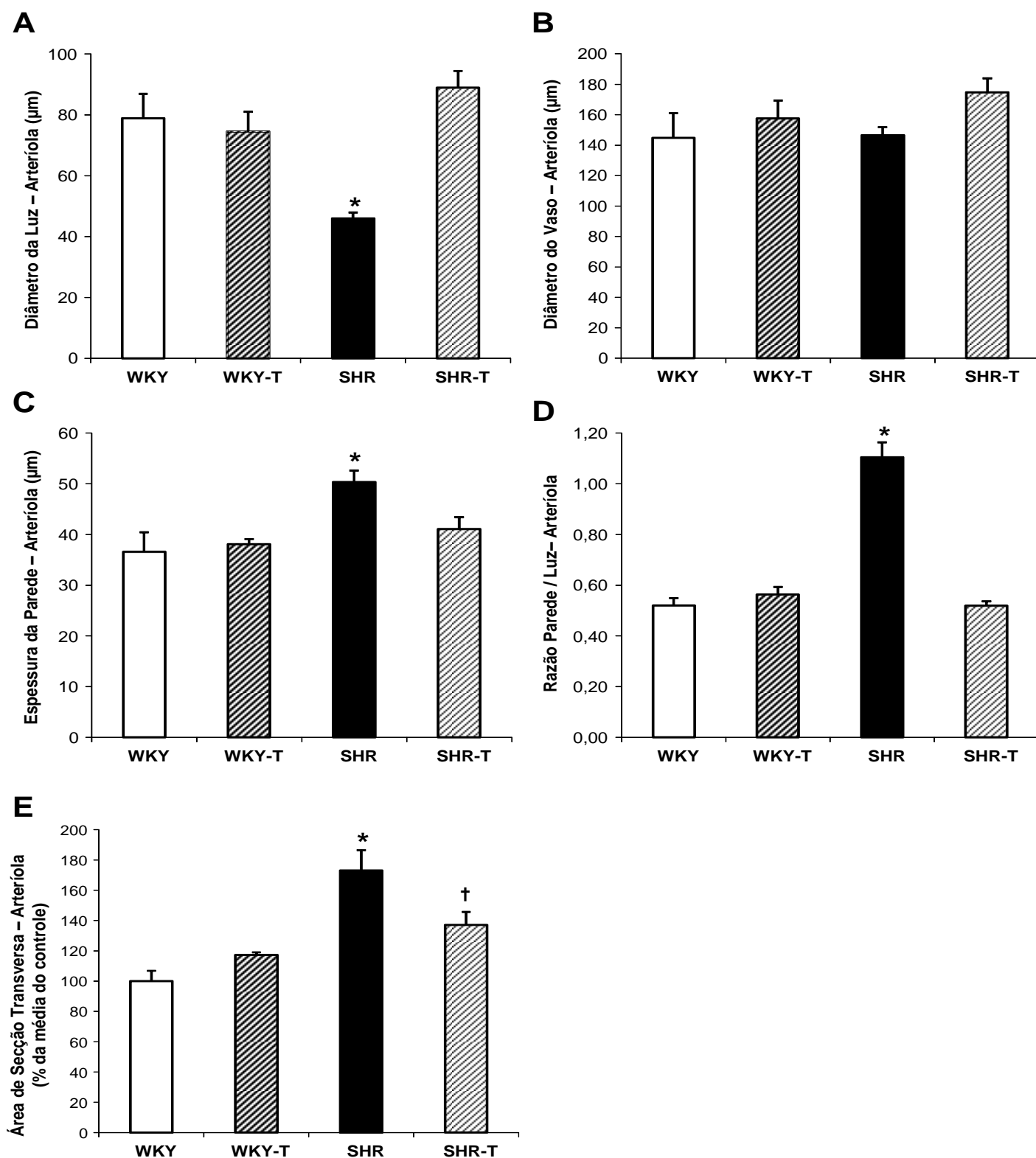


FIGURA 55 – Diâmetro da luz (A) e do vaso (B), espessura da parede (C), razão parede / luz (D) e área de secção transversa (E) da arteríola muscular. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM (n=6-7). * $p < 0,01$ vs. WKY, WKY-T e SHR-T; † $p < 0,01$ vs. WKY e WKY-T.

7.12 Razão capilar por fibra muscular esquelética

Similar ao encontrado nos animais com 6 meses de idade, a rarefação capilar foi observada no grupo SHR com 9 meses de idade comparado ao grupo WKY. Por outro lado, o TF foi efetivo em aumentar 19% o número de capilares pela análise da razão capilar por fibra no grupo WKY-T e corrigir a rarefação capilar no grupo SHR-T quando comparados ao grupo WKY (WKY: $1,2 \pm 0,05$; WKY-T: $1,5 \pm 0,07$; SHR: $0,6 \pm 0,03$ e SHR-T: $1,0 \pm 0,02$ nº de capilares/ fibra muscular) (FIGURA 56).

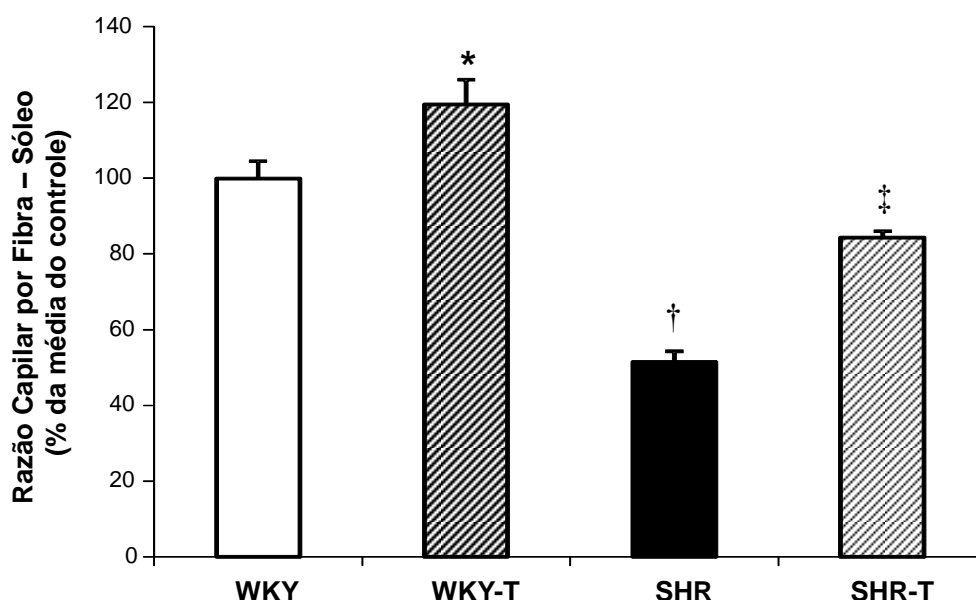


FIGURA 56 – Razão capilar por fibra no músculo sóleo. Os dados estão representados na forma de média \pm EPM (n=7). * p < 0,05 vs. WKY, SHR e SHR-T; † p < 0,05 vs. WKY, WKY-T e SHR-T, ‡ p < 0,05 vs. WKY-T e SHR.

7.13 Microarray de miRNA- sóleo

Para análise do perfil de expressão de miRNAs no músculo sóleo, duas amostras de cada grupo foram submetidas ao *microarray* pela empresa *LC Science* (Houston, Texas, EUA). Dos 727 miRNAs presentes no chip com base no *release* versão 20.0 do Sanger miRBase para ratos, 228 miRNAs foram expressos no sóleo com níveis de expressão maior que 32 unidades arbitrárias (u.a.) (FIGURA 57).

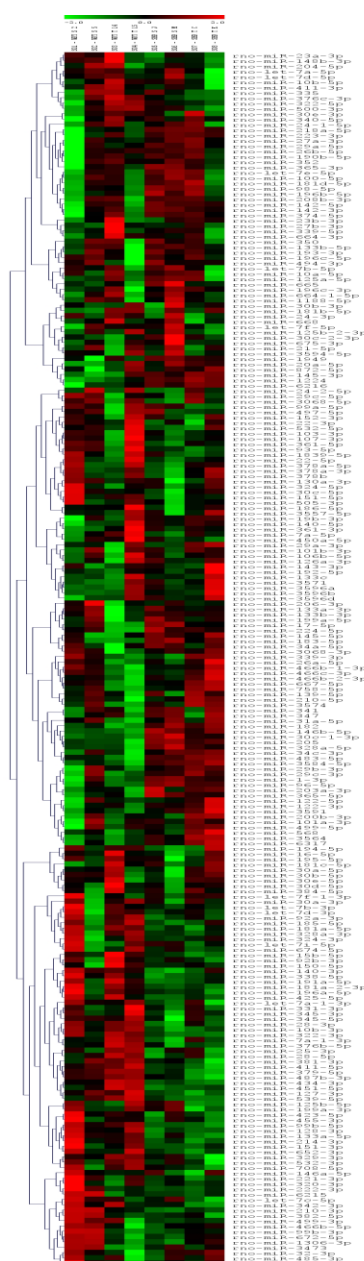


FIGURA 57 – Heatmap dos 228 miRNAs expressos no sóleo via *microarray*.

Na tentativa de avaliar o efeito da HA sobre o perfil de miRNAs no músculo esquelético, foi feita a comparação entre o perfil de expressão dos miRNAs do grupo SHR vs. WKY no sóleo. Dos 228 miRNAs expressos no músculo sóleo, 64 miRNAs foram diferencialmente expressos no grupo SHR comparado ao grupo WKY (FIGURA 58). Desses 64 miRNAs, 39 deles foram reduzidos e 25 foram aumentados pela HA.

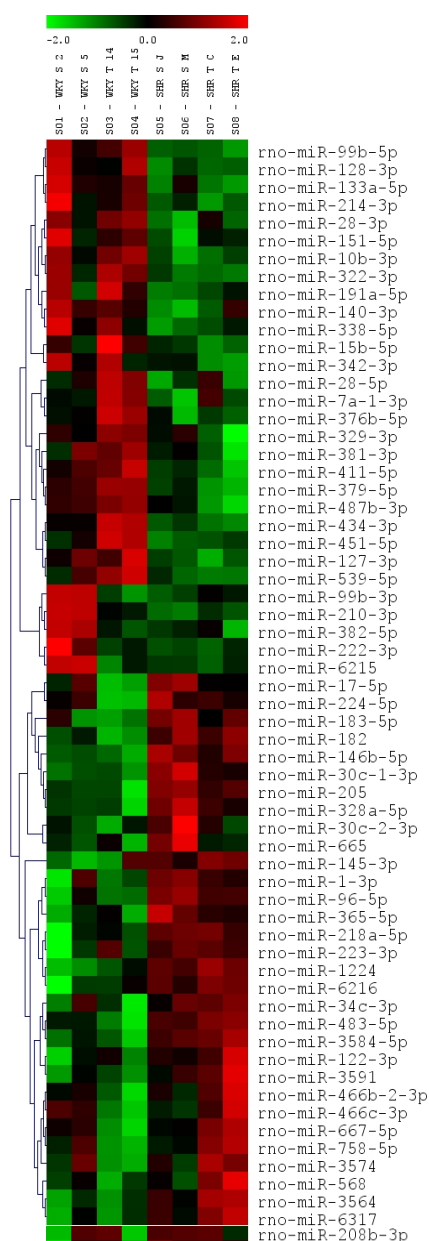


FIGURA 58 – *Heatmap* dos 64 miRNAs diferencialmente expressos no grupo hipertenso comparado ao grupo controle no sóleo via *microarray*.

A partir desta análise, foi observado diferentes efeitos do TF aeróbio sobre o padrão de expressão dos miRNAs na HA, representado pelo grupo SHR-T. Nos miRNAs com aumento de expressão na HA, dos 25 miRNAs com padrão de expressão aumentado no grupo SHR, 3 deles não sofreram efeito do TF no grupo SHR-T, permanecendo com o mesmo perfil de expressão da doença (miRNAs-223-3p, -218a-5p e -1224) (FIGURA 59A). Curiosamente, 9 dos 25 miRNAs tiveram o padrão acentuado da doença quando submetidos ao TF, apresentando um nível de

expressão de maior aumento no grupo SHR-T comparado ao SHR (miRNAs-122-3p, -6216, -3584-5p, -3564, -3591, -6317, -34c-3p, -483-5p e -145-3p) (FIGURA 59B).

Dos 39 miRNAs com padrão de expressão reduzido no grupo SHR, 8 deles não apresentaram diferença significativa quando submetido ao protocolo de TF aeróbio no grupo SHR-T, permanecendo com o mesmo perfil de expressão da doença (miRNAs-128-3p, -99b-5p, -322-3p, -376b-5p, -222-3p, -210-3p e -382-5p) (FIGURA 59A). Além disso, 12 dos 39 miRNAs tiveram o padrão acentuado da doença quando submetido ao TF com um nível de expressão de maior redução no grupo SHR-T comparado ao SHR (miRNAs-15b-5p, -342-3p, -539-5p, -133a-5p, -379-5p, -487b-3p, -434-3p, -329-3p, -127-3p, -381-3p, -411-5p e -214-3p) (FIGURA 59B).

O objetivo principal do estudo foi avaliar os miRNAs que estavam alterados na HA e também verificar o efeito do TF aeróbio, como uma importante terapia não farmacológica, na tentativa de reverter o padrão de expressão da doença, aproximando-se dos níveis do controle WKY. Dessa forma, foi possível observar que o TF induziu o padrão de expressão esperado (inverso ao da HA) de 19 miRNAs que estavam reduzidos no grupo SHR e o TF conseguiu aumentar sua expressão no grupo SHR-T (miRNAs-466c-3p, -466b-2-3p, -667-5p, -99b-3p, -758-5p, -451-5p, -3574, -568, -466b-5p, -140-3p, -338-5p, -151-5p, -28-5p, -7a-1-3p, -28-3p, -499-5p, -10b-3p, -191a-5p e -208b-3p) (FIGURA 60). Além disso, o TF também induziu o padrão de expressão esperado de 13 miRNAs que estavam aumentados na HA e o TF reduziu sua expressão no grupo SHR-T (miRNAs-30c-1-3p, -224-5p, -665, -182, -365-5p, -30c-2-3p, -17-5p, -96-5p, -328a-5p, -1-3p, -205, -146b-5p e -183-5p) (FIGURA 60).

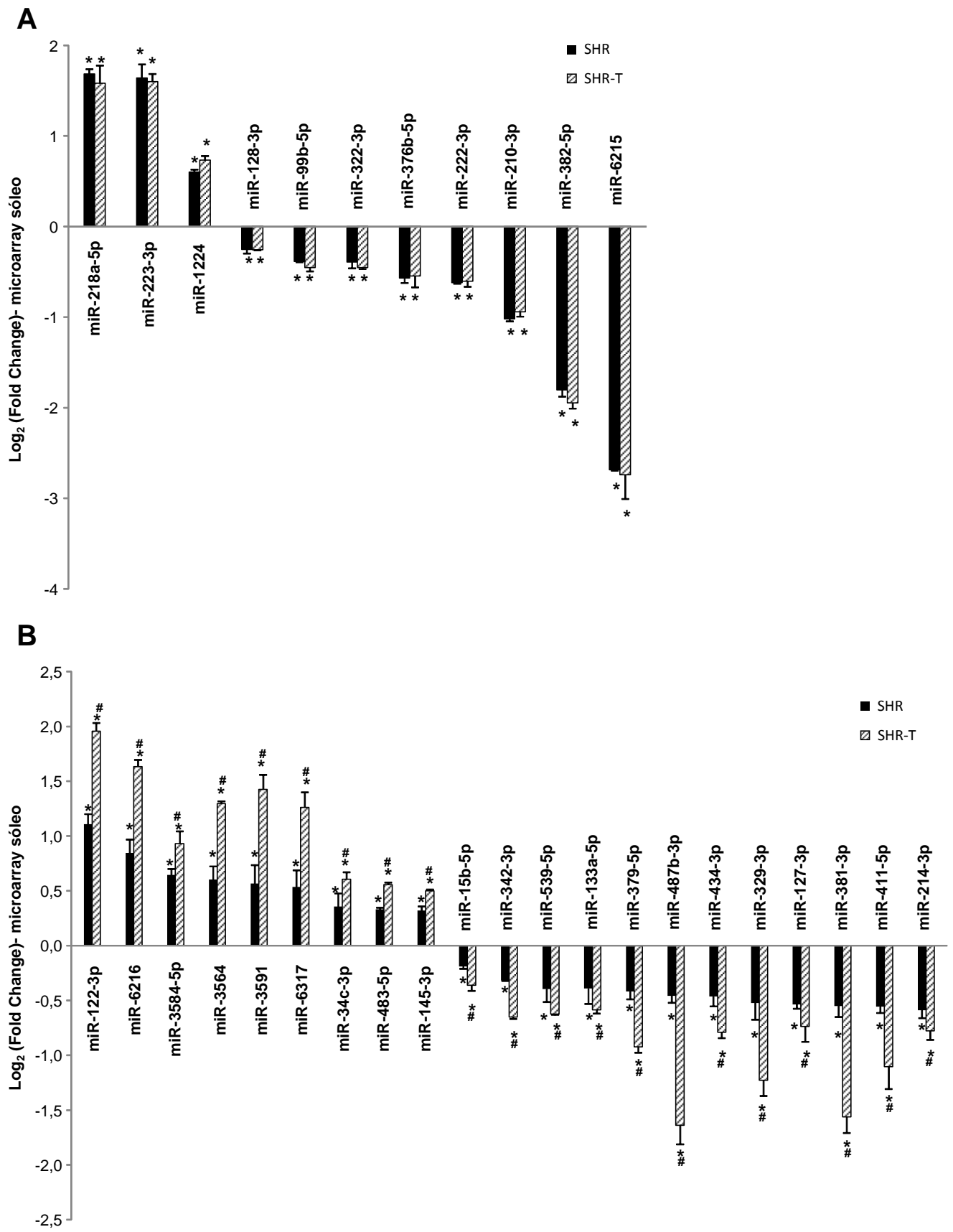


FIGURA 59 – Perfil de miRNAs diferencialmente expressos no grupo SHR comparado ao grupo WKY e efeito do TF avaliados por *microarray* no sóleo. MiRNAs com padrão de expressão reduzido no grupo SHR e sem alteração com TF (A) e com redução acentuada com TF (B). MiRNAs com padrão de expressão aumentado no grupo SHR e sem alteração com TF (A) e com aumento acentuado com TF (B). Os dados estão representados na forma de média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. WKY, # $p < 0,05$ vs. SHR.

Embora o TF aeróbio tenha induzido o padrão de expressão esperado para 32 miRNAs que estavam alterados na HA, apenas 15 miRNAs foram normalizados ou prevenidos estatisticamente pelo TF, sendo estes 7 reduzidos (miRNAs-99b-3p, 466c-3p, -140-3p, -191a-5p, -499-5p, -208b-3p e -667-5p,) (FIGURA 61A) e 8 aumentados (miRNAs-96-5p, -30c-1-3p, -205, -328a-5p, -665, -182, -30c-2-3p e -1-3p e) (FIGURA 61B) pela HA, respectivamente. Assim, os miRNAs que tiveram este perfil foram selecionados para serem confirmados por *real-time PCR*.

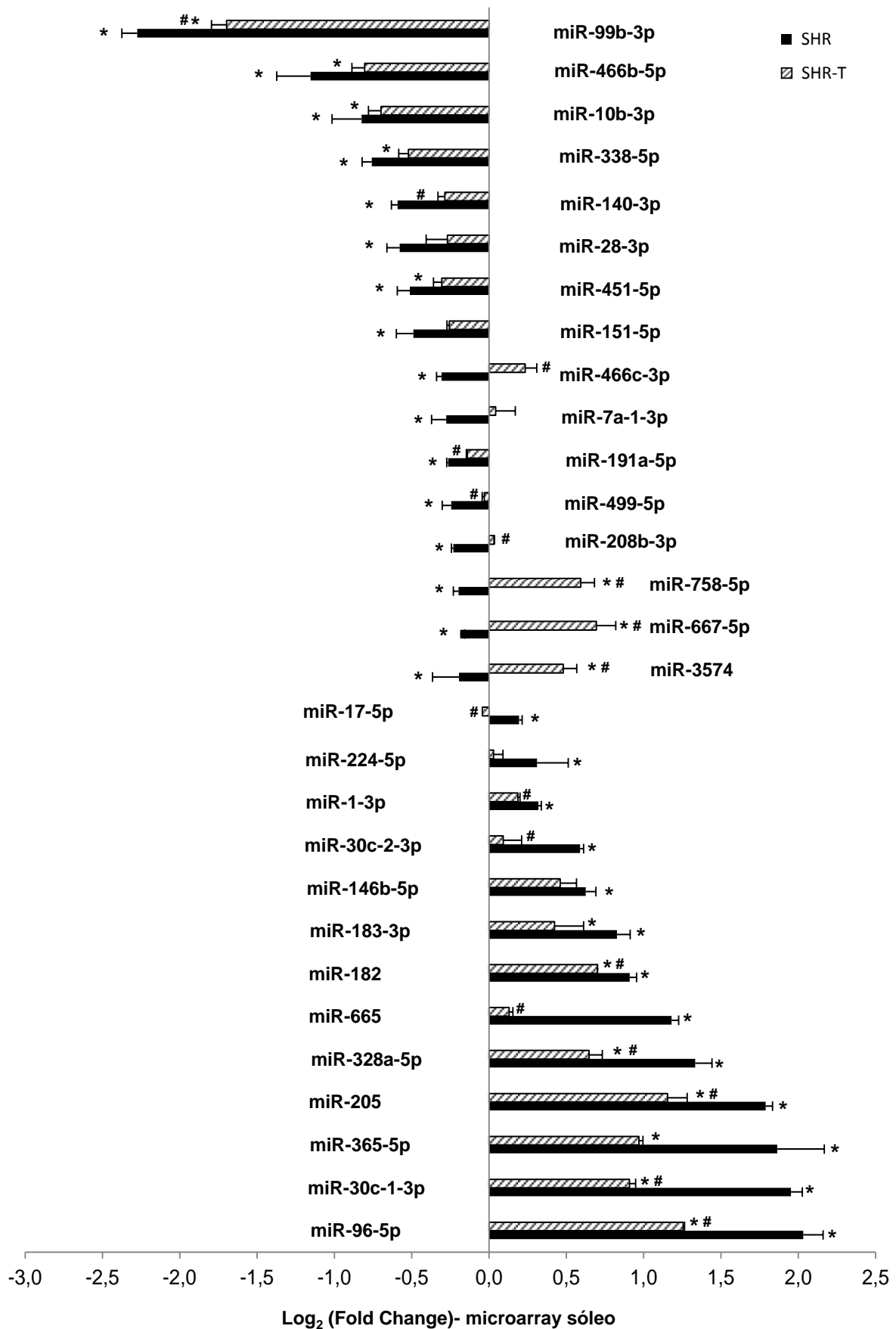


FIGURA 60 – Perfil de miRNAs diferencialmente expressos no grupo SHR comparado ao grupo WKY e efeito do TF avaliados por *microarray* no sóleo. MiRNAs com padrão de expressão reduzido no grupo SHR e aumentados pelo TF e aumentado no grupo SHR e reduzido pelo TF. Resultado expresso como porcentagem da média do controle. * $p < 0,05$ vs. WKY, # $p < 0,05$ vs. SHR.

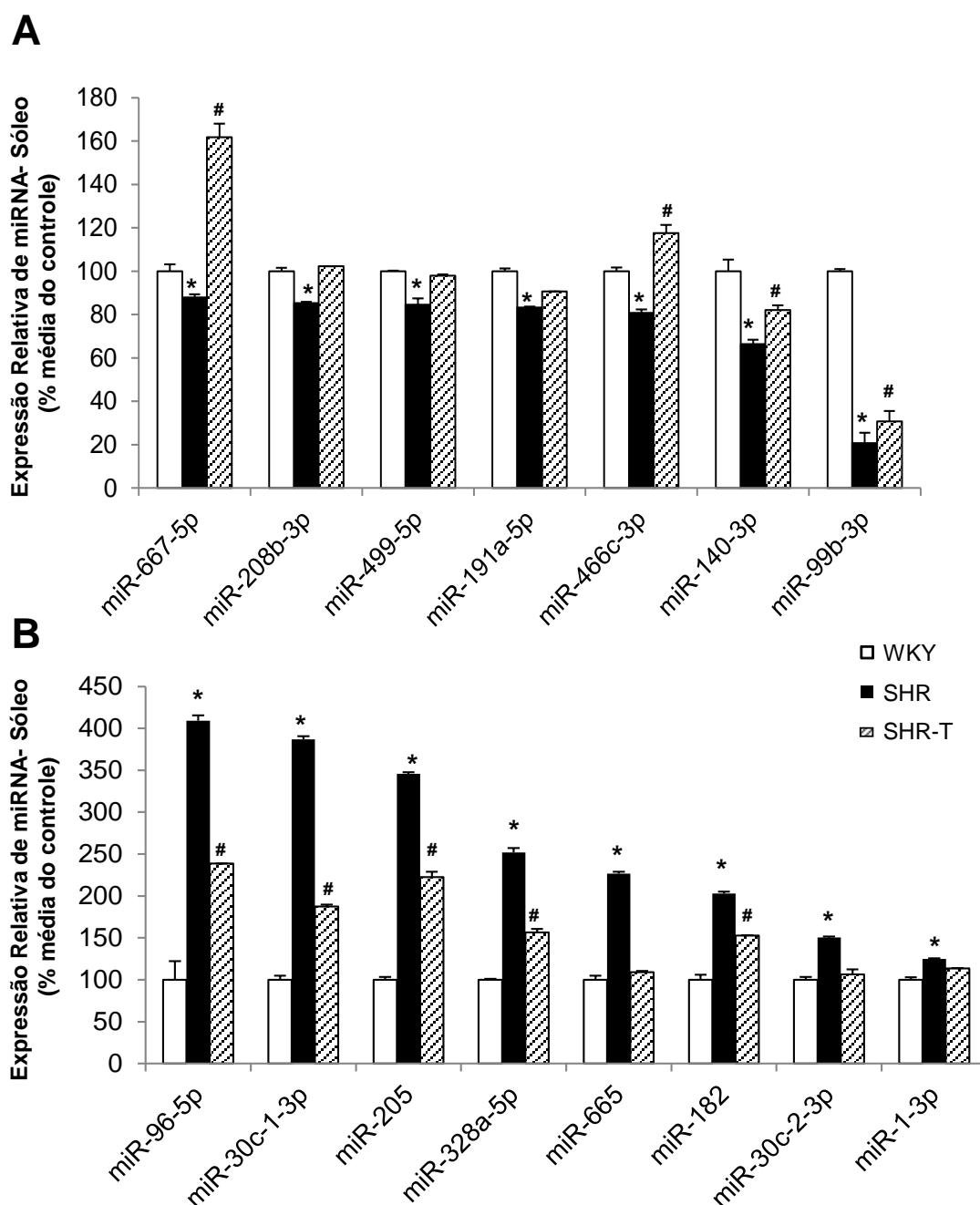


FIGURA 61 – Perfil de miRNAs diferencialmente expressos no grupo SHR comparado ao grupo WKY e efeito do TF avaliados por *microarray* no sóleo. MiRNAs com padrão de expressão reduzido no grupo SHR e prevenido com TF (A) e aumentado no grupo SHR e prevenido com TF (B). Os dados estão representados na forma de porcentagem da média \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. WKY e SHR-T, # $p < 0,05$ vs. WKY.

Foi observado que destes miRNAs selecionados para confirmação, o efeito isolado do TF no grupo WKY-T comparado ao WKY mostrou que dos 7 miRNAs aumentados pelo TF na HA, 4 deles não tiveram alteração induzida pelo TF (miRNAs-140-3p, -499-5p, -191a-5p e -208b-3p) e 3 deles tiveram o padrão de expressão inverso ao encontrado no animal SHR-T, com nível de redução similar ao do SHR (miRNAs-466c-3p, -667-5p e -99b-3p) (FIGURA 62A). Curiosamente, dos 8 miRNAs reduzidos pelo TF na HA, 4 miRNAs também foram estatisticamente reduzidos pelo TF no grupo WKY-T comparado ao WKY, mostrando o mesmo efeito do TF independente da mudança de expressão prévia do miRNA e do modelo animal (miRNAs-182, -96-5p, -328a-5p e -205). Os outros 4 miRNAs não tiveram alteração no grupo WKY-T comparado ao grupo WKY (miRNAs-30c-1-3p, -665, -30c-2-3p e -1-3p) (FIGURA 62B).

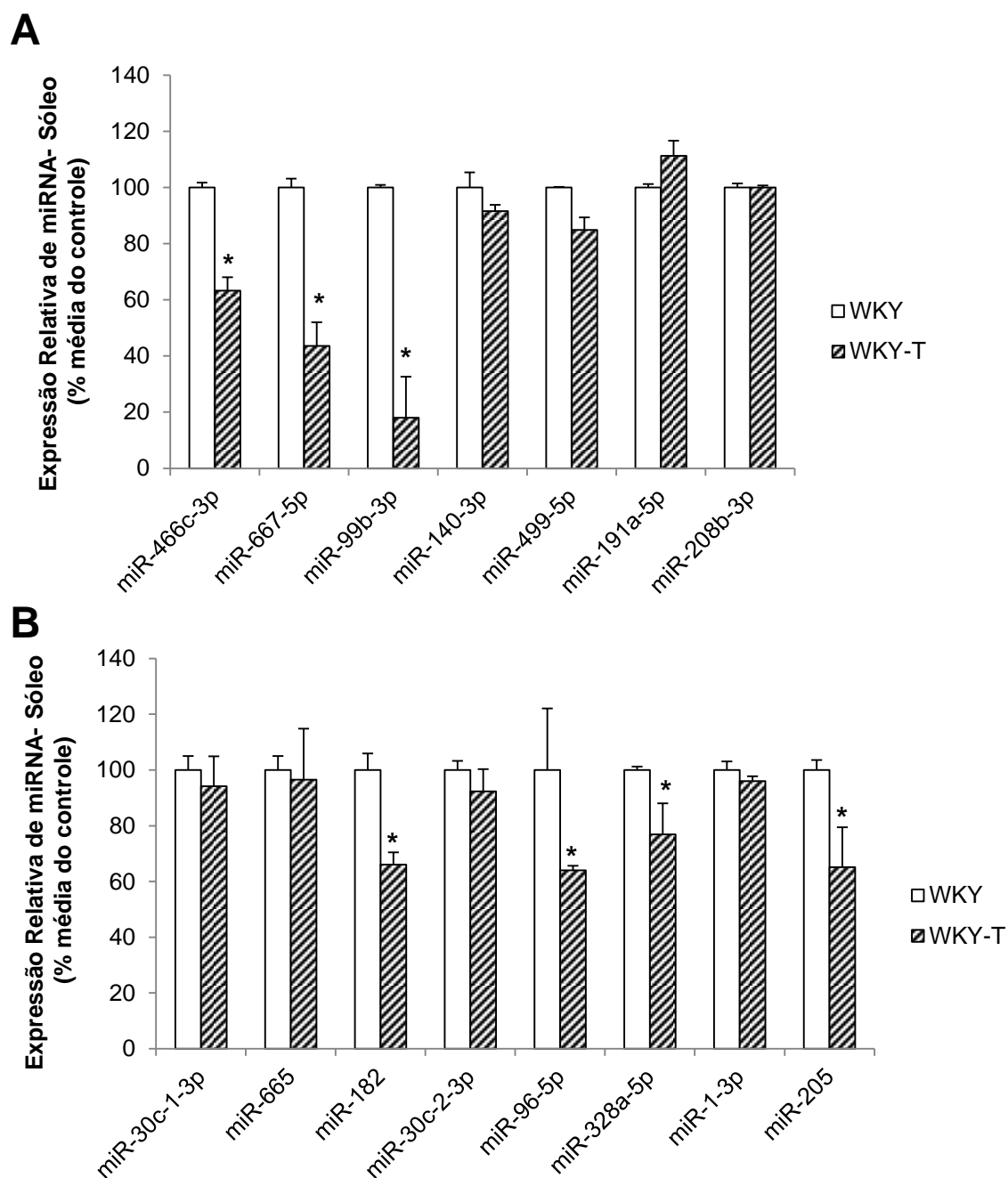


FIGURA 62 – Perfil de miRNAs diferencialmente expressos no grupo WKY-T comparado ao grupo WKY avaliados por *microarray* no músculo sóleo (A e B). Os dados estão representados como porcentagem da média do controle \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. WKY.

7.14 Confirmação de miRNA por *real-time PCR* no sóleo

Após a análise do perfil de miRNAs por *microarray* no músculo sóleo, 15 miRNAs foram selecionados do *microarray* para confirmação por *real-time PCR*. Dos 15 miRNAs analisados, 3 deles não apresentaram diferença estatística entre os grupos (miRNA-30c-1-3p, -191a e -667-5p). Foi verificado apenas uma redução na expressão do miRNA-30c-1-3p no grupo SHR-T comparado ao grupo SHR (FIGURA 63A). Por outro lado, foi confirmado o perfil de redução na HA e normalização como efeito de TF aeróbio para 3 miRNAs (miRNA-99b*, -208b-3p e -499) (FIGURA 63B). Além disso, foi confirmado o perfil de aumento na expressão de 7 miRNAs na HA e normalização ou prevenção em parte desse aumento como efeito do TF (miRNAs-1-3p, -30c-2-3p, -96-5p, -140-5p, -182, -205, -328a-5p e -665) (FIGURA 63C). O miRNA-30c-2-3p teve sua expressão aumentada no grupo SHR conforme verificado no perfil de *microarray*, porém sua expressão não foi alterada com efeito no TF no grupo SHR-T (FIGURA 63C). Curiosamente, o miRNA-140-3p teve sua expressão inversa ao encontrado no *microarray*. No *real-time PCR* foi observado o aumento da sua expressão no grupo SHR e a normalização como efeito de TF no grupo SHR-T. Dessa forma, tivemos 11 miRNAs que tiveram seu padrão de expressão alterado na HA e foram normalizados ou prevenidos em parte pelo TF sendo confirmados por *real-time PCR*. Utilizamos 10 desses miRNAs confirmados para o estudo de alvos *in silico*. O miRNA-328a não foi utilizado no estudo *in silico* por apresentar a menor expressão muscular entre os 11 miRNAs confirmados.

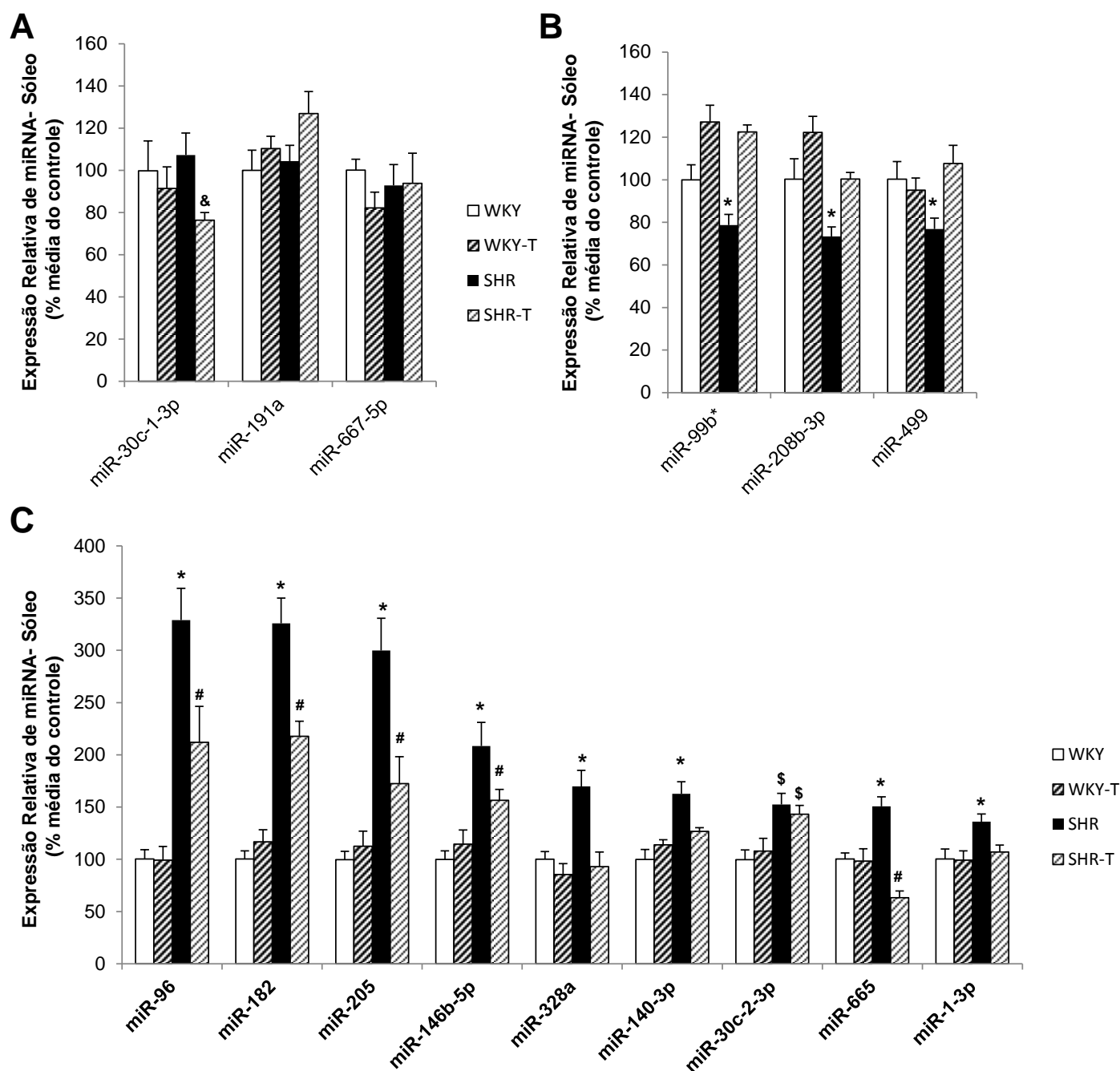


FIGURA 63 – Perfil de miRNAs diferencialmente expressos no grupo SHR comparado ao grupo WKY e efeito do TF avaliados por *real-time PCR*. MiRNAs com padrão de expressão inalterado (A), com padrão reduzido no grupo SHR e prevenido com TF (A) e aumentado no grupo SHR e prevenido com TF (B). Os dados estão representados na forma de porcentagem da média \pm EPM (n=8-9). * p < 0,05 vs. WKY, WKY-T e SHR-T, # p < 0,05 vs. WKY, \$ p < 0,05 vs. WKY e WKY-T e & p < 0,05 vs. SHR.

7.15 Estudo de predição de alvos *in silico*

O estudo de predição de alvos a partir do perfil de expressão de miRNAs proporciona o entendimento dos possíveis mecanismos de envolvimento dos mRNAs regulados pelos miRNAs e as vias de sinalização. Diversos algoritmos vêm sendo desenvolvidos possibilitando estudos *in silico* de interação de miRNAs com genes alvos. Assim, as análises de anotação funcional GO (*Gene Ontology*) e das vias KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) envolvidas nessa interação foram realizadas utilizando a ferramenta DAVID (HUANG et al., 2009), uma vez que integra os genes alvo para avaliar a interação dos miRNAs selecionados pelo *microarray* em vias com importante efeito biológico.

Inicialmente, foi possível verificar o número de genes alvos preditos e validados para cada miRNA selecionado (TABELA 9).

TABELA 9 – Número de miRNAs validados e preditos dos miRNAs diferencialmente expressos pela HA e corrigidos pelo TF aeróbio.

miRNAs	Alvos validados (n)	Alvos preditos (n)
miRNA-1-3p	79	790
miRNA-205	39	416
miRNA-146b-5p	34	224
miRNA-96	34	1.049
miRNA-182	22	1.121
miRNA-99b	19	71
miRNA-499	11	224
miRNA-140-3p	9	389
miRNA-208b-3p	6	182
miRNA-665	0	371

Além disso, verificamos quais mRNAs são regulados por pelo menos 3 ou mais miRNAs simultaneamente (TABELA 10).

TABELA 10 – mRNAs co-desregulados por 3 ou mais miRNAs diferencialmente expressos pela HA e corrigidos pelo TF aeróbio.

mRNAs	Interações de miRNAs validados (n)	Lista de miRNAs
p53	7	miRNAs-1, -96 -140, -146b-5p,-182, -205 e -499
Kras	6	miRNAs-1, -96 -140, -146b-5p,-182 e -205
Akt1	3	miRNAs-1, -96 e -205
Bim	3	miRNAs-1, -96 e -182
Camp	3	miRNAs-1, -182 e -499
Cdkn1a	3	miRNAs-146b-5p,-182 e -208b-3p
Creb1	3	miRNAs-1, -96 e -182
Egfr	3	miRNAs-146b-5p,-182 e -205
Frap1/ mTOR	3	miRNAs-1, -96 e -182
Npepps	3	miRNAs-96, -99b* e -205
Met	3	miRNAs-1, -146b-5p e -205
Pten	3	miRNAs-1, -182 e -205
Scpep1	3	miRNAs-1, -96 e -499
Zeb1	3	miRNAs-1, -182 e -205

Vale ressaltar que o perfil de miRNAs identificado na HA e prevenidos pelo TF pode afetar milhares de genes alvo presentes em centenas de vias de sinalização preditas a partir do grupo de genes alvo validados. Isto se deve pelo fato de cada miRNA poder alvejar diversos genes alvo. Dessa forma, com a descoberta diária de novos genes alvo validados e preditos, a análise a partir da utilização de genes alvos preditos extrapolaria enormemente o número de vias envolvidas.

Entre as vias de sinalização apontadas pelo DAVID com importante efeito biológico, 26 vias foram agrupadas em 4 grandes grupos de processos biológicos designados de morte celular, desenvolvimento vascular, regulação metabólica e regulação do crescimento celular a partir dos alvos validados dos miRNAs-1-3p, -99b*, -205, -146b-5p, -96, -182, -499a, -140-3p e -208b-3p (TABELA 11).

No grupo de desenvolvimento vascular, observamos um conjunto de genes relacionados ao processo angiogênico a partir dos miRNAs selecionados, tais como: BMP4, NRP1, SMAD7, TGFB2, TNNI3, PTEN, CXCL12, AKT1, FAK, HIF1A, HAND1, CD44, HAND2, HMOX1, MAPK14, AGT, NOS3, COL1A1, NOS2, FGF2, NKX2-5, PLA2 e ACVR1. Na via de sinalização mediada por VEGF, podemos observar os alvos validados marcados em vermelho a partir dos miRNAs selecionados (FIGURA 64).

★ Via Angiogênica

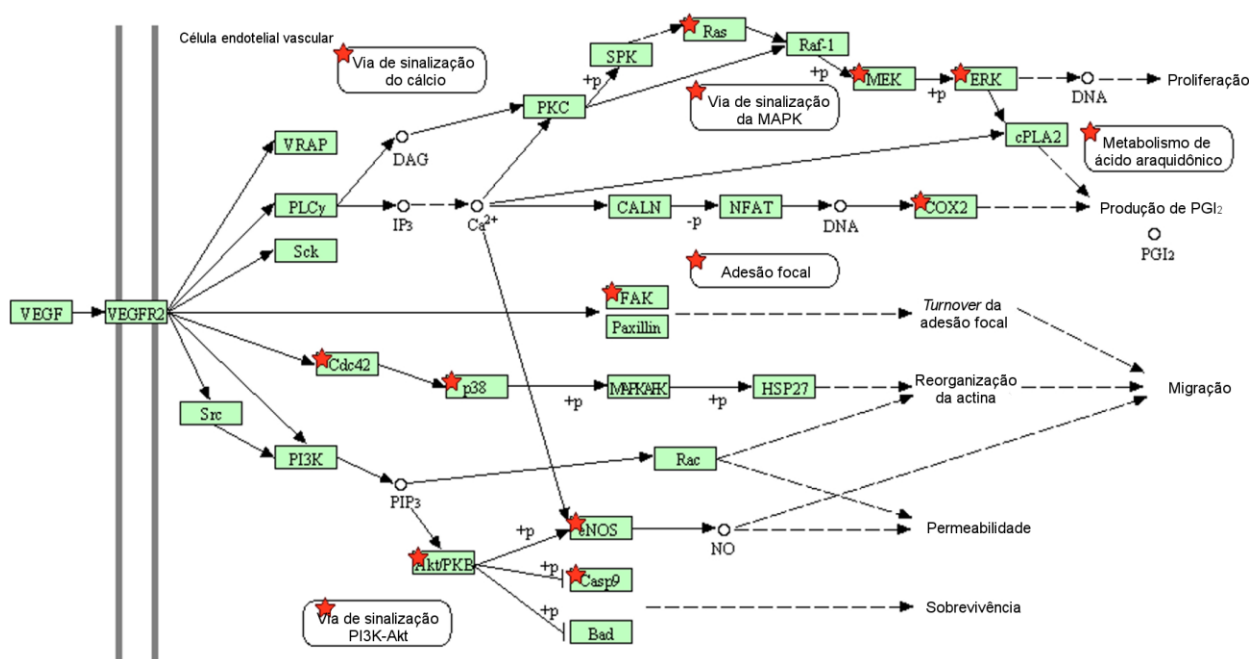


FIGURA 64 – Via de regulação angiogênica. Alvos validados dos miRNAs selecionados estão marcados em vermelho na via de sinalização angiogênica mediada por VEGF gerada pelo KEGG. O programa também nos mostra as vias de sinalização envolvidas pelo conjunto dos miRNAs como a da PI3K/ Akt, MAPK, de sinalização de cálcio, adesão focal e metabolismo do ácido araquidônico.

TABELA 11- Vinte seis vias foram agrupadas em quatro grandes grupos de processos biológicos a partir de alvos validados dos miR-1-3p,-99b,-205,-146b-5p,-96,-182,-499a,-140-3p e -208b-3p.										
Função Biológica	Score de Enriquecimento	Nome da via (KEGG)	Nº Genes	Porcentagem	Valor de p	Lista Total	Fold Enrichment	Teste de Bonferroni	Teste de Benjamini	FDR
Morte Celular	16,78	regulação da morte celular	50	27,32	2,54E-20	177	4,689	6,65E-17	3,33E-17	4,51E-17
		regulação de morte celular programada	49	26,78	1,37E-19	177	4,612	3,59E-16	8,97E-17	2,43E-16
		regulação da apoptose	48	26,23	5,65E-19	177	4,563	1,48E-15	2,46E-16	1,00E-15
		regulação negativa da apoptose	30	16,39	1,68E-15	177	6,477	4,36E-12	2,72E-13	2,95E-12
		regulação negativa de morte celular programada	30	16,39	2,44E-15	177	6,387	6,39E-12	3,55E-13	4,33E-12
Desenvolvimento Vascular	10,62	regulação negativa de morte celular	30	16,39	2,60E-15	177	6,369	6,68E-12	3,52E-13	4,53E-12
		desenvolvimento de vasos	23	12,57	8,86E-13	177	7,175	2,32E-09	7,24E-11	1,57E-09
		desenvolvimento vascular	23	12,57	1,45E-12	177	7,003	3,79E-09	1,11E-10	2,57E-09
		morfogênese de vasos sanguíneos	20	10,93	3,34E-11	177	7,244	8,74E-08	1,82E-09	5,92E-08
		angiogênese	15	8,20	7,67E-09	177	7,746	2,01E-05	2,64E-07	1,36E-05
Regulação Metabólica	7,06	regulação positiva de proteínas do processo metabólico	19	10,383	2,71E-09	177	5,976	7,1E-06	1,06E-07	4,8E-06
		regulação positiva de processos metabólicos dependentes de fosfato	13	7,104	6,28E-09	177	9,936	1,6E-05	2,22E-07	1,1E-05
		regulação positiva de processos metabólicos dependentes de fósforo	13	7,104	6,28E-09	177	9,936	1,6E-05	2,22E-07	1,1E-05
		regulação da fosforilação de aminoácidos	16	8,743	7,28E-09	177	7,069	1,9E-05	2,54E-07	1,3E-05
		regulação positiva de fosforilação	12	6,557	4,99E-08	177	9,455	1,3E-04	1,47E-06	8,8E-05
		regulação positiva da fosforilação de aminoácidos	11	6,011	2,25E-07	177	9,446	5,9E-04	5,26E-06	4,0E-04
		regulação positiva de processos metabólicos de proteínas celulares	16	8,743	3,79E-07	177	5,248	9,9E-04	8,41E-06	6,7E-04
		regulação de proteínas do processo metabólico	22	12,022	9,25E-07	177	3,547	2,4E-03	1,86E-05	1,6E-03
		regulação de modificações proteicas	17	9,290	1,52E-06	177	4,404	4,0E-03	2,88E-05	2,7E-03
		regulação positiva de modificações proteicas	13	7,104	5,98E-06	177	5,313	1,6E-02	9,65E-05	1,1E-02
Regulação do Crescimento Celular	5,11	regulação do tamanho dos componentes celulares	17	9,29	4,93E-07	177	4,794	0,00129	1,0E-05	8,7E-04
		regulação do tamanho celular	15	8,20	4,93E-07	177	5,565	0,00129	1,0E-05	8,7E-04
		regulação negativa do tamanho celular	10	5,46	5,52E-06	177	7,720	0,01433	9,0E-05	9,8E-03
		regulação do crescimento celular	13	7,10	8,70E-06	177	5,122	0,02251	1,4E-04	1,5E-02
		regulação negativa do crescimento celular	9	4,92	9,28E-05	177	6,253	0,21557	1,1E-03	1,6E-01
		regulação negativa do crescimento celular	8	4,37	1,94E-04	177	6,646	0,39734	2,1E-03	3,4E-01

No grupo de sinalização de morte celular, observamos um conjunto de genes relacionados ao processo pró-apoptótico e anti-apoptótico, relevantes para a homeostase do sistema vascular e muscular, a partir dos miRNAs selecionados, tais como: PTGS2, MMP9, FASLG, PMAIP1, PTEN, ADORA1, IL10, AKT1, CASP3, CASP9, CD44, TIA1, HMOX1, NOS3, FAS, NQO1, FGF2, TWIST2, DHCR24, EGFR, NOL3, SOCS2, MADD, RELA, TP53, MAPK1, F2, KCNH8, ACVR1, TNF, BCL2L2, NR3C1, IGF1R, KRAS, BCL2, AGT, NKX2-5, APC, BMP4, IL6, CREB1, SMAD3, NR4A1, HGF, ADIPOQ, TNFSF10, CDKN1A, CDKN1B, ETS1, NEUROD1. Na via de sinalização de morte celular, podemos observar os alvos validados marcados em vermelho a partir dos miRNAs selecionados (FIGURA 65).

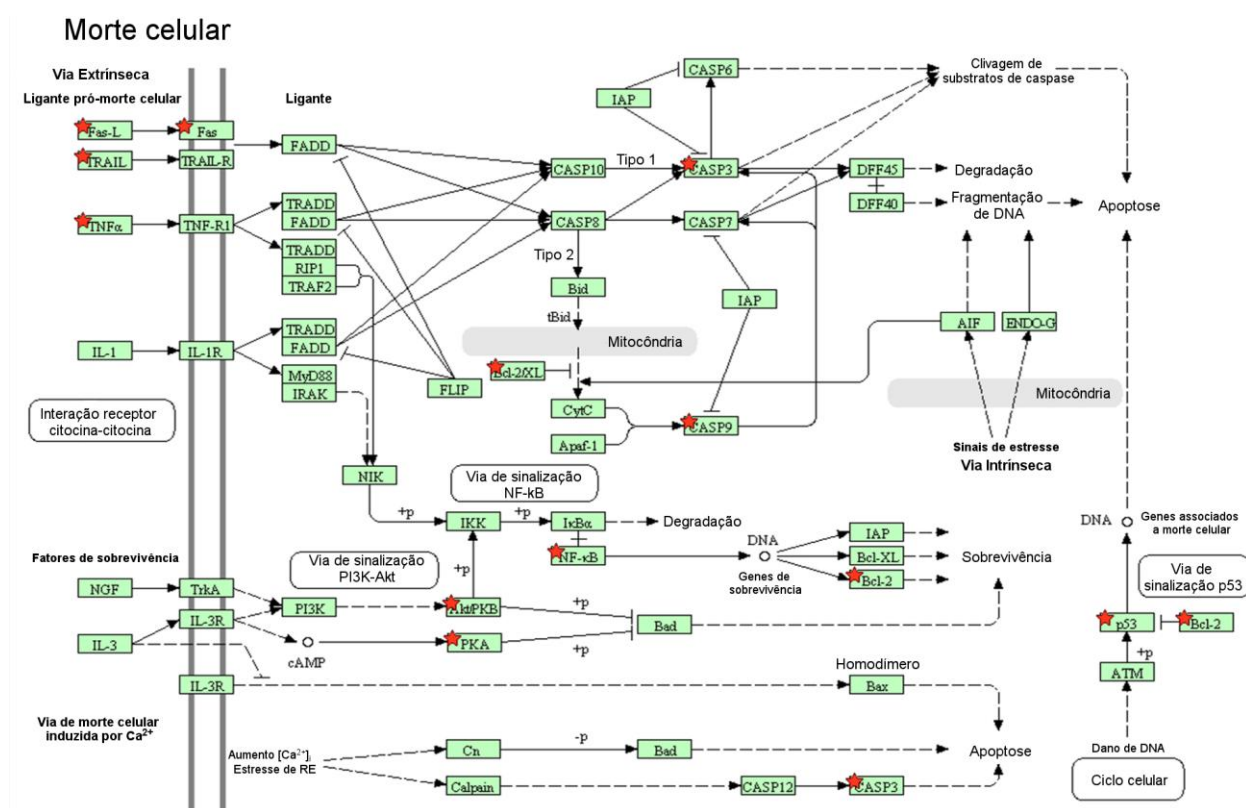


FIGURA 65 – Via de regulação de morte celular. Alvos validados dos miRNAs selecionados estão marcados em vermelho na via de sinalização de morte celular gerada pelo KEGG. O programa também nos mostra as vias de sinalização envolvidas pelo conjunto dos miRNAs como a de fatores de sobrevivência, via PI3K/ Akt, vias de sinalização extrínseca e intrínseca de morte, ciclo celular, morte celular induzida por cálcio, sinalização de p53 e via de sinalização de NF-kB.

7.16 *Array* angiogênico- sóleo

Para análise do perfil de expressão de genes envolvidos no processo angiogênico no músculo sóleo, quatro amostras de cada grupo foram submetidas à análise de expressão gênica por *real-time PCR*. Foram analisados 84 genes angiogênicos (TABELA 4).

Dos 84 genes analisados, 50 genes foram diferencialmente expressos no músculo sóleo de SHR comparado ao grupo WKY. Desses 50 genes, 43 deles foram reduzidos e 7 foram aumentados pela HA.

A partir desta análise, foi observado diferentes efeitos do TF aeróbio sobre a expressão desses genes na HA, representado pelo grupo SHR-T. Dos 43 genes envolvidos no processo angiogênico com expressão reduzida no grupo SHR, 8 deles não apresentaram diferença significativa quando submetido ao protocolo de TF aeróbio no grupo SHR-T (TABELA 12). Curiosamente, 35 genes foram normalizados quando submetido ao TF no grupo SHR-T comparado ao grupo SHR (FIGURA 67).

TABELA 12 – Expressão relativa de genes angiogênicos reduzidos no grupo SHR comparado ao grupo WKY e não modificados pelo TF no músculo sóleo. Resultados expressos como média \pm EPM (n=4). * $p < 0,05$ vs. WKY.

Parâmetros	WKY	SHR	SHR-T
Fgfr3	1 \pm 0,2	0,7 \pm 0,0*	0,7 \pm 0,0*
Hgf	1 \pm 0,0	0,6 \pm 0,1*	0,7 \pm 0,1*
Ifng	1 \pm 0,2	0,6 \pm 0,1*	0,6 \pm 0,1*
Mmp14	1 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1*	0,8 \pm 0,1*
Sp1pr1	1 \pm 0,2	0,7 \pm 0,1*	0,7 \pm 0,1*
Serpinf1	1 \pm 0,2	0,4 \pm 0,1*	0,5 \pm 0,1*
Thbs1	1 \pm 0,0	0,7 \pm 0,1*	0,8 \pm 0,1*
Timp1	1 \pm 0,1	0,7 \pm 0,2*	0,7 \pm 0,1*

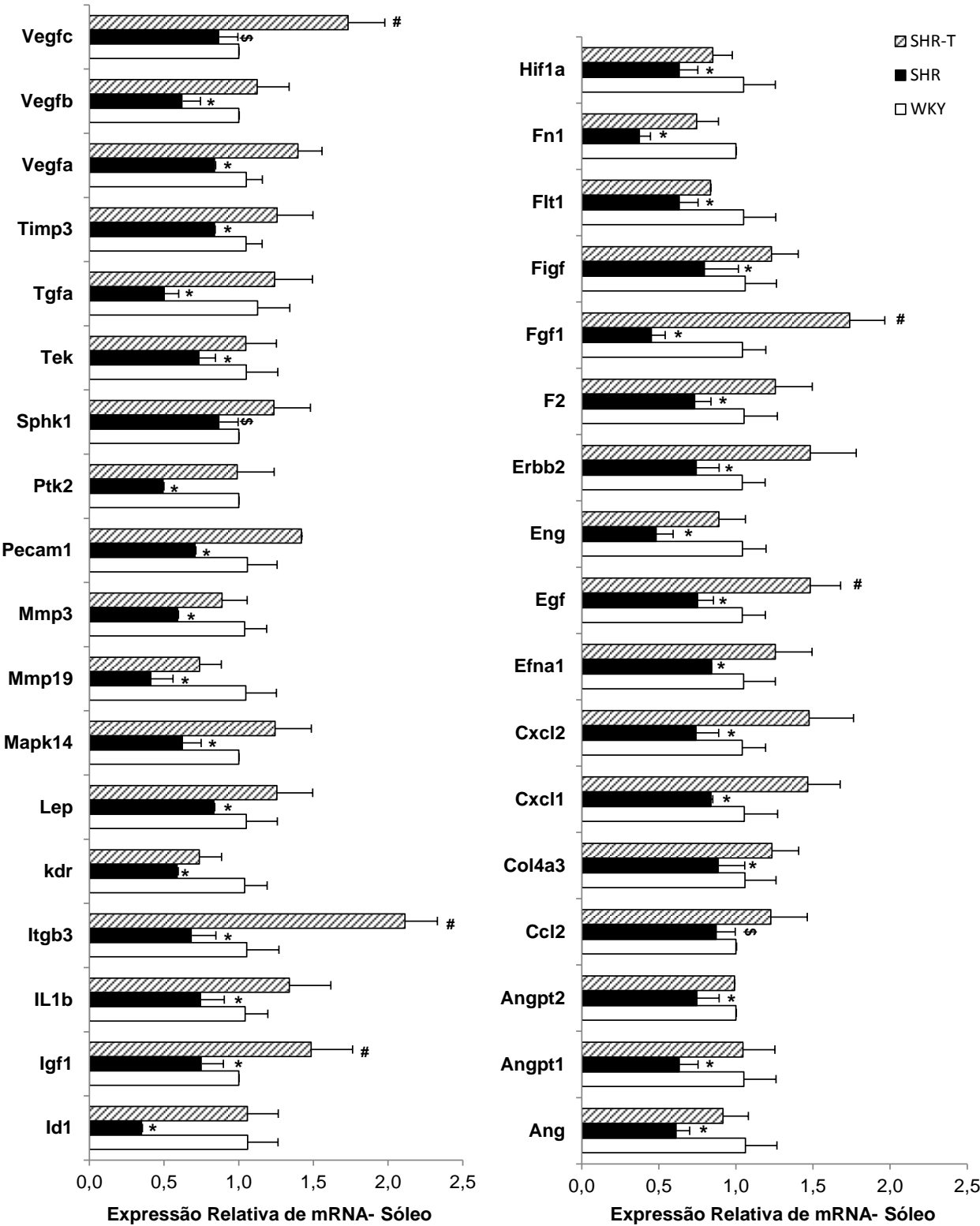


FIGURA 67 - Expressão de genes angiogênicos reduzidos no grupo SHR comparado ao grupo WKY e normalizados pelo TF no sóleo. Os dados estão representados como média \pm EPM (n=4). * $p < 0,05$ vs. WKY e SHR-T, # vs. WKY, \$ vs. SHR-T.

Nos genes com expressão aumentada na HA, 4 deles não sofreram efeito do TF no grupo SHR-T, permanecendo com o mesmo perfil de expressão da doença (TABELA 13). Por outro lado, 3 genes foram normalizados pelo TF no grupo SHR-T comparado ao SHR (FIGURA 68).

Não foi observado alteração na expressão de 34 genes analisados pela HA comparado ao grupo WKY (Akt1, Anpep, BAI1, Cdh5, Col18a1, Cxcl9, Edn1, Epas1, Fgf2, Fgf6, Ifna1, Ifnb1, IL6, Itga5, Jag1, Lect1, Mmp2, Mmp9, Nos3, Nrp2, Pdgfa, Pgf, Pla1, Plg, Ptgs1, Serpinb5, Serpine1, Tgfb1, Tgfb2, Tgfb3, Tie1, Timp2, Tnf e Tymp).

TABELA 13 – Expressão relativa de genes aumentados no grupo SHR e não modificados pelo TF no músculo sóleo. Resultados expressos como média \pm EPM (n=4). * $p < 0,05$ vs. WKY.

Parâmetros	WKY	SHR	SHR-T
F3	1 \pm 0,2	1,47 \pm 0,2*	1,63 \pm 0,0*
Itgav	1 \pm 0,1	1,48 \pm 0,2*	1,78 \pm 0,3*
Mdk	1 \pm 0,0	1,24 \pm 0,1*	2,48 \pm 0,5*
Nrp1	1 \pm 0,0	1,49 \pm 0,2*	2,23 \pm 0,5*

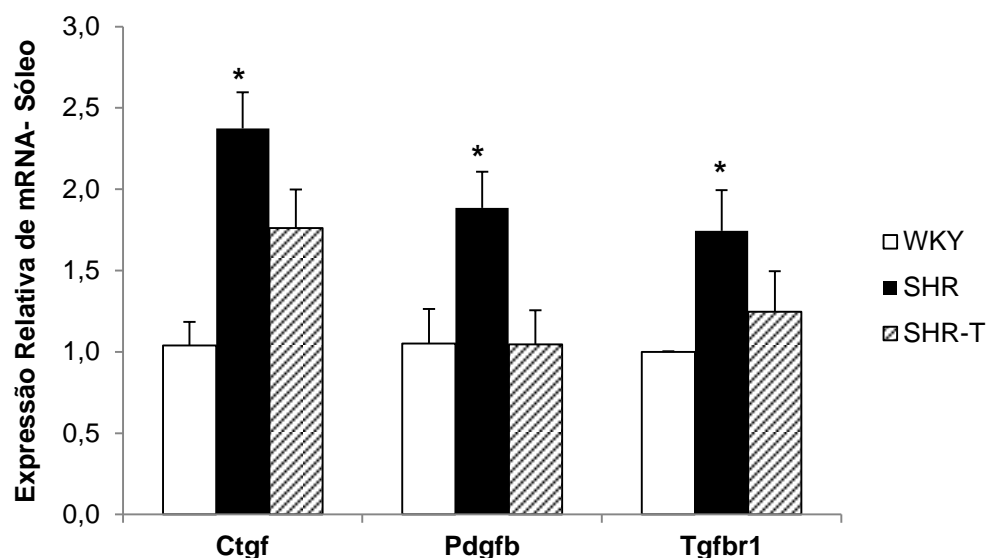


FIGURA 68 – Expressão de genes aumentados no grupo SHR comparado ao grupo WKY e normalizados pelo TF no músculo sóleo. Os dados estão representados como média \pm EPM (n=4). * $p < 0,05$ vs. WKY e SHR-T.

7.17 Expressão protéica

7.17.1 Síntese protéica muscular mediado pela via IGF-I/ Akt/ mTOR na hipertensão arterial: papel do treinamento físico

A FIGURA 69 mostra os níveis protéicos avaliados por *western blot* da via de IGF-I/ Akt/ mTOR no músculo sóleo. Comparado ao grupo WKY sedentário, a HA reduziu os níveis protéicos de IGF-I, PI3K_{p110 α} , p-Akt_{Ser473}/ Akt, p-GSK-3_{Ser9}/ GSK-3 β , p-mTOR_{Ser2448}/ mTOR, p-p70S6k_{Thr389}/ p70S6k e p-eIF4E_{Ser209}/ eIF4E no grupo SHR (FIGURA 69A-F, respectivamente), indicando que estas proteínas da via IGF-I/ Akt/ mTOR podem atuar sinergicamente para um prejuízo da síntese protéica muscular induzida pela HA. Por outro lado, o TF conseguiu restaurar os níveis dessas proteínas no grupo SHR-T, com exceção para a proteína p-GSK-3_{Ser9}/ GSK-3 β que manteve o padrão da doença no grupo SHR-T. Além disso, não foi observado alteração na expressão das proteínas IGF-IR, PTEN e p-4E-BP1_{Thr37/46}/ 4E-BP1 nos diferentes grupos (FIGURA 69B, D e I, respectivamente).

Das proteínas estudadas, a p-GSK-3_{Ser9}/ GSK-3 β foi a única proteína aumentada no grupo WKY-T comparado aos outros grupos, sugerindo seu papel anti-apoptótico mediado pelo TF aeróbio na manutenção da massa muscular.

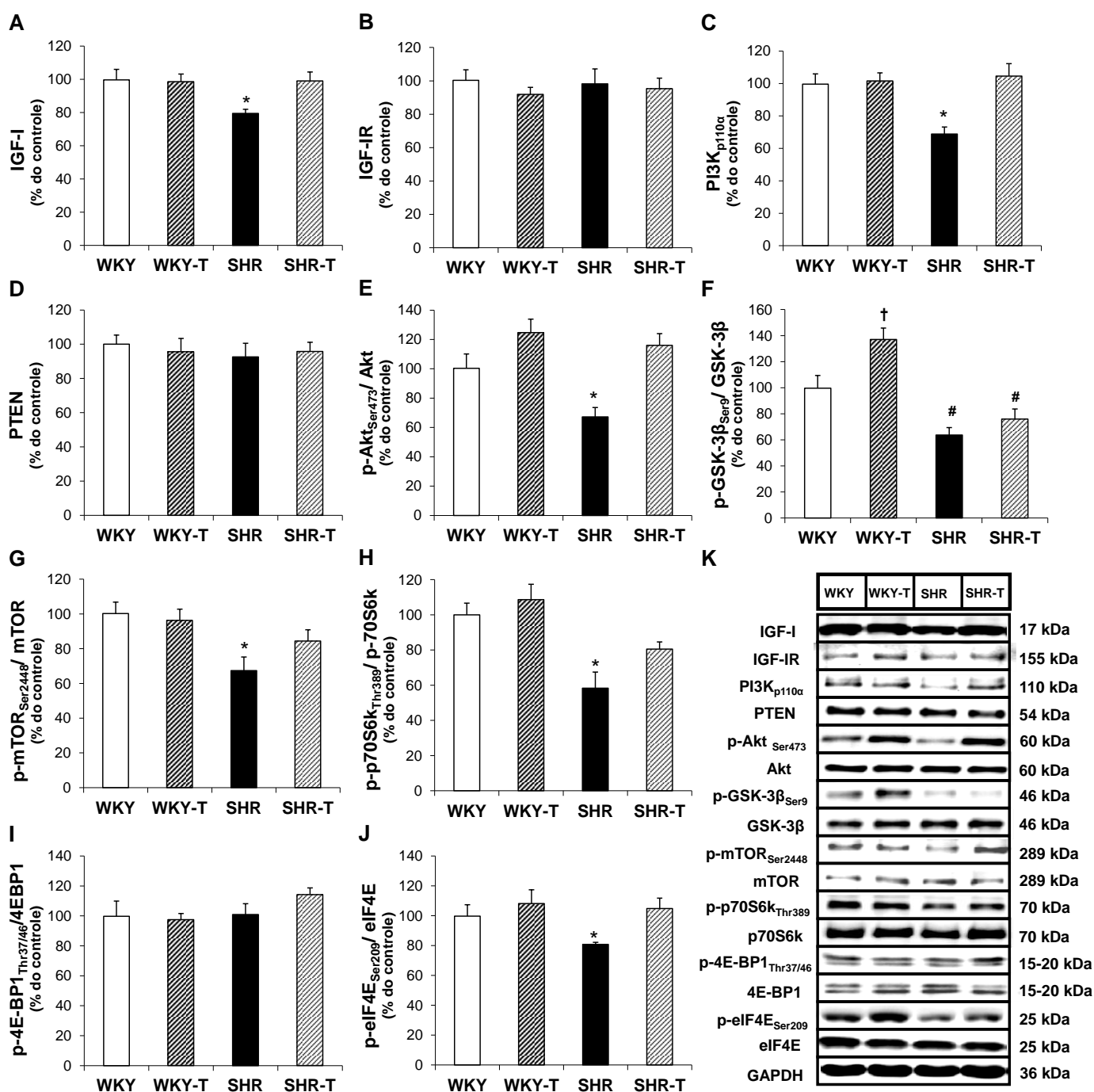


FIGURA 69 – Expressão de proteínas da via de sinalização IGF-I/ Akt/ mTOR envolvidas no anabolismo muscular (sóleo) de animais WKY, WKY-T, SHR e SHR-T. IGF-I (A), IGF-IR (B), PI3K^{p110α} (C), PTEN (D), p-Akt^{Ser473}/ Akt (E), p-GSK-3^{Ser9}/ GSK-3β (F), p-mTOR^{Ser2448}/ mTOR (G), p-p70S6k^{Thr389}/ p70S6k (H), p-4E-BP1^{Thr37/46}/ 4E-BP1 (I), p-eIF4E^{Ser209}/ eIF4E (J) e os seus respectivos blots representativos (K). Os dados estão representados na forma de porcentagem da média ± EPM (n=7)

por grupo). * $p < 0,05$ vs. WKY, WKY-T e SHR-T, # $p < 0,05$ vs. WKY e WKY-T, † $p < 0,05$ vs. WKY, SHR e SHR-T.

7.17.2 Degradação protéica muscular na hipertensão arterial: papel do treinamento físico

A FIGURA 70 mostra os níveis protéicos avaliados por *western blot* dos mediadores de degradação protéica no músculo sóleo. Comparado ao grupo WKY sedentário, a HA não modificou os níveis protéicos de p-FoxO1_{Ser256}/ FoxO1 (FIGURA 70A) e FoxO3a (FIGURA 70B). FoxO é responsável pela ativação de genes do sistema proteolítico ubiquitina proteassoma, especialmente as E3 ligases MuRF-1 e MAFbx/ Atrogin-1. Além disso, a proteína p38 também participa na ativação de MAFbx/ Atrogin-1. Não foi encontrado alteração na expressão dessas proteínas nos diferentes grupos (FIGURA 70C-E), indicando que esta via não é ativada em modelo experimental de HA. O TF aeróbio também não modificou a expressão dessas proteínas estudadas.

Não foi observado alteração na expressão da proteína FSTL-1, um gene responsável pela repressão da diferenciação muscular no processo miogênico (FIGURA 70F).

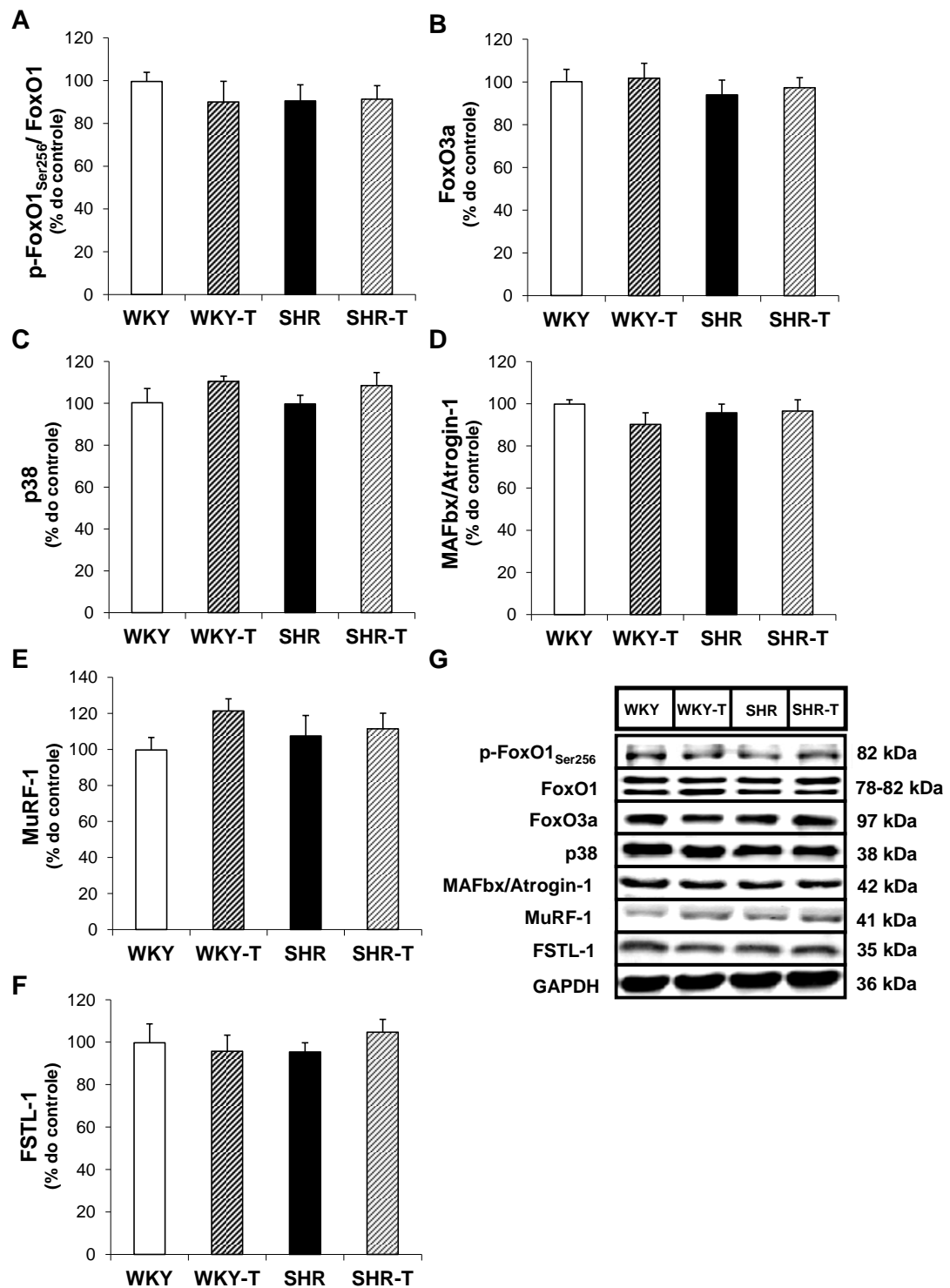


FIGURA 70 – Expressão de proteínas envolvidas no catabolismo muscular (sóleo) de animais WKY, WKY-T, SHR e SHR-T. p-FoxO1_{Ser256}/FoxO1(A), FoxO3a (B), p38 (C), MAFbx/Atrogin-1 (D), MuRF-1 (E), FSTL-1 (F) e os seus respectivos blots representativos (G). Os dados estão representados na forma de porcentagem da média \pm EPM (n=7 por grupo).

7.17.3 Proteínas envolvidas no processo angiogênico na hipertensão arterial: papel do treinamento físico

A FIGURA 71 mostra os níveis protéicos avaliados por *western blot* dos reguladores da via angiogênica no músculo sóleo. Comparado ao grupo WKY sedentário, a HA reduziu os níveis protéicos de VEGF-A, VEGFR2 e eNOS no grupo SHR (FIGURA 71A, D e E, respectivamente). Por outro lado, o TF conseguiu restaurar os níveis dessas proteínas no grupo SHR-T, indicando que estas proteínas da via VEGF/ VEGFR2/ eNOS podem atuar sinergicamente para um apropriado crescimento vascular (FIGURA 71A, D e E, respectivamente). Além disso, o TF aeróbio aumentou a expressão de eNOS no grupo WKY-T comparado ao grupo WKY (FIGURA 71E) .

Não foi observado alteração na expressão das proteínas VEGF-B, VEGFR1, p-Erk_{Thr202/Tyr204}/ Erk e Angpt-2 nos diferentes grupos estudados (FIGURA 71B, C, F e G, respectivamente).

Outros mediadores da via angiogênica foram avaliados. Foi observado uma redução na expressão de TGF α no grupo SHR comparado ao WKY (FIGURA 71H). Sabe-se que TGF α promove angiogênese via PI3K/ Akt/ eNOS, compartilhando da mesma via de sinalização mediada por VEGF/ VEGFR2. Similarmente, a FAK (proteína quinase de adesão focal) apresenta um importante papel na migração e proliferação de células endoteliais contribuindo para a angiogênese. A HA levou uma redução na p-FAK_{Tyr397}/ FAK no grupo SHR (FIGURA 71I). Curiosamente, o TF normalizou os valores dessas proteínas no grupo SHR-T.

Os níveis protéicos da proteína anti-apoptóticas Bcl-2 foi similares entre os grupos WKY e WKY-T. Em contraste, o grupo SHR apresentou uma pronunciada redução nos níveis protéicos de Bcl-2 comparado ao grupo WKY (FIGURA 71J). Este resultado foi similar ao encontrado nos animais de 3 meses de idade com HA no início do protocolo, sugerindo uma ativação apoptótica muscular independente do estágio de HA. Interessantemente, o TF restaurou os níveis protéicos da proteína Bcl-2 no grupo SHR-T contribuindo para a sobrevivência da rede microvascular.

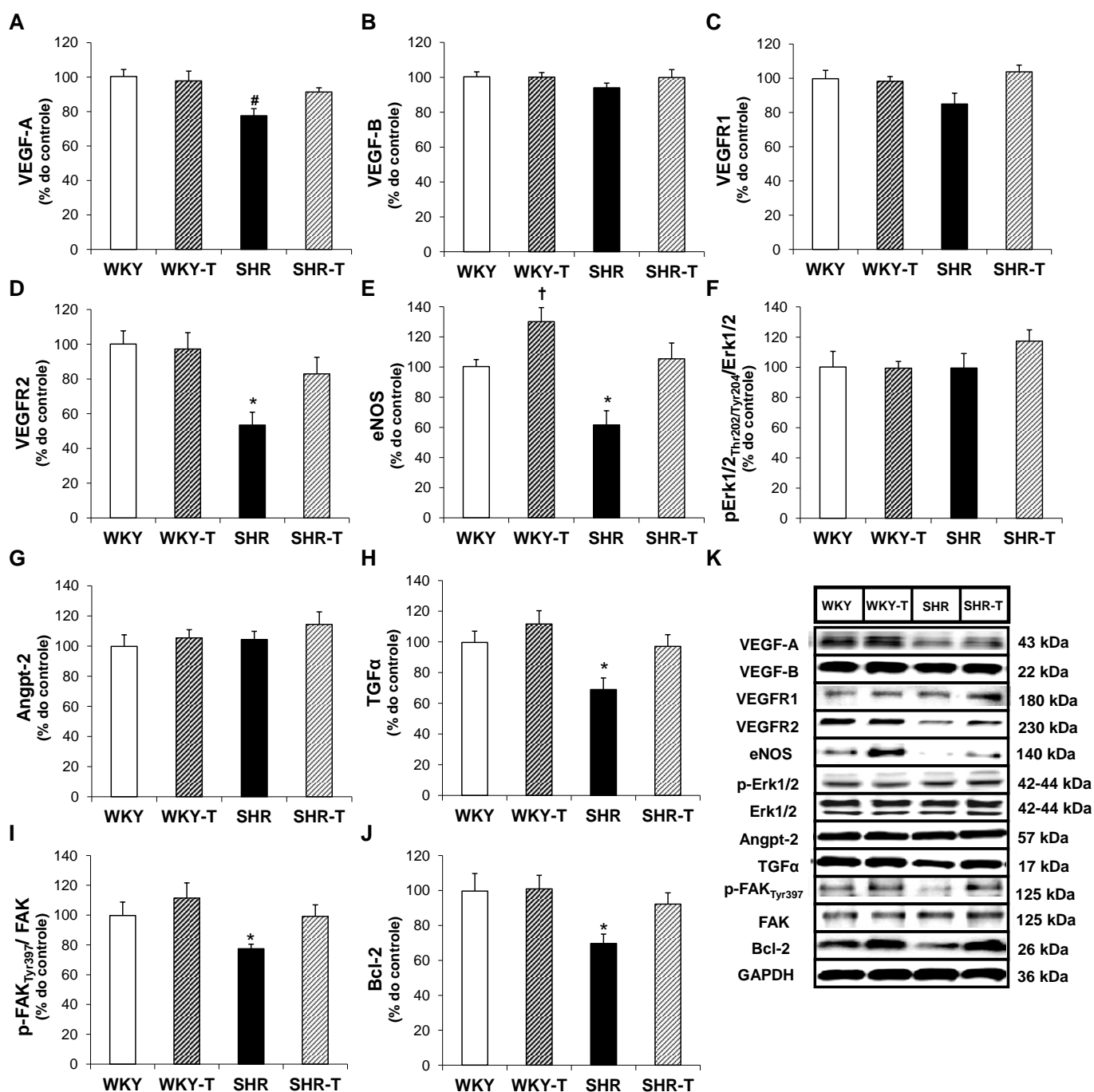


FIGURA 71 – Expressão de proteínas envolvidas na angiogênese no músculo sóleo de animais WKY, WKY-T, SHR e SHR-T. VEGF-A (A), VEGF-B (B), VEGFR1 (C), VEGFR2 (D), eNOS (E), p-Erk^{Thr202/Tyr204}/Erk (F), Angpt-2 (G), TGFα (H), p-FAK^{Tyr397}/FAK (I), Bcl-2 (J) e os seus respectivos blots representativos (K). Os dados estão representados na forma de porcentagem da média ± EPM (n=7 por grupo). * p< 0,05 vs. WKY, WKY-T e SHR-T, # p< 0,05 vs. WKY e WKY-T, † p< 0,05 vs. WKY e SHR.

7.17.4 Reguladores do metabolismo e perfil de fibras muscular na hipertensão arterial: papel do treinamento físico

Comparado ao grupo WKY sedentário, a HA aumentou os níveis protéicos de PUR β (FIGURA 72A) e SP3 (FIGURA 72C) no grupo SHR, indicando que estas proteínas podem inibir a expressão de β -MHC no músculo esquelético implicado na mudança do perfil de fibras musculares. Por outro lado, TF conseguiu corrigir os níveis dessas proteínas no grupo SHR-T trazendo para valores próximos ao controle. Não foi observado alteração na expressão da proteína SOX6 nos diferentes grupos estudados (FIGURA 72B).

A proteína PPAR α não foi modificada entre os grupos (FIGURA 72D). Por outro lado, a expressão de PPAR β/δ foi reduzida no grupo SHR comparado ao WKY. O TF conseguiu corrigir estes valores no grupo SHR-T, contribuindo para a manutenção do fenótipo oxidativo muscular (FIGURA 72E).

Não foi observado alteração na expressão de p-AMPK_{Thr172}/ AMPK entre os grupos SHR e WKY. O TF aumentou a expressão de p-AMPK_{Thr172}/ AMPK no grupo WKY-T comparado ao WKT (FIGURA 72F).

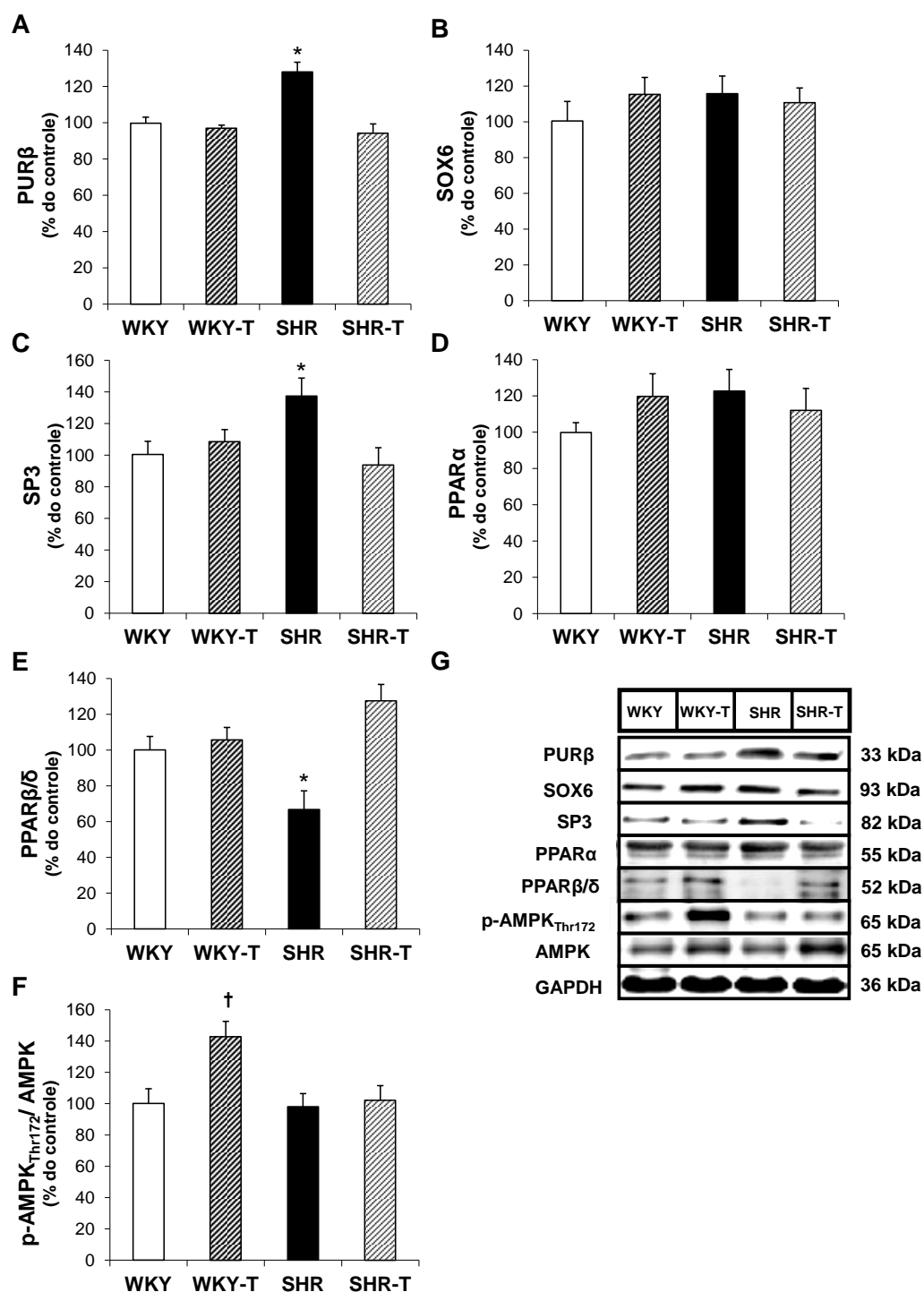


FIGURA 72 – Expressão de proteínas envolvidas no perfil de fibras e metabolismo muscular (sóleo) de animais WKY, WKY-T, SHR e SHR-T. PUR β (A), SOX6 (B), SP3 (C), PPAR α (D), PPAR β/δ (E), p-AMPK_{Thr172}/AMPK (F) e os seus respectivos blots representativos (G). Os dados estão representados na forma de porcentagem da média \pm EPM (n=7 por grupo). * $p < 0,05$ vs. WKY, WKY-T e SHR-T, † $p < 0,05$ vs. WKY, SHR e SHR-T.

QUADRO 2- Resumo das alterações morfofuncionais e hemodinâmicas na 2ª etapa do estudo

Respostas Morfofuncionais e Hemodinâmicas			
Variáveis	WKY-T	SHR	SHR-T
Função Cardíaca	↔	↓	↔ ↑
Massa Cardíaca e ERP	↑	↑	↑ ↔
Septo	↔	↑	↑ ↓
Parede Posterior	↔	↑	↑ ↓
Massa do Pulmão	↔	↑	↑ ↔
Massa do Fígado	↔	↑	↑ ↔
Edema de Pulmão	↔	↑	↑ ↔
Pressão Arterial	↔	↑	↑ ↓
Frequência Cardíaca	↓	↔	↓ ↓
Tolerância aos esforços e VO ₂	↑	↓	↑ ↑

↔ não muda, ↓ reduz e ↑ aumenta vs. WKY
 ↔ não muda, ↓ reduz e ↑ aumenta vs. SHR

QUADRO 3- Resumo das alterações musculares e vasculares na 2ª etapa do estudo

Respostas Morfofuncionais Musculares e Vasculares induzidas pela HA e TF			
Variáveis	WKY-T	SHR	SHR-T
Atividade da citrato sintase	↑	↔	↑ ↑
Massa muscular esquelética	↔	↓	↔ ↑
AST fibras tipo I	↔	↓	↔ ↑
AST fibras tipo II	↔	↓	↔ ↑
AST fibras Intermediárias	↔	↓	↔ ↑
% de fibras tipo I	↔	↓	↔ ↑
% de fibras tipo II	↔	↑	↔ ↓
% de fibras intermediárias	↔	↑	↔ ↓
Força-frequência sóleo	↔	↓	↔ ↑
Força-frequência EDL	↔	↓	↓ ↑
Força específica sóleo- tétano	↔	↓	↔ ↑
Força específica EDL- tétano	↔	↓	↔ ↑
TR50 sóleo- tétano	↔	↑	↔ ↓
TR50 EDL- tétano	↔	↑	↔ ↓
Fadiga sóleo	↔	↔	↔ ↔
Fadiga EDL	↔	↔	↔ ↔
Diâmetro luminar- Femoral	↔	↓	↔ ↑
Espessura da parede- Femoral	↔	↑	↔ ↓
Razão parede-luz Femoral	↔	↑	↔ ↓
AST artéria femoral	↔	↑	↔ ↔
Diâmetro do vaso- Femoral	↔	↔	↔ ↔
Resposta vasoconstritora- FE	↔	↔	↔ ↔
Resposta vasodilatadora- ACh	↔	↔	↔ ↔
Resposta vasodilatadora- ACh com L-NAME	↔	↔	↔ ↔
Resposta vasodilatadora- ACh com pré-contracção ao KCl	↔	↔	↔ ↔
Resposta vasodilatadora- NPS	↔	↔	↔ ↔
Diâmetro luminar- Arteríola	↔	↓	↔ ↑
Espessura da parede-Arteríola	↔	↑	↔ ↓

Razão parede-luz Arteriola	↔	↑	↔ ↓
AST arteriola muscular	↔	↑	↔ ↔
Diâmetro do vaso- Arteriola	↔	↔	↔ ↔
Razão capilar por fibra	↔	↓	↔ ↑

↔ não muda, ↓ reduz e ↑ aumenta vs. WKY
 ↔ não muda, ↓ reduz e ↑ aumenta vs. SHR

QUADRO 4- Resumo das expressões de miRNAs e mRNAs na 2ª etapa do estudo

miRNAs e mRNAs Musculares e Vasculares induzidas pela HA e TF			
Variáveis	WKY-T	SHR	SHR-T
Expressão do miRNA-96	↔	↑	↑ ↓
Expressão do miRNA-182	↔	↑	↑ ↓
Expressão do miRNA-205	↔	↑	↑ ↓
Expressão do miRNA-146b-5p	↔	↑	↑ ↓
Expressão do miRNA-328a	↔	↑	↔ ↓
Expressão do miRNA-140-3p	↔	↑	↔ ↓
Expressão do miRNA-665	↔	↑	↔ ↓
Expressão do miRNA-1-3p	↔	↑	↔ ↓
Expressão do miRNA-99b*	↔	↓	↔ ↑
Expressão do miRNA-208b-3p	↔	↓	↔ ↑
Expressão do miRNA-499	↔	↓	↔ ↑
Expressão gênica Ang	—	↓	↔ ↑
Expressão gênica Angpt 1 e 2	—	↓	↔ ↑
Expressão gênica CollV	—	↓	↔ ↑
Expressão gênica Cxcl 1 e 2	—	↓	↔ ↑
Expressão gênica Efna1	—	↓	↔ ↑
Expressão gênica Egf	—	↓	↑ ↑
Expressão gênica Eng	—	↓	↔ ↑
Expressão gênica Erbb2	—	↓	↔ ↑
Expressão gênica F2	—	↓	↔ ↑
Expressão gênica Fgf1	—	↓	↑ ↑
Expressão gênica Figf	—	↓	↔ ↑
Expressão gênica Flt1	—	↓	↔ ↑
Expressão gênica Fn1	—	↓	↔ ↑
Expressão gênica Hif1a	—	↓	↔ ↑
Expressão gênica Id1	—	↓	↔ ↑
Expressão gênica Igf1	—	↓	↑ ↑
Expressão gênica IL1b	—	↓	↔ ↑
Expressão gênica Itgb3	—	↓	↑ ↑

Expressão gênica Kdr	—	↓	↔ ↑
Expressão gênica Lep	—	↓	↔ ↑
Expressão gênica Mapk14	—	↓	↔ ↑
Expressão gênica Mmp 3 e 19	—	↓	↔ ↑
Expressão gênica Pecam1	—	↓	↔ ↑
Expressão gênica Ptk2/ Fak	—	↓	↔ ↑
Expressão gênica Tek	—	↓	↔ ↑
Expressão gênica Tgfa	—	↓	↔ ↑
Expressão gênica Timp3	—	↓	↔ ↑
Expressão gênica Vegfa e b	—	↓	↔ ↑
Expressão gênica Ctgf	—	↑	↔ ↓
Expressão gênica Pdgfb	—	↑	↔ ↓
Expressão gênica Tgfb1	—	↑	↔ ↓

↔ não muda, ↓ reduz e ↑ aumenta vs. WKY

↔ não muda, ↓ reduz e ↑ aumenta vs. SHR

QUADRO 5- Resumo das expressões protéicas descritas na 2ª etapa do estudo

Expressão de Proteínas Musculares e Vasculares induzidas pela HA e TF			
Variáveis	WKY-T	SHR	SHR-T
IGF-I	↔	↓	↔ ↑
IGF-IR	↔	↔	↔ ↔
PI3K _{p110α}	↔	↓	↔ ↑
PTEN	↔	↔	↔ ↔
p-Akt _{Ser473} / Akt	↔	↓	↔ ↑
p-GSK-3 _{Ser9} / GSK-3β	↑	↓	↓ ↔
p-mTOR _{Ser2448} /mTOR	↔	↓	↔ ↑
p-p70S6k _{Thr389} / p70S6k	↔	↓	↔ ↑
p-4E-BP1 _{Thr37/46} / 4E-BP1	↔	↔	↔ ↔
p-eIF4E _{Ser209} / eIF4E	↔	↓	↔ ↑
p-FoxO1 _{Ser256} / FoxO1	↔	↔	↔ ↔
FoxO3a	↔	↔	↔ ↔
p38	↔	↔	↔ ↔
MAFbx/Atrogin-1	↔	↔	↔ ↔
MuRF-1	↔	↔	↔ ↔
FSTL-1	↔	↔	↔ ↔
VEGF-A	↔	↓	↔ ↑
VEGF-B	↔	↔	↔ ↔
VEGFR1	↔	↔	↔ ↔
VEGFR2	↔	↓	↔ ↑
eNOS	↑	↓	↔ ↑
p-Erk _{Thr202/Tyr204} / Erk	↔	↔	↔ ↔
Angpt-2	↔	↔	↔ ↔
TGFα	↔	↓	↔ ↑
p-FAK _{Tyr397} / FAK	↔	↓	↔ ↑
Bcl-2	↔	↓	↔ ↑
PURβ	↔	↑	↔ ↓
SOX6	↔	↔	↔ ↔
SP3	↔	↑	↔ ↓

PPAR α	↔	↔	↔ ↔
PPAR β/δ	↔	↓	↔ ↑
p-AMPK _{Thr172} / AMPK	↑	↔	↔ ↔

↔ não muda, ↓ reduz e ↑ aumenta vs. WKY
↔ não muda, ↓ reduz e ↑ aumenta vs. SHR

8 DISCUSSÃO

A HA é uma das doenças crônicas mais prevalentes predispondo os indivíduos a insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral e doença renal; considerada uma importante causa de morbidade e mortalidade. Sua etiologia permanece enigmática apesar dos intensos esforços científicos nas últimas décadas (CHOBANIAN et al., 2003; COFFMAN, 2011).

A disfunção do tônus vasomotor e as alterações na estrutura microvascular, comprometendo a homeostase do sistema, são processos primários na patogênese da HA (GREENE et al., 1989; ANTONIOS et al., 1999; LÉVY et al., 2001; FEIHL et al., 2006, COFFMAN, 2011; ROQUE et al., 2013). A manutenção dos níveis normais da PA é condição necessária para adequada perfusão sanguínea tecidual. De fato, o aumento crônico da resistência vascular periférica leva a comprometimento do fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, à disfunção de órgãos-chave para o funcionamento normal do organismo. O comprometimento de órgãos-alvo como cérebro, coração, rins e músculo esquelético está intimamente associado às complicações da HA (COFFMAN, 2011).

O TF aeróbio é considerado uma das abordagens terapêuticas mais significativas em contrapor os efeitos da HA tanto nos vasos sanguíneos, prevenindo e reduzindo os níveis tensionais elevados, quanto nos órgãos-alvo afetados por ela, como o coração e o músculo esquelético, principalmente no que concerne o remodelamento e a função tecidual (BORTOLOTTTO et al., 1999; AMARAL et al., 2000, 2001; MELO et al., 2003; FAGARD, 2005; NAGATOMO et al., 2009; ROSSONI et al., 2011; ROQUE et al, 2013, DAMATTO et al., 2013; CAMPOS et al., 2015). Embora grandes avanços tenham sido feitos no entendimento dos danos causados pela HA nos diferentes tecidos, os mecanismos envolvidos são pouco conhecidos.

Os miRNAs estão envolvidos em praticamente todos os processos biológicos, incluindo a proliferação, apoptose e diferenciação celular. Assim, alteração na expressão dos miRNAs muitas vezes resulta em função celular prejudicada e desenvolvimento de doenças; portanto, o conhecimento a partir dos miRNAs têm potencial relevância terapêutica. Embora haja crescente interesse a respeito do papel dos miRNAs na HA, ainda muito pouco se sabe sobre a influência

deles no remodelamento microvascular e muscular, e atualmente, não há estudos sobre o perfil de expressão de miRNAs no músculo esquelético tanto de pacientes e animais hipertensos quanto induzidos pelo TF.

No presente estudo, foi utilizado o modelo de SHR com 3 e 6 meses de idade no início do protocolo e seus respectivos controles WKY para estudar a influência da HA essencial e de sua progressão sobre as alterações microvascular e muscular esquelética via regulação de miRNAs e seus genes alvo. Além disso, fomos os primeiros na literatura a avaliar o perfil de expressão de miRNAs na musculatura esquelética de animais hipertensos, além de verificar o papel terapêutico do TF aeróbio na tentativa de corrigir ou prevenir parcialmente as alterações na expressão desses miRNAs na HA, promovendo uma melhora no conjunto de alterações estruturais e funcionais microvascular e muscular esquelético favorecendo a regressão da HA e dos danos causados por ela.

Os resultados da 1ª etapa do estudo mostram que o TF aeróbio sobre a HA recém-estabelecida de animais SHR com 3 meses de idade no início do protocolo: 1) aumentou os marcadores de TF aeróbio, 2) reduziu a PA, 3) corrigiu a rarefação capilar e as mudanças na distribuição dos tipos de fibra muscular, 4) normalizou a expressão dos miRNAs-16, -21, -126 e -208b envolvidos na angiogênese, regulação do metabolismo e perfil de fibras, 5) normalizou os fatores angiogênicos e desativou as vias apoptóticas periféricas.

Os resultados da 2ª etapa do estudo mostram que o TF aeróbio sobre a HA crônica de animais SHR com 6 meses de idade no início do protocolo: 1) aumentou os marcadores de TF aeróbio, 2) reduziu a PA, 3) corrigiu a intolerância ao esforço físico, 4) atenuou a hipertrofia cardíaca patológica e a disfunção cardíaca, 5) corrigiu as mudanças na distribuição dos tipos de fibra e a atrofia muscular, 6) atenuou a disfunção muscular no EDL e no sóleo, 7) preveniu o remodelamento estrutural na artéria femoral e na arteríola muscular, 8) normalizou a rarefação capilar, 9) preveniu parcialmente o perfil de expressão de miRNA no sóleo, 10) normalizou uma parte dos genes e proteínas angiogênicas, 11) corrigiu a expressão de proteínas envolvidas na síntese protéica e sinalização apoptótica e 12) normalizou a expressão de proteínas de regulação de metabolismo e perfil de fibras muscular.

8.1 Marcadores de treinamento aeróbio e respostas hemodinâmicas

A capacidade de trabalho aeróbio representada pela maior tolerância à realização de esforço físico e consumo de oxigênio, concomitante com o aumento da atividade oxidativa muscular esquelética e a presença de bradicardia de repouso são adaptações muscular esquelética e cardíaca induzidas pelo TF aeróbio; reconhecidas como os principais marcadores fisiológicos de TF aeróbio (WIBOM et al., 1992; MEDEIROS et al., 2004; EVANGELISTA & KRIEGER, 2006; BACURAU et al., 2009; FERNANDES et al., 2011, Da SILVA et al., 2012; ROQUE et al., 2013; SOUZA, et al., 2014).

Inicialmente, foi demonstrado que o TF aeróbio de natação de baixa intensidade e longa duração foi efetivo em aumentar a capacidade física, aumentando a distância máxima percorrida após protocolo de TF quando comparado ao grupo sedentário. Assim, corroborando com os nossos resultados, estudos vêm demonstrando uma relação direta entre o TF e uma melhora na capacidade de tolerância ao esforço por meio da mensuração da distância percorrida como parâmetro de avaliação da capacidade aeróbia em animais de experimentação, incluso para o modelo de HA investigado, o SHR (SILVA et al., 1997; KOCH & BRITTON, 2001; MELO, et al., 2003; EVANGELISTA & KRIEGER, 2006, ROSSONI et al., 2011, FERNANDES et al., 2012; ROQUE et al., 2013, CAMPOS et al., 2015).

A potência aeróbia pode ser avaliada pela análise do VO_2 máximo que representa a capacidade máxima do organismo de extrair oxigênio (DENADAI et al., 2004). Os resultados de VO_2 pico atingido no teste realizado no início do protocolo experimental foram similares entre os grupos. Entretanto, ao final do protocolo experimental, os resultados demonstram que os ratos do grupo submetido ao TF de natação (WKY-T e SHR-T), em um período de 10 semanas, foram capazes de atingir valores maiores de VO_2 pico que os animais que foram mantidos sedentários (WKY e SHR). Além disso, pode-se observar que os animais mantidos sedentários até os 6 meses de idade apresentaram uma redução do VO_2 pico quando comparados aos seus valores pré protocolo experimental. Isto pode ser explicado pelo fato do VO_2 máximo/ pico reduzir com o avançar da idade, além de ser influenciado pelo sedentarismo (PATERSON & CUNNINGHAM, 1992; HEPPLER et al., 2003; MELO et al., 2003; AZEVEDO et al., 2007).

Curiosamente, os animais SHR que permaneceram sedentários até os 9 meses de idade tiveram os valores de VO_2 pico reduzidos comparado ao WKY sedentário, indicando um menor rendimento físico em animais com HA crônica. Em contraste, o TF aeróbio preveniu esta redução do VO_2 pico no grupo SHR-T, permanecendo com os valores similares ao WKY. Estes resultados estão de acordo com os observados em animais e pacientes com insuficiência cardíaca (CUNHA et al., 2012; GOMES-SANTOS, et al., 2014; FLEG et al., 2015; HAYKOWSKY et al., 2015). Estudos que utilizaram animais com insuficiência cardíaca de etiologia hipertensiva (SHR idosos com 16 semanas de idade) não avaliaram o VO_2 em seus estudos; entretanto, os autores relataram uma melhora na tolerância ao esforço físico avaliado pela distância percorrida em SHR comparado ao controle WKY, sendo este efeito exacerbado pelo TF aeróbio de baixa intensidade e longa duração (ROSSONI et al., 2011; PAGAN et al., 2015).

As adaptações fisiológicas resultantes do TF aeróbio proporcionam uma maior habilidade do sistema cardiorespiratório em ofertar oxigênio e sustratos energéticos para o tecido muscular. No músculo esquelético, a melhora do rendimento está associada à alta densidade mitocondrial, a capacidade oxidativa e a angiogênese (HOLLOSZY & COYLE, 1984; AMARAL et al., 2000, 2001). A enzima citrato sintase é uma das mais importantes na geração de energia via metabolismo aeróbio. Neste estudo a atividade da enzima citrato sintase no músculo sóleo foi aumentada nos grupos WKY-T e SHR-T tanto de 6 meses quanto de 9 meses de idade ao final do protocolo de TF em relação ao respectivos controles, demonstrando a efetividade do TF utilizado. Estudos tem mostrado resultado semelhante ao encontrado no presente estudo (ROQUE et al., 2013; SCHULTZ et al., 2013). Por outro lado, estudos prévios demonstraram que a redução do metabolismo oxidativo muscular associado à insuficiência cardíaca pode ser evitada com o TF aeróbio regular, aliviando muitos dos sintomas induzidos pela insuficiência cardíaca (BACURAU et al., 2009; SOUZA et al., 2014).

Além das adaptações periféricas já descritas, o exercício físico aeróbio realizado regularmente promove importantes adaptações autonômicas e hemodinâmicas que vão influenciar o sistema cardiovascular (RONDON & BRUM, 2003). Dentre elas, o comportamento da frequência cardíaca de repouso, também denominada de bradicardia de repouso, consiste em um bom parâmetro funcional

para verificação de adaptação e eficácia do TF aeróbio. Esta adaptação é observada tanto em animais de experimentação (NEGRÃO et al., 1992; EVANGELISTA et al., 2003; MEDEIROS et al., 2004; BACURAU et al., 2009, DA SILVA et al., 2012; CUNHA et al., 2012; ROQUE et al., 2013; SOUZA et al., 2014; CAMPOS et al., 2015) como no homem (KATONA et al., 1982; PUIG et al., 1993; LATERZA et al., 2007; CUNHA et al., 2012).

Estudos prévios demonstram que a magnitude da bradicardia de repouso é dependente do tipo, intensidade e espécie submetida ao TF aeróbio. Neste estudo observamos que os grupos submetidos ao protocolo de TF, independente do estágio de HA, apresentaram redução significativa na FC de repouso após o final do protocolo experimental quando comparado a sua FC inicial, o que não foi observado nos outros grupos que foram mantidos sedentários. Os mecanismos pelo qual esta bradicardia ocorre parece ser fortemente influenciado pelo tipo de TF e também pela DCV apresentada (BRUM et al., 2004). Em ratos normotensos, esta bradicardia de repouso resultante do TF aeróbio em esteira está associada a uma redução na frequência cardíaca intrínseca (NEGRÃO et al., 1992; EVANGELISTA et al., 2005), entretanto, animais submetidos ao protocolo de natação parecem apresentar bradicardia de repouso por um aumento do tônus vagal (MEDEIROS et al., 2004). Além disso, em ratos hipertensos esta bradicardia está associada a uma redução do tônus simpático cardíaco (GAVA et al., 1995).

Por outro lado, os efeitos sobre PA induzido pelo TF parece depender da presença da HA. De fato, estudos mostraram que a resposta de PA permanece inalterada em humanos e animais normotensos submetidos ao TF aeróbio (NEGRÃO et al., 1993; SILVA et al., 1997; DESAI et al., 1997; AMARAL et al., 2000; MELO et al., 2003; EVANGELISTA et al., 2003; LATERZA et al., 2007; ROSSONI et al., 2011; FERNANDES et al., 2011; Da SILVA et al., 2012). No presente estudo, consistente com os outros estudos acima mencionados, não houve diferença significativa da PA entre os grupos normotensos treinado e sedentário, mostrando que o TF com natação não modifica a PA em repouso. Além disso, este efeito não parece ser inerente ao tipo de TF empregado quando comparado à modalidade em esteira com a natação, nem espécie dependente. No entanto, pode ser condicionada ao nível inicial de PA, já que populações hipertensas são beneficiadas com o TF aeróbio no que concerne a redução da mesma (BRUM et al., 2006).

Estudos epidemiológicos vêm demonstrando nas últimas décadas a relação inversa existente entre o nível de condição física e o desenvolvimento de DCV (PAFFENBARGER et al., 1993; MYERS et al., 2002). Assim, a inatividade física está associada com maior risco de desenvolvimento de HA, sendo considerado o exercício físico regular um componente chave na prevenção e tratamento da HA, contribuindo, contudo, para melhoria de outros fatores de risco cardiovascular.

Foram realizados na década de 60 os primeiros estudos que constataram o potencial efeito preventivo do TF aeróbio no controle e tratamento da HA, surgindo às primeiras evidências de redução na PA em indivíduos hipertensos que faziam exercício físico regular (HAMER, 1967; HANSON & NEDDE, 1970; BOYER, 1970).

Como esperado, observamos que os grupos hipertensos apresentavam níveis elevados de PA comparados aos grupos normotensos no início do protocolo experimental. Entretanto, ao término de 10 semanas de TF comprovamos a eficácia do treinamento de baixa intensidade e longa duração em reduzir a PAS, a PAD e a PAM do grupo SHR-T comparado ao grupo SHR. Estes resultados estão de acordo com os encontrados na literatura, confirmando a eficácia do TF aeróbio em reduzir a PA tanto de animais geneticamente hipertensos quanto de humanos hipertensos (SILVA et al., 1997; VÉRAS-SILVA et al., 1997; AMARAL et al., 2000, 2001; MELO, et al., 2003; FAGARD, 2005; LATERZA et al., 2007; ZAMO et al., 2010; ROSSONI et al., 2011, ROQUE et al., 2013; CAMPOS et al., 2015). Além disso, o TF aeróbio consegue prevenir a HA se o TF for empregado antes desta ser estabelecida (ZAMO et al., 2010). Vale ressaltar que a queda da PA foi muito maior em animais com HA recém-estabelecida comparado a HA crônica. Com a progressão da HA, muitas alterações e mecanismos envolvidos no controle da PA não são mais passíveis de regulação pelo TF; o que torna sua redução muito mais difícil devendo envolver outros agentes. De acordo, uma meta-análise, com mais de mil estudos, observou que os benefícios do TF dependem do quão cedo se inicia a prática regular do exercício, indicando que programas de atividade física superior a 3 meses apresentam melhores resultados (HAYKOWSKY, 2011).

8.2 Efeito do treinamento aeróbio sobre as alterações estruturais e funcionais cardíacas associadas à hipertensão

Os animais geneticamente hipertensos (SHR) têm sido amplamente utilizados para estudar o remodelamento cardíaco e a hipertrofia ventricular esquerda compensada a qual evolui progressivamente para a disfunção ventricular e a insuficiência cardíaca (DIWAN & DORN, 2007; DRAZNER, 2011). Estes ratos foram introduzidos por OKAMOTO & AOKI (1963) como um modelo genético de hipertensão muito semelhante à HA essencial em seres humanos. O diagnóstico de hipertrofia ventricular esquerda na HA é um indicativo de pobre prognóstico. De fato, a mortalidade por causa cardiovascular de pacientes hipertensos com hipertrofia ventricular esquerda é cerca de 70% superior ao de pessoas sem hipertrofia ventricular esquerda (CUSPIDI et al., 2012). A hipertrofia ventricular esquerda induzida pela HA é causada pela sobrecarga de pressão conhecida como hipertrofia concêntrica com um aumento desproporcional na espessura da parede (DIWAN & DORN, 2007; GARCIARENA et al., 2009; DRAZNER, 2011). Depois de desenvolver HA precoce e hipertrofia ventricular esquerda, SHR permanecem compensados por um longo período até o aparecimento da disfunção ventricular (BING et al., 1995; CAMPOS et al., 2015). Estudos mostram que a partir dos 16 meses de idade os SHR começam a apresentar características clínicas de insuficiência cardíaca, tais como congestão pulmonar e hipertrofia ventricular direita (BING et al., 1995; ROSSONI et al., 2011; DAMATTO et al., 2013; PAGAN et al., 2015). Sem tratamento, os ratos evoluem para a morte dentro de duas a quatro semanas.

Como esperado, observamos que os grupos hipertensos apresentavam hipertrofia ventricular esquerda comparado aos normotensos, sendo esta hipertrofia de maior magnitude em animais com HA crônica aos 9 meses de idade comparada aos de 6 meses de idade. A hipertrofia ventricular esquerda foi detectada tanto pela análise do peso do VE corrigido pelo comprimento da tíbia quanto pela avaliação do ecocardiograma por aumento do septo, parede posterior e espessura relativa da parede. Entretanto, ao término de 10 semanas de TF, não foi observado mudança nesta hipertrofia cardíaca; com excessão para os parâmetros septo e parede posterior que foram parcialmente reduzidos pelo TF aeróbio. Embora estudos demonstrem que a hipertrofia não seja modificada, estudos indicam que o TF aeróbio leva a um remodelamento da estrutura cardíaca como um aumento do diâmetro do

cardiomiócito acompanhada por angiogênese, redução na expressão de genes fetais, no conteúdo de colágeno, nos fatores inflamatórios e estresse oxidativo (GARCIARENA et al, 2009; ROSSONI et al., 2011; PAGAN et al., 2015; CAMPOS et al., 2015); contribuindo para a transição da hipertrofia patológica para a fisiológica.

O TF aeróbio induz um aumento da sobrecarga de volume acompanhado de dilatação das câmaras cardíacas referido como hipertrofia excêntrica e aumento proporcional na espessura da parede. Assim, o TF promove hipertrofia ventricular esquerda fisiológica, definida como o coração de atleta, juntamente com as respostas adaptativas benéficas ao sistema cardiovascular como a bradicardia de repouso, aumento do VO_2 max e melhora da função cardíaca (GARCIARENA et al., 2009; FERNANDES et al., 2011, SOCI et al., 2011; Da SILVA et al., 2012).

Estudo recente publicado pelo nosso grupo mostrou que SHR com 6 meses de idade exibia hipertrofia cardíaca com função ventricular preservada e aumento da peroxidação lipídica cardíaca em comparação com ratos normotensos. Os SHR também apresentaram aumento na atividade do proteassoma 26S e da aldeído desidrogenase 2 (ALDH2) sem alteração de proteínas carboniladas, 4-hidroxinonenal (4-HNE), proteínas poliubiquitinadas, chaperonas e marcadores relacionados a apoptose. O TF aeróbio exacerbou a hipertrofia cardíaca acompanhada de melhora da função ventricular e diminuição da PA em SHR. Estas alterações foram acompanhadas por uma redução do estresse oxidativo e da atividade do proteassoma e da ALDH2 sem afetar chaperonas e vias de apoptose. Juntos, os resultados sugerem uma ativação compensatória de ALDH2 e proteassoma cardíaca, a fim de manter o controle de qualidade de proteína durante a hipertrofia cardíaca compensada induzida pela HA. Além disso, o TF minimiza a ativação de ALDH2 e do proteassoma por reduzir o estresse cardíaco, demonstrada por um melhor perfil redox (CAMPOS et al., 2015).

A função cardíaca foi descrita no curso inicial da hipertensão em SHR, com alguns relatos que mostram diminuição da função sistólica (KOKUBO et al., 2005), aumento (CINGOLANI et al., 2003) ou inalterada (BING et al., 1995; GARCIARENA et al., 2009; CAMPOS et al., 2015). Em contraste, os SHR idosos apresentam função cardíaca prejudicada, dilatação ventricular e FEj reduzida, indicando a transição da hipertrofia compensada para a insuficiência cardíaca (DIWAN & DORN, 2007; DRAZNER, 2011).

Na avaliação da função cardíaca, observamos que o TF em ratos WKY não alterou nenhum dos parâmetros mostrando que o aumento a capacidade funcional não está relacionada ao aumento do desempenho cardíaco em ratos normotensos. Diferente do encontrado nos SHR aos 6 meses de idade, os SHR com HA crônica aos 9 meses de idade apresentaram hipertrofia ventricular esquerda com disfunção cardíaca, além de sinais clínicos de insuficiência cardíaca como o edema pulmonar e atrofia muscular. A disfunção sistólica foi verificada pela redução na FEj e aumento no VSF e VDF comparados ao grupo WKY. O TF conseguiu normalizar os valores de FEj e VDF no grupo SHR-T, melhorando a função sistólica. Já a disfunção diastólica em SHR foi verificada pela alteração na razão E/A, redução no TE, e aumento no TRIV e no IPM comparado ao WKY. Notavelmente, o TF aeróbio conseguiu normalizar estes parâmetros no grupo SHR-T, contribuindo para uma melhora da complacência ventricular. Assim, as mudanças oriundas do TF aeróbio cooperam para um atraso no desenvolvimento da insuficiência cardíaca em SHR.

Embora o prejuízo na função miocárdica seja melhor demonstrado nos SHR de idade avançada com presença de insuficiência cardíaca (DIWAN & DORN, 2007; DRAZNER, 2011; DAMATTO et al., 2013; PAGAN et al., 2015); a disfunção cardíaca já foi mostrada em SHR adultos jovens (KOKUBO et al., 2005), sendo que nós observamos esta disfunção aos 9 meses de idade correspondendo aos SHR de meia-idade. Além disso, estudados na literatura indicam sinais clínicos de insuficiência cardíaca em SHR a partir dos 16 meses de idade, sendo que, observamos alguns desses sinais já aos 9 meses de idade. Isto se deve porque os estudos tiveram o interesse de caracterizar o quadro de insuficiência cardíaca em SHR; portanto, constatarem grande parte dos marcadores clínicos a partir dos 16 meses de idade, ao passo que, com 9 meses de idade, os animais devem estar na fase de transição da hipertrofia compensada para a descompensada apresentando apenas alguns dos sinais de insuficiência cardíaca. Estudos ainda são necessários para melhor caracterização desse estágio de transição da hipertrofia compensada para insuficiência cardíaca na progressão da HA em SHR.

No conjunto, independentemente da idade, os dados apoiam um efeito benéfico do TF aeróbio em animais com HA crônica semelhante ao relatado em animais jovens, o que confirma o exercício como um hábito saudável que induz melhorias cardíacas.

8.3 Efeito do treinamento aeróbio no perfil de expressão de miRNAs e alterações metabólicas, estruturais e funcionais da musculatura esquelética associadas à hipertensão

Os miRNAs são altamente expressos no músculo esquelético, entretanto o papel que essas moléculas desempenham em processos fisiológicos e patológicos não estão claros; portanto conhecer como os miRNAs atuam na regulação da massa e função muscular pode trazer respostas importantes no entendimento dos danos musculares induzidos pela HA. Nesse sentido, poucos estudos foram publicados investigando o efeito do TF na expressão de miRNAs no músculo esquelético. Esclarecer o papel do TF como um regulador de miRNAs em modelos de atrofia e disfunção metabólica muscular pode trazer novas respostas no que concerne aos mecanismos chave do crescimento e regeneração muscular. Desse modo, a identificação de perfis de miRNA específicos para determinada patologia e em tecido específico abre perspectivas para estudos futuros, utilizando miRNAs como biomarcadores de diagnóstico clínico e como agentes terapêuticos por meio da superexpressão ou inibição.

Conforme destacado por NIELSEN et al. (2010), fazer associações entre miRNAs específicos e um alvo *downstream* predito pode ser muito difícil. Isto levanta incertezas ou a complexidade da relação entre miRNAs e seus alvos. É provável que miRNAs funcionem coletivamente para regular a expressão de um gene alvo predito. Como apropriadamente descrito em uma revisão, os miRNAs podem "caçar em bandos" (LANCETA et al., 2010). Assim, até mesmo mudanças modestas em um grupo de miRNAs podem afetar a expressão de vários (ou centenas) de genes, talvez, com o objetivo de regular uma rede específica de sinalização (por exemplo, controle da angiogênese ou da síntese protéica). O uso de *microarray* de miRNA e gene complementados por software de predição bioinformática para identificar grupos de miRNAs, redes de sinalização relacionados e genes alvo pode nos ajudar a fazer sentido da importância biológica dos miRNAs (DRUMMOND et al., 2010).

Mediante o exposto, verificamos o perfil de expressão de miRNAs no músculo esquelético de SHR com intuito de identificar um conjunto de miRNAs envolvidos nos danos musculares causados pela HA crônica. Ainda, verificar o papel terapêutico do TF aeróbio na correção destas alterações via ação de miRNAs.

A primeira evidência de que miRNAs desempenham um papel significativo no desenvolvimento muscular originou-se de um estudo em que a deleção do miRNA-1 em pássaros levou a morte prematura resultante do incompleto crescimento muscular esquelético durante estágios iniciais do desenvolvimento (SOKOL & AMBROS, 2005). De acordo, a superexpressão do miRNA-1 promoveu uma mudança para o perfil miogênico em células HeLa, indicando que *myomiRs* tem um papel chave na biologia muscular (LIM et al., 2005). Notavelmente, a seleção do miRNA-1 veio dos achados iniciais com utilização de *microarray* de miRNA no coração humano, indicando que o miRNA-1 não era expresso em cérebro, rim, fígado, pulmão e células HeLa, mas expresso no coração (LAGOS-QUINTANA et al., 2001). Estes achados foram confirmados por LAGOS-QUINTANA et al. (2002) em que mostraram alguns miRNAs expressos em tecido específico indicando que os miRNA-1, -122a e -124a foram expressos restritamente em músculo estriado, fígado e cérebro, respectivamente. Dessa forma, foi possível identificar miRNAs específicos do músculo estriado como os miRNAs-1, -133a/b, -206, -208a/b e -499 ou enriquecidos no músculo como os miRNAs-128 e -486 (CHEN et al., 2006; CALLIS et al., 2007; VAN ROOIJ et al., 2007; MCCARTHY, 2008; VAN ROOIJ et al., 2009; CHEN et al., 2010; SMALL et al., 2010; KOUTSOULIDOU et al., 2011; LIU et al., 2012).

O presente estudo revelou o mapeamento da expressão diferencial dos miRNAs na HA que foram parcialmente prevenidos ou normalizados pelo TF. Dessa forma, tivemos 10 miRNAs que tiveram seu padrão de expressão alterado na HA, sendo 3 deles reduzidos (miRNA-99b*, -208b-3p e -499) e 7 aumentados (miRNAs-1-3p, -96-5p, -140-5p, -182, -205, -328a-5p e -665); confirmados por *real-time PCR*. Entre estes miRNAs diferencialmente expressos, os miRNAs-1-3p, -208b-3p e 499 são considerados como *myomiRs*.

Estudos têm mostrado que a deleção de *myomiRs* individuais no camundongo teve muito pouco impacto sobre o fenótipo muscular esquelético (CALLIS et al., 2007; VAN ROOIJ et al., 2007, 2009; WILLIAMS et al., 2009; LIU et al., 2012, KIRBY et al., 2015). Como exemplo, a deleção do miRNA-206, específico do músculo esquelético, não promoveu alteração do fenótipo muscular representado pelo peso do músculo sóleo, morfologia ou distribuição do tipo de fibra; entretanto, a recuperação da desnervação foi retardada no músculo em animais *knockout* para o

miRNA-206 (WILLIAMS et al., 2009). De modo semelhante, o grupo do professor OLSON mostrou que o miRNA-208a foi necessário para a hipertrofia cardíaca em resposta ao estresse (VAN ROOIJ et al., 2007). Coletivamente, estes achados de camundongos *knockout* para *myomiR* são consistente com a noção de que a função primária do miRNA é mediar a resposta ao estresse da célula, ajudando a restabelecer a homeostase por meio da regulação da expressão de genes (LEUNG & SHARP, 2010); entretanto, não é claro porque estes camundongos *knockout* não apresentam um fenótipo mais alterados como previsto a partir de estudos *in vitro* (CHEN et al., 2006; WILLIAMS et al., 2009). Uma possível explicação poderia ser a sobreposição nos genes alvo entre os membros da família de *myomiRs*, tais como os miRNAs-1 e -206, que em teoria poderia resgatar qualquer fenótipo deletério resultante do miRNA *knockout* (KIRBY et al., 2015). Esta idéia é suportada pelo duplo *knockout* dos miRNAs- 133a-1 e -133a-2 que mostraram danos no septo e miopatia do músculo esquelético que não estava presente no *knockout* para apenas um deles (LIU et al., 2008, 2011). Similar, a geração do animal duplo *knockout* para os miRNAs-208b e -499 promoveu uma perda substancial de fibras musculares do tipo I no sóleo. A perda de fibras lentas nestes animais também foi evidenciado pela redução da expressão gênica e protéica de β -MHC, e um concomitante aumento na expressão de isoformas de miosina rápida tipo IIa, IIx e IIb, o que não foi vista com a deleção do miRNA-208b e do miRNA-499 isoladamente (VAN ROOIJ et al., 2009). Curiosamente, o animal duplo *knockout* exibiu capacidade física aeróbia reduzida em teste de corrida em esteira indicando uma redução da resistência aeróbia resultante da reprogramação de fibras musculares.

MCCARTHY et al. (2009) observaram que a expressão dos miRNAs-208b e -499 foram reduzidos em animais com atrofia muscular em resposta a suspensão dos membros posteriores. Esta desregulação dos miRNAs foi associada com o aumento da expressão de SOX6 e inibição na expressão de β -MHC muscular.

Resultados semelhantes aos encontrados no duplo *knockout* para os miRNAs-208b e -499 e no modelo de atrofia por desuso foram vistos no músculo sóleo de SHR de 6 e 9 meses de idade. Observamos uma redução na expressão dos miRNAs-208b e -499 na HA acompanhada por um aumento na expressão protéica de seus alvos PUR β e SP3, sem modificar a expressão de SOX6. PUR β , SP3 e SOX6 são alvos dos miRNAs-208b e -499 e tem sido descritos por inibirem a

expressão de β -MHC no músculo esquelético implicado na mudança do perfil de fibras musculares (HAGIWARA et al., 2007; JI et al., 2007; VAN ROOIJ et al., 2009). JI et al. (2007) mostraram interações físicas e funcionais entre as proteínas SP3 e PUR β induzindo a repressão da proteína β MHC. PUR β liga-se ao elemento regulatório negativo da β MHC (d β NRE-S) inibindo a expressão do seu gene repórter. Estes resultados colaboram com os dados de mudança do perfil de fibras encontrados nos SHR de 6 e 9 meses de idade, com aumento na porcentagem de fibras do tipo II e redução na porcentagem de fibras do tipo I. Esta transição nos tipos de fibra foi acompanhada por uma redução do VO₂ em SHR com HA crônica, indicando um prejuízo no desempenho aeróbio.

O músculo esquelético é um grande consumidor de oxigênio e é um dos primeiros tecidos que determinam a taxa metabólica basal. Músculo esquelético com prejuízo do aporte sanguíneo promove lesão do órgão, como os encontrados em SHR e em outras DCV, acometidos por uma mudança na distribuição dos tipos de fibra muscular em direção ao aumento na proporção de fibras do tipo II e desenvolvimento de atrofia muscular (NAKATANI et al., 2002; NAGATOMO et al., 2009, BACURAU et al., 2009; CUNHA et al., 2012; SOUZA et al., 2014). A origem da transição de fibras do tipo I para II ainda permanece pouco conhecida; entretanto, evidências emergentes sugerem que alterações metabólicas no músculo alteram os níveis de miRNA, que, em seguida, pode contribuir para a promoção da adaptação tecidual (KIRBY et al., 2015).

O TF aeróbio foi efetivo em corrigir estes danos causados pela HA no músculo sóleo de SHR. O TF normalizou a expressão do miRNA-208b nos animais com 6 meses de idade e a expressão dos miRNAs-208b e -499 nos animais com 9 meses de idade acompanhado pela redução na expressão dos alvos PUR β e SP3 e normalização do perfil de fibras recuperando a resistência aeróbia em SHR-T.

Corroborando, estudo recente mostrou que a sinalização do receptor nuclear PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*) exerce o controle sobre o tipo de fibra muscular por meio dos miRNAs-208b e -499 (GAN et al., 2013). O PPAR β/δ (*beta/ delta*) tem ganhado destaque na literatura por controlar os tipos de fibra e metabolismo muscular esquelético. O PPAR β/δ demonstrou desempenhar um papel chave no desenvolvimento de fibras do tipo I. Animais transgênicos com superexpressão muscular do gene PPAR β/δ têm um aumento da proporção de

fibras do tipo I (LUQUET et al., 2003; WANG et al., 2004; EHRENBORG & KROOK, 2009). No músculo esquelético, o PPAR β/δ tem uma expressão mais pronunciada comparada ao PPAR α (*alfa*), além de sua expressão ser maior em fibras musculares do tipo I oxidativa em comparação com as fibras musculares tipo II glicolíticas (BRAISSANT et al., 1996, MUOIO et al., 2002; De LANGE et al., 2004, WANG et al., 2004).

Estudos tem mostrado que a superexpressão de PGC1 α no músculo esquelético (LIN et al., 2002) conduz a efeitos metabólicos semelhantes às da superexpressão de PPAR β/δ (WANG et al., 2004). Assim, o aumento da expressão de PPAR β/δ ou do seu coativador PGC1 α aumenta a formação de fibras do tipo I. Por outro lado, a ablação de PPAR β/δ muscular promove menor proporção de fibras musculares do tipo I e menor expressão de PGC1 α no músculo esquelético, sugerindo que PPAR β/δ pode regular, pelo menos em parte, a expressão basal de um dos seus importantes cofatores (SCHULER et al., 2006; EHRENBORG & KROOK, 2009).

Animais transgênicos com superexpressão de PPAR β/δ muscular apresentam uma maior capacidade aeróbia (LUQUET et al., 2003; WANG et al., 2004, EHRENBORG & KROOK, 2009; GAN et al., 2013). Em contraste, a expressão excessiva de PPAR α resulta na capacidade reduzida para realização de exercício aeróbio (EHRENBORG & KROOK, 2009; GAN et al., 2013). Camundongos que expressavam PPAR β/δ no músculo foram carinhosamente apelidados de "camundongos maratonistas", porque eles foram capazes de correr duas vezes mais comparado ao controle selvagem (WANG et al., 2004). Além disso, em animais controle, o TF de natação de 6 semanas (45 min por dia, 5 dias por semana) resultou no aumento na expressão protéica de PPAR β/δ no músculo tibial anterior (LUQUET et al., 2003). O aumento da expressão da proteína após TF também tem sido relatada em estudos com seres humanos (RUSSEL et al., 2003; WATT et al., 2004; MAHONEY et al., 2005; FRITZ et al., 2006). Por outro lado, os níveis gênicos de PPAR β/δ no músculo esquelético foram reduzidos em indivíduos com lesão da medula espinal (KRAMER et al., 2006).

Curiosamente, GAN et al. (2013) mostraram que a expressão do miRNA-208b foi significativamente aumentada em animais com superexpressão de PPAR β/δ muscular, mas não era detectável em músculo de animais com

superexpressão de PPAR α . Similar, a expressão do miRNA-499 foi aumentada em animais com superexpressão de PPAR β/δ , mas drasticamente reduzida no músculo de animais com superexpressão de PPAR α . Resultados semelhantes foram obtidos em miócitos esqueléticos por cultura celular, utilizando-se células transgênicas ou superexpressão de PPAR por adenovírus em miócitos controles. Os autores também mostraram que a inibição dos miRNAs-208b e -499 com o uso de *antisense* em animais com superexpressão de PPAR β/δ foi suficiente para inibir a expressão de β -MHC, indicando que a sinalização de PPAR β/δ ocorre via ação dos miRNAs-208b e -499 para o controle do perfil de fibras e metabolismo muscular. Além disso, os autores também identificaram que outro receptor nuclear, o ERR γ (*estrogen-related receptor γ*), estava aumentado em animais com superexpressão de PPAR β/δ , atuando *downstream* a via de PPAR β/δ , ativando a transcrição dos genes *Myh7* and *Myh7b*, consequentemente aumentando a expressão dos miRNAs-208b e -499.

Coletivamente, os resultados indicam que há um circuito mediado pelo receptor nuclear/ miRNA no controle do perfil de fibras muscular, em que PPAR β/δ ativa ERR γ , aumentando a transcrição dos miRNAs-208b e -499, induzindo um programa de contração lenta por inibir repressores da transcrição de genes de contração lenta, tais como SOX6, PUR β e SP3, o que aumentaria a proporção de fibras do tipo I. Por outro lado, PPAR α suprime o programa.

No presente estudo, a proteína PPAR α não foi modificada entre os nossos grupos estudados. Por outro lado, a expressão de PPAR β/δ foi reduzida no grupo SHR comparado ao WKY. O TF aeróbio conseguiu corrigir estes valores no grupo SHR-T, contribuindo para a manutenção do fenótipo oxidativo muscular. Assim, este é o primeiro estudo da literatura a sugerir um mecanismo responsável pela mudança na proporção dos tipos de fibra em SHR via sinalização do eixo PPAR β/δ / miRNAs-208b e -499/ PUR β e SP3/ β -MHC. O efeito do exercício aeróbio poderia estimular este programa por meio do aumento de PGC1 α e PPAR β/δ . Vale lembrar que as fibras musculares do tipo I estão guarnecidas com um sistema mitocondrial e vascular de alta capacidade e um conjunto distinto de isoformas de proteínas contráteis prontas para o trabalho aeróbio. Os mecanismos envolvidos no controle destes processos aparentemente distintos, mas estreitamente interligados é desconhecido. Recentemente, uma pista foi fornecida quando os receptores nucleares PPAR β/δ e ERR γ , reguladores de transcrição do metabolismo de energia

celular (DESVERGNE & WAHLI, 1999), foram mostrados de forma independente conduzir um aumento na composição de fibra de contração lenta oxidativa e vascularização em animais de experimentação (LUQUET et al., 2003; WANG et al., 2004; NARKAR et al., 2011). De fato, agonistas de PPAR podem reduzir discretamente a PA, corrigir a estrutura vascular e a disfunção endotelial em modelos experimentais de HA; considerados como cardioprotetores com potencial terapêutico na prevenção de DCV (TOUYZ & SCHIFFRIN, 2006).

Com a análise de predição dos alvos a partir dos miRNAs diferencialmente expressos na HA, verificamos que os miRNAs-205 e -328a alvejam a proteína PPAR β/δ , podendo fazer uma regulação *upstream* na via de controle do perfil de fibras e metabolismo muscular; um mecanismo ainda desconhecido na literatura. Resultados de confirmação de miRNAs indicam um aumento na expressão desses miRNAs em SHR e uma redução do miRNA-205 e normalização do miRNA-328a induzida pelo TF aeróbio. Embora o PPAR β/δ não tenha ainda sido validado como gene alvo dos miRNAs-205 e -328a, os dados nos levam a acreditar que há um conjunto de miRNAs agindo sinergicamente, como os miRNAs-205, -208b, -328a e -499, para a regulação do metabolismo e tipo de fibra, contribuindo para a homeostase muscular. Não há estudos na literatura que tenham investigado miRNAs que regulam a expressão de PPAR tanto em condições fisiológicas quanto em patológicas. Entretanto, estudos mostram que os miRNAs-23 (SAFDAR et al., 2009), -494 (YAMAMOTO et al., 2012) e -696 (AOI et al., 2010) alvejam o gene Pgc1 α , aumentando sua expressão tanto na sessão aguda quanto em resposta ao TF aeróbio no controle da biogênese mitocondrial.

Os miRNAs também tem sido investigados perante a formação e controle da massa muscular esquelética. Os miRNAs são absolutamente necessários para o desenvolvimento embrionário adequado, uma vez que camundongos *knockout* para Dicer, uma enzima chave durante o processamento do miRNA, morrem no útero no E7,5 (BERNSTEIN et al., 2003). Além disso, uma abordagem mais específica tem demonstrado que os miRNAs são necessários para o desenvolvimento muscular esquelético, em que camundongos que têm a deleção da Dicer especificamente no músculo esquelético morrem no período perinatal e exibem diminuição da massa muscular e morfologia da fibra muscular anormal (O'ROURKE et al., 2007). A diminuição da massa muscular em animais Dicer^{-/-} é notável no E14,5 e torna-se

uma redução drástica no E18,5. Esta perda de massa muscular é resultado de hipoplasia sem alteração no tipo de fibra (O'ROURKE et al., 2007). Este fenótipo poderia refletir a perda na expressão do miRNA-1, que em *Drosophila* foi demonstrado ser necessário para o desenvolvimento e viabilidade do músculo esquelético (SOKOL & AMBROS et al., 2005; O'ROURKE et al., 2007). A importância do miRNA-1 durante o desenvolvimento foi adicionalmente ilustrado por CHEN et al. (2006) em que o prejuízo na expressão dos miRNAs-1 ou -133 afetaram a formação do músculo esquelético e cardíaco.

EISENBERG et al. (2007) mostraram, a partir de um estudo de *microarray*, que 185 miRNAs estavam desregulados em patologias com distúrbios musculares primários, como por exemplo as distrofias musculares de Duchenne, de Becker, Facio-Escápulo-Umeral, entre outras; quase sempre caracterizadas por progressiva fraqueza e atrofia muscular, resultando em prejudicada locomoção. A maior parte dos miRNAs diferencialmente expressos foram aumentados. Entre eles, os miRNAs-146b, -221, -155, -214, -222 e -34a foram consistentemente aumentados em quase que a totalidade dessas patologias. O estudo desenvolvido por EISENBERG et al. (2007) foi o primeiro a fornecer fortes evidências de que a desregulação na expressão dos miRNAs é uma característica comum de patologias com distúrbios musculares primários.

Ao longo dos últimos anos, evidências mostraram que os miRNAs estão envolvidos na disfunção e atrofia muscular associada com o diabetes mellitus (MCCLELLAND & KANTHARIDIS, 2014). Uma diminuição na expressão do miRNA-23a, relatado por reprimir a expressão de atrogenes como MuRF1 e Atrogin-1, foi observado em modelos animais com diabetes mellitus (HUANG et al., 2009; HUDSON et al., 2014), sugerindo que a alteração na expressão do miRNA-23a pode ser associado com o estado catabólico do músculo esquelético no diabetes. A expressão dos miRNAs-144 (KAROLINA et al., 2011) e -135a (AGARWAL et al., 2013) foram aumentados em dois modelos animais de diabetes mellitus tipo 2 e estes miRNAs foram mostrados por reprimir a expressão de IRS-1 e IRS-2, respectivamente; dois componentes da via de sinalização Akt. Além disso, a expressão dos miRNAs-133a e -206 foram reduzidas no músculo esquelético de pacientes com diabetes mellitus tipo 2, enquanto nenhuma mudança foi observada para os miRNAs-1 e -133b. Os pesquisadores mostraram que a alta glicemia de jejum

foi associada com a baixa expressão do miRNA-133a, sugerindo que o miRNA-133a possa ser um marcador molecular relevante para a resistência à insulina (GALLAGHER et al., 2010).

Os miRNAs foram recentemente sugeridos ter um papel na perda de massa muscular esquelética associada com a doença renal crônica (XU et al., 2012). Caracterização do perfil de expressão dos miRNAs no músculo esquelético de camundongos com doença renal crônica revelou uma desregulação de 12 miRNAs; entre eles, uma redução nos miRNAs-29a e -29b foram observados contribuindo para um prejuízo no processo de diferenciação muscular por meio da ativação de YY1 (WANG et al., 2011). Além disso, uma diminuição na expressão do miRNA-486 concomitante ao aumento na expressão de FoxO1 foi observado neste modelo animal na presença de atrofia muscular (XU et al., 2012).

O glicocorticóide é um hormônio endócrino liberado em vários estados patológicos (sepse, insuficiência renal, jejum, imobilização, acidose metabólica, etc.) associado com a atrofia muscular (HASSELGREN, 1999). Um estudo recente mostrou que o glicocorticóide dexametasona induziu a atrofia do músculo esquelético e estimulou a expressão do miRNA-1 via ação do receptor de glicocorticóide e da miostatina, um regulador negativo do crescimento muscular (KUKRETI et al., 2013). Estes autores propuseram um modelo pelo qual o miRNA-1 inibe a expressão de HSP70 (proteína de choque térmico 70), reduzindo assim a fosforilação de Akt com aumento da ativação de FoxO3 e proteínas relacionadas com a atrofia. Estes resultados fornecem evidência de que o miRNA-1 é um miRNA catabólico envolvido na atrofia do músculo esquelético em resposta ao glicocorticóide. Além do aumento do miRNA-1, a dexametasona reduziu os níveis do miRNA-27 em miotubos; um resultado consistente com o aumento da expressão do seu gene alvo validado miostatina (SHEN et al., 2013). Estes resultados sugerem que a miostatina pode ser um regulador central da resposta atrófica muscular por interagir com os miRNAs-1 e -27.

Atualmente, há um interesse em examinar se miRNAs estão envolvidos com a perda de massa muscular no envelhecimento. O aumento dos níveis de miRNAs primários como o pri-miRNA-1-1, -1-2, -133a-1 e -133a-2 foram encontrados em idosos em comparação com os indivíduos jovens, enquanto estas mudanças não foram observados para os miRNAs maduros (DRUMMOND et al., 2008). Estes

autores mostraram que o miRNA-1 estava reduzido nos jovens, mas não em indivíduos idosos após uma sessão aguda de exercício resistido combinado com a ingestão de aminoácidos essenciais (DRUMMOND et al., 2008). Por outro lado, idosos apresentaram uma redução na expressão do miRNA-1 em resposta às 12 semanas de TF resistido, apesar desta alteração não ter sido avaliada em indivíduos jovens (MUELLER et al., 2011). Estudos adicionais são necessários para elucidar se o miRNA-1, o qual tem sido demonstrado inibir vários componentes da via de sinalização IGF-I/ Akt (ELIA et al., 2009), poderia estar envolvido nas alterações musculares no envelhecimento.

Mediante a literatura apresentada, observamos que diversos estudos tem sido desenvolvidos avaliando o papel dos miRNAs em animais e pacientes distróficos, principalmente com a distrofia muscular de Duchenne. Por outro lado, poucos estudos foram publicados com intuito de averiguar a participação de miRNAs nos distúrbios musculares em resposta a outras patologias. Além disso, nenhum estudo até o momento foi publicado indicando o papel dos miRNAs em distúrbios musculares induzido por DCV.

Não há relato de alteração na massa muscular em animais hipertensos até os 6 meses de idade (BENBACHIR-LAMRINI et al., 1990; LEWIS et al., 1994; BORTOLOTTI et al., 1999; NAGATOMO et al., 2009). Os dados do presente estudo estão de acordo com os estudos publicados, uma vez que os animais estudados na primeira etapa do projeto com 6 meses no final do protocolo experimental não apresentaram mudança na massa muscular avaliada pelo peso do tecido corrigido pelo comprimento da tíbia e pelos métodos de histoquímica e imunohistoquímica por meio da análise da área de secção transversa.

CARVALHO et al. (2003) investigaram a mudança na massa do músculo sóleo durante a transição da hipertrofia cardíaca para a insuficiência cardíaca em resposta a estenose aórtica. Os autores encontraram atrofia das fibras musculares do tipo IIa somente durante o estágio de insuficiência cardíaca. Recentemente, DAMATTO et al. (2012) relataram atrofia do músculo sóleo induzida pela insuficiência cardíaca em SHR com 18 meses de idade. Embora escassos, estudos com pacientes hipertensos mostram que a perda de massa muscular não é uniforme entre eles, indicando uma prevalência de 60,9% de pacientes hipertensos não obesos com sarcopenia na população coreana idosa (HAN et al., 2014). Foi

demonstrado uma correlação negativa entre a massa muscular esquelética e ambas retinopatia e nefropatia hipertensiva, indicando que a sarcopenia foi associada com um aumento da taxa de lesões de órgãos alvo da HA (DOĞAN et al., 2012). Alterações estruturais e funcionais cardíacas em pacientes idosos com HA acompanhada por disfunção miocárdica e diminuição da tolerância à atividade física, são mais pronunciadas no grupo de pacientes com perda de massa muscular (MEDVEDEV & GORSHUNOVA, 2012). No presente estudo, observamos uma atrofia muscular nos animais SHR de 9 meses de idade e HA crônica estudados na segunda etapa do projeto. Foi visto atrofia muscular em diferentes músculos pelo peso do tecido corrigido pelo comprimento da tíbia, sendo a atrofia do músculo sóleo confirmada pela redução da área de secção transversa avaliada pelo método de histoquímica. De acordo com a literatura, a atrofia muscular esquelética observada foi detectada após o período caracterizado por uma hipertrofia cardíaca compensada importante para a manutenção do débito cardíaco e adequada perfusão para um estágio já descompensado com disfunção cardíaca e sinais de insuficiência.

A atrofia muscular em SHR foi acompanhada por um prejuízo da função muscular com perda da geração de força nos músculos EDL e sóleo comparado ao WKY avaliada no banho de órgãos. Observamos que tanto no *twitch* com estímulo de 1Hz quanto no tétano com estímulo de 80 Hz houve um aumento do TR50 no grupo SHR em relação ao WKY, indicando um prejuízo no relaxamento muscular impedindo uma resposta contrátil eficiente e dano na geração de força, que favorecem a menor tolerância ao esforço físico aeróbio, também demonstrada. Este prejuízo na resposta funcional muscular pode ser devido a uma disfunção no transiente de cálcio, por estar envolvido no mecanismo de excitação-contração-relaxamento. Uma vez o Ca^{2+} elevado no citoplasma e com prejuízo na sua recaptação ele se torna citotóxico que pode causar ativação de proteases, lipases e nucleases, tendo como consequência alterações nas propriedades fisiológicas e na transcrição gênica, além de apoptose, atrofia e diminuição da capacidade regenerativa (BARTOLI & RICHARD, 2005).

PERREAULT et al. (1993) descreveram pela primeira vez o prejuízo no transiente de cálcio em animais com insuficiência cardíaca por reduzir a magnitude e a velocidade da captação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático após a contração em associação com redução na tensão e na força tetânica muscular. Além disso,

SIMONINI et al. (1999) foram os primeiros a reportar uma redução na expressão gênica de sarco endo-retículo Ca^{2+} -ATPase 2 (SERCA2) no músculo sóleo de ratos infartados com insuficiência cardíaca. BUENO et al. (2010) mostraram uma redução na expressão dos receptores diidropiridina e ryanodina, prejudicando a saída do Ca^{2+} para o citosol acompanhado por uma redução na expressão das proteínas SERCA2 e trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), prejudicando a recaptação do Ca^{2+} nos músculos sóleo e plantar contribuindo para a redução na função muscular em animais com insuficiência cardíaca por hiperatividade simpática. Os autores mostraram que o TF aeróbio corrigiu estes parâmetros contribuindo para a melhora da tolerância ao esforço e função muscular nestes animais. Um estudo recente mostrou que o uso de terapia gênica com SERCA2 para tratamento da insuficiência cardíaca restaura a expressão do miRNA-1 via fosforilação de Akt acompanhada pela normalização da expressão do gene alvo NCX1 com melhora da função cardíaca (KUMARSWAMY et al., 2012). Especulando os dados, poderíamos pensar que o aumento da expressão do miRNA-1, demonstrado no estudo, reduziria a expressão do seu gene alvo NCX1, o que poderia explicar parte do prejuízo da recaptação de Ca^{2+} e piora da função muscular em SHR. Este é o primeiro estudo na literatura a avaliar a função muscular *ex vivo* em SHR e o efeito do TF sobre ela. Faltam ainda estudos para o entendimento dos mecanismos envolvidos na redução de força muscular na HA crônica.

Diversos estudos tem confirmado a presença de atrofia muscular em animais e pacientes com insuficiência cardíaca de outras etiologias que não a hipertensiva (infarto do miocárdio, transtornos com hiperatividade simpática e estenose aórtica), em que a perda de massa muscular e a intolerância aos esforços são indicativos de mau prognóstico para o paciente com insuficiência cardíaca (BACURAU et al., 2009; CUNHA et al., 2012; GIELEN et al., 2012; HAYKOWSAY et al., 2013; MOREIRA et al., 2013; SOUZA et al., 2014; BRUM et al., 2014). Nesse sentido, vale destacar que o TF aeróbio é uma abordagem terapêutica significativa em minimizar essa perda (BRUM et al., 2014). Embora o TF aeróbio não promova aumento na área de secção transversa do músculo esquelético em indivíduos saudáveis, como observado pelo TF de força (FOLLAND & WILLIAMS, 2007); em animais com estado hipotrófico, o TF aeróbio é capaz de restaurar ou aumentar a massa muscular para níveis considerados eutróficos (BACURAU et al., 2009;

CUNHA et al., 2012; MOREIRA et al., 2013; SOUZA et al., 2014; BRUM et al., 2014). Até o presente momento não há relatos sobre o efeito do TF sobre a regulação da massa muscular e da função em SHR.

No nosso estudo, não observamos efeito da HA e do TF aeróbio na massa muscular dos animais com 6 meses de idade ao final do protocolo entre os grupos; entretanto, vimos que o TF aeróbio preveniu o desenvolvimento da atrofia muscular no grupo SHR-T com 9 meses de idade acompanhada por uma normalização da função muscular, apresentando um fenótipo muscular semelhante ao controle. Este dado é muito significativo, visto que a perda de massa muscular em pacientes hipertensos está associada ao mau prognóstico desses indivíduos (MEDVEDEV & GORSHUNOVA, 2012).

A perda de massa muscular é consequência da redução da síntese e do aumento da degradação protéica (GLASS, 2003). Até o momento, pouco se conhece sobre os mecanismos que regulam o trofismo muscular na HA, uma vez que, um equilíbrio entre as vias de síntese e degradação proteica são necessárias para a manutenção e homeostase muscular. Estudos indicam uma redução na expressão de IGF-I (SCHULZE et al., 2003) e da Akt fosforilada (TOTH et al., 2011) muscular na insuficiência cardíaca, contribuindo para o quadro de atrofia. Por outro lado, os animais transgênicos que superexpressaram IGF-I no músculo esquelético preveniram a atrofia muscular induzida pelo infarto do miocárdio concomitante ao aumento na expressão de componentes da via Akt/ mTOR e redução da via de degradação (SCHULZE et al., 2005), o que sugere uma forte participação da via IGF-I/ Akt/ mTOR no controle no trofismo muscular em DCV.

Nós observamos uma redução da expressão de IGF-I, PI3K, p-Akt_{ser473}, GSK-3 β _{ser9}, p-mTOR_{ser2448}, p-p70S6k_{Thr389} e p-eIF4E_{Ser209} no músculo sóleo de SHR com 9 meses de idade, o que sugere um prejuízo da síntese protéica na HA crônica. O miRNA-1 tem sido descrito por alvejar os genes Igf-I, Igf-IR (ELIA et al., 2009), Pi3k e a Akt (CHEN et al., 2012) e os alvos preditos mTOR e eIF4E. Interessantemente, a expressão do miRNA-1 foi aumentada no sóleo de SHR comparado ao WKY, indicando uma desativação da via IGF-I/ PI3K/ Akt/ mTOR pelo miRNA-1. Similar ao miRNA-1, os miRNAs-96, -182 e -205 foram diferencialmente expressos e aumentados na HA comparado ao WKY. Vale ressaltar que esses 3 miRNAs foram os mais aumentados na HA com aumentos de 229% para o miRNA-

96, 226% para o miRNA-182 e 200% para o miRNA-205, sugerindo uma grande participante deles nas alterações musculares advindas da HA. O miRNA-96 tem como alvo validado a Akt1 (VISHWAMITRA et al., 2012) e preditos os genes Irs1, Pi3k, Rictor, mTOR e p70S6k; já o miRNA-205 tem como alvo validado a Akt1 (WANG et al., 2013) e preditos eIF4E e p70S6k e o miRNA-182 o alvo validado mTOR (NAGARAJA et al., 2010).

Assim, os resultados indicam uma ação sinérgica desses 4 miRNAs na regulação do trofismo muscular via IGF-I/ Akt/ mTOR. O TF aeróbio conseguiu corrigir os valores de IGF-I, PI3K, p-Akt_{ser473}, p-mTOR_{ser2448}, p-p70S6k_{Thr389} e p-eIF4E_{Ser209} no músculo sóleo de SHR-T, sem alterar a expressão de GSK-3 β _{ser9}. Estes resultados foram acompanhados pela correção na expressão do miRNA-1 e redução parcial dos miRNAs-96, -182 e -205 no sóleo de SHR-T comparado ao WKY. Dessa forma, nossos resultados demonstram pela primeira vez a contribuição do TF aeróbio no controle de um conjunto de miRNAs, aumentando a ativação da via IGF-I/ Akt/ mTOR e recuperando a massa muscular em animais com HA crônica.

A FIGURA 73 ilustra os miRNAs e genes alvos envolvidas na via de sinalização de síntese protéica em resposta a HA e ao TF aeróbio.

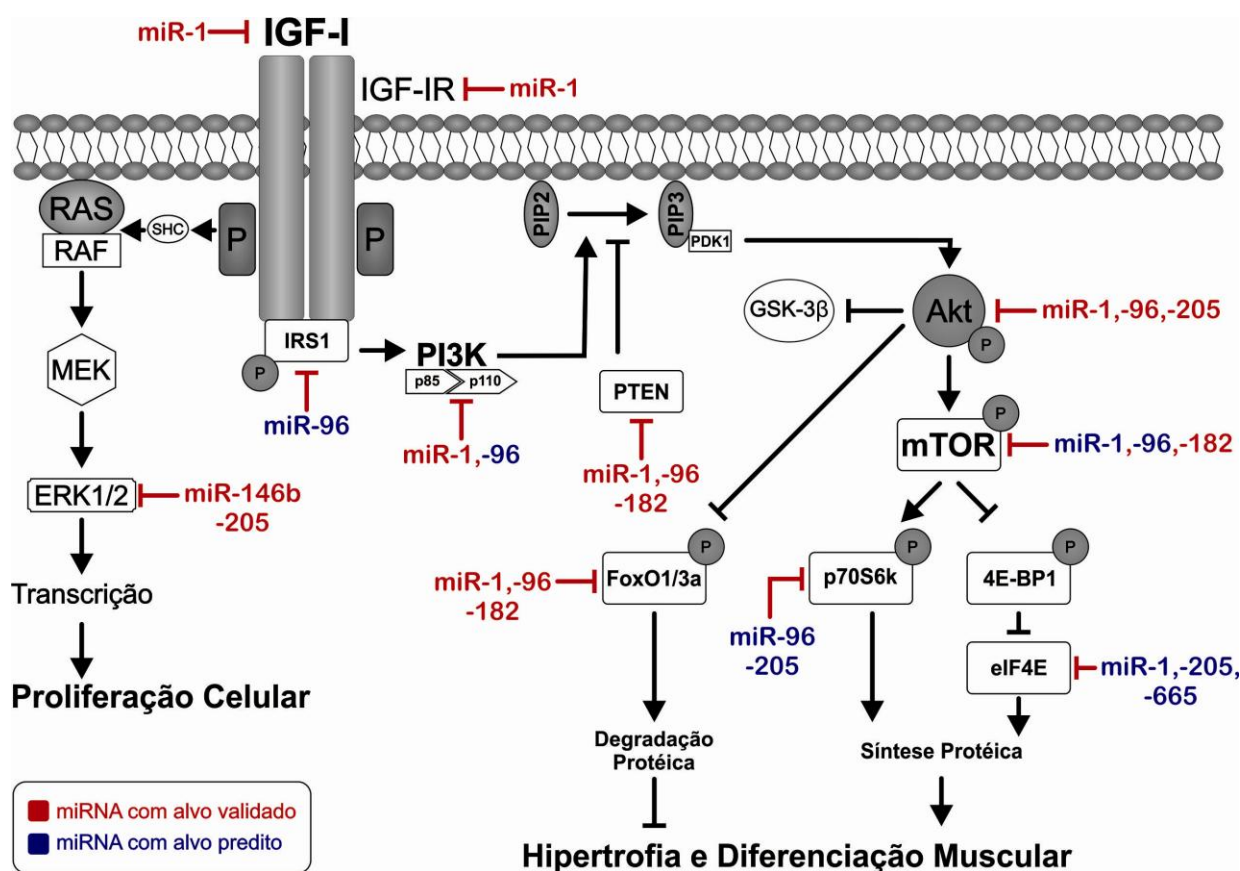


FIGURA 73 – Representação esquemática de miRNAs envolvidos na regulação da sinalização mediada por IGF-I. IGF-I aumenta a atividade da Akt. Esta ativação da Akt pode ser atenuada por PTEN. O estado ativado de Akt estimula a síntese proteica por meio da mTOR via p70S6k e eIF4E. A Akt também inibe a degradação proteica por meio da supressão da atividade de GSK-3 β e FoxO1/3a, que induz a degradação proteica por meio da ativação da expressão de MuRF1 e Atrogin-1. O presente estudo têm mostrado que os miRNAs-1, -96, -146b, -182 e -205 regulam negativamente a via IGF-I / Akt/ mTOR por alvejarem diversos genes da via. A HA crônica foi mostrada aumentar significativamente a expressão desses miRNAs selecionados com base na análise do perfil de expressão por *microarray* de miRNA. Portanto, o aumento na expressão desses miRNAs levou a redução da via de sinalização IGF-I/ Akt/ mTOR pela HA crônica promovendo a atrofia muscular por redução da síntese proteica e proliferação celular, ao passo que, o TF corrigiu esta sinalização restabelecendo a massa muscular. As linhas vermelhas indicam a função inibidora dos miRNAs identificados no músculo esquelético. Os miRNAs identificados em vermelho representam miRNAs com alvos já validados na literatura, enquanto os miRNAs identificados em azul representam miRNAs com alvos ainda preditos.

A primeira evidência de que mTOR ativa p70S6k com um papel na hipertrofia muscular induzida pelo TF veio por meio do estudo de BAAR & ESSER (1999). Neste estudo, a fosforização da p70S6k foi aumentada nos músculos tibial anterior e EDL depois de 3 e 6 horas do TF resistido; entretanto, o mais interessante foi a correlação direta observada entre o aumento da p70S6k e o aumento da massa muscular induzida pelo TF. Corroborando, estudos de causa e efeito com utilização de rapamicina, um inibidor específico de mTOR, foram desenvolvidos com intuito de avaliar o papel chave da mTOR na hipertrofia muscular esquelética induzida pelo treinamento resistido. KUBICA et al. (2004, 2005) utilizaram ratos machos *Sprague-Dawley* submetidos a exercício resistido agudo, em que observaram aumento na síntese protéica do músculo gastrocnêmio 16 horas após o exercício físico, a qual foi completamente prevenida pela administração de rapamicina 2 horas antes do exercício. Além disso, estudos relatam o aumento na fosforilação de GSK-3 β via Akt, inibindo sua atividade, e promovendo diminuição de eIF2B imediatamente após e 3 horas depois do treinamento resistido, suportando a hipótese que esta via está envolvida na estimulação do aumento da síntese protéica em resposta ao exercício resistido (SAKAMOTO et al., 2004, ATHERSON et al., 2005).

Tentando mimetizar atrofia muscular esquelética foi observado o efeito do destreinamento. Ao contrário da sinalização descrita com treinamento resistido, o músculo atrofiado foi associado com uma diminuição da fosforilação de Akt (LÉGER et al., 2006b). Além disso, uma diminuição da ativação da Akt sobre GSK-3 β foi observada também no período de destreinamento, sugerindo que esta via também é responsável pelo processo de atrofia muscular mediante destreinamento físico.

Alguns estudos tem mostrado o papel isolado do TF sobre a hipertrofia muscular via miRNAs. McCARTHY & ESSER (2007) mostraram que após 7 dias de exercício resistido, o músculo plantar revelou uma diminuição de 50% na expressão dos miRNA-1 e -133, sugerindo que esta regulação negativa é necessária para a adaptação do músculo, incluindo a hipertrofia muscular. De acordo com os dados em animais, no ser humano um sessão aguda de exercício resistido resultou em uma diminuição significativa na expressão de miRNA-1 em músculo esquelético (DRUMMOND et al., 2008), a fim de potencializar a ativação da cascata de sinalização IGF-I / Akt. Por outro lado, em humanos não treinados, 60 minutos de exercício aeróbio foi mostrado aumentar a expressão dos miRNAs-1 e -133 no

músculo vasto lateral; no entanto, após 12 semanas de TF aeróbio, os níveis de repouso dos miRNAs-1, -133a, -133b e -206 foram mais baixos do que pré TF (NIELSEN et al., 2010). Da mesma forma, RUSSELL et al. (2013) relataram um aumento da expressão dos miRNAs-1, -133a, -133b e -181a juntamente com uma diminuição da expressão dos miRNAs-9, -23, -23b e -31 em resposta ao exercício aeróbio agudo. Estes mesmos autores descobriram que, após 10 dias de TF aeróbio, os miRNAs-1 e -31 ainda estavam aumentados e diminuídos, respectivamente, e que o TF tinha induzido um aumento da expressão do miRNA-29b. Empregando uma abordagem mais abrangente por *microarray*, KELLER et al. (2011) demonstraram que 6 semanas de ciclismo diminuíram significativamente a expressão dos miRNAs-1 e -133, juntamente com os miRNAs-101 e -455. Embora estudos tenham investigado a expressão de miRNAs no músculo esquelético após exercício agudo e crônico, a análise de vias de sinalização por meio da expressão de genes alvos tem sido pouco avaliados. Vale lembrar que não há estudos de expressão de miRNAs nem em distúrbios musculares por DCV nem pelo efeito terapêutico do TF.

O ativação da via de IGF-I/ Akt/ mTOR além de contribuir para o aumento de síntese protéica, ela reduz a via de degradação. A Akt fosforilada inibe FoxO, sequestrando-os para o citosol e impossibilitando de transcrever genes envolvidos no processo de atrofia muscular, tais como, MAFbx/ atrogin-1 e MuRF1 (BODINE et al., 2001; SANDRI et al., 2004; STITT et al., 2004; LATRES et al., 2005). Um dos mecanismos que explica a resposta benéfica do TF na prevenção da atrofia muscular se refere à regulação de diferentes componentes do sistema ubiquitina proteassoma, um importante regulador do catabolismo protéico, cuja atividade está alterada na insuficiência cardíaca e é restabelecida tanto em modelos experimentais de insuficiência cardíaca (CUNHA et al., 2012; SOUZA et al., 2014), quanto em indivíduos portadores de insuficiência cardíaca (CUNHA et al., 2012, GIELEN et al., 2012) pelo exercício aeróbio. Estudos mostram que FoxO1 está reduzida em músculo esquelético humano hipertrofiado após período de TF resistido quando comparados com o período de pré-treinamento, o qual corrobora com os dados prévios realizados em roedores e cultura celular (LÉGER et al.; 2006a).

Embora a atividade da Akt estivesse reduzida no animal SHR, não observamos alteração na expressão das proteínas envolvidas nas vias de

degradação dependente e independente de FoxO. Dessa forma, os resultados indicam que a atrofia muscular encontrada em animais com HA crônica seja devido a um prejuízo na via de síntese sem afetar a via de degradação protéica.

8.4 Efeito do treinamento aeróbio no perfil de expressão de miRNAs e alterações estruturais, funcionais e moleculares do vaso associadas à hipertensão

O remodelamento vascular é caracterizado pela reorganização de vasos sanguíneos em resposta a estímulos fisiológicos ou patológicos. O início e a progressão da doença vascular estão estritamente relacionados com a saúde do interior da parede arterial. Três camadas distintas definem a estrutura de um vaso sanguíneo, e a sua organização é precisamente coordenada. A camada externa é composta principalmente de tecido conjuntivo e é importante para a proteção da estrutura das camadas abaixo. A camada média é principalmente composta de CMLV organizadas em camadas únicas ou múltiplas, dependendo da localização do vaso, e é importante para a regulação da PA. A camada interna é composta por células endoteliais, proporcionando uma superfície de proteção perante o fluxo sanguíneo (QUINTAVALLE et al., 2011a; LAURENT & BOUTOUYRIE, 2015).

Artérias de resistência desempenham um papel crucial no controle da PA. A resistência periférica em pequenas artérias (diâmetro de lúmen $<350\ \mu\text{m}$) e arteríolas (diâmetro de lúmen $<100\ \mu\text{m}$) é responsável por 45% a 50% da resistência periférica total (MULVANY & AALKJAER, 1990; SCHIFFRIN, 1992; MULVANY, 2012), enquanto que os capilares ($\approx 7\ \mu\text{m}$ de diâmetro de lúmen) são responsáveis por 23% a 30%. A lei de Poiseuille indica que a resistência é inversamente proporcional ao raio à quarta potência. Assim, pequenas alterações no lúmen arterial resultam em mudanças significativas na resistência arterial (LAURENT & BOUTOUYRIE, 2015).

Curiosamente, alterações estruturais em artérias de resistência de SHR já são vistas na quarta semana de vida (com valores normais de PA), representadas pela maior espessura da parede e razão parede-lúmen de artérias mesentéricas de resistência, antes mesmo do desenvolvimento da HA. Por outro lado, a presença de disfunção endotelial avaliada pelo relaxamento das artérias de resistência em

resposta a ACh não foi visível nos SHR desta idade, indicando a necessidade de níveis elevados de PA para a disfunção neste leito vascular (RIZZONI et al, 1994).

O remodelamento vascular induzido pela HA é caracterizado por alterações estruturais e funcionais de pequenas artérias e arteríolas contribuindo para a redução no diâmetro luminal do vaso, reconhecido como a principal causa de aumento da resistência periférica vascular e um preditor de eventos cardiovasculares (INTENGAN & SCHIFFRIN, 2000; MELO et al., 2003; ROQUE et al., 2013; LAURENT & BOUTOUYRIE, 2015).

As alterações estruturais presentes na HA dependerão dos diferentes fatores causais desta patologia e da progressão da doença, podendo o remodelamento ser do tipo eutrófico, hipertrófico e hipotrófico. O remodelamento eutrófico está presente na maioria dos pacientes com HA essencial leve e SHR e corresponde a uma reestruturação do vaso com uma redução do diâmetro externo e do lúmen do vaso (classificado como *inward* ou para o interior do vaso) com a área de secção transversa preservada, resultando em maior razão parede-lúmen (INTENGAN & SCHIFFRIN, 2000; LAURENT & BOUTOUYRIE, 2015). Assim, a reestruturação da mesma quantidade de parede em torno de um lúmen reduzido sem crescimento celular é uma maneira eficaz para normalizar o estresse da parede circunferencial (FOLKOW et al. 1958). Dessa forma, estas alterações estruturais podem representar um mecanismo de proteção contra a elevação da PA, em última análise, evitando o aumento da tensão da parede ao nível dos capilares que são incapazes de resistir a esta tensão (LAURENT & BOUTOUYRIE, 2015).

No remodelamento vascular hipertrófico podemos observar o crescimento da camada média do vaso, resultando em uma redução do lúmen. O crescimento desta camada do vaso pode ocorrer por um aumento no número (hiperplasia) ou do tamanho (hipertrofia) das CMLV, ou ainda de ambos os fatores (MULVANY et al., 1985; MULVANY, 2012). Além disso, o crescimento da camada média do vaso pode ocorrer devido à aumentada deposição das proteínas de matriz, principalmente o colágeno e a elastina, contribuindo para o desenvolvimento e manutenção da HA, por atuar no remodelamento e na rigidez vascular (MCGRATH et al., 2005).

Na segunda etapa do projeto investigamos as alterações estruturais induzidas pela HA crônica em pequenas artérias femorais e em arteríolas musculares. Em acordo com os dados da literatura, tanto as artérias femorais quanto

as arteríolas musculares apresentaram um remodelamento vascular induzido pela HA crônica.

Em artérias femorais e arteríolas musculares de SHR observamos uma redução no diâmetro luminal acompanhada por um aumento da espessura da parede resultando em um aumento exacerbado na relação parede-lúmen, sem alteração do diâmetro do vaso, mas com aumento na área de secção transversa o que caracteriza um remodelamento do tipo hipertrófico para o interior do vaso. Com a progressão da HA, é possível que o remodelamento eutrófico, comumente observado em artérias de resistências de SHR e humanos com HA leve, evolua para o hipertrófico (LAURENT & BOUTOUYRIE, 2015). Diferentes tipos de remodelamento têm sido descrito em artérias e arteríolas de SHR, sendo estas divergências principalmente decorrentes da idade, tipo e diâmetro da artéria analisada (FEIHL et al., 2006, 2008).

Estudo conduzido por LI et al. (1997) mostraram que pequenas artérias como a coronária, renal, mesentérica e femoral exibiram remodelamento com hipertrofia para o interior do vaso de SHR em comparação com WKY. Por outro lado, o tratamento com Losartan, um inibidor do receptor de angiotensina II tipo I, resultou numa redução dependente da dose na espessura da parede e da relação parede-lúmen em pequenas artérias dos quatro leitos vasculares estudados. Estas alterações foram acompanhadas por redução da hipertrofia cardíaca patológica, da disfunção endotelial e da PA em SHR tratados com Losartan. De fato, o tratamento por meio da utilização de fármacos tais como, antagonistas de canais de cálcio, inibidores do sistema renina-angiotensina e vasodilatores periféricos, é capaz de reverter às alterações estruturais observadas em pequenas artérias e arteríolas (LI et al. 1997; SCHIFFRIN & TOUYZ, 2004; LAURENT & BOUTOUYRIE, 2015). Estas alterações são devido à angiotensina II ser um determinante principal do remodelamento de pequenas artérias, porque aumenta o crescimento das CMLV, a deposição de colágeno, a contratilidade e induz a inflamação em animais e humanos hipertensos (SCHIFFRIN & TOUYZ, 2004; LAURENT & BOUTOUYRIE, 2015). Entretanto, poucos estudos investigaram o efeito do TF sobre este remodelamento, sendo que este é o primeiro estudo a avaliar o efeito do TF aeróbio sobre o remodelamento da artéria femoral de SHR.

No presente estudo, observamos que o TF aeróbio normalizou este remodelamento de pequenas artérias femorais e da arteríola muscular no grupo SHR-T promovendo um aumento do diâmetro do lúmen vascular, redução da espessura da parede, da razão parede-lúmen e da área de secção transversa do vaso. Entretanto, estudos adicionais são necessários para o entendimento dos mecanismos que levaram a correção das alterações estruturais observadas na artéria femoral e arteríola muscular de SHR induzida pelo TF aeróbio.

A inatividade física caracterizada por repouso de 60 dias em indivíduos saudáveis acamados tem sido descrita por contribuir para um aumento da espessura da parede, redução do diâmetro interno do vaso e maior razão parede-lúmen da artéria femoral. Por outro lado, o TF resistido realizado 3 vezes por semana mostrou prevenir parcialmente o remodelamento da artéria femoral induzido pela inatividade física (VAN DUIJNHOFEN et al., 2010).

ROQUE et al. (2013) mostraram que o TF aeróbio normalizou os diâmetros interno e externo de pequenas artérias coronárias contribuindo para reversão do remodelamento hipertrófico em SHR. Estas alterações foram acompanhadas por uma redução da rigidez vascular induzida pelo TF aeróbio. Entretanto, os autores não observaram mudanças dos parâmetros estruturais induzidos pela HA em artérias mesentéricas de resistência em resposta ao TF aeróbio, embora o TF tenha sido efetivo em reduzir a rigidez deste leito vascular acompanhada por uma redução do conteúdo de colágeno e elastina.

As arteríolas musculares de animais SHR foram descritas por serem marcadamente hipertrofiadas, mas a relação parede-lúmen foi normalizada nos músculos locomotores (sóleo, gastrocnêmio e grácil) e não locomotores (miocárdio e diafragma), acompanhada por um aumento na densidade capilar induzida pelo TF aeróbio (MELO et al., 2003). Assim, os resultados sugerem que as alterações estruturais mediadas pelo TF na HA contribuem por reduzir a resistência local e melhorar a capacidade física da circulação, contribuindo, assim, para efeito de redução da PA.

Além das alterações estruturais, a função endotelial, essencial para a regulação do controle vasomotor devido à síntese de fatores relaxantes derivados do endotélio, tais como, o NO, a bradicinina, a prostaciclina (PGI₂) e o EDHF (fator hiperpolarizante derivado do endotélio) e fatores constritores derivados do endotélio,

tais como, a angiotensina II e a endotelina-1, contribue, sobremaneira, para a regulação da resistência vascular na HA (DAVEL et al., 2011).

O NO é conhecido como um dos mais importantes fatores relaxantes derivados do endotélio. Uma vez sintetizado, o NO se difunde para o músculo liso vascular e ativa a enzima GCs (guanilato ciclase solúvel), a qual aumenta os níveis intracelulares de GMPc (3',5'-monofosfato cíclico de guanosina) por hidrolisar moléculas de GTP (5'-trifosfato de guanosina). O GMPc ativa PKG (proteína quinase G), uma quinase que promove o relaxamento do músculo liso vascular por reduzir as concentrações intracelulares de Ca^{2+} , além de aumentar a atividade da fosfatase da miosina de cadeia leve (MCL) reduzindo a contração muscular lisa vascular (TRIGGLE et al., 2012). A redução nas concentrações intracelulares de Ca^{2+} ocorre por vários mecanismos, entre os quais podemos citar: o aumento da receptação de Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático, a saída de Ca^{2+} para o meio extracelular por estimulação da Ca^{2+} ATPase da membrana, ao fechamento dos canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, a abertura dos canais de K^{+} ativados por Ca^{2+} e a consequente hiperpolarização da célula, resultando no relaxamento da musculatura lisa vascular (TRIGGLE et al., 2012).

Na HA, a exposição constante à alta pressão intraluminal conduz para a ativação de células endoteliais, a liberação de mediadores inflamatórios e pró-coagulantes e a aderência de neutrófilos e plaquetas. Como resultado, o endotélio se torna disfuncional, com uma prejudicada vasodilatação e um fenótipo pró-inflamatório e pró-trombótico da parede do vaso (LANDMESSER & DREXLER, 2007; LAURENT & BOUTOUYRIE, 2015). A disfunção endotelial está intimamente associada com a lesão do órgão e o prognóstico clínico em pacientes com HA (FELMEDEN et al., 2003; LAURENT & BOUTOUYRIE, 2015).

Alterações na liberação dos fatores derivados do endotélio podem ser a causa do prejuízo do relaxamento arterial na HA (GUERRERO et al., 2013, ROQUE et al., 2013; PUZSEROVA et al., 2014). Por outro lado, diferentes resultados têm sido descritos na literatura a respeito da resposta vasodilatadora de artérias na HA, indicando uma melhora (KONISHI & SU, 1983) ou não alteração (PETROVA et al., 2013) nesta resposta; podendo depender do leito vascular, dos diferentes protocolos utilizados, da idade dos animais e do modelo de HA utilizado.

Estudos com HA mostram disfunção endotelial com redução da resposta vasodilatadora dependente de endotélio na artéria femoral de SHR jovens (7 semanas de idade) e SHR adultos jovens (22 semanas de idade) comparado aos seus respectivos controles WKY, sendo esta disfunção mediada por um mecanismo independente de NO (PUZSEROVA et al., 2014). GUERRERO et al. (2013) também mostraram uma redução da resposta vasodilatadora dependente de endotélio na artéria femoral de SHR comparado ao WKY. O TF preveniu este prejuízo na resposta vasodilatadora induzida por ACh em SHR. O pré-tratamento dos anéis femorais com L-NAME preveniu as diferenças de relaxamento entre os grupos, sugerindo que a via de NO está envolvida na resposta vasodilatadora dependente do endotélio em artéria femoral de SHR. Este prejuízo da resposta vasodilatadora dependente do endotélio também foi vista em outros leitos vasculares, como nas artérias coronárias e mesentéricas de SHR comparadas ao WKY. Além disso, o TF aeróbio em SHR foi efetivo em melhorar a resposta vasodilatadora dependente de endotélio dessas artérias, sem alterar a resposta independente do endotélio (ROQUE et al., 2013).

Por outro lado, estudos também tem descrito a não alteração da resposta vasodilatadora em SHR, como demonstrado por PETROVA et al. (2013) em que a resposta vasodilatadora dependente do endotélio da artéria femoral em SHR adultos jovens (5 meses) e SHR de meia idade (12 meses) não foi alterada comparado ao WKY. Os autores e outros na literatura encontraram que a artéria femoral de SHR apresentava um aumento da vasoconstrição em resposta à noradrenalina comparada ao WKY (PETROVA et al., 2013; PUZSEROVA et al., 2014).

No presente estudo, não observamos nenhuma alteração no relaxamento dependente e independente do endotélio em artérias femorais de SHR comparado ao WKY por meio da resposta dilatadora induzida por ACh (indutora da produção de óxido nítrico) e por NPS (um doador de óxido nítrico), respectivamente. Além disso, também não encontramos alteração na resposta vasoconstritora induzida por FE em artéria femoral de SHR comparada ao WKY. O TF aeróbio não promoveu nenhuma alteração nestes parâmetros. Além disso, a presença de L-NAME e a pré-contração com KCl impediram por completo o relaxamento induzido por ACh das artérias femorais de normotensos e hipertensos tanto sedentários quanto treinados,

demonstrando a participação de NO e dos canais de K⁺ na resposta de relaxamento dependente de endotélio nestas artérias.

A integridade da camada endotelial é fundamental para a homeostase do sistema vascular; uma vez danificado, o endotélio pode contribuir para a patogênese da HA. As células endoteliais apresentam papel de destaque no desenvolvimento, manutenção e remodelamento das redes vasculares; necessárias para a angiogênese, um processo que envolve a proliferação, migração e a diferenciação de células endoteliais (URBICH et al., 2008). Uma característica marcante da HA é a perda de microvasos funcionais e prejudicado processo angiogênico (LÉVY et al., 2001; FEIHL et al., 2006; BATKAI & THUM, 2011; LAURENT & BOUTOUYRIE, 2015). Dessa forma, a melhora da função endotelial e a correção da rarefação microvascular são de considerável interesse como estratégias terapêuticas para HA (GREENE et al., 1989; ANTONIOS et al., 1999; LÉVY et al., 2001; FEIHL et al., 2006, 2008; BATKAI & THUM, 2011; COFFMAN, 2011; ROQUE et al., 2013; LAURENT & BOUTOUYRIE, 2015).

Diversos estudos sugerem que reguladores da biogênese de miRNA, bem como miRNAs específicos, possam ser importantes na patogênese da disfunção endotelial e reduzida capacidade angiogênica na HA. Em células endoteliais, a Dicer é expressa constitutivamente e tem um papel importante na angiogênese. A deleção da Dicer, tanto *in vitro* quanto *in vivo* resulta em prejudicada angiogênese (KUEHBACHER et al., 2007; SUAREZ et al., 2007). No desenvolvimento embrionário, camundongos deficientes para Dicer morreram durante a metade da gestação entre E12,5 e E14,5, mostrando uma prejuízo na formação de vasos sanguíneos e na vascularização do saco vitelino (YANG et al., 2005). A análise do mecanismo molecular de regulação angiogênica dependente de Dicer revelou, como esperado, uma alteração na expressão de genes relacionados com o processo angiogênico. Reguladores críticos da angiogênese como o VEGF e o seus receptores VEGFR1 e 2, eNOS, Tie-2 e angiopoetina-4 (Angpt-4) foram desregulados em resposta ao *knockdown* para Dicer (KUEHBACHER et al., 2007; SUAREZ et al., 2007). Embora o mesmo perfil de expressão de miRNAs e genes alvo não tenham sido observados entre os estudos, isto mostra que a regulação desse processo é altamente dinâmico e que diferentes miRNAs são expressos

espaço-temporalmente durante o desenvolvimento em comparação com células endoteliais isoladas em cultura (URBICH et al., 2008).

O perfil de expressão de miRNAs em células endoteliais revelou que miRNAs específicos são enriquecidos no endotélio e envolvidos no processo angiogênico (miRNAs pro-angiogênicos-17-92 cluster, -23/-27, -126, -130a, -210, -296, -378 e let-7f; miRNAs anti-angiogênicos -15b, -16, -20, -21, 92a, -221, -222, e -328) (POLISENO et al., 2006; URBICH et al., 2008; SUÁREZ & SESSA, 2009; QUINTAVALLE et al., 2011). Além disso, a maioria desses miRNAs também foram altamente expressos em artérias carótidas de ratos normais (JI et al., 2007), sugerindo que estes miRNAs pertencem a uma assinatura de miRNA específica da vasculatura.

Na primeira etapa do projeto buscamos entre os *angiomirs* (miRNAs envolvidos no processo angiogênico) descritos, qual deles poderiam regular a sobrevivência, a manutenção e a formação de novos capilares. Entre eles, os miRNAs-16, -21, -126, -221 e -222 desempenham um papel conjunto no controle da angiogênese e da integridade vascular.

O miRNA-126 é um miRNA exclusivamente expresso no endotélio e é um importante regulador positivo da sinalização angiogênica e de integridade vascular *in vivo*. É codificado pelo intrón 7 do gene fator de crescimento epidermal (EGF). *Knockdown* para o miRNA-126 durante a embriogênese de *zebrafish* ou a deleção do miRNA-126 em camundongos resultou em defeitos no desenvolvimento vascular. Assim, camundongos deficientes para o miRNA-126 exibiram prejuízo na angiogênese, ruptura do lúmen vascular, hemorragia generalizada e parcial letalidade embrionária. Curiosamente, camundongos mutantes para o miRNA-126 que completaram com sucesso a embriogênese exibiam diminuída capacidade angiogênica e um aumento da mortalidade após a ligadura coronária em modelo de infarto do miocárdio. Além disso, as células endoteliais deficientes para o miRNA-126 não conseguiram responder a fatores angiogênicos, incluindo o VEGF, o EGF e o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) (WANG et al., 2008; FISH et al., 2008; STASZEL et al., 2011; QUINTAVALLE et al., 2011; NAZARI-JAHANTIGH et al., 2012). O miRNA-126 também está envolvido na comunicação celular, sendo transportado por corpos apoptóticos com função de uma molécula alarme após danos vasculares (ZERNECKE et al., 2009).

Dois alvos diretos do miRNA-126 tem sido descritos, o SPRED1 e a PIK3R2. As duas proteínas regulam negativamente a sinalização de VEGF por inibir as vias MAPK e PI3K/ Akt/ eNOS (WANG et al., 2008; FISH et al., 2008; Da SILVA Jr et al., 2012). Corroborando, sites de predição bioinformática mostram que os miRNAs- 221 e -222 alvejam a eNOS e o c-kit (um marcador de células progenitoras endoteliais), envolvidos no remodelamento vascular (URBICH et al., 2008; SUÁREZ & SESSA, 2009; QUINTAVALLE et al., 2011; BÁTKAI & THUM, 2011). Embora os miRNA-126, -221 e -222 promovam um papel importante na regulação da eNOS, consequentemente na regulação do tônus vascular, sobrevivência celular, permeabilidade e angiogênese, não há estudos que tenham investigado o papel desses miRNAs nas alterações vasculares induzidas pela HA.

A liberação de NO pelo endotélio tem um importante papel na manutenção do tônus basal do vaso, portanto, na regulação da PA e distribuição do fluxo sanguíneo, contribuindo de maneira importante para as propriedades vasodilatadoras e para a manutenção da estrutura microvascular. A disfunção endotelial refere-se à redução nas propriedades vasoativas derivadas do endotélio, sendo principalmente detectada por uma perda na biodisponibilidade de NO, constantemente observada na HA (LANDMESSER & DREXLER, 2007; GKALIAGKOUSI et al., 2009). O desequilíbrio no controle do tônus vascular observado na microcirculação de indivíduos com HA pode ser o resultado da excessiva vasoconstrição causando a oclusão de arteríolas de resistência e a não perfusão de capilares, induzindo a rarefação microvascular e a diminuição da condutância em paralelo da microcirculação muscular esquelética (GREENE et al., 1989; ANTONIOS et al., 1999; LÉVY et al., 2001; FEIHL et al., 2006, 2008). Além disso, estudos demonstram que o estresse de cisalhamento endotelial conduz para uma sustentada liberação de eNOS e a ausência de fluxo sanguíneo, e portanto de NO, poderia conduzir a disfunção endotelial acompanhada por apoptose periférica e posteriormente perda de vasos não perfundidos na hipertensão, promovendo assim o quadro de rarefação microvascular (LÉVY et al., 2001; FEIHL et al., 2006; LAURENT & BOUTOUYRIE, 2015). Estudos com SHR demonstraram que a normalização da resistência vascular periférica mediada pela normalização da razão parede-lúmen vascular e da rarefação microvascular juntamente com a melhora da função endotelial são cruciais para a redução da HA induzida pelo TF aeróbio

(AMARAL et al., 2000; 2001; MELO et al., 2003; ROQUE et al., 2013). Dessa forma, a angiogênese é um essencial atributo para indivíduos hipertensos, visto que melhora o aporte sanguíneo para os tecidos auxiliando na redução da PA (LÉVY et al., 2001; MELO et al., 2003; SUZUKI, 2004; FEIHL, et al., 2006, 2008).

Os resultados da primeira etapa do estudo mostram pela primeira vez uma redução na expressão do miRNA-126 no sóleo do animal SHR com 6 meses de idade e um aumento na expressão de seu alvo PI3KR2 comparado ao WKY. O aumento da PI3KR2 leva a uma inibição de PI3K e da via de sinalização regulada por ela como Akt/ eNOS. De fato, foi observado uma redução na expressão de eNOS nestes animais, indicando um possível papel desta via na rarefação capilar destes animais. Por outro lado, o TF recuperou a expressão do miRNA-126 e de seu alvo PI3KR2 no animal SHR-T, além de reduzir a expressão dos miRNAs-221 e -222 nos animais WKY-T e SHR-T comparados ao controle, contribuindo para a correção na expressão de eNOS nos SHR-T e aumento de sua expressão nos WKY-T, indicando um papel angiogênico do TF aeróbio no controle desta via de sinalização.

Alvos validados do miRNA-16 são o VEGF e a proteína anti-apoptótica Bcl-2 (URBICH et al., 2008; SUÁREZ & SESSA, 2009; QUINTAVALLE et al., 2011; CHAMORRO-JORGANES, et al., 2011). DEJEAN et al. (2011) demonstraram que o miRNA-16 interage diretamente com o mRNA do VEGF na região 3' UTR promovendo a repressão da tradução protéica de VEGF. Os autores também mostraram que o aumento do miRNA-16 resultou em reduzida angiogênese e crescimento tumoral *in vivo*. Outro estudo mostrou que a superexpressão do miRNA-16 reduziu a proliferação, a migração e a formação de tubos das células endoteliais *in vitro*; e a superexpressão por lentivírus do miRNA-16 reduziu a capacidade das células endoteliais de formar vasos sanguíneos *in vivo* (CIMMINO et al., 2005; CHAMORRO-JORGANES, et al., 2011). Além disso, o miRNA-16 tem sido mostrado induzir a apoptose em células leucêmicas por alvejar a proteína anti-apoptótica Bcl-2 (DEJEAN et al., 2011). De modo semelhante, estudos têm demonstrado que o estresse de cisalhamento regula a expressão desses miRNAs em células endoteliais e que o miRNA-21 influencia a biologia endotelial por regular a apoptose (Bcl-2) e a atividade da eNOS (WEBER et al, 2010; LIU et al., 2010).

Observamos que a HA também foi associada com aumento na expressão dos miRNAs-16 e -21 periférica em paralelo com uma diminuição da expressão de

VEGF e Bcl-2. O TF aeróbio restabeleceu a expressão desses parâmetros na HA, Esta resposta foi acompanhada pela correção da rarefação capilar em SHR-T induzidas pelo TF aeróbio, indicando que a formação de novos capilares pode depender do balanço entre os fatores pró-angiogênicos/ de sobrevivência e os fatores anti-angiogênicos/ de morte celular.

Sabe-se que a eNOS estimula a expressão de VEGF (DULAK et al., 2000), conhecido como um dos principais reguladores da angiogênese e sobrevivência celular (BYRNE et al., 2005). De fato, a deleção/ inibição de VEGF induz a uma redução significativa na densidade capilar acompanhada por apoptose celular (TANG et al., 2004; WANG et al., 2004). O VEGF liga-se ao VEGFR2 e ativa a via de sinalização PI3K/ Akt. Esta sinalização aumenta a neovascularização e a migração das células endoteliais mediada por eNOS e inibi a apoptose por estimular a expressão de proteínas anti-apoptóticas, como a Bcl-2 (GERBER et al., 1998; NOR et al., 1999). Além disso, o fator pró-apoptótico Bad é alvo da Akt. A Akt fosforila Bad tornando-a inativa para sinalização apoptótica (DATTA et al., 1997).

Aumentada sinalização apoptótica no músculo sóleo de SHR tem sido mostrado comparado ao WKY, com aumento da expressão da proteína pró-apoptótica Bax, da atividade da caspase 3 e da fragmentação do DNA, assim como redução nos níveis protéicos de Bcl-2 (QUADRILATERO & RUSH, 2006; De RESENDE et al., 2006). Consistente com os dados da literatura em mostrar maior expressão de proteínas pró-apoptóticas e redução das anti-apoptóticas na HA, nossos resultados indicam que o músculo sóleo de SHR apresenta um aumento na expressão de Bad e uma redução de Bcl-2 e Bcl-x, assim como uma diminuição da razão p-Bad_{ser112}/Bad. Além disso, nossos resultados mostram que uma redução da síntese de NO endotelial poderia contribuir para uma moderada troca da homeostase redox em direção a um estado pró-oxidante corroborando para a ativação da via de sinalização pró-apoptótica microvascular, uma vez que o estresse oxidativo mediado pela HA promove prejuízo da resposta vasodilatadora e apoptose da célula endotelial associada com a perda de microvasos (KOBAYASHI et al., 2005; VANHOUTTE et al., 2009).

Dessa forma, os resultados da primeira etapa do projeto aumentam nossa compreensão dos mecanismos pelos quais miRNAs modulam a homeostase vascular. Eles mostram que os miRNAs-16, -21, -126, -221 e -222 trabalham

conjuntamente na resposta angiogênica e na sobrevivência celular endotelial em SHR induzida pelo TF aeróbio.

Na segunda etapa do projeto, investigamos entre os miRNAs diferencialmente expressos pela HA crônica, selecionados a partir do *microarray*, quais estariam envolvidos no controle da angiogênese e da integridade vascular. Entre eles, o miRNA-205 foi um dos mais diferencialmente expressos com aumento de 200% no grupo SHR comparado ao grupo WKY e reconhecido por alvejar um conjunto de genes angiogênicos, sendo, portanto, foco do presente estudo.

O miRNA-205 foi recentemente descrito por ter o VEGF (YUE et al., 2012), a Akt1 (WANG et al., 2013), as SMADs1 e 4 (TABRUYN et al., 2013) e o EGFR (PARK et al., 2014) como uns dos seus alvos validados. Além disso, o miRNA-205 tem como alvos preditos a eNOS, a FAK, a Bcl-2, o TGF α (factor de crescimento transformante alfa), a Angpt-2 (angiopoetina-2), a p70S6K e o eIF4E; o que demonstra um forte envolvimento na regulação angiogênica.

Sabidamente, angiogênese é um processo de múltiplos passos que inclui a integração de diferentes vias de sinalização. Além do papel chave do VEGF e da eNOS no processo angiogênico, como demonstrado previamente, numerosos outros participantes desse processo têm sido descrito por contribuir para a formação de novos capilares, por exemplo, o FGF-2, o TGF α , o EGF, as Angpt (angiopoetinas), o PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas), o HGF (fator de crescimento de hepatócitos), a FAK, o Colágeno IV, entre muitos outros (RISAU, 1997, CARMELIET, 2003, GUSTAFSSON, 2011).

YUE et al. (2012) identificaram pela primeira vez que o miRNA-205 alveja o VEGF. A expressão do miRNA-205 induz a apoptose e prejudica a viabilidade celular das células de glioma, indicado como um potente supressor de tumor. Curiosamente, alteração na expressão do miRNA-205 tem sido observada na Telangiectasia Hemorrágica Hereditária, uma doença vascular autossômica dominante, caracterizada pela mal formação arteriovenosa com ausência dos capilares, resultando em ligações diretas entre as artérias e veias, tornando-as frágeis e com tendência para a ruptura. Os autores observaram que o miRNA-205 desloca o equilíbrio TGF- β para o lado anti-angiogênico alvejando Smad1 e Smad4. Além disso, a superexpressão do miRNA-205 em células endoteliais reduz a proliferação, migração e formação do tubo endotelial, enquanto a sua inibição

mostra os efeitos opostos (TABRUYN et al., 2013). Interessantemente, WANG et al. (2013) foram os primeiros a gerar um camundongo *Knockout* para o miRNA-205, o que gerou letalidade neonatal com prejuízo no desenvolvimento, com região epidérmica e crescimento do folículo capilar severamente comprometida. Os autores mostraram que a Akt fosforilada foi negativamente regulada com a deleção do miRNA-205 restringindo a proliferação das células tronco da pele, sendo validada como alvo do miRNA-205.

Estudos também mostraram que o miRNA-205 pode ser regulado diretamente pelo fator apoptótico p53 (PIOVAN et al., 2012). Isto sugere que o perfil de miRNA pode mudar em resposta à composição do meio, uma vez que o aumento de p53 aumenta a expressão do miRNA-205; o que poderia estar acontecendo na HA crônica, uma vez que o miRNA-205 está aumentado nesta patologia. Curiosamente, a FAK é conhecida por ser uma proteína crítica que sequestra proteínas pró-apoptóticas, tais como a p53, para mediar a sobrevivência celular (CANCE & GOLUBOVSKAYA, 2008); além de ser um alvo predito do miRNA-205. Assim, é possível pensar que na HA, o aumento da expressão do miRNA-205 conduziria a uma redução na expressão de FAK, levando ao aumento de p53, uma vez que a FAK deixaria de inibi-lo, resultando no aumento do miRNA-205 induzido por p53 e um ciclo vicioso em doenças vasculares.

De acordo com o nosso estudo de alvos validados a partir do conjunto de miRNAs selecionados na HA, os genes p53 e KRAS (um dos três membros da família *oncogene* RAS, o qual codifica pequenas GTPases envolvidas na sinalização celular) têm sido apontados como os genes mais alvejados pelo conjunto de miRNAs; indicando que a via de sobrevivência/ morte celular está alterada nesta patologia. A ativação de sinalização RAS promove crescimento, diferenciação e sobrevivência celular. O oncogene KRAS promove tumorigênese por meio da ativação de várias vias *downstreams*, incluindo PI3K/ Akt, ERK1/2 e Bad (CAMPBELL et al., 2007). Em recente estudo, os autores mostraram que a expressão do miRNA-96 estava reduzido, aumentando a expressão de KRAS com ação proliferativa e anti-apoptótica em pacientes com câncer de pâncreas (YU et al., 2012). Assim, os autores mostraram que o miRNA-96 regula negativamente a Akt fosforilada via redução de KRAS, indicando o miRNA-96 como um candidato ao tratamento de câncer de pâncreas. Curiosamente, nós observamos um aumento de

229% na expressão do miRNA-96 na HA, o que poderia induzir a redução da KRAS e da via de sinalização Akt, contribuindo para um fenótipo antiproliferativo e pró-apoptótico endotelial na HA, demonstrado no presente estudo pela rarefação microvascular via desbalanço dos fatores angiogênicos e apoptóticos.

Além da ação descrita previamente, a FAK, uma tirosina quinase citoplasmática, desempenha um papel fundamental na sinalização celular mediada por fatores crescimento e integrina, reconhecida como um importante fator na migração e proliferação celular, processo vital para a angiogênese (GOLIGORSKY et al., 1999; ZACHARY & GLIKI, 2001; SHEN et al., 2005; BRAREN, et al., 2006). Importante, a deleção de FAK no endotélio de camundongos inibiu o crescimento do tumor e reduziu a angiogênese tumoral. Além disso, em ensaios angiogênicos *in vivo* a deleção da FAK prejudicou a neovascularização induzida por VEGF. Além disso, a deleção da FAK em células endoteliais *in vitro* resultou em reduzida fosforilação de Akt estimulada por VEGF associada à reduzida proliferação celular e aumento da morte celular (TAVORA et al., 2010). Em conjunto, estes dados sugerem que a inibição farmacológica da FAK prejudica a sua capacidade para modular dinamicamente o citoesqueleto de actina e facilitar a migração e formação de tubos em células endoteliais, processos absolutamente necessário para que ocorra angiogênese.

O colágeno tipo IV (Col IV) é um componente importante da membrana basal dos vasos sanguíneos e desempenha um papel fundamental na regulação da adesão celular endotelial, migração, e angiogênese. WANG & SU (2011) demonstraram que o NO aumentou a expressão da integrina $\alpha\beta3$, o principal receptor do Col IV. Este resultado promoveu aumento da FAK fosforilada e alterações na adesão celular, migração e proliferação. De fato, o uso de RNA de interferência para o Col IV ou o anticorpo neutralizador da integrina $\alpha\beta3$ inibiu os efeitos de NO sobre a reparação, proliferação e formação de tubo endotelial (WANG & SU, 2011). Os autores mostraram que a regulação da expressão de Col IV foi mediada pela via cGMP-PKG uma vez que tanto o inibidor de PKG (KT5823) quanto o uso de RNA de interferência para PKG reduziram a expressão gênica e protéica de colágeno IV, assim como a angiogênese induzida por NO. Assim, os resultados sugerem que o NO-GMPc-PKG inicia um fenótipo pró-angiogênico que regula positivamente a síntese de Col IV, ativação de integrina/ FAK e a angiogênese.

Corroborando, uma ativação de FAK via VEGFR2 tem sido descrito por poder se associar seletivamente a integrina $\alpha\beta 3$, considerado um mecanismo atrativo por integrar a sobrevivência das células e funções angiogênicas de VEGF (ZACHARY & GLIKI, 2001).

O TGF- α é um fator de crescimento que se liga ao EGFR, o qual ativa uma via de sinalização para a proliferação celular, inibição de apoptose, migração e angiogênese (RISAU, 1997, CARMELIET, 2003, GUSTAFSSON, 2011). Estudos tem mostrado que o tamanho do infarto foi significativamente reduzido nos animais tratados com TGF- α em comparação com os controles. Estes resultados foram mediados por induzir a angiogênese, neurogênese e neuroproteção após acidente vascular cerebral em resposta ao tratamento com TGF- α . Além disso, os autores mostraram que pelo menos parte do efeito pró-angiogênico do tratamento parece ser derivado da incorporação de células progenitoras endoteliais derivadas de medula óssea para os vasos sanguíneos na região da borda do infarto (LEKER et al., 2009). Outros estudos tem mostrado que o TGF- α , bem como VEGF e o bFGF podem ser associados com a angiogênese e a progressão e metástase de carcinoma de célula do esôfago (LI et al., 2000). Maiores elucidações dos mecanismos moleculares envolvidos no processo angiogênico são necessários. Além disso, nenhum estudo foi publicado até o presente momento sobre os mecanismos angiogênicos induzidos tanto pela HA quanto pelo TF via ação de miRNAs.

Nós observamos uma redução da expressão de diversos fatores angiogênicos induzidos pela HA crônica, entre eles podemos destacar a redução da expressão gênica de Ang (angiogenina), Angpt-1 e 2, Col IV, Egf, Eng (endoglina), Fgf, Fn1 (fibronectina1), Hif1a, Igf-I, Vegfr2/ Kdr, Pecam, Fak, Tgf- α , Timp3 e Vegfa e b. Esta redução foi confirmada para alguns desses genes avaliados por meio da expressão protéica. As expressões protéicas de VEGF-A, VEGFR2/ KDR, p-Akt_{ser473}, eNOS, p-FAK_{ser397}, TGF- α e Bcl-2 foram reduzidas no músculo sóleo de SHR com 9 meses de idade, o que sugere um prejuízo da sinalização angiogênica na HA crônica. Interessantemente, a expressão do miRNA-205 foi aumentada no sóleo de SHR comparado ao WKY, indicando uma desativação da via de sinalização VEGF/ FAK/ Akt/ eNOS/ Bcl-2 e fatores de crescimento TNF- α e Angpt pelo miRNA-205. Dessa forma, o miRNA-205, por intermédio de seus alvos validados e preditos, poderia atuar globalmente na regulação do processo angiogênico, por induzir a

formação de novos capilares e promover a integridade vascular inibindo a apoptose em favor da sobrevivência celular na HA.

Similar ao miRNA-205, os miRNAs-1, -96, -140, -146b-5p, -182 e -665 foram diferencialmente expressos e aumentados na HA comparado ao WKY, sugerindo uma grande participante deles nas alterações vasculares induzidas pela HA. O miRNA-1 tem como alvos validados o FGF2 (SELBACH et al., 2008), o IGF-I (ELIA et al., 2009), o EGFR (SELBACH et al., 2008), a Fn1 (WANG et al., 2011), a PI3K e a Akt (CHEN et al., 2012) e preditos o VEGF, a eNOS, a Bcl-2 e o TGF- α . O miRNA-96 tem como alvos validados a Akt1 (VISHWAMITRA et al., 2012) e preditos os gene Fn1, Angpt, Pi3K e a p70S6k. O miRNA-140 tem como alvos preditos o VEGFR2/ KDR, eNOS e a Bcl-2. O miRNA-146b-5p tem como alvo validado o EGFR (HURST et al., 2009) e preditos a Bcl-2, o Fn1 e o FGF2. O miRNA-182 os alvos preditos Bcl-2 e EGFR e o miRNA-665 os alvos preditos VEGFR2/ KDR, Angpt, TGF- α e Bcl-2.

Assim, os resultados indicam uma ação conjunta desses 7 miRNAs na regulação da angiogênese via ação de diversos fatores de crescimento e componentes de matriz. O TF aeróbio conseguiu corrigir os valores de expressão gênica dos genes descritos e das proteínas VEGF-A, VEGFR2/ KDR, p-Akt_{ser473}, eNOS, p-FAK_{ser397}, TGF- α e Bcl-2 no músculo sóleo de SHR-T, sem alteração na expressão protéica de VEGF-B, VEGFR1/ Flt1, Angpt-2 e p-Erk_{Thr202/Tyr204} tanto pela HA quanto pelo TF aeróbio. Estes resultados foram acompanhados pela redução parcial dos miRNAs-96, -146b-5p, -182 e -205 e correção na expressão dos miRNA-1, -140 e -665 no sóleo de SHR-T comparado ao WKY. Em conjunto, nossos resultados demonstram pela primeira vez a contribuição do TF aeróbio no controle de um conjunto de miRNAs na correção da rarefação microvascular, aumentando a ativação da via angiogênica e recuperando a integridade vascular em animais com HA crônica.

A FIGURA 74 ilustra os miRNAs e genes alvo envolvidos na via de sinalização angiogênica em resposta a HA e ao TF aeróbio.

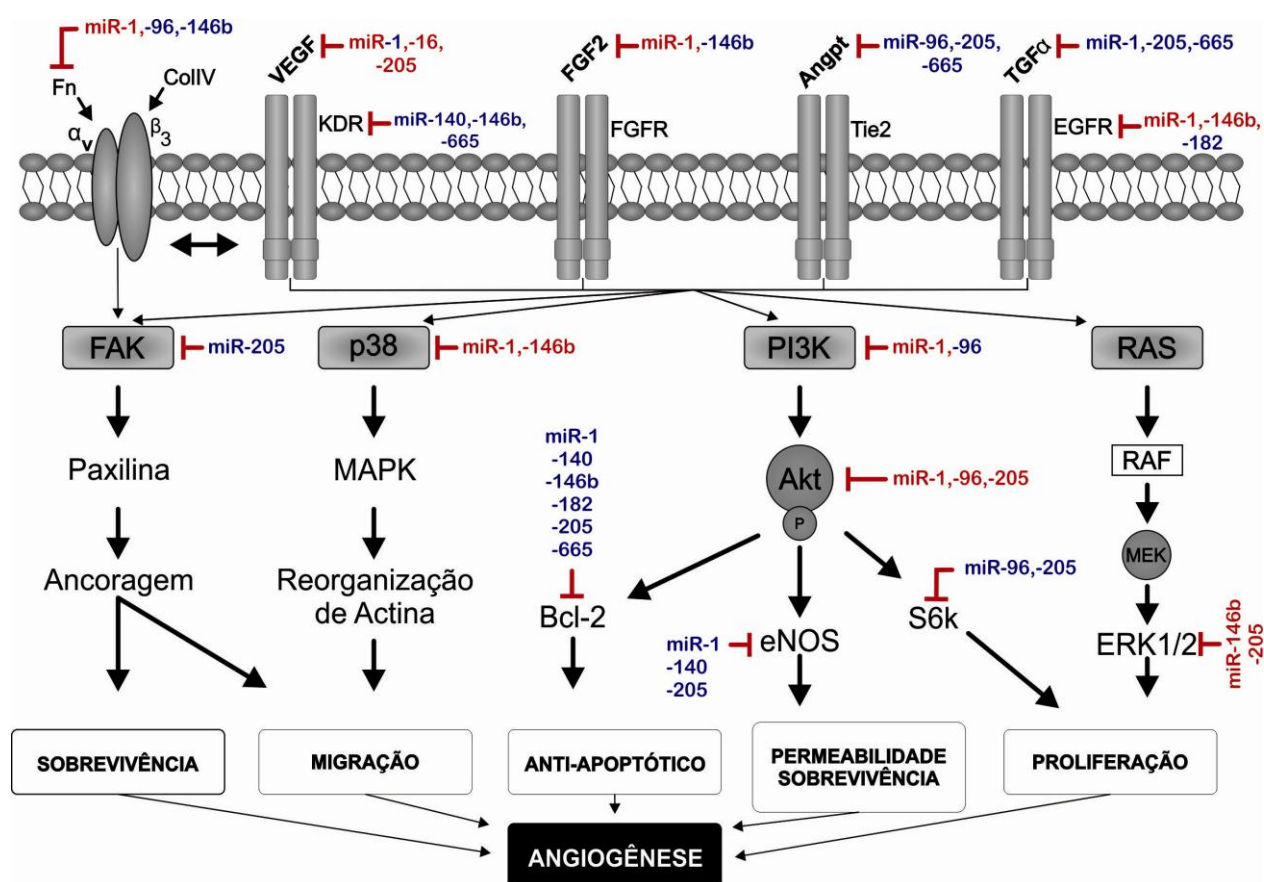


FIGURA 74 – Representação esquemática de miRNAs envolvidos na regulação da sinalização angiogênica. Fatores de crescimento como VEGF, FGF2, Angpt, TGF- α e IGF-I e componentes da matriz como Fn (fibronectina) e Col IV (colágeno IV) aumentam a atividade das vias de sinalização mediada por FAK, p38, PI3K/ Akt e RAS contribuindo para a angiogênese. A via mais conhecida é mediada por VEGF/ VEGFR2 ativando a via da PI3K/ Akt. O estado ativado de Akt estimula a síntese de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2, aumenta a expressão de eNOS estimulando a permeabilidade e a sobrevivência celular e ativa a p70S6k estimulando a proliferação endotelial. Concomitantemente, a via sinalizada por VEGF/ VEGFR2 também ativa a FAK contribuindo para a sobrevivência e migração da célula endotelial, podendo também ser ativada por componentes da matriz. O presente estudo têm mostrado que os miRNAs-1, -96, -140, -146b-5p, -182, -205 e -665 regulam negativamente a via angiogênica por alvejarem diversos genes da via. A HA crônica foi mostrada aumentar significativamente a expressão desses miRNAs selecionados com base na análise do perfil de expressão por *microarray* de miRNA. Portanto, o aumento na expressão desses miRNAs levou a redução desta via de sinalização pela HA crônica promovendo a rarefação

capilar, ao passo que, o TF corrigiu esta sinalização restabelecendo a rede microvascular. As linhas vermelhas indicam a função inibidora dos miRNAs identificados na célula endotelial. Os miRNAs identificados em vermelho representam miRNAs com alvos já validados na literatura, enquanto os miRNAs identificados em azul representam miRNAs com alvos ainda preditos.

9 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que a rarefação capilar, a mudança no perfil de fibras e a atrofia muscular advindas da progressão da HA envolve alteração de um conjunto de miRNAs e genes alvo comprometidos com a falha do processo angiogênico, ativação de vias apoptóticas e reduzida síntese protéica. O TF aeróbio participa do restabelecimento muscular e vascular na HA por corrigir estas alterações via ação de miRNAs.

10 PERSPECTIVAS

Apesar das opções terapêuticas atualmente disponíveis para o tratamento da HA, as alterações na função e estrutura vascular associadas a esta patologia persiste em grande número de pacientes e as lesões em órgãos-alvo, como no coração e músculo esquelético, ainda representam uma complicação bastante significativa. Portanto, o estudo de novas e potenciais terapias, como o uso de miRNAs, para o tratamento desses danos associados à HA deve ser estimulado.

Os dados apresentados contribuem para o nosso conhecimento da participação conjunta dos miRNAs nas adaptações musculares e vasculares e são importantes porque nos permite avançar para melhor elucidar o papel dos miRNAs no exercício e na patologia.

Desse modo, a identificação de perfis de miRNAs específicos para DCV e em tecido específico abre perspectivas para estudos futuros, utilizando miRNAs como biomarcadores de diagnóstico clínico e como agentes terapêuticos por meio da superexpressão ou inibição.

REFERÊNCIAS

ABEDI, H.; ZACHARY, I. Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v.272, p.15442–15451, 1997.

ABU-GHAZALEH, R., et al. Src mediates stimulation by vascular endothelial growth factor of the phosphorylation of focal adhesion kinase at tyrosine 861, and migration and anti-apoptosis in endothelial cells. **The Biochemical Journal**, v.360, p.255-264, 2001.

AGARWAL, P. miR- 135a targets IRS2 and regulates insulin signaling and glucose uptake in the diabetic gastrocnemius skeletal muscle. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1832, n.8, p.1294-303, 2013.

ALBINSSON, S. et al. MicroRNAs are necessary for vascular smooth muscle growth, differentiation, and function. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.30, p.1118–1126, 2010.

ALDERTON, W.K. et al. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **The Biochemical Journal**, v.357, p.593-615, 2001.

ALESSI, D.R. et al. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. **The EMBO Journal**, v.15, p.6541–6551, 1996.

ALON, T. et al. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. **Nature Medicine**, v.1, p.1024–1028, 1995.

ALP, P.R.; NEWSHOLME, E.A.; ZAMMIT, V.A. Activities of citrate synthase and NAD⁺-linked and NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. **The Biochemical Journal**, v.154, p.689-700, 1976.

AMARAL, S.L. et al. Angiotensin II and VEGF are involved in angiogenesis induced by short-term exercise training. **American Journal Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v.281, p.H1163-1169, 2001.

AMARAL, S.L. et al. Exercise training causes skeletal muscle venular growth and alters hemodynamic responses in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Hypertension**, v.19, p.931-940, 2001.

AMARAL, S.L. et al. Exercise training normalizes wall-to-lumen ratio of the gracilis muscle arterioles and reduces pressure in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Hypertension**, v.18, p.1563-1572, 2000.

AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, v.431, p.350-355, 2004.

AMBROSIO, G. et al. Microcirculation in hypertension. In: Schmitd-Schonbein, G.H.; Granger, D.N. **Molecular Basis for Microcirculatory Disorders**. Paris: France, p.607-618, 2003.

ANTONIOS, T.F. et al. Rarefaction of skin capillaries in borderline essential hypertension suggests an early structural abnormality. **Hypertension**, v.34, p.655-658, 1999.

AOI, W et al. The microRNA miR-696 regulates PGC-1{alpha} in mouse skeletal muscle in response to physical activity. **The American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v.298, n.4, p.E799-806, 2010.

ARAKAWA, K. Antihypertensive mechanism of exercise. **Journal of Hypertension**, v.11, p.223-229, 1993.

ARMSTRONG, R.B.; PHELPS, R.O. Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. **American Journal of Anatomy**, v.171, p.259-272, 1984.

ATHERSON, P.J. et al. Selective activation of AMPK-PGG-lalpha or PKB-TSC2-mTOR signaling can explain adaptive responses to endurance or resistance training-like electrical muscle stimulation. **The FASEB Journal**, v.19, p.786-788, 2005.

AZEVEDO, L.F. et al. Cardiac and Metabolic Characteristics of Long Distance Runners of the Sport and Exercise Cardiology Outpatient Facility of a Tertiary Hospital. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.88, p.16-23, 2007.

BAAR, K.; ESSER, K. Phosphorylation of p70 (S6k) correlates with increased skeletal muscle mass following resistance exercise. **American Journal of Physiology**, v. 276, p.C120-C127. 1999.

BACURAU, A.V.N. et al. Sympathetic hyperactivity differentially affects skeletal muscle mass in developing heart failure: role of exercise training. **Journal of Applied Physiology**, v.106, p.1631-1640, 2009.

BARTEL, D.P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v.116, p.281-297, 2004.

BARTOLI, M.; RICHARD, I. Calpains in muscle wasting. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.37, n.10, p.2115-2133, 2005.

BASSEL-DUBY, R. & OLSON, E.N. Role of calcineurin in striated muscle: development, adaptation, and disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.311, p.1133–1141; 2003.

BASSEL-DUBY, R., OLSON E. N. Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. **Annual Review of Biochemistry**, 75: 19-37, 2006.

BÁTKAI S, THUM T. MicroRNAs in Hypertension: Mechanisms and Therapeutic Targets. **Current Hypertension Reports**, v.2, n.14, p.79-87, 2012.

- BEN BACHIR-LAMRINI, L. et al. Evidence of a slow-to-fast fiber type transition in skeletal muscle from spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.258, p.352-357, 1990.
- BERNSTEIN, D. Exercise assessment of transgenic models of human cardiovascular disease. **Physiological Genomics**, v.13, p.217-226, 2003.
- BERNSTEIN, E., et al. Dicer is essential for mouse development. **Nature Genetics**, v.35, n.3, p.215-217, 2003.
- BIGGS, W.H. et al. Identification and characterization of members of the FKHR (FOXO) subclass of winged-helix transcription factors in the mouse. **Mammalian Genome**, v.12, n.6, p.416-425, 2001.
- BING, O.H.L. et al. The spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from compensated left ventricular hypertrophy to failure. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.27, p.383-396, 1995.
- BIRKENKAMP, K.U.; COFFER, P.J. Regulation of cell survival and proliferation by the FOXO (Forkhead box, class O) subfamily of Forkhead transcription factors. **Biochemical Society Transactions**, v.31, p.292-297, 2003.
- BIROT, O.J. Exercise-induced expression of vascular endothelial growth factor RNAm in rat skeletal muscle is dependent on fibre type. **Journal of Physiology**, v.552, p.213-221, 2003.
- BODINE, S.C. et al. Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. **Nature Cell Biology**, v.3, p.1014-9, 2001.
- BODINE, S.C. mTOR Signaling and Molecular Adaptation to Resistance Exercise. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 38, n.11, p.1950-1957, 2006.
- BOETTGER, T. et al. Acquisition of the contractile phenotype by murine arterial smooth muscle cells depends on the Mir143/145 gene cluster. **The Journal of Clinical Investigation**, v.119, p.2634-2647, 2009.
- BOLSTER, D.R. et al. Immediate response of mammalian target of rapamycin (mTOR)-mediated signaling following acute resistance exercise in rat skeletal muscle. **Journal of Physiology**, v.553, p.213-220, 2003.
- BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Molecular Immunology**, v.39, p.615-47, 2003.
- BORTOLOTTI, S.K. et al. Fiber type populations and Ca²⁺ activation properties of single fibers in soleus muscles from SHR and WKY rats. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v.276, P.628-637, 1999.

BOYER, J.L. Exercise therapy in hypertensive men. **The Journal of the American Medical Association**, v.211, p.1668–1671, 1970.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRAISSANT, O. et al. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. **Endocrinology**, v.137, p.354–366, 1996.

BRANDÃO, M.U. et al. Left ventricular function during dynamic exercise in untrained and moderately trained subjects. **Journal of Applied Physiology**, v.75, p.1989-1995, 1993.

BRAREN, R. et al. Endothelial FAK is essential for vascular network stability, cell survival, and lamellipodial formation. **The Journal of Cell Biology**, v.172, p.151-162, 2006.

BRENNECKE, J. et al. Principles of MicroRNA-Target Recognition. **PloS Biology**, v.3, p.85, 2005.

BROOKE, M.H.; KAISER, K.K. Muscle fiber types: how many and what kind?. **Archives of Neurology**, v.23, p.369-379, 1970.

BROOKS, G.A.; WHITE, T.P. Determination of metabolic and rate response of rats to treadmill exercise. **American Journal of Physiology**, v.45, p.1009-1014, 1978.

BROOKS, P.C. et al. Integrin $\alpha\beta3$ antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. **Cell**, v.79, p.1157-1164, 1994.

BROWN, M.D. et al. The effects of different patterns of muscle activity on capillary density, mechanical properties and structure of slow a fast rabbit muscle. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v.361, p.241-250, 1976.

BRUM, P.C. et al. Adaptações agudas e crônicas do exercício físico no sistema cardiovascular. **Revista Paulista de Educação Física**, v.18, p.21-31, 2004.

BRUM, P.C. et al. Hipertensão arterial e exercício físico aeróbio. In: NEGRAO, C.E.; BARRETO, A.C.P. **Cardiologia do exercício: do atleta ao cardiopata**. Editora Manole (2ªed), p.167-78, 2006.

BRUM, P.C. et al. Skeletal myopathy in heart failure: effects of aerobic exercise training. **Experimental Physiology**, v.99, n.4, p.616-620, 2014.

BUENO, C.R. Jr et al. Aerobic exercise training improves skeletal muscle function and Ca^{2+} handling-related protein expression in sympathetic hyperactivity-induced heart failure. **Journal of Applied Physiology**, v.109, p.702–709, 2010.

BYRNE, A.M. et al. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.9, p.777-794, 2005.

CALLIS, T.E. et al. MicroRNAs in skeletal and cardiac muscle development. **DNA and Cell Biology**, v.26, p.219-225, 2007.

CAMPBELL, P.M. et al. K-Ras promotes growth transformation and invasion of immortalized human pancreatic cells by Raf and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. **Cancer Research**, v.67, p.2098–2106, 2007.

CAMPOS JC, et al. Increased clearance of reactive aldehydes and damaged proteins in hypertension-induced compensated cardiac hypertrophy: impact of exercise training. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p.464195, 2015.

CANCE W.G.; GOLUBOVSKAYA, V.M. Focal adhesion kinase versus p53: apoptosis or survival? **Science Signaling**, v.1, n.20, p.e22, 2008.

CANTRELL, D.A. Phosphoinositide 3-kinase signaling pathways. **Journal of Cell Science**, v.114, p.1439-1445, 2001.

CARVALHO, R.F. et al. Myosin heavy chain expression and atrophy in rat skeletal muscle during transition from cardiac hypertrophy to heart failure. **International Journal of Experimental Pathology**, v.84, p.201-206, 2003.

CHAMORRO-JORGANES, A. ET AL. MicroRNA-16 and MicroRNA-424 Regulate Cell-Autonomous Angiogenic Functions in Endothelial Cells via Targeting Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 and Fibroblast Growth Factor Receptor-1. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.31, p.2595-2606, 2011.

CHAN, T.O.; TSICHILIS, P.N. PDK2: a complex tail in one Akt. **Science's STKE**, v.66, p.1-5, 2001.

CHEN, J.F. et al. microRNA-1 and microRNA-206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. **The Journal of Cell Biology**, v.190, p.867-879, 2010.

CHEN, J.F. et al. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. **Nature Genetics**, v.38, p.228-233, 2006.

CHEN, T. et al. Insulin ameliorates miR-1-induced injury in H9c2 cells under oxidative stress via Akt activation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.369, n.1-2, p167-174, 2012.

CHO, H. et al. Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance or glucose homeostasis in mice. **The Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.38349-38352, 2001.

CHOBANIAN, A.V. ET AL. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. **Hypertension**, v.42, p.1206-1252, 2003.

CHRISTENSEN, K.L.; MULVANY, M.J. Location of resistance arteries. **Journal of Vascular Research**, v.38, p.1-12, 2001.

CIMMINO, A. et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. . **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.102, n.39, p.13944-13949, 2005.

CINGOLANI, O.H. et al. Increased systolic performance with diastolic dysfunction in adult spontaneously hypertensive rats. **Hypertension** , v.41, p.249-254, 2003.

COFFER, P.J.; WOODGETT, J.R. Molecular cloning and characterization of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. **European Journal of Biochemistry**, v.201, p.475-481, 1991.

COFFMAN, M. T. Under pressure: the search for the essential mechanisms of hypertension. **Nature Medicine**, v.17, n.11, p.1402-1409, 2011.

COHEN, R.A. et al. Inhibitory role of the endothelium in the response of isolated coronary arteries to platelets. **Science**, v.221, p.273-274, 1983.

CORNELISSEN, V.A.; FAGARD, R.H. Effects of endurance training on blood pressure, blood pressure-regulating mechanisms, and cardiovascular risk factors. **Hypertension**, v.46, p.667-675, 2005.

CROSS, D.A. et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. **Nature**, v.378, p.785-789, 1995.

CUNHA, T.F. et al. Exercise training prevents oxidative stress and ubiquitin-proteasome system overactivity and reverse skeletal muscle atrophy in heart failure. **PLoS One**, v.7, p.e41701, 2012.

CUSPIDI C, et al. Prevalence of left-ventricular hypertrophy in hypertension: an updated review of echocardiographic studies. **Journal of Human Hypertension**, v.26, p.343-349, 2012.

CZECH, B.; HANNON, G.J. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. **Nature Reviews Genetics**, v.12, p.19-31, 2011.

Da SILVA, N. Jr et al. Swimming training in rats increases cardiac MicroRNA-126 expression and angiogenesis. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v.44, p.1453-1462, 2012.

DAHER, Z. et al. Vascular endothelial growth factor receptor-2 activates ADP-ribosylation factor 1 to promote endothelial nitric-oxide synthase activation and nitric

oxide release from endothelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v.285, p.24591-24599, 2010.

DAMATTO, R.L., et al. Heart failure-induced skeletal myopathy in spontaneously hypertensive rats. **International Journal of Cardiology**, v.167, n.3, p.698-703, 2013.

DANGWAL, S. et al. Novel techniques and targets in cardiovascular microRNA research. **Cardiovascular Research**, v.93, p.545-554, 2012.

DATTA, S.R. ET AL. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. **Cell**, v.91, p.231-241, 1997.

DATTA, S.R. et al. Cellular survival: A play in three Akts. **Genes & Development**, v.13, p.2905-2927, 1999.

DAVEL, A. P. et al. Endothelial dysfunction in cardiovascular and endocrine-metabolic diseases: an update. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.44, n.9, p.920-932, 2011.

De LANGE, P. et al. Combined cDNA array/RT-PCR analysis of gene expression profile in rat gastrocnemius muscle: relation to its adaptive function in energy metabolism during fasting. **The FASEB Journal**, v.18, p.350–352, 2004.

De RESENDE, M.M. et al. Role of endothelial cell apoptosis in regulation of skeletal muscle angiogenesis during high and low salt intake. **Physiological Genomics**, v.25, p.325-335, 2006.

DEBBABI, H. et al. Increased skin capillary density in treated essential hypertensive patients. **American Journal of Hypertension**, v.19, p.477-483, 2006.

DEJEAN, E. et al. Hypoxia-microRNA-16 downregulation induces VEGF expression in anaplastic lymphoma kinase (ALK)-positive anaplastic large-cell lymphomas. **Leukemia**, v.25, p.1882-1890, 2011.

DENADAI, B.S. et al. Índices fisiológicos associados com a performance aeróbica em corredores de endurance: efeitos da duração da prova. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.10, p.401-404, 2004.

DESVERGNE, B.; WAHLI, W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. **Endocrine Reviews**, v.20 n.5, p.649–688, 1999.

DICKINSON, B.A. et al. Plasma microRNAs serve as biomarkers of therapeutic efficacy and disease progression in hypertension-induced heart failure. **European Journal of Heart Failure**, v.15, p.650-659, 2013.

DIWAN A, DORN GW 2nd. Decompensation of cardiac hypertrophy: cellular mechanisms and novel therapeutic targets. **Physiology**, v.22, p.56-64, 2007.

DOENCH, J.G.; SHARP, P.A. Specificity of microRNA target selection in translational repression. **Genes & Development**, v.18, p.504-511, 2004.

DOĞAN, M.H. et al. Correlations between sarcopenia and hypertensive target organ damage in a Turkish cohort. **Acta Clinica Belgica**, v.67, n.5, 328-332, 2012.

DRAZNER, M.H. The progression of hypertensive heart disease. **Circulation**, v.123, p.327-334, 2011.

DRUMMOND, M. J. et al. Aging differentially affects human skeletal muscle microRNA expression at rest and after an anabolic stimulus of resistance exercise and essential amino acids. **The American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v.295, p.E1333-E1340, 2008.

DRUMMOND, M.J. MicroRNAs and exercise-induced skeletal muscle adaptations. **Journal of Physiology**, v.588, p.3849-3850, 2010.

DUBEY, R.K.; OVERBECK, H.W. Culture of rat mesenteric arteriolar smooth muscle cells: effects of platelet-derived growth factor, angiotensin, and nitric oxide on growth. **Cell and Tissue Research**, v.275, p.133-141, 1994.

DULAK, J. et al. Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.20, p.659-666, 2000.

EARNSHAW, W.C. et al. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. **Annual Review of Biochemistry**, v.68, p.383-424, 1999.

EHRENBORG, E.; KROOK, A. Regulation of skeletal muscle physiology and metabolism by peroxisome proliferator-activated receptor delta. **Pharmacological Reviews**, v.61, n.3, p.373-393, 2009.

ELIA, L. et al. Reciprocal regulation of microrna-1 and insulin-like growth factor-1 signal transduction cascade in cardiac and skeletal muscle in physiological and pathological conditions. **Circulation**, v.120, p.2377-2385, 2009.

EVANGELISTA, F. et al. Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, p.1751-1759, 2003.

EVANGELISTA, F.S. et al. Loss of resting bradycardia with detraining is associated with intrinsic heart rate changes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, p.1141-1147, 2005.

EVANGELISTA, F.S.; KRIEGER, J.E. Small gene effect and exercise training-induced cardiac hypertrophy in mice: an Ace gene dosage study. **Physiological Genomics**, v.27, p.231-236, 2006.

FAGARD, R.H. Physical activity, physical fitness and incidence of hypertension. **Journal of Hypertension**, v.23, p.265-267, 2005.

FEIHL, F. et al. Hypertension and microvascular remodelling. **Cardiovascular Research**, v.78, n.2, p.274-85, 2008.

FEIHL, F. et al. Hypertension: A disease of the microcirculation?. **Hypertension**, v.48, p.1012-1017, 2006.

FELMEDEN, D.C. et al. A comparison of flow-mediated dilatation and von Willebrand factor as markers of endothelial cell function in health and in hypertension: relationship to cardiovascular risk and effects of treatment: a substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial. **Blood Coagulation & Fibrinolysis**, v.14, n.5, p.425-431, 2003.

FERNANDES, T. et al. Aerobic exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves regulatory microRNAs, decreased angiotensin-converting enzyme-angiotensin II, and synergistic regulation of angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin (1-7). **Hypertension**, v.58, p.182-189, 2011.

FERNANDES, T. et al. Eccentric and concentric cardiac hypertrophy induced by exercise training: microRNAs and molecular determinants. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.44, p.836-847, 2011.

FERNANDES, T. et al. Exercise training restores the endothelial progenitor cells number and function in hypertension: implications for angiogenesis. **Journal of Hypertension**, v.30, p.2133-2143, 2012.

FERRARA, N. et al. The biology of VEGF and its receptors. **Nature Medicine**, v.9, p.669-676, 2003.

FERRARA, N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. **Journal of Molecular Medicine**, v.77, p.527-543, 1999.

FERRARA, N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. **American Journal Physiology - Cell Physiology**, v.280, p.C1358-C1366, 2001.

FERRARA, N. VEGF and quest for tumor angiogenesis factors. **Nature Reviews Cancer**, v.2, p.795-803, 2002.

FISH, J.E. et al. MiR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. **Developmental Cell**, v.15, p.272-284, 2008.

FLEG, J.L. et al. Exercise training as therapy for heart failure: current status and future directions. **Circulation: Heart Failure**, v.8, n.1, p.209-220, 2015.

FLEMING, W.W. Membrane potential and vascular smooth muscle sensitivity. A minireview. **Blood Vessels**, v.24, p.108-112, 1987.

FOLKOW, B. et al.. Adaptive structural changes of the vascular walls in hypertension and their relation to the control of the peripheral resistance. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.44, p.255-272, 1958.

FOLLAND, J.P.; WILLIAMS, A.G. The adaptations to strength training : morphological and neurological contributions to increased strength. **Sports Medicine**, v.37, n.2, p.145-168, 2007.

FORTUNO, M.A. et al. Clinical implications of apoptosis in hypertensive heart disease. **American Journal Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v.284, p.1495-1506, 2003.

FRAISL, P. et al. Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism. **Developmental Cell**, v.16, p.167-179, 2009.

FRANCHINI, KGB. Circulações regionais. In: **Fisiologia Básica**. São Paulo: EDUSP, 1999.

FRANKE, T.F. et al. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. **Cell**, v.81, p.727-36, 1995.

FRITZ, T. et al. Low-intensity exercise increases skeletal muscle protein expression of PPARdelta and UCP3 in type 2 diabetic patients. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v.2, p.492–498, 2006.

FRY, A.C. The role of the resistance exercise intensity on muscle fibre adaptations. **Sports Medicine**, v.34, p.663-679, 2004.

FUJITA, S. et al. Blood flow restriction during low-intensity resistance exercise increases S6K1 phosphorylation and muscle protein synthesis. **Journal of Applied Physiology**, v.103, p.903-910. 2007.

FULTON, D. et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. **Nature**, v.399, p.597-601, 1999.

GALLAGHER, I. J. et al. Integration of microRNA changes in vivo identifies novel molecular features of muscle insulin resistance in type 2 diabetes. **Genome Medicine**, v.2, n.2, p.9, 2010.

GAN, Z. et al. Nuclear receptor/microRNA circuitry links muscle fiber type to energy metabolism. **The Journal of Clinical Investigation**, v.123, n.6, p.2564-2575, 2013.

GARCIARENA, C.D. et al. Endurance training in the spontaneously hypertensive rat. Conversion of pathological into physiological cardiac hypertrophy. **Hypertension**, v.53, p.708-714, 2009.

GERBER H.P., et al. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. **The Journal of Biological Chemistry**, v.273, p.30336–30343, 1998.

GIELEN, S. Exercise training attenuates MuRF-1 expression in the skeletal muscle of patients with chronic heart failure independent of age: the randomized Leipzig Exercise Intervention in Chronic Heart Failure and Aging catabolism study. **Circulation**, v.125, n.22, p.2716-2727, 2012.

GKALIAGKOUSI, E. et al. Nitric oxide dysfunction in vascular endothelium and platelets: role in essential hypertension. **Journal of Hypertension**, v.27, p.2310-2320, 2009.

GLASS, D.J. Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. **Nature Cell Biology**, v.5, p.87-90, 2003.

GLASS, D.J. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, p.1974-1984, 2005.

GOBE, G. et al. Apoptosis occurs in endothelial cells during hypertension-induced microvascular rarefaction. **Journal of Structural Biology**, v.118, p.63-72, 1997.

GOLDSPINK, G. Gene expression in muscle in response to exercise. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v.24, p.121-126, 2003.

GOLIGORSKY, M.S. et al. Nitric oxide modulation of focal adhesions in endothelial cells. **American Journal of Physiology**, v.276, p.C1271-C1281, 1999.

GOMES-SANTOS, I. L. Effects of Exercise Training on Circulating and Skeletal Muscle Renin-Angiotensin System in Chronic Heart Failure Rats. **PLoS One**, v.9, n.5, p.e98012, 2014.

GRASSI, G. et al. Physical exercise in essential hypertension. **Chest**, v.101, p.312S-314S, 1992.

GREEN, D.J. et al. Comparison of resistance and conduit vessel nitric oxide-mediated vascular function in vivo: effects of exercise training. **Journal of Applied Physiology**, v.97, p.749-755, 2004.

GREEN, D.J. et al. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. **Journal of Physiology**, v.561, p.1-25, 2004.

GREEN, D.R.; KROEMER, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. **Science**, v.305, p.626-629, 2004.

GREENE, A.S. et al. Microvascular rarefaction and tissue vascular resistance in hypertension. **American Journal Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v.256, p.126-131, 1989.

GUERRERO, F. et al. Effect of tetrahydrobiopterin and exercise training on endothelium-dependent vasorelaxation in SHR. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v.69, n.2, p.277-287, 2013.

GUO, H. et al. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. **Nature**, v.466, n.7308, p.835–840, 2010.

GUO, Q. et al. Effects of antihypertensive drugs and exercise training on insulin sensitivity in spontaneously hypertensive rats. **Hypertens Res**, v.31, p.525-533, 2008.

GUSTAFSSON T. Vascular remodelling in human skeletal muscle. **Biochemical Society Transactions**, v.39, n.6, p.1628-32, 2011.

GUSTAFSSON, T. et al. Exercise-induced expression of angiogenesis-related transcription and growth factors in human skeletal muscle. **American Journal Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v.276, p.679-685, 1999.

GUSTAFSSON, T. et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor in human skeletal muscle in response to short-term one-legged exercise training. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v.444, p.752-759, 2002.

GUSTAFSSON, T.; KRAUS, W. E. Exercise-induced angiogenesis-related growth and transcription factors in skeletal muscle, and their modification in muscle pathology. **Frontiers in Bioscience**, v.6, p.75-89, 2001.

HAGBERG, J.M. et al. Effect of exercise training in 60- to 69-year-old persons with essential hypertension. **American Journal of Cardiology**, v.64, p.348-353, 1989.

HAGBERG, J.M. et al. The role of exercise training in the treatment of hypertension: an update. **Sports Medicine**, v.30, p.193-206, 2000.

HAGIWARA, N. et al. Sox6 is required for normal fiber type differentiation of fetal skeletal muscle in mice. **Developmental Dynamics**, v.236, p.2062-2076, 2007.

HAMER, NK. Effect of walking on blood-pressure in systemic hypertension. **Lancet**, v.2, p.114-118, 1967.

HAMMOND, S.M. Dicing and slicing: The core machinery of the RNA interference pathway. **FEBS Journal**, v.579, p.5822-5829, 2005.

HAN, K. et al. Sarcopenia as a determinant of blood pressure in older Koreans: findings from the Korea National Health and Nutrition Examination Surveys (KNHANES) 2008-2010. **PLoS One**, v.9, n.1, p.e86902, 2014.

- HANAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**, v.86, p.353-364, 1996.
- HANGAUER, M.J. et al. Pervasive Transcription of the Human Genome Produces Thousands of Previously Unidentified Long Intergenic Noncoding RNAs. **PLoS Genet**, v.9, p.e1003569, 2013.
- HANKS, S.K. et al. Focal Adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.89, p.8487-849, 1992.
- HANSEN, T.B. et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. **Nature**, v.495, p.384–388, 2013.
- HANSON, J.S.; NEDDE, W.H. Preliminary observations on physical training for hypertensive males. **Circulation Research**, v.27, p.49-53, 1970.
- HARTMANN, D.; THUM, T. MicroRNAs and vascular (dys)function. **Vascular Pharmacology**, v.55, p.92-105, 2011.
- HASSELGREN, P. O. Glucocorticoids and muscle catabolism. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v.2, n.3, p.201-215, 1999.
- HAUNSTETTER, A.; IZUMO, S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. **Circulation Research**, v.82, p.1111-1129, 1998.
- HAYKOWSKY, M. et al. A meta-analysis of the effects of exercise training on left ventricular remodeling following myocardial infarction: start early and go longer for greatest exercise benefits on remodeling. **Trials**, v.4, p.12:92, 2011.
- HAYKOWSKY, M.J. et al. Determinants of Exercise Intolerance in Patients with Heart Failure and Reduced or Preserved Ejection Fraction. **Journal of Applied Physiology**, 2015. [Epub ahead of print]
- HE, L.; HANNON, G.J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. **Nature Reviews Genetics**, v.5, p.522-531, 2004.
- HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v.407, p.770-776, 2000.
- HEPPLE, R.T. et al. Aerobic power declines with aging in rats skeletal muscles perfused at matched connective O₂ delivery. **Journal of Applied Physiology**, v.94, p.744-751, 2003.
- HERNANDEZ, J.M. et al. Time course evaluation of protein synthesis and glucose uptake after acute resistance exercise in rats. **Journal of Applied Physiology**, v.88, p.1142-1149, 2000.

HIGASHI, Y.; YOSHISUMI, M. Exercise and endothelial function: Role of endothelium-derived nitric oxide and oxidative stress in healthy subjects and hypertensive patients. **Pharmacology & Therapeutics**, v.102, p.87-96, 2004.

HITACHI, K. et al. Myostatin signaling regulates Akt activity via the regulation of miR-486 expression. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.47, p.93-103, 2014.

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

HOLMES, D.I.R.; ZACHARY, I. The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease. **Genome Biology**, v.6, p.209, 2005.

HOPPELER, H. et al. Endurance training in humans: aerobic capacity and structure of skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v.59, p.320-327, 1985.

HORI, A. et al. Immunohistochemical classification of skeletal muscle fibers. **Acta Histochemica et Cytochemica**, v.31, p.375-384, 1998.

HUANG, B. et al. MicroRNA expression profiling in diabetic GK rat model. **A Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v.41, n.6, p.472-477, 2009.

HUANG, D. W. et al. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. **Nature Protocols**, v.4, n.1, p.44-57, 2009.

HUANG, P.L. et al. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. **Nature**, v.377, p.239-242, 1995.

HUDSON, M.B. et al. miR-23a is decreased during muscle atrophy by a mechanism that includes calcineurin signaling and exosome-mediated export. **The American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v.306, n.6, p.C551-558, 2014.

HURST, D.R. et al. Breast cancer metastasis suppressor 1 up-regulates miR-146, which suppresses breast cancer metastasis. **Cancer Research**, v.69, n.4, p.1279-1283, 2009.

HUTCHINS, P.M. et al. Participation of oxygen in the local control of skeletal muscle microvasculature. **Circulation Research**, v.40, p.85-93, 1974.

INTENGAN, H.D.; SCHIFFRIN, E.L. Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: Role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. **Hypertension**, v.36, p.312-318, 2000.

IRIGOYEN, M. et al. Fisiopatologia da Hipertensão: o que avançamos?. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v.1, p.20-45, 2003.

ITO, H. et al. Decreased superoxide dismutase activity and increased superoxide anion production in cardiac hypertrophy of spontaneously hypertensive rats. **Clinical and Experimental Hypertension**, v.17, p.803-816, 1995.

JI, J. et al. Puralpha and Purbeta collaborate with Sp3 to negatively regulate beta-myosin heavy chain gene expression during skeletal muscle inactivity. **Molecular and Cellular Biology**, v.27, p.1531-1543, 2007.

JI, R. et al. MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation. **Circulation Research**, v.100, p.1579-1588, 2007.

JONES, P.F. et al. Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.88, p.4171-4175, 1991.

KAROLINA, D. S. et al. MicroRNA 144 impairs insulin signaling by inhibiting the expression of insulin receptor substrate 1 in type 2 diabetes mellitus. **PLoS One**, v.6, n.8, p.e22839, 2011.

KATONA, P.G. et al. Sympathetic and parasympathetic cardiac control in athletes and nonathletes at rest. **Journal of Applied Physiology**, v.52, p.1652-1657, 1982.

KATUSIC, Z.S.; COSENTINO, F. Nitric-Oxide Synthase - from Molecular-Biology to Cerebrovascular Physiology. **News in Physiological Sciences**, v.9, p.64-67, 1994.

KELLER, P. et al. A transcriptional map of the impact of endurance exercise training on skeletal muscle phenotype. **Journal of Applied Physiology**, v.110, n.1, p.46-59, 2011.

KHVOROVA, A. et al. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. **Cell**, v.115, p.209-216, 2003.

KIM, V.N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.6, p.376-85, 2005.

KINGWELL, K. Cardiovascular disease: microRNA protects the heart. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.10, p.98, 2011.

KOBAYASHI, N. et al. Oxidative stress promotes endothelial cell apoptosis and loss of microvessels in the spontaneously hypertensive rats. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.25, p.2114-2121, 2005.

KOCH, L.G.; BRITTON, S.L. Artificial selection for intrinsic aerobic endurance running capacity in rats. **Physiological Genomics**, v.5, p.45-52, 2001.

KOKUBO, M. et al. Noninvasive evaluation of the time course of change in cardiac function in spontaneously hypertensive rats by echocardiography. **Hypertension Research**, v.28, p.601-609, 2005.

KONISHI, M.; SU, C. Role of endothelium in dilator responses of spontaneously hypertensive rat arteries. **Hypertension**, v.5, n.6, p.881–886, 1983.

KOUTSOULIDOU, A. et al. Expression of miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-206 increases during development of human skeletal muscle. **BMC Developmental Biology**, v.11, v.34, 2011.

KRÄMER, D.K. et al. Human skeletal muscle fibre type variations correlate with PPARalpha, PPARdelta and PGC-1alfa mRNA. **Acta Physiologica**, v.188, p.207–216, 2006.

KRIEFER, F.N. et al. Inhibition of NO biosynthesis, but not elevated blood pressure, reduces angiogenesis in rat models of secondary hypertension. **Blood Press**, v.11, p.116-124, 2002.

KRIEGER, E.M.; MICHELINI, L.C. Dados básicos sobre a manutenção da pressão arterial. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v.2, p.9-17, 1992.

KUBICA, N. et al. Alterations in the expression in the expression of mRNAs and proteins that that code for species relevant to elf2B activity after an acute bout of resistance exercise. **Journal of Applied Physiology**, v.96, p.679-687. 2004.

KUBICA, N. et al. Resistance exercise increases muscle protein synthesis and translation of eukaryotic initiation factor 2B epsilon mRNA in a mammalian target of rapamycin-defendant manner. **The Journal of Biological Chemistry**, v.280, p.7570-7580, 2005.

KUBIS, N. et al. Role of microvascular rarefaction in the increased arterial pressure in mice lacking for the endothelial nitric oxide synthase gene (eNOS^{3-/-}). **Journal of Hypertension**, v.20, p.1581-1587, 2002.

KUEHBACHER, A. et al. Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. **Circulation Research**, v.101, v.59-68, 2007.

KUKRETI, H. et al. Muscle specific microRNA1 (miR1) targets heat shock protein 70 (HSP70) during dexamethasone-mediated atrophy. **The Journal of Biological Chemistry**, v.288, n.9, p.6663-6678, 2013.

KUMARSWAMY R. et al. SERCA2a gene therapy restores microRNA-1 expression in heart failure via an Akt/FoxO3A-dependent pathway. **European Heart Journal**, v.33, p.1067-1075, 2012.

KUO, N.T. et al. Prolonged hypoxia increases vascular endothelial growth factor mRNA and protein in adult mouse brain. **Journal of Applied Physiology**, v.86, p.260-264, 1999.

LAGOS-QUINTANA, M. et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. **Science**, v.294, n.5543, p.853-858, 2001.

LAGOS-QUINTANA, M. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. **Current Biology**, v.12, n.9, p.735-739, 2002.

LANCETA, J. et al. MicroRNA group disorganization in aging. **Experimental Gerontology**, v.45, n.4, p.269-278, 2010.

LANDMESSER, U.; DREXLER, H. Endothelial function and hypertension. **Current Opinion in Cardiology**, v.22, n.4, p.316–20, 2007.

LANG, R.M. et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. **Journal of the American Society of Echocardiography**, v.8, n.12, p.1440-63, 2005.

LATERZA, M.C. et al. Exercise training restores baroreflex sensitivity in never-treated hypertensive patients. **Hypertension**, v.49, p.1298-1306, 2007.

LATRES, E. et al. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inversely regulates atrophy-induced genes via the phosphatidylinositol 3-kinase/ Akt/ mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v.280, p.2737-2744, 2005.

LAU, N.C. et al. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, v.294, p.858-62, 2001.

LAURENT, S.; BOUTOUYRIE, P. The structural factor of hypertension: large and small artery alterations. **Circulation Research**, v.116, n.6, p.1007-1021, 2015.

LECKER, S.H. et al. Muscle protein breakdown and the critical role of the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. **Journal of Nutrition**, v.129, p.227S-237S, 1999.

LEE, P.C. et al. Impaired wound healing and angiogenesis in eNOS-deficient mice. **American Journal of Physiology**, v.277, p.1600-1608. 1999.

LEE, R.C. et al. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v.75, p.843-854, 1993.

LEE, R.C.; AMBROS, V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, v.294, p.862-864, 2001.

LEE, Y.S.; DUTTA, A. MicroRNAs in Cancer. **The Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v.4, p.199-227, 2009.

LÉGER, B. et al. Akt signalling through GSK-3 β , mTOR and FOXO1 is involved in human skeletal muscle hypertrophy and atrophy. **The Journal of Physiology**, v.576, p.923-933, 2006b.

LÉGER, B. et al. Human skeletal muscle atrophy in amyotrophic lateral sclerosis reveals a reduction in Akt and an increase in atrogen-1. **The FASEB Journal**, v.20, p.583-585, 2006a.

LEKER, R.R. et al. Transforming growth factor alpha induces angiogenesis and neurogenesis following stroke. **Neuroscience**, v.163, n.1, p.233-43, 2009.

LEUNG, A. K.; SHARP, P. A. MicroRNA functions in stress responses. **Molecular Cell**, v.40, n.2, p.205-215, 2010.

LEVKAU, B. et al. Caspase-mediated cleavage of focal adhesion kinase pp125FAK and disassembly of focal adhesions in human endothelial cell apoptosis. **The Journal of Experimental Medicine**, v.187, p.579-586, 1998.

LÉVY, B.I. et al. Microcirculation in hypertension: a new target for treatment?. **Circulation**, v.104, p.735-740, 2001.

LÉVY, B.I. New aspects in the mechanisms of hypertension and the pathophysiology of the arterial tree. In: SAFAR, M.E. **Macro and microcirculation in hypertension**. Editora Lippincott Williams & Wilkins, p.3-12, 2005.

LEWIS, B.P. et al. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. **Cell**, v.120, p.15-20, 2005.

LEWIS, D.M. et al. A faster twitch contraction of soleus in the spontaneously hypertensive rat is partly due to changed fibre type composition. **Experimental Physiology**, v.79, p.377-386, 1994.

LI Z. et al. TGF- α as well as VEGF, PD-ECGF and bFGF contribute to angiogenesis of esophageal squamous cell carcinoma. **International Journal of Oncology**, v.17, n.3, p.453-460, 2000.

LI, H. et al. Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. **Nitric Oxide**, v.7, p.132-147, 2002.

LI, J.S. et al. Effect of AT1 angiotensin-receptor blockade on structure and function of small arteries in SHR. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.30, n.1, p.75-83, 1997.

LIM, L. P. et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. **Nature**, v.433, n.7027, p.769-73, 2005.

LIN, J. et al. Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. **Nature**, v.418, p.797-801, 2002.

- LIU, C.G. et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.102, p.13944-13949, 2005.
- LIU, N. et al. Mice lacking microRNA 133a develop dynamin 2-dependent centronuclear myopathy. **The Journal of Clinical Investigation**, v.121, n.8, p.3258-3268, 2011.
- LIU, N. et al. microRNA-133a regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. **Genes & Development**, v.22, n.23, p.3242-3254, 2008.
- LIU, N. et al. microRNA-206 promotes skeletal muscle regeneration and delays progression of Duchenne muscular dystrophy in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v.122, p.2054-2065, 2012.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$. **Methods**, v.25, p.402-408, 2001.
- LUQUET, S. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability. **The FASEB Journal**, v.17, p.2299–2301, 2003.
- MAEDA, S. et al. Effects of exercise training of 8 weeks and detraining on plasma levels of endothelium-derived factors, endothelin-1 and nitric oxide, in healthy young humans. **Life Sciences**, v.69, p.1005-1016, 2001.
- MAHONEY, D. J. et al. Analysis of global mRNA expression in human skeletal muscle during recovery from endurance exercise. **The FASEB Journal**, v.19, p.1498-1500, 2005.
- MARQUES, F. Z. et al. Gene expression profiling reveals renin mRNA overexpression in human hypertensive kidneys and a role for microRNAs. **Hypertension**, v.58, p.1093–1098, 2011.
- MATSUI, T. et al. Phenotypic spectrum caused by transgenic overexpression of activated Akt in the heart. **The Journal of Clinical Investigation**, v.277, p.22896-22901, 2002.
- McCARTHY, J. J. MicroRNA-206: the skeletal muscle-specific myomiR. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1779, p.682-691, 2008.
- McCARTHY, J.J et al.. Evidence of MyomiR network regulation of betamyosin heavy chain gene expression during skeletal muscle atrophy. **Physiological Genomics**, v.39, n.3, p.219-226, 2009.
- McCARTHY, J.J.; ESSER, K.A. MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy. **Journal of Applied Physiology**, v.102, p.306-313, 2007.

McCLELLAND, A. D.; KANTHARIDIS P. microRNA in the development of diabetic complications. **Clinical Science** , v.126, n.2, p.95-110, 2014.

McGRATH, J.C. et al. New aspects of vascular remodeling: the involvement of all vascular cell types. **Experimental Physiology**, v.90, p.469-75, 2005.

McMULLEN, J.R. et al. Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.100, n.21, p.12355-12360, 2003.

MEDEIROS, A. et al. Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.37, p.1909-1917, 2004.

MEDVEDEV, N.V.; GORSHUNOVA, N.K. Age-related sarcopenia as the risk factor of development of myocardial dysfunction and chronic heart failure in elderly patients with arterial hypertension. **Advances in Gerontology**, v.25, n.3, p.456-460, 2012.

MELO, R.P. et al. Training-induced, pressure-lowering effect in SHR wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles. **Hypertension**, v.42, p.851-857, 2003.

MINAMI, N. et al. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor and exercise training on exercise capacity and skeletal muscle. **Journal of Hypertension**, v.25, p.1241-1248, 2007.

MONTGOMERY RL, VAN ROOIJ E. MicroRNA regulation as a therapeutic strategy for cardiovascular disease. **Currents Drug Targets**, v.11, p.936-942, 2010.

MOREIRA, J. B., et al. High- versus moderate-intensity aerobic exercise training effects on skeletal muscle of infarcted rats. **Journal of Applied Physiology**, v.114, p.1029–1041, 2013.

MOTOHASHI, N. et al. Regulation of IRS1/Akt insulin signaling by microRNA-128a during myogenesis. **Journal of Cell Science**, v.126, p.2678-2691, 2013.

MOYNA, N.M.; THOMPSON, P.D.; The effect of physical activity on endothelial function in man. **Acta Physiology Scandinavian**, v.180, p.113-123, 2004.

MUELLER, M. Different molecular and structural adaptations with eccentric and conventional strength training in elderly men and women. **Gerontology**, v.57, n.6, p.528-538, 2011.

MUKHERJI, S. et al. MicroRNAs can generate thresholds in target gene expression. **Nature Genetics**, v.43, p.854-859, 2011.

MULVANY, M.J. et al. Evidence for hyperplasia in mesenteric resistance vessels of spontaneously hypertensive rats using a three-dimensional dissector. **Circulation Research**, p.794-800, v.57, 1985.

MULVANY, M.J. Small artery remodelling in hypertension. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.110, p.49-55, 2012.

MULVANY, M.J.; AALKJAER, C. Structure and function of small arteries. **Physiological Reviews**, v.70, p.921-961, 1990.

MULVANY, M.J.; HALPERN, W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. **Circulation Research**, v.41, p.19-26, 1977.

MUOIO, D. M. et al. Fatty acid homeostasis and induction of lipid regulatory genes in skeletal muscles of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha knock-out mice. Evidence for compensatory regulation by PPAR delta. **The Journal of Biological Chemistry**, v.277, p.26089–26097, 2002.

MYERS, J. et al. Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing. **The New England Journal of Medicine**, v.346, p.793-801, 2002.

NADER, G.A. Molecular determinants of skeletal muscle mass: getting the "AKT" together. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.37, n.10, p.1985-1996, 2005.

NADER, G.A.; ESSER, K.A. Intracellular signaling specificity in skeletal muscle in response to different modes of exercise. **Journal of Applied Physiology**, v.90, p.1936-1942, 2001.

NAGARAJA, A. K. et al. A link between mir-100 and FRAP1/mTOR in clear cell ovarian cancer. **Molecular Endocrinology**, v.24, n.2, p.447-463, 2010.

NAGATOMO, F. et al. Skeletal muscle characteristics of rats with obesity, diabetes, hypertension, and hyperlipidemia. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v.16, p.576-585, 2009.

NAKATANI, T. et al. Cell size and oxidative enzyme activity of type-identified fibers in rat hindlimb muscles: a review. **Acta Histochemica et Cytochemica**, v.36, p.105-114, 2003.

NARKAR, V.A., et al. Exercise and PGC-1alpha-independent synchronization of type I muscle metabolism and vasculature by ERR γ . **Cell Metabolism**, v.13, n.3, p.283-293, 2011.

NAZARI-JAHANTIGH, M. et al. The role of microRNAs in arterial remodelling. **Thrombosis and Haemostasis**, v.107, p.611-618, 2012.

NEGRÃO, C.E. et al. Effect of exercise training on RSNA, baroreflex control, and blood pressure responsiveness. **American Journal of Physiology**, v.265, p.365-370, 1993.

NEGRÃO, C.E. et al. Exercício físico e endotélio. In: DA LUZ, P.; LAURINDO, F.R.M.; CHAGAS, A.C.P. **Endotélio e doenças cardiovasculares**, Editora Manole, p.161-172, 2005.

NEGRÃO, C.E. et al. Vagal and sympathetic control of heart rate during exercise by sedentary and exercise-trained rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.25, p.1045-1052, 1992.

NELSON, L. et al. The effect of changing levels of physical activity on blood pressure and hemodynamics in patients with essential hypertension. **Lancet**, v.2, p.474-476, 1986.

NEUFELD, G. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor. **The FASEB Journal**, v.13, p.9-22, 1999.

NIELSEN, S. et al. Muscle specific microRNAs are regulated by endurance exercise in human skeletal muscle. **The Journal of Physiology**, v.588, p.4029-4037, 2010.

NISHIDA, K. et al. Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase. **The Journal of Clinical Investigation**, v.90, p.2092-2096, 1992.

NOR, J.E. et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. **The American Journal of Pathology**, v.154, p.375-384, 1999.

NOR, J.E.; POLVERINI, P. Role of endothelial cell survival and death signals in angiogenesis. **Angiogenesis**, v.3, p.101-116, 1999.

O'ROURKE, J. R. et al. Essential role for Dicer during skeletal muscle development. **Developmental Biology**, v.311, n.2, p.359-368, 2007.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Japanese Circulation Journal**, v.27, p.282-93, 1963.

OLENA, A.F.; PATTON, J.G. Genomic organization of microRNAs. **Journal of Cellular Physiology**, v.222, p.540-545, 2009.

OOI, J. et al. The therapeutic potential of miRNAs regulated in settings of physiological cardiac hypertrophy. **Future Medicinal Chemistry**, v.6, p.205-222, 2014.

PAFFENBARGER, R.S. et al. The association of changes in physical-activity level and other lifestyle characteristics with mortality among men. **The New England Journal of Medicine**, v.328, p.538-545, 1993.

PAGAN L.U. et al. Long-Term Low Intensity Physical Exercise Attenuates Heart Failure Development in Aging Spontaneously Hypertensive Rats. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v.36, p.61-74, 2015.

PARENTI, A. et al. Nitric oxide is an upstream signal of vascular endothelial growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase1/2 activation in postcapillary endothelium. **The Journal of Biological Chemistry**, v.273, p.4220-4226, 1998.

PARK, K.S. et al. CRIPTO1 expression in EGFR-mutant NSCLC elicits intrinsic EGFR-inhibitor resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v.124, n.7, p.3003-3015, 2014.

PARKINGTON, J.D. et al. Contraction-mediated mTOR, p75S6k, and ERK1/2 phosphorylation in aged skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v.97, p.243-248, 2004.

PASQUINELLI, A.E. et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. **Nature**, v.408, p.86–89, 2000.

PEREIRA, M. et al. Differences in prevalence, awareness, treatment and control of hypertension between developing and developed countries. **Journal of Hypertension**, v.27, p.963–975, 2009.

PERREAULT, C.L. et al. Alterations in contractility and intracellular Ca²⁺ transients in isolated bundles of skeletal muscle fibers from rats with chronic heart failure. **Circulation Research**, v.73, p.405–412, 1993.

PESCATELLO, L.S. et al. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and hypertension. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v.36, p.533-553, 2004.

PIOVAN, C. Oncosuppressive role of p53-induced miR-205 in triple negative breast cancer. **Molecular Oncology**, v.6, p.458-472, 2012.

POLISENO, L. et al. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. **Blood**, v.108, p.3068-3071, 2006.

POOLE, D.C.; MATHIEU-COSTELLO, O. Relationship between fiber capillarization and mitochondrial volume density in control and trained rat soleus and plantaris muscles. **Microcirculation**, v.3, p.175-186, 1996.

PRIOR, B.M. et al. What makes vessels grow with exercise training? **Journal of Applied Physiology**, v.52, p.1119-1128, 2004.

PUIG, J. et al. Spectral analysis of heart rate variability in athletes. **Journal of Sport Medicine, Physiology & Fitness**, v.33, p.44-48, 1993.

PUZSEROVA, A. et al. Age-related alterations in endothelial function of femoral artery in young SHR and WKY rats. **BioMed Research International**, v.2014, p.658479, 2014.

QIN, S.; ZHANG, C. MicroRNAs in vascular disease. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.57, p.8-12, 2011.

QUADRILATERO, J.; RUSH, J.W.E. Increased DNA fragmentation and altered apoptotic protein levels in skeletal muscle of spontaneously hypertensive rats. **Journal of Applied Physiology**, v.101, p.1149-1161, 2006.

QUIAT, D.; OLSON, E.N. MicroRNAs in cardiovascular disease: from pathogenesis to prevention and treatment. **The Journal of Clinical Investigation**, v.123, p.11-18, 2013.

QUINTAVALLE, C. et al. "ApoptomiRs" in vascular cells: Their role in physiological and pathological angiogenesis. **Vascular Pharmacology**, v.55, n.4, p.87-91, 2011.

QUINTAVALLE, M. et al. Arterial remodeling and atherosclerosis: miRNAs involvement. **Vascular Pharmacology**, v.55, n.4, p.106-110, 2011a.

RAFF, M.C. et al. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. **Science**, v.262, p.695-700, 1993.

RAO, P.K. et al. Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, p.8721-8726, 2006.

REINHART, B.J. et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v.403, p.901-906, 2000.

RENNIE, M.J. et al. Control of the size of the human muscle mass. **Annual Review of Physiology**, v.66, p.799-828, 2004.

RHOADES, M.W. et al. Prediction of plant microRNA targets. **Cell**, v.110, p.513-520, 2002.

RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. **Nature**, v.386, p.671-674, 1997.

RIZZONI, D. et al. Vascular structural and functional alterations before and after the development of hypertension in SHR. **American Journal of Hypertension**, v.7, n.2, p.193-200, 1994.

ROMMEL, C. et al. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. **Nature Cell Biology**, v.3, p.1009-1013, 2001.

RONDON, M.U.P.B.; BRUM, P.C. Exercício físico como tratamento não-farmacológico da hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v.10, p.134-139, 2003.

ROQUE, F. R. et al. Aerobic exercise reduces oxidative stress and improves vascular changes of small mesenteric and coronary arteries in hypertension. **British Journal of Pharmacology**, v.168, p.686-703, 2013.

ROSSÉ, T. et al. Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. **Nature**, v.391, p.496-499, 1998.

ROSSONI, L.V. et al. Cardiac benefits of exercise training in aging spontaneously hypertensive rats. **The Journal of Hypertension**, v.29, n.12, p.2349-2358, 2011.

ROWELL, L.B. et al. Is peak quadriceps blood flow in humans even higher during exercise with hypoxemia?. **American Journal of Physiology**, v.251, p.1038-1044, 1986.

RUEDEMANN, A.D. Conjunctival vessels. **The Journal of the American Medical Association**, v.101, p.1477-1481, 1933.

RUSSELL, A. P. et al. Regulation of miRNAs in human skeletal muscle following acute endurance exercise and short-term endurance training. **The Journal of Physiology**, v.591, p.4637-4653, 2013.

RUSSELL, A.P. et al. Endurance training in humans leads to fiber type-specific increases in levels of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in skeletal muscle. **Diabetes**, v.52, p.2874-2881, 2003.

SAFAR, M.E. Macro and microcirculation in hypertension. In: SAFAR, M.E. **Macro and microcirculation in hypertension**. Editora: Lippincott Williams & Wilkins, p. 1-2, 2005.

SAFDAR, A. et al. miRNA in the regulation of skeletal muscle adaptation to acute endurance exercise in C57Bl/6J male mice. **PLoS One**, v.4, p.e5610, 2009.

SAKAMOTO, K. et al. Exercise regulates Akt and glycogen synthase kinase-3 activities in human skeletal muscle. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.319, p.419-425, 2004.

SALVESEN, G.S.; DUCKETT, C.S. Apoptosome: the seven-spoked death machine. **Developmental Cell**, v.2, p.256-277, 2002.

SANCHEZ, A.M. et al. eIF3f: a central regulator of the antagonism atrophy/hypertrophy in skeletal muscle. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.45, n.10, p.2158-2162, 2013.

SANDRI, M. et al. FOXO transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. **Cell**, v.117, p.399-412, 2004.

SCHAIBLE, T.F.; SCHEUER, J. Effects of physical training by running or swimming on ventricular performance of rats hearts. **Journal of Applied Physiology**, v.46, p.854-860, 1979.

SCHIAFFINO, S. et al. Mechanisms regulating skeletal muscle growth and atrophy. **FEBS Journal**, v.280, p.4294–4314, 2013.

SCHIFFRIN, E.L. Reactivity of small blood vessels in hypertension: relation with structural changes. State of the art lecture. **Hypertension**, v.19, p.II1–II9, 1992.

SCHIFFRIN, E.L.; TOUYZ, R.M. From bedside to bench to bedside: role of renin angiotensin- aldosterone system in remodeling of resistance arteries in hypertension. **The American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v.287, p.H435-H446, 2004.

SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell**, v.103, p.211-225, 2000.

SCHULER, M. et al. PGC1 alpha expression is controlled in skeletal muscles by PPAR beta, whose ablation results in fiber-type switching, obesity, and type 2 diabetes. **Cell Metabolism**, v.4, p.407–414, 2006.

SCHULTZ, R. L. Metabolic Adaptations of Skeletal Muscle to Voluntary Wheel Running Exercise in Hypertensive Heart Failure Rats. **Physiological Research**, v.62, p.361-369, 2013.

SCHULZE PC, et al. Transgenic overexpression of locally acting insulin-like growth factor-1 inhibits ubiquitin-mediated muscle atrophy in chronic left-ventricular dysfunction. **Circulation Research**, v.97, n.5, p.418-426, 2005.

SCHULZE, P.C. et al. Muscular levels of proinflammatory cytokines correlate with a reduced expression of insulinlike growth factor-I in chronic heart failure. **Basic Research in Cardiology**, v.98, n.4, p.267-274, 2003.

SCHWARZ, D.S. et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. **Cell**, v.115, p.199-208, 2003.

SCHWARZ, S. et al. The microRNA regulated SBP-box genes SPL9 and SPL15 control shoot maturation in Arabidopsis. **Plant Molecular Biology**, v.67, p.183-195, 2008.

SELBACH, M. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. **Nature**, v.455, n.7209, p.58-63, 2008.

SEN, C.K. et al. Micromanaging vascular biology: tiny microRNAs play big band. **Journal of Vascular Research**, v.46, p.527-540, 2009.

SEVER, P.S.; POULTER, N.R. A hypothesis for the pathogenesis of essential hypertension: the initiating factors. **Journal of Hypertension Suppl**, v.7, p.S9-12, 1989.

SHALABY, F. et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1 deficient mice. **Nature**, v.376, p.62-66, 1995.

SHEN, H. et al. Identification of microRNAs involved in dexamethasone-induced muscle atrophy. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.381, n.1- 2, p.105-113, 2013.

SHEN, T.L., et al. Conditional knockout of focal adhesion kinase in endothelial cells reveals its role in angiogenesis and vascular development in late embryogenesis. **The Journal of Cell Biology** v.169, p.941-952, 2005.

SILLAU, A.H.; BANCHERO, N. Visualization of capillaries in skeletal muscle by the ATPase reaction. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v.369, p.269-271, 1977.

SILVA, G.J. et al. Acute and chronic effects of exercise on baroreflexes in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v.30, p.714-719, 1997.

SIU, P.M. et al. Citrate synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac e skeletal muscles. **Journal of Applied Physiology**, v.94, p.555-560, 2003.

SLEE, E.A. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase -9-dependent manner. **The Journal of Cell Biology**, v.144, p.281-292, 1999.

SMALL, E. M. et al. Regulation of PI3-kinase/Akt signaling by muscle-enriched microRNA-486. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.107, n.9, p.4218-4223, 2010.

SOCI, U.P. MicroRNAs 29 are involved in the improvement of ventricular compliance promoted by aerobic exercise training in rats. **Physiological Genomics**, v.43, p.665-673, 2011.

SOKOL, N. S.; AMBROS, V. Mesodermally expressed Drosophila microRNA-1 is regulated by Twist and is required in muscles during larval growth. **Genes & Development**, v.19, n.19, p.2343-2354, 2005.

SONG, M. S. et al. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.13, p.283-296, 2012.

SOUZA, R.W. et al. Aerobic exercise training prevents heart failure-induced skeletal muscle atrophy by anti-catabolic, but not anabolic actions. **PLoS One**, v.9, n.10, p. e110020. 2014.

STASZEL, T. et al. Role of microRNAs in endothelial cell pathophysiology. **Polish Archives of Internal Medicine**, v.121, p.361-367, 2011.

STITT, T.N. et al. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. **Molecular Cell**, v.14, p.395-403, 2004.

STRUIJKER BOUDIER, H.A. et al. The microcirculation and hypertension. **Journal of Hypertension Suppl**, v.10, p.S147–S156, 1992.

SUÁREZ, Y. et al. Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells. **Circulation Research**, v.100, p.1164-73, 2007.

SUÁREZ, Y.; SESSA, W.C. MicroRNAs as novel regulators of angiogenesis. **Circulation Research**, v.104, p.442-454, 2009.

SULLIVAN, J.M. et al. Attenuation of the microcirculation in young patients with high-output borderline hypertension. **Hypertension**, v.5, p.844-851, 1983.

SUN, D. et al. Enhanced release of prostaglandins contributes to flow-induced arteriolar rarefaction in eNOS knockout mice. **Circulation Research**, v.85, p.288-293, 1999.

SUN, H.X. et al. Essential role of microRNA-155 in regulating endothelium-dependent vasorelaxation by targeting endothelial nitric oxide synthase. **Hypertension**, v.6, p.1407-1414, 2012.

SUZUKI, H. et al. Xanthine oxidase activity associated with arterial blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.95, p.4754–4759, 1998.

SUZUKI, J. Time course changes in VEGF expression and capillarity in the early stage of exercise training with CO₂ treatment in rat skeletal muscles. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.181, p.225-232, 2004.

TABRUYN, S.P. MiR-205 is downregulated in hereditary hemorrhagic telangiectasia and impairs TGF-beta signaling pathways in endothelial cells. **Angiogenesis**, v.16, n.4, p.877-887, 2013.

TANG, K. et al. Capillary regression in vascular endothelial growth factor-deficient skeletal muscle. **Physiological Genomics**, v.18, p.63-69, 2004.

TAVORA, B. et al. Endothelial FAK is required for tumour angiogenesis. **EMBO Molecular Medicine**, v.2, n.12, p.516-528, 2010.

THUM T. MicroRNA therapeutics in cardiovascular medicine. **EMBO Molecular Medicine**, v.4, p.3-14, 2012.

THUM, T.; VAN ROOIJ, E. MicroRNA therapeutics in cardiovascular medicine. **EMBO Molecular Medicine**, v.4, p.3-14, 2010.

TIPTON, C.M. Exercise training and hypertension: an update. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v.19, p.447-505, 1991.

TISDALE, M.J. The ubiquitin-proteasome pathway as a therapeutic target for muscle wasting. **Journal of Community and Supportive Oncology**, v.3, p.209-217, 2005.

TOTH, M.J. et al. Chronic heart failure reduces Akt phosphorylation in human skeletal muscle: relationship to muscle size and function. **Journal of Applied Physiology**, v.110, n.4, p.892-900, 2011.

TOUYZ, R.M., SCHIFFRIN, E.L. Peroxisome proliferator-activated receptors in vascular biology-molecular mechanisms and clinical implications. **Vascular Pharmacology**, v.45, n.1, p.19-28, 2006.

TRAN, J. et al. Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.264, p.781-788, 1999.

URBICH, C. et al. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. **Cardiovascular Research**, v.79, p.581-588, 2008.
v.6, n.8, p.e22839, 2011.

VALENCIA-SANCHES, M.A. et al. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. **Genes & Development**, v.20, p.515-524, 2006.

VAN DER HEIDE, L.P. et al. The ins and outs of FOXO shuttling: mechanisms of FOXO translocation and transcriptional regulation. **The Biochemical Journal**, v.380, p.297-309. 2004.

VAN DUIJNHOFEN, N.T. et al. Impact of bed rest on conduit artery remodeling: effect of exercise countermeasures. **Hypertension**, v.56, n.2, p.240-246, 2010.

VAN ROOIJ, E. et al. A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. **Developmental Cell**, v.17, p.662-673, 2009.

VAN ROOIJ, E. et al. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. **Science**, v.316, p.575-579, 2007.

VAN ROOIJ, E.; OLSON, E.N. MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. **The Journal of Clinical Investigation**, v.117, p.2369-2376, 2007.

VANDER HEIDEN, M.G.V.; THOMPSON, C.B. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis?. **Nature Cell Biology**, v.1, p.E209-216, 1999.

VANHOUTTE, P.M. et al. Endothelial dysfunction and vascular disease. **Acta Physiologica**, v.196, p.193-222, 2009.

VASAN, R.S. et al. Impact of high-normal blood pressure on the risk of cardiovascular disease. **The New England Journal of Medicine**, v.354, p.1291-1297, 2001.

VASQUES, L. R. et al. MicroRNAs: A New Paradigm for Gene Regulation. In: Gupta VK, Gaur RK, Gafni Y. **RNAi Technology**, p.135-152, 2012.

VASUDEVAN, S. et al. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. **Science**, v.318, p.1931-1924, 2007.

VERAS-SILVA, A.S. et al. Low-intensity exercise training decreases cardiac output and hypertension in spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Physiology**, v.273, p.2627-2631, 1997.

VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL. **Revista hipertensão**, v.13, p.1-68, 2010.

VIHKO, V. et al. Oxidative and lysosomal capacity in skeletal muscle of mice after endurance training of different intensities. **Acta Physiologica Scandinavica**, v.104, p.74-81, 1978.

VISHWAMITRA, D. et al. MicroRNA 96 is a post-transcriptional suppressor of anaplastic lymphoma kinase expression. **The American Journal of Pathology**, v.180, n.5, p.1772-1780, 2012.

VYAS, D.R. et al. GSK- 3b negatively regulates skeletal myotube hypertrophy. **The American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v.283, p.C545–C551, 2002.

WANG D, et al. MicroRNA-205 controls neonatal expansion of skin stem cells by modulating the PI(3)K pathway. **Nature Cell Biology**, v.15, n.10, p.1153-1163, 2013.

WANG, F. et al. miRNA-1 targets fibronectin1 and suppresses the migration and invasion of the HEP2 laryngeal squamous carcinoma cell line. **FEBS Letters**, v.585, n.20, p.3263-3269, 2011.

WANG, H. et al. Impaired angiogenesis in SHR is associated with decreased KDR and MT1-MMP expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.315, p.363-368, 2004.

WANG, H.; SU, Y. Collagen IV contributes to nitric oxide-induced angiogenesis of lung endothelial cells. **The American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v.300, n.5, p.C979-88, 2011.

WANG, K. The long noncoding RNA CHRF regulates cardiac hypertrophy by targeting miR-489. **Circulation Research**, v.114, p.1377-1388, 2014.

WANG, S. et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. **Developmental Cell**, v.15, p.261-271, 2008.

WANG, X. H. Decreased miR- 29 suppresses myogenesis in CKD. **Journal of the American Society of Nephrology**, v.22, n.11, p.2068-2076, 2011.

WANG, X.; PROUD, C.G. The mTOR pathway in the control of protein synthesis. **Physiology**, v.21, p.362-369, 2006.

WANG, Y.X. et al. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. **PLOS Biology**, v.2, n.10, p.e294, 2004.

WATT, M. J. et al. Suppression of plasma free fatty acids upregulates peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and delta and PPAR coactivator 1alpha in human skeletal muscle, but not lipid regulatory genes. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.33, p.533-544, 2004.

WEBER, M. et al. MiR-21 is induced in endothelial cells by shear stress and modulates apoptosis and eNOS activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.393, p.643-648, 2010.

WHELTON, S.P. et al. Effect of aerobic exercise on blood pressure: a metaanalysis of randomized, controlled trials. **Annals of Internal Medicine**, v.136, p.493-503, 2002.

WIBOM, R. et al. Adaptation of mitochondrial ATP production in human skeletal muscle to endurance training and detraining. **Journal of Applied Physiology**, v.73, p.2004-2010, 1992.

WILLIAMS, A.H. et al. MicroRNA control of muscle development and disease. **Current Opinion in Cell Biology**, v.21, p.461-469, 2009.

WISLOFF, U. et al. Intensity-controlled treadmill running rats: VO₂max and cardiac hypertrophy. **American Journal Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v.280, p.H1301-1310, 2001.

WU, R. et al. Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. **Journal of Hypertension**, v.19, p.741-748, 2001.

XU, J. et al. Transcription factor FoxO1, the dominant mediator of muscle wasting in chronic kidney disease, is inhibited by microRNA-486. **Kidney International**, v.82, p.401-411, 2012.

YANG, W.J. et al. Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development. **The Journal of Biological Chemistry**, v.208, p.9330-9335, 2005.

YU, S. et al. miRNA-96 suppresses KRAS and functions as a tumor suppressor gene in pancreatic cancer. **Cancer Research**, v.70, n.14, p.6015-6025, 2010.

YUASA, K. et al. MicroRNA-206 is highly expressed in newly formed muscle fibers: implications regarding potential for muscle regeneration and maturation in muscular dystrophy. **Cell Structure and Function**, v.33, p.163-169, 2008.

YUE, X. MicroRNA-205 functions as a tumor suppressor in human glioblastoma cells by targeting VEGF-A. **Oncology Reports**, v.27, n.4, p.1200-1206, 2012.

ZACHARY, I.; GLIKI, G. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. **Cardiovascular Research**, v.49, n.3, p.568-81. 2001.

ZACHARY, I.; ROZENGURT, E. Focal adhesion kinase (p125FAK): a point of convergence in the action of neuropeptides, integrins and oncogenes. **Cell**, v.71, p.891-894, 1992.

ZERNECKE, A. et al. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. **Science Signaling**, v.2, n.100, p.ra81, 2009.

ZHANG, G.; LI, Y. p38 β MAPK upregulates atrogen1/MAFbx by specific phosphorylation of C/EBP β . **Skeletal Muscle**, v.2, p.20, 2012.

ZHAO, Y. et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. **Cell**, v.129, p.303-317, 2007.

ZICHE, M. et al. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. **The Journal of Clinical Investigation**, v.94, p.2036-2044, 1994.

ZICHE, M. et al. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. **The Journal of Clinical Investigation**, v.99, p.2625-2634, 1997.

ANEXO A – Parecer de aprovação do CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais) da EEFÉ-USP.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE




Of.CEUA/714/EEFE/060314

Senhor(a) Pesquisador(a)

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada em 27 de fevereiro de 2014, **aprovou** o Protocolo de Pesquisa nº 2014/01 – Caracterização do perfil de microRNAs e genes alvo muscular esquelético envolvidos na rarefação microvascular de ratos espontaneamente hipertensos: papel do treinamento físico.

Solicitamos a observância da apresentação do relatório parcial e final da pesquisa em setembro de 2015 e janeiro 2017, respectivamente.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Paulo Rizzo Ramires
Vice Coordenador

Ilmo(a). Sr(a).
Prof(a). Dr(a). Edilamar Menezes de Oliveira



ANEXO B – Primeira página do artigo científico publicado referente aos resultados parciais obtidos na primeira etapa do projeto.

Hypertension
JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION

American Heart
Association® 
Learn and Live™

Exercise Training Prevents the Microvascular Rarefaction in Hypertension Balancing Angiogenic and Apoptotic Factors Role of MicroRNAs-16, -21, and -126

Tiago Fernandes, Flávio C. Magalhães, Fernanda R. Roque, M. Ian Phillips, Edilamar M. Oliveira

Abstract—Aerobic exercise training (ET) lowers hypertension and improves patient outcomes in cardiovascular disease. The mechanisms of these effects are largely unknown. We hypothesized that ET modulates microRNAs (miRNAs) involved in vascularization. miRNA-16 regulates the expression of vascular endothelial growth factor and antiapoptotic protein Bcl-2. miRNA-21 targets Bcl-2. miRNA-126 functions by repressing regulators of the vascular endothelial growth factor pathway. We investigated whether miRNA-16, -21 and -126 are modulated in hypertension and by ET. Twelve-week-old male spontaneously hypertensive rats (SHRs; $n=14$) and Wistar Kyoto (WKY; $n=14$) rats were assigned to 4 groups: SHRs, trained SHRs (SHR-T), Wistar Kyoto rats, and trained Wistar Kyoto rats. ET consisted of 10 weeks of swimming. ET reduced blood pressure and heart rate in SHR-Ts. ET repaired the slow-to-fast fiber type transition in soleus muscle and the capillary rarefaction in SHR-Ts. Soleus miRNA-16 and -21 levels increased in SHRs paralleled with a decrease of 48% and 25% in vascular endothelial growth factor and Bcl-2 protein levels, respectively. Hypertension increased Bad and decreased Bcl-x and endothelial NO synthase levels and lowered p-Bad_{ser112}:Bad ratio. ET in SHR-Ts reduced miRNA-16 and -21 levels and elevated vascular endothelial growth factor and Bcl-2 levels. ET restored soleus endothelial NO synthase levels plus proapoptotic and antiapoptotic mediators in SHR-Ts, indicating that the balance between angiogenic and apoptotic factors may prevent microvascular abnormalities in hypertension. miRNA-126 levels were reduced in SHRs with an increase of 51% in phosphoinositide-3 kinase regulatory subunit 2 expression but normalized in SHR-Ts. Our data show that ET promoted peripheral revascularization in hypertension, which could be associated with regulation of select miRNAs, suggesting a mechanism for its potential therapeutic application in vascular diseases. (*Hypertension*. 2012;59[part 2]:513-520.) • **Online Data Supplement**

Key Words: exercise training ■ angiogenesis ■ hypertension ■ microRNA ■ VEGF ■ Bcl-2

Aerobic exercise training (ET) is an established, nonpharmacological tool for prevention and treatment of hypertension, involving a decrease in the incidence of cardiovascular events.^{1–3} ET improves endothelial function, counteracts microvascular rarefaction, and decreases blood pressure in hypertension.^{1–3} However, the molecular mechanisms underlying these effects by ET in hypertension are poorly understood. Endothelial microRNAs (miRNAs) are potential therapeutic targets for tackling capillary rarefaction and defective angiogenesis in hypertension.⁴ We hypothesized that ET modulates specific angiogenesis-related miRNAs in hypertension.

miRNA profiles of endothelial cells have been reported and several highly expressed miRNAs identified with angiogenic factors as putative mRNA targets (proangiogenic miRNAs: -17 to -92 cluster, -126, 130a, -210, -296, -378, and let-7f; antiangiogenic miRNAs: -15b, -16, -20, -21, -92a, -221, -222, and -328), according to prediction algorithms.^{5–7}

However, the specific targets and functions in endothelial cells related to angiogenesis have only been characterized for a few of these miRNAs. Among the miRNAs involved in the survival, maintenance, and formation of new capillaries, miRNA-16, -21, and -126 play a well-known role in the control of angiogenesis and vascular integrity.^{4–11}

In animals with knockdown of miRNA-126, endothelial cell migration was impaired during vessel growth.^{5,10,11} Molecular level analysis revealed that miRNA-126 repressed sprouty-related protein 1 and phosphoinositide-3 kinase regulatory subunit 2 (PI3KR2, also known as p85- β), which negatively regulates vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling via VEGF receptor (VEGFR) 2, mitogen-activated protein kinase, and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathways.^{5,10,11} Indeed, VEGF and antiapoptotic protein Bcl-2 have been identified by bioinformatic approaches and subsequently validated as targets to miRNA-16 in endothelial cells, showing that mimetics of these miRNAs reduced

ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO

- **FERNANDES TIAGO**; Baraúna V.G; Negrão C.E.; Phillips M.I.; Oliveira E.M. AEROBIC EXERCISE TRAINING PROMOTES PHYSIOLOGICAL CARDIAC REMODELING INVOLVING A SET OF microRNAs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015. *In press*
- Campos JC*, **FERNANDES TIAGO***, Bechara LR, da Paixão NA, Brum PC, de Oliveira EM, Ferreira JC. INCREASED CLEARANCE OF REACTIVE ALDEHYDES AND DAMAGED PROTEINS IN HYPERTENSION-INDUCED COMPENSATED CARDIAC HYPERTROPHY: IMPACT OF EXERCISE TRAINING. *Oxid Med Cell Longev*. 2015: 464195, 2015. * equal contribution.
- Antunes-Correa LM, Nobre TS, Groehs RV, Alves MJ, **FERNANDES TIAGO**, Couto GK, Rondon MU, Oliveira P, Lima M, Mathias W, Brum PC, Mady C, Almeida DR, Rossoni LV, Oliveira EM, Middlekauff HR, Negrão CE. MOLECULAR BASIS FOR THE IMPROVEMENT IN MUSCLE METABOREFLEX AND MECHANOREFLEX CONTROL IN EXERCISE-TRAINED HUMANS WITH CHRONIC HEART FAILURE. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 307 (11): H1655-66, 2014.
- Neves VJ, **FERNANDES TIAGO**, Roque FR, Soci UP, Melo SF, de Oliveira EM. EXERCISE TRAINING IN HYPERTENSION: ROLE OF microRNAs. *World J Cardiol*. 6 (8): 713-27, 2014.
- Gomes-Santos IL, **FERNANDES TIAGO**, Couto GK, Ferreira-Filho JC, Salemi VM, Fernandes FB, Casarini DE, Brum PC, Rossoni LV, de Oliveira EM, Negrão CE. EFFECTS OF EXERCISE TRAINING ON CIRCULATING AND SKELETAL MUSCLE RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM IN CHRONIC HEART FAILURE RATS. *PLoS One*. 9 (5): e98012, 2014.

- Melo SF, **FERNANDES TIAGO**, Baraúna VG, Matos KC, Santos AA, Tucci PJ, Oliveira EM. EXPRESSION OF microRNA-29 AND COLLAGEN IN CARDIAC MUSCLE AFTER SWIMMING TRAINING IN MYOCARDIAL-INFARCTED RATS. *Cell Physiol Biochem*. 33 (3): 657-69, 2014.
- Oliveira-Junior SA, Martinez PF, Guizoni DM, Campos DH, **FERNANDES TIAGO**, Oliveira EM, Okoshi MP, Okoshi K, Padovani CR, Cicogna AC. AT1 RECEPTOR BLOCKADE ATTENUATES INSULIN RESISTANCE AND MYOCARDIAL REMODELING IN RATS WITH DIET-INDUCED OBESITY. *PLoS One*. 9 (1): e86447, 2014.
- Roque FR, Briones AM, García-Redondo AB, Martínez-Revelles S, Avendaño MS, Cachofeiro V, **FERNANDES TIAGO**, Vassallo DV, Oliveira EM, Salaices M. AEROBIC EXERCISE REDUCES OXIDATIVE STRESS AND IMPROVES VASCULAR CHANGES OF SMALL MESENTERIC AND CORONARY ARTERIES IN HYPERTENSION. *Br J Pharmacol*. 168: 686-703, 2013.
- Alves CR, Alves GB, Pereira AC, Trombetta IC, Dias RG, Mota GF, **FERNANDES TIAGO**, Krieger JE, Negrão CE, Oliveira EM. VASCULAR REACTIVITY AND ACE ACTIVITY RESPONSE TO EXERCISE TRAINING ARE MODULATED BY THE +9/-9 BRADYKININ B2 RECEPTOR GENE FUNCTIONAL POLYMORPHISM. *Physiol Genomics*. 45: 487-92, 2013.
- **FERNANDES TIAGO**, Hashimoto NY, Schettert IT, Nakamuta JS, Krieger JE, Oliveira EM. O GRAU DE MELHORA NA FUNÇÃO DAS CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIAIS DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA É DEPENDENTE DO VOLUME DE TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO. *Rev Bras Med Esporte*, 19 (4): 260-266, 2013.
- das Neves VJ, Tanno AP, Cunha TS, **FERNANDES TIAGO**, Guzzoni V, da Silva CA, de Oliveira EM, Moura MJ, Marcondes FK. EFFECTS OF NANDROLONE AND RESISTANCE TRAINING ON THE BLOOD PRESSURE,

CARDIAC ELECTROPHYSIOLOGY, AND EXPRESSION OF ATRIAL B-ADRENERGIC RECEPTORS. *Life Sci.* 30: 1029-35, 2013.

- Barretti DL, Magalhães FC, **FERNANDES TIAGO**, do Carmo EC, Rosa KT, Irigoyen MC, Negrão CE, Oliveira EM. EFFECTS OF AEROBIC EXERCISE TRAINING ON CARDIAC RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM IN AN OBESE ZUCKER RAT STRAIN. *Plos One*, 7: e46114, 2012.
- **FERNANDES TIAGO**, Magalhães FC, Roque FR, Phillips MI, Oliveira EM. EXERCISE TRAINING PREVENTS THE MICROVASCULAR RAREFACTION IN HYPERTENSION BALANCING ANGIOGENIC AND APOPTOTIC FACTORS: ROLE OF microRNAs-16, -21, AND -126. *Hypertension*. 59: 513-20, 2012.
- Carmo EC; **FERNANDES TIAGO**; Oliveira EM. ESTERÓIDES ANABOLIZANTES: DO ATLETA AO CARDIOPATA. *Revista da Educação Física* (UEM. Impresso) 23: 307-318, 2012. *Revisão*
- Malfitano C, De Angelis K, **FERNANDES TIAGO**, Wichi RB, Rosa K, Pazzine M, Mostarda C, Ronchi FA, Oliveira EM, Casarini DE, Irigoyen MC. LOW-DOSE ENALAPRIL REDUCES ANGIOTENSIN II AND ATTENUATES DIABETIC-INDUCED CARDIAC AND AUTONOMIC DYSFUNCTIONS. *J Cardiovasc Pharmacol*. 59: 58-65, 2012.
- **FERNANDES TIAGO**, Nakamuta JS, Magalhães FC, Roque FR, Lavini-Ramos C, Schettert IT, Coelho V, Krieger JE, Oliveira EM. EXERCISE TRAINING RESTORES THE ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS NUMBER AND FUNCTION IN HYPERTENSION: IMPLICATIONS FOR ANGIOGENESIS. *J Hypertens*. 30: 2133-43, 2012.
- DA Silva ND Jr, **FERNANDES TIAGO**, Soci UP, Monteiro AW, Phillips MI, DE Oliveira EM. SWIMMING TRAINING IN RATS INCREASES CARDIAC microRNA-126 EXPRESSION AND ANGIOGENESIS. *Med Sci Sports Exerc*. 44: 1453-62, 2012.

- **FERNANDES TIAGO**, Roque FR, Magalhães FC, Do Carmo EC, Oliveira EM. O TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO CORRIGE A RAREFAÇÃO CAPILAR E AS ALTERAÇÕES NAS PROPORÇÕES DOS TIPOS DE FIBRA MUSCULAR ESQUELÉTICA EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS. *Rev Bras Med Esporte*, 18: 267-272, 2012.
- Do Carmo EC, **FERNANDES TIAGO**, Koike D, Da Silva ND Jr, Mattos KC, Rosa KT, Barretti D, Melo SF, Wichí RB, Irigoyen MC, de Oliveira EM. ANABOLIC STEROID ASSOCIATED TO PHYSICAL TRAINING INDUCES DELETERIOUS CARDIAC EFFECTS. *Med Sci Sports Exerc*. 43: 1836-48, 2011.
- Hashimoto NY, **FERNANDES TIAGO**, Soci UP, Oliveira EM. DETERMINANTES MOLECULARES DA HIPERTROFIA CARDÍACA INDUZIDA POR DIFERENTES VOLUMES DE TREINAMENTO AERÓBIO. *Revista Brasileira de Cardiologia*; 24:153-162, 2011.
- Tanno AP, das Neves VJ, Rosa KT, Cunha TS, Giordano FC, Calil CM, Guzzoni V, **FERNANDES TIAGO**, de Oliveira EM, Novaes PD, Irigoyen MC, Moura MJ, Marcondes FK. NANDROLONE AND RESISTANCE TRAINING INDUCE HEART REMODELING: ROLE OF FETAL GENES AND IMPLICATIONS FOR CARDIAC PATHOPHYSIOLOGY. *Life Sci*. 89: 631-7, 2011.
- **FERNANDES TIAGO**, Soci UP, Oliveira EM. ECCENTRIC AND CONCENTRIC CARDIAC HYPERTROPHY INDUCED BY EXERCISE TRAINING: microRNAs AND MOLECULAR DETERMINANTS. *Braz J Med Biol Res*. 44: 836-47, 2011. *Review*
- Melo SFS; Amadeu, MA; Magalhaes, FC; **FERNANDES TIAGO**; do Carmo, EC; Barretti, D; Brum PC; Oliveira EM. EXERCÍCIO DE FORÇA ATIVA A VIA AKT/mTOR PELO RECEPTOR DE ANGIOTENSINA II TIPO I NO MÚSCULO

CARDÍACO DE RATOS. *Revista Brasileira de Educação Física e Esporte*. 25: 377-385, 2011.

- Soci UP, **FERNANDES TIAGO**, Hashimoto NY, Mota GF, Amadeu MA, Rosa KT, Irigoyen MC, Phillips MI, Oliveira EM. MicroRNAs-29 ARE INVOLVED IN THE IMPROVEMENT OF VENTRICULAR COMPLIANCE PROMOTED BY AEROBIC EXERCISE TRAINING IN RATS. *Physiol Genomics*. 43: 665-73, 2011.
- **FERNANDES TIAGO**, Hashimoto NY, Magalhães FC, Fernandes FB, Casarini DE, Carmona AK, Krieger JE, Phillips MI, Oliveira EM. AEROBIC EXERCISE TRAINING-INDUCED LEFT VENTRICULAR HYPERTROPHY INVOLVES REGULATORY microRNAs, DECREASED ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME-ANGIOTENSIN II, AND SYNERGISTIC REGULATION OF ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME 2-ANGIOTENSIN (1-7). *Hypertension*. 58: 182-9, 2011.
- Carmo, EC, **FERNANDES TIAGO**, Bueno, CR Jr, Barreti, D, Silva Jr ND, Melo SFS Redondo, FRR, Uchida, MC, Brum, PC, Oliveira, EM. O PAPEL DO ESTERÓIDE ANABOLIZANTE SOBRE A HIPERTROFIA E FORÇA MUSCULAR EM TREINAMENTOS DE RESISTÊNCIA AERÓBIA E DE FORÇA. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 17: 212-217, 2011.
- Carmo, EC, Kaleizo, R; Koike, D; **FERNANDES TIAGO**, Silva Jr ND, Mattos, KC; Wichi, R; Irigoyen, MC, Oliveira, EM. A ASSOCIAÇÃO DE ESTERÓIDE ANABOLIZANTE AO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO LEVA A ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CARDÍACAS E PERDA DE FUNÇÃO VENTRICULAR EM RATOS. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 17: 137-141, 2011.

CAPÍTULOS DE LIVROS PUBLICADOS

- Roque FR, **FERNANDES TIAGO**; das Neves VJ, Oliveira EM. BENEFICIAL EFFECTS OF AEROBIC EXERCISE TRAINING ON CARDIAC, VASCULAR AND SKELETAL MUSCLE TISSUES IN HYPERTENSION: RECENT EVIDENCES. In: Janette A. Simmons and Austin C. Brown. (Org.). *Aerobic Exercise: Health Benefits, Types and Common Misconceptions*. 1ed. NY: Nova Science Publishers p.1-32, 2013.
- **FERNANDES TIAGO**; P.R., Ursula; F.S., Stephano; R., Cleber; MO, Edilamar. SIGNALING PATHWAYS THAT MEDIATE SKELETAL MUSCLE HYPERTROPHY: EFFECTS OF EXERCISE TRAINING. In: Julianna Cseri. (Org.). *Skeletal Muscle - From Myogenesis to Clinical Relations*. 1ed.: InTech, p.191-218, 2012.
- Barauna, VG; **FERNANDES TIAGO**; Oliveira, E.M. CARDIAC RENIN ANGIOTENSIN SYSTEM AND EXERCISE TRAINING. In: Sôta Harada and Itsuki Moi. (Org.). *Angiotensin: new research*. 1ed. NY: Nova Science Publishers, p. 59-91, 2011.
- **FERNANDES TIAGO**; Oliveira, EM. FUNDAMENTOS EM CÉLULAS-TRONCO. In: rofs. Drs. Vagner Raso; Júlia Maria D Andrea Greve; Marcos Doederlein Polito. (Org.). *POLLOCK: Fundamentos Práticos em Fisiologia*. 1ed.Barueri, SP: Manole, p. 208-225, 2011.