



**Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa  
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências  
Genômicas e Biotecnologia**

**ANÁLISES METAGENÔMICAS E PROTEÔMICAS DOS EFEITOS  
DO TREINAMENTO AERÓBIO EM MODELOS ANIMAIS:  
UMA VISÃO MOLECULAR INTEGRADA DA OBESIDADE E  
HIPERTENSÃO ARTERIAL**

**Autor: Bernardo Petriz de Assis**

**Orientador: Dr. Octávio Luiz Franco**

**Co-orientador: Dr. André Melro Murad**

**Brasília - DF**

**2014**

BERNARDO PETRIZ DE ASSIS

**ANÁLISES METAGENÔMICAS E PROTEÔMICAS DOS EFEITOS DO  
TREINAMENTO AERÓBIO EM MODELOS ANIMAIS:  
UMA VISÃO MOLECULAR INTEGRADA DA OBESIDADE E HIPERTENSÃO  
ARTERIAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, como pré-requisito para obtenção do Título de Doutor em Ciências Genômicas e Biotecnologia.

Orientador: Dr. Octávio Luiz Franco

Co-orientador: Dr. André Melro Murad

Brasília  
2014

A848a Assis, Bernardo Petriz de.

Análises metagenômicas e proteômicas dos efeitos do treinamento aeróbio em modelos animais: uma visão molecular integrada da obesidade e hipertensão arterial. / Bernardo Petriz de Assis – 2014.

119 f.; il.: 30 cm

Tese (Doutorado) – Universidade Católica de Brasília, 2014.

Orientação: Prof. Dr. Octávio Luiz Franco

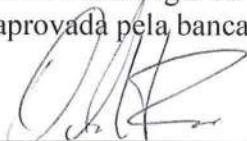
Coorientador: Prof. Dr. André Melro Murad

1. Biotecnologia. 2. Exercício físico. 3. Ventrículo esquerdo. 4. Microbiota fecal. 5. Pirosequenciamento. I. Franco, Octávio Luiz, orient. II. Murad, André Melro, orient. III. Título.

CDU 606

Ficha elaborada pela Biblioteca Pós-Graduação da UCB

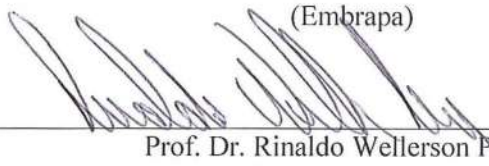
Tese de autoria de Bernardo Petriz de Assis, intitulada “ANÁLISES METAGENÔMICAS E PROTÔMICAS DOS EFEITOS DO TREINAMENTO EM MODELOS ANIMAIS: UMA VISÃO MOLECULAR INTEGRADA DA OBESIDADE E HIPERTENSÃO ARTERIAL”, apresentada como requisito parcial para obtenção de grau de Doutor em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, em 04 de Agosto de 2013, defendida e aprovada pela banca examinadora abaixo assinada:



Prof. Dr. Octávio Luiz Franco  
Orientador

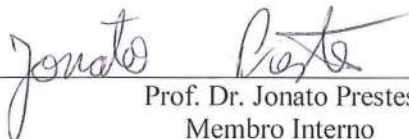
(Programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Genômicas e Biotecnologia- UCB)

Prof. Dr. Andre Melro Murad  
Coorientador  
(Embrapa)



Prof. Dr. Rinaldo Wellerson Pereira  
Membro Interno

(Programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Genômicas e Biotecnologia - UCB)



Prof. Dr. Jonato Prestes  
Membro Interno

(Programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Educação Física – UCB)



Prof. Dr. Thales Rocha  
Membro Externo  
(Embrapa – Cenargen)



Prof.ª Dr.ª Edilamar Menezes de Oliveira  
Membro Externa  
(Universidade de São Paulo- USP)

Prof.ª Dr.ª Taia Maria Berto Rezende  
Suplente

(Programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Genômicas e Biotecnologia – UCB)

Dedico este trabalho ao grande mestre da minha vida, e a todos que através de sua obra, cruzaram a minha vida deixando nada além de bons exemplos, amizade, ensinamentos e memórias inesquecíveis.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e por ter me concedido todas as oportunidades que fazem da minha caminhada uma aventura fantástica. A minha mãe do céu, obrigado por iluminar sempre o meu caminho.

Aos meus pais, André e Sandra, pilares da minha vida, e exemplos de tudo o que eu gostaria de ser como pessoa, profissional e um dia pai de família. Obrigado por todo apoio incondicional, e por terem sempre acreditado em mim, mesmo quando eu mesmo não acreditei. Obrigado também por todos os quilômetros viajados de moto ao lado de vocês, estes momentos são meus preferidos.

Ao meu irmão Daniel e minha cunhada Débora, vocês são uma referência de casal para mim e fazem eu acreditar que posso trilhar o mesmo caminho de vocês. Obrigado pelo carinho! Daniel, você sempre será um exemplo de que a serenidade é sempre o melhor caminho.

A minha namorada Bruna, pelas horas de privação no convívio e pela sua coragem de enfrentar tantos momentos difíceis que fortaleceram e amadureceram o nosso amor. O seu sorriso é sempre fonte de inspiração e conforto pra mim. Que todos nossos sonhos de um futuro juntos se realizem. Te amo.

Aos meus sogros, Eduardo e Márcia, e à minha cunhadinha, Rafaela e cunhado Bartô e aos tios, Wania e Edmilson, Zé e Lilian, obrigado pelo ótimo convívio e todo carinho que sempre me deram.

Aos meus avós, Antônio e Desiree (*in memoriam*), João e Taís, obrigado por terem me dado as melhores memórias que uma criança pode ter. E muito obrigado por terem me dado os melhores pais do mundo.

Aos meus tios, Bruno e Rossana, Monica e Fernando, Rafael (*in memoriam*), Maria Vitória e Maria Luiza, João Luís e Letícia, Cristiana e Rossano, Paulo e Ana Márcia, e aos meus primos, Leonardo e Larissa, Bruna e Diogo, Felipe e Gabriel, Ronaldinho e Ricardo, Rodrigo e Frederico. Obrigado pelo amor de vocês! Juntos vocês fazem parte das minhas melhores memórias.

Aos amigos, Ped, Rodrigão e Janara, Boni, Iuri e Juliana, Markito, Bigode, Fain, Fred, Bukinha, Tusta e Fernanda, Danis, Biel e Larissa, Cenora, Vava, Pet, Babusis, Marquinhos, Camila e João, Xandy e Lis, Vitinho e Neiliane, Tonhão, Caio, Bixilin, Zé, Luiz Felipe e Roberto. Obrigado por nunca terem se interessado pela minha vida acadêmica e desta forma terem permitido que eu vivesse momentos especiais longe da ciência.

À minha família de Oxford, Marbella e Marcelo, Igor e Ângela, Rafael e Paula, Marihon Elis e Thomas. Obrigado por terem sido minha segunda família e por terem dividido comigo uma das experiências de vida mais fantásticas que já tive. Sem vocês, a Inglaterra teria sido ainda mais cinza.

A todos da família CABP, pelos 10 anos de convívio e aprendizado. À Luciana Ramalho que me ensinou a fazer meu primeiro SDS-PAGE e com isso me apaixonei pela proteômica e ao Rocha pela minha iniciação científica. Aos pesquisadores e amigos, Amanda, Mariana, Ângela, Mirna, Simone, Suzana, Michele, Aline, Betty, Larissa, Laureane, Daniel, Junior, Flavia, Aninha, Stella Willian, João Paulo, Getúlio, Ludovico, Patrícia, Tania Mara, Ângela, Gabriela, Rinaldo, Thales, Taia, Simoni, Gabriel e Alinne. Não consigo imaginar estes últimos 10 anos sem vocês.

Aos amigos de profissão do INEI, da UCB e do UDF: André, Marcelo, Ricardo, Alcione, Eudes, Rafael Sotero, Rafilks, Marcelão, Hugo, Carlos Ernesto, Pedro ‘The bomb’, Dr. Befort, Prof. Luís Octávio, Marcão, Amanda, Jeese e Pamella, Clarissa, Rodrigo Celes, Juliana, Denis, Rafael, Manuela, Gabriel, Mirna, Suderlan e Flavio. Obrigado pela amizade, pelos ensinamentos, excelente convívio e exemplos de profissionalismo que são. Vocês possibilitaram e formam até hoje a minha trajetória profissional.

AO Centro Universitário UDF por ter apostado em mim e por me oportunizar a estar diariamente no lugar que mais gosto de estar, a sala de aula. Aos meus alunos, por constantemente me inspirarem. Vocês são fonte diária de aprendizado em minha vida.

Aos amigos, sócios e mais nobres parceiros científicos, Clarissa Gomes e Jeesser Almeida. Qualquer mérito que esta tese venha a ter, eu dedico ela a vocês. Fazer ciência com vocês é um dos meus maiores prazeres na vida. Que nossa parceria seja tão grande quanto a nossa amizade. Obrigado de coração.

Ao Andre Murad, meu co-orientador, obrigado por toda a dedicação e paciência e por ter sempre me recebido muito bem na Embrapa. O sucesso desta tese passa obrigatoriamente por você.

To my friendly advisor at SGC-Oxford, Dr. Opher Gileadi. Thank you for all your patience, for the inestimable knowledge and scientific talks while having some tea. It was an honor for me to learn from you. Working at SGC have already changed my personal and academic life. I also would like to thank Rod for all the great time at the mass spectrometry lab and Lee for the opportunity to go to Oxford.

Por fim, gostaria de dedicar meus últimos 10 anos de vida acadêmica ao meu AMIGO e ORIENTADOR, Octávio. Fazer ciência ao estilo “Octávio” é, antes de mais nada, amar o que faz. Não amar a ciência em si, mas amar as transformações sociais e principalmente pessoais que ela gera. Não são artigos, tubos de ensaios ou projetos milionários e sim pessoas e sua formação. Fazer ciência ao estilo “Octávio” é perguntar ao aprendiz se ele está feliz antes de qualquer coisa. Meu amigo, você me ensinou a melhor das ciências e por 10 anos tenho sido a pessoa mais feliz e realizada profissionalmente. Que nossa parceria e amizade simplesmente não tenham fim.

Ao Rock ‘n’ Roll, por quebrar o silêncio, incompatível comigo.

“You can't always get what you want  
But if you try sometimes,  
You just might find you get what you need!”

(The Rolling Stones, 1969)



## Resumo

A hipertensão e a obesidade são patologias de origem multifatorial, com elevada correlação patogênica. Na hipertensão, a hipertrofia cardíaca patológica ocorre em resposta à sobrecarga hemodinâmica no coração, podendo evoluir para a insuficiência cardíaca. Além disso, a obesidade tem sido associada à composição da microbiota intestinal, com influência sobre o metabolismo do hospedeiro. Por outro lado, o exercício físico tem sido amplamente utilizado como agente não farmacológico na prevenção e tratamento da obesidade e hipertensão. Todavia, pouco se sabe a respeito do efeito do exercício na composição da microbiota intestinal em fenótipos patológicos e dos mecanismos moleculares responsáveis pela regressão da hipertrofia cardíaca patológica. Desta forma, por meio do pirosequenciamento do gene 16S RNAr e de técnicas proteômicas (nanoUPLC-MS<sup>E</sup>), o presente estudo analisou o efeito do treinamento aeróbio no transcriptoma fecal e no proteoma do ventrículo esquerdo de modelo animal obeso (Zucker<sup>fa/fa</sup>), não-obeso (Wistar) e espontaneamente hipertenso (SHR). O treinamento foi capaz de alterar a composição da microbiota intestinal em todas as linhagens animais. Os gêneros, *Allobaculum* (SHR,  $p=4.06e-3$ ) e *Lactobacillus* (OZR,  $p=0.040$ ) apresentaram-se mais abundantes pós-treinamento, enquanto *Streptococcus* (WR,  $p=4.55e-3$ ), *Aggregatibacter* (SHR,  $p=0.036$ ) e *Sutturella* (SHR,  $p=0.048$ ) apresentaram uma menor abundância. Também foi identificada uma correlação significativa entre unidades de operação taxonômica pertencente às famílias Clostridiceae e Bacteroidaceae ( $P<0.01$ ) e os gêneros, *Oscillospira* e *Ruminococcus* ( $P<0.01$ ) com o acúmulo de lactato sanguíneo coletado pré e pós-treino. Por sua vez, as análises por nanoUPLC/MS<sup>E</sup> identificaram um total de 250 proteínas no ventrículo esquerdo de ratos SHR, sendo 16 proteínas exclusivas ao grupo não treinado (SHR-C). O treinamento em baixa intensidade (SHR-B) alterou a abundância de 36 proteínas em comparação a 44 alteradas pelo treinamento em alta intensidade (SHR-A). O aumento de proteínas antioxidantes (peroxiredozina-6), de contração (cadeia leve da miosina-4), metabólicas ( $\gamma$ -enolase) e variantes de histona indica o efeito cardioprotetor do exercício em fenótipo hipertenso. Estes dados reforçam o papel do exercício físico como agente modulador da microbiota intestinal e cardioprotetor sugerindo novas possibilidades terapêuticas na prevenção e no tratamento da obesidade e da hipertensão arterial.

**Palavras-chave:** Exercício físico, Ventrículo esquerdo, Microbiota fecal, NanoUPLC-MS<sup>E</sup>, Pirosequenciamento

## Abstract

Hypertension and obesity are diseases with multifactor pathogenesis, being both highly correlated pathologically. Cardiac pathological hypertrophy is a common physiological response to chronic hemodynamic overload in hypertensive phenotype, which could lead to heart failure. Moreover, obesity pathogenesis has been recently associated with the composition of gut microbiota, affecting the host metabolism. In the other way, physical activity is a non-pharmacological agent widely used in the prevention and treatment of obesity and hypertension. However, the effects of exercise on gut microbiota of pathologic phenotype are poorly understood as well as the molecular mechanisms behind the regression of pathological cardiac hypertrophy. In this matter, the pyrosequencing of the 16S rRNA gene and proteomic techniques (nanoUPLC-MS<sup>E</sup>) were used to assess the effect of aerobic exercise training over faecal metagenome and left ventricle proteome of obese (Zucker<sup>fa/fa</sup>), non-obese (Wistar) and spontaneously hypertensive (SHR) animal models. Exercise training altered bacteria gut composition in all animal models. The *Allobaculum* (SHR, p=4.06e-3), and *Lactobacillus* (OZR, p=0.040) genus, were enriched after exercise, while *Streptococcus* (WR, p=4.55e-3), *Aggregatibacter* (SHR, p=0.036) and *Sutturella* (SHR, p=0.048) were less enhanced before training. A significant correlation was observed in UTOs from Clostridiceae (P<0.01) and Bacteroidaceae (P<0.01) families and *Oscillospira* (P<0.01) and *Ruminococcus* (P<0.01) genera with blood lactate accumulation. Proteomic analysis revealed 250 proteins in SHR's left ventricle, being 16 proteins where exclusive to untrained rats group (SHR-C). Low intensity training (SHR-B) altered the abundance of 36 proteins, while 44 were altered by high intensity training (SHR-A). The up-regulation of antioxidant (peroxiredoxin-6), contractile (myosin light chain-4), metabolic ( $\gamma$ -enolase) and histone variants indicates the cardioprotective effects of exercise in hypertensive phenotype. These data enforce the positive effect of exercise in the modulation of gut microbiota and cardioprotection, suggesting the possibilities of therapeutic strategies in the treatment of obesity and systemic hypertension.

**Keywords:** Physical exercise, Left ventricle, Fecal microbiota, NanoUPLC/MS<sup>E</sup>, Pyrosequencing

## Lista de ilustrações

**Figura 1:** Caracterização da hipertrofia cardíaca patológica concêntrica e fisiológica excêntrica.

**Figura 2:** Representação geral das ferramentas de análise proteômica na investigação do proteoma cardíaco

**Figura 3:** Representação das estruturas que compõem o lúmen intestinal

**Figura 4:** Mecanismos de regulação da microbiota intestinal e da obesidade. Inúmeros fatores modulam a microbiota intestinal.

**Figura 5:** Mecanismos de regulação do exercício com a microbiota intestinal e o sistema imunológico da mucosa intestinal.

**Figura 6:** Desenho experimental para o pirosequenciamento do de gene 16S RNAr.

**Figura 7:** Velocidade de treinamento pré e pós-treino (A) e concentração de lactato sanguíneo pré e pós-treino (B).

**Figura 8:** Alfa diversidade e curva de rarefação.

**Figura 9:** Histograma da composição da população microbiota fecal

**Figura 10:** Efeito do exercício sobre a abundância relativa do gênero bacteriano.

**Figura 11:** Perfil das espécies com abundância diferencial entre as três linhagens de ratos.

**Figura 12:** Efeito do treinamento sobre a comunidade bacteriana.

**Figura 13:** Correlação da abundância relativa das comunidades microbianas e concentração de lactato sanguíneo ( $\text{mmol.L}^{-1}$ ).

**Figura 14:** Desenho experimental do efeito do treinamento em baixa e alta intensidade no proteoma do ventrículo esquerdo de modelo animal hipertenso (SHR).

**Figura 15:** Teste incremental de velocidade máxima (TI):

**Figura 16.** Classificação das proteínas identificadas quanto à localização celular (A), função biológica (B) e função molecular (C).

**Figura 17:** Diagrama de Venn

**Figura 18:** Histogramas representativos das alterações na abundância das proteínas em resposta ao exercício

**Figura 19:** Representação do cardiomiócito com as principais proteínas identificadas em resposta ao treinamento em baixa e alta intensidade.

## Lista de tabelas

**Tabela 1:** Frequência das comunidades bacterianas pré e pós-treinamento.

**Tabela 2:** Caracterização da amostra de animais espontaneamente hipertensos (SHR).

**Tabela 3:** Proteínas identificadas na comparação do efeito do treinamento em baixa intensidade no proteoma do ventrículo esquerdo.

**Tabela 4:** Proteínas identificadas na comparação do efeito do treinamento em alta intensidade no proteoma do ventrículo esquerdo.

## Lista de anexos

**Anexo A** – Lista de publicações realizadas ao longo do Doutorado entre Março de 2011 a Setembro de 2015.

**Anexo B** – Artigos submetidos para publicação em periódicos internacionais.

**Anexo C** - Plano de trabalho desenvolvido no estágio doutoral no laboratório *Structural Genomics Consortium* na Universidade de Oxford – Reino Unido no período de 2012-2013.

**Anexo D** – Artigo da presente tese publicado no periódico *BMC Genomics*

## Lista de abreviações

- % Porcentagem  
 2-DE Eletroforese bidimensional (*Two-dimensional electrophoresis*)  
 ADH Álcool desidrogenase  
 AGCC Ácidos graxos de cadeia curta  
 CLS Concentração de lactato sanguíneo  
 cm Centímetros  
 CVD Câmara ventricular direita  
 CVE Câmara ventricular esquerda  
 DGGE Gel de eletroforese com desnaturação em gradiente (*Denaturing Gel Electrophoresis*)  
 DIGE Eletroforese bidimensional diferencial (*Differential Electrophoresis*)  
 DNA Ácido desoxirribonucléico  
 dNTP Desoxirribonucleotídeo trifosfato (*Deoxyribonucleotide*)  
 DTT Ditiotreitól (*Dithiothreitol*)  
 EDTA Ácido etilenodiaminotetracético  
 fmol Fentomol  
 g Gramas  
 GFP Glu-fibrino peptídeo  
 h Horas  
 LL Limiar de lactato  
 m Metro  
 M Molar  
 m.min<sup>-1</sup> Metros por minuto  
 mA Mili ampere  
 MFEL Máxima fase estável de lactato  
 mg.kg<sup>-1</sup> Miligramas por quilograma  
 Micro CT Micro tomografia  
 min Minutos  
 mL Mililitros  
 mM Milimolar  
 mm.Hg<sup>-1</sup> Milímetros de mercúrio  
 NCBI Centro nacional de informações em biotecnologia (*National center of biotechnology information*)  
 NGS Sequenciamento de próxima geração (*Next generation sequencing*)  
 nm Nanômetros  
 °C Graus Celsius  
 OMS Organização Mundial da Saúde  
 PAD Pressão Arterial Diastólica  
 PAS Pressão Arterial Sistólica  
 pb Par(es) de base  
 PCoA Análises de coordenadas principais (*Principal coordinates analysis*)  
 PCR Reação de Polimerase em Cadeia (*Polymerase chain reaction*)  
 PCR-TGGE Reação de Polimerase em Cadeia – Gel de eletroforese com Gradiente de Temperatura (*Polymerase Reaction Chain – Temperature Gradient Gel Electrophoresis*)  
 PMFS (*Phenylmethylsulfonyl fluoride*)  
 PTM Modificação pós-traducional (*Post translational modification*)  
 RNAr RNA ribossomal  
 SHR Rato espontaneamente hipertenso (*Spontaneously hypertensive rat*)  
 SHR-A Rato hipertenso treinado em alta intensidade

SHR-B Rato hipertenso treinado em baixa intensidade  
SHR-C Rato hipertenso não treinado (grupo controle)  
TI Teste incremental máximo  
TOF Tempo de voo (*Time off flight*)  
UTO Unidade taxonômica operacional (*Operational taxonomic unit*)  
V Volts  
VE Ventrículo esquerdo  
VO<sub>2max</sub> Consumo máximo de oxigênio  
W Watts  
ZO Rato obeso Zucker<sup>fa/fa</sup>  
µg Microgramas  
µL Microlitros  
µm Micrômetro

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
2.1 OBESIDADE E HIPERTENSÃO ARTERIAL.....	4
2.2 MODULAÇÕES CARDÍACAS EM RESPOSTA A HIPERTENSÃO ARTERIAL.....	5
2.3 EXERCÍCIO FÍSICO.....	8
2.4 PROTEÔMICA, INVESTIGAÇÃO MOLECULAR E EXERCÍCIO FÍSICO .....	9
2.5 A MICROBIOTA INTESTINAL .....	13
2.6 O EXERCÍCIO FÍSICO NA MANIPULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL .....	17
3. HIPÓTESE .....	20
4. OBJETIVOS .....	21
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
EFEITOS DO EXERCÍCIO MODERADO SOBRE A MICROBIOTA INTESTINAL DE MODELO ANIMAL PATOLÓGICO.....	22
Volume 1 .....	22
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
5.1 ANIMAIS E MANEJO .....	23
5.2 ADAPTAÇÃO E TREINAMENTO.....	23
5.3 ANÁLISE DE LACTATO SANGUÍNEO .....	24
5.4 COLETAS E EXTRAÇÃO DO DNA FECAL .....	25
5.5 PIROSEQUENCIAMENTO DO GENE 16S RNAr COM <i>BARCODE</i> .....	26
5.6 ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS DO GENE 16S RNAr .....	26
5.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	27
5.8 NÚMERO DE ACESSO DAS SEQUÊNCIAS.....	27
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
6.1 EFEITOS DO EXERCÍCIO SOBRE A CAPACIDADE AERÓBIA.....	29
6.2 COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA FECAL .....	30
6.3 COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA PRÉ E PÓS- TREINAMENTO .....	34
6.4 ANÁLISES POR COORDENADAS PRINCIPAIS (PCOA) .....	40



6.5 CORRELAÇÃO DA ABUNDÂNCIA DE BACTÉRIAS E CONCENTRAÇÃO DE LACTATO.....	42
7.CONCLUSÃO.....	46
EFEITO DO TREINAMENTO AERÓBIO EM BAIXA E ALTA INTENSIDADES SOBRE O PROTEOMA CARDÍACO DE MODELO ANIMAL HIPERTENSO.....	47
Volume 2.....	47
8.MATERIAL E MÉTODOS.....	48
8.1 ANIMAIS E ADAPTAÇÃO AO TREINAMENTO.....	48
8.2 TREINAMENTO E TESTE INCREMENTAL.....	48
8.3 AFERIÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA.....	49
8.4 EXTRAÇÃO TECIDUAL.....	51
8.5 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO PROTEICA.....	51
8.6 DIGESTÃO DE PROTEÍNA PARA AQUISIÇÃO NANOUPLC-MS <sup>E</sup> .....	52
8.7 AQUISIÇÃO EM NANOUPLC-MS <sup>E</sup> .....	53
8.8 PROCESSAMENTO DE DADOS E IDENTIFICAÇÃO PROTEICA.....	54
8.9 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	55
9.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
9.1 EFEITOS DO TREINAMENTO AERÓBIO SOBRE MODELO ANIMAL HIPERTENSO.....	57
9.2 ANOTAÇÕES FUNCIONAIS.....	60
9.3 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS EXCLUSIVAS.....	64
9.4 EFEITOS DO TREINAMENTO EM DIFERENTES INTENSIDADES SOBRE O PROTEOMA CARDÍACO.....	65
9.5 EFEITOS DO TREINAMENTO NAS PROTEÍNAS CONTRÁTEIS E DE ORGANIZAÇÃO CELULAR.....	72
9.6 EFEITOS DO TREINAMENTO SOBRE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS EM PROCESSOS METABÓLICOS.....	73
9.7 EFEITOS DO TREINAMENTO SOBRE PROTEÍNAS ESTRUTURAS DO NUCLEOSSOMO E FATORES DE TRANSCRIÇÃO.....	75
9.8 EFEITOS DO TREINAMENTO SOBRE PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS E ANTI-OXIDATIVAS.....	76
10.CONCLUSÃO.....	79
11.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
ANEXO A.....	92
ANEXO B.....	94

ANEXO C .....	95
ANEXO D .....	101

## 1. INTRODUÇÃO

A hipertensão e a obesidade consistem em duas doenças de origem multifatorial que apesar de apresentarem patogêneses distintas, apresentam uma íntima relação no seu desenvolvimento patofisiológico (1). Sabe-se que a obesidade é um fator independente para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, entre elas a hipertensão (2). Deste modo, milhões de pessoas no mundo inteiro são acometidas por ambas as patologias, gerando um elevado gasto com saúde pública, além dos altos índices de óbito (3, 4).

Entre os inúmeros fatores deletérios à saúde em resposta à obesidade e à hipertensão, o aparato cardiovascular apresenta-se como um dos sistemas fisiológicos mais afetados. O aumento na resistência periférica e a sobrecarga pressórica induzem o processo de adaptação patológica crônica, resultando na hipertrofia cardíaca concêntrica. A hipertrofia no ventrículo esquerdo e a redução no volume da cavidade ventricular são as respostas morfológicas mais significativas. Este processo é acompanhado pela alteração do metabolismo energético, modificação no padrão de expressão de genes e síntese de proteínas contráteis e carreadoras de íons, disfunção no trânsito celular de cálcio e aumento na sinalização apoptótica nos cardiomiócitos. Além destes fatores, a redução no aporte sanguíneo em determinadas áreas do miocárdio induz a formação da fibrose intersticial, comprometendo ainda mais a contratilidade do miocárdio. Todos estes fatores induzem o coração a uma menor eficiência funcional com possível progressão para a insuficiência cardíaca congestiva (IC) (5).

Apesar de a obesidade apresentar uma origem multifatorial relativamente conhecida, recentemente foi demonstrado que sua patogênese também pode estar associada à composição da microbiota intestinal (6). A microbiota é a coleção de microrganismos transitórios e permanentes de um determinado ecossistema. Estes microrganismos revestem o lúmen intestinal, desempenhando ampla função fisiológica como a maturação e o desenvolvimento do sistema imunológico, a proteção contra agentes patogênicos e o auxílio na decomposição de matéria orgânica (7, 8). Devido a sua intrínseca interação com o sistema gastrointestinal e a sua influência no metabolismo do hospedeiro, a microbiota intestinal pode ser considerada como um “órgão metabólico” (9). Atualmente, sabe-se que indivíduos

obesos apresentam uma composição microbiana distinta da dos indivíduos magros (10). Neste contexto, foi observado que a microbiota associada à obesidade apresenta maior habilidade no processo de extração energética do meio e de estocagem de gordura, influenciando significativamente no metabolismo do hospedeiro.

Pode-se dizer que o sedentarismo é um dos maiores contribuintes para o desenvolvimento de doenças metabólicas e cardiovasculares (11). Em contrapartida, o exercício físico é um agente não farmacológico, amplamente utilizado na prevenção e atenuação destas patologias, bem como de outras (12). A prática de atividade física está associada à diminuição do peso corporal, controle metabólico, regulação da disfunção endotelial e atenuação da pressão arterial elevada (13), sendo indicada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como um dos principais agentes no tratamento clínico da obesidade e da hipertensão arterial sistêmica (14).

Estudos envolvendo técnicas de investigação molecular (ex. proteômica e transcriptômica) demonstram que, apesar da hipertrofia cardíaca patológica e fisiológica apresentarem inicialmente algumas manifestações morfológicas semelhantes, a sua indução e progressão são norteadas por mecanismos moleculares distintos (15). As modificações moleculares observadas na hipertrofia fisiológica em resposta ao exercício estão associadas ao aprimoramento cardiovascular e da capacidade aeróbia. Estas modificações são capazes de atenuar a hipertrofia patológica e reestruturar sua função miocárdica (16-28). Recentemente, alguns estudos também verificaram o efeito do exercício na modulação da composição da microbiota intestinal em modelo animal (29, 30) e em humanos atletas (31). Estes estudos apontam para uma redução de filos bacterianos associados à obesidade, o que pode indicar a alteração da microbiota via exercício físico como um possível novo tratamento da obesidade.

Acredita-se que alterações metabólicas induzidas pelo exercício, incluindo o aumento de fluxo sanguíneo no trato gastrointestinal e a redução no tempo de transição fecal são fatores que podem modificar a abundância e a diversidade da microbiota intestinal nos diferentes modelos animais. Em relação ao modelo animal hipertenso, acredita-se que a redução na pressão arterial em resposta ao treinamento reduzirá a sobrecarga pressórica no coração, levando a adaptações no seu proteoma, principalmente na resposta das proteínas de função metabólica e

contrátil e nos fatores de transcrição. Estas modificações podem caracterizar sinalizações moleculares específicas da regressão da hipertrofia cardíaca patológica (concêntrica) e transição para a hipertrofia fisiológica (excêntrica). Com base nestas hipóteses, por meio de técnicas proteômicas e de pirosequenciamento do gene 16S RNAr, o presente trabalho analisou o efeito do treinamento aeróbio sobre o metagenoma fecal e o proteoma do ventrículo esquerdo de modelo animal obeso, não obeso e hipertenso.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 OBESIDADE E HIPERTENSÃO ARTERIAL

A obesidade é uma doença de etiologia multifatorial (32) com ampla associação a inúmeras patologias como as doenças cardiovasculares, em especial a hipertensão arterial sistêmica (1). Apesar de ambas as patologias estarem relacionadas (33), a obesidade tem sido apontada como um fator independente no desenvolvimento de doenças cardiovasculares (2). Deste modo, os mecanismos deletérios da obesidade no organismo têm sido amplamente investigados, especialmente no aparelho cardiovascular, devido ao seu elevado grau de comprometimento (34). Esta relação recebe grande atenção da comunidade científica, uma vez que ambas as patologias afetam milhares de pessoas no mundo todo gerando gastos crescentes com saúde pública além do elevado índice de mortalidade (3, 4, 14). Relata-se que aproximadamente 150 milhões de americanos apresentam índice de massa corporal correspondente ao sobrepeso ou à obesidade ( $IMC \geq 30 \text{ kg.m}^2$ ), enquanto 76,4 milhões são hipertensos ( $PAS \geq 140 \text{ mmHg}^{-1}$ /  $PAD \geq 90 \text{ mm.Hg}^{-1}$ ) (35). Segundo o Ministério da Saúde brasileiro, entre as demais patologias associadas à obesidade, as cardiovasculares representam cerca de 30% dos óbitos registrados no Brasil. O último levantamento da Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico (VIGITEL) apontou para o aumento no número de brasileiros acima do peso ideal (50,8%) e com obesidade (17,5%) (36).

Os mecanismos moleculares relacionados ao comprometimento cardiovascular em resposta à obesidade e à hipertensão não estão completamente elucidados. Todavia, sabe-se que estas patologias promovem modulações no metabolismo cardíaco assim como em sua contração, resultando em um aparelho cardíaco menos eficiente. A progressão destas alterações está associada ao desenvolvimento da insuficiência cardíaca (IC) (37, 38). Todavia, apesar de estar amplamente relacionada à hipertensão (39), a obesidade, sozinha, é considerada uma grande contribuinte para o desenvolvimento da IC (40). Este processo ocorre pela sobrecarga hemodinâmica crônica no sistema cardiovascular em resposta a

incrementos na pressão e no volume de enchimento das câmaras cardíacas, gerando um aumento na carga de trabalho do coração (41, 42). A resposta fisiológica compensatória a este processo é a hipertrofia patológica, com a dilatação excessiva da câmara ventricular e o enfraquecimento na força de contração (43).

## 2.2 MODULAÇÕES CARDÍACAS EM RESPOSTA A HIPERTENSÃO ARTERIAL

Dentre os vários fatores de risco existentes para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV), a hipertensão arterial sistêmica (HAS) é a responsável pela maior taxa de mortalidade no mundo, sendo considerada uma epidemia pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (44). Cerca de 95% dos casos de hipertensão são decorrentes de fatores desconhecidos (hipertensão essencial ou primária) (45). Todavia, sabe-se que inúmeros fatores contribuem para o desenvolvimento desta doença, sendo eles a obesidade, o consumo elevado de sódio, a ingestão de álcool, o tabagismo, o estilo de vida estressante e fatores genéticos (1). Quando não tratada, a hipertensão arterial acarreta na modificação patológica do coração, debilitando progressivamente sua função (46). O conjunto destas alterações no coração denomina-se cardiopatia hipertensiva, sendo caracterizada pela hipertrofia concêntrica do ventrículo esquerdo e ausência de demais doenças cardiovasculares (47).

Como dito anteriormente, uma das maiores características da HAS crônica é a indução da hipertrofia patológica concêntrica no miocárdio (48). Este processo ocorre em resposta ao aumento da resistência periférica vascular que induz uma maior sobrecarga pressórica e tensão na parede do coração. Por sua vez, esta resposta hipertrófica ocorre em maior magnitude no ventrículo esquerdo devido a sua ação sistólica contra a pressão sistêmica aumentada. Neste sentido, a hipertrofia ventricular é considerada uma resposta adaptativa do coração para que o mesmo vença a sobrecarga pressórica, reduzindo a tensão na parede cardíaca, mantendo assim o débito cardíaco. Esta adaptação induz a uma compensação hemodinâmica que pode perdurar por anos, apesar da hipertensão arterial (48).

A hipertrofia patológica concêntrica em resposta à HAS é caracterizada pelo aumento geral da massa cardíaca e do espessamento da parede do ventrículo

esquerdo em decorrência do aumento dos sarcômeros “em paralelo” (**Figura 1**). O aumento na espessura dos cardiomiócitos induz a redução no volume da câmara ventricular esquerda, uma das características mais significantes da hipertrofia concêntrica (46). Todavia, esta adaptação apresenta um limite fisiológico, onde o miocárdio não consegue ter força para manter o fluxo sanguíneo, gerando maior acúmulo de sangue na cavidade e sua conseqüente dilatação (volume diastólico aumentando) e disfunção sistólica (redução na força de contração do miocárdio). A progressão deste quadro pode resultar na insuficiência cardíaca congestiva (IC) (48, 49).

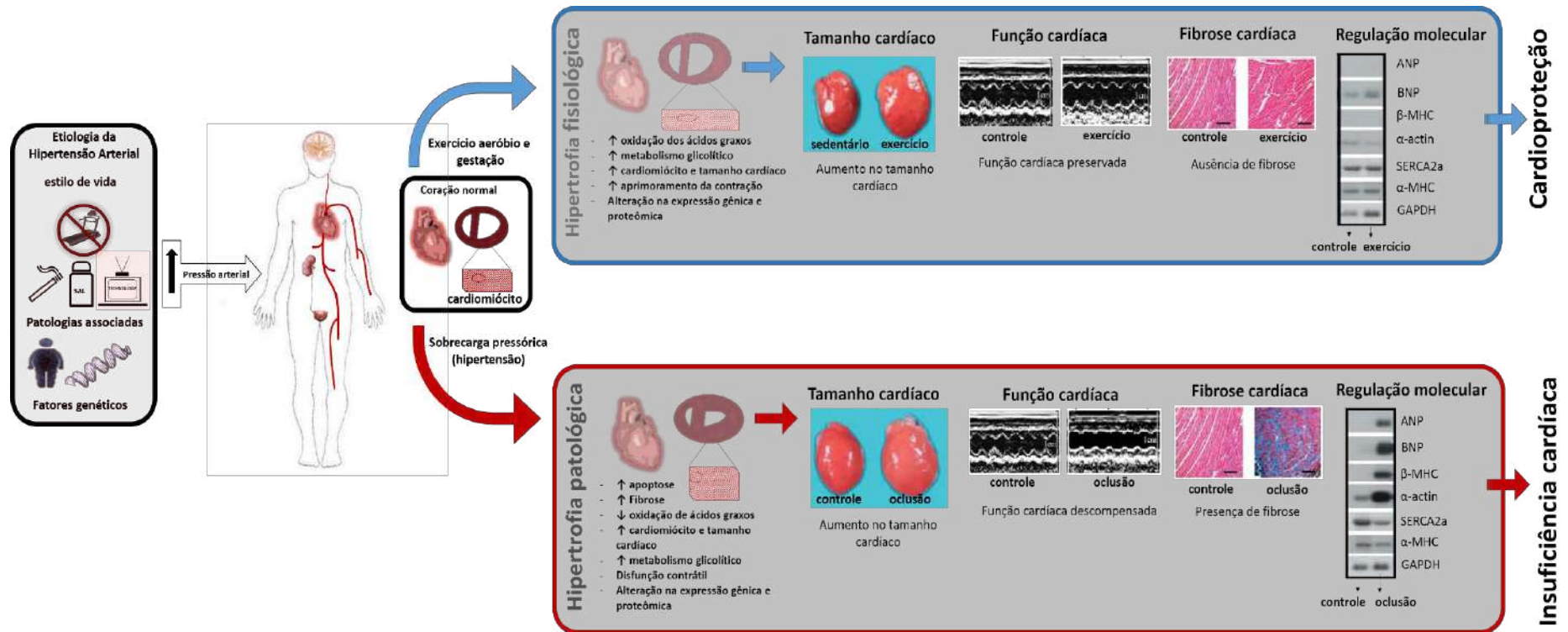
A hipertrofia concêntrica é caracterizada não só pelo aumento no volume cardíaco, mas também pela morte de cardiomiócitos, levando a um padrão de disfunção estrutural e funcional do coração. Este processo é resultante de uma série de sinalizações e modificações moleculares. Entre estas alterações, observa-se a desorganização dos sarcômeros decorrente da alteração na expressão de proteínas miofibrilares (ex. alteração na proporção de  $\alpha$ -MyHC e  $\beta$ -MyHC, aumento na abundância de desmina e vimetina), afetando a força de contração (50). Além do mais, apesar de haver um aumento na vascularização do coração hipertrofiado, o aumento no volume do cardiomiócito em resposta à hipertrofia concêntrica dificulta sua total vascularização, levando a uma carência no aporte sanguíneo (isquemia relativa) e à morte de algumas células. Este fator resulta na indução da fibrose intersticial. Além disso, a diminuição da expressão de proteínas transportadoras de íons e a disfunção no influxo de cálcio são outros fatores determinantes para a disfunção contrátil do miocárdio (51).

No aspecto metabólico, observa-se alterações no metabolismo cardíaco, com redução significativa do metabolismo de ácidos graxos livres (AGL), aumento do metabolismo glicolítico e redução na capacidade oxidativa mitocondrial (52, 53). Por fim, o aumento na sinalização apoptótica também tem sido evidenciado mediante os estímulos crônicos de indução a hipertrofia cardíaca patológica (54, 55). Devido a estas características, a hipertrofia concêntrica do ventrículo esquerdo (HVE) é considerada um dos marcadores mais importantes de eventos cardíacos, sendo significativamente associada à anormalidade na condução elétrica cardíaca (arritmias) e no desenvolvimento da insuficiência cardíaca congestiva (49).



Em decorrência da plasticidade do miocárdio, inúmeros aspectos estão relacionados especificamente à hipertrofia concêntrica em resposta à hipertensão. Muitos destes aspectos se contrastam com a hipertrofia fisiológica observada, por exemplo, durante a gravidez ou decorrente da prática de exercício físico. Nestes últimos casos, a estrutura e a funcionalidade cardíaca são preservadas além de não ocorrer progressão para a insuficiência cardíaca (5). A **Figura 1** é uma representação da etiopatogênese da hipertrofia concêntrica em comparação a hipertrofia excêntrica observada em resposta ao exercício físico.

**Figura 1:** Caracterização da hipertrofia cardíaca patológica concêntrica e fisiológica excêntrica. Fatores etiológicos da hipertensão e patogênese da hipertrofia concêntrica com aspecto morfológico (aumento do tamanho cardíaco em ambas as hipertrofias) e funcional (ecocardiograma com função cardíaca descompensada na hipertrofia patológica). Fibrose cardíaca (presente apenas na hipertrofia patológica) e regulação gênica (expressão molecular diferencial entre ambas as hipertrofias). Figura adaptada de Petriz e Franco (17) e Bernardo et al.,(52).



## 2.3 EXERCÍCIO FÍSICO

O exercício pode ser considerado como um agente não farmacológico amplamente conhecido pelos seus efeitos reguladores no organismo, como o aumento da capacidade e resistência físicas e a promoção de bem estar (56). Evidências científicas e diretrizes sustentam a recomendação do exercício físico como um dos principais mecanismos de intervenção clínica para a prevenção e atenuação de patologias, como distúrbios metabólicos e doenças cardiovasculares (57). A prática de exercício físico está associada ao aprimoramento da capacidade aeróbia (58, 59) sendo amplamente utilizado em programas de reabilitação cardiovascular. Desta forma, o exercício apresenta um status de agente cardioprotetor.

A hipertrofia cardíaca é uma das alterações fisiológicas mais significativas devido a sua influência direta no aumento e eficiência da força de contração cardíaca (60). Diferentemente da hipertrofia concêntrica em resposta à sobrecarga pressórica, o exercício aeróbio induz a hipertrofia excêntrica, resultante da vasodilatação na musculatura esquelética e aumento do retorno venoso e a sobrecarga hemodinâmica (volumétrica) no coração (24). Mediante ao estímulo crônico do exercício aeróbio, ocorre o aumento no diâmetro da cavidade ventricular em proporção ao espessamento da parede ventricular. Neste caso, ocorre o aumento no comprimento do cardiomiócito devido ao aumento dos sarcômeros “em linha”. Todas estas alterações são resultantes do aumento na síntese das proteínas sarcoméricas, aprimorando assim a força de contração do cardiomiócito. Além disso, ocorre o aumento na abundância de enzimas relacionadas ao metabolismo de ácidos graxos e de glicose, aumentando a capacidade oxidativa do coração além do aprimoramento da regulação intracelular de cálcio (52, 61). Juntas, estas modulações moleculares resultam em uma estrutura cardíaca mais eficiente, com menor gasto energético. Estes aspectos estão associados à diminuição da frequência cardíaca de repouso e submáxima, o aumento do retorno venoso e volume de ejeção sanguínea (62, 63). Tais alterações promovem um sistema cardiovascular mais eficiente e resistente ao estresse compreendido por maiores sobrecargas fisiológicas (**Figura 1**).

O exercício físico é um importante agente terapêutico no tratamento da hipertensão, devido ao seu rápido efeito atenuante sobre esta patologia (23, 64). Nos últimos anos, inúmeras pesquisas têm sido realizadas a fim de demonstrar os mecanismos pelos quais o exercício reverte a hipertrofia patológica em hipertrofia fisiológica (25, 28). Um número substancial destas pesquisas foi realizado em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), uma vez que este modelo animal apresenta os efeitos da hipertensão primária e suas consequências fisiológicas sobre sistema cardiovascular (23, 28). A literatura evidencia que o exercício físico melhora as funções sistólica e diastólica (23), além de reestruturar e aprimorar a função contrátil e metabólica do coração (27, 65). Estes fatores, além de estudos conduzidos em seres humanos (66), sustentam a utilização do exercício físico em programas de reabilitação cardíaca, uma vez que sua ação está associada a menores taxas de mortalidade (67, 68).

Em relação à obesidade, o exercício físico apresenta resultados significativos sobre a redução do peso corporal, sendo amplamente recomendado no tratamento da obesidade pela OMS e demais entidades, como a *American Heart Association* (69-71). Deste modo, o exercício físico também tem sido visto como um tratamento eficaz da redução da glicemia, pressão arterial e atenuação da disfunção endotelial, condições estas que comumente estão associadas à obesidade e à hipertensão (72, 73).

#### 2.4 PROTEÔMICA, INVESTIGAÇÃO MOLECULAR E EXERCÍCIO FÍSICO

Acredita-se que as proteínas são agentes-chave na modulação molecular e consequente modificação fenotípica (74). Deste modo, os principais objetivos das análises proteômicas consistem em identificar, quantificar e analisar todas as proteínas expressas em um determinado genoma, assim como verificar possíveis modulações na expressão proteica após determinada perturbação ao meio biológico (ex. exercício físico, doença) (75).

O uso de técnicas moleculares e da perspectiva molecular no campo do exercício físico é relativamente recente. Todavia, o uso de ferramentas de investigação molecular na análise do proteoma cardíaco tem sido cada vez mais

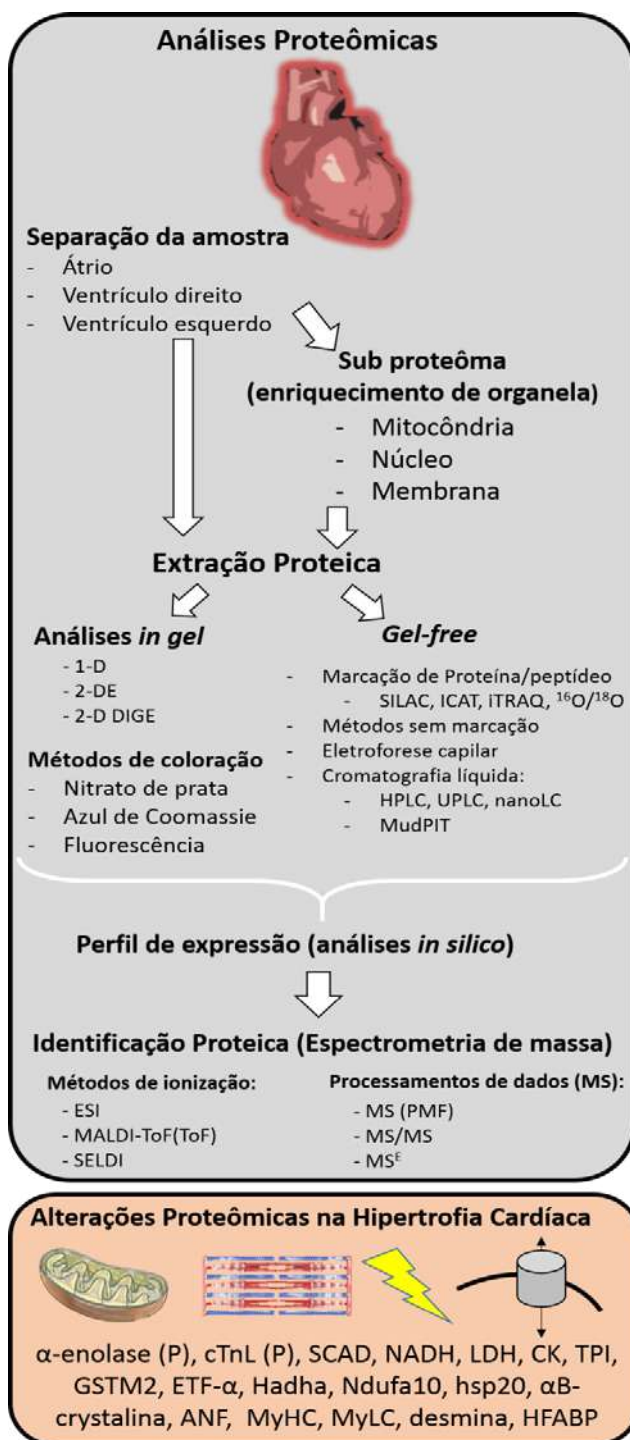
empregado nas pesquisas clínicas, biomédicas e do exercício (17, 24, 26, 76-79). Inicialmente, as primeiras pesquisas, objetivaram verificar as modulações proteômicas no miócito cardíaco em resposta ao processo de hipertrofia e adaptação ao treinamento físico (78-80). A variação entre estes estudos decorre das diferentes intensidades e tempo de treinamento, buscando assim estabelecer uma compreensão mais clara da relação de dose-resposta ao exercício. Outra abordagem usual consiste na identificação e distinção entre as adaptações moleculares da hipertrofia fisiológica e a hipertrofia patológica (80). Desta forma, estudos proteômicos apresentam uma importante perspectiva ao efeito cardioprotetor do exercício físico como agente não farmacológico (81, 82).

Limitações nas técnicas proteômicas realizadas em gel de poliacrilamida conduziram o desenvolvimento de outras técnicas de separação proteica independentes da eletroforese bidimensional (83). Tais métodos são constituídos pela separação das amostras biológicas por meio do método de cromatografia líquida (LC), podendo ser realizados em série, apresentando uma característica de análise multidimensional (MudPit) (84). Estes métodos, além de sanarem algumas das limitações técnicas prévias, como o fracionamento de amostras complexas permite quantificar por espectros de massa (MS) os componentes peptídicos ou proteicos de amostras como o plasma (85) ou o tecido cardíaco (86). Assim pode-se também analisar e comparar cada peptídeo/proteína diferencialmente expresso de um proteoma em relação a outro e possivelmente identificar novos marcadores patológicos ou de adaptação fisiológica, como o exercício (87).

A análise de proteoma por meio da cromatografia líquida de ultra desempenho torna-se uma ferramenta ainda inovadora no campo da ciência do exercício e imprescindível para uma investigação molecular mais ampla, detalhada e complementar às demais técnicas de investigação proteômica (ex. 2-DE, DIGE). O método de análise nanoUPLC/MS<sup>E</sup>, consiste na separação de peptídeos tripticos por meio da cromatografia de ultra pressão em nano escala, os quais são diretamente analisados por um espectrômetro de massa (88). Este método permite a separação de amostras biológicas complexas, além de fornecer parâmetros quantitativos entre as diferentes amostras analisadas. Por fim, o nanoUPLC é acoplado a uma nova metodologia de aquisição de MS (MS<sup>E</sup>) capaz de detectar maiores quantidades de peptídeos (89), obter sequências lineares estruturais na ordem de femtomol (fmol),

além de permitir a análise de amostras com pouca abundância (88). Desta forma, até o presente momento não há relatos do uso do método de nanoUPLC/MS<sup>E</sup> na investigação dos efeitos do treinamento sobre o proteoma do ventrículo esquerdo de modelo animal hipertenso. A **Figura 2** apresenta as principais técnicas proteômicas utilizadas na investigação dos efeitos do exercício e da patologia no proteoma cardíaco.

**Figura 2:** Representação geral das ferramentas de análise proteômica na investigação do proteoma cardíaco. O painel inferior indica algumas proteínas metabólicas, contráteis, de estresse e de membrana. Alpha-enolase (P) (alfa-enolase fosforilada), cTnI (P) (troponina I fosforilada), SCAD (acil-CoA desidrogenase de cadeia curta), NADH (dinucleotídeo de nicotinamida e adenina), LDH (lactato desidrogenase), CK (creatina quinase), TPI (triose fosfato isomerase), GSTM2 (glutathione S-transferase Mu 2), ETF- $\alpha$  (flavoproteína- $\alpha$  transportadora de elétrons), HADHA (3-hidroxiacil-CoA desidrogenase), Ndufa10 (NADH desidrogenase (ubiquinona) subcomplexo alfa1, 10), HSP20 (proteína de resposta ao estresse 20),  $\alpha$ B-cristalina, ANF (peptídeo natriurético atrial), MyHC (cadeia pesada de miosina), MyLC (cadeia leve da miosina), desmina, HFABP (proteína tipo cardíaca de ligação a ácido graxo).



## 2.5 A MICROBIOTA INTESTINAL

Na última década, inúmeras pesquisas tiveram como principal foco o trato gastrointestinal devido à densa e diversa variedade de comunidades bacterianas que habitam e interagem simbioticamente com este órgão (90). Esta intensa interação é responsável por influenciar significativamente a homeostase fisiológica assim como a susceptibilidade patológica do organismo (10). Não restrito ao trato gastrointestinal, porém significativamente mais abundante neste ecossistema ( $10^{14}$  bactérias, ~1,5 kg no intestino grosso), a coleção de todos estes microrganismos é denominada de microbiota (91). Com ampla função fisiológica no trato gastrointestinal, estes microrganismos revestem o lúmen intestinal (**Figura 3**), desempenhando uma função primordial na maturação do sistema imunológico, na decomposição de matéria orgânica e na proteção contra agentes patogênicos (7, 8). Devido a sua intrínseca interação com o sistema gastrointestinal e influência no metabolismo do hospedeiro, a microbiota intestinal é tida como um “órgão metabólico”, porém, seus mecanismos de ação não são completamente conhecidos (9).

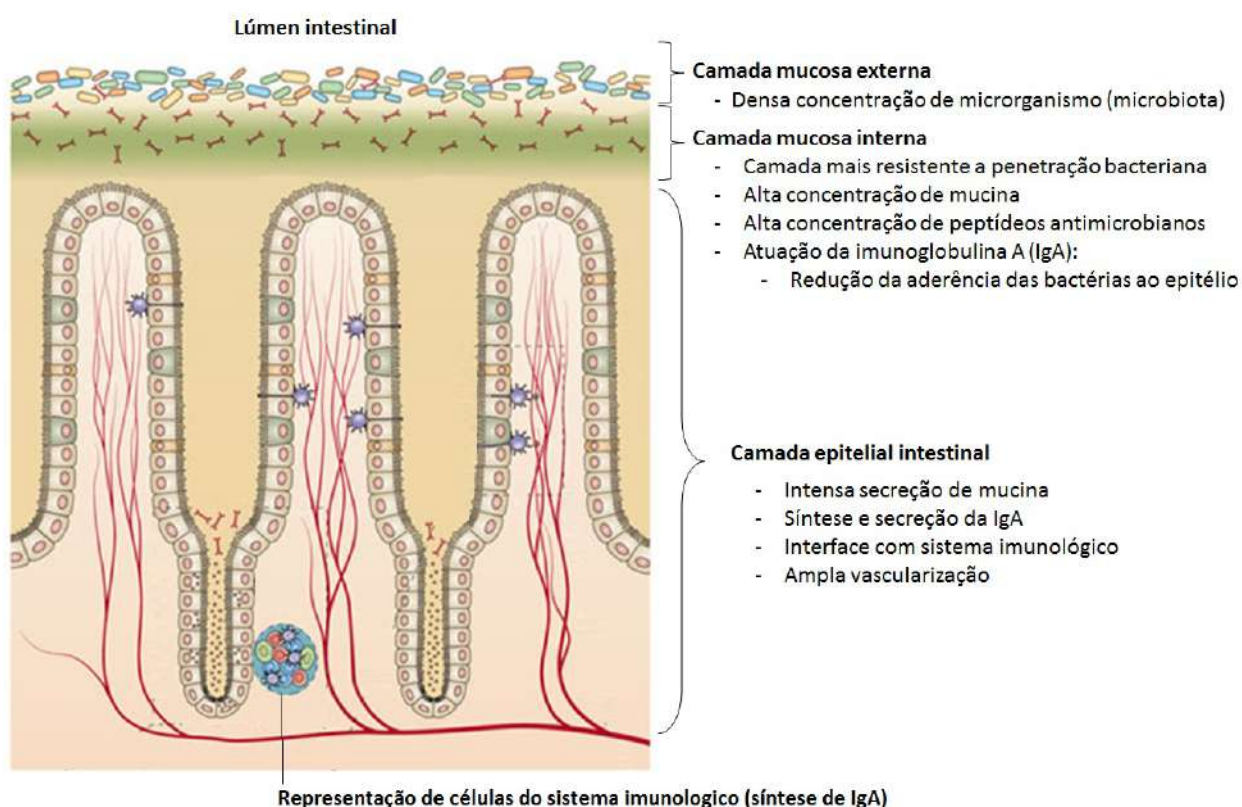
O intestino grosso apresenta a maior densidade destes microrganismos ( $10^{12}$  microrganismos.mL<sup>-1</sup>), pertencentes em sua maioria aos filos Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria e Proteobacteria, seguidos, em menor proporção, pelos Fusobacteria, Verrucomicrobia e TM7 (92). A gênese da microbiota ocorre no momento do nascimento, herdado maternamente, sendo, inclusive, influenciada pelo método do parto (ex. cesária vs. parto normal) (93). Devido ao trato gastrointestinal ser um órgão com ligação ao meio externo (ex. boca e ânus), a microbiota deste meio sofre intensa influência dos inúmeros fatores como alimentação, uso de fármacos, antibióticos, patógenos e patologias. Ao longo da vida, demais fatores como localização geográfica, estilo de vida, e fatores genéticos intrínsecos também irão influenciar e modular dinamicamente a composição desta comunidade bacteriana (94).

Uma vez que a microbiota interage simbioticamente com seu hospedeiro, tem sido estabelecido que alterações em sua composição influenciam diretamente a homeostase do meio. Sendo esta relação simbiótica e conforme relatado anteriormente, alterações fisiológicas do meio gastrointestinal também interferem no



equilíbrio da microbiota (95). Porém, sabe-se que distúrbios neste ecossistema podem desencadear processos alergênicos, inflamatórios e disfunções metabólicas, estabelecendo o distúrbio na composição microbiana como fator significativo no desenvolvimento de inúmeras patologias (96). Desta forma, o equilíbrio deste sistema se torna um aspecto fundamental para a manutenção de um estado biológico saudável.

**Figura 3:** Representação das estruturas que compõem o lúmen intestinal e do conjunto de microrganismos que constituem a microbiota intestinal e sua interação com o sistema imunológico. Figura adaptada de Sommer e Backhed (90).



Sabe-se que a obesidade é uma doença de gênese multifatorial (32) com elevado índice de associação a demais patologias como as doenças cardiovasculares, em especial a hipertensão (1). Apesar do amplo espectro de fatores já determinados sobre desenvolvimento da obesidade, inúmeros estudos realizados na última década indicaram um novo componente significativo no desenvolvimento desta patologia, a microbiota intestinal (6, 97, 98). A característica peculiar da microbiota intestinal associada à obesidade está no fato desta

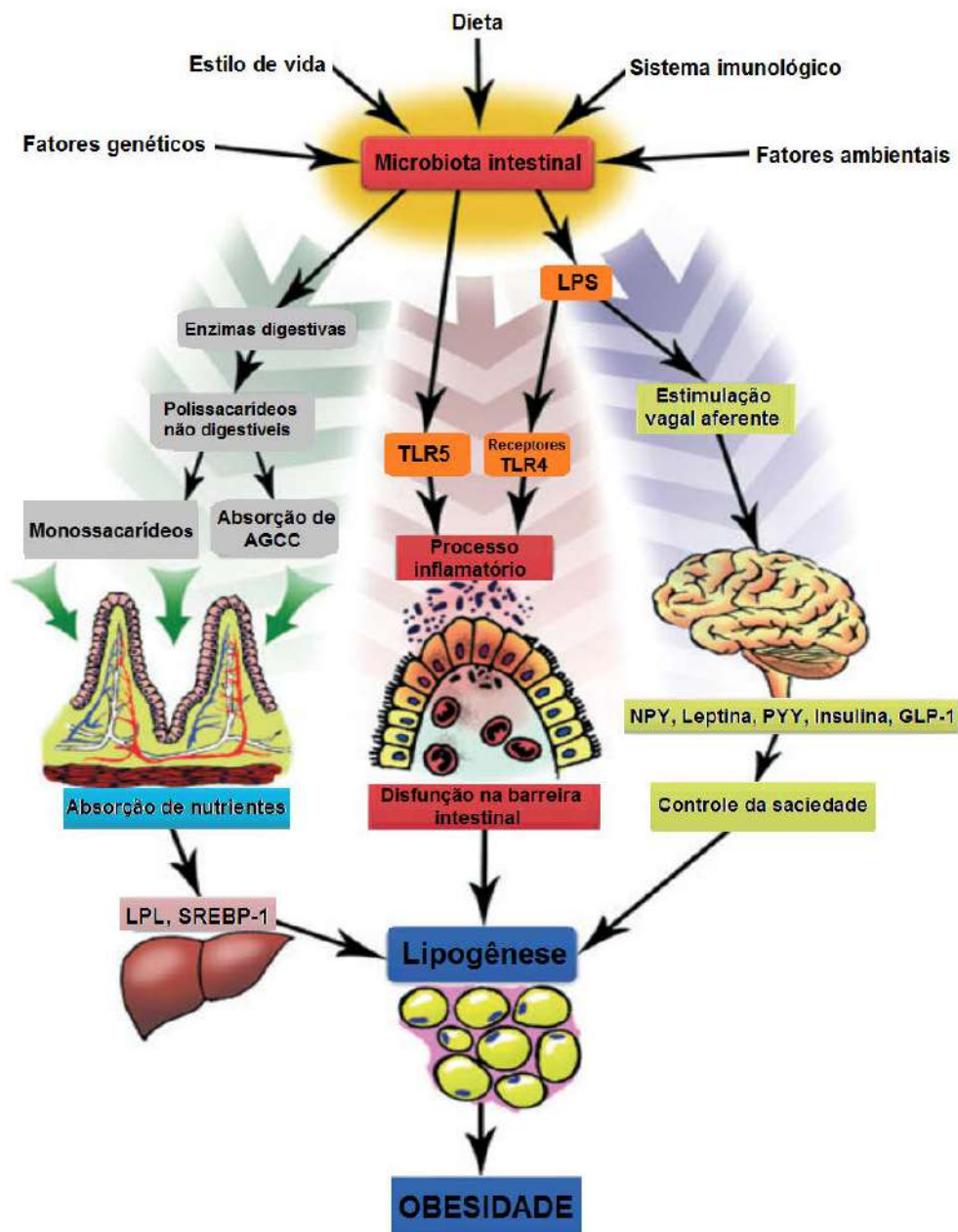
comunidade bacteriana apresentar maior habilidade no processo de extração energética do meio (99).

Uma das funções da microbiota intestinal consiste em degradar macromoléculas complexas provenientes da alimentação e fermentar componentes indigestíveis, auxiliando na absorção de eletrólitos. Portanto, estas atividades desempenham papel fundamental na aquisição de nutrientes e no processo de extração energética deles (100). É relatado na literatura que a microbiota comensal possui a habilidade de degradar polissacarídeos complexos, naturalmente não digeríveis por humanos, gerando assim ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (101). Além disso, sua habilidade em regular genes relacionados ao processo de absorção de carboidratos e lipídios complexos pelo tecido adiposo contribui para o acúmulo e estocagem de gordura no organismo (101). Em adição a estes fatores, a microbiota intestinal influencia o processo de obesidade por meio de perturbações em vias metabólicas, indução de processo inflamatório epitelial e interfere nos sistemas de controle da saciedade alimentar (**Figura 4**).

Na última década, inúmeras pesquisas objetivaram estabelecer e associar o perfil da composição microbiana com aspectos e características fenotípicas associadas a patologias como a obesidade (9) e o diabetes (102). Neste processo, verificou-se que fenótipos relacionados à obesidade apresentavam uma diversidade microbiana intestinal reduzida assim como alterações significativas no mais alto nível taxonômico, o filo (103). Estudos clássicos envolvendo o sequenciamento do gene 16S do RNAr apontaram que indivíduos e animais obesos apresentavam uma predominância do filo Firmicutes em relação ao Bacteroidetes comparados aos seus pares não obesos (6, 10). Inúmeros estudos subsequentes também associaram gêneros e espécies bacterianas específicas à obesidade (*Lactobacillus*, *Staphylococcus* e *Faecalibacterium*) e ao fenótipo não obeso (*Bacteroidetes*, *Methanobrevibacter*, *Bifidobacterium*) (9, 104). Por fim, determinadas bactérias (*L. ingluviei*) e agentes patogênicos (*Lipopolysaccharide endotoxin*) foram evidenciados como agentes moduladores da microbiota e indutores de aumento de peso e processos inflamatórios (104, 105). Estes estudos apontam uma relação íntima entre determinadas comunidades bacterianas e o fenótipo obeso, assim como, no desenvolvimento desta patologia. Todavia, apesar destes resultados, outros estudos demonstraram níveis semelhantes entre os filos mais abundantes (Firmicutes e

Bacteroidetes) (106, 107), assim como a relação inversa (108), com predominância de Bacteroidetes sobre Firmicutes em indivíduos obesos.

**Figura 4: Mecanismos de regulação da microbiota intestinal e da obesidade.** Inúmeros fatores modulam a microbiota intestinal. Determinadas alterações na microbiota podem influenciar vias metabólicas por meio da alteração no processo de extração energética, indução a processos inflamatórios e alterações nos controles de saciedade alimentar. GLP-1 (*glucagon like protein-1*), LPS (lipopolissacarídeo), NPY (neuropeptídeo Y), PYY (peptídeo YY), AGCC (Ácidos graxos de cadeia curta), SREBP-1 (*sterol regulatory element binding protein-1*), TLR4 (receptor *toll-like 4*), TLR5 (receptor *toll-like 5*). Figura adaptada de Tehrani et al., (100).



## 2.6 O EXERCÍCIO FÍSICO NA MANIPULAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL

O exercício físico tem sido utilizado como um agente não farmacológico no tratamento de inúmeras patologias e um fator chave para a manutenção e a melhora da saúde (109). Somado a fatores dietéticos, programas de atividade física são propostos para prevenir, tratar e atenuar diversas patologias, entre elas a obesidade e doenças associadas, como a hipertensão (1, 13, 110). Embora a hipertensão e a obesidade frequentemente coexistam (1), foi estabelecido que ambas as patologias são fatores independentes para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (2), afetando milhões de pessoas no mundo todo (14).

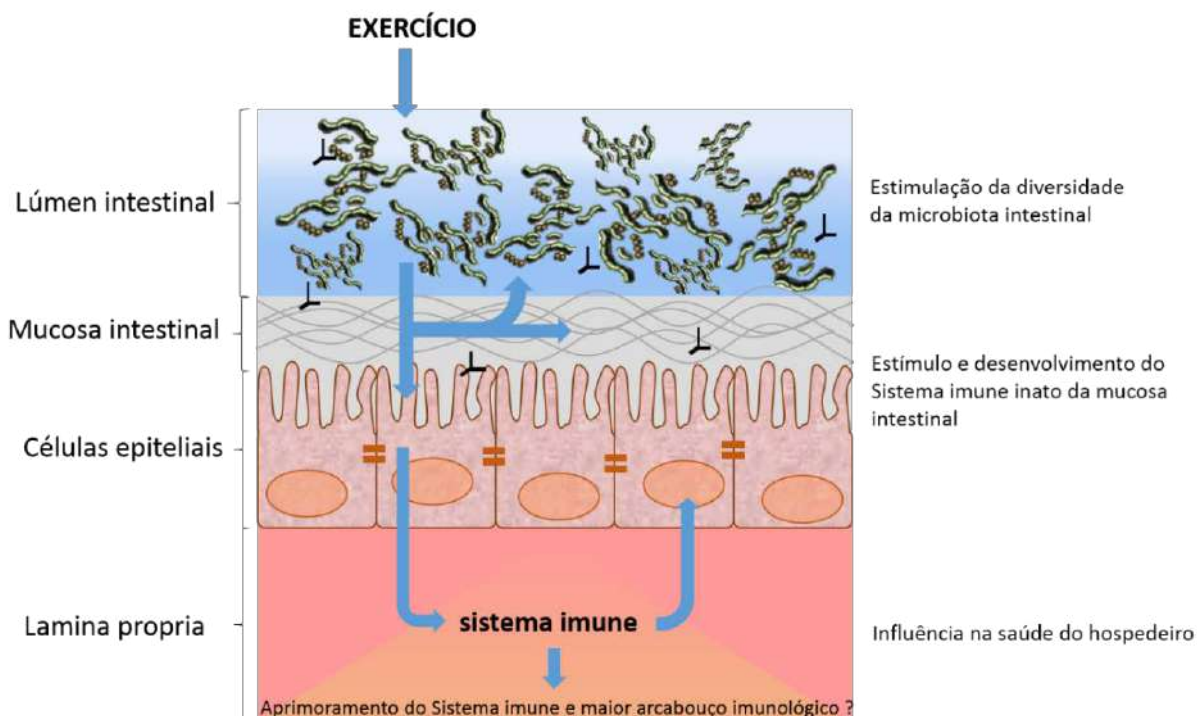
Sabe-se que o exercício físico executado com intensidades controladas promove alterações fisiológicas (ex. dilatação do cécum) com efeito protetor sobre o trato gastrointestinal (30, 111). Estudos indicam uma correlação inversa entre exercício físico e inflamação do cólon e câncer intestinal (112). Trabalhos demonstram que animais exercitados apresentaram menor risco no desenvolvimento de câncer de cólon (113), relação esta também observada em humanos (114). Supõe-se, portanto, que o exercício pode desempenhar papel fundamental na redução do tempo de trânsito intestinal, diminuindo assim o tempo de contato entre o cólon e agentes cancerígenos (30).

Recentemente, estudos usando as técnicas de PCR-TGGE (*Polimerase Reaction Chain – Temperature Gradient Gel Electrophoresis*) e DGGE (*Denaturing Gel in Gradient*) verificaram que o exercício físico apresentou ação moduladora na composição e diversidade da microbiota de ratos não patológicos (29, 30). Estes estudos demonstraram que, além dos efeitos na morfologia gastrointestinal, o exercício atinge a comunidade microbiana. Isso indica que o exercício físico pode ser visto como um novo agente ambiental, com potencial para alterar a ecologia bacteriana e possivelmente apresentar uma função terapêutica junto com a dieta, pré-bióticos e demais tratamentos. Uma vez que o exercício desempenha um importante papel na regulação do metabolismo (gasto energético), assim como na microbiota, especula-se que o exercício físico possa modificar a relação da microbiota com o hospedeiro, modulando o metabolismo deste. Apesar destes mecanismos ainda serem desconhecidos, a alteração na composição da microbiota

pele exercício, junto a outros tratamentos (ex. dieta e transplante de microbiota) podem aumentar as estratégias no tratamento clínico da obesidade.

Apesar das respostas do sistema imunológico ao exercício serem relativamente bem conhecidas, os mecanismos envolvidos no efeito do exercício físico na microbiota e sua interação com o sistema imunológico permanecem desconhecidos (**Figura 5**).

**Figura 5:** Mecanismos de regulação do exercício com a microbiota intestinal e o sistema imunológico da mucosa intestinal. O exercício influencia positivamente a diversidade da microbiota intestinal, o que pode estar relacionado com regulação positiva do sistema imune inato da mucosa intestinal. O aumento na diversidade da microbiota intestinal está relacionado com a melhoria do perfil metabólico e respostas imunológicas.



Apesar disso, algumas doenças como obesidade e diabetes têm sido investigadas por apresentarem em sua patogênese a ativação do sistema imunológico em resposta a alterações na microbiota intestinal do hospedeiro. Sabe-se que a relação da microbiota intestinal com o sistema imunológico estimula o desenvolvimento do sistema imune comensal intestinal, um dos principais mecanismos de prevenção contra a invasão patogênica (115). Este mecanismo ocorre por meio dos receptores de reconhecimento padrão, entre eles o TLRs (*toll-like receptors*) e o NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*), que fazem a distinção de patógenos e agentes inofensivos por intermédio de características

moleculares conservadas (116). Neste sentido, os receptores TLR são modulados pela microbiota intestinal, iniciando uma cascata molecular que inclui a ativação da via do fator nuclear kappa bB (NF-kB) seguido pela síntese de citosinas e ativação de células T (116). Os receptores TLR foram associados ao sedentarismo e à inflamação, além de sua expressão ser reduzida após o exercício físico, contribuindo para um status imunodepressor pós-exercício (117). Todavia, a relação destes componentes com a microbiota intestinal mediante o efeito do exercício é desconhecida, sendo um possível campo de grande perspectiva exploratória e clínica.

Estudos indicam que níveis e variações reduzidos nas comunidades bacterianas estão associados a disfunções na saúde em contraste com o aumento na variedade e diversidade bacterianas, o qual está associado ao aprimoramento no perfil metabólico e na resposta imunológica, sendo um possível marcador positivo de saúde (94). Apesar do efeito do exercício voluntário ter sido observado em determinados estudos (29, 30), esta relação ainda necessita de mais investigação, principalmente envolvendo parâmetros controlados como a intensidade e a duração do treinamento físico. Outro fator importante a ser considerado é o uso da tecnologia de pirosequenciamento do gene 16S do RNAr, aumentando a abundância de sequências e a cobertura taxonômica da comunidade bacteriana em questão. Por fim, não existem relatos na literatura desta relação em fenótipos patológicos como a obesidade e a hipertensão.

Levando em consideração os aspectos positivos do exercício físico no sistema cardiovascular e no controle da obesidade, o presente estudo propõe-se a examinar os efeitos do treinamento aeróbico com intensidade controlada sobre o proteoma cardíaco de modelo animal hipertenso, além do *status* da microbiota intestinal de modelo animal obeso e hipertenso.

### 3. HIPÓTESE

Acredita-se que alterações metabólicas induzidas pelo exercício, incluindo o aumento de fluxo sanguíneo no trato gastrointestinal, a redução no tempo de transição fecal e o estímulo crônico do sistema imune com interface à mucosa intestinal são fatores que podem modificar a abundância e a diversidade da microbiota intestinal nos diferentes modelos animais. Em relação ao modelo animal hipertenso, acredita-se que a redução da pressão arterial em resposta ao treinamento reduzirá a sobrecarga hemodinâmica no coração, levando a adaptações no seu proteoma, principalmente na resposta das proteínas de função metabólica e contrátil. Estas modificações podem caracterizar sinalizações moleculares específicas de transição e regressão da hipertrofia cardíaca patológica para a hipertrofia fisiológica.

## 4.OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho consiste em verificar os efeitos do treinamento aeróbio moderado sobre o metagenoma da microbiota fecal de modelo animal obeso (Zucker<sup>fa/fa</sup>), não obeso (ratos Wistar) e espontaneamente hipertenso (SHR) e o efeito do treinamento aeróbio em baixa e alta intensidade sobre o proteoma do ventrículo esquerdo de ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

### 4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar, por meio do pirosequenciamento do gene 16S RNAr, o efeito do treinamento de quatro semanas em intensidade moderada sobre a diversidade e composição da microbiota intestinal de ratos Wistar, ratos obesos (Zucker<sup>fa/fa</sup>) e ratos espontaneamente hipertensos (SHR);
- Verificar o efeito do treinamento de oito semanas em baixa e alta intensidade na capacidade aeróbia, na abundância e na pressão arterial sistólica de ratos SHR;
- Analisar por meio da técnica de nanoUPLC-MS<sup>E</sup> o efeito do treinamento de oito semanas em baixa e alta intensidade no proteoma do ventrículo esquerdo de ratos SHR;
- Analisar alterações proteômicas relacionadas com a regressão da hipertrofia cardíaca patológica do ventrículo esquerdo.



**BERNARDO PETRIZ DE ASSIS**

**EFEITOS DO EXERCÍCIO AERÓBIO MODERADO SOBRE A MICROBIOTA  
INTESTINAL DE MODELO ANIMAL PATOLÓGICO**

**Volume 1**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, como pré-requisito para obtenção do Título de Doutor em Ciências Genômicas e Biotecnologia.

Orientador: Dr. Octávio Luiz Franco

Co-orientador: Dr. André Melro Murad

**Brasília  
2014**

## 5.MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 ANIMAIS E MANEJO

Para o presente estudo, três linhagens de ratos provenientes de dois genótipos distintos foram utilizadas, um genótipo homozigoto obeso Zucker<sup>fa/fa</sup> (ZO; n=5, 389,4 ± 21 g) e um genótipo de hipertensão espontânea (SHR; ~171.4 ± 7.7 mm.Hg<sup>-1</sup>, n=5, 227.4 ± 29,3 g) oriundo do cruzamento seletivo de ratos Wistar-Kyoto com elevada pressão arterial (118, 119). Uma linhagem de ratos Wistar (W; n=5, 223,2 ± 27,3 g) foi usada como controle normotenso e fenótipo não obeso para os grupos SHR e ZO, respectivamente. Todos os animais tinham, aproximadamente, 18 semanas de vida e eram provenientes do biotério da Universidade Federal de São Paulo. Os animais de cada grupo foram mantidos em gaiolas coletivas (cinco animais por gaiola). A temperatura do biotério foi mantida, em média, a 23 °C (± 2 °C) e a luz do ambiente controlada em ciclos de 12 horas (claro/escuro). Os animais foram alimentados com ração padrão para roedores Labina® (Purina, São Paulo, Brasil) e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram conduzidos de modo supervisionado e os cuidados com os animais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA), UnBDOC n° 48695/2010.

### 5.2 ADAPTAÇÃO E TREINAMENTO

Previamente ao treinamento de quatro semanas, todos os animais foram submetidos a um processo inicial de aclimação e adaptação à esteira rolante. A esteira rolante utilizada era formada por uma correia conduzida por um servo motor com o codificador óptico para o controle preciso de velocidade (*Treadmill Control* LE8710, Panlab, Harvard *Apparatus*, Barcelona - Espanha). A movimentação do motor permitia a seleção de qualquer velocidade de 0 até 100 m.min<sup>-1</sup>. Os animais foram separados por divisórias de acrílico onde há uma grade de choque manipulável e presente em cada canaleta. Esta grade foi usada para estimular os animais a correrem. A parte dianteira e a caixa de acrílico que veda as baias foram

revestidas com material de cor preta, escurecendo o ambiente. Esta ação gera um ambiente similar a uma rota de fuga, estimulando os animais a continuar correndo. Assim, foram fornecidos aos animais estímulos negativos e positivos, tendo por resultado uma corrida contínua.

A aclimação consistiu em deixar os animais sobre a esteira por 10 a 30 min durante cinco dias. Posteriormente, os animais foram adaptados à esteira em movimento por duas semanas com tempo e velocidade sendo incrementados até o limite de 20 m.min<sup>-1</sup> para os ratos do grupo W e SHR e de 12 m.min<sup>-1</sup> para os ratos OZ, conforme descrito por Almeida et al., (120, 121). Após o período de adaptação, todos os animais foram treinados em esteira rolante por 4 semanas, 30 min por dia, 5 dias por semana com intensidade moderada. A intensidade de treinamento foi pré-estabelecida nestes animais de acordo com a máxima fase estável de lactato (MFEL), conforme previamente descrito (120, 121).

A MFEL é a maior concentração de lactato sanguíneo mantida em fase estável ao longo do exercício prolongado de carga constante. Desta forma, a intensidade do exercício correspondente à MFEL representa a maior intensidade submáxima de esforço que pode ser realizada sem a contribuição do metabolismo anaeróbio (122). Deste modo, a MFEL é o padrão ouro na identificação da intensidade da qual a taxa de liberação de lactato para o sangue excede sua taxa de remoção, sendo frequentemente indicada para prescrição do treinamento aeróbio (123). Sua determinação é um processo laborioso que requer a realização de, no mínimo, três testes de carga constante (em dias diferentes), com aproximadamente 30 min de duração e sucessivas coletas de lactato sanguíneo (a cada 5 min) (120, 121). Desta forma, os animais do grupo Wistar e SHR foram treinados a uma velocidade de 20 m.min<sup>-1</sup> e os animais OZ treinaram a 12 m.min<sup>-1</sup>. Ao final do período de quatro semanas de treinamento, uma nova determinação da MFEL foi realizada para verificar a melhora da capacidade aeróbia de todos os animais.

### 5.3 ANÁLISE DE LACTATO SANGUÍNEO

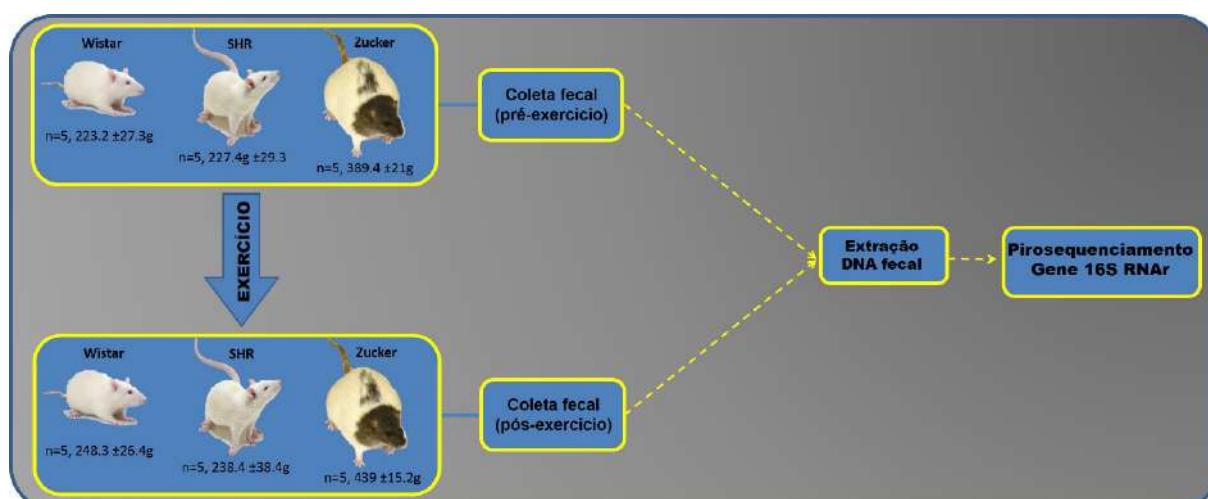
A dosagem de lactato sanguíneo para a determinação da MFEL foi realizada utilizando 10 µL de sangue capilar coletado a partir de um pequeno corte na extremidade da cauda do animal em repouso e a cada 5 min durante o teste de

MFEL. O sangue capilar foi depositado em microtubos contendo 20  $\mu\text{L}$  de fluoreto de sódio a 1% e estocado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A análise da concentração de lactato sanguíneo foi realizada pelo método eletroenzimático no aparelho YSI 1500 *Sports* (Yellow Springs, USA). A MFEL foi considerada quando não houve o aumento acima de  $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de lactato sanguíneo entre o 10 e o 25 min do teste (124).

#### 5.4 COLETAS E EXTRAÇÃO DO DNA FECAL

Amostras fecais de cada animal de cada grupo foram coletadas em dois momentos distintos; pré-treinamento e após as quatro semanas de treinamento (**Figura 5**). Em ambas as coletas, as amostras foram imediatamente estocadas em solução RNAlater® (*Life Technologies*, USA) para preservação do material genético até sua estocagem a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, as amostras pertencentes a três animais de cada linhagem foram escolhidas aleatoriamente para a extração do DNA fecal. Cerca de 0,25 g de cada amostra fecal foi utilizado para a extração do DNA microbial (*PowerFecal DNA Isolation Kit*, *MoBio*, Carlsbad, CA, USA).

**Figura 5:** Desenho experimental para o pirosequenciamento do gene 16S RNAr com caracterização das três linhagens de ratos: não obesos (Wistar), obesos (Zucker<sup>fa/fa</sup>) e espontaneamente hipertensos (SHR).



## 5.5 PIROSEQUENCIAMENTO DO GENE 16S RNAr COM *BARCODE*

O gene 16S do RNA ribossômico (RNAr) da comunidade bacteriana foi amplificado pelo *primer pair* 787F-1492R (125). Para as análises de pirosequenciamento, a estrutura do *primer* foi modificada, onde o *forward primer* (5'-3') recebeu um adaptador de pirosequenciamento 454-A da Roche e um *barcode* de 12-pb (específico para cada amostra) e o *reverse primer* (3'-5') recebeu apenas o adaptador de pirosequenciamento 454-B. A reação de PCR com total de 20 µL continha ~ 10 ng de DNA fecal metagenômico, 1X de tampão de PCR (Invitrogen, USA), 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 pmol de cada *primer*, 0,25 mM de dNTP e 1,5 U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen, USA). O protocolo cíclico foi programado para se iniciar com a etapa de desnaturação por 3 min a 95 °C, seguido por 25 ciclos de desnaturação de 30 s a 95 °C, a etapa de anelamento por 30 s a 58 °C e extensão por 1,4 min a 72 °C, seguido pela extensão final por 7 min a 72 °C e resfriamento até 10 °C. Por fim, o RNAr amplificado das comunidades bacterianas foi purificado com o kit QIAquick PCR *Purification Kit* (Chatsworth, CA). A concentração das amplificações de RNAr foi realizada pelo método fluorimétrico, utilizando o aparelho *Qubit fluorometer* (Invitrogen, USA) e por fim o Sequenciamento em paralelo usando a tecnologia GS *FLX Titanium* foi realizado no 454 da Roche *Life Sciences Corporation, Branford, CT, USA*.

## 5.6 ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS DO GENE 16S RNAr

Um total de 1.398.681 sequências de RNAr 16S foram obtidas pelo sequenciamento no 454 GS *FLX Titanium*. Todas as amplificações do RNAr 16S foram processadas no módulo quantitativo em ecologia microbiana pelo *software* (QUIME) *pipeline* versão 1.6.0-dev (126). As amplificações de RNAr 16S foram organizadas de acordo com seu *barcode* (12pb específicos acoplados ao *primer*) para formar um total de 18 amostras fecais pareadas. Os *reads* gerados pelo pirosequenciamento com tamanho menor que 180pb, sequências ambíguas, base com valor de Phred <30 e seus *primers*, os *barcodes* e as sequências referentes aos adaptadores foram todas descartadas. As sequências restantes foram submetidas a

um processo de eliminação de ruído para a remoção de erros de pirosequenciamento por meio de algoritmo, conforme descrito por Reeder e Knight (127). As unidades taxonômicas operacionais (UTO) foram agrupadas mediante a 97% de similaridade usando um protocolo de referência-aberta de UTO, onde as sequências foram agrupadas e contrastadas contra o banco de dados *Greengenes* (128) usando o algoritmo Uclust (129). Os *reads* mais abundantes de cada UTO foram alinhados pelo algoritmo PyNAST (126). As UTOS quiméricas foram detectadas pelo algoritmo *Chimera Slayer* (130) e a classificação taxonômica foi realizada com o classificador *naive Bayesian* de acordo com a classificação da base de dados do *Ribosomal database Project* (131), aplicando-se o limiar de confiança de 80%. O índice *Shannon* e o enriquecimento observado foram usados para avaliar a riqueza de cada comunidade. Por fim, o algoritmo *unweighted Unifac* foi aplicado para geração das análises de coordenadas principais (PCoA).

## 5.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As diferenças estatísticas entre as amostras provenientes do período pré-treinamento e pós-treinamento foram comparadas usando-se o teste de similaridade (ANOSIM), pela permuta de grupo com 999 réplicas (132), e relações bivariadas foram medidas pela correlação de Pearson com regressão linear pelo QUIME (126). O teste estatístico das diferenças taxonômicas entre as amostras foi calculado pelo teste t de *Welch* combinado com o método invertido de *Welch* para se calcular a confiança de intervalo (cobertura nominal de 95%), usando o software *Statistical Analysis of Metagenomic Profiles* (STAMP) versão 2.0.0 (133).

## 5.8 NÚMEROS DE ACESSO DAS SEQUÊNCIAS

Os arquivos tipo *sff* (*standard flowgram format*) gerados a partir do pirosequenciamento no 454 FLX *Titanium* foram submetidos ao banco de dados de sequências do Centro Nacional de Informação em Biotecnologia (NCBI) com o número de projeto: PRJNA246617.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inúmeros fatores ambientais e intrínsecos ao hospedeiro são conhecidos pela sua capacidade em modificar a composição da microbiota intestinal (94, 96). Este ecossistema dinâmico, altamente sensível a agentes externos, tem uma ligação simbiótica com a saúde do hospedeiro e sua homeostase. Neste contexto, disfunções na microbiota intestinal têm sido recentemente incluídas na patogênese de doenças inflamatórias gastrointestinais, de doenças metabólicas e da obesidade (95).

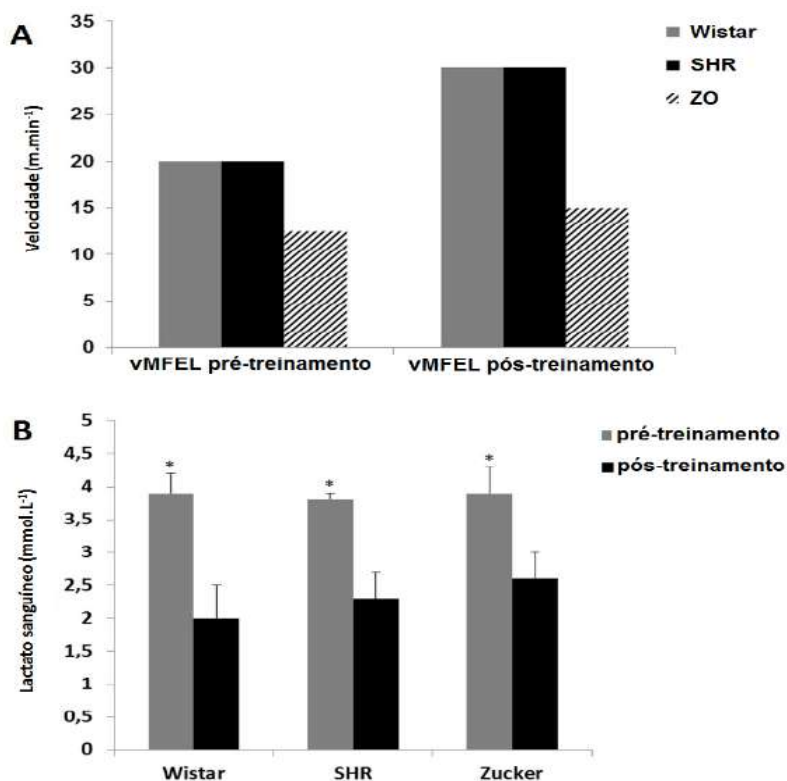
Recentemente, foi demonstrado que a atividade física é um agente externo com capacidade de modular a microbiota intestinal. Esta ação foi verificada em animais com obesidade induzida (134) e em roedores saudáveis, onde a concentração de n-butirato no cécum foi aumentada (30). Estes estudos utilizaram as técnicas de PCR-TGGE e PCR-DGGE para avaliar modificações na composição microbiana decorrente ao exercício (29). De outro modo, o presente estudo buscou entender esta relação por meio de uma análise mais robusta, utilizando o pirosequenciamento dos genes 16S RNAr além do uso de parâmetros controlados de exercício em modelos animais não patológicos e patológicos. Embora a relação entre exercício voluntário e modificação da microbiota intestinal em animais não-patológicos já tenha sido investigada (29, 30, 134), tais efeitos necessitam de maior investigação, principalmente, em fenótipos patológicos e utilizando parâmetros de treinamento controlados, como o volume e a intensidade do exercício.

Acredita-se que alterações metabólicas induzidas pelo exercício, incluindo o aumento de fluxo sanguíneo no trato gastrointestinal, a redução no tempo de transição fecal e o estímulo crônico do sistema imune com interface com a mucosa intestinal, são fatores que podem modificar a abundância e a diversidade da microbiota intestinal. Uma vez que os mecanismos de modulação da microbiota intestinal não são amplamente conhecidos, sua resposta ao exercício pode ampliar as perspectivas de novas terapias no combate a doenças com etiologia associada à disfunção da microbiota, como a obesidade.

## 6.1 EFEITOS DO EXERCÍCIO NA CAPACIDADE AERÓBIA

Após as quatro semanas de corrida em esteira a uma intensidade moderada ( $12,5 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$  para os ratos ZO e  $20 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$  para os Wistar e SHR), o teste de máxima fase estável de lactato (MFEL) indicou que todos os animais das três linhagens apresentaram melhora em sua capacidade e abundância, conforme evidenciado pelo aumento da velocidade de treino correspondente a MFEL ( $15 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$  para os ZO e  $30 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$  para os W e SHR) (**Figura 7A**). Ao se comparar as velocidades inicial e final do treinamento, foi verificada uma redução significativa na concentração de lactato sanguíneo (CLS) de  $\sim 49\%$  nos ratos Wistar,  $\sim 39\%$  nos SHR e  $\sim 33\%$  nos ZO. Essa redução na CLS (pré vs. pós-treinamento) demonstra a eficiência da intensidade de exercício proposta (correspondente a MFEL) para todos os animais deste estudo ( $p < 0.01$ ) (**Figura 7B**).

**Figura 7:** Velocidade de treinamento pré e pós-treino (A) e concentração de lactato sanguíneo pré e pós-treino (B). Comparação entre as velocidades de treinamento correspondentes a MFEL pré e pós quatro semanas de exercício em intensidade moderada, com indicativo de melhoria na velocidade correspondente a MFEL ( $15 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$  para ZO e  $20 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$  para SHR e Wistar) (A). Acúmulo de lactato sanguíneo correspondente a velocidade inicial de treinamento e a velocidade final pós-treinamento, \*, com  $p < 0,01$  (B).





## 6.2 COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA FECAL

Após o processo de filtração algorítmica das 1.389.681 sequências originais, 899.124 sequências foram obtidas decorrentes das amostras fecais de três ratos de cada grupo experimental, coletado nos períodos pré (Wistar; n=3, SHR; n=3, ZO; n=3) e pós-treinamento (Wistar-T; n=3, ESHE-T; n=3, ZO-T; n=3). Uma média de 49,951 sequências por animal foi obtida com tamanho médio de 524,8 pb, e uma média de 581,1 UTOs distintas foram observadas. O índice de diversidade *Shannon* obtido para estas sequências foi de 6,43, todavia, as amostras pós-treinamento apresentaram maior índice ( $6,8 \pm 0,2$ ) quando comparadas às amostras pré-treinamento ( $6,4 \pm 0,5$ ) (**Tabela 1**).

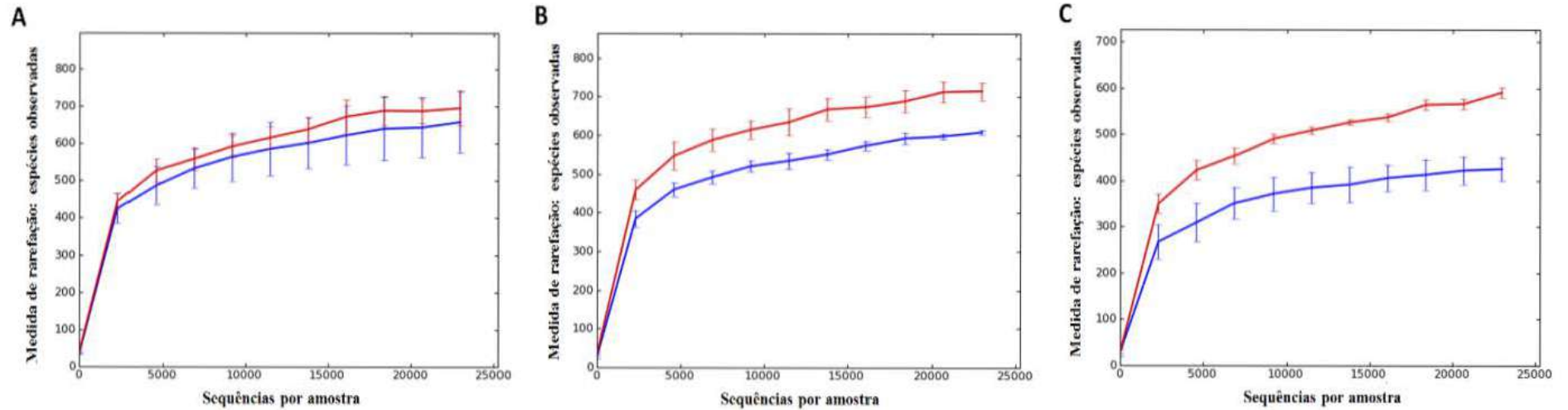
**Tabela 1:** Frequência das comunidades bacterianas pré e pós-treinamento conforme revelado pela análise de pirosequenciamento do gene 16S RNAr.

Amostra	Tratamento	Nº de seqs iniciais	Nº de seqs finais	UTO observadas <sub>(0,03)</sub>	Índice Shannon	Tamanho médio dos reads
<b>Wistar1</b>	pré-treinamento	41,185	26,760	501	6,26	526
<b>Wistar2</b>	pré-treinamento	41,911	23,184	549	7,08	529
<b>Wistar3</b>	pré-treinamento	97,296	57,362	756	7,03	526
<b>SHR1</b>	pré-treinamento	96,930	63,069	631	6,82	525
<b>SHR2</b>	pré-treinamento	86,732	54,951	605	6,37	524
<b>SHR3</b>	pré-treinamento	98,934	68,876	619	6,03	524
<b>ZO1</b>	pré-treinamento	111,659	59,302	410	5,43	523
<b>ZO2</b>	pré-treinamento	64,952	52,432	391	5,79	523
<b>ZO3</b>	pré-treinamento	64,977	44,150	454	6,45	524
<b>Wistar-T1</b>	pós-treinamento	72,145	43,398	624	6,95	527
<b>Wistar-T2</b>	pós-treinamento	92,674	59,077	680	6,94	529
<b>Wistar-T3</b>	pós-treinamento	72,799	44,001	715	6,70	526
<b>SHR-T1</b>	pós-treinamento	90,997	60,669	693	6,91	527
<b>SHR-T2</b>	pós-treinamento	71,630	43,615	723	7,12	525
<b>SHR-T3</b>	pós-treinamento	71,600	47,042	680	6,57	524
<b>ZO-T1</b>	pós-treinamento	82,287	57,836	562	6,56	524
<b>ZO-T2</b>	pós-treinamento	84,030	55,752	574	6,63	521
<b>ZO-T3</b>	pós-treinamento	55,943	37,648	509	6,43	521

**Legenda:** W (rato Wistar pré-treinamento), -TW (rato Wistar pós-treinamento), SHR (rato hipertenso pré-treinamento), SHR-T (rato hipertenso pós-treinamento), ZO (rato obeso Zucker<sup>fa/fa</sup> pré-treinamento), ZO-T (rato obeso Zucker<sup>fa/fa</sup> pós-treinamento), seqs (sequências).

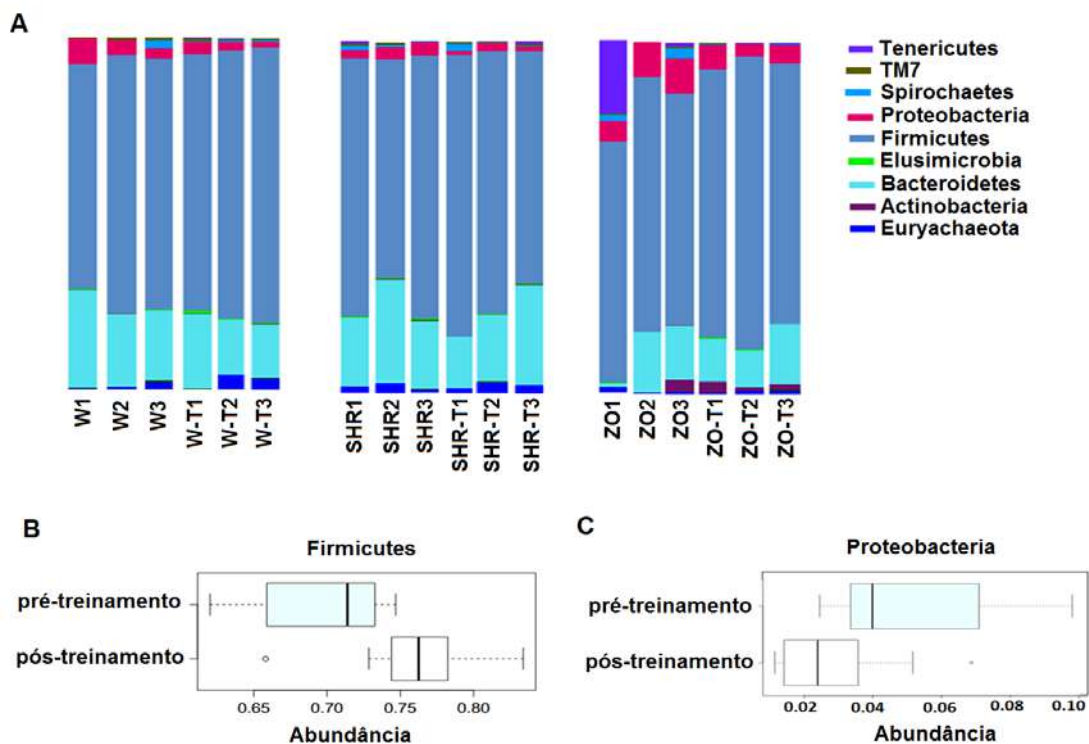
A diversidade bacteriana foi analisada por meio da medição de rarefação observada nas espécies contra o número de sequências por amostra (mínimo de 23.000 sequências de RNAr 16S). Com 97% de UTO observadas, a medida de rarefação mostrou que a diversidade das espécies atingiu o platô de tendência em todas as amostras na medida em que o número de sequências foi aumentado (**Figura 8A**, Wistar; **8B**, SHR; e **8C**, ZO). Este fator indica que o acréscimo de mais sequências iria promover um número reduzido de espécies adicionais ao estudo. Em relação à diversidade das espécies bacterianas presentes em cada amostra no período pré-treinamento (linha azul) e pós-treinamento (linha vermelha), a curva de rarefação relacionada à riqueza de UTO indica que as amostras pós-treinamento apresentam maior diversidade de espécies em relação às amostras coletadas pré-treinamento. Esta relação é mais evidente nos animais hipertensos (SHR) e obesos (ZO), respectivamente (**Figuras 8B e 8C**). As medições de rarefação e o índice *Shannon* indicaram que o treinamento de quatro semanas influenciou positivamente a diversidade bacteriana em todos os grupos experimentais (**Tabela 1 e Figura 8**).

**Figura 8:** Alfa diversidade e curva de rarefação. As curvas de rarefação das amostras fecais apresentam pelo menos 23 mil seqüências de RNAr 16S em cada amostra coletada. Cada linha conecta um número médio e desvio padrão ( $\pm$  DP) correspondente a 97% de similaridade entre as UTO's observadas para ratos Wistar (A), SHR (B) e Zucker obesos (C). As linhas em azul indicam a riqueza das comunidades bacterianas pré-treinamento e as linhas em vermelho, o pós-treinamento.



A **Figura 9** demonstra a abundância relativa observada dos principais filos dominantes presentes nas amostras fecais coletadas pré e pós-treinamento. Por esta análise, foi observado que os filos dominantes foram o Firmicutes e o Bacteroidetes, seguidos pelo filo Proteobacteria. Considerando as três linhagens juntas, a análise pareada das amostras pré vs. pós-treinamento indicou que o filo Firmicutes é mais abundante após o treinamento aeróbico (1,1 vezes;  $p < 0,05$ ) (**Figura 9B**), contrário ao filo Proteobacteria, que apresentou redução após o treinamento (1,8 vezes  $p < 0,05$ ) (**Figura 9C**). Porém, apenas o grupo de ratos com obesidade apresentou aumento significativo (1,1 vezes) na abundância do filo Firmicutes após o treinamento (ZO;  $0,69 \pm 0,03$  vs. ZO-T;  $0,78 \pm 0,04$ ,  $p < 0,05$ ), enquanto o filo Bacteroidetes mostrou-se reduzido (1,3 vezes) com o treinamento apenas no grupo de ratos Wistar (Wistar;  $0,23 \pm 0,04$  vs. Wistar-T;  $0,17 \pm 0,03$ ,  $p < 0,05$ ).

**Figura 9:** Histograma da composição da população da microbiota fecal de ratos não obesos (W), hipertensos (SHR) e obesos (ZO) pré (W1, W2, W3, SHR1, SHR2, SHR3, ZO1, ZO2, ZO3) e pós-treinamento (W-T1, W-T2, W-T3, SHR-T1, SHR-T2, SHR-T3, ZO-T1, ZO-T2, ZO-T3). Distribuição bacteriana avaliada no nível taxonômico filo (A). Os resultados são apresentados para as amostras independentes descritas na Tabela 1, *Boxplots* com diferença de abundância significativa pré e pós-treinamento para os filos Firmicutes (B) e Proteobacteria (C).



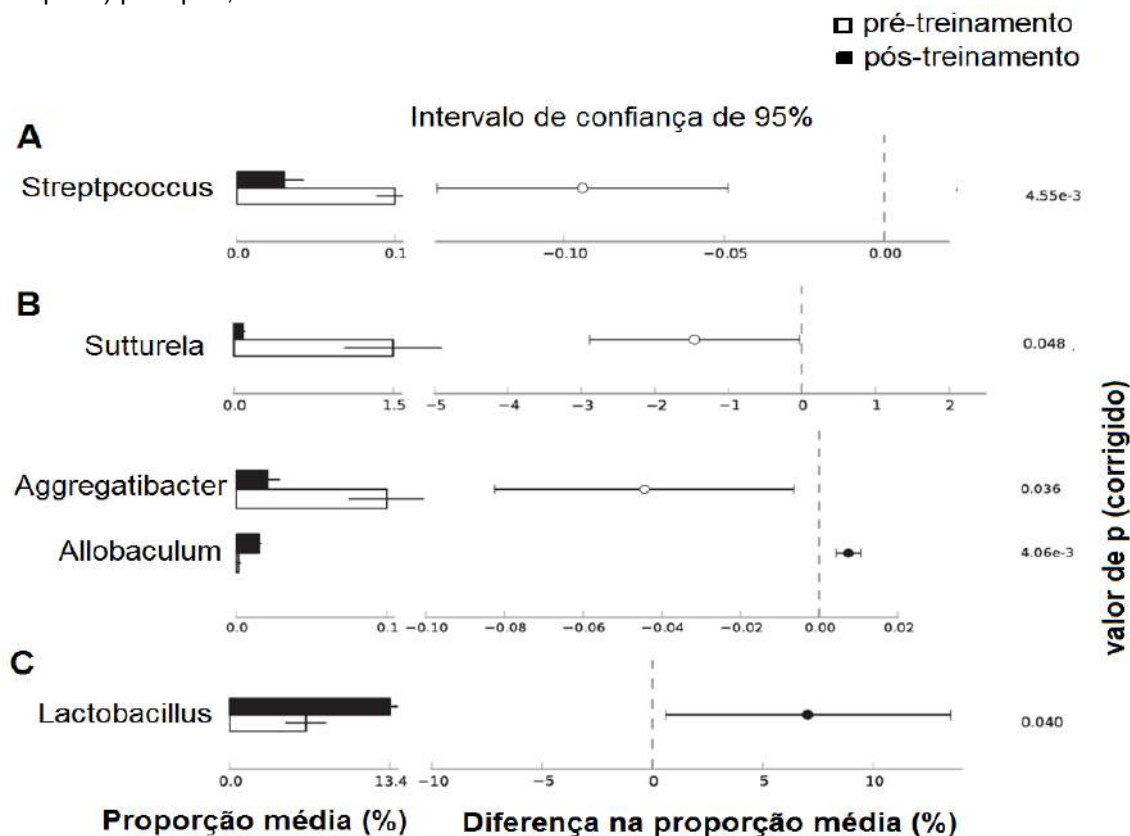
A predominância dos filos Firmicutes e Bacteroidetes é caracterizada de modo geral nos estudos sobre a microbiota intestinal. Neste sentido, esta relação já foi verificada em humanos (108), no cécum de camundongos (99), bem como no intestino de ratos exercitados (29). De modo geral, a obesidade está associada ao empobrecimento da comunidade microbiana no intestino, e à redução do filo Bacteroidetes (6). Porém, uma maior proporção deste filo em relação ao Firmicutes também foi descrita em um estudo envolvendo humanos com sobrepeso e obesidade em relação a indivíduos magros (108). Todavia, esta relação nem sempre é observada, conforme relatado por Harris et al., (92) em seu estudo sobre o efeito de distúrbios metabólicos sobre a microbiota intestinal de indivíduos magros e obesos, onde o autor não observou alterações nestes principais filos. Tem sido argumentado que diferenças na microbiota intestinal em nível de filo bacteriano são raramente observadas. Porém, o presente estudo indicou que possivelmente o treinamento aeróbio e/ou o genótipo patológico foi capaz de promover alterações significativas na diversidade e abundância bacteriana em nível de filo (**Figuras 8 e 9**). Certamente, a relação de causa e efeito se tornou mais significativa quando observada em níveis taxonômicos mais específicos. Deste modo, o presente estudo verificou a relação do efeito do exercício em nível de gênero bacteriano, conforme descrito adiante.

### 6.3 COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE BACTERIANA PRÉ E PÓS-TREINAMENTO

No nível taxonômico correspondente ao gênero, apenas as amostras que apresentaram a variação significativa ( $p < 0,05$ ) na abundância relativa em resposta ao exercício foram consideradas. Em relação aos ratos Wistar, o gênero *Streptococcus* foi o único a apresentar alteração em sua abundância, estando este gênero mais enriquecido nas amostras pré-treinamento ( $p < 0,05$ ) (**Figura 10A**). Nos ratos SHR, os gêneros *Allobaculum*, *Aggregatibacter* e *Sutterella* apresentaram alteração em sua abundância decorrente do efeito do exercício. *Allobaculum* foi o único gênero que apresentou aumento da abundância após o treinamento ( $p < 0,05$ ). De todos os gêneros identificados, o *Sutterella* apresentou a maior abundância relativa (1,5 %,  $p < 0,05$ ), sendo o mais abundante antes do treinamento (**Figura**

**10B).** Em contrapartida, nos animais obesos ZO, o gênero *Lactobacillus* apresentou aumento em sua abundância relativa após o treinamento de quatro semanas (**Figura 10C**).

**Figura 10:** Efeito do exercício sobre a abundância relativa do gênero bacteriano. Proporção de abundância relativa do gênero bacteriano nos ratos Wistar (A), SHR (B) e obesos (C). As alterações significativas dos gêneros estão indicadas como pré-treinamento (barra branca) e pós-treinamento (barra preta) para  $p < 0,05$ .



Em suma, o treinamento alterou significativamente a abundância de cinco gêneros bacterianos (**Figura 10**), onde três deles foram reduzidos após o treinamento (*Streptococcus* – ratos Wistar, *Sutturela* e *Aggregatibacter* – SHR) e dois gêneros apresentam-se mais abundantes após o treinamento (*Allobaculum* - SHR e *Lactobacillus* - ZO). De todos os gêneros, o *Lactobacillus* apresentou maior aumento de abundância relativa, porém, apenas observado no grupo de ratos obesos (13.4%  $p < 0.05$ , **Figura 10C**). Em concordância com o presente estudo, um estudo recente de Queipo-Ortuno et al., (29) revelou que o gênero *Lactobacillus* também foi aumentado em ratos não patológicos submetidos a seis semanas de exercício voluntário. Este gênero faz parte do grupo de bactérias ácido-láticas (BAL)

que estão presentes na superfície da mucosa do intestino delgado e no cólon de animais, produzindo ácido láctico por meio de homo ou heterometabolismo fermentativo (135). Neste segundo processo, além de ácido láctico e gás carbônico, o ácido acético e o etanol também são produzidos (136), o que pode contribuir para um ambiente ainda mais acidificado (136). Tem sido relatado que a presença de BAL no trato gastrointestinal produz benefícios para a saúde, com ações sobre a microbiota intestinal, modulações no sistema imune da mucosa e depleção de agentes patogênicos (135). Neste sentido, o enriquecimento deste gênero em ratos obesos em resposta ao treinamento pode possivelmente influenciar a acidez gastrointestinal por meio da produção de compostos ácidos (ex: ácido láctico, ácido acético). No entanto, este parâmetro não foi verificado no presente estudo. Aqui, o lactato sanguíneo foi medido a fim de se verificar adaptações na capacidade aeróbia, portanto, utilizado como um parâmetro adaptação ao treinamento de quatro semanas. Ademais, o ácido láctico produzido pelas bactérias do gênero *Lactobacilos* é convertido em butirato no intestino pela ação de bactérias como a *B. coccooides* e *E. rectale*, também aumentadas em resposta ao exercício (29). O composto butirato têm sido relacionado à síntese de mucina e à proteção do epitélio intestinal (137). Em um estudo de Matsunomo et al., (30), os autores verificaram a modulação da microbiota intestinal e o aumento da concentração de n-butirado no cécum de ratos exercitados. O aumento de *Lactobacilos* observado nos ratos obesos pode apresentar possivelmente um papel positivo no meio gastrointestinal destes animais. Porém, também tem sido relatado que o fenótipo obeso associado à microbiota intestinal apresenta o enriquecimento da espécie *Lactobacillus reuteri* (138), enquanto as outras espécies (ex: *Lactobacillus gasseri* BNR17) estão envolvidas na regulação do metabolismo (139), apresentando efeitos anti-obesidade (140).

Na presente análise, o gênero *Sutterela* apresentou-se mais abundante em ratos hipertensos antes do treinamento (**Figura 10B**). O papel deste gênero na doença inflamatória intestinal foi recentemente investigado, porém nenhuma relação foi identificada (141). É necessária maior investigação para se estabelecer alguma relação entre a diminuição deste gênero pelo exercício e as respostas fisiológicas desta ação.

Pode-se observar que as alterações nos gêneros identificados não foram consistentes em todos os grupos experimentais deste estudo. Estas inconsistências



podem estar relacionadas com as diferenças biológicas peculiares para cada genótipo utilizado no estudo. Enquanto vários estudos evidenciam a relação da obesidade com a modificação da microbiota intestinal (6, 10), esta relação em fenótipo hipertenso ainda é uma incógnita. Neste sentido, baseado nos dados deste estudo exploratório envolvendo diferentes genótipos, é interessante notar que a microbiota intestinal de três fenótipos diferentes foi modificada, possivelmente, pela ação de um agente externo, no caso, o exercício físico.

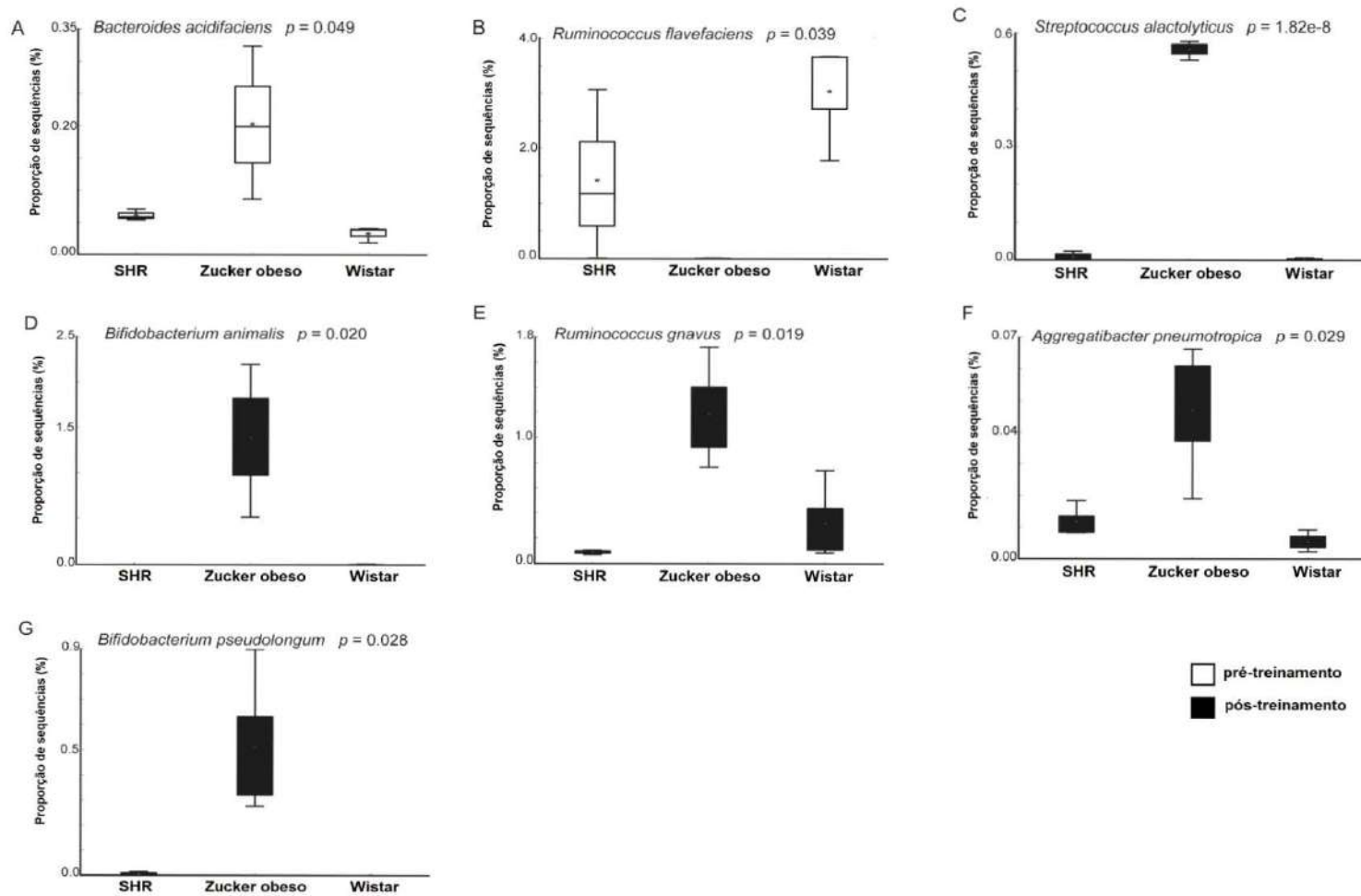
A distribuição das principais espécies bacterianas (em proporção de sequências %) coletadas nas amostras fecais pré- e pós-treinamento está apresentada em *box plot*, onde apenas as espécies com variação significativa em sua abundância relativa ( $p < 0,05$ ) entre os três grupos experimentais foram consideradas. Apenas as espécies *Bacteroides acidifaciens* e *Ruminococcus flavefaciens* foram consideradas nas amostras pré-treinamento (**Figuras 11A e 11B**). Todavia, nas amostras pós-treinamento, seis espécies foram consideradas, sendo elas: *Streptococcus alactolyticus*, *Bifidobacterium animalis*, *Ruminococcus gnavus*, *Aggregatibacter pneumotropica* e *Bifidobacterium pseudolongum* (**Figuras 11C-G**). Entre todas as amostras (pré- e pós-treinamento), foi observado que apenas a espécie *Ruminococcus flavefaciens* apresentou menor abundância no grupo de animais obesos ZO (**Figura 11B**). As demais espécies apresentaram-se mais enriquecidas nos animais obesos (**Figuras 11C-G**). A maioria dessas espécies pertence ao filo Firmicutes (**Figuras 11B-E**), seguidas pelo filo Bacteroidetes (**Figura 11A**), Proteobacteria (**Figura 11F**) e Actinobacteria (**Figura 11G**).

No que diz respeito às amostras coletadas no período pré-treinamento, a proporção de sequências da espécie *Bacteroides acidifaciens* foi significativamente mais abundante no grupo ZO do que nos ratos Wistar e SHR ( $p < 0,05$ ) (**Figura 11A**). No entanto, um perfil oposto foi observado em relação às sequências atribuídas à espécie *Ruminococcus flavefaciens*, com maior abundância observada no grupo de ratos Wistar seguido pelo SHR, porém ausente nos ratos ZO ( $p < 0,05$ ) (**Figura 11B**).

Nas amostras coletadas após o treinamento físico, as análises em relação à proporção de sequências indicam que todas as espécies listadas (*Streptococcus alactolyticus*, *Bifidobacterium animalis*, *Ruminococcus gnavus*, *Aggregatibacter pneumotropica* e *Bifidobacterium pseudolongum*) foram mais abundantes nos ratos ZO em comparação aos ratos Wistar e SHR (**Figuras 11C-G**,

respectivamente). A abundância relativa da espécie *Streptococcus alactolyticus* nos ratos obesos ZO divergiu significativamente dos grupos SHR e Wistar ( $p < 0,05$ ), onde uma proporção reduzida de sequências foi observada em ambas as linhagens (**Figura 11C**). Também pertencente ao filo Firmicutes, a espécie *Bifidobacterium animalis* apresentou-se amplamente enriquecida nos animais obesos e praticamente ausente em abundância nos ratos Wistar e SHR ( $p < 0,05$ ) (**Figura 11D**). Em relação à *Ruminococcus gnavus*, essa espécie apresentou abundância reduzida nos ratos Wistar, e estava ausente nos ratos SHR, sendo abundantemente enriquecida nos animais obesos ZO (**Figura 11E**). A espécie *Aggregatibacter pneumotropica* apresentou um perfil semelhante ao da espécie *Ruminococcus gnavus*, sendo também mais abundante nos ratos obesos ZO em comparação aos ratos não obesos (Wistar) e hipertensos (SHR) ( $p < 0,05$ ) (**Figura 11F**). Por fim, a espécie *Bifidobacterium pseudolongum* pertencente ao filo Actinobacteria apresentou uma abundância quase exclusiva ao grupo ZO ( $p < 0,05$ ), apresentando-se praticamente ausente nos ratos Wistar e SHR (**Figura 11G**).

**Figura 11:** Perfil das espécies com abundância diferencial entre as três linhagens de ratos. *Box plot* indicando a distribuição em proporção das espécies com abundância diferencial entre as três linhagens de ratos pré (branco) e pós-treinamento (preto) para  $p < 0,05$ .



O papel da espécie *B. acidifaciens* na produção de imunoglobulina (IgA) no intestino grosso de ratos foi recentemente demonstrado por Yanagibashi et al., (142), onde esta produção desempenha papel adaptativo do sistema imune da mucosa intestinal (143). Uma vez que a IgA é aumentada em desordens metabólicas (143), a abundância relativa de *Bacteroides acidifaciens* em ratos obesos (**Figura 11A**) pode ser associada ao papel da microbiota intestinal na sinalização pró-inflamatória peculiar à obesidade (144). A bactéria *Ruminococcus flavefaciens*, é uma espécie normalmente encontrada no rúmen de mamíferos. No presente estudo, esta bactéria apresentou-se mais abundante no período pré-treinamento, se mostrando ausente nos animais obesos (**Figura 11B**). A inibição desta espécie foi observada em ratos jovens em resposta à suplementação probiótica com *L. acidophilus* NCFM (145). Aparentemente, pode-se inferir que o fenótipo obeso pode estar associado a fatores negativos para a proliferação dessa espécie em particular.

Em contraste com o presente resultado, a gênero *Bifidobacterium* é freqüentemente associada a fenótipos não-obesos (95). No entanto, esta espécie foi observada apenas no grupo de animais obesos (**Figura 11D**). Em relação à abundância relativa de espécie *Ruminococcus gnavus* em ratos obesos, esta bactéria é reconhecida por ter um efeito antibacteriano e protetor contra patógenos (146), também encontrada em níveis reduzidos em câncer de cólon (147). Porém, um aumento em sua abundância tem sido observado em eventos de diverticulite (148), o que é normalmente associado à obesidade (149). Por fim, a espécie *Bifidobacterium pseudolongum* também foi observada quase que exclusivamente presente nos ratos com obesidade (**Figura 11G**). O aumento na abundância desta espécie foi verificado em ratos obesos induzidos por dieta e probióticos quando comparado a ratos sem suplementação de probióticos (150).

#### 6.4 ANÁLISES POR COORDENADAS PRINCIPAIS (PCOA)

A análise de coordenadas principais (PCoA) das distâncias UniFrac *unweighed* foi calculada e comparada entre todas as amostras fecais coletadas pré e pós-treinamento dos três grupos experimentais para se observar as similaridades na composição da microbiota e também o efeito do exercício na comunidade

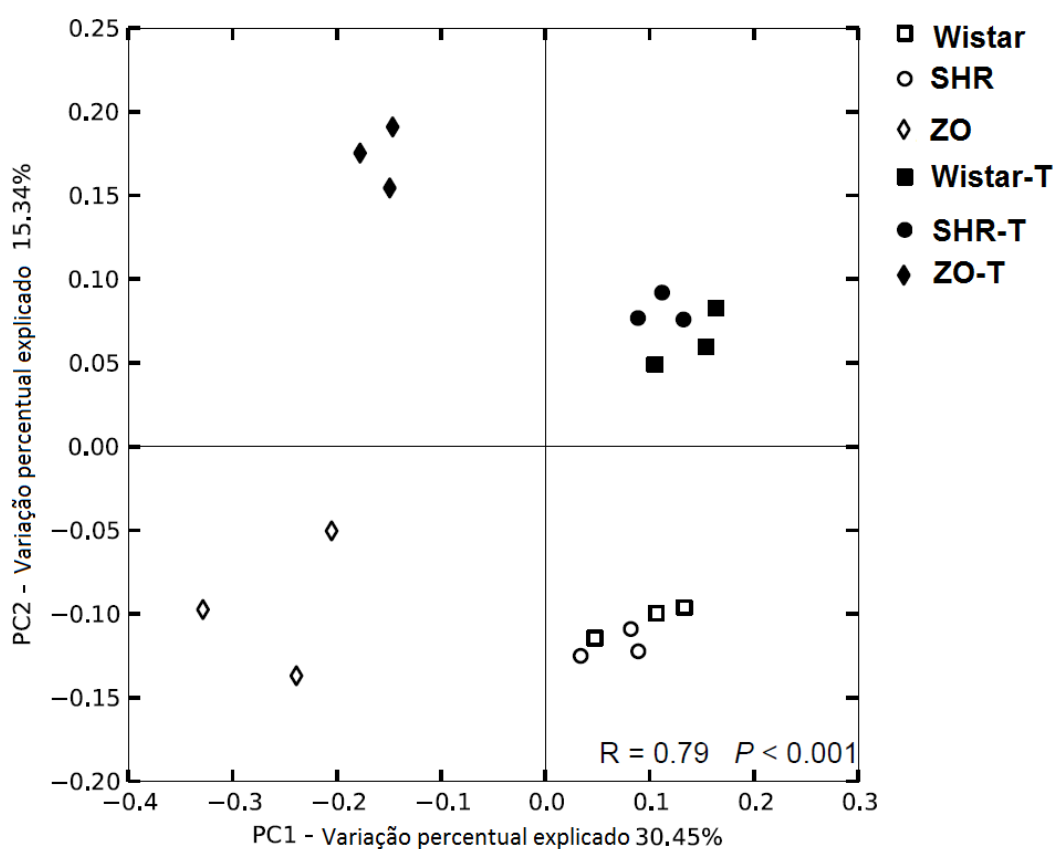
microbiana (**Figura 12**). Todas as réplicas biológicas pertencentes a cada grupo experimental (Wistar, SHR e ZO) foram agrupadas, apresentando uma alta correlação entre si ( $R=0,79$ ,  $P<0,001$ ). As amostras fecais coletadas pré-treinamento (símbolos brancos) foram plotadas no quadrante inferior, onde a análise de distância *Unifarc* (PcoA) indicou que os ratos pertencentes às linhagens Wistar e SHR compartilham uma composição microbiana similar. Todavia, estes animais apresentam-se agrupados distante dos ratos obesos OZ, indicando uma composição distinta na comunidade bacteriana entre estes grupos (**Figura 12**).

As análises PcoA também indicaram que a microbiota dos animais Wistar, SHR e ZO foram significativamente alteradas pelo treinamento de quatro semanas com intensidade moderada. Novamente, todas as amostras pré-treinamento (símbolos brancos) apresentaram-se agrupadas significativamente distantes das amostras pós-treinamento (símbolos pretos). Todavia, mesmo após a alteração na microbiota decorrente do exercício, as linhagens de ratos Wistar e SHR apresentaram composição similar em sua comunidade bacteriana, mantendo-se distintas dos ratos obesos (**Figura 12**, símbolos pretos).

A análise PCoA apresentada neste estudo (**Figura 12**) está em consonância com outros estudos que também relataram uma distinção entre a microbiota de ratos Zuckers obesos e não-obesos (151) e camundongos obesos e não-obesos (6). Também foi relatado por este estudo que ratos Wistar e SHR compartilham composição similar entre suas microbiotas intestinais (**Figura 12**). De modo semelhante, foi relatado que ratos tratados com um inibidor da síntese do óxido nítrico NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) desenvolveram hipertensão, apresentando alterações na microbiota do cécum em comparação com ratos de controle normotensos (152). Em relação ao efeito do exercício, a análise PCoA demonstrou que quatro semanas de treinamento aeróbio moderado alterou significativamente a composição da microbiota em todas as linhagens de ratos (**Figura 12**). Em acordo com este resultado, outros programas de exercício envolvendo diferentes volumes (seis dias (29), 5 semanas (30) e 12 semanas (134) de corrida voluntária), também modificaram a composição da microbiota intestinal de ratos. Assim como observado em resposta à dieta (31), estes dados indicam que a comunidade microbiana pode responder rapidamente ao exercício, mesmo que não realizado cronicamente. Juntos, estes dados sugerem que além de outros fatores já

bem conhecidos como dieta, fármacos e doenças, o exercício pode ser visto como um novo agente externo capaz de modular significativamente a microbiota intestinal de animais patológicos e não patológicos. Recentemente, esta relação também foi verificada em humanos atletas (31).

**Figura 12:** Efeito do treinamento sobre a comunidade bacteriana. A análise de coordenadas principais (PCoA) das distâncias *UniFrac unweighed* foi gerada com as sequências obtidas pelas amostras dos ratos não obesos (Wistar – quadrados), hipertensos (SHR - círculos) e obesos (ZO – losango) pré-treinamento (símbolos em branco) e pós-treinamento (símbolos em preto seguido da letra “T”). A análise de similaridade ANOSIM foi usada para confirmar a distinção da comunidade bacteriana entre as três linhagens de ratos.



## 6.5 CORRELAÇÃO DA ABUNDÂNCIA DE BACTÉRIAS E CONCENTRAÇÃO DE LACTATO

Após quatro semanas de treinamento, todos os animais foram submetidos a um novo teste de identificação da MFEL para avaliação da melhora na capacidade aeróbia resultante do treinamento realizado na intensidade correspondente a MFEL

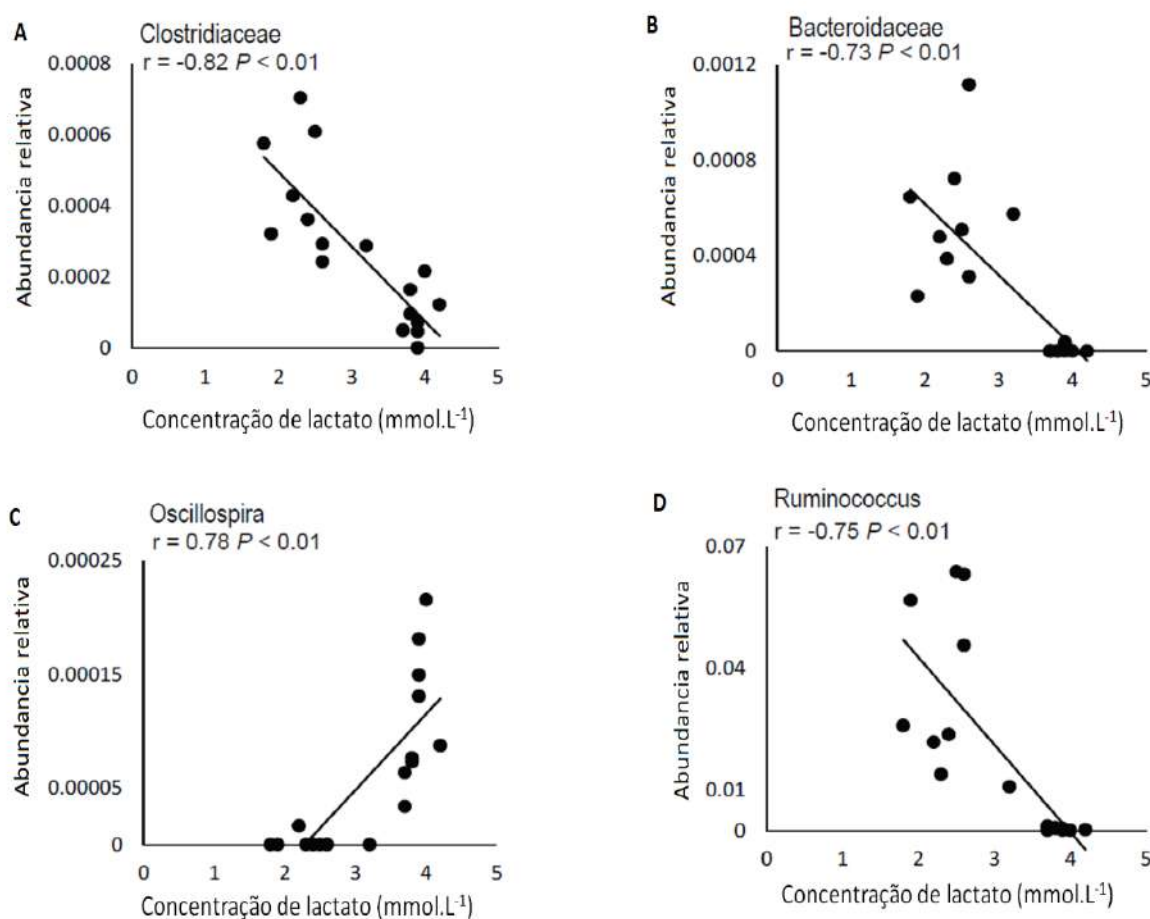
previamente identificada (12,5 m.min<sup>-1</sup> para ZO e 20 m.min<sup>-1</sup> para Wistar e SHR) (120, 121). Conforme demonstrado na **Figura 7A**, ao se comparar as velocidades inicial e final do treinamento foi observada uma redução significativa na concentração de lactato sanguíneo (CLS) em todas as linhagens de ratos. Desta forma, a CLS reduzida (médias de 2,3 mmol.L<sup>-1</sup>, **Figura 7B**) está associada à melhoria da capacidade aeróbia dos ratos treinados quando comparada a uma maior CLS (3,8 mmol.L<sup>-1</sup>) dos ratos não treinados. Deste modo, as comunidades bacterianas fecais foram plotadas contra a concentração de lactato sanguíneo pré e pós-treinamento para se estabelecer uma possível correlação entre a abundância microbiana e o estado de condicionamento aeróbio (**Figura 13**).

As UTOs correspondentes a duas famílias bacterianas (Clostridiceae e Bacteroidaceae) e a dois gêneros (*Oscillospira* e *Ruminococcus*) apresentaram uma correlação significativa com a concentração de lactato ( $p < 0,05$ ) (**Figura 13**). A abundância das UTOs pertencentes a ambas as famílias bacterianas foi negativamente correlacionada com a CLS (Clostridiaceae,  $r = -0,82$ ,  $p < 0,01$ ; Bacteroidaceae,  $r = -0,73$ ,  $p < 0,01$ ). Em ambos os casos, uma maior abundância bacteriana foi observada correlacionando-se com uma menor CLS, indicando que o treinamento pode ser favorável para a proliferação destas UTOs pertencentes a ambas as famílias bacterianas (**Figuras 13A e 13B**). Em relação às UTOs pertencentes a família Bacteroidaceae, a abundância relativa das mesmas é próxima de zero quando a CLS é correspondente a ~ 4 mmol.L<sup>-1</sup> (**Figura 13B**) e associada ao pré-treinamento. No entanto, este resultado não reflete a depleção de toda a família Bacteroidaceae e sim, possivelmente, de uma UTO específica desta família, ausente para esta concentração de lactato.

Em relação à abundância relativa das UTOs pertencentes aos gêneros, *Oscillospira* e *Ruminococcus*, estes apresentaram correlação oposta uma da outra em relação à CLS (**Figuras 13C-D**). As UTOs correspondentes à *Oscillospira* apresentaram uma correlação positiva com a CLS ( $r = 0,78$ ,  $P < 0,01$ ), contrário das UTOs correspondentes ao gênero *Ruminococcus*, que foram correlacionados negativamente ( $r = -0,75$ ,  $P < 0,01$ ) (**Figuras 13C e 13D**). As UTOs do gênero *Oscillospira* apresentam-se quase que ausentes nas CLS mais reduzidas, porém com aumentos de abundância em CLS maiores que 3,5 mmol.L<sup>-1</sup>. Esta correlação parece indicar que o treinamento físico pode ser visto como um fator desfavorável

para a proliferação de UTO específica deste gênero no meio intestinal (**Figura 13C**). No entanto as UTOs do gênero *Ruminococcus* demonstraram maior abundância mediante às baixas CLS. Todavia, a abundância de UTOs deste gênero diminuiu significativamente quando CLSs se encontrava em  $\sim 4 \text{ mmol.L}^{-1}$ .

**Figura 13:** Correlação da abundância relativa das comunidades microbianas e concentração de lactato sanguíneo ( $\text{mmol.L}^{-1}$ ). O perfil da microbiota intestinal foi determinado pelo pirosequenciamento do gene 16S RNAr em amostras fecais de ratos Wistar, SHR e obesos. O coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) foi utilizado onde são indicados os valores corrigidos de  $P < 0,05$  para cada taxonomia apresentada.



No presente estudo, a MFEL foi usada para avaliar a melhora na capacidade aeróbia em resposta a quatro semanas de treinamento físico em intensidade moderada (13). Assim, após o treinamento, uma redução significativa na CLS foi observada em todas as linhagens de ratos (**Figura 7B**), o que é associado a uma melhora na capacidade aeróbia destes animais. As UTOs das famílias de



*Oscillospira* e *Ruminococcus* foram negativamente correlacionadas com a CLS (Clostridiaceae,  $R = -0,82$ ,  $P < 0,01$  e Bacteroidaceae,  $R = -0,73$   $P < 0,01$ ), assim como as UTOs do gênero *Ruminococcus* ( $R = -0,75$   $P < 0,01$ ). Nestes três casos, a maior abundância relativa de UTO observada em ambas as famílias se correlaciona com uma menor CLS, indicando que o treinamento físico pode ser favorável para a proliferação destas UTOs específicas (**Figuras 13A, B e D**). Diferentemente, as UTOs referentes à *Oscillospira* apresentaram correlação positiva com a CLS ( $R = 0,78$ ,  $P < 0,01$ ) (**Figura 13C**). Observa-se que a abundância relativa destas UTOs aumenta quando a concentração de lactato ultrapassa  $\sim 3,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Uma vez que uma menor CLS durante o teste de MFEL pode ser associada a um status mais adaptado ao treinamento, esse resultado indica que possivelmente o treinamento gera alterações na abundância da Unidade Taxonômica Operacional deste gênero.

## 7. CONCLUSÃO

Estes achados sugerem que o treinamento físico é capaz de alterar a microbiota intestinal em nível de gênero, com alteração significativa na composição e diversidade bacterianas, sendo esta modificação independente do genótipo e fenótipo aqui investigados. A alteração na abundância de determinados gêneros como *Lactobacillus* pode indicar um possível mecanismo de reestruturação da microbiota intestinal de indivíduos obesos. A similaridade na composição da microbiota de ratos Wistar e hipertensos, contrário a ratos obesos, reforça os achados que evidenciam a obesidade como um forte componente modulador da microbiota intestinal. Diferenças na abundância de espécies bacterianas entre os três grupos experimentais possivelmente indica que o genótipo pode apresentar uma assinatura bacteriana característica, onde por estes dados, a obesidade exerce forte influência. Por fim, o efeito do treinamento e do condicionamento físicos, aqui avaliados pela CLS, pode estar relacionado a modificações fisiológicas no meio intestinal, favorecendo ou inibindo a proliferação bacteriana, conforme observado pelas UTOs das famílias Clostridiaceae e Bacteroidaceae e dos gêneros *Oscillospira* e *Ruminococcus*. Este é o primeiro estudo a usar parâmetros controlados de intensidade de exercício para a verificação da influência do treinamento aeróbio sobre a diversidade e composição da microbiota intestinal de ratos obesos, hipertensos e não patológicos. No entanto, o efeito do exercício sobre a acidez do lúmen ou amostras fecais não foi verificado, o que limita o estabelecimento de uma possível relação entre o exercício e a alteração intestinais por acidificação do meio. Assim, mais estudos são necessários para verificar se estas modificações apresentam implicações terapêuticas para a obesidade ou tratamento da hipertensão por meio da indução de espécies bacterianas com potencial de restabelecer a microbiota intestinal com os probióticos. A confirmação do exercício com este potencial implicaria no aumento de estratégias para o tratamento clínico da obesidade e patologias associadas à disfunção microbiana.

**BERNARDO PETRIZ DE ASSIS**

**EFEITO DO TREINAMENTO AERÓBIO EM INTENSIDADES DISTINTAS SOBRE  
O PROTEOMA CARDÍACO DE MODELO ANIMAL HIPERTENSO**

**Volume 2**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Strictu Senso* em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, como pré-requisito para obtenção do Título de Doutor em Ciências Genômicas e Biotecnologia.

Orientador: Dr. Octávio Luiz Franco

Co-orientador: Dr. André Melro Murad

**Brasília  
2014**

## 8. MATERIAL E MÉTODOS

### 8.1 ANIMAIS E ADAPTAÇÃO AO TREINAMENTO

Foram utilizados para este estudo 15 ratos machos da espécie *Rattus norvegicus* espontaneamente hipertensos (SHR), com 21 semanas de vida provenientes do biotério da Universidade Federal de São Paulo. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (cinco animais por gaiola). A temperatura do biotério foi mantida em média de 23°C ( $\pm$  2°C) e a luz do ambiente controlada em ciclos de 12 h (claro/escuro). Os animais foram alimentados com ração padrão para roedores Labina (Purina) e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram conduzidos de modo supervisionado e os cuidados com os animais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no uso animal (CEUA), UnBDOC nº 48695/2010.

Previamente, foi realizada a separação dos grupos de treinamento e controle e todos os animais foram submetidos a um processo inicial de aclimação e adaptação à esteira rolante (Li 870, *Letica Scientific Instruments*, Espanha), conforme descrito anteriormente no **item 5.2**. A aclimação consistiu em deixar os animais na esteira parada por 10 a 30 min por dia durante cinco dias. Posteriormente, os animais foram adaptados à esteira em movimento por duas semanas, com tempo e velocidade iniciais de 10 min a 10 m.min<sup>-1</sup>, com progressão gradativa para 12 min a 15 m.min<sup>-1</sup>, e por fim, a 15 min a 20 m.min<sup>-1</sup>, conforme descrito por Contarteze et al., (153). Após o período de adaptação, os animais foram separados e divididos em três grupos; grupo controle (SHR-C; n=5), grupo de treinamento em baixa intensidade (SHR-B; n=5) e grupo de treinamento em alta intensidade (SHR-A; n=5).

### 8.2 TREINAMENTO E TESTE INCREMENTAL

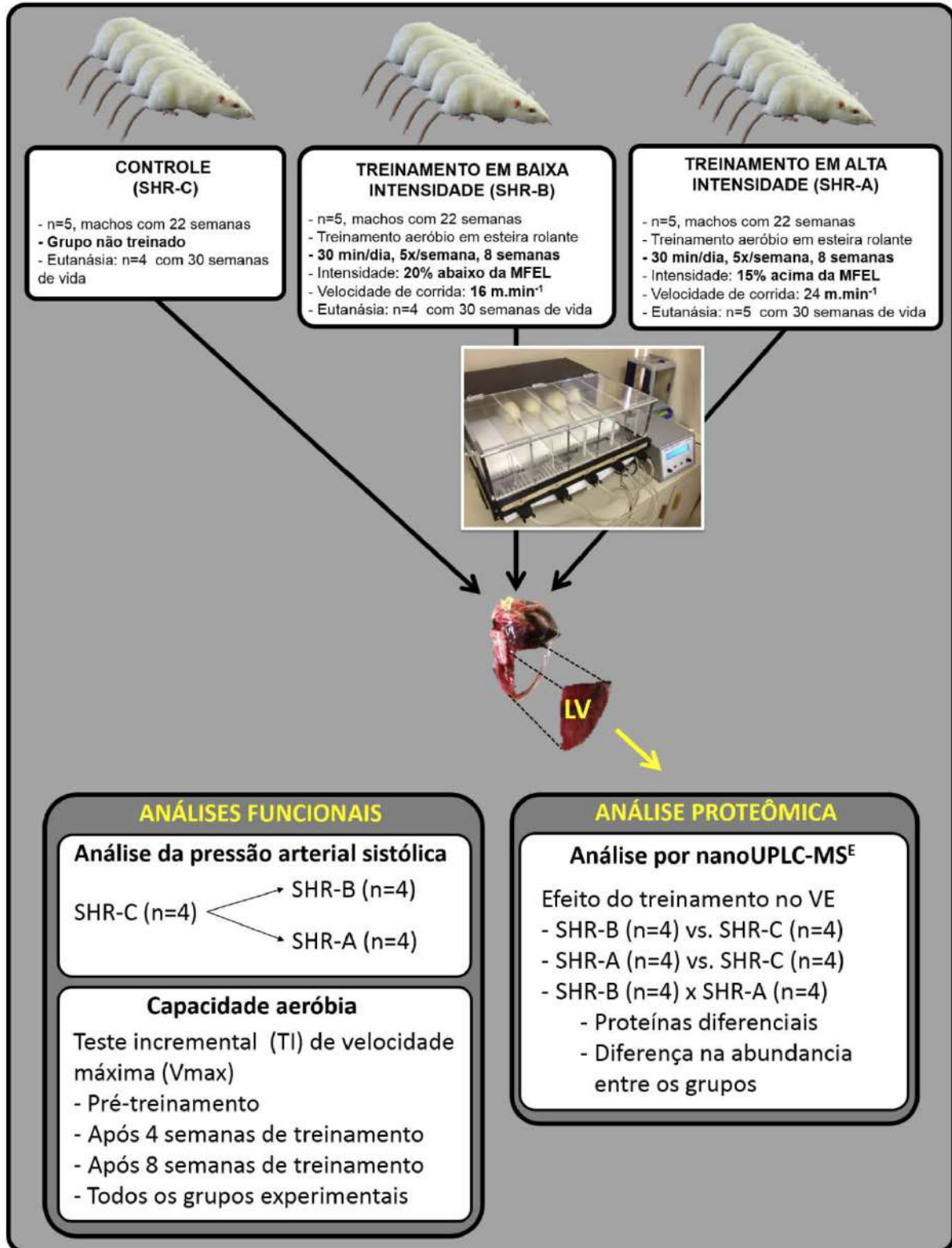
As intensidades de treinamento foram selecionadas com base na determinação da máxima fase estável de lactato (MFEL) previamente identificada em ratos SHR com velocidade correspondente a 20 m.min<sup>-1</sup> (154). Considerado a

MFEL como uma intensidade moderada de treinamento, foi estabelecida como baixa intensidade uma velocidade correspondente a 20% abaixo do MFEL ( $16 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ ), e, para o treinamento de alta intensidade, uma velocidade correspondente a 15% acima da MFEL ( $24 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Deste modo, os animais do grupo SHR-B e SHR-A treinaram em suas respectivas intensidades, sendo 30 min por dia, 5 dias por semana, durante 8 semanas. Ao final da 4ª semana de treinamento, as intensidades de treinamento de ambos os grupos foram ajustadas por meio de um teste incremental de velocidade máxima (TI), realizado por meio de incrementos de  $3 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$  a cada 3 min, a partir da velocidade inicial de  $8 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$  até a exaustão do animal, conforme descrito por Rodrigues et al., (155). Os animais do grupo controle também foram submetidos ao TI. O mesmo teste foi repetido ao final da 8ª semana de treinamento para a verificação da capacidade aeróbia de todos os animais. O desenho experimental do presente estudo está apresentado em forma esquemática na **Figura 14**.

### 8.3 AFERIÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA

Todos os animais foram submetidos à aferição da pressão arterial sistólica (PAS) antes período de treinamento e ao final das oito semanas de treinamento em baixa e alta intensidade. A pressão arterial sistólica foi aferida pelo método não invasivo de esfigmomanometria, adaptada a roedores (Panlab *NIPB system*®, Barcelona – Espanha). Todos os animais foram previamente sedados com xilazina 2% ( $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) e cetamina 10% ( $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) intraperitoneal, e alocados dentro de um aparato de contenção, permitindo a estabilização do animal para a alocação do sensor automático de aferição. Uma média de oito aferições foi realizada em cada animal, sendo as três primeiras descartadas.

**Figura 14:** Desenho experimental do projeto sobre o efeito do treinamento em baixa e alta intensidade no proteoma do ventrículo esquerdo de modelo animal hipertenso (SHR). Caracterização das amostras, da intensidade de treinamento e as análises propostas ao presente projeto. TI (teste incremental). Vmax (velocidade máxima), LV (ventrículo esquerdo).



#### 8.4 EXTRAÇÃO TECIDUAL

Vinte quatro horas após a última sessão de exercício, todos os animais foram sedados com xilazina 2% (50 mg.kg<sup>-1</sup>) e cetamina 10% (80 mg.kg<sup>-1</sup>) intraperitoneal e, posteriormente, sacrificados por meio de torção cervical. O tecido cardíaco de cada animal foi retirado, pesado e alocado em recipiente com tampão fosfato salino resfriado, onde o ventrículo esquerdo foi dissecado, pesado e imediatamente congelado em nitrogênio líquido e, posteriormente, estocado à -80 °C para análise proteômica.

#### 8.5 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO PROTEICA

As proteínas solúveis do ventrículo esquerdo foram extraídas de acordo com o protocolo descrito por Comunian et al., (86), conforme descrito a seguir. O ventrículo esquerdo dos grupos SHR-C (n=4; 0,14 ± 0,02 g), SHR-B (n=4; 0,13 ± 0,02 g) e SHR-A (n=4; 0,12 ± 0,01 g) foram homogeneizados individualmente em tampão de extração resfriado contendo 300mM de sacarose, 10 mM de Tris, 2 mM de EDTA, 10 mM de DTT, 1 mM de PMSF e 0,1 % de SDS. Inicialmente, as amostras foram pulverizadas em nitrogênio líquido e, posteriormente, homogeneizadas a uma proporção de 0,150 g de tecido por 0,5 mL de tampão de extração (peso/volume). Após este processo, o homogeneizado foi centrifugado a 1000 g por 10 min. Após a centrifugação, o supernadante foi coletado e concentrado em *speedvac* (Labconco, EUA). Após o processo de concentração, as amostras foram ressuspensas em bicarbonato de amônia a 100 mM e solução *RapiGest*<sup>™</sup> a 0,5 % (Waters, Manchester, UK) e aquecidas a 95 °C, por 5 min, para a extração das proteínas de membrana. Posteriormente, as amostras foram submetidas ao processo de quantificação proteica por meio do método fluorimétrico *Qubit*® (Life Technologies, Carlsbad, USA) em temperatura ambiente. A concentração proteica final de cada amostra foi ajustada para 50 µg para o processo de digestão triptica.

## 8.6 DIGESTÃO DE PROTEÍNA PARA AQUISIÇÃO NANOUPLC-MS<sup>E</sup>

Cinquenta microlitros de cada amostra a uma concentração padrão de 1  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  foi colocada em tubos de micro centrífuga, onde 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{NH}_4\text{HCO}_2$  50 mM (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) foram adicionados. Em seguida, 25  $\mu\text{L}$  de solução *RapiGest* (0,2% v/v) (Waters, Manchester, UK) foram adicionados e o conteúdo foi levado ao agitador (Daigger<sup>®</sup>, EUA). Posteriormente, os tubos foram aquecidos a 80 °C, por 15 min e centrifugados por 15 s. Foram adicionados 2,5  $\mu\text{L}$  de dithiothreitol (DTT) 100 mM (GE *Healthcare*, EUA) e, em seguida, as amostras foram levadas ao agitador (Diagger<sup>®</sup>, EUA). Na sequência, os tubos foram aquecidos a 60 °C, por 30 min, e deixados para resfriar em temperatura ambiente, seguido por outra centrifugação de 15 s. Posteriormente, foram adicionados 2,5  $\mu\text{L}$  iodoacetamida 300 mM (GE *Healthcare*, EUA) e as amostras foram novamente agitadas (Diagger<sup>®</sup>, EUA). Em seguida, as amostras foram deixadas, por 30 min, em ambiente escuro a temperatura ambiente. Após este período, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de solução tríplica (Promega, Madison, EUA), em  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e esta, encaminhada ao agitador (Diagger<sup>®</sup>, EUA). O processo de digestão ocorreu a 37 °C, por 12 h. Em seguida à digestão, para precipitação do surfactante, 10  $\mu\text{L}$  de ácido trifluoroacético 5% (Mallinckrodt, EUA) foram adicionados às amostras e estas, levadas ao agitador (Diagger<sup>®</sup>, EUA). As amostras foram incubadas a 37 °C, por 90 min e, em seguida, centrifugadas a 20.000 g, a 6 °C, por 30 min e o sobrenadante, transferido para um frasco de 12x32 mm (Waters, Manchester, UK). Por último, as amostras foram evaporadas em concentrador a vácuo (Labconco, EUA). Após a total secagem das amostras, foram adicionados 190  $\mu\text{L}$  de formato de amônio (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), e 10  $\mu\text{L}$  de padrão de digestão proteica de beta fosforilase (PhosB) (*MassPREP Digestion Standart PhosB*) (Waters, Milford, USA) a 50  $\text{fmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , conforme descrito e adaptado por Murad et al., (156). A concentração final de proteína foi de 0,5  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  e a concentração final de beta fosforilase foi de 50  $\text{fmol}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ .



## 8.7 AQUISIÇÃO EM NANOUPLC-MS<sup>E</sup>

A separação em nano escala dos fragmentos tripticos do extrato foi executada utilizando-se um sistema cromatográfico *nanoACQUITY™ system* (Waters Corp, Milford, USA) com tecnologia 2D por diluição. A primeira dimensão (1D) foi realizada utilizando uma coluna *XBridge™ 300x50 mm nanoEase™ BEH130 C18* com 5  $\mu\text{m}$  de partícula. A segunda dimensão (2D) foi realizada utilizando-se uma pré-coluna *Symmetry C18 5  $\mu\text{m}$ , 5 mm x 300  $\mu\text{m}$*  e uma coluna analítica *HSST3 C18 1.8  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$  x 150 mm*, ambas de fase reversa (Waters Corp, Milford, USA). Na 1D, a fase móvel A foi uma solução de 20 mM de formato de amônio, e a fase móvel B foi acetonitrila. Na corrida 2D, a fase móvel A foi uma solução de 0,1 % de ácido fórmico em água, e a fase móvel B foi 0,1 % de ácido fórmico em acetonitrila. Duas corridas foram feitas. Na primeira corrida, foi simulando apenas uma dimensão em 70 min para checar as condições da digestão e uma quantificação inicial da amostra. A segunda corrida, foi utilizando a segunda dimensão, usando 5 frações, totalizando 5 horas de corrida. Para a primeira corrida, 2  $\mu\text{L}$  da amostra foram transferidos para 1D em 0,5 min com um fluxo de 2  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  e 0,1 % B. Os peptídeos foram eluídos da 1D em um fluxo de 2  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  e 65 % da fase móvel B por 4 min e diluídos na pré coluna da 2D, com 0,1 % solução de ácido fórmico, em um fluxo de 20  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  por 20,5 min. Os peptídeos foram eluídos da coluna analítica usando um gradiente de 7 a 40 % da fase móvel B em 54 min em um fluxo de 500  $\eta\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ , seguido de uma lavagem, por 10 min, com 85% de B. A coluna foi reequilibrada às condições iniciais por 10 min. A temperatura da coluna foi mantida a 35°C. A massa de correção *lockmass* Glu-fibrino peptídeo (GFP) foi injetada no *spray* de referência *NanoLockSpray* do espectrômetro de massa utilizando o sistema fluídico do SynaptG2 com fluxo constante de 500  $\eta\text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  em uma concentração de 320 fmol da GFP. Após a aquisição, as amostras foram quantificadas utilizando o método descrito a seguir e a segunda corrida foi realizada ajustando-se o volume da injeção para que a concentração de amostra em todas as condições fosse de 500  $\eta\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . As amostras foram inicialmente transferidas para a coluna da 1D em 0,5 min à 2  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  e 0,1 % B. Os peptídeos da primeira fração foram eluídos da 1D à 2  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$  e 10,8 % de B por 2 min e diluídos na pré-coluna da 2D usando 0,1 % solução de ácido fórmico em um fluxo de 10  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ , por 8,5 min. Os peptídeos foram

separados usando-se um gradiente de 7-35 % de fase móvel B, por 37 min, em um fluxo de 500  $\mu$ L.min<sup>-1</sup>, seguido de uma lavagem de 5 min com 85 % de fase móvel B. A temperatura da coluna foi mantida a 35°C. Os peptídeos da segunda, terceira, quarta e quinta frações foram eluídos utilizando 14, 16,7, 20,4 e 50 % de fase móvel B, respectivamente. As condições da diluição, fluxo e separação na 2D foram as mesmas da primeira fração. A massa de correção GFP foi injetada em todas as frações nas mesmas condições já descritas. Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

Os peptídeos trípticos foram analisados usando-se um espectrômetro de massa *Synapt G2 HDMS*<sup>TM</sup> (Waters, Manchester, UK) com um híbrido quadrupolo/mobilidade iônica/ortogonal com aceleração *time off light* (ao-TOF). Para todas as análises, o espectrômetro foi operado em modo positivo, utilizando-se um *nanoSpray* e com resolução de no mínimo 20.000 *full-width half-maximum* (FWHM). O analisador foi calibrado externamente utilizando as massas dos íons b+ e y+ da GFP com m/z de 50 até 1990 e com correção pós-aquisição, utilizando-se o valor de m/z da dupla carga do precursor de GFP  $[M + 2H]^{2+} = 785.8426$ . A massa do íon de referência foi amostrada com intervalos de 30s. As massas exatas por tempo de retenção (*Exact mass retention time*; EMRT) de nanoLC-MS<sup>E</sup> foram adquiridas em aquisição independente, alternando de baixa para alta energia. O espectro contínuo foi coletado, em cada modo, em 1,5 s com um atraso de *scan* de 0,1 s. Em modo de baixa energia (*MS mode*), foi usado 3 eV de energia de colisão constante. Em modo de energia elevada (*fragmentation*), foi usada uma rampa de 12 a 45 eV durante o 1,5 s de *scans*. A rádio frequência do quadrupolo foi ajustada para que íons com m/z entre 50 e 2000 fossem transmitidos eficientemente, garantindo que íons menores que 50 m/z fossem provenientes da separação dentro da célula de colisão *T-wave TRAP* (156).

## 8.8 PROCESSAMENTO DE DADOS E IDENTIFICAÇÃO PROTEICA

Os espectros de massa (MS) obtidos do nanoUPLC-MS<sup>E</sup> foram processados utilizando-se o *software Protein Lynx Global Server* (PLGS) versão 2.5.2s (Waters, Manchester, UK). A identificação de proteínas foi mediada pelo algoritmo de

contabilização de íons do *software* e realizando-se a comparação com o banco de dados UniProtKB/Swiss-Prot de *Rattus Norvegicus*, incluindo-se as sequências dos padrões de digestão Mass PREP (MPDS) UniProtKB/Swiss-Prot (Fosforilase - P00489 - PHS2\_RABIT, hemoglobina bovina - P02070 - HBB\_BOVIN, ADH - P00330 - ADH1\_YEAST, BSA - P02769 - ALBU\_BOVIN). Para análise de quantificação proteica, a medida de intensidade observada de três peptídeos protótipos de cada proteína foi quantificada a partir da intensidade medida dos peptídeos protótipos identificados do padrão externo utilizando-se algoritmos dedicados (157, 158). A identificação de proteínas foi executada atendendo os seguintes critérios: no mínimo 01 fragmento por peptídeo, no mínimo 03 fragmentos por proteína, no mínimo 01 peptídeo por proteína, modificações variáveis de acetilação no N-terminal, N desaminação, Q desaminação e oxidação M, modificação fixa de C-carbamidometil, taxa de 4 % de falsos positivos e proteína de calibração P00489. A concentração de proteína de calibração foi de acordo com a injeção, a digestão foi executada por tripsina e foi permitido o erro de clivagem em 1.

## 8.9 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As proteínas identificadas foram separadas em: proteínas comuns aos grupos, exclusivas de cada grupo e diferenciais (abundância aumentada e/ou diminuída) entre cada um dos grupos experimentais de acordo com o proposto cruzamento dos grupos, SHR-A vs. SHR-C; SHR-B vs, SHR-C e SHR-A vs. SHR-B. O PLGS foi utilizado para a análise na abundância das proteínas aumentadas e/ou diminuídas utilizando a razão logarítmica (Log10) das concentrações de proteínas em fmol. Para maior confiabilidade dos dados, foram realizadas duas réplicas técnicas para cada réplica biológica de cada grupo experimental (SHR-B e SHR-A) e de controle (SHR-C), totalizando oito experimentos por grupo. Desta forma, para se estabelecer o perfil protéico de cada amostra, foram realizadas análises distintas de cada réplica biológica, levando-se em consideração a reprodutibilidade técnica de cada amostra. O valor de p foi utilizado para determinar se a abundância da proteína encontrava-se aumentada ( $p > 0,95$ ) ou diminuída ( $p < 0,05$ ). Valores observados entre esses extremos indicaram a ausência de alteração na abundância das proteínas. O

*software Protein Lynx Global Server*(PLGS) versão 2.5.5s foi utilizado para a identificação das proteínas expressas com relevância estatística após a comparação cruzada entre os três grupos, utilizando teste t com  $p < 0,05$ .

Após a identificação das proteínas com referência cruzada no banco de dados *Uniprot*, os códigos gerados foram submetidos ao banco de dados no NCBI para diminuir o erro de proteínas não caracterizadas em cada grupo experimental. Além disso, foi determinado um valor de concentração (*fold*) para as proteínas com abundância diferencial, para certificar o quanto a determinada proteína apresentou-se mais abundante ou reduzida em relação ao grupo de comparação. Apenas proteínas com variação no  $\Delta$  (delta) de 0,5 no *fold* foram consideradas para o presente estudo. Após esta identificação inicial, as proteínas foram separadas quanto ao seu *locus celular* e função molecular e biológica classificadas de acordo com as anotações do *gene ontology* (GO).

Os dados das réplicas técnicas e biológicas são apresentados como média e desvio padrão (média  $\pm$  DP). O teste de Shapiro-Wilk ( $P < 0,05$ ) foi aplicado para verificar a normalidade dos dados. Uma análise de variância (ANOVA One-Way) com correção *post hoc* de Bonferroni foi utilizada para as comparações de variáveis Vmax e PAS entre os grupos experimentais. Os testes estatísticos foram realizados no *software GraphPad* (Instat Califórnia, EUA), considerando-se o valor de  $p < 0,05$ .

## 9. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 9.1 EFEITOS DO TREINAMENTO AERÓBIO SOBRE MODELO ANIMAL HIPERTENSO

A hipertensão arterial sistêmica é uma das doenças de maior prevalência no mundo (159, 160), sendo a hipertrofia ventricular esquerda (HVE) um resultante comum desta doença, além de um preceptor significante no desenvolvimento da insuficiência cardíaca (160). Todavia, o controle dos níveis de PA atenua o desenvolvimento da HVE, contribuindo para a normalização miocárdica e a redução da morbidade cardiovascular. Neste sentido, o exercício físico tem apresentado efeitos positivos na atenuação da disfunção sistólica (23), assim como na regressão da HVE induzida pela elevada pressão arterial (28, 161, 162). Além destas respostas, o exercício apresenta efeitos anti-apoptóticos, e está associado ao aprimoramento da microcirculação e função endotelial, contribuindo para a redução da resistência vascular periférica (19, 162-165). Entretanto, os mecanismos moleculares que regulam estes eventos na HVE induzida pela hipertensão arterial não estão completamente esclarecidos.

Desta forma, no presente estudo foi realizada uma análise dos efeitos de duas intensidades de treinamento aeróbio sobre o proteoma do ventrículo esquerdo de ratos espontaneamente hipertensos. Inicialmente, a fim de caracterizar o grau de hipertensão dos ratos SHR com 22 semanas de idade, a pressão arterial sistólica (PAS) de todos os animais foi aferida antes do período de treinamento e ao final de oito semanas de treinamento. Este é um dos modelos mais comuns de hipertensão essencial, onde estes animais desenvolvem pressão arterial elevada na fase inicial da vida, assim como hipertrofia cardíaca (118, 119). O valor médio de  $169,8 \pm 13,8$  mmHg<sup>-1</sup> da PAS caracterizou o fenótipo hipertensivo dos animais utilizados neste estudo (**Tabela 2**), se mostrando consistente com a literatura (118, 161, 162, 164).

**Tabela 2:** Caracterização dos animais espontaneamente hipertensos (SHR)

	SHR-C	SHR-B	SHR-A
N	4	4	5
Idade pré-treinamento	22	22	22
Idade na eutanásia	33	33	33
Peso corporal pré-treinamento (g)	306,3 ± 16,6	315,3 ± 5,8	299 ± 10,9
Peso corporal pós-treinamento (g)	317,5 ± 22,7*	337 ± 18,8	305 ± 27
Peso do coração (g)	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,2
Peso cardíaco / Peso corporal (mg/g)	4,5 ± 0,2	4,2 ± 0,2	4,3 ± 0,2
PAS pré-treinamento (mmHg <sup>-1</sup> )	168,5 ± 9,2	168,5 ± 9,2	168,5 ± 9,2
PAS pós-treinamento (mmHg <sup>-1</sup> )	182 ± 8,9 <sup>§a</sup>	156,1 ± 5,6 <sup>b</sup>	139,4 ± 10,5 <sup>c</sup>
Δ PAS pré/pós treinamento	13,5	-12,4	-29,1

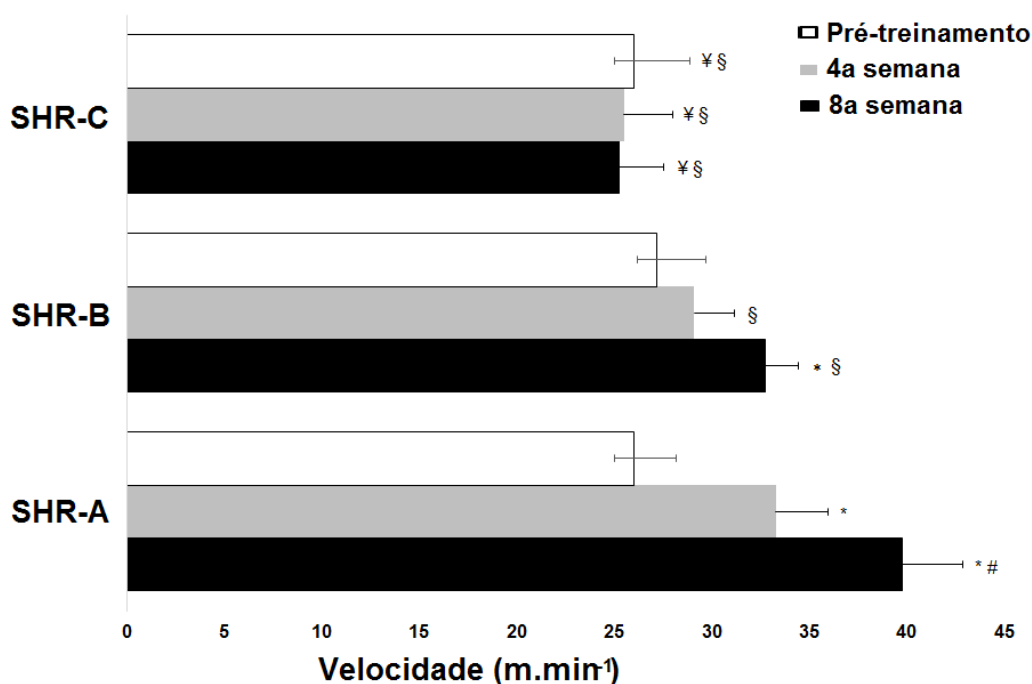
**Legenda:** PAS (pressão arterial sistólica), Δ PAS (delta da pressão arterial sistólica), Os símbolos indicam: \* diferente do peso corporal pré-treinamento ( $p = 0,01$ ), § diferente da PAS nos grupos SHR-B e SHR-A ( $p = 0,0001$ ), <sup>a, b e c</sup> diferente da PAS pré-treinamento.

O efeito positivo do treinamento aeróbio sobre a pressão arterial foi confirmado pela redução da PAS após oito semanas de treinamento em baixa intensidade (SHR-B; 168,5 ± 9,2 vs. 156,1 ± 5,6 mmHg<sup>-1</sup>, Δ -12,4 mmHg<sup>-1</sup>) e em alta intensidade (SHR-A; 168,5 ± 9,2 vs. 139,4 ± 10,5 mmHg<sup>-1</sup>, Δ -29,1 mmHg<sup>-1</sup>). Em contrapartida, o grupo de animais não treinados (SHR-C) apresentou uma elevação contínua da PAS ao final do experimento (SHR-C 168,5 ± 9,2 vs. 182 ± 8,9 mmHg<sup>-1</sup>, Δ 13,5 mmHg<sup>-1</sup>) (**Tabela 2**). Estas respostas estão de acordo com inúmeros estudos, onde diferentes regimes de exercício e intensidades foram eficazes na redução da PAS e no aprimoramento da capacidade aeróbia (161, 162, 166-168), contribuindo até mesmo para a interrupção da hipertrofia cardíaca patológica (169). Além da hipertrofia ventricular esquerda, outros parâmetros como infiltrado de colágeno e a razão parede/lúmen arterial também foram reduzidos em ratos SHR após treinamento aeróbio em esteira (22). Tem sido observado com certa consistência que o treinamento aeróbio em baixa intensidade reduz significativamente a PAS em modelo animal hipertenso (170-172), assim como demonstrado pelo presente estudo.

Antes do período de treinamento e ao final da 4<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas de treinamento, todos os animais foram submetidos a um teste incremental (TI) de velocidade máxima (Vmax) conforme descrito no **item 8.2**. O TI demonstrou que quatro e oito semanas de treinamento aprimoraram a capacidade aeróbia de ambos os grupos exercitados: SHR-B pré-treinamento; 27,2 ± 2,5 m.min<sup>-1</sup> vs. 8<sup>a</sup> semana; 32,8 ± 4,5 m.min<sup>-1</sup>,  $p < 0,05$ ; SHR-A pré-treinamento; 26 ± 4,2 m.min<sup>-1</sup> vs. 4<sup>a</sup>

semana;  $33,3 \pm 1,7 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$  vs. 8ª semana;  $39,8 \pm 3,4 \text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$   $p < 0,05$  (**Figura 15**). Por intermédio do TI, foi observado que quatro semanas de treinamento em alta intensidade (SHR-A) resultaram em uma maior  $V_{\text{max}}$  alcançada quando comparada ao grupo de animais sedentários (¥;  $p < 0,05$ ). Resultado similar também foi observado após oito semanas de treinamento quando comparado ao grupo controle (SHR-C; pré-exercício, 4 e 8 semanas, #;  $p < 0,05$ ) e ao grupo treinado em baixa intensidade (SHR-B; na 4ª e 8ª semanas de treinamento, §;  $p < 0,05$ ) (**Figura 15**).

**Figura 15:** Teste incremental de velocidade máxima (TI): Comparação entre o TI realizado pré treinamento e ao final da 4ª e 8ª semana de treinamento nos grupos SHR-C, SHR-B e SHR-A. Os símbolos indicam; \*  $p \leq 0,05$  em relação ao TI pré-treinamento de cada grupo, #  $p \leq 0,05$  em relação ao TI da 4ª semana, ¥  $p \leq 0,05$  em relação ao TI apenas no grupo SHR-A na 4ª semana e §  $p \leq 0,05$  em relação ao TI apenas no grupo SHR-A na 8ª semana.



O treinamento aeróbio proposto neste estudo não resultou em nenhuma alteração no peso do coração, assim como na razão entre o peso cardíaco e o peso corporal ( $P_{\text{card}}/P_{\text{corp}}$ ) dos animais SHR (**Tabela 2**). Normalmente esta razão é utilizada como um marcador fisiológico de hipertrofia cardíaca, tendo sido evidenciada em ratos SHR submetidos ao treinamento de natação (173, 174). Em outro estudo, foi verificado que o treinamento aeróbio em esteira reduziu o peso cardíaco deste mesmo modelo animal, porém não foi observada nenhuma alteração na razão  $P_{\text{Card}}/P_{\text{Corp}}$  (27). Apesar de não ter sido verificada nenhuma alteração no peso cardíaco entre os grupos experimentais, este estudo verificou que o

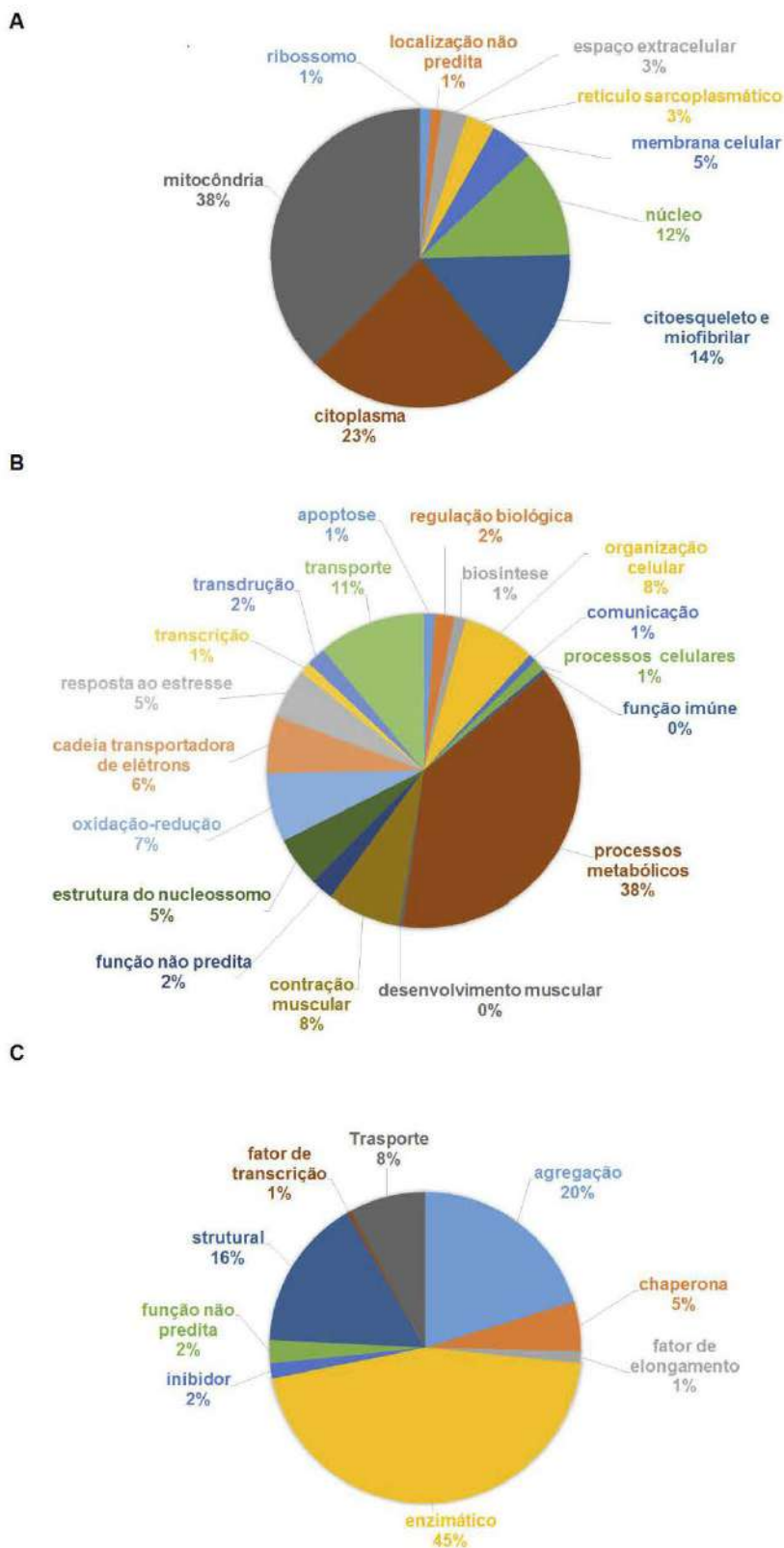
treinamento em baixa e alta intensidade promoveu o aumento na expressão de proteínas contráteis e estruturais (**item 8.4**), o que é normalmente associado à hipertrofia ventricular esquerda (175).

## 9.2 ANOTAÇÕES FUNCIONAIS

A análise do proteoma do VE por meio da técnica de nanoUPLC-MS<sup>E</sup> levou à identificação de 250 proteínas distintas (Artigo anexo). Apesar de fazer parte desta lista, as proteínas usadas como padrão na digestão proteica (Fosforilase - P00489 - PHS2\_RABIT, Hemoglobina Bovina - P02070 - HBB\_BOVIN, ADH - P00330 - ADH1\_YEAST, BSA - P02769 - ALBU\_BOVIN) não foram consideradas para as análises comparativas. As proteínas identificadas foram classificadas quanto a sua localização celular (**Figura 16A**), processo biológico (**Figura 16B**) e função molecular (**Figura 15C**), de acordo com as anotações do *Gene Ontology* (GO). A maioria das proteínas identificadas foi derivada das estruturas mitocondriais (38 %) seguido pelo citoplasma (23 %), citoesqueleto/miofibrilar (14 %) e núcleo celular (12 %) (**Figura 16A**). Apesar destas classificações, inúmeras proteínas podem pertencer a sublocalidades distintas na célula, o que auxilia na identificação e entendimento de sua função biológica. Seguido do elevado número de proteínas mitocondriais, a maioria das proteínas identificadas foi relacionada com processos metabólicos distintos (38 %), seguido por atividade de transporte intracelular (11 %), contração muscular (8 %), organização celular (8 %), respiração e oxi-redução (7 %) (**Figura 16B**). Por fim, cerca de 45 % das proteínas identificadas apresentam atividade enzimática, seguido por agregação proteica (20 %), função estrutural (16 %), transporte (8 %) e de chaperona (5 %) (**Figura 16C**).

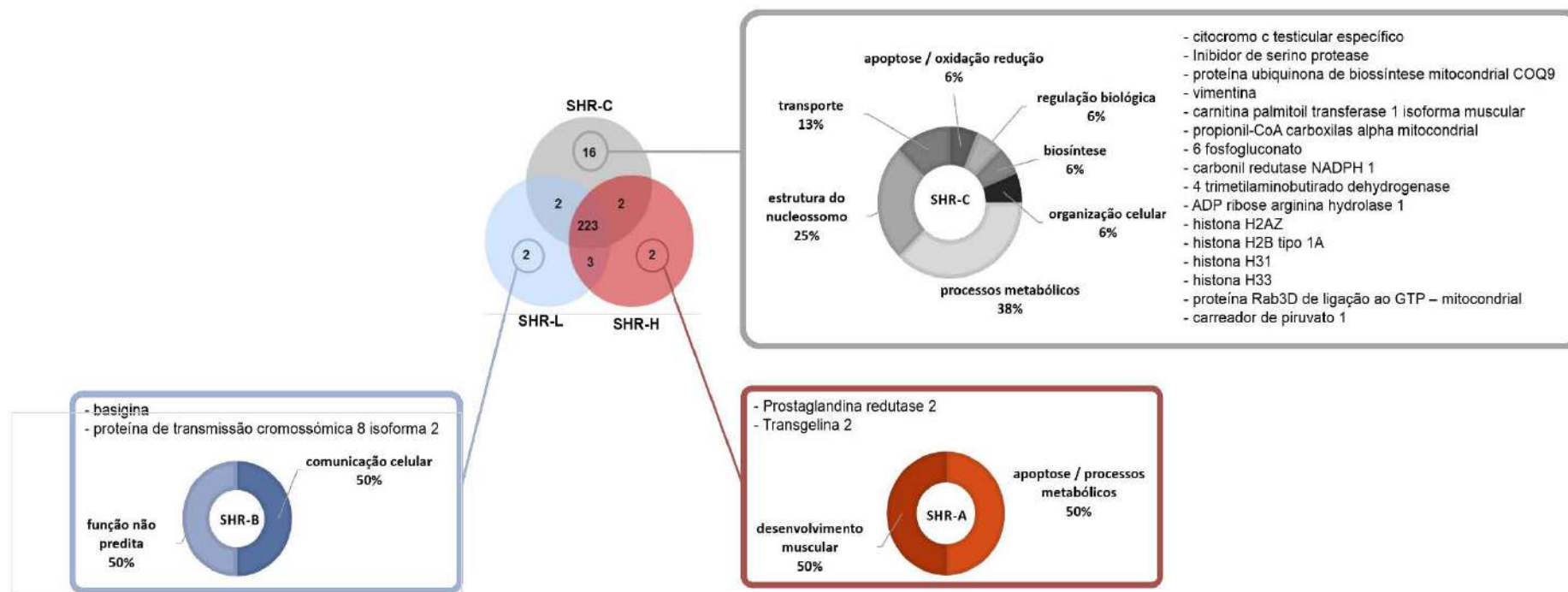


**Figura 16.** Classificação das proteínas identificadas quanto à localização celular (A), função biológica (B) e função molecular (C).



O diagrama de Venn foi utilizado para indicar a distribuição das proteínas identificadas nos três grupos experimentais (**Figura 17**). Das duzentas e cinquenta identificações, duzentas e vinte três apresentaram-se presentes nos três grupos, sendo dezesseis exclusivas ao grupo controle (SHR-C), duas proteínas exclusivas ao grupo SHR-B e duas proteínas exclusivas ao grupo SHR-A (**Figura 17**). Pode-se notar que as proteínas identificadas exclusivamente no grupo SHR-C foram majoritariamente relacionadas com processos metabólicos (38 %), seguido por proteínas da estrutura do nucleossomo (25 %). Uma proteína do grupo SHR-B está associada à comunicação celular (basigina) enquanto o processo biológico da proteína de transmissão cromossômica 8 não é previsto pelas anotações do *Gene Ontology*. Já as proteínas do grupo SHR-A são relacionadas com a apoptose (prostaglandina redutase 2) e desenvolvimento muscular (transgelina 2) (**Figura 17**). De modo geral, a maioria das proteínas, de 223 compartilhadas entre todos os grupos, é atribuída a classificação de processos metabólicos pelo *Gene Ontology* (**Figura 16B**).

**Figura 17:** Diagrama de Venn demonstrando as proteínas identificadas por nanoUPLC/MS<sup>E</sup> e sua intersecção nos grupos SHR-C, SHR-B e SHR-A. O diagrama também apresenta as proteínas exclusivas de cada grupo e as proteínas comuns a todos os grupos



### 9.3 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS EXCLUSIVAS

Conforme evidenciado no diagrama de Venn, dezoito proteínas foram identificadas exclusivamente nos três grupos experimentais deste estudo (**Figura 17**). Dentre as identificações exclusivas ao grupo SHR-C, algumas proteínas como, citocromo c, vimetina e histona 2HA.Z estão associadas, respectivamente, com indução a apoptose, fibrose e desenvolvimento da hipertrofia miocárdica (176, 177). Dentre estes componentes, a histona 2HA.Z exerce papel importante na remodelação da cromatina. Deste modo, sabe-se que a incorporação de histona-variantes, a modificação da histona e a metilação do DNA são fatores epigenéticos interconectados que atuam sobre a estrutura da cromatina eucariótica, tornando-a mais ou menos propensa para o processo de transcrição (178-180). Neste sentido, remodelações na cromatina com influência sobre a regulação da transcrição são fatores primordiais na indução da hipertrofia cardíaca (181, 182). A substituição das histonas base, por variantes especializadas está envolvida na regulação deste processo. Isso foi observado pelo aumento na expressão da histona H2A.Z durante a hipertrofia cardíaca, onde, em contrapartida, o uso de animais com *knockout* para esta proteína resultou na regressão hipertrófica (183). A identificação da histona variante H2A.Z exclusivamente no grupo de ratos não exercitados (SHR-C), sugere a participação desta proteína no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca patológica em ratos SHR (**Figura 17**). Sabe-se que essa proteína controla a remodelação da cromatina, desempenhando um papel importante no reparo do DNA (184). Deste modo, a expressão da H2A.Z no grupo de ratos SHR destreinados pode estar relacionada a um estado fisiológico mais propenso a produzir componentes oxidativos, aumentando a lesão de DNA e exigindo seu maior reparo.

Enquanto o papel biológico da proteína de transmissão cromossomal é desconhecido, a proteína basigina participa de diversos processos, incluindo comunicação celular, diferenciação espermatogênica, inflamação e atividade de chaperona (185). Diversos estímulos metabólicos são relatados por estimular a indução da basigina (186), o que pode possivelmente explicar sua identificação no grupo exercitado (SHR-B) devido a modificações metabólicas em resposta ao treinamento. Por outro lado, as proteínas prostaglandina redutase 2 e transgelina 2 foram identificadas apenas no grupo treinado em alta intensidade (SHR-A, **Figura**

17). A primeira proteína está relacionada ao metabolismo das prostaglandinas, onde um estudo indicou que sua super expressão está envolvida na regulação da transcrição de receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR gama), inibindo também a diferenciação de adipócitos (187). No entanto, o significado fisiológico de sua expressão no cardiomiócito em resposta exclusiva ao exercício não está clara.

Análises proteômicas do miocárdio de ratos treinados após indução ao infarto evidenciaram a redução na expressão de uma isoforma da transgelina 2 (transgelina) (26), sugerindo o efeito supressor do exercício sobre esta proteína. A transgelina 2 pertence à família da calponina, proteínas capazes de inibir a atividade de ATPase da miosina no músculo liso, afetando a interação miofibrilar entre miosina e actina (188). Neste sentido, a redução na expressão da transgelina no miocárdio pós-enfartado em resposta ao treinamento pode representar um mecanismo positivo de regulação miofibrilar nestes animais. Todavia, até o presente momento, este foi o primeiro estudo a verificar o efeito do treinamento na transgelina 2 em modelo animal hipertenso. Neste sentido, são necessárias outras investigações para verificar se esta isoforma está envolvida no processo de atenuação da HVE patológica.

#### 9.4 EFEITOS DO TREINAMENTO EM DIFERENTES INTENSIDADES SOBRE O PROTEOMA CARDÍACO

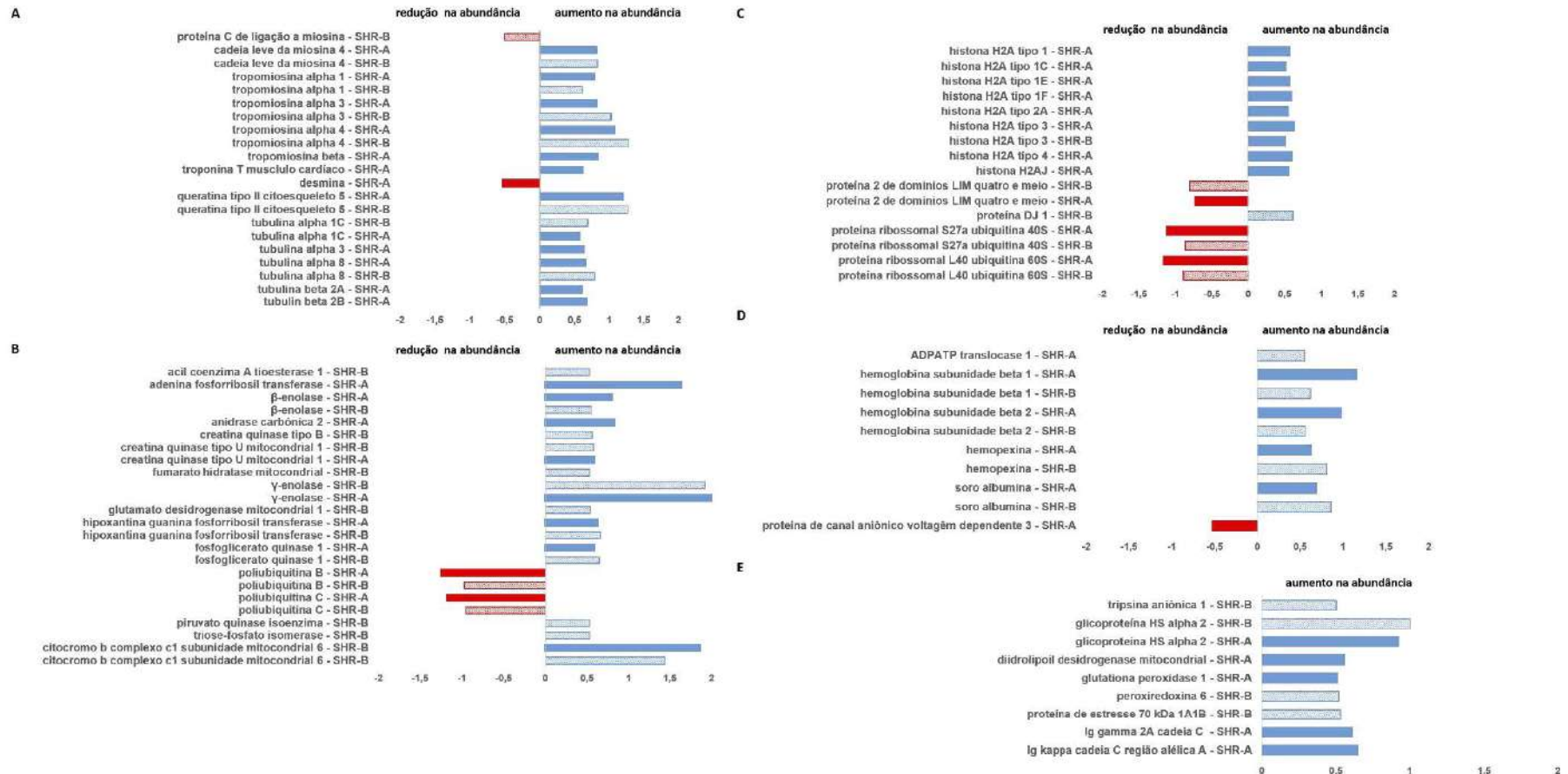
Após a identificação total de proteínas, a comparação entre os grupos SHR-B:SHR-C e SHR-A:SHR-C foi realizada como objetivo de avaliar o efeito do treinamento de baixa e alta intensidades sobre o proteoma do ventrículo esquerdo de animais não treinados (SHR-C). Além disso, ambos os grupos exercitados foram comparados entre si (SHR-B:SHR-A). A análise proteômica demonstrou que o treinamento em baixa intensidade (SHR-B:SHR-C) alterou a expressão de trinta e seis proteínas (**Tabela 3**), enquanto o treinamento em alta intensidade (SHR-A:SHR-C) alterou a expressão de quarenta e quatro proteínas (**Tabela 4**), sendo vinte e quatro comumente alteradas por ambos os tratamentos. As proteínas alteradas por estes dois tratamentos foram agrupadas de acordo com seu processo biológico e

estão representadas na **Figura 18**. Das trinta e seis proteínas alteradas pelo treinamento em baixa intensidade, trinta foram super expressas, enquanto seis delas foram sub expressas ( $P \leq 0,05$ ). A maioria destas proteínas foi relacionada a processos metabólicos (12 super expressas e 2 sub expressas), contração muscular e organização celular (7 super expressas e 1 sub expressa), transporte (5 super expressas), e regulação de transdução e transcrição (1 super expressa e 3 sub expressas). Outras cinco proteínas foram todas super expressas, com funções relacionadas à estruturação do nucleossomo, proteólise, regulação biológica, oxidação-redução e resposta ao estresse (**Tabela 3 e Figura 18**).

O efeito do treinamento em alta intensidade induziu a super expressão de 37 proteínas e a sub expressão de outras 7 ( $P \leq 0,05$ ). Diferentemente do treinamento em baixa intensidade, aqui, a maioria das proteínas alteradas foi relacionada à contração muscular e à organização celular (12 super expressas e 1 sub expressa), seguido por processos metabólicos (8 super expressas e 2 sub expressas), estrutura do nucleossomo (8 super expressas), transporte (4 super expressas e 1 sub expressa) e regulação da transdução e transcrição (3 sub expressas). Outras 5 proteínas foram todas super expressas, estando relacionadas a regulação biológica, oxidação-redução e a resposta imune (**Tabela 4 e Figura 18**).

Por fim, a comparação entre as proteínas alteradas pelo treinamento em baixa intensidade e o treinamento em alta intensidade ( $\text{Log}(e)\text{SHR-L:SHR-A}$ ) evidenciou a alteração significativa na expressão de apenas duas proteínas: a super expressão da subunidade alfa da hemoglobina ( $P \geq 0.95$ ) e a sub expressão da adenina fosforibosiltransferase ( $P \leq 0.05$ ).

**Figura 18:** Histogramas representativos das alterações na abundância das proteínas em resposta ao exercício em baixa (azul claro) e alta intensidades (azul escuro), considerando apenas as proteínas com aumento ( $P \geq 0,95$  - azul) e redução ( $P \leq 0,05$  - vermelho) na abundância com um delta mínimo de 0,5 vezes no log 10 entre as razões de SHR-A:SHR-C e SHR-B:SHR-C. Todas as proteínas alteradas foram agrupadas de acordo com seu processo biológico do *Gene Ontology* (GO). Contração muscular e processo de organização da célula (A), processos metabólicos e cadeia transportadora de elétrons (B), estrutura do nucleossomo e regulação da transdução e transcrição (C), transporte (D) e funções diversas (E).



**Tabela 3:** Proteínas alteradas pelo treinamento em baixa intensidade no proteoma do ventrículo esquerdo

Descrição	n° do Uniprot	Pontuação no PLGS	SHR-B:SHR-C Razão Log(e)	SHR-B:SHR-C Log(e)StdDev	SHR-B:SHR-C_P
<b>Contração muscular e componentes de organização celular</b>					
proteína tipo C de ligação a miosina	MYPC_RAT	5604,45	-0,5	0,11	0
cadeia leve da miosina 4	MYL4_RAT	9903,65	0,83	0,23	1
tropomiosina alpha 1	TPM1_RAT	19404,48	0,61	0,17	1
tropomiosina alpha 3	TPM3_RAT	2731,77	1,02	0,31	1
tropomiosina alpha 4	TPM4_RAT	1937,27	1,27	0,37	1
queratina tipo II do citoesqueleto 5	K2C5_RAT	494,33	1,26	0,65	1
tubulina alpha 1C	TBA1C_RAT	580,17	0,69	0,29	1
tubulina alpha 8	TBA8_RAT	569,33	0,79	0,49	1
<b>Processos metabólicos e cadeia respiratória</b>					
tioesterase 1 de acil coenzima A	ACOT1_RAT	688,01	0,53	0,24	1
β enolase	ENOB_RAT	2407,82	0,55	0,19	1
creatina quinase tipo B	KCRB_RAT	336,78	0,56	0,24	1
creatina quinase tipo U mitocondrial	KCRU_RAT	1417,38	0,58	0,18	1
fumarato hidratase mitocondrial	FUMH_RAT	1945,22	0,53	0,17	1
γ enolase	ENOG_RAT	1942,14	1,92	0,36	1
glutamato desidrogenase mitocondrial1	DHE3_RAT	420,21	0,54	0,39	0,99
hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase	HPRT_RAT	908,34	0,66	0,69	0,95
fosfoglicerato quinase 1	PGK1_RAT	1196,99	0,65	0,14	1
poliubiquitina B	UBB_RAT	16275,18	-0,97	0,25	0
poliubiquitina C	UBC_RAT	40048,59	-0,95	0,26	0
piruvato quinase isoenzima	KPYR_RAT	965,34	0,53	0,36	1
triose-fosfato isomerase	TPIS_RAT	3647,97	0,53	0,1	1
citocromo b complexo c1 subunidade mitocondrial 6	QCR6_RAT	14667,27	1,44	0,28	1
<b>Estrutura do nucleossomo / regulação de transcrição e transdução</b>					
histona H2A tipo 3	H2A3_RAT	19122,19	0,51	0,44	0,99
proteína 2 de domínios LIM quarto e meio	FHL2_RAT	1694,2	-0,8	0,34	0
proteína DJ 1	PARK7_RAT	3138,38	0,61	0,17	1



proteína ribossomal S27a ubiquitina 40S	RS27A_RAT	4212,14	-0,86	0,25	0
proteína ribossomal L40 ubiquitina 60S	RL40_RAT	4212,14	-0,89	0,26	0
<b>Transporte</b>					
ADP ATP translocase 1	ADT1_RAT	11237,2	0,55	0,09	1
hemoglobina subunidade beta 1	HBB1_RAT	24918,53	0,62	0,07	1
hemoglobina subunidade beta 2	HBB2_RAT	19887,18	0,56	0,09	1
hemopexina	HEMO_RAT	680,91	0,81	0,42	1
soro albumina	ALBU_RAT	7507,42	0,86	0,07	1
<b>Diversas funções</b>					
Glicoproteína HS alpha 2	FETUA_RAT	514,46	1	0,48	1
proteína de estresse 70 KDa 1A1B	HSP71_RAT	554,84	0,53	0,19	1
tripsina aniônica 1	TRY1_RAT	1413,55	0,5	0,31	1
Peroxiredoxina-6	PRDX6_RAT	756,18	0,52	0,23	1

A pontuação do PLGS é obtida pelo software ProteinLynx Global Server (versão 2.5, Waters, Manchester, UK). Proteínas com alteração em sua abundância com delta ( $\Delta \geq 0,5$  vezes) no Log(e) na razão entre os grupos SHR-B:SHR-C.  $P \geq 0,95$ ; aumento na abundância (azul),  $P \leq 0,05$ ; redução na abundância (vermelho).

**Tabela 4:** Proteínas alteradas pelo efeito do treinamento em alta intensidade no proteoma do ventrículo esquerdo

Descrição	nº do Uniprot	Pontuação do PLGS	SHR-A:SHR-C Razão Log(e)	SHR-A:SHR-C Log(e)StdDev	SHR-A:SHR-C_P
<b>Contração muscular e componentes de organização celular</b>					
cadeia leve de miosina 4	MYL4_RAT	9903,65	0,82	0,2	1
tropomiosina alpha 1	TPM1_RAT	19404,48	0,79	0,15	1
tropomiosina alpha 3	TPM3_RAT	2731,77	0,82	0,31	1
tropomiosina alpha 4	TPM4_RAT	1937,27	1,08	0,37	1
tropomiosina beta	TPM2_RAT	5691,56	0,84	0,26	1
troponina T do musculo cardiaco	TNNT2_RAT	5944,61	0,62	0,16	1
desmina	DESM_RAT	5676,96	-0,54	0,15	0
queratina tipo II do citoesqueleto 5	K2C5_RAT	494,33	1,2	0,55	1
tubulina alpha 1C	TBA1C_RAT	580,17	0,58	0,32	1
tubulina alpha 3	TBA3_RAT	613,42	0,64	0,37	1
tubulina alpha 8	TBA8_RAT	569,33	0,66	0,55	1
tubulina beta 2A	TBB2A_RAT	1387,44	0,61	0,24	1
tubulina beta 2B	TBB2B_RAT	1387,44	0,68	0,25	1
<b>Processos metabólicos e cadeia respiratória</b>					
adenina fosforibosiltransferase	APT_RAT	388,55	1,64	0,92	1
B-enolase	ENOB_RAT	2407,82	0,8	0,2	1
anidrase carbónica 2	CAH2_RAT	573,54	0,83	0,56	1
creatina quinase tipo U mitocondrial 1	KCRU_RAT	1417,38	0,59	0,19	1
γ enolase	ENOG_RAT	1942,14	2,01	0,41	1
hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase	HPRT_RAT	908,34	0,63	0,57	0,99
fosfoglicerato quinase 1	PGK1_RAT	1196,99	0,59	0,14	1
poliubiquitina B	UBB_RAT	16275,18	-1,25	0,27	0
poliubiquitina C	UBC_RAT	40048,59	-1,18	0,26	0
citocromo b complexo c1 subunidade mitocondrial 6	QCR6_RAT	14667,27	1,86	0,3	1
<b>Estrutura do nucleossomo / regulação de transcrição e transdução</b>					
histona H2A tipo 1	H2A1_RAT	19122,19	0,57	0,38	1
histona H2A tipo 1 C	H2A1C_RAT	19122,19	0,52	0,38	1

histona H2A tipo 1 E	H2A1E_RAT	19122,19	0,57	0,4	0,99
histona H2A tipo 1 F	H2A1F_RAT	21168,17	0,59	0,34	1
histona H2A tipo 2 A	H2A2A_RAT	19122,19	0,55	0,42	1
histona H2A tipo 3	H2A3_RAT	19122,19	0,63	0,41	0,99
histona H2A tipo 4	H2A4_RAT	19222,71	0,6	0,4	0,99
histona H2AJ	H2AJ_RAT	19122,19	0,56	0,47	1
proteína 2 de domínio quarto e meio LIM	FHL2_RAT	1694,2	-0,73	0,44	0
proteína ribossomal S27a ubiquitina 40S	RS27A_RAT	4212,14	-1,12	0,3	0
proteína ribossomal L40 ubiquitina 60S	RL40_RAT	4212,14	-1,16	0,27	0
<b>Transporte</b>					
hemoglobina subunidade beta 1	HBB1_RAT	24918,53	1,16	0,07	1
hemoglobina subunidade beta 2	HBB2_RAT	19887,18	0,98	0,08	1
hemopexina	HEMO_RAT	680,91	0,63	0,41	1
soro albumina	ALBU_RAT	7507,42	0,69	0,07	1
proteína de canal aniônico seletivo voltagem dependente 3	VDAC3_RAT	2813,54	-0,53	0,38	0
<b>Diversas funções</b>					
glicoproteína HS alpha 2	FETUA_RAT	514,46	0,92	0,48	1
diidrolipoil desidrogenase mitochondrial	DLDH_RAT	1341,7	0,56	0,09	1
glutaciona peroxidase 1	GPX1_RAT	2101,75	0,51	0,27	1
Ig gamma cadeia 2A região C	IGG2A_RAT	480,36	0,61	0,2	1
Ig kappa cadeia C região do alelo A	KACA_RAT	479,7	0,65	0,44	1

A pontuação do PLGS é obtida pelo software ProteinLynx Global Server (versão 2.5, Waters, Manchester, UK). Proteínas com alteração em sua abundância com delta ( $\Delta \geq 0,5$  vezes) no Log(e) na razão entre os grupos SHR-A:SHR-C.  $P \geq 0,95$ ; aumento na abundância (azul),  $P \leq 0,05$ ; redução na abundância (vermelho).

## 9.5 EFEITOS DO TREINAMENTO NAS PROTEÍNAS CONTRÁTEIS E DE ORGANIZAÇÃO CELULAR

A alteração no padrão de proteínas estruturais e contráteis é uma das principais modificações observadas na hipertrofia cardíaca patológica, com impacto significativo na funcionalidade do cardiomiócito (52). Em conjunto com estas alterações, a geração de fibrose miocárdica afeta as interações miofibrilares dependentes de cálcio, influenciando a progressão da HVE para a insuficiência cardíaca. Em contrapartida, a hipertrofia induzida em resposta ao exercício promove o aprimoramento de agentes reguladores da força e contração, gerando adaptações positivas no coração (76, 79, 189). Aqui, a expressão de proteínas relacionadas à regulação da força de contração (cadeia leve da miosina 4) e à estrutura miofibrilar (tropomiosina beta e cadeias alfa 1,2, 3 e troponina T) foram positivamente reguladas por ambas as intensidades de treinamento (**Figura 18A**), em contraste com a sub expressão da cadeia leve de miosina 1, observada no VE de ratos hipertensos (190). Essas modulações indicam aspectos positivos do exercício físico sobre os mecanismos regulatórios de força e contração cardíaca em fenótipo hipertenso. No entanto, a troponina T, um marcador de inflamação do miocárdio, foi aumentada após o treinamento em alta intensidade (**Figura 18A**). Esta proteína têm sido também indicada como um marcador agudo após a prática de exercício prolongado (191).

Entre o grupo de proteínas com função contrátil e estrutural, apenas a proteína C de ligação à miosina (MyBP-C) e desmina foram sub expressas pelo treinamento nos grupos SHR-B e SHR-A, respectivamente (**Figura 18A**). A proteína MyBP-C contribui para a junção dos filamentos grossos, sendo também um substrato para a proteína quinase dependente de AMP cíclico (AMPK) (192). Adicionalmente, foi observado que a fosforilação desta proteína reduz sua interação com a miosina, evidenciando seu papel regulatório da contração miofibrilar (192). Neste sentido, o treinamento em baixa intensidade (SHR-B) pode ter gerado algum efeito negativo sobre a regulação da contração no VE. No entanto, até o presente momento, o efeito do exercício sobre a fosforilação da MyBP-C não foi investigado, assim, as consequências funcionais deste processo permanecem desconhecidas. Por outro lado, a redução na expressão da desmina pode indicar uma regulação

positiva do treinamento sobre o a HVE, uma vez que elevados níveis de desmina são observados durante o desenvolvimento da hipertrofia ventricular patológica (190, 193-195).

## 9.6 EFEITOS DO TREINAMENTO SOBRE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS EM PROCESSOS METABÓLICOS

Seguida pelas modificações estruturais, a alteração no metabolismo cardíaco representa outra característica marcante da hipertrofia patológica. Este processo caracteriza-se pelo aumento da oxidação glicolítica em relação à oxidação de ácidos graxos, substrato majoritário do metabolismo cardíaco (190, 194, 196-198). Além disso, o comprometimento da capacidade oxidativa mitocondrial representa um mecanismo fundamental no desenvolvimento da HVE, sendo esta disfunção verificada até mesmo antes do início da hipertensão arterial em ratos SHR (199). Por outro lado, alterações nas enzimas mitocondriais induzidas pelo treinamento aeróbio estão associadas ao aprimoramento da capacidade cardiovascular (81, 175, 200-202). Neste sentido, análises proteômicas indicam que estas alterações em resposta ao exercício são normalmente contrárias às observadas na insuficiência cardíaca induzida pela hipertensão (203, 204).

Com exceção das proteínas pertencentes ao complexo proteolítico ubiquitina-proteassoma (205) (poliubiquitina B e C), as demais proteínas relacionadas a metabolismo de fosfocreatina (PCr), de nucleotídeo, de oxidação de ácidos graxos e oxidação glicolítica foram todas super expressas pelo treinamento (**Figura 18B**). A redução nos níveis de expressão do complexo poliubiquitina B e C pode indicar um efeito negativo do treinamento sobre a degradação de proteínas cardíacas, uma vez que estas proteínas estão associadas ao processo de atrofia muscular (206, 207). Curiosamente, o treinamento em baixa intensidade alterou mais proteínas metabólicas (SHR-B = 14) do que o treinamento em alta intensidade (SHR-A = 12), entre elas, tioesterase de acil coenzima A 1, creatina quinase B, fumarato hidratase mitocondrial e demais enzimas glicolíticas. Por outro lado, enzimas do metabolismo de nucleotídeos (adenina fosforibosiltransferase) e da síntese de bicarbonato (anidrase carbônica 2) foram super expressas apenas em resposta ao treinamento

em alta intensidade (**Figura 18B**). A alteração destas enzimas metabólicas indica que a resposta no proteoma do VE ao exercício pode ocorrer de modo dependente à intensidade do treinamento.

Entre as proteínas metabólicas, foi verificado que a  $\gamma$ -enolase, a adenina fosforibosiltransferase e o citocromo b c1 foram significativamente mais expressas que as demais. Estudos mostraram que diferentes estímulos hipertróficos, como o exercício (175) e a hipertensão (194, 198), resultaram no aumento da expressão da  $\alpha$ -enolase, confirmando a oxidação da glicose como um importante mecanismo de remodelação do VE em ratos SHR. Ademais, evidências indicam que a fosforilação da  $\alpha$ -enolase exerce um papel fundamental no desenvolvimento da HVE em ratos SHR(190), porém, ainda não foi verificado o efeito do exercício na desfosforilação desta proteína e quais as implicações fisiológicas deste processo. Tem sido proposto que a redução de  $\beta$ -enolase em relação à  $\alpha$ -enolase pode estar associada a efeitos metabólicos positivos na hipertrofia cardíaca (208). Porém, resultados opostos foram verificados no ventrículo direito em roedores em um modelo de sobrecarga pressórica no ventrículo direito (203). Além deste estudo, foram verificados níveis elevados de  $\beta$ -enolase após treinamento de *endurance*, sendo esta enzima considerada um marcador sérico de lesão muscular induzida pelo exercício (209). Além das isoformas  $\alpha$  e  $\beta$ -enolase, uma forma intermediária de  $\gamma$ -enolase também é encontrada no miócito cardíaco de ratos, conforme verificado no presente estudo. Porém, a resposta desta enzima ao exercício ainda é pouco conhecida.

Por outro lado, o aumento na expressão de enzimas envolvidas no metabolismo de nucleotídeos, como a adenina fosforibosiltransferase (**Figura 18B**), pode estar associada ao aumento no metabolismo das purinas em resposta ao exercício (210). Uma vez que esta enzima participa da formação de nucleotídeos (84), esta síntese pode ser uma resposta para a maior demanda energética do miocárdio em resposta ao treinamento em alta intensidade (SHR-A). A subunidade 6 do citocromo bc1 mitocondrial também foi aumentada após o treinamento em ambas as intensidades. Apesar do efeito pró-apoptótico observado no VE de ratos SHR, níveis elevados na concentração da classe desta proteína também foram observados no músculo esquelético após treinamento aeróbio (211). Esta observação parece ser consistente com o aumento na síntese de ATP devido a

maior demanda energética em resposta ao treinamento físico. Por fim, o presente estudo também observou o aumento da proteína ADPATP translocase 1, que promove o transporte de ADP e ATP através da membrana mitocondrial (ATP em direção ao citoplasma e ADP para a matriz mitocondrial). Apesar de esta proteína estar biologicamente classificada como transportadora, ela exerce um papel fundamental no metabolismo celular. Seu aumento exclusivo no grupo treinado em baixa intensidade (SHR-B, **Figura 18D**) pode indicar uma resposta específica e dependente da intensidade de treinamento.

## 9.7 EFEITOS DO TREINAMENTO SOBRE PROTEÍNAS ESTRUTURAIS DO NUCLEOSSOMO E FATORES DE TRANSCRIÇÃO

Conforme discutido no **item 9.3**, modificações na estrutura da cromatina são mecanismos fundamentais para o processo de transcrição. Neste estudo, foi verificado que diversas proteínas estruturais do nucleossomo (família da histona 2Aa) foram super expressas exclusivamente em resposta ao treinamento em alta intensidade, onde apenas a histona H2A tipo 3 foi regulada também pelo SHR-B (**Figura 18C**). Neste sentido, o papel epigenético desempenhado pelas variantes de histonas, parece ser dependente da intensidade do exercício, uma vez que a maioria das variantes da H2A foi aumentada em SHR-A. Porém, a remodelação da cromatina em resposta ao aumento da expressão de variantes de H2A e sua relação com a expressão gênica na atenuação da HVE patológica demanda mais investigações.

Curiosamente, em contraste às proteínas do nucleossomo, o treinamento em ambas as intensidades resultou na diminuição da expressão da maioria das proteínas de regulação da transcrição (proteína 2 de domínio LIM quatro e meio, proteína ribossomal S27a ubiquitina 40S e proteína ribossomal L40 ubiquitina 60S), com exceção da proteína DJ-1, positivamente regulada apenas no grupo SHR-B (**Figura 18C**). Esta proteína é altamente expressa no coração e outros tecidos com papel citoprotetor a danos oxidativos e inflamatórios (212, 213).

## 9.8 EFEITOS DO TREINAMENTO SOBRE PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS E ANTI-OXIDATIVAS

A hipertrofia ventricular esquerda induzida pela hipertensão é caracterizada, entre outros fatores, pelo aumento na sinalização apoptótica (17). No presente estudo, foi observada redução da proteína de canal iônico voltagem dependente 3 (VDAC3) após o treinamento em alta intensidade (SHR-A, **Figura 18D**). Uma resposta similar também foi observada em uma isoforma desta proteína no miocárdio pós-infartado de ratos submetidos ao treinamento aeróbio (26). Porém, análises proteômicas revelaram o aumento na expressão desta proteína no ventrículo esquerdo de camundongos idosos (214), sendo também determinante no processo de apoptose (215), onde a redução na expressão de VACD2 está associada com a melhora na função cardíaca. Pode-se verificar que as proteínas VACD2 e VACD3 respondem de modo similar ao exercício aeróbio, o que pode indicar o efeito regulatório destas proteínas em disfunções no cardiomiócito.

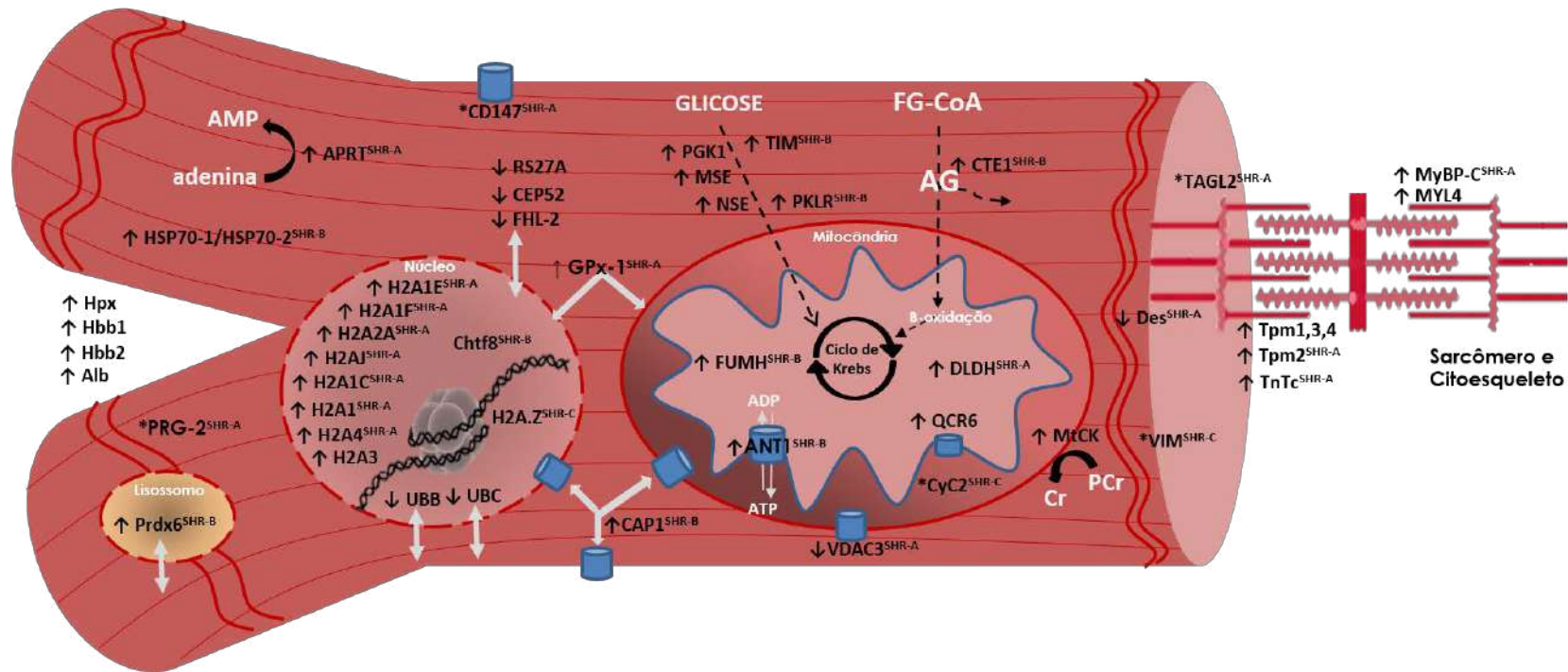
Alterações na síntese de ATP estão associadas ao aumento no influxo de  $Ca^{2+}$  na mitocôndria e na geração de espécies reativas de oxigênio, estando estes fatores relacionados à patogênese da hipertensão (17). Deste modo, a normalização destes fatores pode representar mecanismos envolvidos na recuperação da funcionalidade do cardiomiócito. Observou-se que o treinamento aeróbio regulou, de modo positivo, uma série de proteínas antioxidantes, tais como peroxirredoxina 6, glutathione peroxidase 1 e dihidrolipoil mitocondrial desidrogenase 1 (**Figura 18E**). Esta ação pode ser considerada como um fator positivo na atenuação dos agentes oxidativos observados na HVE patológica. A peroxirredoxina 6 é considerada a principal enzima com ação de redutase do peróxido de hidrogênio, onde verificou-se que ratos gerados sem a expressão desta proteína são suscetíveis ao estresse oxidativo (216). Por fim, um estudo mostrou que os níveis plasmáticos de peroxirredoxina 6 são aumentados após o exercício físico (217), indicando o efeito positivo do treinamento no aumento da expressão desta proteína e sua ação antioxidante. Uma resposta similar também foi observada no perfil da glutathione peroxidase 1, assim como no seu perfil proteômico observado no miocárdio de modelo animal submetido ao treinamento aeróbio após enfarte induzido (26). Estes



dados reforçam os mecanismos de oxirredução com o efeito de cardioproteção induzido pelo exercício.

Por fim, as principais proteínas discutidas neste estudo são mostradas em uma representação de um cardiomiócito (**Figura 19**) para melhor visualização e compreensão do seu papel biológico na célula e sua resposta ao treinamento aeróbio.

**Figura 19:** Representação do cardiomiócito com as principais proteínas identificadas em resposta ao treinamento em baixa e alta intensidades. \*: proteínas exclusivamente a um grupo experimental, (↑): aumento na abundância, (↓): redução na abundância. As siglas sem marcação representam as proteínas alteradas em resposta a ambas as intensidades de treinamento (SHR-B ou SHR-A). As setas cinza indicam as proteínas expressas em diferentes localizações na célula. Alb (albumina sérica), AMP; (monofosfato de adenosina), ANT1 (ADPATP translocase 1), APRT (adenina fosforibosiltransferase), CAP1 (proteína DJ 1), CEP52 (proteína ribossômica L40 ubiquitina 60S), Chtf8 (proteína de transmissão cromossômica 8 isoforma 2), CTE1 (tioesterase de acil coenzima A 1), CyC2 (citocromo c testículo específico), DC147 (basigina), Des (desmina), DLDH (diidrolipoil I desidrogenasemitocondrial), FHL-2 (proteína de domínio LIM quatro e meio 2), FUMH(fumarato hidratase mitocondrial), GPx-1 (glutationa peroxidase 1), H2A.Z (histona H2A.Z), H2A1 (histona H2A tipo 1), H2A1C (histona H2A tipo 1C), H2A1E (histona H2A tipo 1E), H2A1F (tipo histona H2A 1F), H2A2A (histona H2A tipo 2AE), H2A3 (histona H2A tipo 3), H2A4 (histona H2A tipo 4), H2AJ (histona H2AJ), Hbb1 (hemoglobina subunidade beta 1), Hbb2 (hemoglobina subunidade beta 2), Hpx (hemopexina), HSP70-1 / HSP70-2 (proteína de choque térmico 70 kDa 1A1B), MSE (β-enolase), MtCk (creatina quinase tipo U mitocondrial), MyBP-C (proteína C de ligação a miosina tipo cardíaca), MYL4 (cadeia leve da miosina 4), NSE (γ-enolase), PGK1 (fosfoglicerato quinase 1), PKLR (piruvato-quinase isoenzima RL), Prdx6 (peroxiredoxina 6), PRG-2 (prostaglandina-2), QCR6 (citocromo b subunidade c1 complexo mitocondrial 6), RS27A (proteína ribossômica S27a ubiquitina 40S), TAGL2 (transgelina-2), TIM (piruvatoquinase isoenzima), TnTc (troponina T cardíaca), TPM1, 3 e 4 (tropomiosina alpha 1, 3 e 4), TPM2 (tropomiosina beta), UBB (poliubiquitina B), UBC (poliubiquitina C), VDAC3 (proteína de canal seletivo aniônico 3), VIM (vimentina),



## 10. CONCLUSÃO

No presente estudo, verificou-se que o treinamento em baixa e alta intensidades aprimorou a capacidade aeróbia e reduziu de modo significativo a pressão arterial sistólica em modelo animal hipertenso. Estas respostas indicam que o treinamento com intensidades controladas baseadas na MFEL é uma estratégia terapêutica em potencial no tratamento da hipertensão essencial. Estas alterações hemodinâmicas positivas modificaram o proteoma do ventrículo esquerdo de modo significativo, onde ambas as intensidades alteraram de forma semelhante proteínas relacionadas com a contração muscular, processos metabólicos e transporte, enquanto o SHR-A exerceu maior efeito na expressão das proteínas estruturais do nucleossomo. A redução na abundância da desmina, poliubiquitina B e C, e do canal voltagem dependente 3 e o aumento na abundância da proteína DJ-1 e proteínas antioxidantes representam respostas cardioprotetoras na HVE induzidas pelo treinamento aeróbio. Além disso, a resposta das variantes de histona 2HA ao treinamento em alta intensidade reforçam a idéia do exercício como agente modulador da cromatina, sendo este um potente mecanismo de regulação da transcrição gênica. Conforme esperado, o exercício modificou a abundância de inúmeras enzimas envolvidas em processos metabólicos. Destas, a  $\gamma$ -enolase e a adenina fosforibosiltransferase indicam uma resposta primordial da oxidação glicolítica e síntese de nucleotídeos no VE de ratos SHR em resposta ao treinamento. Por fim, o treinamento exibiu efeito positivo na expressão de proteínas sarcoméricas, apesar do efeito negativo na abundância da proteína C de ligação à miosina, relacionada à regulação da contração miofibrilar. Deste modo, estes dados sugerem o exercício físico como um possível mecanismo atenuador e restaurador da hipertrofia cardíaca patológica em resposta à hipertensão. No entanto, os mecanismos moleculares subjacentes a este processo ainda não são completamente esclarecidos, onde se sugere mais estudos, especialmente utilizando diferentes regimes de treinamento e investigação de proteoma subcelular específicos com foco nas proteínas mitocondriais.

## 11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. LANDSBERG, L., et al. Obesity-related hypertension: pathogenesis, cardiovascular risk, and treatment--a position paper of the The Obesity Society and The American Society of Hypertension. *Obesity (Silver Spring)*. 2013 Jan;21(1):8-24.
2. HUBERT, H. B., et al. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 1983 May;67(5):968-77.
3. NICHOLS, G. A., et al. Medical care costs among patients with established cardiovascular disease. *Am J Manag Care*. 2010 Mar;16(3):e86-e93.
4. AHA, American Heart Association -. *Cardiovascular Disease Statistics*. acessado em 9 de Março de 2010. 2006.
5. LORELL, B. H., CARABELLO, B. A. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation*. 2000 Jul 25;102(4):470-9.
6. LEY, R. E., et al. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Aug 2;102(31):11070-5.
7. DUERKOP, B. A., et al. Immune responses to the microbiota at the intestinal mucosal surface. *Immunity*. 2009 Sep 18;31(3):368-76.
8. HOOPER, L. V., et al. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science*. 2001 Feb 2;291(5505):881-4.
9. ANGELAKIS, E., et al. The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. *Future microbiology*. 2012 Jan;7(1):91-109.
10. LEY, R. E., et al. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006 Dec 21;444(7122):1022-3.
11. AMISOLA, R. V., JACOBSON, M. S. Physical activity, exercise, and sedentary activity: relationship to the causes and treatment of obesity. *Adolesc Med*. 2003 Feb;14(1):23-35.
12. CHURCH, T. S., et al. Changes in weight, waist circumference and compensatory responses with different doses of exercise among sedentary, overweight postmenopausal women. *PLoS One*. 2009;4(2):e4515.
13. ALMEIDA, J. A., et al. Exercise Training at MLSS Decreases Weight Gain and Increases Aerobic Capacity in Obese Zucker Rats. *Int J Sports Med*. 2013 Jul 30:In press.
14. WHO. Obesity and overweight: World Health Organization; 2012 [updated May 2012;10/02/2013].
15. SONG, H. K., et al. Deep RNA sequencing reveals novel cardiac transcriptomic signatures for physiological and pathological hypertrophy. *PLoS One*. 2012;7(4):e35552.
16. AMARAL, S. L., MICHELINI, L. C. Effect of gender on training-induced vascular remodeling in SHR. *Braz J Med Biol Res*. 2011 Sep;44(9):814-26.
17. PETRIZ, B. A., FRANCO, O. L. Effects of Hypertension and Exercise on Cardiac Proteome Remodelling. *BioMed research international*. 2014;2014:634132.
18. LIBONATI, J. R. Cardiac remodeling and function following exercise and angiotensin II receptor antagonism. *Eur J Appl Physiol*. 2012 Aug;112(8):3149-54.
19. FERNANDES, T., et al. Exercise training prevents the microvascular rarefaction in hypertension balancing angiogenic and apoptotic factors: role of microRNAs-16, -21, and -126. *Hypertension*. 2012 Feb;59(2):513-20.
20. YANG, A. L., et al. Enhancement of vasorelaxation in hypertension following high-intensity exercise. *Chin J Physiol*. 2011 Apr 30;54(2):87-95.

21. SILVA, D. M., et al. Swimming training improves the vasodilator effect of angiotensin-(1-7) in the aorta of spontaneously hypertensive rat. *J Appl Physiol*. 2011 Nov;111(5):1272-7.
22. ROSSONI, L. V., et al. Cardiac benefits of exercise training in aging spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2011 Dec;29(12):2349-58.
23. LIBONATI, J. R., et al. Exercise training improves systolic function in hypertensive myocardium. *J Appl Physiol*. 2011 Dec;111(6):1637-43.
24. 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*. 2011 Aug;58(2):182-9.
25. CARNEIRO-JUNIOR, M. A., et al. Exercise training and detraining modify the morphological and mechanical properties of single cardiac myocytes obtained from spontaneously hypertensive rats. *Braz J Med Biol Res*. 2010 Nov;43(11):1042-6.
26. BANSAL, A., et al. Proteomic analysis reveals late exercise effects on cardiac remodeling following myocardial infarction. *J Proteomics*. 2010 Sep 10;73(10):2041-9.
27. KOLWICZ, S. C., et al. Left ventricular remodeling with exercise in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 Oct;297(4):H1361-8.
28. GARCIARENA, C. D., et al. Endurance training in the spontaneously hypertensive rat: conversion of pathological into physiological cardiac hypertrophy. *Hypertension*. 2009 Apr;53(4):708-14.
29. QUEIPO-ORTUNO, M. I., et al. Gut Microbiota Composition in Male Rat Models under Different Nutritional Status and Physical Activity and Its Association with Serum Leptin and Ghrelin Levels. *PLoS One*. 2013;8(5):e65465.
30. MATSUMOTO, M., et al. Voluntary running exercise alters microbiota composition and increases n-butyrate concentration in the rat cecum. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2008 Feb;72(2):572-6.
31. CLARKE, S. F., et al. Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut*. 2014 Jun 9.
32. GUYENET, S. J., SCHWARTZ, M. W. Clinical review: Regulation of food intake, energy balance, and body fat mass: implications for the pathogenesis and treatment of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Mar;97(3):745-55.
33. MENDE, C. W. Obesity and hypertension: a common coexistence. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 2012 Mar;14(3):137-8.
34. DHALIWAL, S. S., WELBORN, T. A. Central obesity and multivariable cardiovascular risk as assessed by the Framingham prediction scores. *Am J Cardiol*. 2009 May 15;103(10):1403-7.
35. GO, A. S., et al. Heart Disease and Stroke Statistics--2013 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2013 Jan 1;127(1):e6-e245.
36. MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. *Vigitel Brasil 2013 : vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico*. Brasília : Ministério da Saúde, 2013. 150 p. : il. – (Série G. Estatística e Informação em Saúde). 2013.
37. BRAY, G. A., et al. Overweight and obesity: the pathogenesis of cardiometabolic risk. *Clin Cornerstone*. 2009;9(4):30-40; discussion 1-2.
38. DONG, F., et al. Impaired cardiac contractile function in ventricular myocytes from leptin-deficient ob/ob obese mice. *J Endocrinol*. 2006 Jan;188(1):25-36.

39. MOVAHED, M. R., et al. Obesity in Adolescence is Associated with Left Ventricular Hypertrophy and Hypertension. *Echocardiography*. 2011 Feb;28(2):150-3.
40. BAENA-DIEZ, J. M., et al. Obesity is an independent risk factor for heart failure: Zona Franca Cohort study. *Clin Cardiol*. 2010 Dec;33(12):760-4.
41. CLARK, K. Obesity and the risk of heart failure. *J Insur Med*. 2003;35(1):59-60.
42. BAHRAMI, H., et al. Novel metabolic risk factors for incident heart failure and their relationship with obesity: the MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis) study. *J Am Coll Cardiol*. 2008 May 6;51(18):1775-83.
43. ARTHAM, S. M., et al. Impact of obesity on the risk of heart failure and its prognosis. *J Cardiometab Syndr*. 2008 Summer;3(3):155-61.
44. SLIWA, K., et al. Hypertension: a global perspective. *Circulation*. 2011 Jun 21;123(24):2892-6.
45. KAPLAN, N. M. Primary hypertension. From pathophysiology to prevention. *Arch Intern Med*. 1996 Sep 23;156(17):1919-20.
46. HILL, J. A., OLSON, E. N. Cardiac plasticity. *N Engl J Med*. 2008 Mar 27;358(13):1370-80.
47. BOGLIOLO, Luigi. *Bogliolo Patologia*. FILHO, Geraldo Brasileiro, editor. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2011.
48. SCHILLACI, G., et al. From hypertension to hypertrophy to heart failure: the role of cardiotrophin-1. *J Hypertens*. 2013 Mar;31(3):474-6.
49. GRADMAN, A. H., ALFAYOUMI, F. From left ventricular hypertrophy to congestive heart failure: management of hypertensive heart disease. *Prog Cardiovasc Dis*. 2006 Mar-Apr;48(5):326-41.
50. NAKAO, K., et al. Myosin heavy chain gene expression in human heart failure. *J Clin Invest*. 1997 Nov 1;100(9):2362-70.
51. ZWADLO, C., BORLAK, J. Disease-associated changes in the expression of ion channels, ion receptors, ion exchangers and Ca(2+)-handling proteins in heart hypertrophy. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005 Sep 15;207(3):244-56.
52. BERNARDO, B. C., et al. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacology & therapeutics*. 2010 Oct;128(1):191-227.
53. EGSTRUP, M., et al. Abnormal glucose metabolism is associated with reduced left ventricular contractile reserve and exercise intolerance in patients with chronic heart failure. *European heart journal cardiovascular Imaging*. 2013 Apr;14(4):349-57.
54. OLIVETTI, G., et al. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med*. 1997 Apr 17;336(16):1131-41.
55. FORTUNO, M. A., et al. Clinical implications of apoptosis in hypertensive heart disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 May;284(5):H1495-506.
56. DIMEO, F., et al. Response to the antihypertensive effects of exercise among those with resistant hypertension. *Hypertension*. 2013 Jan;61(1):e2.
57. WHO. *Global recommendations on physical activity for health*. Geneva, Switzerland: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data; 2010.
58. PEREIRA, M. G., et al. Exercise training reduces cardiac angiotensin II levels and prevents cardiac dysfunction in a genetic model of sympathetic hyperactivity-induced heart failure in mice. *Eur J Appl Physiol*. 2009 Apr;105(6):843-50.
59. LEE, J., et al. Regular exercise produced cardioprotective effects on rat's heart with hypertension induced by L-NAME administration. *Clin Exp Hypertens*. 2009 Jun;31(4):364-75.

60. HALL, ARTHUR C. GUYTON & JOHN E. Tratado de Fisiología Médica Elsevier 2006. 1264 p.
61. SCHAUB, M. C., et al. Modulation of contractility in human cardiac hypertrophy by myosin essential light chain isoforms. *Cardiovasc Res*. 1998 Feb;37(2):381-404.
62. BOOTH, F. W., et al. Exercise and gene expression: physiological regulation of the human genome through physical activity. *J Physiol*. 2002 Sep 1;543(Pt 2):399-411.
63. WISLOFF, U., et al. Intensity-controlled treadmill running in rats: VO<sub>2</sub> max and cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Mar;280(3):H1301-10.
64. GIADA, F., et al. Exercise prescription for the prevention and treatment of cardiovascular diseases: part I. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2008 May;9(5):529-44.
65. KINNEY LAPIER, T. L., RODNICK, K. J. Effects of aerobic exercise on energy metabolism in the hypertensive rat heart. *Phys Ther*. 2001 Apr;81(4):1006-17.
66. PAPADEMETRIOU, V., KOKKINOS, P. F. Exercise Training and Blood Pressure Control in Patients With Hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)*. 1999 Oct;1(2):95-105.
67. LAWLER, P. R., et al. Efficacy of exercise-based cardiac rehabilitation post-myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am Heart J*. 2011 Oct;162(4):571-84 e2.
68. HAYKOWSKY, M. J., et al. A meta-analysis of the effect of exercise training on left ventricular remodeling in heart failure patients: the benefit depends on the type of training performed. *J Am Coll Cardiol*. 2007 Jun 19;49(24):2329-36.
69. PATTERSON, C. M., LEVIN, B. E. Role of exercise in the central regulation of energy homeostasis and in the prevention of obesity. *Neuroendocrinology*. 2008;87(2):65-70.
70. ARENA, R., et al. Assessment of functional capacity in clinical and research settings: a scientific statement from the American Heart Association Committee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention of the Council on Clinical Cardiology and the Council on Cardiovascular Nursing. *Circulation*. 2007 Jul 17;116(3):329-43.
71. WHO. Obesity and overweight. 2006;Fact sheet 311.
72. LIMA, L. C., et al. Hypotensive effects of exercise performed around anaerobic threshold in type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract*. 2008 Aug;81(2):216-22.
73. HALLIWILL, J. R. Mechanisms and clinical implications of post-exercise hypotension in humans. *Exerc Sport Sci Rev*. 2001 Apr;29(2):65-70.
74. LIEBLER, D. C. Proteomic approaches to characterize protein modifications: new tools to study the effects of environmental exposures. *Environ Health Perspect*. 2002 Feb;110 Suppl 1:3-9.
75. WILKINS, M. R., et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)*. 1996 Jan;14(1):61-5.
76. PETRIZ, B. A., et al. Effects of acute exercise over heart proteome from monogenic obese (ob/ob) mice. *J Cell Physiol*. 2013 Apr;228(4):824-34.
77. PETRIZ, B. A., et al. Proteomics applied to exercise physiology: a cutting-edge technology. *J Cell Physiol*. 2012 Mar;227(3):885-98.
78. BOLUYT, M. O., et al. Changes in the rat heart proteome induced by exercise training: Increased abundance of heat shock protein hsp20. *Proteomics*. 2006 May;6(10):3154-69.

79. BURNISTON, J. G. Adaptation of the rat cardiac proteome in response to intensity-controlled endurance exercise. *Proteomics*. 2009 Jan;9(1):106-15.
80. SUN, Biao., Jun hong Wang., Yuan yuan L., Shu shu Zhu., Jin Yang., Ji zheng Ma. Proteomic adaptation to chronic high intensity swimming training in the rat heart. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2008;Part D 3:108–17.
81. KAVAZIS, A. N., et al. Exercise training induces a cardioprotective phenotype and alterations in cardiac subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondrial proteins. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 Jul;297(1):H144-52.
82. POWERS, S. K., et al. Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med*. 2008 Jan 15;44(2):193-201.
83. ROE, M. R., GRIFFIN, T. J. Gel-free mass spectrometry-based high throughput proteomics: tools for studying biological response of proteins and proteomes. *Proteomics*. 2006 Sep;6(17):4678-87.
84. FRANZEL, B., WOLTERS, D. A. Advanced MudPIT as a next step towards high proteome coverage. *Proteomics*. 2011 Jul 7.
85. JENSEN, B. P., et al. Quantification of cyclizine and norcyclizine in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2011 Mar 15;879(9-10):605-9.
86. COMUNIAN, C., et al. A comparative MudPIT analysis identifies different expression profiles in heart compartments. *Proteomics*. 2011 Jun;11(11):2320-8.
87. WIESE, S., et al. Protein labeling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics*. 2007 Feb;7(3):340-50.
88. MURAD, A. M., RECH, E. L. NanoUPLC-MSE proteomic data assessment of soybean seeds using the Uniprot database. *BMC biotechnology*. 2012;12:82.
89. SHEN, Y., et al. High-efficiency nanoscale liquid chromatography coupled on-line with mass spectrometry using nanoelectrospray ionization for proteomics. *Anal Chem*. 2002 Aug 15;74(16):4235-49.
90. SOMMER, F., BACKHED, F. The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nature reviews Microbiology*. 2013 Apr;11(4):227-38.
91. HOOPER, L. V. Do symbiotic bacteria subvert host immunity? *Nature reviews Microbiology*. 2009 May;7(5):367-74.
92. HARRIS, K., et al. Is the gut microbiota a new factor contributing to obesity and its metabolic disorders? *J Obes*. 2012;2012:879151.
93. RAVEL, J., et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 15;108 Suppl 1:4680-7.
94. NICHOLSON, J. K., et al. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science*. 2012 Jun 8;336(6086):1262-7.
95. MILLION, M., RAOULT, D. The role of the manipulation of the gut microbiota in obesity. *Current infectious disease reports*. 2013 Feb;15(1):25-30.
96. NATIVIDAD, J. M., VERDU, E. F. Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: pathological and therapeutic implications. *Pharmacol Res*. 2013 Mar;69(1):42-51.
97. MILLION, M., et al. Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. *Int J Obes (Lond)*. 2012 Jun;36(6):817-25.
98. REINHARDT, C., et al. Intestinal microbiota during infancy and its implications for obesity. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2009 Mar;48(3):249-56.
99. TURNBAUGH, P. J., et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006 Dec 21;444(7122):1027-31.



100. TEHRANI, A. B., et al. Obesity and its associated disease: a role for microbiota? *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*. 2012 Apr;24(4):305-11.
101. BACKHED, F., et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Nov 2;101(44):15718-23.
102. QIN, J., et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. 2012 Oct 4;490(7418):55-60.
103. TURNBAUGH, P. J., et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009 Jan 22;457(7228):480-4.
104. ANGELAKIS, E., et al. An evaluation of the effects of *Lactobacillus ingluviei* on body weight, the intestinal microbiome and metabolism in mice. *Microb Pathog*. 2012 Jan;52(1):61-8.
105. FEI, N., ZHAO, L. An opportunistic pathogen isolated from the gut of an obese human causes obesity in germfree mice. *ISME J*. 2013 Apr;7(4):880-4.
106. DUNCAN, S. H., et al. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int J Obes (Lond)*. 2008 Nov;32(11):1720-4.
107. JUMPERTZ, R., et al. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *Am J Clin Nutr*. 2011 Jul;94(1):58-65.
108. SCHWIERTZ, A., et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity (Silver Spring)*. 2010 Jan;18(1):190-5.
109. HEFFERNAN, K. S., et al. Resistance exercise training reduces arterial reservoir pressure in older adults with prehypertension and hypertension. *Hypertens Res*. 2013 May;36(5):422-7.
110. HALLIWILL, J. R., et al. Postexercise hypotension and sustained postexercise vasodilatation: what happens after we exercise? *Exp Physiol*. 2013 Jan;98(1):7-18.
111. DE OLIVEIRA, E. P., BURINI, R. C. The impact of physical exercise on the gastrointestinal tract. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2009 Sep;12(5):533-8.
112. PETERS, H. P., et al. Potential benefits and hazards of physical activity and exercise on the gastrointestinal tract. *Gut*. 2001 Mar;48(3):435-9.
113. BUEHLMAYER, K., et al. Exercise associated genes in rat colon mucosa: upregulation of ornithin decarboxylase-1. *Int J Sports Med*. 2007 May;28(5):361-7.
114. CERIN, E., et al. Levels of physical activity for colon cancer prevention compared with generic public health recommendations: population prevalence and sociodemographic correlates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 Apr;14(4):1000-2.
115. CEBRA, J. J. Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am J Clin Nutr*. 1999 May;69(5):1046S-51S.
116. JANEWAY, C. A., Jr., MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. *Annual review of immunology*. 2002;20:197-216.
117. GLEESON, M., et al. Exercise and Toll-like receptors. *Exerc Immunol Rev*. 2006;12:34-53.
118. SEN, S., et al. Cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*. 1974 Nov;35(5):775-81.
119. SEN, S., et al. Biochemical changes associated with development and reversal of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res*. 1976 Mar;10(2):254-61.
120. ALMEIDA, J. A., et al. Assessment of maximal lactate steady state during treadmill exercise in SHR. *BMC Res Notes*. 2012;5:661.
121. ALMEIDA, J. A., et al. Determination of the Maximal Lactate Steady State in Obese Zucker Rats. *Int J Sports Med*. 2012 Sep 12.

122. HECK, H., et al. Justification of the 4-mmol/l lactate threshold. *Int J Sports Med.* 1985 Jun;6(3):117-30.
123. KINDERMANN, W., et al. The significance of the aerobic-anaerobic transition for the determination of work load intensities during endurance training. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1979 Sep;42(1):25-34.
124. BILLAT, V. L., et al. The concept of maximal lactate steady state: a bridge between biochemistry, physiology and sport science. *Sports Med.* 2003;33(6):407-26.
125. ARMOUGOM, F. and D. Raoult. Exploring microbial diversity using 16S rRNA high-throughput methods. *J Comput Sci Syst Biol.* 2009; 2(1):74-92.
126. CAPORASO, J. G., et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods.* 2010 May;7(5):335-6.
127. REEDER, J., KNIGHT, R. Rapidly denoising pyrosequencing amplicon reads by exploiting rank-abundance distributions. *Nat Methods.* 2010 Sep;7(9):668-9.
128. DESANTIS, T. Z., et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol.* 2006 Jul;72(7):5069-72.
129. EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics.* 2010 Oct 1;26(19):2460-1.
130. HAAS, B. J., et al. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Res.* 2011 Mar;21(3):494-504.
131. WANG, Q., et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol.* 2007 Aug;73(16):5261-7.
132. CLARKE, K.R. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology* 1993. ;18:117-43.
133. PARKS, D. H., BEIKO, R. G. Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities. *Bioinformatics.* 2010 Mar 15;26(6):715-21.
134. EVANS, C. C., et al. Exercise prevents weight gain and alters the gut microbiota in a mouse model of high fat diet-induced obesity. *PLoS One.* 2014;9(3):e92193.
135. KLAENHAMMER, T., et al. Discovering lactic acid bacteria by genomics. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2002 Aug;82(1-4):29-58.
136. MAKAROVA, K., et al. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Oct 17;103(42):15611-6.
137. PENG, L., et al. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *J Nutr.* 2009 Sep;139(9):1619-25.
138. ARMOUGOM, F., et al. Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and Methanogens in anorexic patients. *PLoS One.* 2009;4(9):e7125.
139. XIE, N., et al. Effects of two *Lactobacillus* strains on lipid metabolism and intestinal microflora in rats fed a high-cholesterol diet. *BMC Complement Altern Med.* 2011;11:53.
140. KANG, J. H., et al. Effects of *Lactobacillus gasseri* BNR17 on body weight and adipose tissue mass in diet-induced overweight rats. *J Microbiol.* 2010 Oct;48(5):712-4.
141. MUKHOPADHYA, I., et al. A comprehensive evaluation of colonic mucosal isolates of *Sutterella wadsworthensis* from inflammatory bowel disease. *PLoS One.* 2011;6(10):e27076.

142. YANAGIBASHI, T., et al. IgA production in the large intestine is modulated by a different mechanism than in the small intestine: *Bacteroides acidifaciens* promotes IgA production in the large intestine by inducing germinal center formation and increasing the number of IgA+ B cells. *Immunobiology*. 2013 Apr;218(4):645-51.
143. RODRIGUEZ-SEGADE, S., et al. High serum IgA concentrations in patients with diabetes mellitus: age-wise distribution and relation to chronic complications. *Clin Chem*. 1996 Jul;42(7):1064-7.
144. HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006 Dec 14;444(7121):860-7.
145. KAPLAN, C. W., et al. 16S ribosomal DNA terminal restriction fragment pattern analysis of bacterial communities in feces of rats fed *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl Environ Microbiol*. 2001 Apr;67(4):1935-9.
146. DABARD, J., et al. Ruminococcin A, a new lantibiotic produced by a *Ruminococcus gnavus* strain isolated from human feces. *Appl Environ Microbiol*. 2001 Sep;67(9):4111-8.
147. CHEN, W., et al. Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. *PLoS One*. 2012;7(6):e39743.
148. HANSEN, S. G., et al. Two cases of *Ruminococcus gnavus* bacteremia associated with diverticulitis. *Journal of clinical microbiology*. 2013 Apr;51(4):1334-6.
149. STRATE, L. L., et al. Obesity increases the risks of diverticulitis and diverticular bleeding. *Gastroenterology*. 2009 Jan;136(1):115-22 e1.
150. PARK, D. Y., et al. Supplementation of *Lactobacillus curvatus* HY7601 and *Lactobacillus plantarum* KY1032 in diet-induced obese mice is associated with gut microbial changes and reduction in obesity. *PLoS One*. 2013;8(3):e59470.
151. WALDRAM, A., et al. Top-down systems biology modeling of host metabolite-microbiome associations in obese rodents. *J Proteome Res*. 2009 May;8(5):2361-75.
152. XU, J., et al. Intake of Blueberry Fermented by *Lactobacillus plantarum* Affects the Gut Microbiota of L-NAME Treated Rats. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:809128.
153. CONTARTEZE, R. V., et al. Stress biomarkers in rats submitted to swimming and treadmill running exercises. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2008 Nov;151(3):415-22.
154. ALMEIDA, J.A., et al. Assessment of maximal lactate steady state during treadmill exercise in SHR. *BMC Research Notes*. 2012;5, (661).
155. RODRIGUES, B., et al. Maximal exercise test is a useful method for physical capacity and oxygen consumption determination in streptozotocin-diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol*. 2007;6:38.
156. MURAD, A., et al. Characterisation and quantitation expression analysis of recombinant proteins in plant complex mixtures using nanoUPLC mass spectrometry. *Protocol Exchange* 2011.
157. LI, G. Z., et al. Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. *Proteomics*. 2009 Mar;9(6):1696-719.
158. SILVA, J. C., et al. Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition. *Mol Cell Proteomics*. 2006 Jan;5(1):144-56.
159. WHO. A global brief on hypertension. 2013.
160. GO, A. S., et al. Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2013 Jan 1;127(1):e6-e245.

161. MELO, R. M., et al. Training-induced, pressure-lowering effect in SHR: wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles. *Hypertension*. 2003 Oct;42(4):851-7.
162. AMARAL, S. L., et al. Exercise training normalizes wall-to-lumen ratio of the gracilis muscle arterioles and reduces pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2000 Nov;18(11):1563-72.
163. CORNELISSEN, V. A., FAGARD, R. H. Effects of endurance training on blood pressure, blood pressure-regulating mechanisms, and cardiovascular risk factors. *Hypertension*. 2005 Oct;46(4):667-75.
164. AMARAL, S. L., et al. Exercise training causes skeletal muscle venular growth and alters hemodynamic responses in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2001 May;19(5):931-40.
165. HUANG, C. Y., et al. Anti-apoptotic and pro-survival effects of exercise training on hypertensive hearts. *J Appl Physiol*. 2012 Mar;112(5):883-91.
166. VOGT, M., et al. Significance of physical exercise in hypertension. Influence of water temperature and beta-blockade on blood pressure, degree of cardiac hypertrophy and cardiac function in swimming training of spontaneously hypertensive rats. *Basic Res Cardiol*. 1986;81 Suppl 1:157-69.
167. ZHANG, J., et al. Exercise training promotes expression of apelin and APJ of cardiovascular tissues in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci*. 2006 Aug 15;79(12):1153-9.
168. FARIA, T. O., et al. Acute resistance exercise reduces blood pressure and vascular reactivity, and increases endothelium-dependent relaxation in spontaneously hypertensive rats. *Eur J Appl Physiol*. 2010 Sep;110(2):359-66.
169. EVENWEL, R., STRUYKER-BOUDIER, H. Effect of physical training on the development of hypertension in the spontaneously hypertensive rat. *Pflugers Arch*. 1979 Jul;381(1):19-24.
170. SUN, M. W., et al. Low-intensity voluntary running lowers blood pressure with simultaneous improvement in endothelium-dependent vasodilatation and insulin sensitivity in aged spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res*. 2008 Mar;31(3):543-52.
171. HORTA, P. P., et al. Exercise training attenuates blood pressure elevation and adverse remodeling in the aorta of spontaneously hypertensive rats. *Life Sci*. 2005 Nov 12;77(26):3336-43.
172. VERAS-SILVA, A. S., et al. Low-intensity exercise training decreases cardiac output and hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol*. 1997 Dec;273(6 Pt 2):H2627-31.
173. FILHO, A. G., et al. Selective increase of angiotensin(1-7) and its receptor in hearts of spontaneously hypertensive rats subjected to physical training. *Exp Physiol*. 2008 May;93(5):589-98.
174. MEDEIROS, A., et al. Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2004 Dec;37(12):1909-17.
175. BURNISTON, J. G., HOFFMAN, E. P. Proteomic responses of skeletal and cardiac muscle to exercise. *Expert Rev Proteomics*. 2011 Jun;8(3):361-77.
176. LIU, Z., et al. Remarkably high activities of testicular cytochrome c in destroying reactive oxygen species and in triggering apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jun 13;103(24):8965-70.
177. DI SOMMA, S., et al. Changes in myocardial cytoskeletal intermediate filaments and myocyte contractile dysfunction in dilated cardiomyopathy: an in vivo study in humans. *Heart*. 2000 Dec;84(6):659-67.

178. BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 2002 Jan 1;16(1):6-21.
179. BANNISTER, A. J., KOUZARIDES, T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 2011 Mar;21(3):381-95.
180. TALBERT, P. B., HENIKOFF, S. Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 Apr;11(4):264-75.
181. SAYED, D., et al. Transcriptional regulation patterns revealed by high resolution chromatin immunoprecipitation during cardiac hypertrophy. *J Biol Chem.* 2013 Jan 25;288(4):2546-58.
182. HAN, P., et al. Chromatin remodeling in cardiovascular development and physiology. *Circ Res.* 2011 Feb 4;108(3):378-96.
183. ABDELLATIF, Ieng-Yi Chen; Jacqueline Lypowy; Jayashree Pain; Danish Sayed; Stan Grinberg; Ralph R. Alcendor; Junichi Sadoshima; Maha. Histone H2A.z Is Essential for Cardiac Myocyte Hypertrophy but Opposed by Silent Information Regulator 2 $\alpha$ . *The Journal of Biological Chemistry*,. 2006;286.
184. XU, Y., et al. Histone H2A.Z controls a critical chromatin remodeling step required for DNA double-strand break repair. *Mol Cell.* 2012 Dec 14;48(5):723-33.
185. MURAMATSU, T., MIYAUCHI, T. Basigin (CD147): a multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion. *Histol Histopathol.* 2003 Jul;18(3):981-7.
186. NEHME, C. L., et al. Distribution of the integral plasma membrane glycoprotein CE9 (MRC OX-47) among rat tissues and its induction by diverse stimuli of metabolic activation. *Biochem J.* 1995 Sep 1;310 ( Pt 2):693-8.
187. CHOU, W. L., et al. Identification of a novel prostaglandin reductase reveals the involvement of prostaglandin E2 catabolism in regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation. *J Biol Chem.* 2007 Jun 22;282(25):18162-72.
188. FERJANI, I., et al. Two distinct regions of calponin share common binding sites on actin resulting in different modes of calponin-actin interaction. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Sep;1804(9):1760-7.
189. ROCHA, L. A., et al. High molecular mass proteomics analyses of left ventricle from rats subjected to differential swimming training. *BMC Physiol.* 2012;12:11.
190. JIN, X., et al. Hyper-phosphorylation of alpha-enolase in hypertrophied left ventricle of spontaneously hypertensive rat. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Jul 11;371(4):804-9.
191. SHAVE, R., et al. Exercise-induced cardiac troponin T release: a meta-analysis. *Med Sci Sports Exerc.* 2007 Dec;39(12):2099-106.
192. FLASHMAN, E., et al. Cardiac myosin binding protein C: its role in physiology and disease. *Circ Res.* 2004 May 28;94(10):1279-89.
193. PRICE, M. G. Molecular analysis of intermediate filament cytoskeleton--a putative load-bearing structure. *Am J Physiol.* 1984 Apr;246(4 Pt 2):H566-72.
194. GALLEGO-DELGADO, J., et al. Comparison of the protein profile of established and regressed hypertension-induced left ventricular hypertrophy. *J Proteome Res.* 2006 Feb;5(2):404-13.
195. JIN, X., et al. Differential protein expression in hypertrophic heart with and without hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Proteomics.* 2006 Mar;6(6):1948-56.
196. JULLIG, M., et al. Is the failing heart out of fuel or a worn engine running rich? A study of mitochondria in old spontaneously hypertensive rats. *Proteomics.* 2008 Jun;8(12):2556-72.

197. ZHOU, S. G., et al. Proteomic analysis of hypertrophied myocardial protein patterns in renovascularly hypertensive and spontaneously hypertensive rats. *J Proteome Res.* 2006 Nov;5(11):2901-8.
198. JUNHONG, W., et al. Proteomic analysis of left ventricular diastolic dysfunction hearts in renovascular hypertensive rats. *Int J Cardiol.* 2008 Jul 4;127(2):198-207.
199. MENG, C., et al. Alterations of mitochondrial enzymes contribute to cardiac hypertrophy before hypertension development in spontaneously hypertensive rats. *J Proteome Res.* 2009 May;8(5):2463-75.
200. BURNISTON, J. G. Changes in the rat skeletal muscle proteome induced by moderate-intensity endurance exercise. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Jul-Aug;1784(7-8):1077-86.
201. EGAN, B., ZIERATH, J. R. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab.* 2013 Feb 5;17(2):162-84.
202. HODY, S., et al. Human muscle proteome modifications after acute or repeated eccentric exercises. *Med Sci Sports Exerc.* 2011 Dec;43(12):2281-96.
203. FABER, M. J., et al. Proteomic changes in the pressure overloaded right ventricle after 6 weeks in young rats: correlations with the degree of hypertrophy. *Proteomics.* 2005 Jul;5(10):2519-30.
204. BUGGER, H., et al. Proteomic remodelling of mitochondrial oxidative pathways in pressure overload-induced heart failure. *Cardiovasc Res.* 2010 Jan 15;85(2):376-84.
205. GLICKMAN, M. H., CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* 2002 Apr;82(2):373-428.
206. BODINE, S. C., et al. Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science.* 2001 Nov 23;294(5547):1704-8.
207. CUNHA, T. F., et al. Aerobic exercise training upregulates skeletal muscle calpain and ubiquitin-proteasome systems in healthy mice. *Journal of applied physiology.* 2012 Jun;112(11):1839-46.
208. KELLER, A., et al. Differential expression of alpha- and beta-enolase genes during rat heart development and hypertrophy. *Am J Physiol.* 1995 Dec;269(6 Pt 2):H1843-51.
209. N., Chosa. E; Sekimoto. T; Sonoda. N; Yamamoto. K; Matsuda. H; Takahama. K; Tajima. Evaluation of human beta-enolase as a serum marker for exercise-induced muscle damage. *Clin J Sport Med* 2003;13(4):209-12.
210. SUTTON, J. R., et al. Purine metabolism during strenuous muscular exercise in man. *Metabolism.* 1980 Mar;29(3):254-60.
211. TERJUNG, R. L., et al. Effect of exercise on the turnover of cytochrome c in skeletal muscle. *J Biol Chem.* 1973 Nov 10;248(21):7404-6.
212. TAIRA, T., et al. DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO reports.* 2004 Feb;5(2):213-8.
213. MCNALLY, R. S., et al. DJ-1 enhances cell survival through the binding of Cezanne, a negative regulator of NF-kappaB. *J Biol Chem.* 2011 Feb 11;286(6):4098-106.
214. DAI, Q., et al. The left ventricle proteome differentiates middle-aged and old left ventricles in mice. *J Proteome Res.* 2008 Feb;7(2):756-65.
215. GONCALVES, R. P., et al. Mini review on the structure and supramolecular assembly of VDAC. *J Bioenerg Biomembr.* 2008 Jun;40(3):133-8.
216. MULLER, F. L., et al. Trends in oxidative aging theories. *Free Radic Biol Med.* 2007 Aug 15;43(4):477-503.

217. DESKUR, E., et al. Exercise-induced increase in hydrogen peroxide plasma levels is diminished by endurance training after myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 1998 Dec 31;67(3):219-24.

## ANEXO A

### Lista de publicações realizadas ao longo do Doutorado, a partir de Março de 2011 até Setembro de 2014.

**Petriz, B. A.**, Gomes, C. P., ROCHA, L. A. O., Rezende, T. M. B., Franco, O. L. Proteomics applied to exercise physiology: a cutting-edge technology. *Journal of Cellular Physiology* (Print). p. 885-898, 2011. IF: 4.218

ALMEIDA, J.A., **PETRIZ, B.A.**, Gomes, C.P.C, Pereira, R.W., Franco, O.L. Assessment of maximal lactate steady state during treadmill exercise in SHR. *BMC Research Notes*. , v.5, p.661 - , 2012. Unofficial IF: 1.39

Rocha, Luiz A O, **Petriz, Bernardo**, Borges, David H, Oliveira, Ricardo J, Andrade, Rosangela V de, Domondt, Gilberto, Pereira, Rinaldo W, Franco, Octávio L. High molecular mass proteomics analyses of left ventricle from rats subjected to differential swimming training. *BMC Physiology* (Online). , v.12, p.11, 2012. Unofficial IF: 2.13

Tonietto, Angela, **Petriz, Bernardo A**, Araujo, Werika C, Mehta, Angela, Magalhaes, Beatriz S, Franco, Octavio L. Comparative proteomics between natural *Microcystis* isolates with a focus on microcystin synthesis. *Proteome Science*. v.10, p.38, 2012. IF: 2.42

Fariba Mehrkhou., TALEBI, A. A., KOCHAMESHGI, M. G., HOSSEININAVEH, V., CANDIDO, E. S., **PETRIZ, B.A.**, DIAS, S. C., CASTRO, M. E. B., Mehta, A., Franco, O.L. Comparative proteomic analyses of *Anticarsia gemmatalis* and *Spodoptera frugiperda* guts. *African Journal of Agricultural Research*. v.7, p.3342-3348, 2012. IF: 0.26

**PETRIZ, BERNARDO A.**, CUNHA, VERUSCA N., VILLETH, GABRIELA R. C., Mehta, Ângela, ROCHA, LUIZ A. O., SILVA, OSMAR N., ALMEIDA, JEESER A., MORAIS, PAMELA K., SIMÕES, HERBERT G., FRANCO, OCTÁVIO L. Effects of acute exercise over heart proteome from monogenic obese (ob/ob) mice. *Journal of Cellular Physiology* (Print). v.227, p. n/a, 2012. IF: 4.218

**PETRIZ, B.A.**, ALMEIDA, J.A., Freire, M.S, Rezende, T.M.B., ROCHA, L. A. O., FRANCO, L. O. Mitochondrial proteomics: from structure to function. In: *Proteomics - Human Diseases and Protein Functions*. 1 ed. Rijeka: InTech, 2012, v.1, p. 369-390.

ALMEIDA, J.A., **PETRIZ, B.A.**, Gomes, C.P.C, ROCHA, L. A. O., Pereira, R.W., Franco, O.L. Determination of the maximal lactate steady state in obese Zucker rats. *International Journal of Sports Medicine*. v.34, p.214-217, 2013. IF: 2.433

ALMEIDA, JEESER A., **PETRIZ, B.A.**, GOMES, C. P. C., ARAUJO, R. C., Pereira, R.W., FRANCO, O. L. Exercise Training at MLSS Decreases Weight Gain and Increases Aerobic Capacity in Obese Zucker Rats. *International Journal of Sports Medicine*. v.86, p. n/a, 2013. IF: 2.433



**PETRIZ, B.A.**, ALMEIDA, J. A., MIGLIOLO, L., FRANCO, O. L. Pharmacological potential of exercise and RAS vasoactive peptides for prevention of diseases. *Current Protein and Peptide Science*. v.14, p.459-471, 2013. IF: 2.88

REZENDE, T. M. B., LIMA, S. M. F., **PETRIZ, B.A.**, SILVA, OSMAR N., Freire, M.S, FRANCO, O. L. Dentistry proteomics: From laboratory development to clinical practice. *Journal of Cellular Physiology (Print)*. p.2271-2284, 2013. IF: 4.218

**PETRIZ, B.A.**; GOMES, C.P.C. Extração de proteínas de tecido animal. In: Franco, O.L; Gomes, C.P.C, Dias, S.C. (Org.). Manual para estudo de proteínas.. 1ed.Florianópolis: Bookess, 2013, v. 1, p. 1-181.

**Petriz, B. A.**; TONIETTO, A. . Eletroforese em gel de poliacrilamida 1D (SDS-PAGE). In: Franco, O.L; Gomes, C.P.C, Dias, S.C. (Org.). Manual para estudo de proteínas. 1ed.Florianópolis: Bookess, 2013, v. 1, p. 1-170.

**PETRIZ, B.A.**; FRANCO, O. L. Advances in Protein Chemistry and Structural Biology: Proteomics in Biomedicine and Pharmacology. *ADV PROTEIN CHEM STR*, v. 95, p. 1-24, 2014.

**PETRIZ, B.A.**; FRANCO, O. L. Effects of Hypertension and Exercise on Cardiac Proteome Remodelling. *BioMed Research International*, v. 2014, p. 1-14, 2014.

**PETRIZ, B.A.**; CASTRO, A. P.; ALMEIDA, J. A.; GOMES, C. P. C. ; FERNANDES, G. R.; KRUGER, R. H.; PEREIRA, R. W.; FRANCO, O. L. Exercise induction of gut microbiota modifications in obese, non-obese and hypertensive rats. *BMC Genomics*, v. 15, p. 511, 2014.

#### **Publicações aceitas (ainda não publicadas)**

**PETRIZ, B.A.** et al., Exercise performed around MLSS decreases systolic blood pressure and increases aerobic capacity in hypertensive rats. *BMC Physiol*, 2014

**PETRIZ, B.A.** et al., NanoUPLC/MSE proteomic analysis reveals modulation on left ventricle proteome from hypertensive rats after exercise training. *Journal of Proteomics*, 2014.

#### **Publicações Submetidas em prelo**

**PETRIZ, B.A.**, PRESTES, J., FRANCO, O.C. Exercise and close interactions with the immune system and gut microbiota. *Exercise Immunology Review*.2014

Petriz, B.A., Prestes, J e Franco, O.C. 2014

*Submitted: 8-07-2014*

Considered for publication in a review model.

## ANEXO B

### Publicações submetidas

**Exercise performed around MLSS decreases systolic blood pressure and increases aerobic capacity in hypertensive rats**

Petriz, B.A et al., 2014

BMC Physiol

*manuscript ID:* 5610166121172936

*submitted:* 29 Dec 2013

*peer review status:* Under review

### Publicações aceitas com correções requeridas:

**NanoUPLC/MSE proteomic analysis reveals modulation on left ventricle proteome from hypertensive rats after exercise training**

Petriz, B.A et al., 2014

Journal of Proteomics

Submitted: 25-08-2014

Major corrections

**Exercise and close interactions with the immune system and gut microbiota**

Petriz, B.A., Prestes, J e Franco, O.C. 2014

Exercise Immunology Review.

*Submitted:* 8-07-2014

Considered for publication in a review model.

## **ANEXO C**

Plano de trabalho desenvolvido no estágio doutoral no laboratório *Structural Genomics Consortium* na Universidade de Oxford – Reino Unido no período de 2012-2013.



**UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA - UCB**  
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa - PRPGP  
Programa de Pós-Graduação "Stricto Sensu" em  
Ciências Genômicas e Biotecnologia



**Chamada de Projetos CNPq/Structural Genomics  
Consortium-**

**SGC N ° 29/2011 – Programa Ciência sem Fronteiras**

**Plano de trabalho de 12 meses**

**Doutorado sanduiche SGC – Oxford**

**Proponentes: Bernardo Petriz de Assis**



**UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA - UCB**  
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa - PRPGP  
Programa de Pós-Graduação "Stricto Sensu" em  
Ciências Genômicas e Biotecnologia



### **Plano de trabalho de 12 meses**

O projeto implica no uso de métodos de alto desempenho (HTP) do consórcio SGC (*Structural Genomics Consortium*) na produção de proteínas recombinantes usando o sistema de expressão por *E.coli* ou baculovirus. O grupo de Biotecnologia tem interesse no desenvolvimento de novas tecnologias de expressão, purificação e caracterização de proteínas alvo do consórcio SCG. O nosso principal foco consiste na construção de uma linha de produção de proteínas recombinantes, que é de alto interesse para o grupo associado da Universidade Católica de Brasília, juntamente ao consórcio SGC e determinar, usando métodos eficientes de detecção, quais proteínas são expressas em estado solúvel e estável para futuros estudos estruturais. A plataforma estabelecida pela equipe de Biotecnologia implementada em Oxford tem gerado mais de 360 novas estruturas de proteínas humanas e 1 proteína integral de membrana em menos de 7 anos. As áreas foco de interesse da SCG em Oxford incluem epigenética, proteínas quinases, biogênese de organela, silenciamento de fator de crescimento, processamento de RNA-DNA e proteínas integrais de membrana (IMPs). Todos esses alvos são selecionados de acordo com sua viabilidade pelo grupo *Biotech* e a maioria deles são purificados para posterior cristalização pelos membros das equipes de Biologia.

O projeto requer um (1) estudante de Doutorado do laboratório do Prof. Octávio Franco para passar seis (6) meses trabalhando na seleção e triagem em alto desempenho (HTP) em uma variedade de alvos da SGC, as quais usualmente são pequenas proteínas humanas como bromodominio e domínio PHD. Os seis (6) meses restantes serão destinados junto ao grupo *Biotech* na expressão de proteínas em alta escala por *E.coli* e sua purificação ou em um dos grupos de Biologia focado na purificação de proteínas específicas. O estudante também usará técnicas de qualidade em controle como espectrometria de massa para identificar modificações pós-transdacionais como fosforilação ou glicosilação. Possivelmente haverá a oportunidade de usar outras técnicas de biofísica a estas proteínas, incluindo verificação por estabilidade térmica usando qPCR para identificar ligantes que aumentam a estabilidade.

O estudante do Prof. Octavio L. Franco ira aprender como aplicar estas técnicas descritas acima e caso haja tempo hábil, métodos adicionais como expressão em inseto e ou células animais. Ele ira adquirir muitas das habilidades técnicas empregadas em um laboratório de produção de proteínas, trabalhando de maneira altamente eficiente em colaboração estreita com outros grupos do consórcio SGC. O estudante será treinado para técnicas em biologia molecular se tornando capacitado na expressão e purificação de proteínas para cristalização e estudos funcionais.

## Cronograma

### 1º Semestre

Atividades	1º mês	2º mês	3º mês	4º mês	5º mês	6º mês
Clonagem em alto desempenho (HTP)	X	X				
Teste de expressão		X	X			
Purificação de diferentes famílias de proteínas humanas em bactérias			X	X	X	
Expressão em sistema baculovírus.					X	X

### 2º Semestre

Atividades	1º mês	2º mês	3º mês	4º mês	5º mês	6º mês
Expressão de alvos específicos em alta escala em bactéria	X	X				
Expressão de alvos específicos em alta escala em baculovírus.			X	X		
Purificação de proteínas				X	X	X

#### Técnicas a serem desenvolvidas:

96-well PCR e Clonagem de ligação Independente.

Mutagênese.

Testagem de expressão em *E.coli* (em celular de inseto).

1-10 Expressão de proteínas em larga escala (amplificação viral para baculovírus).

Purificação usando o sistema ÄKTA-Xpress or ÄKTA-Purifier (IMAC, GF e troca iônica).

Espectrometria de massa e outras técnicas biofísicas (como Tm shift assay) caso necessário.

## **Solicitação de Oxford**

### **1. Essas técnicas serão usadas para qual aspecto do trabalho que vocês já desenvolvem?**

O Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas (CAPB) tem como um de seus principais focos a identificação de peptídeos antimicrobianos assim como na identificação de marcadores provenientes de doenças cardiovasculares e metabólicas. Ambas as linhas contemplem o objetivo comum da formulação farmacológica. O treinamento nas técnicas de expressão e purificação de proteínas recombinantes assim como no método biofísico de caracterização, como a espectrometria de massa serão vitais para ambas as linhas de pesquisa do CAPB principalmente objetivando uma linha de produção em larga escala. A amplificação e aprimoramento destas técnicas e do processo de purificação de peptídeos antimicrobianos poderão, por exemplo, gerar uma maior demanda de cooperação com a linha de pesquisa em nano farmacologia. Ação semelhante na identificação dos marcadores moleculares em modelo animal patológico com o aprimoramento técnico recebido em espectrometria de massa. Desta forma a vivencia e o treinamento destas técnicas junto ao consórcio SG em Oxford implicará no aprimoramento geral e o estreitamento técnico entre as linhas de pesquisa do CAPB.

### **2. Quais são as vantagens para o CNPq/Brasil financiar um aluno para adquirir essa técnica?**

Além de contribuir para a formação pessoal do aluno diretamente envolvido no projeto e do aprimoramento e estabelecimento de novas linhas de pesquisa no CAPB, abre-se uma estreita possibilidade de colaboração junto ao consorcio SG em Oxford. A colaboração junto a este centro de excelência em pesquisa tem valor inestimável no âmbito do treinamento técnico-científico do alunato brasileiro vinculado às áreas de pesquisa de colaboração entre o CAPB e SGC-Oxford. É importante ressaltar a grande relevância da cooperação de uma instituição de pesquisa brasileira (CAPB-Universidade Católica de Brasília) junto a um relevante consórcio de internacional de biotecnologia, uma vez que a produção de proteínas recombinantes tem efetivo valor industrial e potencial para o desenvolvimento farmacologia em baixo custo. Desta forma o financiamento do aluno brasileiro é o passo inicial para o estabelecimento técnico e pessoal entre as instituições assim como estratégico para a abertura e estabelecimento de novas cooperações.

### **3. O aluno: formação pessoal? Abrir novas linhas de colaboração?**

O treinamento das técnicas desenvolvidas e aprimoradas pelo aluno financiado pelo CNPq/Brasil, possibilita a execução de Workshops e treinamento de demais brasileiros em formação acadêmico-científico. A vasta variedade da flora brasileira permite ao CAPB testar uma gama de peptídeos e sua possível atividade farmacológica. A possibilidade de cooperação junto ao SGC permite estreitar a linha entre; identificação e purificação e a expressão e produção de novos compostos em larga escala. O mesmo cenário pode ser desenvolvido junto à linha de pesquisa de identificação de marcadores patológicos relacionados a doenças cardiovasculares e metabólicas. Desta forma a formação pessoal é de extrema importância no estabelecimento de novas linhas de pesquisa através do estreitamento da relação técnica científica com demais pesquisadores do exterior, permitindo assim o intercambio entre as instituições.

Prof. Dr. Octavio Luiz Franco  
Universidade Católica de Brasília  
Programa de Pós Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia  
GAN 916N – Av. W5 – Campus II – Modulo C  
Brasília-DF, Brazil  
e-mail: [ocfranco@pos.ucb.br](mailto:ocfranco@pos.ucb.br) / e-mail: ocfranco@gmail.com



## ANEXO D

Os resultados do Volume I da presente tese foi recentemente publicado no periódico *BMC Genomics*

Research article

Highly accessed

Open Access

### Exercise induction of gut microbiota modifications in obese, non-obese and hypertensive rats

Bernardo A Petriz<sup>1,5†</sup>, Alinne P Castro<sup>2,4†</sup>, Jeesser A Almeida<sup>1,3,5</sup>, Clarissa PC Gomes<sup>1</sup>, Gabriel R Fernandes<sup>1</sup>, Ricardo H Kruger<sup>2</sup>, Rinaldo W Pereira<sup>1,3</sup> and Octavio L Franco<sup>1,3,4\*</sup>

\* Corresponding author: Octavio L Franco [ocfranco@gmail.com](mailto:ocfranco@gmail.com)

▼ Author Affiliations

† Equal contributors

1 Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF, Brazil

2 Laboratório de Enzimologia, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brazil

3 Programa de Pós-Graduação em Educação Física, Universidade Católica de Brasília, Brasília, DF, Brazil

4 Universidade Católica Dom Bosco, Pos-Graduação em Biotecnologia, Campo Grande, MS, Brazil

5 UDF centro Universitário, Brasília, DF, Brasil

Email: Bernardo A Petriz [bernardopetriz@gmail.com](mailto:bernardopetriz@gmail.com) - Alinne P Castro [p.alinne@gmail.com](mailto:p.alinne@gmail.com) - Jeesser A Almeida [jeeser@gmail.com](mailto:jeeser@gmail.com) - Clarissa PC Gomes [clarissapgomes@gmail.com](mailto:clarissapgomes@gmail.com) - Gabriel R Fernandes [fernandes.gabriel@gmail.com](mailto:fernandes.gabriel@gmail.com) - Ricardo H Kruger [kruger@unb.br](mailto:kruger@unb.br) - Rinaldo W Pereira [rinaldo.ucb@gmail.com](mailto:rinaldo.ucb@gmail.com) - Octavio L Franco [ocfranco@gmail.com](mailto:ocfranco@gmail.com)

*BMC Genomics* 2014, **15**:511 doi:10.1186/1471-2164-15-511

The electronic version of this article is the complete one and can be found online at:  
<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/15/511>