

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
UFSCAR/UNESP

A INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO FÍSICO EM RATOS
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS TRATADOS COM DEXAMETASONA:
CONTRIBUIÇÃO DOS microRNAs

Aluna: Naiara Araújo Herrera

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Lia do Amaral Cardoso

Bauru
Setembro/2020

Naiara Araújo Herrera

**A INFLUÊNCIA DO TREINAMENTO FÍSICO EM RATOS
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS TRATADOS COM DEXAMETASONA:
CONTRIBUIÇÃO DOS microRNAs**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos como requisito para a obtenção do título de **Doutora em Ciências Fisiológicas**

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Lia do Amaral Cardoso.

**Bauru
Setembro/ 2020**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Naiara Araújo Herrera, realizada em 02/09/2020.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Sandra Lia do Amaral Cardoso (UNESP)

Prof. Dr. Gerson Jhonatan Rodrigues (UFSCar)

Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos (USP)

Prof. Dr. Anderson Saranz Zago (UNESP)

Prof. Dr. Thiago José Dionisio (USP)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

EPIGRAFE

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

DEDICATÓRIA

À minha família e aos meus amigos que formam o alicerce da minha vida. Sem vocês, seria impossível.

AGRADECIMENTOS

À todos os professores que tiveram participação na minha formação e funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas e do Programa Inter-Institucional de Pós-Graduação em Ciências fisiológicas - associação ampla UFSCAR/ UNESP.

Ao suporte financeiro realizado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP PROCESSO #2016/12532-5 e FAPESP BEPE (Bolsa de Estágio Pesquisa no Exterior) PROCESSO #2018/06998-7).

Ao Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos (FOB-USP), por ceder o laboratório para a realização das análises dos microRNAs e ao Especialista de Laboratório Dr. Thiago J. Dionísio (FOB-USP) por me ensinar e auxiliar nessas análises.

Ao Prof. André Luis Shinohara (FOB-USP) e ao Prof. Jesus Carlos Andreo (FOB-USP), por cederem o laboratório para a realização das análises morfométricas pela técnica de coloração com Hematoxilina e eosina.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a Sandra Lia do Amaral Cardoso, pela oportunidade de realizar o Doutorado, pela competência na orientação, pela dedicação ao seu trabalho e aos seus alunos, pelo respeito e por todos os ensinamentos ao longo desses anos.

Aos amigos do LEFEx, Aline, Lidiane, André, Anderson, Paula, Isley, Francine, Mayara, Vinicius, Danyelle, Lidieli, por todos os momentos que compartilhamos juntos tanto dentro como fora do laboratório.

À Amanda, por todos os momentos vividos durante esses anos, por todo incentivo e por estar comigo mesmo nos momentos de fraqueza.

Em especial aos meus pais, Edna e Gilson, e ao meu irmão Renan, pelo apoio, incentivo, por me amarem incondicionalmente e por me darem o privilégio de fazer parte dessa família. “Quando as raízes são profundas, não há razão para temer o vento”.

RESUMO

A hipertensão arterial (HA) é uma doença multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA) que pode ser dividida em HA primária e secundária. A dexametasona (DEX) é um glicocorticoide sintético, cujo uso crônico pode desencadear HA. O uso de DEX em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) pode aumentar o risco de mortalidade pela hipertensão exacerbada. A rarefação da microcirculação está presente tanto na HA primária como na induzida por DEX e está associada com alterações nas vias angiogênicas e apoptóticas. Mais recentemente, os microRNAs vêm ganhando visibilidade e sendo considerados importantes na determinação da densidade capilar, contudo, seu papel na rarefação microvascular induzida pela DEX em SHR ainda não foi investigado. Inversamente, o treinamento físico (TF) tem sido recomendado como co-adjuvante no tratamento da HA. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar se o treinamento físico é capaz de atenuar aumento da pressão arterial em SHR tratados com DEX e se esse efeito está associado às alterações na expressão dos microRNAs relacionadas a microcirculação. Ratos normotensos (Wistar) e hipertensos (SHR) foram submetidos a 8 semanas de TF em esteira (60% da capacidade máxima, 5 dias por semana, 1 hora por dia) ou mantidos sedentários. Durante 14 dias, após as 8 semanas de treinamento físico, os animais foram tratados com DEX (50µg/kg de peso corporal por dia, *s.c.*) ou salina. A pressão arterial e a análise espectral foram aferidas após o tratamento com DEX. Posteriormente, o músculo tibial anterior e o ventrículo esquerdo foram retirados e processados para avaliação da densidade capilar e razão capilar fibra nessas musculaturas, bem como, para a avaliação da produção proteica do VEGF, AKT, p-AKT, eNOS, Bcl-2 e caspase-3-clivada e da expressão gênica dos microRNAs-16, 21, 126, 155, 221 e 222. Nos ratos Wistar a DEX causou aumento da pressão arterial (+27%), desbalanço autonômico para o coração, redução da densidade capilar e da razão capilar fibra no músculo tibial anterior, associado à redução do VEGF, da p-AKT/AKT, da Bcl-2 e ao aumento da caspase-3-clivada. Já o treinamento físico atenuou o aumento da pressão arterial (-10%) e o desbalanço autonômico para o coração. Ainda, preveniu a redução da densidade capilar no músculo tibial anterior associada ao aumento da expressão do microRNA 126, atenuação da redução do VEGF, da p-AKT/AKT, da Bcl-2 e a atenuação do aumento da caspase-3-clivada. Além disso, o treinamento físico aumentou a densidade capilar no ventrículo esquerdo dos animais Wistar por aumentar a expressão do microRNA 126, a razão entre p-AKT/AKT e a eNOS. Nos SHR, a DEX, não acarretou aumento da pressão arterial. Já o treinamento físico reduziu a pressão arterial e aumentou a densidade capilar e a razão capilar fibra no músculo tibial anterior e no ventrículo esquerdo. Assim, pode-se concluir o pré-condicionamento físico atenua a hipertensão arterial induzida pela DEX em ratos Wistar, por prevenir o desbalanço autonômico para o coração, bem como a rarefação da microcirculação na musculatura esquelética, resposta esta que foi associada a maior expressão do microRNA 126. Além disso, o TF *per se* promove angiogênese no miocárdio associada ao aumento do microRNA 126, independente do tratamento com DEX. Ainda, o TF foi eficaz em reduzir a hipertensão arterial nos SHR, independente do tratamento com a DEX, por melhorar o balanço autonômico e a microcirculação dos músculos tibial anterior e cardíaco. Vale ressaltar que a DEX não exacerbou as alterações hemodinâmicas e da microcirculação já presentes nos SHR.

Palavras chaves: Glicocorticoide, exercício físico, pressão arterial, rarefação, musculatura esquelética.

ABSTRACT

Hypertension (HT) is a multifactorial disease characterized by elevated and sustained blood pressure (BP), which can be primary or secondary. Dexamethasone (DEX) is a synthetic glucocorticoid and its chronic use causes hypertension. Hypertension exacerbation induced by DEX on spontaneously hypertensive rats (SHR) could increase mortality risk. Microvascular rarefaction is present in both primary and DEX-induced hypertension and it is associated with angiogenic/apoptotic pathway unbalance. More recently, microRNA has been considered important in determining the genesis of spontaneous hypertension, however, their role in DEX-induced hypertension in SHR has not been investigated. Conversely, physical training (T) has been recommended as a co-adjuvant for the HT treatment. Thus, the aim of the present study was to investigate whether physical training is able to attenuate blood pressure increase in SHR treated with DEX and whether if this effect is associated with changes in microRNA related to microcirculation. Normotensive (Wistar) and hypertensive (SHR) rats underwent 8 weeks of T on a treadmill (60% of maximum capacity, 5 days a week, 1 hour a day) or kept sedentary. During 14 days, after 8 weeks of physical training, animals were treated with DEX (50 μ g / kg of body weight per day, s.c.) or saline. Blood pressure measurement and spectral analysis were performed after DEX treatment. Subsequently, tibialis anterior muscle and left ventricle were removed and processed for capillary density and capillary-to-fiber ratio evaluation, as well as VEGF, AKT, p-AKT, eNOS, Bcl-2, caspase-3-cleaved proteins levels and microRNA-16, 21, 126, 155, 221 and 222 expression. In Wistar rats, DEX increased blood pressure (+27%), caused an autonomic imbalance to the heart, reduced capillary density and capillary-to-fiber ratio on tibialis anterior muscle associated with VEGF, p-AKT / AKT, Bcl-2 reduction and caspase-3-cleaved increase. Training attenuated blood pressure (-10%) increase and autonomic imbalance to the heart and prevented capillary density and capillary-to-fiber ratio reduction on tibialis anterior muscle associated with microRNA 126 increase and with a better balance between VEGF, p-AKT/AKT, Bcl-2 and caspase-3-cleaved levels. In SHRs, training reduced blood pressure and increased tibialis anterior muscle and left ventricle capillary density and capillary-to-fiber ratio. Thus, exercise training attenuates hypertension induced by DEX in Wistar rats due to autonomic imbalance attenuation and microcirculation rarefaction prevention associated with microRNA 126 increase. T, per se, induced myocardium angiogenesis associated with microRNA 126 increase, regardless DEX treatment. In addition, T reduced H in SHR, regardless DEX treatment, due to autonomic balance and microcirculation improvement. DEX did not exacerbate hemodynamic and microcirculation alteration already present in SHR.

Keywords: Glucocorticoid, physical exercise, blood pressure, rarefaction, skeletal muscle.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Demonstração esquemática das vias de ativação angiogênica, e apoptóticas.....21
- Figura 2.** Linha do tempo do protocolo experimental durante 70 dias. Peso corporal (PC), teste máximo (Teste max), pressão arterial.....30
- Figura 3:** Delta da capacidade física máxima, comparando os valores após e antes do período de treinamento físico dos ratos Wistar sedentários (n=20) e treinados (n=20). Significância: + vs sedentário; p<0,05.....38
- Figura 4:** Delta da capacidade física máxima, comparando os valores após o tratamento e após o período de treinamento físico dos ratos Wistar sedentário controle, SC (n=10), sedentário dexametasona, SD (n=10), treinado controle, TC (n=10) e treinado dexametasona, TD (n=10). Significância: p<0,05.....38
- Figura 5:** Delta do peso corporal durante o período de treinamento físico na esteira nos animais Wistar sedentários (n=20) e treinados (n=20). Significância: p<0,05.....39
- Figura 6:** Delta do peso corporal durante o período de tratamento com dexametasona nos grupos de ratos Wistar: sedentário controle (n=10), sedentário dexametasona (n=10), treinado controle (n=10) e treinado dexametasona (n=10). Significância: * vs controle; p<0,05.....40
- Figura 7:** Valores de pressão arterial sistólica (Painel A), diastólica (Painel B) e média (Painel C) dos grupos Wistar sedentários controle (SC, n=8), sedentário dexametasona (SD, n=9), treinado controle (TC, n=7) e treinado dexametasona (TD, n=9). Significância: * vs controle, + vs sedentário;p<0,05.....41
- Figura 8:** Valores de frequência cardíaca dos grupos Wistar sedentários controle (SC, n=5), sedentário dexametasona (SD, n=5), treinado controle (TC, n=5) e treinado dexametasona (TD, n=7). Significância: + vs sedentário; p<0,05.....42
- Figura 9:** Valores das ondas de Baixa frequência (Painel A), Alta frequência (Painel B), Baixa frequência/Alta frequência (Painel C) para o coração e valores das ondas de Baixa frequência (Painel D) para os vasos dos grupos Wistar sedentários controle (SC, n=8), sedentário dexametasona (SD, n=8), treinado controle (TC, n=7) e treinado dexametasona (TD, n=9). Significância: * vs controle, + vs sedentário; p<0,05.....44
- Figura 10:** Valores da densidade capilar (Painel A), razão capilar fibra (Painel B) e imagens representativas de um animal por grupo coradas com hematoxilina e eosina (Painel C) no músculo TA dos grupos Wistar sedentários controle (SC, n=8), sedentário dexametasona (SD, n=9), treinado controle (TC, n=8) e treinado dexametasona (TD, n=8). Os núcleos dos capilares estão marcados em roxo e a musculatura em rosa. Aumento de 40x. Barra de 100µm. Significância: * vs controle, + vs sedentário; p<0,05.....45

Figura 11: Valores da densidade capilar (Painel A) e imagens representativas de um animal por grupo coradas com hematoxilina e eosina (Painel C) no ventrículo esquerdo dos grupos Wistar sedentários controle (n=8), sedentário dexametasona (n=8), treinado controle (n=8) e treinado dexametasona (n=10). Os núcleos dos capilares estão marcados em roxo e a musculatura em rosa. Aumento de 40x. Barra de 100µm. Significância: * vs controle, + vs sedentário; p<0,05.....46

Figura 12: Valores das análises quantitativas da produção das proteínas VEGF (Painel A), p-AKT/AKT (Painel B), Bcl-2 (Painel C), Enos (Painel D) e Caspase (Painel E) normalizado por GAPDH no músculo TA dos grupos Wistar sedentários controle (SC), sedentário dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado dexametasona (TD). O número de ratos usados para a produção proteica foi de 5 a 10 por grupo e os resultados são expressos como % do grupo controle (SC). Significância: * vs controle, + vs sedentário; p<0,05.....47

Figura 13: Valores das análises quantitativas da produção das proteínas VEGF (Painel A), p-AKT/AKT (Painel B), Bcl-2 (Painel C), Enos (Painel D) e Caspase (Painel E) normalizado por GAPDH no músculo VE dos grupos Wistar sedentários controle (SC), sedentário dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado dexametasona (TD). O número de ratos usados para a produção proteica foi de 4 a 8 por grupo e os resultados são expressos como % do grupo controle (SC). Significância: * vs controle, + vs sedentário; p<0,05.....48

Figura 14: Expressão no músculo tibial anterior dos grupos Wistar sedentários controle (SC), sedentário dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado dexametasona (TD) do microRNA-16 (Painel A), microRNA-21 (Painel B), microRNA-126 (Painel C), microRNA-155 (Painel D), microRNA-221 (Painel E) e microRNA-222 (Painel F). Os microRNAs foram normalizados pela expressão do microRNA U6. O número de ratos usados para a expressão gênica foi de 4 a 10 por grupo e os resultados são expressos como % do grupo controle (SC). Significância: * vs controle, + vs sedentário; p<0,05.....49

Figura 15: Expressão no ventrículo esquerdo dos grupos Wistar sedentários controle (SC), sedentário dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado dexametasona (TD) do microRNA-16 (Painel A), microRNA-21 (Painel B), microRNA-126 (Painel C), microRNA-155 (Painel D), microRNA-221 (Painel E) e microRNA-222 (Painel F). Os microRNAs foram normalizados pela expressão do microRNA U6. O número de ratos usados para a expressão gênica foi de 4 a 10 por grupo e os resultados são expressos como % do grupo controle (SC). Significância: * vs controle, + vs sedentário; p<0,05.....50

Figura 16: Correlação positiva entre a expressão do microRNA-126 e a razão entre a p-AKT/AKT no músculo tibial anterior (Painel A) e o ventrículo esquerdo (Painel B) dos animais Wistar. Os resultados da produção proteica são expressos como % do grupo controle (SC). Os microRNAs foram normalizados pela expressão do microRNA U6. Significância: a = correlação positiva (Correlação de Pearson).....51

Figura 17: Delta da capacidade física máxima, comparando os valores após e antes do período de treinamento físico dos SHR sedentários (n=20) e treinados (n=20). Significância: + vs sedentário; p<0,05.....52

Figura 18: Delta da capacidade física máxima, comparando os valores após o tratamento e após o período de treinamento físico dos SHR: SC (n=10), SD (n=10), TC (n=10) e TD (n=10). Significância: p<0,05.....52

Figura 19: Delta do peso corporal durante o período de treinamento físico na esteira nos SHR sedentários (n=20) e treinados (n=20). Significância: + vs sedentário; p<0,05.....53

Figura 20: Delta do peso corporal durante o período de tratamento com dexametasona de SHR: sedentário controle (n=10), sedentário dexametasona (n=10), treinado controle (n=10) e treinado dexametasona (n=10). Significância: * vs controle; p<0,05.....54

Figura 21: Valores de pressão arterial sistólica (Painel A), diastólica (Painel B) e média (Painel C) dos SHR sedentários controle (SC, n=15), sedentário dexametasona (SD, n=14), treinado controle (TC, n=9) e treinado dexametasona (TD, n=8). Significância: + vs sedentário; p<0,05.....55

Figura 22: Valores de frequência cardíaca dos SHR sedentários controle (SC, n=8), sedentário dexametasona (SD, n=9), treinado controle (TC, n=7) e treinado dexametasona (TD, n=4). Significância: p<0,05.....56

Figura 23: Valores das ondas de Baixa frequência (Painel A), Alta frequência (Painel B), Baixa frequência/Alta frequência (Painel C) para o coração e valores das ondas de Baixa frequência (Painel D) para os vasos dos SHR sedentários controle (SC, n=11), sedentário dexametasona (SD, n=11), treinado controle (TC, n=8) e treinado dexametasona (TD, n=7). Significância: p<0,05.....58

Figura 24: Valores da densidade capilar (Painel A), razão capilar fibra (Painel B) e imagens representativas de um animal por grupo coradas com hematoxilina e eosina (Painel C) no músculo TA dos SHR sedentários controle (SC, n=13), sedentário dexametasona (SD, n=14), treinado controle (TC, n=8) e treinado dexametasona (TD, n=7). Os núcleos dos capilares estão marcados em roxo e a musculatura em rosa. Aumento de 40x. Barra de 100µm. Significância: + vs sedentário; p<0,05.....59

Figura 25: Valores da densidade capilar (Painel A) e imagens representativas de um animal por grupo coradas com hematoxilina e eosina (Painel B) no ventrículo esquerdo dos SHR sedentários controle (n=13), sedentário dexametasona (n=14), treinado controle (n=8) e treinado dexametasona (n=7). Os núcleos dos capilares estão marcados em roxo e a musculatura em rosa. Aumento de 40x. Barra de 100µm. Significância: + vs sedentário; p<0,05.....60

Figura 26: Valores das análises quantitativas da produção das proteínas VEGF (Painel A) e Caspase (Painel B) normalizado por GAPDH no músculo TA dos SHR sedentários controle (SC), sedentário dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado dexametasona (TD). O número de ratos usados para a produção proteica foi de 4 a 8 por grupo e os resultados são expressos como % do grupo controle (SC). Significância: + vs sedentário; p<0,05.....61

Figura 27: Valores das análises quantitativas da produção das proteínas VEGF (Painel A) e eNOS (Painel B) normalizado por GAPDH no músculo VE dos SHR sedentários controle (SC), sedentário dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado dexametasona (TD). O número de ratos usados para a produção proteica foi de 4 a 8 por grupo e os resultados são expressos como % do grupo controle (SC). Significância: + vs sedentário; p<0,05.....61

Figura 28: Expressão no músculo tibial anterior dos SHR sedentários controle (SC), sedentário dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado dexametasona (TD) do microRNA-16 (Painel A), microRNA-21 (Painel B), microRNA-126 (Painel C), microRNA-155 (Painel D), microRNA-221 (Painel E) e microRNA-222 (Painel F). Os microRNAs foram normalizados pela expressão do microRNA U6. O número de ratos usados para a expressão gênica foi de 4 a 10 por grupo e os resultados são expressos como % do grupo controle (SC). Significância: $p < 0,05$62

Figura 29: Expressão no ventrículo esquerdo dos SHR sedentários controle (SC), sedentário dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado dexametasona (TD) do microRNA-16 (Painel A), microRNA-21 (Painel B), microRNA-126 (Painel C), microRNA-155 (Painel D), microRNA-221 (Painel E) e microRNA-222 (Painel F). Os microRNAs foram normalizados pela expressão do microRNA U6. O número de ratos usados para a expressão gênica foi de 6 a 10 por grupo e os resultados são expressos como % do grupo controle (SC). Significância: $p < 0,05$63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de massa muscular e glândula adrenal entre os grupos Wistar SC, SD, TC e TD.....	43
Tabela 2: Valores de massa muscular e glândula adrenal entre os SHR.....	57
Tabela 3: Comparação entre os Wistar e SHR sedentários controle.....	64

ABREVIACOES

AF: Alta frequência

AKT: Treonina\serina tirosina quinase.

ANOVA: Variância de dois caminhos

Bad: Bcl-2-associated death promoter

Bak: Bcl-2 homologous antagonist/killer

Bax: Bcl-2-like protein 4

Bcl-2: B-cell lymphoma 2

Bcl-x2: Bcl-2-associated X protein

BF: Baixa frequência

BHR: Borderline hypertensive rats

C:F: Razão capilar fibra

CEUA: Comitê de tica no uso de animais

DAG: Diacilglicerol

DC: Densidade capilar

DEX: Dexametasona

DNA: cido desoxirribonucleico

eNOS: xido nítrico sintase endotelial

EPM: Erro padrão da média

FC: Frequência cardíaca

HA: hipertensão arterial

HE: Hematoxilina-eosina

HIF-1: Fator de transcrio indutível por hipóxia

Lin-4: Lineage-deficient-4

MicroRNA: Micro cido ribonucleico

NO: xido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintase

NTS: Núcleo do trato solitário

PA: Pressão arterial

PAD: Pressão arterial diastólica

PAM: Pressão arterial média

PAS: Pressão arterial sistólica

PI3K: Fosfatidilinositol 3 quinase

PIC: Coquetel inibidor de proteases

PCL: Fosfolipase C

PCR: Reação de cadeia polimerase

PTP1B: Protein tyrosine phosphatase 1B

RNA: Pequenos ácidos ribonucleicos

SC: Sedentário controle

SD: Sedentário Dexametasona

SHR: Ratos espontaneamente hipertensos

SNA: Sistema nervoso autônomo

SOL: Sólido

TA: Tibial anterior

TBT-S: Tris-buffered saline

TC: Treinado controle

TEM: Teste de esforço máximo

TD: Treinado Dexametasona

TF: Treinamento físico

USP: Universidade de São Paulo

VE: Ventrículo esquerdo

VEGF: Fator de crescimento endotelial de vasos

VEGF-R2: Receptores de VEGF

VOP: Velocidade de onda de pulso

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Hipertensão arterial, dexametasona e microcirculação	17
1.2 Treinamento físico e hipertensão arterial	22
2 OBJETIVO GERAL	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Capacidade física máxima dos animais	27
3.2 Grupos experimentais	27
3.3 Protocolo de treinamento físico	28
3.4 Tratamento farmacológico	28
3.5 Determinação da pressão arterial direta	29
3.5.1 Confeção de cânulas	29
3.5.2 Registro de PA e frequência cardíaca	29
3.5.3 Análise espectral	30
3.6 Retirada dos músculos cardíaco e esquelético	30
3.6.1 Análises morfométricas	30
3.6.2 Protocolo de dosagem de proteína	31
3.6.3 Procedimento de Western Blotting	31
3.6.4 Extração de RNA total para análise de microRNAs	33
3.6.5 Quantificação e qualificação do RNA	33
3.6.6 Expressão de microRNAs	34
3.6.7 Síntese de cDNA para microRNAs	34
3.6.8 Reação de polimerase em cadeia em tempo real (real-time PCR) para expressão de microRNAs	34
3.7 Métodos estatísticos	35
4 RESULTADOS	35
4.1 ANIMAIS WISTAR	35
4.1.1 CAPACIDADE FÍSICA MÁXIMA E PESO CORPORAL	35
4.1.2 ANÁLISES HEMODINÂMICAS	38
4.1.3 PESO MUSCULAR E PESO DA GLÂNDULA ADRENAL	40
4.1.4 ANÁLISE ESPECTRAL	41
4.1.5 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS	42

4.1.6 PRODUÇÃO PROTEICA	44
4.2 SHR	49
4.2.1 CAPACIDADE FÍSICA MÁXIMA E PESO CORPORAL	49
4.2.2 ANÁLISES HEMODINÂMICAS	52
4.2.3 PESO MUSCULAR E DA GLÂNDULA ADRENAL	54
4.2.4 ANÁLISE ESPECTRAL	55
4.2.5 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS	56
4.2.6 PRODUÇÃO PROTEICA	58
4.3 COMPARAÇÃO ENTRE ANIMAIS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS	61
5 DISCUSSÃO	63
6 CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS	72
ANEXO 1	81
	81

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão arterial, dexametasona e microcirculação

A hipertensão arterial (HA) é uma doença clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA). Esta patologia é considerada o principal fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e coronarianas e um grave problema de saúde pública, uma vez que afeta aproximadamente 35% a 40% da população europeia e 25% da população brasileira (MUNTER et al., 2002; CHEN et al., 2012, MANCIA et al., 2013). A HA pode ser dividida em dois tipos: 1/ hipertensão primária ou essencial que consiste em uma alteração multifatorial condicionada por fatores genéticos e ambientais, 2/ hipertensão secundária, que está associada a outras doenças como estenose arterial renal, apneia do sono, doenças endócrinas e/ou uso crônico de medicamentos.

Diversos são os mecanismos que podem estar envolvidos na gênese e manutenção da HA como o aumento da atividade nervosa simpática (BRUM et al., 2000), redução do óxido nítrico (NO)(XAVIER-VIDAL, 2012), enrijecimento arterial, ou seja, diminuição da complacência dos vasos que é determinada pelo aumento da velocidade da onda de pulso (VOP) (PIZZI et al., 2006; ALGHATRIF E LAKATTA, 2015; LI et al., 2016), como também o aumento da resistência periférica vascular (AMARAL et al., 2000), associado à redução da luz arteriolar (OVERTON et al., 1998), aumento da razão parede-luz das arteríolas (AMARAL et al., 2000) e/ou à rarefação de capilares (AMARAL et al., 2000; AMARAL E MICHELINI, 2011; FERNANDES et al., 2012).

A densidade de vasos é mantida por um balanço entre fatores que promovem a formação de novos vasos (angiogênicos) e fatores que promovem a morte celular (apoptóticos), sendo que o desbalanço desse mecanismo pode contribuir tanto para a formação de novos vasos (angiogênese) como para a rarefação de capilares (apoptose) (GERBER et al., 1998).

A angiogênese é um processo fisiológico de formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes e seu principal estimulador é o fator de crescimento endotelial de vasos (VEGF)

(NICOSIA et al., 1994). Existem 8 isoformas do VEGF (VEGF-121, VEGF-145, VEGF-148, VEGF-165, VEGF 165b, VEGF-183 e VEGF-206) os quais podem interagir com 3 isoformas de receptores (VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3) (FERRARA, 2009). Tem sido demonstrado que suas ações podem ser desenvolvidas por meio de dois mecanismos diferentes, conforme observado na representação esquemática da Figura 1: 1/ age como proteína chave da angiogênese fisiológica pela ativação da fosfolipase C (PLC) que estimulará a formação de diacilglicerol (DAG) e IP₃-inositol 1,4,5-trifosfato, aos quais aumentam o Ca²⁺ intracelular. O aumento de Ca²⁺ promove ativação da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), responsável pela formação de óxido nítrico (NO), gás que atua na vasodilatação, inibição da agregação plaquetária, crescimento da musculatura lisa, inibição da adesão de monócitos e leucócitos no endotélio e na angiogênese (COHEN et al., 1983; KUBIS et al., 2002); 2/ age como fator anti-apoptótico, pela ativação da via fosfatidilinositol-3-quinase /proteína quinase B (PI3K/AKT), que irá fosforilar a *Bcl-2-like protein 4* (Bax) (proteína apoptótica) desativando-a e proporcionando a sobrevivência da célula (GERBER et al., 1998; ROY et al., 2006). Ainda, a AKT também pode fosforilar a eNOS, auxiliando na produção de NO (FERRARA, 1999) (Figura 1).

Por outro lado, a apoptose é um processo que elimina células por meio de sinais internos que controlam a expressão gênica das proteínas da família Bcl-2, que possui proteínas que induzem a morte celular (apoptóticas) como a *Bcl-2 interacting-domain death agonist* (Bid), *Bcl-2 homologous antagonist/killer* (Bak), *Bcl-2-associated death promoter* (Bad) e Bax e proteínas que suprimem a morte celular (anti-apoptóticas) como a *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) e a *Bcl-2-associated X protein* (Bcl-x₂)(BORNER, 2003; JUNG et al., 2014). Em situações onde esse processo é ativado, como por exemplo durante situações de estresse, danos no ácido desoxirribonucleico (DNA), hipóxia ou mesmo na ausência de fatores angiogênicos (VEGF), a fosforilação da proteína apoptótica Bax não acontece, possibilitando a Bax competir com o sítio de ligação das proteínas anti-apoptóticas na mitocôndria (Figura 1). Este mecanismo provoca a

liberação do citocromo C da mitocôndria para o citoplasma, que se associa à proteína Apaf-1 e forma o apoptossomo (complexo proteico formado pela junção entre citocromo c e proteína Apaf-1) dando início ao processo de formação das caspases, ativando a procaspase-9 e posteriormente a caspase-3 que irá sinalizar, clivar e condensar as células para serem fagocitadas por macrófagos (GRIVICICH et al., 2007).

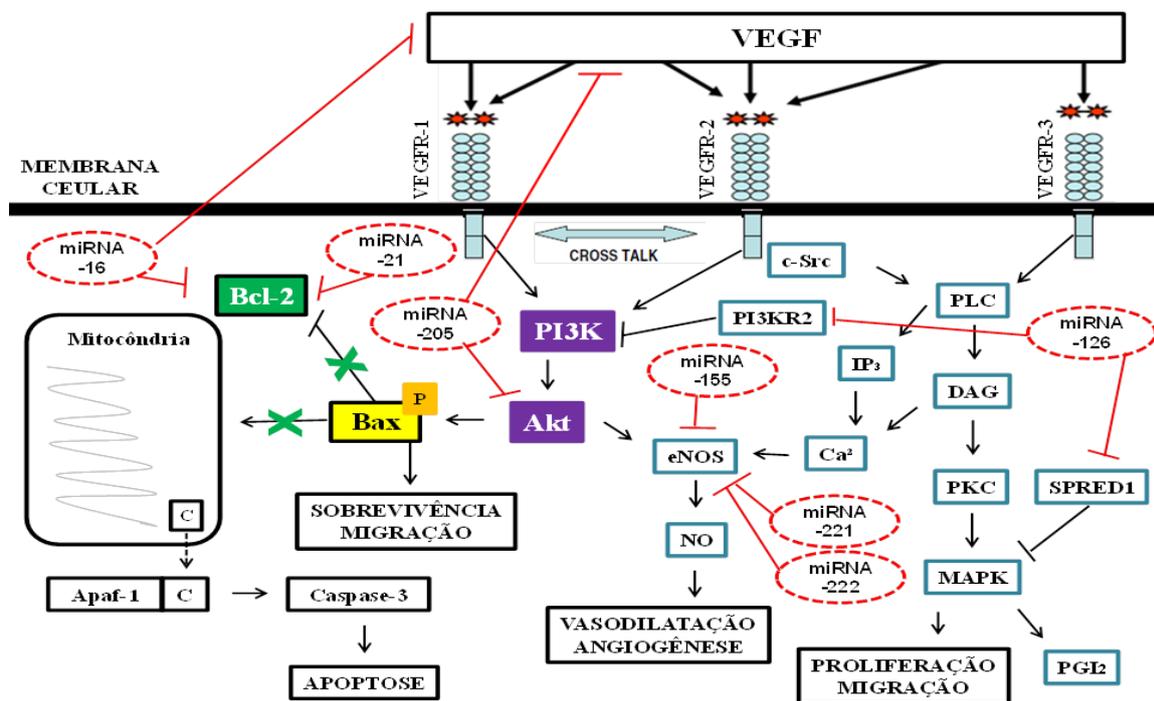


Figura 1: Demonstração esquemática das vias de ativação angiogênica, adaptado de (ROY et al., 2006) e apoptóticas, adaptado de (GRIVICICH et al., 2007; SANZ et al., 2008).

Mais recentemente, alguns autores têm sugerido que os micro ácidos ribonucleicos (microRNA) apresentam papel importante regulação da angiogênese e da apoptose nas células endoteliais (URBICH et al., 2008; QUINTAVALLE et al., 2011). Os microRNAs são caracterizados como uma nova classe de pequenos ácidos ribonucleicos (RNAs) de fita simples, com um tamanho de aproximadamente 22 nucleotídeos, codificados pelo genoma, que são capazes de regular a expressão gênica de todas as vias biológicas (GUO et al., 2010; HARTMANN E THUM, 2011).

O primeiro microRNA foi descoberto em 1993 e denominado de *lineage-deficient-4* (lin-4) (LEE et al., 1993) e, somente sete anos depois, o segundo microRNA foi descoberto (let-7) (REINHART et al., 2000) sendo associados ao desenvolvimento de larvas. A partir de então, microRNAs relacionados à regulação desenvolvimental foram descobertos em outras espécies possibilitando a hipótese de que os microRNAs pudessem regular outros processos biológicos (PASQUINELLI et al., 2000; SUAREZ E SESSA, 2009). Hoje o miRBase (banco de dados de bioinformática) possui mais de 35.000 microRNAs catalogados em mais de 220 organismos (URBICH et al., 2008). O microRNA se liga à região 3'UTR do mRNA alvo exercendo seus efeitos regulatórios de redução dos níveis protéicos de seus genes alvo, que pode ocorrer tanto pela inibição como pela degradação do mRNA. Um microRNA pode regular diferentemente cerca de 200 mRNAs (SMALL E OLSON, 2011).

Diversos microRNAs foram relacionados ao processo de angiogênese e apoptose, dentre os principais pode-se citar os microRNAs 16, 21, 126, 155, 221 e 222 (WANG et al., 2008; FISH et al., 2008; URBICH et al., 2008; SUAREZ E SESSA, 2009; CHAMORRO-JORGANES et al., 2011; SUN et al., 2012; NEVES et al., 2014; FERNANDES et al., 2012). Dentre estes, o microRNA 126 foi destacado por regular a formação de capilares e a sobrevivência celular. Como demonstrado na Figura 1, o microRNA 126 inibe as proteínas que regulam negativamente as vias MAPK e PI3K/AKT e assim, conseqüentemente, a sinalização do VEGF, caracterizando-o como angiogênico (FISH et al., 2008; WANG et al., 2008). Por outro lado, miméticos do microRNA 16 provocaram redução tanto do VEGF como da Bcl-2, enquanto antagonistas do microRNA 16 acarretaram aumento dessas proteínas, caracterizando esse microRNA como anti-angiogênico (CIMMINO et al., 2005; URBICH et al., 2008; CHAMORRO-JORGANES et al., 2011). A Bcl-2 também é considerada um alvo para o microRNA 21 (JI et al., 2007). Da mesma forma, os microRNA 155, 221 e 222 também foram descritos como anti-angiogênicos por regular negativamente a eNOS (URBICH et al., 2008; SUAREZ E SESSA, 2009; SUN et al., 2012). Por

fim, o microRNA-205 tem como alvos validados o VEGF e a AKT (YUE et al., 2012; WANG et al., 2013), como visto na Figura 1.

Vários estudos demonstram que ratos espontaneamente hipertensos (SHR) apresentam rarefação microvascular, tanto em musculatura esquelética como cardíaca (GREENE et al., 1989; AMARAL et al., 2000; LEVY et al., 2001; AMARAL E MICHELINI, 2011; FERNANDES et al., 2012) e os autores têm sugerido que esta rarefação pode estar associada tanto com a redução dos níveis de fatores angiogênicos como o VEGF e a eNOS (FERNANDES et al., 2012; KUBIS et al., 2002; WANG et al., 2004) como com a ativação da sinalização apoptótica (FERNANDES et al., 2012). Neste sentido, tem sido sugerido que os microRNAs possam estar envolvidos com essas alterações, uma vez que foram evidenciadas associações entre a redução da expressão do microRNA-126 e aumento dos microRNAs 16, 21 e 205 com a redução da eNOS, do VEGF e da Bcl-2 no músculo sóleo (SOL) de SHR (FERNANDES et al., 2012; FERNANDES, 2015).

A HA secundária, provocada pelo uso crônico de DEX (MONDO et al., 2006; HERRERA et al., 2016), também tem sido associada com a rarefação de capilares (HERRERA et al., 2016). Estudos mostram que a DEX parece provocar redução do número de vasos tanto *in vitro* como *in vivo* (VOGT E SCHMID-SCHONBEIN, 2001; NAKAO et al., 2012, MIRABELLI et al., 2014, BRAUN et al., 2015; HERRERA et al., 2016) e esse efeito deletério da droga parece estar associado tanto à redução do fator angiogênico VEGF (BAREL et al., 2010; HERRERA et al., 2016) como à redução da proteína anti-apoptótica Bcl-2 e da razão entre a Bcl-2/Bax, o que auxilia na ativação da via apoptótica (HERRERA et al., 2016). Entretanto, diferentemente dos SHR, nada se sabe sobre a contribuição dos microRNAs nas alterações evidenciadas na microcirculação induzidas pela DEX.

Sabendo-se que a DEX é um fármaco amplamente utilizado na clínica como anti-inflamatório e antialérgico, além de outras utilizações (CARDOSO et al., 2013; MARDANI E BIGDELIAN, 2013; REBEYROL et al., 2012) e que indivíduos hipertensos podem fazer o uso

desse medicamento, é plausível a ideia de que o tratamento com a DEX poderia provocar aumento mais acentuado da PA de indivíduos já hipertensos. Esta resposta poderia estar associada a um maior desbalanço autonômico para o coração e a maiores efeitos deletérios na microcirculação, o que, em conjunto, poderiam culminar em um drástico aumento do risco de morbi-mortalidade nesses pacientes. Neste sentido, é extremamente importante a determinação dos efeitos da do tratamento com a DEX sobre os mecanismos que determinam a hipertensão arterial, para que seja viável a prescrição adequada deste fármaco, priorizando a redução dos riscos para a população hipertensa.

Estudos mostram que não houve diferença significativa na PA de SHR adrenalectomizados que realizaram o tratamento com DEX (STERN et al., 1984; DELANO et al., 2005), entretanto a retirada das glândulas adrenais inviabilizou a investigação do efeito da DEX no aumento da PA nesses estudos, uma vez que a adrenalectomia provoca redução da PA nesse modelo experimental (STERN e al., 1984). Já, ratos da primeira geração de pais SHR, denominados de *borderline hypertensive rats* (BHR), expostos a DEX no período de gestação, apresentaram maior aumento da PA quando comparados a ratos normotensos que também foram expostos a DEX (BECKTOLD et al., 2008). No entanto, apesar do indício que a exposição ao tratamento com a DEX no período de gestação é capaz de aumentar ainda mais a PA de hipertensos, até o momento, nada se sabe sobre o efeito do tratamento com a DEX na PA de SHR adultos, muito menos sobre os possíveis mecanismos que possam estar envolvidos.

1.2 Treinamento físico e hipertensão arterial

O treinamento físico (TF) tem sido amplamente recomendado como tratamento não farmacológico para hipertensos, principalmente os programas de exercícios de baixa a moderada intensidades (MANCIA et al., 2013; PESCATELLO et al., 2004).

Vários mecanismos estão relacionados com a redução da PA provocada pelo TF, dentre eles pode-se citar redução da atividade nervosa simpática (CAVALCANTI et al., 2009;

MARTINEZ et al., 2011), melhora do controle autonômico para o coração (BURGI et al., 2011; HIGA-TANIGUCHI et al., 2007), redução da resistência vascular periférica (AMARAL et al., 2000; AMARAL E MICHELINI, 2011) e a prevenção da redução do número de vasos (AMARAL et al., 2001; AMARAL et al., 2008; FERNANDES et al., 2012). Em relação à microcirculação, vários autores têm demonstrado os efeitos benéficos do TF em atenuar a redução da densidade capilar (DC), resposta esta que pode contribuir significativamente para o melhor controle da PA, tanto em animais espontaneamente hipertensos (AMARAL et al., 2000, FERNANDES et al., 2012) como em humanos (HANSEN et al., 2010). Tem sido demonstrado que o efeito do TF na microcirculação ocorre rapidamente, em cerca de horas a 3 dias (GUSTAFFSON et al., 1999; AMARAL et al., 2001, AMARAL et al., 2008) e permanece ao longo do período de treinamento (AMARAL et al., 2008; LAUGHLIN E ROSEGUINI, 2008; HARBER-ABEL et al., 2012).

Durante as sessões de exercício físico, tanto a redução da pressão parcial de oxigênio como o *shear-stress* (estresse de cisalhamento), atuam como estímulos para as células endoteliais liberarem o fator de transcrição induzível por hipóxia (HIF-1 α). O HIF-1 α , por sua vez, aumenta a expressão do VEGF, proteína esta que provoca tanto a inibição da cascata de apoptose como estimula a angiogênese, contribuindo para a prevenção da rarefação de capilares (AMARAL et al., 2000; AMARAL et al., 2001; AMARAL et al., 2008; SEMENZA, 2009; FERNANDES et al., 2012; ALMEIDA et al., 2013).

Além do VEGF, outros efeitos benéficos do TF em modular fatores angiogênicos e apoptóticos parecem auxiliar na prevenção da rarefação em hipertensos. Tem sido destacado um aumento na expressão de receptores de VEGF (VEGFR-2), prevenção da redução da eNOS e da proteína anti-apoptótica Bcl-2, bem como a prevenção do aumento da proteína apoptótica Bad (FERNANDES et al., 2012).

Além disso, progressos recentes vêm sendo mostrados na utilização do microRNA como base terapêutica envolvendo tanto terapias farmacológicas como não farmacológicas (treinamento

físico) no controle da hipertensão (SHI, 2015). Os microRNAs estão relacionados tanto com as fases iniciais como com a progressão da hipertensão e, as alterações de suas expressões podem ser utilizadas tanto para o diagnóstico, prognóstico como para o tratamento desta patologia. Drogas anti-hipertensivas, como anti-microRNA e miméticos de microRNA, vem sendo testadas como novo método de tratamento para a hipertensão (SHI, 2015) e os resultados têm sido positivos. Neste sentido, foi demonstrado que SHR tratados com inibidores do microRNA-22 apresentaram diminuição da PA por meio da modulação da atividade nervosa simpática (FRIESE et al., 2013). Já com relação ao TF utilizado como tratamento não farmacológico para a hipertensão envolvendo os microRNA, tem sido demonstrado que o estresse de cisalhamento regula a expressão de microRNAs nas células endoteliais, podendo esses microRNAs estarem especificamente relacionados à angiogênese e à apoptose, auxiliando na prevenção da rarefação de capilares (NEVES et al., 2014). Tem sido evidenciado em cultura de celular que, após o estresse de cisalhamento, as células apresentam aumento da expressão do microRNA-21, que influencia negativamente a apoptose endotelial pela fosforilação da eNOS e a produção do NO (WEBER et al., 2010). Da mesma forma, ratos SHR que foram submetidos a 10 semanas de TF de natação apresentaram atenuação do aumento dos microRNAs-16,-21,-205 e diminuição do microRNA-126, que foram diretamente relacionados com a manutenção dos níveis de VEGF, eNOS e Bcl-2 e com a prevenção da rarefação de capilares (FERNANDES, 2015).

Mais especificamente sobre o efeito do TF na HA induzida pela DEX, estudo recente do nosso laboratório mostrou, pela primeira vez, que o TF é capaz de atenuar o aumento da PA induzida por DEX (HERRERA et al., 2016) e que esse efeito está associado tanto com um melhor balanço autonômico para o coração e redução da atividade nervosa simpática para os vasos, como com a prevenção da rarefação de capilares na musculatura esquelética (HERRERA et al., 2016). Esta manutenção da microcirculação após o TF foi acompanhada pela prevenção da redução do VEGF, da Bcl-2 e da razão entre a Bcl-2/Bax (HERRERA et al., 2016). Importante destacar que

o efeito observado na prevenção da redução do VEGF na musculatura esquelética parece ser dependente da dose de DEX utilizada e da forma de administração, uma vez que este resultado não foi observado em outro estudo com dose 10x maior (BAREL et al., 2010).

Contudo, apesar das evidências de efeitos benéficos no TF na microcirculação de ratos treinados e tratados com DEX, até o momento, nada se sabe sobre a contribuição dos microRNAs nesse contexto, muito menos, dos efeitos benéficos na microcirculação que o TF poderia proporcionar em indivíduos hipertensos, com o risco de vida drasticamente aumentado devido ao tratamento com DEX.

Assim, enquanto os tratamentos farmacológicos agem para aliviar os sintomas, as terapias com microRNAs podem influenciar na origem do problema e serem mais promissoras. Neste sentido, o exercício físico, a partir da modulação dos microRNAs, passa a ser uma potente estratégia não farmacológica para conter o problema desde sua origem, evitando ou atenuando os efeitos colaterais dos medicamentos.

Com isso, foi hipótese deste trabalho que o TF, realizado antes e concomitante ao tratamento com DEX em SHR, fosse capaz de modular a expressão dos microRNAs relacionados à microcirculação e contribuir de forma significativa para reduzir a PA de SHR tratados com DEX.

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi investigar se TF é capaz de modular a expressão dos microRNAs relacionados com a microcirculação e assim possa prevenir o aumento da PA em SHR tratados com DEX.

Os objetivos específicos foram:

1/ Determinar se a DEX provoca aumento acentuado da PA em SHR e se esta resposta está associada com a alterações nos microRNAs relacionados com microcirculação. Para isso

foram analisadas a DC e a razão capilar / fibra, a produção proteica do VEGF, AKT, p-AKT, eNOS, Bcl-2 e caspase-3-clivada e a expressão gênica dos microRNAs 16,21,126,155,221 e 222 no músculo tibial anterior (TA) e no ventrículo esquerdo (VE) dos animais normotensos (Wistar) e hipertensos (SHR) sedentários, tratados ou não com DEX.

2/ Determinar se o TF é capaz de diminuir o aumento acentuado da PA em SHR tratados com DEX e se esse efeito está associado com os microRNAs. Para isso foram analisadas a DC e a razão capilar / fibra, a produção proteica do VEGF, AKT, p-AKT, eNOS, Bcl-2 e caspase-3-clivada e a expressão gênica dos microRNAs 16,21,126,155,221 e 222 no músculo TA e no VE dos animais normotensos (Wistar) e hipertensos (SHR) treinados, tratados ou não com DEX.

3/ Determinar se os microRNAs possuem contribuição na diminuição do número de vasos na musculatura esquelética associado à alterações das vias angiogênicas e apoptóticas na HA induzida por DEX em ratos Wistar e se o TF é capaz prevenir essas alterações. Para tanto foram analisadas a DC e a razão capilar / fibra, a produção proteica do VEGF, AKT, p-AKT, eNOS, Bcl-2 e caspase-3-clivada e a expressão gênica dos microRNAs-16,21,126,155,221 e 222 no músculo TA e no VE dos animais normotensos (Wistar) sedentários e treinados, tratados ou não com DEX.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados ratos normotensos (Wistar) e espontaneamente hipertensos (SHR) com idade de 7-8 semanas (250-300g). Durante o protocolo experimental os animais foram mantidos em gaiolas com até cinco animais, no Biotério de Manutenção da Faculdade de Ciências da UNESP, campus de Bauru, em ciclo-claro escuro de 12:12 horas e temperatura controlada de 22°C. A ração e água filtrada foram fornecidas *ad libitum*. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências, UNESP-BAURU (Processo nº836/2016) (ANEXO 1).

3.1 Capacidade física máxima dos animais

Os animais passaram por 10 dias de adaptação à esteira (modificada para ratos, possuindo 10 raias suspensas de ferro, Inbramed, Millennium). Posteriormente, todos os animais realizaram o Teste de esforço máximo (TEM-1) que determinou a capacidade física máxima de forma indireta. Foi utilizado um protocolo adaptado que preconiza aumentos de velocidade de 3 m/min a cada 3 min de exercício na esteira até a exaustão (BAREL et al., 2010). Este teste foi repetido após 4 (TEM-2), 8 (TEM-3) semanas e após os 14 dias de tratamento com a DEX (TEM-4) para reajuste das velocidades visando a garantia da manutenção da intensidade até o final do protocolo e para avaliação da capacidade física. Os animais sedentários foram colocados a cada 15 dias na esteira para permanecerem adaptados e realizaram os testes máximos nos mesmos períodos que os treinados.

3.2 Grupos experimentais

Posteriormente ao teste de esforço máximo, os animais foram divididos em oito grupos, distribuídos de forma que não apresentassem diferença entre capacidade física máxima e peso corporal. Em seguida foram aleatoriamente divididos em: GRUPO 01 – 10 animais Wistar que permaneceram sedentários durante todo o período do experimento e receberam tratamento com salina nos últimos 14 dias; GRUPO 02 – 10 animais Wistar que permaneceram sedentários durante todo o período do experimento e receberam tratamento com dexametasona nos últimos 14 dias; GRUPO 03 – 10 animais Wistar que realizaram o treinamento físico por 70 dias, inclusive durante o tratamento, e receberam tratamento com salina nos últimos 14 dias; GRUPO 04 - 10 animais Wistar que realizaram o treinamento físico por 70 dias, inclusive durante o tratamento, e receberam tratamento com dexametasona; GRUPO 05 – 10 animais SHR que permaneceram sedentários durante todo o período do experimento e receberam tratamento com salina nos últimos 14 dias; GRUPO 06 – 10 animais SHR que permaneceram sedentários durante todo o período do experimento e receberam tratamento com dexametasona nos últimos 14 dias; GRUPO 07 – 10

animais SHR que realizaram o treinamento físico por 70 dias, inclusive durante o tratamento, e receberam tratamento com salina nos últimos 14 dias; GRUPO 08 - 10 animais SHR que realizaram o treinamento físico por 70 dias, inclusive durante o tratamento, e receberam tratamento com dexametasona nos últimos 14 dias. A Figura 2 demonstra o protocolo experimental que foi utilizado.

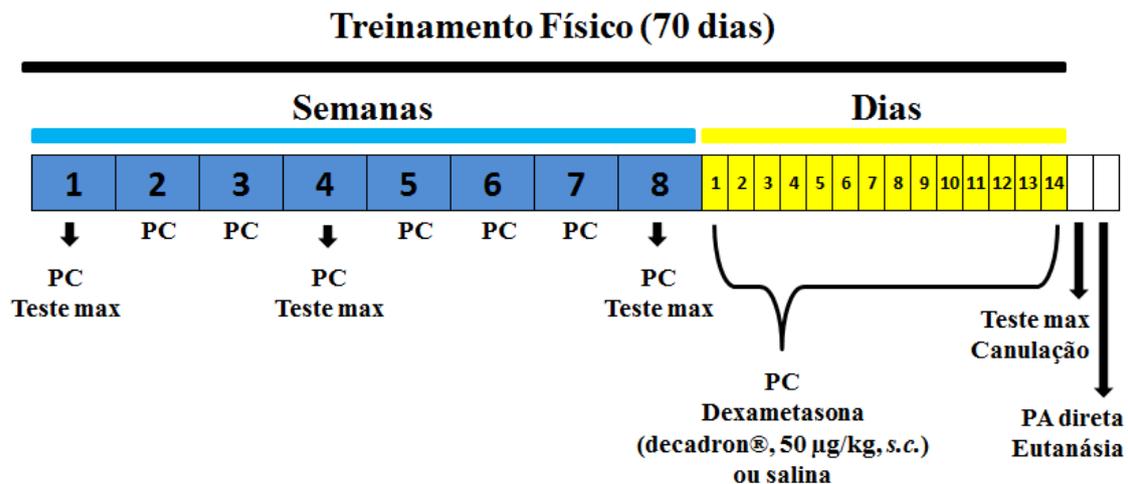


Figura 2. Linha do tempo do protocolo experimental durante 70 dias. Peso corporal (PC), teste máximo (Teste max), pressão arterial (PA).

3.3 Protocolo de treinamento físico

Os animais foram submetidos a um período de TF em esteira ergométrica durante uma hora por dia, por 8 semanas, com intensidade de 60% da velocidade máxima atingida no teste de esforço máximo, seguindo protocolo previamente publicado (SILVA et al., 1997). Durante os 14 dias de tratamento com DEX ou salina os animais treinados continuaram seu treinamento.

3.4 Tratamento farmacológico

Foi utilizado o Decadron injetável (fosfato dissódico de dexametasona - 4mg/mL, ampola de 2,5mL) do laboratório farmacêutico Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A (Guarulhos, SP, Brasil). Em cada animal foi administrada a dose de 50µg/kg por dia, de forma subcutânea, durante 14 dias. O tratamento foi realizado diariamente até às 9 horas da manhã. Os animais do grupo

controle receberam salina de forma subcutânea no mesmo volume que o calculado para DEX, durante 14 dias nos mesmos horários que os animais tratados com DEX.

3.5 Determinação da pressão arterial direta

3.5.1 Confeção de cânulas

Para a confecção das cânulas foram utilizados tubos de polietileno PE-50 (Scientific Commodities Inc. Lake Havasu, AZ, Estados Unidos), aos quais foram soldados a tubos de polietileno PE-10 (Scientific Commodities Inc Lake Havasu, AZ, Estados Unidos), como previamente publicado (AMARAL et al., 2000).

Os animais foram anestesiados com ANASEDAN[®] (cloridrato de xilasina, 7mg/Kg) e DOPALEN[®] (cloridrato de quetamina, 80mg/Kg), CEVA, Paulínia, SP, Brasil. Posteriormente, foi realizada uma incisão no pescoço do animal, localizada a artéria carótida, na qual foi introduzida a parte mais fina da cânula preenchida com solução fisiológica heparinizada. A outra parte da cânula foi exteriorizada na região dorsal do animal. Após o término do procedimento foi aplicado analgésico (Flunixinina meglumina 0,025 mg/kg, *i.m.*, Schering-Plough, Cotia, SP, Brasil) e aguardadas 24 horas para recuperação do animal (AMARAL et al., 2000).

3.5.2 Registro de PA e frequência cardíaca

Após a recuperação da cirurgia, a PA foi registrada continuamente nos ratos acordados pela conexão da cânula da artéria carótida ao sistema de registro, usando frequência de amostragem de 2000 Hz (transdutor e pré-amplificador, ADInstrument[®], Colorado Springs, CO, Estados Unidos) conectado ao computador. PA pulsátil e a FC foram registradas utilizando o software LabChartPro. 7.0. A partir dos valores de PA pulsátil, foram calculadas as pressões arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e pressão arterial média (PAM).

3.5.3 Análise espectral

A partir da PA pulsátil (15-30 minutos) foram detectados os pontos de inflexão ciclo por ciclo (PAS, batimento por batimento) utilizando o software LabChartPro v 7.0 (ADInstruments, NSW, Austrália). A variabilidade da frequência cardíaca (FC) e da pressão arterial sistólica (PAS) foi analisada no domínio da frequência a partir do software desenvolvido pelo Prof Dr. Daniel Penteadó Martins Dias (CardioSeries V2.4, <http://www.danielpenteadó.com>). A análise da variabilidade da FC foi realizada por meio da decomposição do sistograma pela Transformada Rápida de Fourier e a variabilidade da PAS realizada por meio do tacograma do registro da PAS. Posteriormente, foram determinadas as potências das bandas de baixa frequência (BF, 0,20-0,75 Hz) e de alta frequência (AF, 0,75-3,0 Hz) que correspondem, respectivamente, à atividade nervosa simpática e parassimpática e parassimpática. Além disso foi determinado o balanço simpato-vagal, pela razão BF/AF (SILVA et al., 2015).

3.6 Retirada dos músculos cardíaco e esquelético

Os animais foram eutanasiados por sobrecarga de anestésico ANASEDAN[®] (cloridrato de xilasina, 20mg/Kg), e DOPALEN[®] (cloridrato de quetamina, 160mg/Kg), CEVA, Paulínia, SP, Brasil. Após a confirmação da eutanásia, o VE e o músculo TA foram removidos, limpos, pesados e separados para análises histológica, proteica e gênica.

3.6.1 Análises morfométricas

Amostras do VE e TA foram imediatamente envolvidos por talco neutro, cobertos com *tissue tek* (Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, CA, Estados Unidos) e mergulhados em nitrogênio líquido. Após o congelamento, as amostras foram armazenadas em freezer a -80°C.

Os cortes transversais (5-10 µm) dos tecidos foram realizados com o material congelado, dentro criostato (-20°C) (Leica[®], CM 1850, Nussloch, Alemanha), os quais, posteriormente foram fixados em lâminas para a realização da técnica de coloração com Hematoxilina-Eosina (HE),

como previamente publicado (HERRERA et al., 2016; JESUS et al., 2020). Posteriormente, em microscópio de luz (Olympus Bx50, Toquio, Japão) os cortes foram analisados utilizando-se objetiva de 40x e, em seguida, foram fotografados (DP Controller, Olympus, Tóquio, Japão).

De forma off-line, a densidade capilar foi obtida pela média da contagem da quantidade de capilares identificados nas fotos e a razão capilar/fibra pela razão entre a quantidade de capilares e a quantidade de fibras identificadas, utilizando o programa Image.pro Plus 6.2 (Bethesda, MD, Estados Unidos), como previamente publicado (MOURA et al., 2011, HERRERA et al., 2016).

3.6.2 Protocolo de dosagem de proteína

O VE e o TA foram homogeneizados em uma solução de RIPA (Cell Signaling Technology, Inc Danvers, MA, Estados Unidos) contendo vários inibidores de proteases. No momento da homogeneização foram adicionados 1% de phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) e 0,1% de PIC (Coquetel inibidor de protease, Sigma Aldrich St. Louis, MO, Estados Unidos). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm (11.200 g) por 10 minutos, na temperatura de 4°C e, em seguida, o sobrenadante foi coletado e transferido para outro tubo.

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford utilizando o kit comercial Bio-Rad kit (Protein Assay Standard II, Bio-Rad Hercules, CA, Estados Unidos) com albumina como padrão, como previamente publicado (AMARAL et al., 2001). Os valores de absorvância foram analisados no leitor de microplacas (BMG Labtech, Spectro Star nano, Ortenberg, Alemanha) utilizando uma placa de 96 poços. Após a dosagem, as amostras foram estocadas em freezer a -20°C até serem utilizadas para os experimentos de Western Blotting.

3.6.3 Procedimento de Western Blotting

As proteínas foram eletroforicamente separadas por tamanho, usando um sistema de gel de poliacrilamida conforme publicação prévia do laboratório (AMARAL et al., 2001). Basicamente, foi utilizado um gel com duas camadas de poliacrilamida, em diferentes

concentrações: 5% na camada superior e de 8 a 12% na camada inferior, dependendo do peso molecular da proteína. A solução tampão de corrida constituiu de: 190 mM de glicina, 25 mM de Tris, 0,1% de SDS, pH 8,3. As amostras foram colocadas para correr por aproximadamente 60 minutos a 200 V num sistema de eletroforese (Bio-Rad, Philadelphia, PA, Estados Unidos). Marcadores de peso molecular (Bio-Rad, Philadelphia, PA, Estados Unidos) foram simultaneamente utilizados como tamanho padrão. As proteínas foram transferidas eletroforicamente para uma membrana de nitrocelulose com aplicação de corrente de 120 V por 1 hora e meia em um tampão: 190 mM de glicina, 25 mM de Tris, 20% de metanol, pH 8,3. Após a transferência, a equivalência da quantidade de proteína colocada em cada coluna foi conferida com a coloração de *Ponceau* (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) e posteriormente as membranas foram lavadas em solução *Tris-Buffered Saline and Tween 20* (TBS-T) (0,95g de Trisma –HCl; 0,50g de Trisma Base; 8,8g de NaCl e 1mL de Tween 20 para um litro de água destilada). Na etapa seguinte foi utilizado o aparelho SnapId (Millipore, Darmstadt, Hesse, Alemanha) para incubação das membranas com solução bloqueadora (3% de albumina diluída em solução TBS-T) por 2 minutos. Em seguida as membranas foram incubadas por 10 minutos com diluição apropriada do anticorpo para VEGF₁₆₅ (*human anti-mouse monoclonal*, 1:1.000, BD Pharmingen San Diego, CA, EUA), Bcl-2 (*anti-rabbit polyclonal*, 1:500, Cell Signaling Tech, Danvers, MA, EUA), Proteína quinase B (AKT) (*anti-rabbit polyclonal*, 1:1.000, Cell Signaling Tech, Danvers, MA, EUA), fosfo-AKT (p-AKT) (*anti-rabbit polyclonal*, 1:1.000, Cell Signaling Tech, Danvers, MA, EUA), eNOS (*anti-mouse monoclonal*, 1:1.000, BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA), caspase-3-clivada (*anti-rabbit polyclonal*, 1:1.000, Cell Signaling Tech, Danvers, MA, EUA) e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (*anti-rabbit polyclonal*, 1:1.000, R&D SYSTEMS, Minneapolis, MN, EUA) para normalização. Logo após, as membranas foram lavadas em 5 mL de solução TBS-T, por 3 vezes de 10 minutos e, em seguida, incubadas com o anticorpo secundário (IgG *anti-rabbit* ou *anti-mouse*, dependendo da origem de cada anticorpo primário) por 10 minutos e lavadas novamente. O anticorpo foi detectado por

luminescência química aumentada (Super signal Pico, Pierce® RockFord, IL, Estados Unidos) e as membranas foram expostas a filme de radiografia. As bandas foram analisadas utilizando um programa de computador (Scion Image, Corporation, 0.4.0.2, Rockaway, NJ, Estados Unidos) e cada grupo foi comparado com o grupo sedentário controle (SC), sendo este considerado como 100%.

3.6.4 Extração de RNA total para análise de microRNA

Todos os procedimentos para avaliação da expressão gênica foram realizados na FOB-USP¹.

Foi utilizado o RNeasy mini kit (Qiagen) para a extração do RNA seguindo protocolo informado pelo fabricante. Anteriormente, os tecidos TA e VE foram homogeneizados na solução de lise do kit com álcool absoluto. Após a homogeneização, todo o homogenato foi colocado nas colunas de purificação do kit e centrifugado em temperatura ambiente na velocidade máxima por 1 minuto. Posteriormente, o RNA foi retido nesta coluna, e lavado por dois tampões específicos antes da eluição do RNA em água livre de RNase.

3.6.5 Quantificação e qualificação do RNA

Depois de reconstituído, o RNA total das amostras foi mensurado e qualificado no espectrofotômetro Nanodrop 1000 Thermo Scientific (USA). Para isso foram utilizados 2 µL de cada amostra para obtenção das leituras nos comprimentos de onda de 260 nm (A260) e 280 nm (A280), os quais forneceram informações sobre a quantidade e qualidade do RNA. Amostras com valores entre 1,9 e 2,1 na relação A260/A280 foram transcritas.

¹ Em parceria com Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos, que é responsável pelo equipamento de PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real Viia 7 (Applied Biosystems®, Estados Unidos), adquirido em processo Multiusuário FAPESP (2009/53848-1).

3.6.6 Expressão de microRNAs

Foi realizada análise da expressão dos microRNAs 16 (MIMAT0000785), 21 (MIMAT0000790), 126 (MIMAT0000832), 155 (MIMAT0000646), 205 (MIMAT0000266), 221 (MIMAT0000891), 222 (MIMAT0000891) no músculo TA e no VE. A análise de microRNA foi de acordo com o protocolo descrito por *Taqman MicroRNA Assay* (Applied Biosystem, Foster City, CA, Estados Unidos). Foi também utilizado o kit *TaqMan MicroRNA Reverse Transcriptase da Applied Biosystem*, Foster City, CA, Estados Unidos.

3.6.7 Síntese de cDNA para microRNA

O cDNA para análise de microRNA foi sintetizado a partir do RNA total utilizando *primers* específicos para cada microRNA, de acordo com o protocolo *Taqman microRNA Assay* (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). Foram utilizados 100 ng de RNA em 1 μ L. Foi preparada uma reação de transcrição reversa (RT) contendo dNTPs (100mM), enzima MultiScribe reverse transcriptase (50U/mL), tampão 10x para a enzima RT, inibidores de RNase (20U/mL), totalizando 7 μ L. Foram adicionados 3 μ L de primer e água livre de nuclease para completar o volume de 15 μ L de reação. A reação de PCR foi realizada a 16°C por 30 min, a 42°C por 30 min, a 85°C por 5 min e posteriormente as amostras foram mantidas sob refrigeração a 4°C.

3.6.8 Reação de polimerase em cadeia em tempo real (real-time PCR) para expressão de microRNAs

Para 20 μ L da reação de PCR foram incluídos 1,33 μ L do produto RT, 10 μ L de Taqman 2X Universal PCR master mix II (No AmpErase UNG), 1 μ L de primer (TaqMan microRNA Assay 20X, Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) e 7,67 μ L de água livre de nucleases. As reações foram incubadas a 95°C por 10 min, seguidos por 40 ciclos de 95°C, por 15 s e 60°C por 1 min. Foram lidas as fluorescências pelo detector ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). Foi utilizado o U6 snRNA como normalizador para análise de cada microRNA testado.

3.7 Métodos estatísticos

Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Foi utilizada a análise de variância de dois caminhos (ANOVA), sendo um caminho o treinamento e o outro o tratamento, além do teste *T-student*, para comparação entre somente dois grupos. As amostras que apresentaram diferenças significativas foram analisadas pelo post-hoc de Tukey. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 ANIMAIS WISTAR

4.1.1 CAPACIDADE FÍSICA MÁXIMA E PESO CORPORAL

Durante o protocolo experimental, tanto os animais treinados como os sedentários, realizaram quatro testes para avaliação da capacidade física máxima, sendo eles: antes, durante e ao final do período de treinamento físico (início, 4^a semana e 8^a semana) e após o período de tratamento com DEX. Na Figura 3 pode ser observado o resultado em delta entre o teste máximo realizado ao final do período de treinamento físico (8^a semana) e antes do período de treinamento dos ratos Wistar treinados e sedentários. Os animais treinados melhoraram sua capacidade física, apresentando um delta de $+386,6 \pm 20,4$ s, que foi significativamente diferente quando comparado ao grupo sedentário, que teve sua capacidade física reduzida após dois meses, com delta de $-130,10 \pm 18,02$ s.

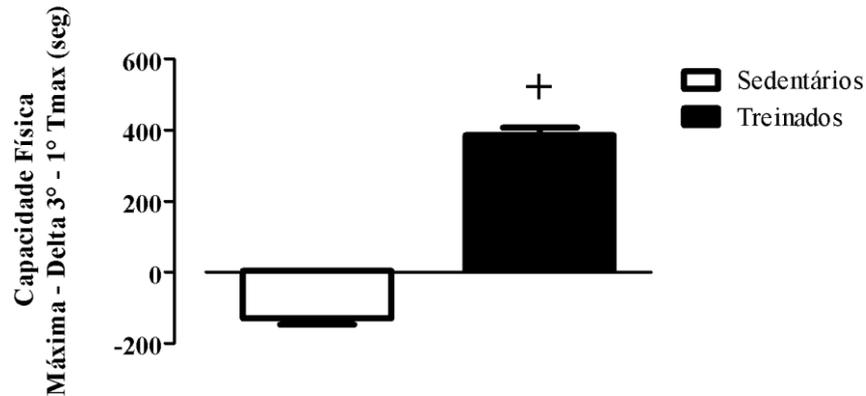


Figura 3: Delta da capacidade física máxima, comparando os valores após e antes do período de treinamento físico dos ratos Wistar sedentários (n=20) e treinados (n=20). Significância: + vs sedentário; p<0,05.

Ainda em relação à capacidade física máxima dos animais, pode ser observado na Figura 4 que não houve nenhuma diferença significativa entre os grupos no resultado do teste máximo após o período de tratamento com DEX (delta entre o final e no início do tratamento) nos animais Wistar.

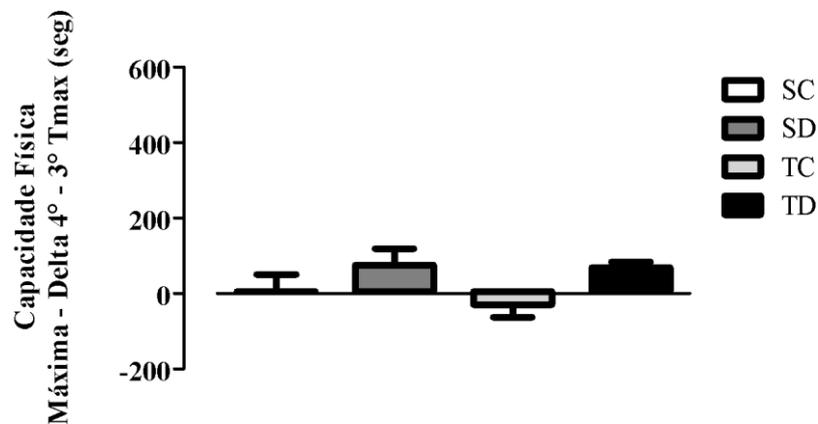


Figura 4: Delta da capacidade física máxima, comparando os valores após o tratamento e após o período de treinamento físico dos ratos Wistar sedentário controle, SC (n=10), sedentário dexametasona, SD (n=10), treinado controle, TC (n=10) e treinado dexametasona, TD (n=10). Significância: p<0,05.

A Figura 5 mostra o delta do peso corporal antes e ao final das oito semanas de treinamento físico, tanto dos animais sedentários (n=20) como dos animais treinados (n=20). Pode-se observar que ambos os grupos (sedentários e treinados) apresentaram aumento do seu peso

corporal durante esse período ($+226,1 \pm 7,8$ gramas e $+211,6 \pm 8,4$ gramas, para sedentários e treinados, respectivamente).

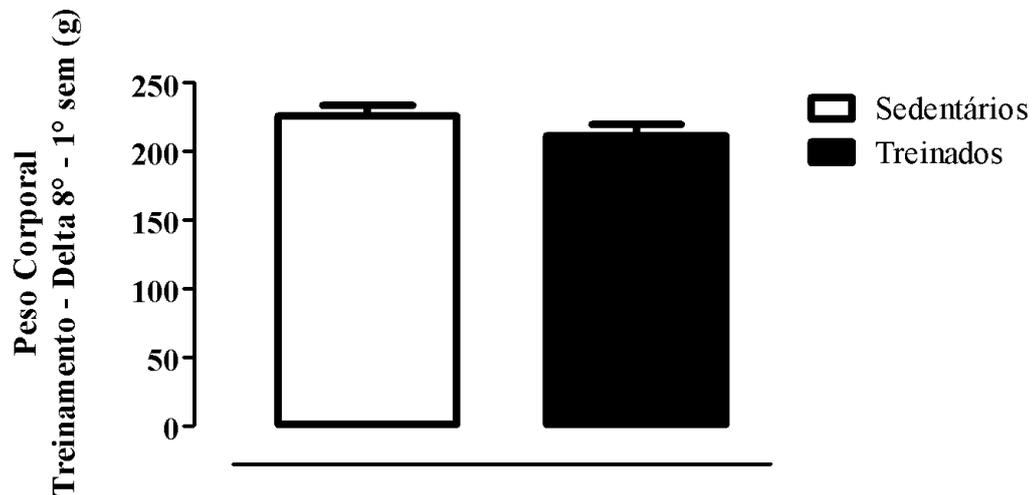


Figura 5: Delta do peso corporal durante o período de treinamento físico na esteira nos animais Wistar sedentários (n=20) e treinados (n=20). Significância: $p < 0,05$.

Já, na Figura 6, pode-se observar o efeito do tratamento com a DEX no peso corporal dos animais Wistar, demonstrado pelo delta entre o final e o início do período de tratamento. Os animais tratados com DEX, independente do treinamento físico, apresentaram redução significativa do peso corporal ao final do tratamento (SD $-52,6 \pm 3,4$ gramas e TD $-54,3 \pm 4,0$ gramas).

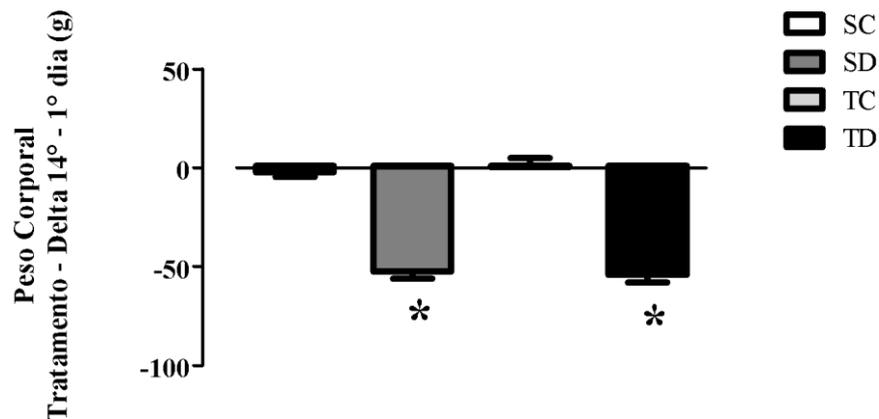


Figura 6: Delta do peso corporal durante o período de tratamento com dexametasona nos grupos de ratos Wistar: sedentário controle (n=10), sedentário dexametasona (n=10), treinado controle (n=10) e treinado dexametasona (n=10). Significância: * vs controle; $p < 0,05$.

4.1.2 ANÁLISES HEMODINÂMICAS

Os resultados de PA direta podem ser observados na Figura 7 para PAS (Painel A), PAD (Painel B) e PAM (Painel C), respectivamente. Pode-se observar que o tratamento crônico com DEX aumentou significativamente a PAS no grupo SD ($129,8 \pm 4,9$ mmHg vs $106,2 \pm 6,0$ mmHg, SD vs SC), a PAD ($119,2 \pm 3,9$ mmHg vs $91,3 \pm 3,3$ mmHg, para SD vs SC), como também a PAM no grupo SD ($122,7 \pm 4,2$ mmHg vs $96,3 \pm 3,8$ mmHg, SD vs SC).

Por outro lado, o treinamento físico foi eficaz em atenuar o aumento da PAS, como observado no grupo TD, quando comparado aos animais SD ($129,8 \pm 4,9$ mmHg vs $121,8 \pm 3,9$ mmHg, para SD vs TD, respectivamente) e prevenir o aumento da PAD ($119,2 \pm 3,9$ mmHg vs $106,4 \pm 5,1$ mmHg, para SD vs TD, respectivamente) e da PAM ($122,7 \pm 4,2$ mmHg vs $110,2 \pm 3,8$ mmHg, para SD vs TD, respectivamente).

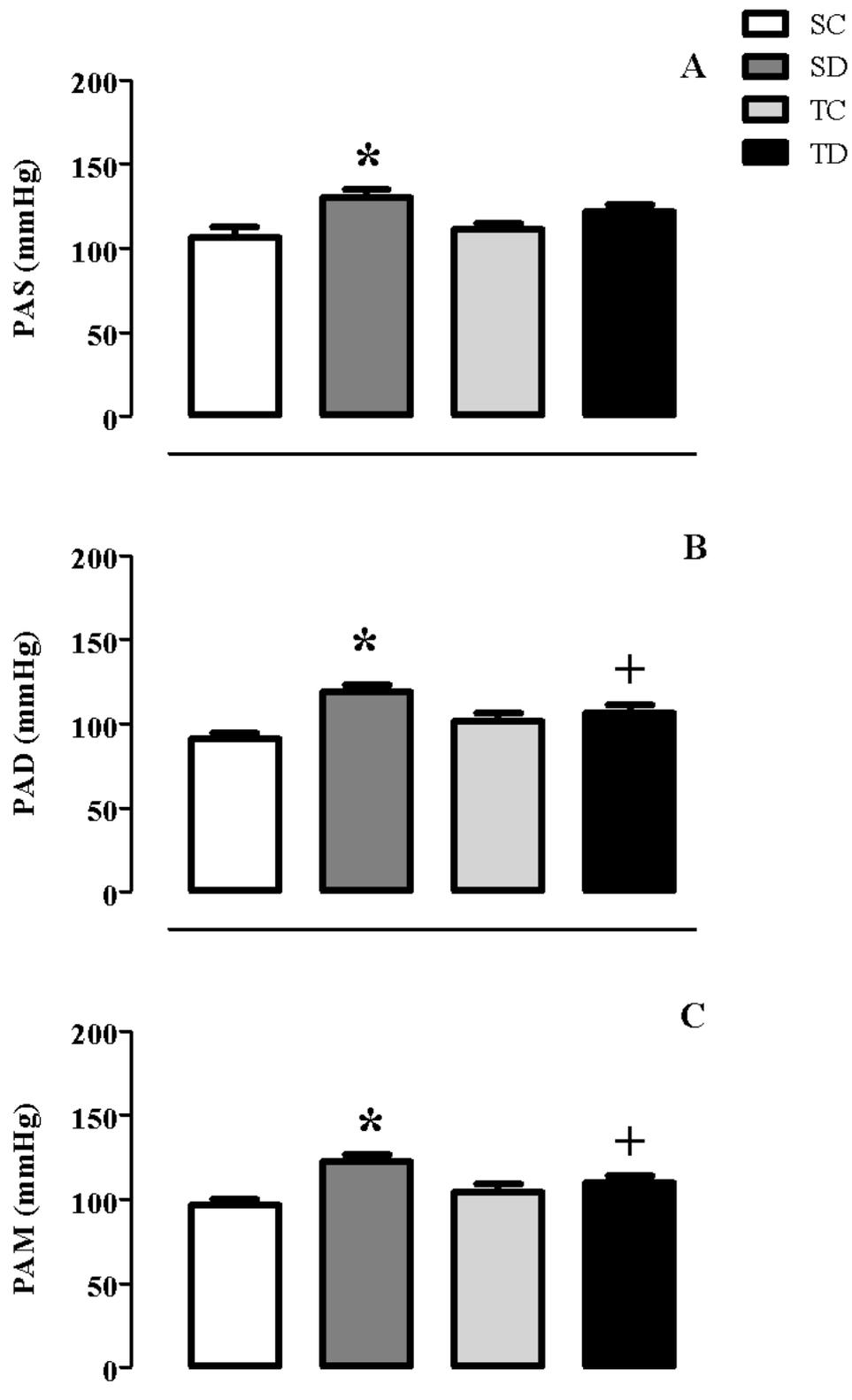


Figura 7: Valores de pressão arterial sistólica (Painel A), diastólica (Painel B) e média (Painel C) dos grupos Wistar sedentários controle (SC, n=8), sedentário dexametasona (SD, n=9), treinado controle (TC, n=7) e treinado dexametasona (TD, n=9). Significância: * vs controle, + vs sedentário; $p < 0,05$.

A Figura 8 mostra que a DEX não alterou os resultados da frequência cardíaca dos animais Wistar, mas dentre os tratados com DEX, o grupo treinamento apresentou menor FC ao final do protocolo experimental (treinamento e tratamento) comparado ao grupo SD (SD, $427,4 \pm 26,8$ bpm e TD, $371,2 \pm 8,2$ bpm).

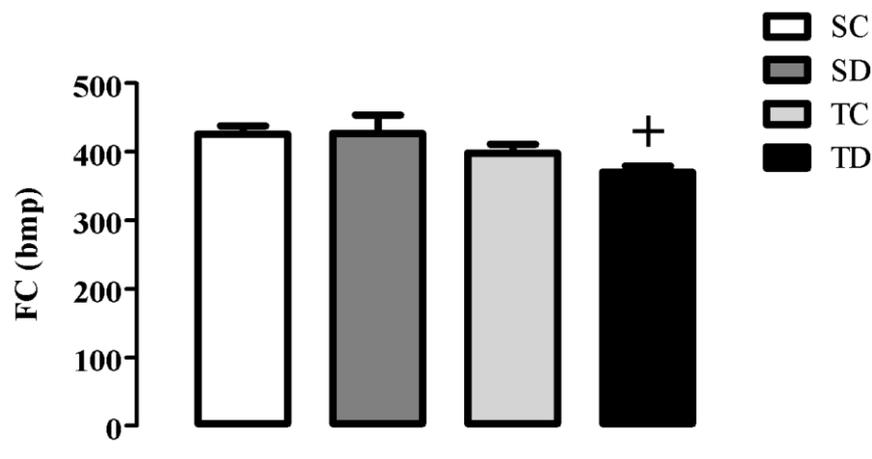


Figura 8: Valores de frequência cardíaca dos grupos de ratos Wistar sedentários controle (SC, n=5), sedentário dexametasona (SD, n=5), treinado controle (TC, n=5) e treinado dexametasona (TD, n=7). Significância: + vs sedentário; $p < 0,05$.

4.1.3 PESO MUSCULAR E PESO DA GLÂNDULA ADRENAL

Após realizar a eutanásia dos animais, os músculos TA, o coração, o VE e a glândula adrenal foram removidos, limpos e pesados. Na Tabela 1 pode-se observar que o tratamento com a DEX não determinou alterações no peso muscular do TA, no coração ou VE. Entretanto, o tratamento com DEX provocou redução significativa do peso da glândula adrenal, tanto do grupo sedentário como no grupo treinado e tratado com DEX (Tabela 1).

Tabela 1: Valores de massa muscular e glândula adrenal entre os grupos SC, SD, TC e TD.

	SC	SD	TC	TD
Tíbia (cm)	4,1 ± 0,01	4,1 ± 0,01	4,1 ± 0,02	4,1 ± 0,01
TA/Tíbia (mg/cm)	185,6 ± 4,7	167,0 ± 3,7	184,5 ± 7,1	184,5 ± 2,7
Coração/Tíbia (mg/cm)	309,5 ± 10,7	304,3 ± 14,5	292,8 ± 5,0	300,7 ± 6,4
VE/Tíbia (mg/cm)	219,1 ± 12,2	200,3 ± 8,0	196,7 ± 4,3	209,4 ± 4,3
Adrenal/Tíbia (mg/cm)	10,9 ± 0,72	6,2 ± 0,27*	9,9 ± 0,58	6,23 ± 0,54*

Músculo tibial anterior (TA), Ventrículo Esquerdo (VE) e Glândula Adrenal, normalizados pelo comprimento da tíbia. Significância: * vs controle; $p < 0,05$.

4.1.4 ANÁLISE ESPECTRAL

Para investigar os possíveis mecanismos que poderiam estar contribuindo para o aumento de PA determinado pelo tratamento crônico com DEX, foi realizada a análise do balanço autonômico para o coração e da atividade simpática para os vasos, pela técnica de análise espectral ao final do protocolo experimental (treinamento e tratamento).

Na Figura 9 pode-se observar que o tratamento com a DEX provocou aumento nas ondas de baixa frequência (BF) ($45,1 \pm 5,9$ nu vs $18,7 \pm 4,8$ nu, SD vs SC) (Painel A) e na razão entre as ondas de BF/AF no grupo SD ($1,8 \pm 0,5$ vs $0,3 \pm 0,1$, SD vs SC) (Painel C), bem como, promoveu uma redução das ondas de AF no grupo SD ($54,8 \pm 5,9$ nu vs $81,2 \pm 4,8$ nu, SD vs SC) (Painel C).

O treinamento físico, por sua vez, foi capaz de atenuar todas as alterações provocadas pelo tratamento crônico com DEX (Figura 9, Painéis A, B e C). No painel D da Figura 9 pode-se observar que os resultados de ondas de BF (mmHg²), que representa a modulação simpática para os vasos, não foram diferentes entre os grupos.

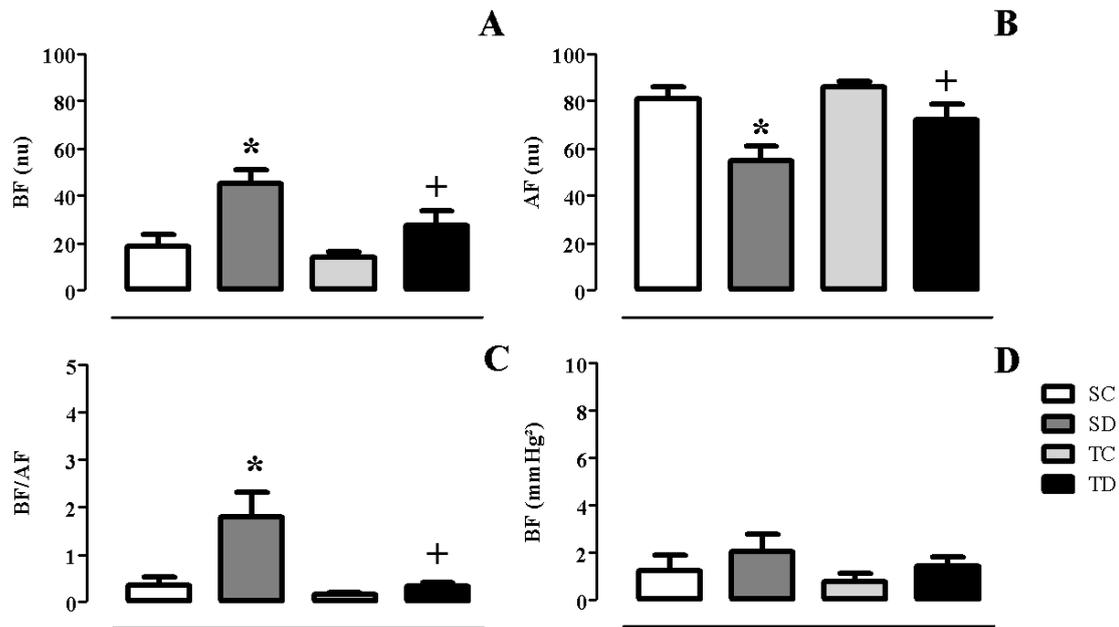


Figura 9: Valores das ondas de Baixa frequência (Painel A), Alta frequência (Painel B), Baixa frequência/Alta frequência (Painel C) para o coração e valores das ondas de Baixa frequência (Painel D) para os vasos dos grupos Wistar sedentários controle (SC, n=8), sedentário dexametasona (SD, n=8), treinado controle (TC, n=7) e treinado dexametasona (TD, n=9). Significância: * vs controle, + vs sedentário; $p < 0,05$.

4.1.5 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS

Os cortes transversais do músculo tibial anterior foram corados com HE e submetidos à microscopia de luz para análise da densidade capilar e razão capilar/fibra.

A Figura 10 mostra os resultados densitométricos resultantes das análises morfométricas do músculo tibial. Pode-se observar no Painel A que houve redução da densidade capilar no grupo SD ($152,7 \pm 8,8$ vs $192,6 \pm 16,3$ n/mm^2 , para SD vs SC, respectivamente), redução essa que foi prevenida pelo treinamento físico no grupo TD ($222,0 \pm 10,3$ vs $152,7 \pm 8,8$ n/mm^2 , para TD vs SD, respectivamente). Da mesma forma, houve redução da razão capilar fibra (Painel B), ($0,7 \pm 0,02$ vs $0,9 \pm 0,01$, para SD vs SC respectivamente) que também foi prevenida pelo treinamento físico no grupo TD ($1,0 \pm 0,02$ vs $0,7 \pm 0,02$, para TD vs SD, respectivamente). Além disso, pode-se observar que o treinamento físico foi capaz de aumentar significativamente tanto a densidade capilar ($238,8 \pm 13,3$ vs $192,6 \pm 16,3$ n/mm^2 , para TC vs SC, respectivamente) como a razão capilar/fibra ($1,0 \pm 0,04$ vs $0,9 \pm 0,01$, para TC vs SC, respectivamente).

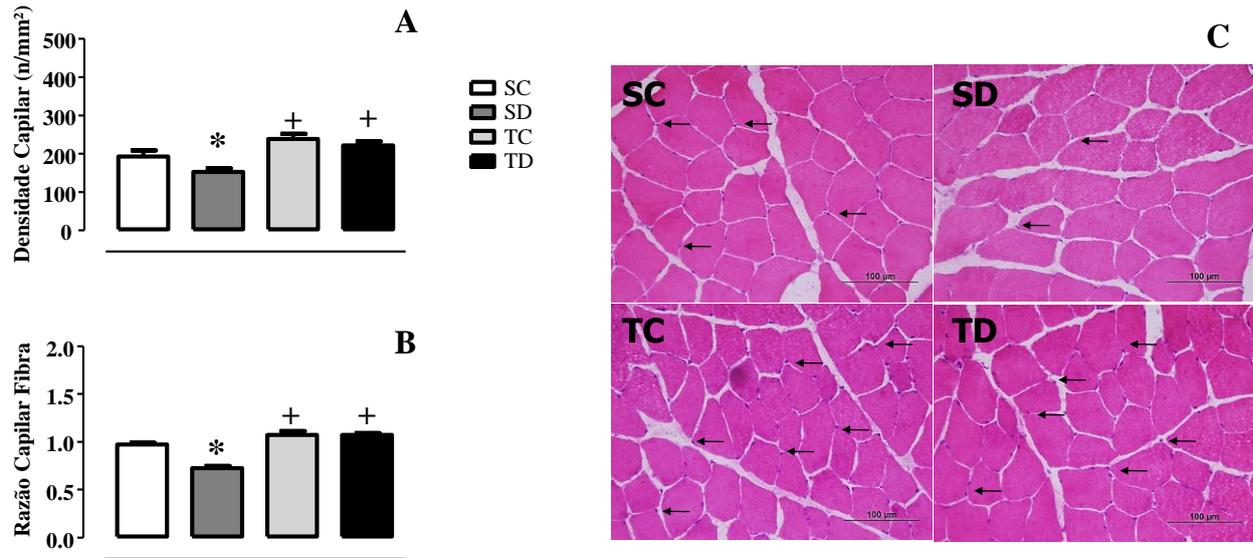


Figura 10: Valores da densidade capilar (Painel A), razão capilar fibra (Painel B) e imagens representativas de um animal por grupo coradas com hematoxilina e eosina (Painel C) no músculo TA dos grupos Wistar sedentários controle (SC, n=8), sedentário dexametasona (SD, n=9), treinado controle (TC, n=8) e treinado dexametasona (TD, n=8). O núcleos dos capilares estão marcados em roxo e a musculatura em rosa. As setas pretas indicam os capilares ao redor das fibras musculares. Aumento de 40x. Barra de 100μm. Significância: * vs controle, + vs sedentário; $p < 0,05$.

A Figura 11 mostra os resultados densitométricos resultantes das análises morfométricas do ventrículo esquerdo. Pode-se observar no Painel A que a DEX não determinou qualquer alteração significativa, no entanto, houve aumento da densidade capilar, tanto no grupo TC ($1032,2 \pm 27,4$ vs $883,5 \pm 19,3$ n/mm², para TC vs SC, respectivamente) quanto no grupo TD ($1030,5 \pm 29,2$ vs $853,4 \pm 7,4$ n/mm², para TD vs SD, respectivamente).

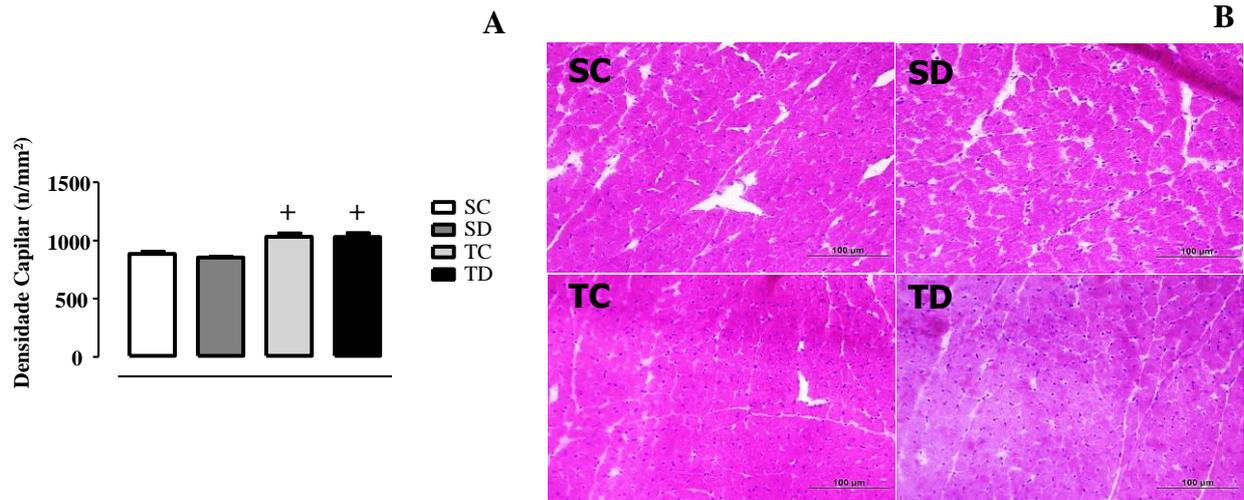


Figura 11: Valores da densidade capilar (Painel A) e imagens representativas de um animal por grupo coradas com hematoxilina e eosina (Painel C) no ventrículo esquerdo dos grupos Wistar sedentários controle (n=8), sedentário dexametasona (n=8), treinado controle (n=8) e treinado dexametasona (n=10). O núcleos dos capilares estão marcados em roxo e a musculatura em rosa. Aumento de 40X. Barra de 100µm. Significância: * vs controle, + vs sedentário; $p < 0,05$.

4.1.6 PRODUÇÃO PROTEICA

A figura 12 mostra os resultados de produção proteica do VEGF, p-AKT, AKT, Bcl-2, eNOS e Caspase-3-clivada. O tratamento com DEX provocou redução do VEGF (Painel A, -43,0%, para SD vs SC, respectivamente), da razão p-AKT/AKT (Painel B, -39,6%, para SD vs SC), da Bcl-2 (Painel C, -23,0%, para SD vs SC, respectivamente) e aumento da caspase-3-clivada (Painel E, +34,0%, for SD vs SC, respectivamente) no músculo tibial anterior. Por outro lado, o treinamento físico foi capaz de prevenir a redução do VEGF (+61,4%, para TD vs SD, respectivamente), da razão p-AKT/AKT (+37,7%, para TD vs SD, respectivamente) e da Bcl-2 (+7,7%, para TD vs SD, respectivamente) e o aumento da caspase-3-clivada (-23,1%, para TD vs SD, respectivamente). Nem o tratamento com a dexametasona nem o treinamento físico alteraram significativamente a produção proteica da eNOS (Painel D).

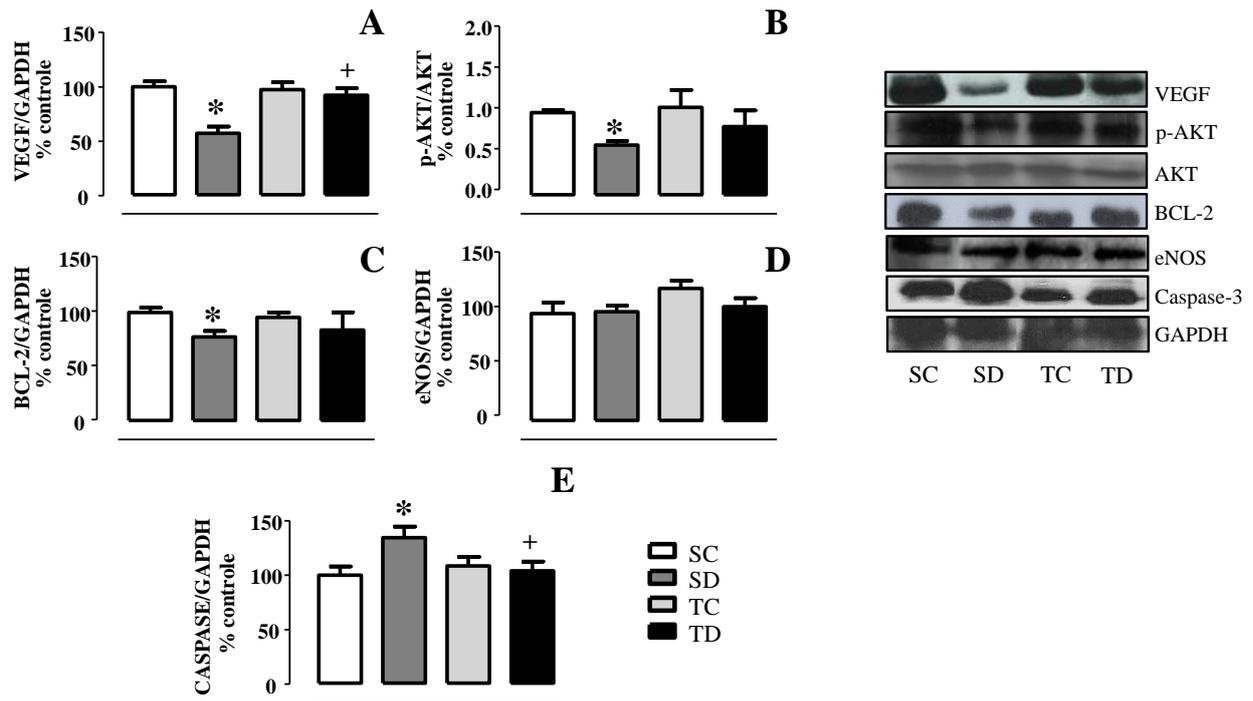


Figura 12: Valores das análises quantitativas da produção das proteínas VEGF (Painel A), p-AKT/AKT (Painel B), Bcl-2 (Painel C), Enos (Painel D) e Caspase (Painel E) normalizado por GAPDH no músculo TA dos grupos Wistar sedentários controle (SC), sedentário dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado dexametasona (TD). O número de ratos usados para a produção proteica foi de 5 a 10 por grupo e os resultados são expressos como % do grupo controle (SC). Significância: * vs controle, + vs sedentário; $p < 0,05$.

Os resultados de produção proteica do VEGF, p-AKT, AKT, Bcl-2, eNOS e Caspase-3-clivada no ventrículo esquerdo estão demonstrados na Figura 13. O treinamento físico foi capaz aumentar a produção proteica da razão p-AKT/AKT (+52,0%, para TC vs SC, respectivamente e +73,1%, para TD vs SD, respectivamente) e da eNOS (+36,5%, para TC vs SC e +50,6%, para TD vs SD, respectivamente).

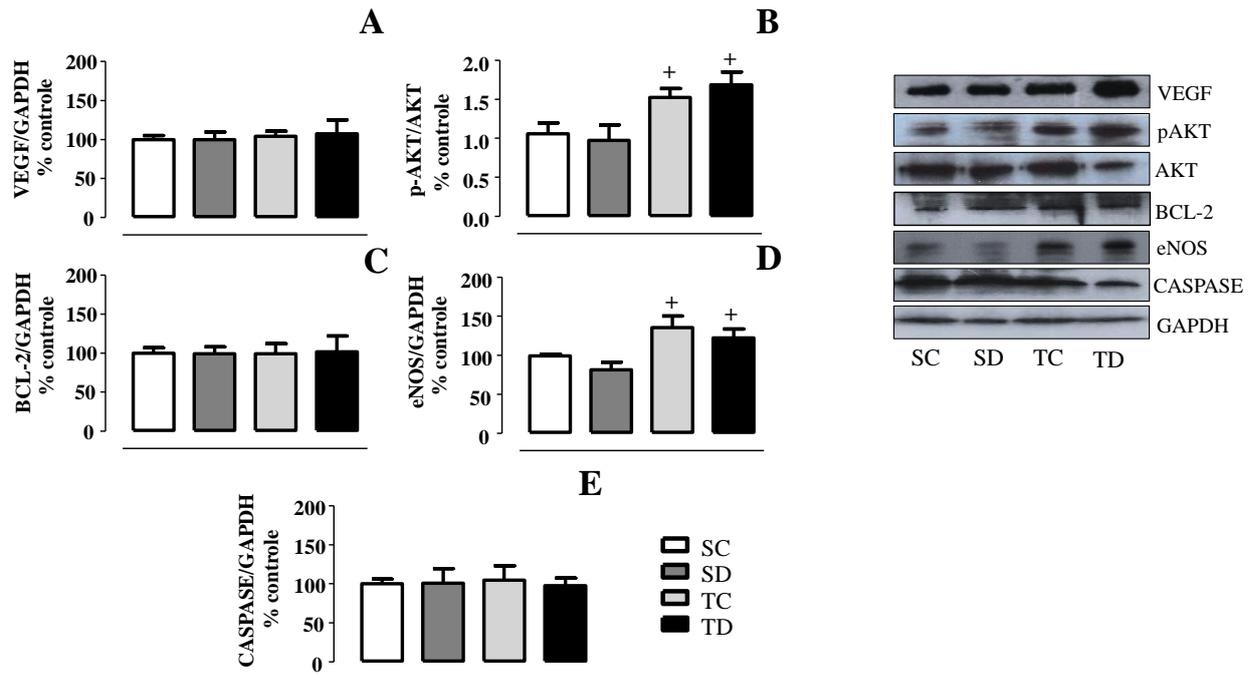


Figura 13: Valores das análises quantitativas da produção das proteínas VEGF (Painel A), p-AKT/AKT (Painel B), Bcl-2 (Painel C), eNOS (Painel D) e Caspase (Painel E) normalizado por GAPDH no músculo VE dos grupos Wistar sedentários controle (SC), sedentário dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado dexametasona (TD). O número de ratos usados para a produção proteica foi de 4 a 8 por grupo e os resultados são expressos como % do grupo controle (SC). Significância: * vs controle, + vs sedentário; $p < 0,05$.

4.1.7 microRNA

A análise da expressão dos microRNAs 16, 21, 155, 126, 221 e 222 foi realizada no músculo tibial anterior e no ventrículo esquerdo por meio do PCR real-time. Todos os resultados foram normalizados pelo controle (100 unidades arbitrárias). A figura 14 mostra que o tratamento com a DEX não alterou significativamente a expressão dos microRNAs. Por outro lado, o treinamento físico foi capaz de aumentar a expressão do microRNA 126, tanto no grupo TC (Painel C, +13,1%, para TC vs SC, respectivamente) como no grupo TD (Painel C +15,9%, para TD vs SD, respectivamente) no músculo TA.

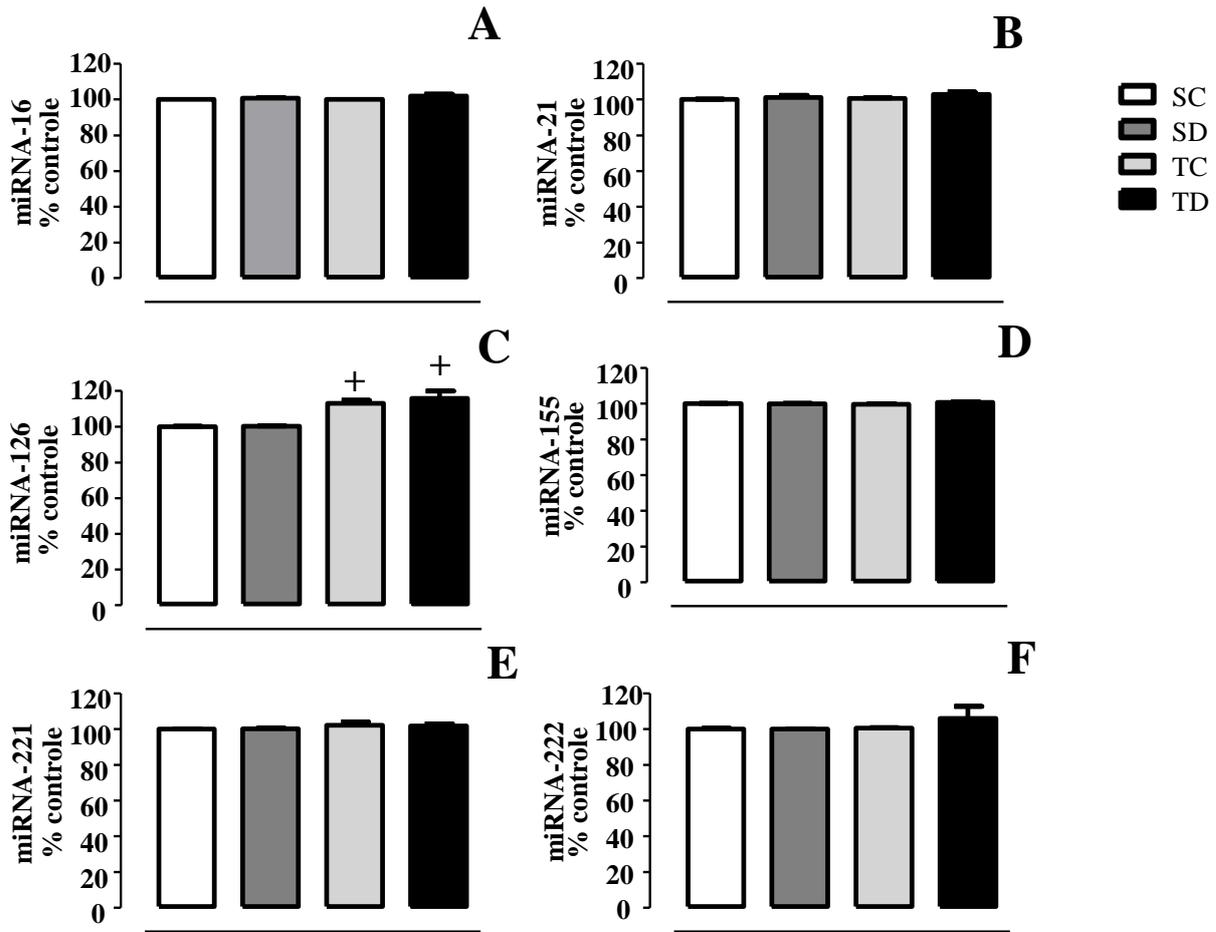


Figura 14: Expressão no músculo tibial anterior dos grupos Wistar sedentários controle (SC), sedentário dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado dexametasona (TD) do microRNA-16 (Painel A), microRNA-21 (Painel B), microRNA-126 (Painel C), microRNA-155 (Painel D), microRNA-221 (Painel E) e microRNA-222 (Painel F). Os microRNAs foram normalizados pela expressão do microRNA U6. O número de ratos usados para a expressão gênica foi de 4 a 10 por grupo e os resultados são expressos como % do grupo controle (SC). Significância: * vs controle, + vs sedentário; $p < 0,05$.

A Figura 15 mostra que o treinamento físico foi capaz de aumentar a expressão do microRNA 16 no ventrículo esquerdo, tanto no grupo TC (Painel A, +1,9%, para TC vs SD, respectivamente) como no grupo TD (Painel A, +2,7%, para TD vs SD, respectivamente) bem como do microRNA 126, tanto no grupo TC (Painel C, +1,4%, para TC vs SD, respectivamente) como no grupo TD (Painel C, +1,4%, para TD vs SD, respectivamente) (Painel A).

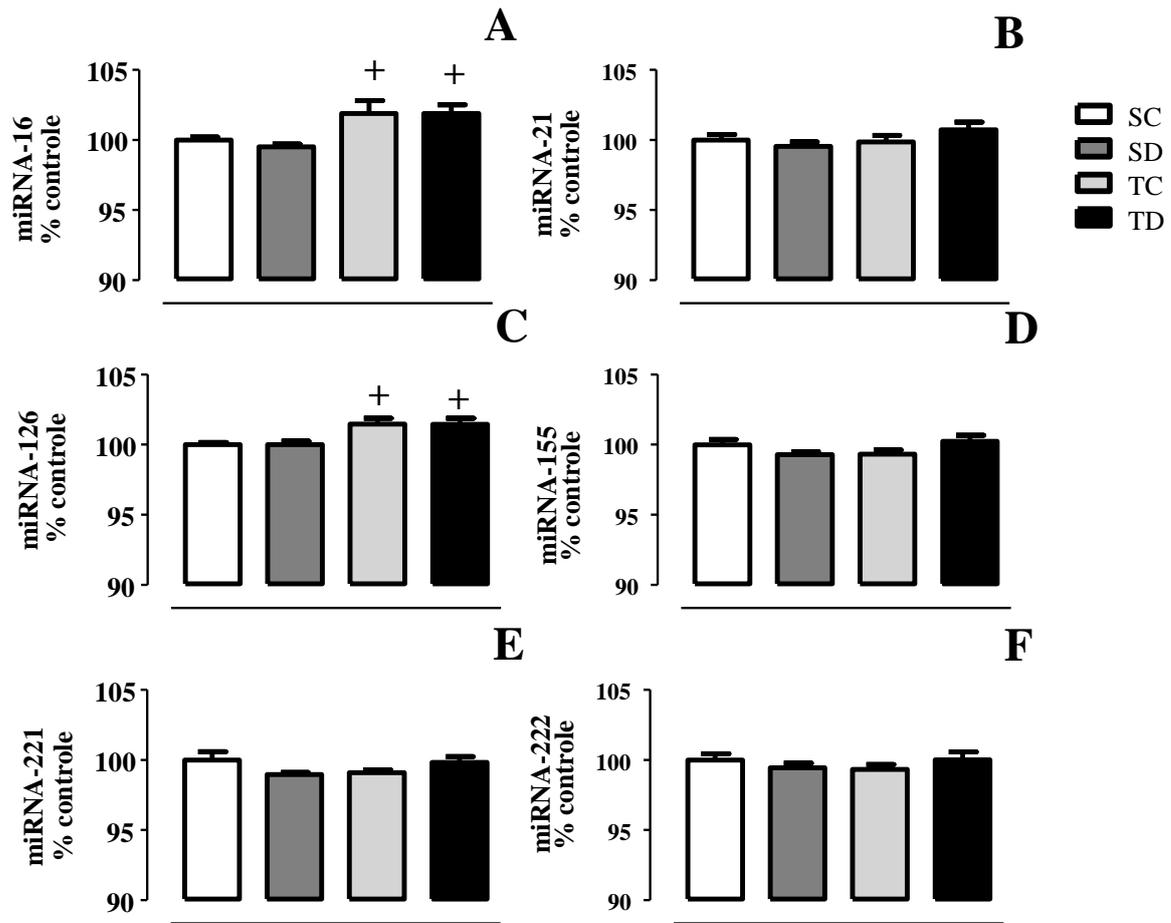


Figura 15: Expressão no ventrículo esquerdo dos grupos Wistar sedentários controle (SC), sedentário dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado dexametasona (TD) do microRNA-16 (Painel A), microRNA-21 (Painel B), microRNA-126 (Painel C), microRNA-155 (Painel D), microRNA-221 (Painel E) e microRNA-222 (Painel F). Os microRNAs foram normalizados pela expressão do microRNA U6. O número de ratos usados para a expressão gênica foi de 4 a 10 por grupo e os resultados são expressos como % do grupo controle (SC). Significância: * vs controle, + vs sedentário; $p < 0,05$.

Além disso, a Figura 16 ilustra que foram encontradas correlações positivas entre a expressão do microRNA-126 e a razão entre a p-AKT/AKT, tanto no tibial anterior ($r = +0,725$) como no ventrículo esquerdo ($r = +0,590$).

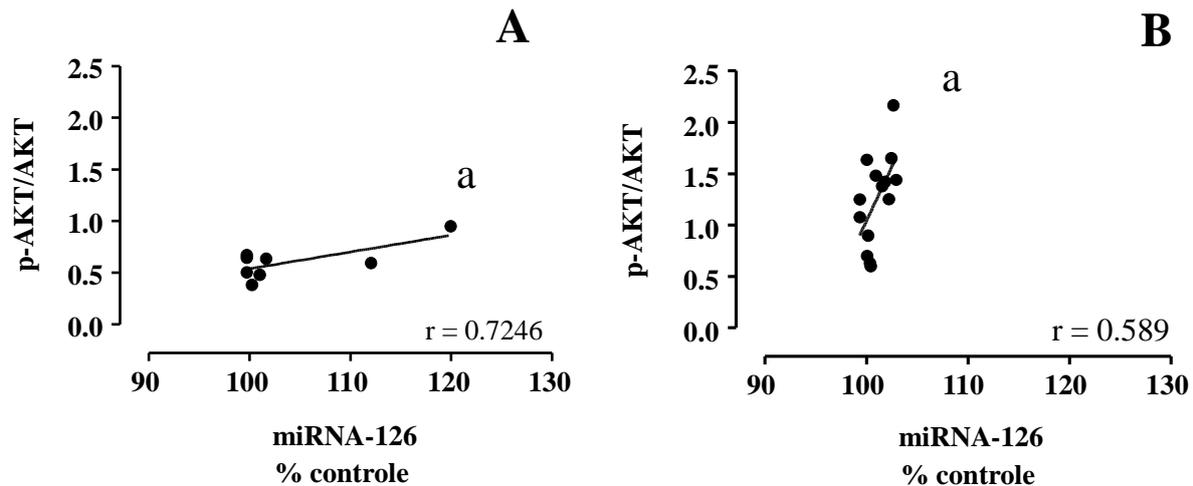


Figura 16: Correlação positiva entre a expressão do microRNA-126 e a razão entre a p-AKT/AKT no músculo tibial anterior (Painel A) e o ventrículo esquerdo (Painel B) dos animais Wistar. Os resultados da produção proteica são expressos como % do grupo controle (SC). Os microRNAs foram normalizados pela expressão do microRNA U6. Significância: a = correlação positiva (Correlação de Pearson).

4.2 SHR

4.2.1 CAPACIDADE FÍSICA MÁXIMA E PESO CORPORAL

Da mesma forma que os animais Wistar (normotensos), tanto os SHR treinados como os SHR sedentários realizaram quatro testes para a avaliação da capacidade física máxima durante o protocolo experimental, sendo eles realizados: antes, durante e ao final do período de treinamento físico (4^a semana e 8^a semana) e após o período de tratamento com DEX.

Na Figura 17 pode ser observado o resultado em delta entre o teste máximo realizado ao final do período de treinamento físico (8^a semana) e antes do período de treinamento físico dos SHR treinados e sedentários. Pode-se observar que o grupo treinado melhorou sua capacidade física máxima nesse período, apresentando um delta de $+379,0 \pm 38,3$ s, enquanto que os animais sedentários apresentaram um delta de $-103,1 \pm 45,2$ s.

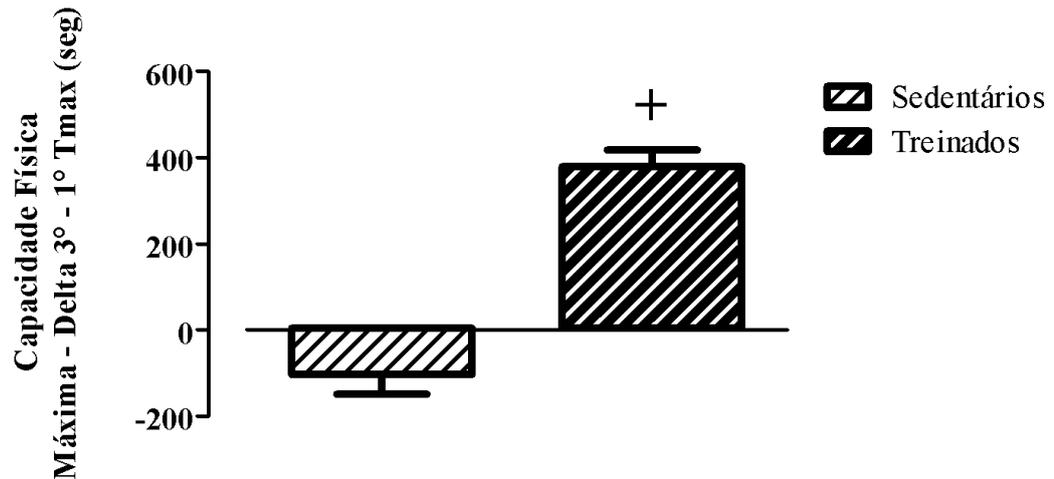


Figura 17: Delta da capacidade física máxima, comparando os valores após e antes do período de treinamento físico dos SHR sedentários (n=20) e treinados (n=20). Significância: + vs sedentário; $p < 0,05$.

A Figura 18 mostra que não foi observada nenhuma diferença significativa capacidade física máxima dos SHR durante o período de tratamento com DEX.

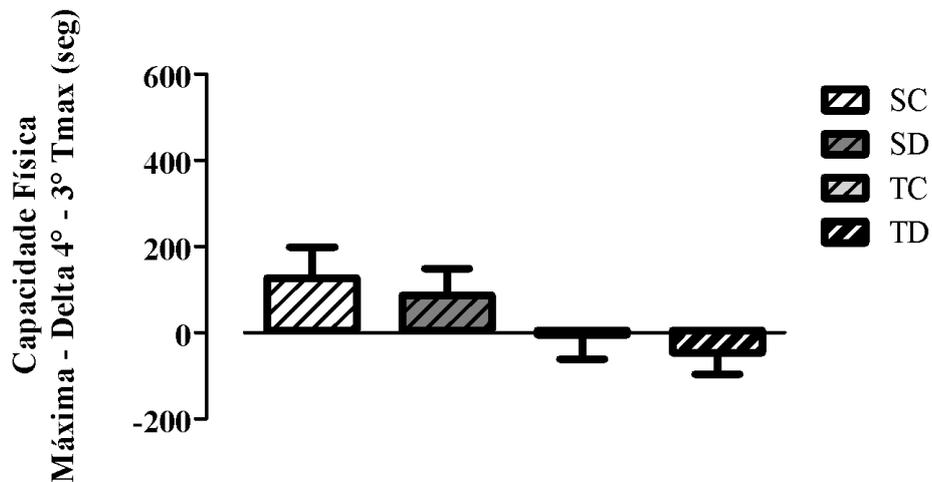


Figura 18: Delta da capacidade física máxima, comparando os valores após o tratamento e após o período de treinamento físico dos SHR: SC (n=10), SD (n=10), TC (n=10) e TD (n=10). Significância: $p < 0,05$.

Em relação ao peso corporal dos SHR, a Figura 19 mostra o delta do peso corporal antes e ao final das oito semanas de treinamento físico, tanto dos SHR sedentários como dos animais treinados. Pode-se observar que ambos os grupos (sedentários e treinados) apresentaram um aumento do seu peso corporal durante esse período ($+80,4 \pm 2,7$ gramas e $+65,0 \pm 2,1$ gramas, para

sedentários e treinados, respectivamente), sendo que esse aumento foi significativamente menor no grupo treinado quando comparado ao grupo sedentário.

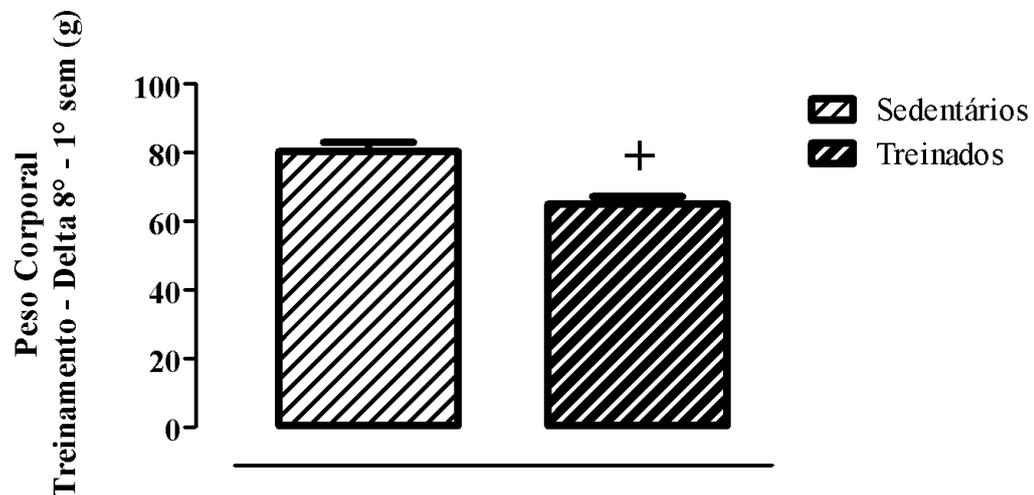


Figura 19: Delta do peso corporal durante o período de treinamento físico na esteira nos SHR sedentários (n=20) e treinados (n=20). Significância: + vs sedentário; $p < 0,05$.

A Figura 20 mostra o delta do peso corporal dos SHR durante o período de tratamento. Pode-se observar que os animais tratados com DEX, independente do treinamento físico, apresentaram redução significativa do peso corporal ao final do tratamento (SD $-32,3 \pm 4,0$ gramas e TD $-30,0 \pm 4,2$ gramas).

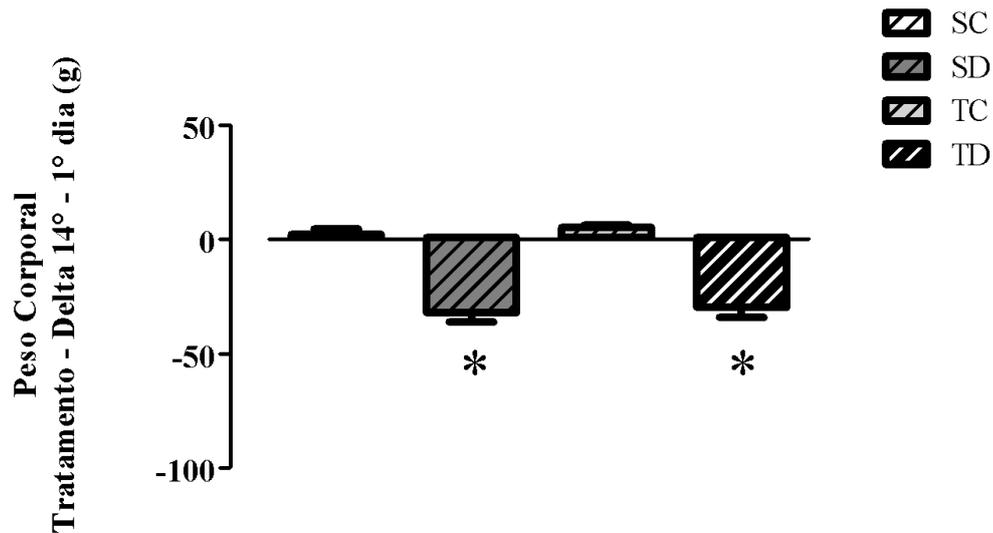


Figura 20: Delta do peso corporal durante o período de tratamento com dexametasona de SHR: sedentário controle (n=10), sedentário dexametasona (n=10), treinado controle (n=10) e treinado dexametasona (n=10). Significância: * vs controle; $p < 0,05$.

4.2.2 ANÁLISES HEMODINÂMICAS

Os resultados de PA direta dos SHR podem ser observados na Figura 21 para PAS (Painel A), pressão arterial diastólica (Painel B) e pressão arterial média (Painel C). Pode-se observar que o tratamento com a DEX não alterou a PA dos animais SHR, no entanto, o TF foi efetivo em reduzir os valores de PAS, PAD e PAM dos animais, independente do tratamento com a DEX (PAS, $148,2 \pm 6,9$ mmHg vs $112,3 \pm 5,0$ mmHg, para SC vs TC, respectivamente e $150,7 \pm 7,6$ mmHg vs $121,0 \pm 5,2$ mmHg, para SD vs TD, respectivamente; PAD, $137,4 \pm 6,1$ mmHg vs $100,3 \pm 3,5$ mmHg, para SC vs TC, respectivamente e $135,9 \pm 8,1$ mmHg vs $104,5 \pm 5,8$ mmHg, para SD vs TD, respectivamente e PAM, $141,3 \pm 6,3$ mmHg vs $104,3 \pm 3,8$ mmHg, para SC vs TC, respectivamente e $140,3 \pm 3,8$ mmHg vs $110,0 \pm 5,1$ mmHg, para SD vs TD, respectivamente).

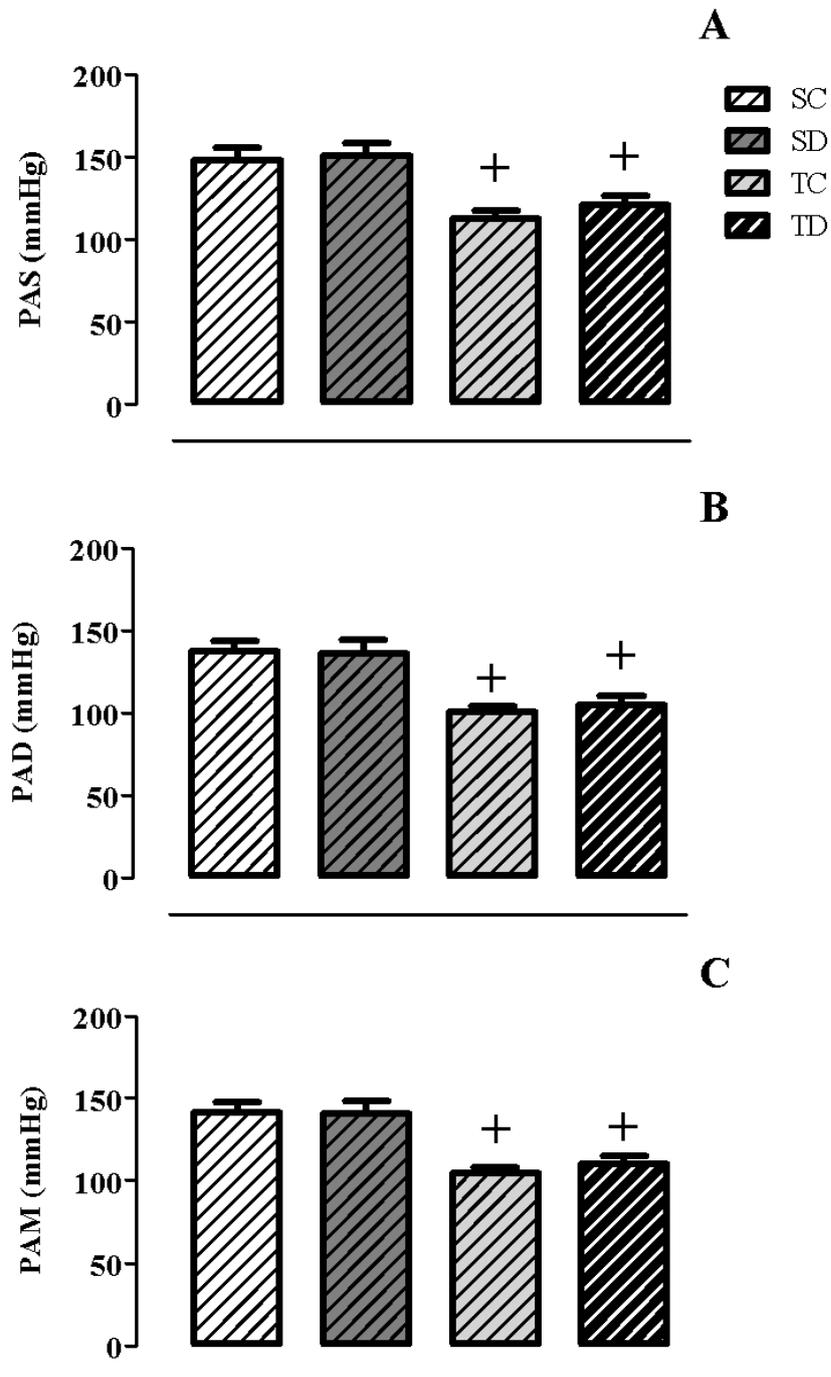


Figura 21: Valores de pressão arterial sistólica (Painel A), diastólica (Painel B) e média (Painel C) dos SHR sedentários controle (SC, n=15), sedentário dexametasona (SD, n=14), treinado controle (TC, n=9) e treinado dexametasona (TD, n=8). Significância: + vs sedentário; $p < 0,05$.

A frequência cardíaca dos SHR não apresentou diferença significativa entre os grupos, como observado na Figura 22.

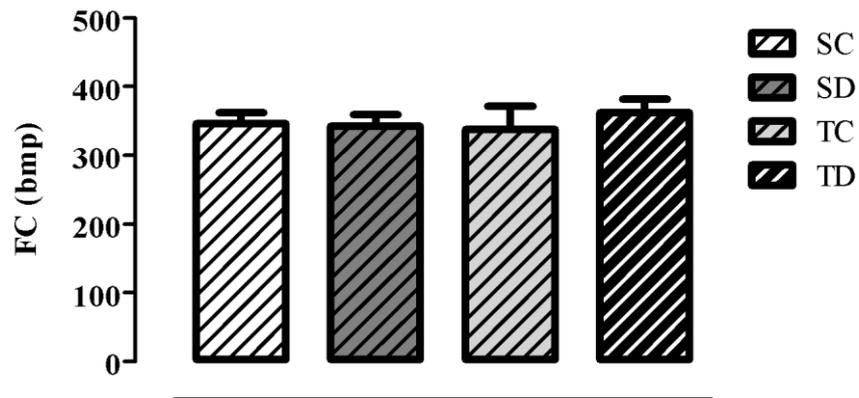


Figura 22: Valores de frequência cardíaca dos SHR sedentários controle (SC, n=8), sedentário dexametasona (SD, n=9), treinado controle (TC, n=7) e treinado dexametasona (TD, n=4). Significância: $p < 0,05$.

4.2.3 PESO MUSCULAR E DA GLÂNDULA ADRENAL

Na Tabela 2 pode-se observar que o tratamento com a DEX não determinou alterações no peso muscular do coração e do VE. Entretanto, o tratamento com DEX provocou redução significativa do peso das glândulas adrenais tanto do grupo sedentário como no grupo treinado e tratado com DEX (Tabela 2).

Tabela 2: Valores de massa muscular e glândula adrenal entre os SHR.

	SC	SD	TC	TD
Tíbia (cm)	4,0 ± 0,02	3,9 ± 0,02	4,0 ± 0,03	3,9 ± 0,01
TA/Tíbia (mg/cm)	131,2 ± 2,6	123,3 ± 4,0	138,3 ± 3,7	126,0 ± 3,6
Coração/Tíbia (mg/cm)	291,0 ± 3,8	289,0 ± 5,5	280,1 ± 8,7	275,5 ± 8,4
VE/Tíbia (mg/cm)	207,0 ± 2,9	210,0 ± 5,0	198,2 ± 5,7	202,2 ± 5,3
Adrenal/Tíbia (mg/cm)	6,4 ± 0,4	4,5 ± 0,1*	7,3 ± 0,2	5,2 ± 0,2*

Músculo tibial anterior (TA), Ventrículo Esquerdo (VE) e Glândulas Adrenais, normalizados pelo comprimento da tíbia. Significância: * vs controle; p<0,05.

4.2.4 ANÁLISE ESPECTRAL

A Figura 23 mostra o resultado da análise espectral dos SHR tanto para o coração como para os vasos. Pode-se observar que o tratamento com a DEX não provocou nenhuma alteração nas ondas de BF (Painel A), AF (Painel B), na razão entre as ondas de BF/AF (Painel C) para o coração, como também não alterou as ondas de BF (Painel D) para os vasos.

O treinamento físico, por sua vez, reduziu a razão BF/AF no grupo TC (Painel C, $0,31 \pm 0,08$ vs $1,68 \pm 0,3$, TC vs SC) e TD (Painel C, $0,48 \pm 0,12$ vs $2,06 \pm 0,55$, TD vs SD).

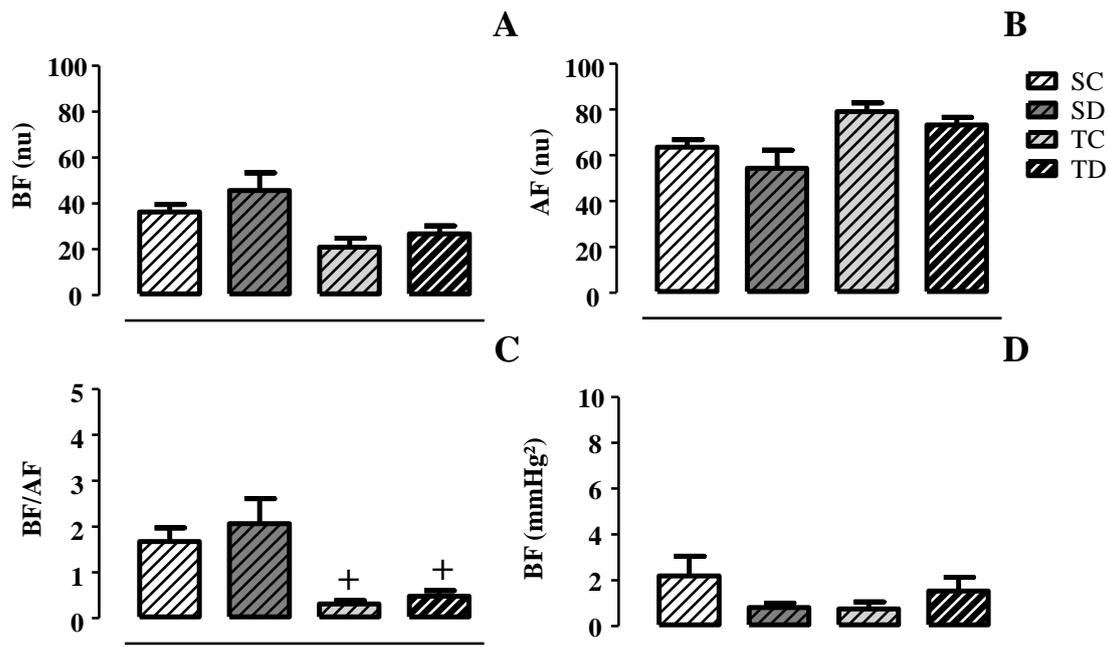


Figura 23: Valores das ondas de Baixa frequência (Painel A), Alta frequência (Painel B), Baixa frequência/Alta frequência (Painel C) para o coração e valores das ondas de Baixa frequência (Painel D) para os vasos dos SHR sedentários controle (SC, n=11), sedentário dexametasona (SD, n=11), treinado controle (TC, n=8) e treinado dexametasona (TD, n=7). Significância: + vs sedentário; $p < 0,05$.

4.2.5 ANÁLISES MORFOMÉTRICAS

A Figura 24 mostra os resultados densitométricos resultantes das análises morfométricas do músculo tibial dos SHR. Pode-se observar no Painel A que a DEX não determinou qualquer alteração significativa, no entanto, o treinamento físico determinou aumento da densidade capilar tanto no grupo TC ($192,1 \pm 11,3$ vs $153,3 \pm 5,2$ n/mm², para TC vs SC, respectivamente), quanto no grupo TD ($211,6 \pm 12,3$ vs $164,1 \pm 3,9$ n/mm², para TD vs SD, respectivamente). Da mesma forma, o treinamento físico determinou aumento da razão capilar/fibra (Painel B), tanto no grupo TC ($0,9 \pm 0,03$ vs $0,7 \pm 0,04$, para TC vs SC, respectivamente) quanto no grupo TD ($1,0 \pm 0,04$ vs $0,7 \pm 0,02$, para TD vs SD, respectivamente).

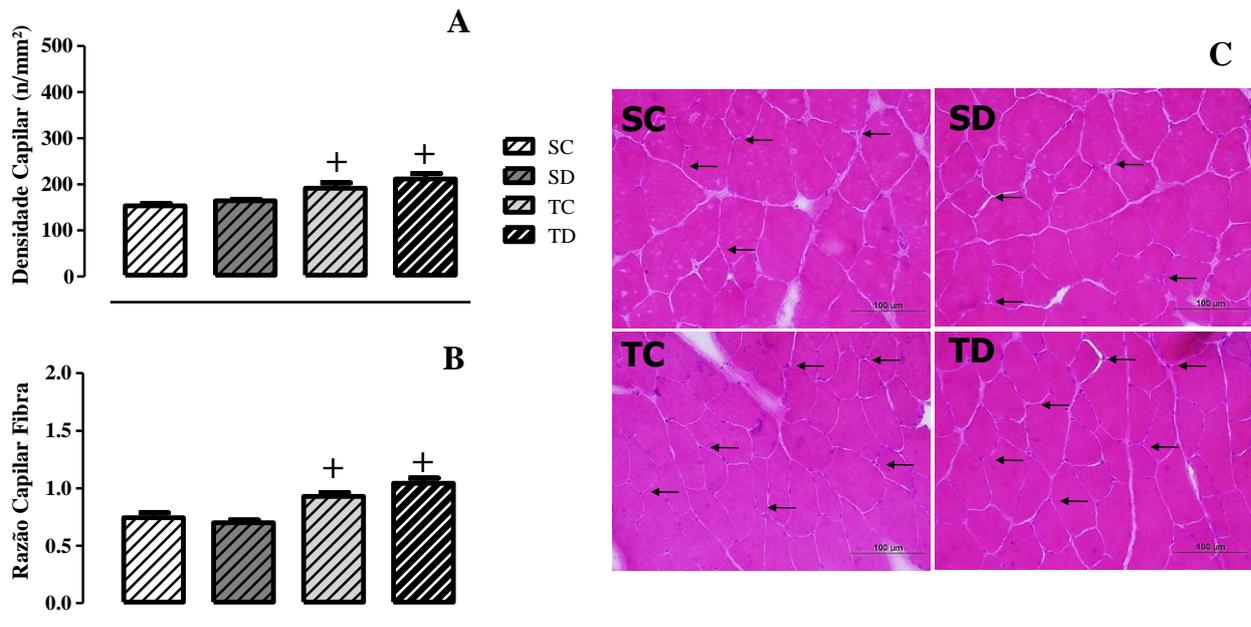


Figura 24: Valores da densidade capilar (Painel A), razão capilar fibra (Painel B) e imagens representativas de um animal por grupo coradas com hematoxilina e eosina (Painel C) no músculo TA dos SHR sedentários controle (SC, n=13), sedentário dexametasona (SD, n=14), treinado controle (TC, n=8) e treinado dexametasona (TD, n=7). O núcleos dos capilares estão marcados em roxo e a musculatura em rosa. As setas pretas indicam os capilares ao redor das fibras musculares. Aumento de 40x. Barra de 100μm. Significância: + vs sedentário; p<0,05.

A Figura 25 mostra os resultados densitométricos resultantes das análises morfométricas do ventrículo esquerdo dos SHR. Pode-se observar no Painel A que a DEX não determinou qualquer alteração significativa, no entanto, houve aumento da densidade capilar, tanto no grupo TC ($1102,7 \pm 20,3$ vs $756,9 \pm 20,6$ n/mm², para TC vs SC, respectivamente), quanto no grupo TD ($1048,1 \pm 21,7$ vs $745,7 \pm 18,1$ n/mm², para TD vs SD, respectivamente).

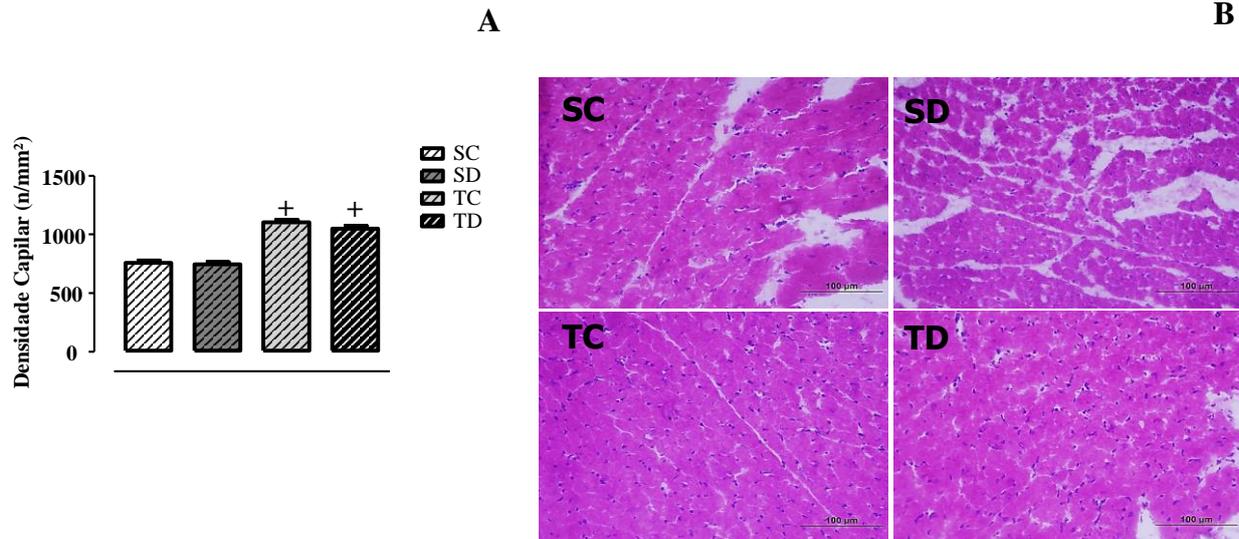


Figura 25: Valores da densidade capilar (Painel A) e imagens representativas de um animal por grupo coradas com hematoxilina e eosina (Painel B) no ventrículo esquerdo dos SHR sedentários controle (n=13), sedentário dexametasona (n=14), treinado controle (n=8) e treinado dexametasona (n=7). O núcleos dos capilares estão marcados em roxo e a musculatura em rosa. As setas pretas indicam os capilares ao redor das fibras musculares. Aumento de 40x. Barra de 100µm. Significância: + vs sedentário; $p < 0,05$.

4.2.6 PRODUÇÃO PROTEICA

As figuras 26 e 27 mostram os resultados de produção proteica do VEGF e Caspase-3-clivada no músculo tibial anterior (Figura 26) e no ventrículo esquerdo (Figura 27) dos SHR.

No músculo tibial anterior dos SHR, o tratamento com DEX não determinou qualquer alteração nas proteínas observadas, por outro lado, o treinamento físico foi capaz de aumentar a produção proteica do VEGF (Painel A, +42,0% para TC vs SC, respectivamente e +29,0% para TD vs SD, respectivamente) e reduzir a Caspase-3 clivada (Painel B, -33,0% para TC vs SC, respectivamente e -41,0% para TD vs SD, respectivamente). Da mesma forma, a DEX não alterou nenhuma das proteínas observada no ventrículo esquerdo, mas o exercício físico regular proporcionou aumento do VEGF (+35,0% para TC vs SC, respectivamente e +50% para TD vs SD, respectivamente, Painel A) e redução da Caspase-3 clivada (-26,0% para TC vs SC, respectivamente e -42,0% para TD vs SD, respectivamente, Painel B).

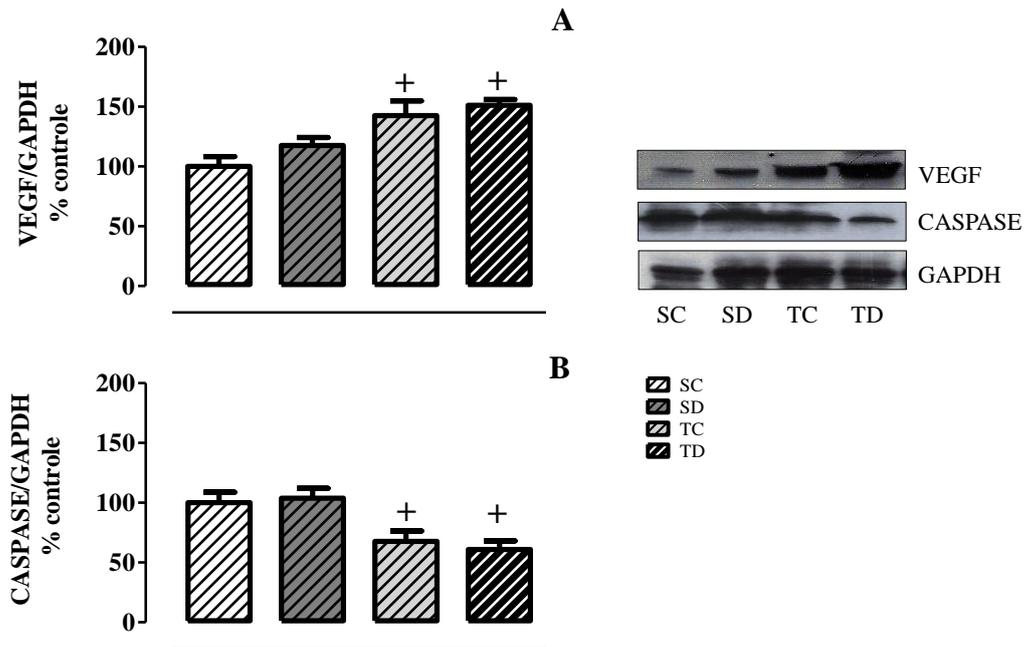


Figura 26: Valores das análises quantitativas da produção das proteínas VEGF (Painel A) e Caspase (Painel B) normalizado por GAPDH no músculo TA dos SHR sedentários controle (SC), sedentário dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado dexametasona (TD). O número de ratos usados para a produção proteica foi de 8 a 4 por grupo e os resultados são expressos como % do grupo controle (SC). Significância: + vs sedentário; $p < 0,05$.

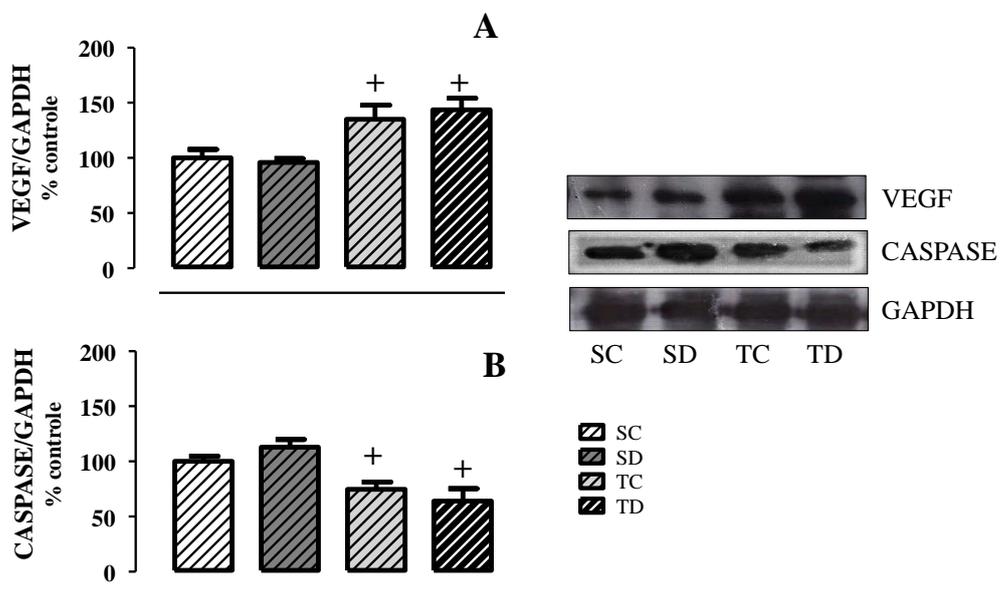


Figura 27: Valores das análises quantitativas da produção das proteínas VEGF (Painel A) e Caspase (Painel B) normalizado por GAPDH no músculo VE dos SHR sedentários controle (SC), sedentário dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado dexametasona (TD). O número de ratos usados para a produção proteica foi de 8 a 5 por grupo e os resultados são expressos como % do grupo controle (SC). Significância: + vs sedentário; $p < 0,05$.

4.2.7 microRNA

A análise da expressão dos microRNAs 16, 21, 155, 126, 221 e 222 foi realizada no músculo tibial anterior e no ventrículo esquerdo por meio do PCR real-time. Todos os resultados foram normalizados pelo controle (100 unidades arbitrárias). As figuras 28 e 29, respectivamente, mostram que tanto o tratamento com a DEX como o treinamento físico não alteraram significativamente a expressão dos microRNAs no músculo tibial anterior (Figura 28) e no ventrículo esquerdo (Figura 29).

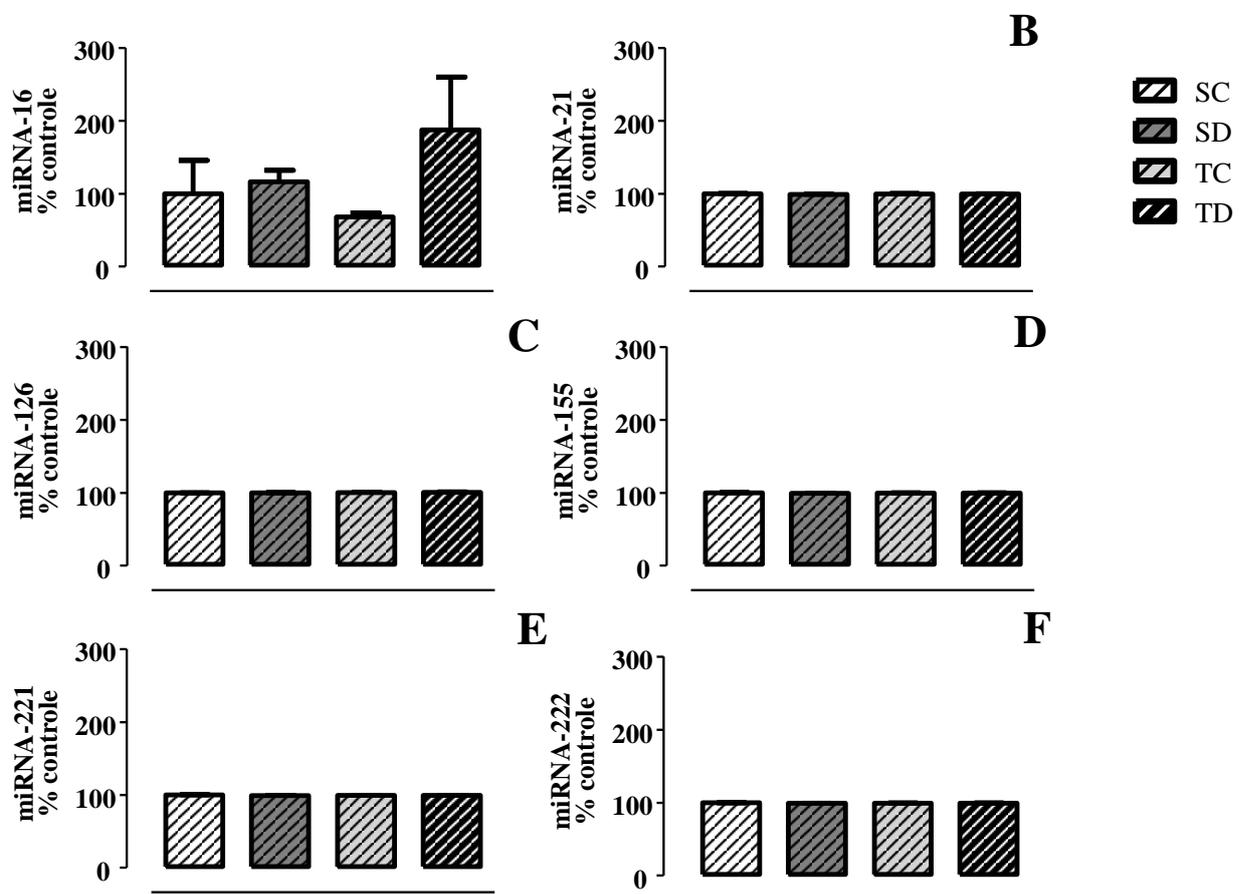


Figura 28: Expressão no músculo tibial anterior dos SHR sedentários controle (SC), sedentário dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado dexametasona (TD) do microRNA-16 (Painel A), microRNA-21 (Painel B), microRNA-126 (Painel C), microRNA-155 (Painel D), microRNA-221 (Painel E) e microRNA-222 (Painel F). Os microRNAs foram normalizados pela expressão do microRNA U6. O número de ratos usados para a expressão gênica foi de 4 a 10 por grupo e os resultados são expressos como % do grupo controle (SC). Significância: $p < 0,05$.

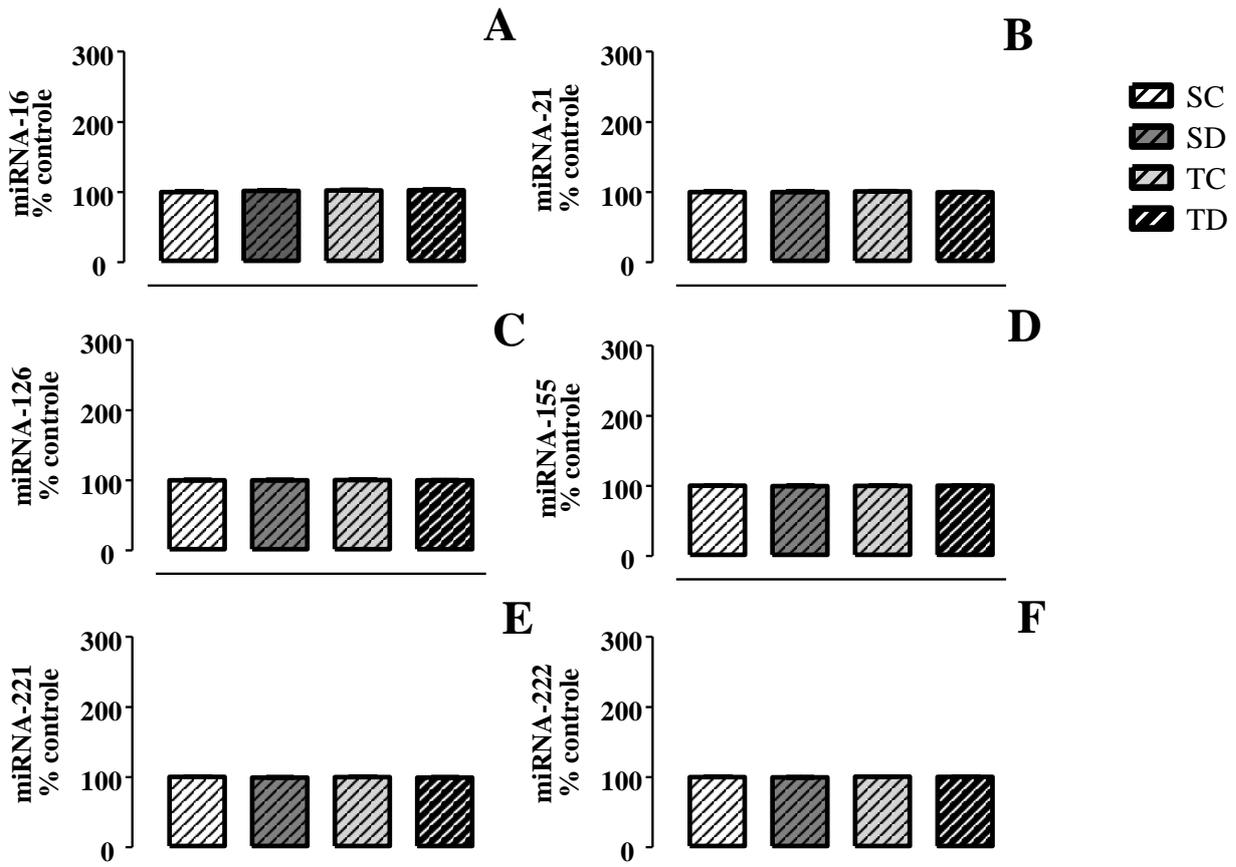


Figura 29: Expressão no ventrículo esquerdo dos SHR sedentários controle (SC), sedentário dexametasona (SD), treinado controle (TC) e treinado dexametasona (TD) do microRNA-16 (Painel A), microRNA-21 (Painel B), microRNA-126 (Painel C), microRNA-155 (Painel D), microRNA-221 (Painel E) e microRNA-222 (Painel F). Os microRNAs foram normalizados pela expressão do microRNA U6. O número de ratos usados para a expressão gênica foi de 6 a 10 por grupo e os resultados são expressos como % do grupo controle (SC). Significância: $p < 0,05$.

4.3 COMPARAÇÃO ENTRE ANIMAIS NORMOTENSOS E HIPERTENSOS

Na Tabela 3 pode-se observar uma comparação dos resultados entre o grupo Wistar sedentário controle e o grupo SHR sedentário controle. Pode-se observar que os SHR apresentaram menor incremento de peso corporal após 8 semanas de treinamento físico. Além disso, no final do protocolo experimental, os SHR apresentaram maiores valores de PAS, PAD e PAM, bem como desbalanço autonômico para o coração e redução da densidade capilar no músculo tibial anterior e no ventrículo esquerdo, quando comparados aos Wistar.

Tabela 3: Comparação entre os Wistar e SHR sedentários controle

	Wistar SC	SHR SC
Peso Corporal Treinamento Delta 8° - 1° sem (g)	226,1 ± 7,8	80,4 ± 2,7*
Peso Corporal Tratamento Delta 14° - 1° dia (g)	-2,3 ± 2,5	+2,0 ± 2,3
PAS (mmHg)	106,2 ± 6,0	148,2 ± 6,9*
PAD (mmHg)	91,3 ± 3,3	137,4 ± 6,1*
PAM (mmHg)	96,3 ± 3,8	141,3 ± 6,3*
BF (nu)	18,7 ± 4,8	36,3 ± 3,2*
AF (nu)	81,2 ± 4,8	63,6 ± 3,5*
BF/AF	0,36 ± 0,16	1,68 ± 0,30*
DC TA n/mm ²	192,6 ± 16,3	153,3 ± 5,2*
DC VE n/mm ²	883,5 ± 19,3	756,9 ± 20,6*

Peso Corporal (PC), Pressão Arterial Sistólica (PAS), Pressão Arterial Diastólica (PAD), Pressão Arterial Média (PAM), Densidade capilar (DC), Tibial anterior (TA), Ventrículo esquerdo (VE). Significância: * vs controle; p<0,05.

5 DISCUSSÃO

Os principais achados deste estudo foram que o tratamento com DEX induziu aumento da PA nos animais Wistar associado à alterações no balanço autonômico para o coração, bem como à rarefação de capilares no músculo tibial anterior, provavelmente determinado por um desbalanço entre as proteínas angiogênicas, apoptóticas e anti-apoptóticas. Por outro lado, o treinamento físico em esteira, realizado previa e simultaneamente ao tratamento com DEX, aumentou a expressão do microRNA-126, que contribuiu para evitar o desbalanço entre as proteínas envolvidas no processo de rarefação de capilares. Além disso, o treinamento prévio evitou as alterações no balanço autonômico para o coração observadas nos animais sedentários e tratados. Dessa forma, o TF atenuou o aumento de PA dos animais tratados com DEX. Nos SHR, que já apresentavam alterações hemodinâmicas e de microcirculação, o tratamento com a DEX não comprometeu ainda mais estas variáveis. Por outro lado, o treinamento físico reduziu a PA por meio de alterações benéficas no balanço autonômico para o coração e determinou angiogênese na musculatura esquelética e cardíaca, que foi associada ao aumento de VEGF e redução de caspase-3 clivada, independente a expressão dos microRNAs analisados.

A DEX é um glicocorticoide sintético amplamente utilizado na clínica como anti-inflamatório, antialérgico, no tratamento de asma, doenças autoimunes e febre reumática, além de também ser utilizado como antiemético (REBEYROL et al., 2012; CARDOSO et al., 2013; MARDANI e BIGDELIAN, 2013). Contudo, apesar de possuir diversos benefícios, o uso crônico desse fármaco pode acarretar efeitos deletérios, dentre eles, o aumento da pressão arterial, redução do peso corporal, atrofia muscular, resistência à insulina, hiperglicemia e hiperinsulinemia (WEINSTEIN et al., 1998; SCHNEITER e TAPPY, 1998; DODIC et al., 1999; MONDO et al., 2006; RAFACHO et al., 2007; SANTOS et al., 2007; GIOZZET et al., 2008; BAREL et al., 2010; MACEDO et al., 2014; DIONÍSIO et al., 2014).

No presente estudo, o tratamento crônico com a DEX por 14 dias confirmou a redução do peso corporal nos animais Wistar que já havia sido evidenciada em estudos anteriores do nosso laboratório e outros (BAREL et al., 2010; DIONISIO et al., 2014; MACEDO et al, 2014; HERRERA et al., 2016; SATO et al., 2016). Esta resposta pode estar associada tanto com a redução da ingestão alimentar, haja vista que a partir do primeiro dia de tratamento com DEX os animais comem menos ração (MACEDO et al, 2014; KRUG et al., 2016) ou com a redução de massa magra generalizada observada nos animais, que acontece a partir do terceiro dia e permanece durante todo o período de tratamento (MACEDO et al., 2016). Os mecanismos responsáveis pela redução de peso corporal não foram investigados no presente estudo. Com o intuito de prevenir esse efeito deletério, os animais realizaram previa e concomitantemente ao tratamento com a DEX um treinamento físico em esteira. Contudo, confirmando os resultados anteriores, o treinamento físico foi ineficaz em prevenir ou mesmo atenuar a redução de peso corporal observada após tratamento crônico com DEX (BAREL et al., 2010; NICASTRO et al., 2012; DIONISIO et al., 2014; MACEDO et al, 2014; HERRERA et al., 2016, CONSTANTINO et al, 2017; JESUS et al, 2020).

A hipertensão induzida pela DEX tem sido relatada em vários estudos utilizando diferentes dosagens, períodos de tratamento e formas de administração (SUZUKI, et al., 1982; DODIC et al., 1999; MONDO et al., 2006; ONG et al., 2013; HERRERA et al., 2016). Confirmando resultados previamente observados, este estudo demonstrou que o tratamento com baixa dose de DEX (50 µg/kg por dia durante 14 dias) determinou aumento da PAS (+22%), PAD (+30%) e PAM (+27%), nos animais Wistar. Tem sido sugerido que alterações no sistema nervoso central possam contribuir para o aumento da pressão arterial induzida por DEX, uma vez que, injeções bilaterais de DEX no NTS (WANG et al., 2005) ou mesmo injeção de corticosterona na parte dorsal do cérebro (SCHEUER et al., 2004) foram capazes de provocar aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca. Injeções de DEX concomitante com um antagonista do receptor de

glicocorticoide no NTS preveniu o aumento da PA (WANG et al., 2005), confirmando o papel importante do sistema nervoso central na hipertensão induzida pela DEX. Recentemente, outros estudos do nosso laboratório demonstraram que tanto alterações no sistema nervoso autonômico (desbalanço autonômico para o coração) como alterações na efetividade do baroreflexo estavam relacionadas com o aumento da pressão arterial induzida por DEX em ratos Wistar (HERRERA et al., 2016; CONSTANTINO et al., 2017). No presente estudo, os resultados reforçam o papel do sistema nervoso autonômico no aumento da pressão arterial induzida por DEX, uma vez que os ratos Wistar tratados com DEX apresentaram concomitantemente ao aumento da PA, aumento das ondas de BF (+141,1%), diminuição das ondas de AF (-32,5%) e aumento da razão BF/AF (+400%), que representa um desbalanço autonômico para o coração.

Além dos efeitos centrais, outras evidências sugerem que alterações periféricas também possam contribuir com o aumento da pressão arterial induzido pelo tratamento com DEX. Dentre elas, pode-se citar o aumento de receptores adrenérgicos $\alpha 1B$ em células do músculo liso (SAKAUE e HOFFMAN, 1991), aumento de noradrenalina plasmática (KUMAI et al., 2000), da concentração de adrenalina (KUMAI et al., 2000; SILVAN et al., 2007; WATANABE et al., 1995) e, mais recentemente, redução da densidade capilar no músculo esquelético (HERRERA et al., 2016; HERRERA et al., 2017; JESUS et al, 2020). Em concordância, no presente estudo, o tratamento com DEX reduziu a capilarização no músculo tibial anterior.

A densidade de vasos é mantida por um balanço fino entre fatores que promovem a formação de novos vasos (angiogênicos) e fatores que promovem a morte celular (apoptóticos), sendo que o desbalanço desse mecanismo pode contribuir tanto para a formação de novos vasos (angiogênese) como para a rarefação de capilares (apoptose) (GERBER et al., 1998; GRIVICICH et al., 2007; SANZ et al., 2008). Poucos trabalhos avaliaram os mecanismos responsáveis pela rarefação de capilares induzida pela DEX. Vogt e Schmid-schobein (2001) demonstram que a rarefação de capilares no músculo cremaster, observada nos animais tratados com DEX, estava

associada a processos de fragmentação nuclear em células endoteliais, característicos de apoptose. Recentemente, demonstramos *in vitro* que a disfunção endotelial induzida por DEX é mediada pelo receptor de glicocorticoide e pela ativação da *protein tyrosine phosphatase 1B* (PTP1B), que é um inibidor da via de sinalização orquestrada pelo VEGF (HERRERA et al, 2020).

Estudos recentes de nosso laboratório também mostraram que a rarefação de vasos induzida pelo tratamento crônico com a DEX no músculo esquelético de ratos Wistar está associada à alterações na via de sinalização do PI3K/AKT, induzida por VEGF (HERRERA et al., 2016; HERRERA et al., 2017; JESUS et al, 2020) e a DEX também acarreta redução na produção de NO estimulada por VEGF em células endoteliais (aorta) (HERRERA et al., 2020). Essa redução do NO não foi associada a alterações na razão da tetrahydrobiopterina (BH4) para 7,8-dihydrobiopterina (BH2). Além disso, a DEX não teve efeito na produção de NO estimulada por bradicinina indicando que a fosforilação de eNOS estimulada por VEGF seja o alvo dos efeitos da DEX (HERRERA et al., 2020).

Os resultados do presente estudo reafirmam este possível mecanismo, uma vez que a DEX acarretou redução do VEGF, da Bcl-2 e da razão entre a p-AKT/AKT, bem como aumentou a produção da Caspase-3-clivada.

Alguns autores têm sugerido que os microRNAs representam papel importante na regulação da angiogênese e da apoptose nas células endoteliais, uma vez que o microRNA é capaz de regular as vias biológicas do organismo por meio da inibição/degradação do mRNA (URBICH et al., 2008; QUINTAVALLE et al., 2011). Por esta razão, alguns microRNAs, dentre eles os microRNAs 16, 21, 126, 155, 221 e 222 (WANG et al., 2008; FISH et al., 2008; URBICH et al., 2008; SUAREZ E SESSA, 2009; CHAMORRO-JORGANES et al., 2011; SUN et al., 2012; NEVES et al., 2014; FERNANDES et al., 2012) têm sido alvos de estudo para a compreensão dos processos de angiogênese / apoptose. Fernandes et al. (2012) demonstraram que SHR apresentam redução do microRNA-126 e aumento dos microRNAs 16, 21 e 205, os quais estão associados

com a redução da eNOS, do VEGF, da Bcl-2 e rarefação microvascular no músculo sóleo. Posteriormente, os mesmos autores verificaram aumento do microRNA-16 associado à redução do VEGF e redução do número de vasos no coração de ratos obesos (FERNANDES et al., 2018). Além disso, a deleção do microRNA-126, *in vivo*, provoca redução da densidade capilar no coração de ratos (WANG et al., 2008). Contudo, ainda nada se sabia sobre o papel nos microRNAs que estão envolvidos com a microcirculação na rarefação de capilares induzida pela DEX.

Neste sentido, o presente estudo investigou o efeito da DEX na expressão dos microRNAs-16, 21, 126, 155, 221, 222, o quais estão relacionados com as proteínas analisadas no músculo TA. Surpreendentemente, apesar de haver rarefação no TA acompanhada de redução de VEGF, da Bcl-2 e da razão entre p-AKT/AKT, bem como aumento da produção da Caspase-3-clivada, nenhuma diferença significativa foi observada na expressão dos microRNAs analisados, sugerindo que esses microRNAs não são influenciados significativamente pela DEX neste tecido avaliado. Além do músculo tibial anterior, analisamos também os efeitos do tratamento com a DEX no ventrículo esquerdo de animais Wistar. O tratamento com DEX não alterou a densidade de capilares no miocárdio e, de acordo com esta resposta, não foram encontradas alterações significativas nas expressões de microRNAs ou na produção das proteínas envolvidas com os processos de apoptose e angiogênese.

Um dos objetivos do presente estudo foi investigar se o TF em esteira, realizado previa e concomitante ao tratamento com a DEX, poderia atenuar ou prevenir o aumento da PA induzido pela droga e quais mecanismos poderiam contribuir com esta resposta. Nesse sentido, o TF promoveu uma atenuação do aumento da PA induzida pela DEX nos ratos Wistar, principalmente por melhorar o balanço autonômico para o coração, a atividade nervosa simpática para os vasos e por prevenir a redução da densidade capilar no músculo esquelético. Estas respostas na microcirculação da musculatura esquelética foram associadas à prevenção da redução do VEGF, da razão p-AKT/AKT e da Bcl-2, bem como à prevenção do aumento da caspase-3-clivada,

confirmando resultados previamente publicados (HERRERA et al., 2016; HERRERA et al., 2017; JESUS et al., 2020), indicando que esses mecanismos, em conjunto, sejam os possíveis responsáveis pelo efeito benéfico do TF.

A resposta benéfica do TF em modular o sistema nervoso autonômico desajustado pode estar associada à neuroplasticidade induzida pelo TF crônico, uma vez que, o TF é capaz de reajustar tanto a sensibilidade baroreflexa (BRUM et al., 2000), o reflexo pressor do exercício (MIZUNO et al., 2015), como o próprio sistema nervoso autonômico (MASSON et al., 2014), auxiliando na regulação das alterações no comando central da PA.

Já a prevenção da rarefação de capilares na musculatura esquelética induzida pelo TF pode estar relacionada aos estímulos regulares das sessões de exercício (redução da pressão parcial de oxigênio e aumento do estresse de cisalhamento) que fazem com que as células endoteliais aumentem a expressão do VEGF e da eNOS (proteínas que proporcionam ao organismo angiogênese e previnem a rarefação), bem como alterem a expressão de determinados microRNAs que regulam proteínas associadas à angiogênese e à apoptose (AMARAL et al., 2001; AMARAL et al., 2008; URBICH et al., 2008; AMARAL et al., 2000; QUINTAVALLE et al., 2011; FERNANDES et al., 2012). Em concordância, 10 semanas de exercício de natação foram capazes de prevenir a rarefação de capilares no músculo sóleo de SHR por prevenir o aumento dos microRNAs 16 e 21, bem como a redução do microRNA 126, os quais foram associados à prevenção da redução do VEGF, eNOS e Bcl-2 (FERNANDES et al., 2012).

No presente estudo, os resultados mostram que o TF aumentou a expressão do microRNA 126. O microRNA 126 inibe a PI3K, proteína esta que é responsável por regular negativamente a via de sinalização da PI3K (FISH et al., 2008; WANG et al., 2008). Com isso, o aumento da expressão do microRNA 126 inibe o efeito inibitório realizado pela PI3K e, portanto, auxilia a ativação da via angiogênica. Neste sentido, observamos uma prevenção da redução do VEGF, da razão p-AKT/AKT e da Bcl-2, bem como uma prevenção do aumento da caspase-3-clivada. Além

disso, observaram-se correlações significativas entre a expressão do microRNA 126 e a razão entre p-AKT/AKT ($r= 0,725$) no músculo tibial anterior. Importante ressaltar que o tratamento com a DEX não impediu os efeitos benéficos do treinamento físico no músculo TA de ratos Wistar.

Apesar da DEX não determinar nenhuma alteração significativa na microcirculação do miocárdio em animais sedentários, pode-se observar que o treinamento físico em esteira foi capaz de aumentar a expressão do microRNA 126 e a densidade de capilares no miocárdio, tanto no grupo TC quanto no grupo TD. Este efeito benéfico do treinamento, especificamente nesse microRNA e nessa musculatura, já havia sido demonstrado anteriormente em outros tipos de exercício, como por exemplo no treinamento de natação por 12 semanas em ratos Wistar (SILVA et al., 2012) ou no treinamento físico voluntário por 8 semanas em ratos (GHORBANZADEH et al., 2017). Da mesma forma que o observado na musculatura esquelética, o aumento do microRNA-126 auxiliou a ativação da via de sinalização da PI3K-AKT promovendo angiogênese no miocárdio, independente do tratamento com DEX.

Outro objetivo do presente estudo foi investigar se o tratamento com a DEX poderia culminar em acentuado aumento da pressão arterial em SHR, aumentando o risco de mortalidade, bem como analisar se esse efeito estaria relacionado com alterações no sistema nervoso autônomo e na microcirculação. Como demonstrado na tabela 3 do presente estudo, a hipertensão espontânea foi associada ao desbalanço autonômico para o coração (MASSON et al., 2014) e à redução da microcirculação na musculatura esquelética e cardíaca, como já evidenciada em outros estudos com SHR (AMARAL et al., 2000; AMARAL E MICHELINI, 2011; FERNANDES et al., 2012). A rarefação de capilares no miocárdio dos SHR pode não estar diretamente relacionada com a pressão arterial, porém contribui para reduzido fluxo sanguíneo para o coração. Era nossa preocupação verificar se o tratamento com DEX pioraria esta resposta.

Os resultados do presente estudo mostraram que a DEX não determinou maior aumento da pressão arterial em SHR, ou seja, a pressão elevada presente nesses animais era exclusivamente

em decorrência da linhagem (SHR). Além disso, nenhuma das alterações presentes na musculatura esquelética e cardíaca, já presentes nos animais SHR, foi piorada pelo tratamento com a DEX.

Por outro lado, como observado nos animais Wistar, o treinamento físico em esteira, realizado por 70 dias, antes e durante o tratamento com DEX, foi eficaz em reduzir a pressão arterial dos SHR, associado à melhora do balanço autonômico e aumento da microcirculação na musculatura esquelética e cardíaca, em consonância com os estudos da literatura em SHR (AMARAL et al., 2000; AMARAL E MICHELINI, 2011; FERNANDES et al., 2012; MASSON et al., 2014).

Tanto no músculo tibial anterior como no miocárdio, o aumento de densidade de vasos induzido pelo treinamento físico em esteira estava relacionado com aumento de VEGF e redução da caspase-3 clivada, no entanto, nenhuma alteração significativa foi encontrada na expressão dos microRNAs analisados.

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem que o pré-condicionamento físico atenua a hipertensão arterial induzida pela DEX em ratos Wistar, por prevenir o desbalanço autonômico para o coração, bem como a rarefação da microcirculação na musculatura esquelética, resposta esta que foi associada a maior expressão do microRNA 126. Além disso, o TF *per se* promove angiogênese no miocárdio associada ao aumento do microRNA 126, independente do tratamento com DEX. Ainda, o TF foi eficaz em reduzir a hipertensão arterial nos SHR, independente do tratamento com a DEX, por melhorar o balanço autonômico e a microcirculação dos músculos tibial anterior e cardíaco. Vale ressaltar que a DEX não exacerbou as alterações hemodinâmicas e da microcirculação já presentes nos SHR.

REFERÊNCIAS

- ALGHATRIF, M.; LAKATTA, E. G. The conundrum of arterial stiffness, elevated blood pressure, and aging. **Curr Hypertens Rep**, v. 17, n. 2, p. 12, 2015.
- ALMEIDA, C. C. et al. A fisiologia do exercício físico na estimulação da angiogênese em pacientes diabéticos com doença vascular periférica. **UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 9, n. 17, p. 21-26, 2013.
- AMARAL, S. L. et al. Angiogenesis induced by electrical stimulation is mediated by angiotensin II and VEGF. **Microcirculation**, v. 8, n. 1, p. 57-67, 2001.
- AMARAL, S. L.; MICHELINI, L. C. Effect of gender on training-induced vascular remodeling in SHR. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, n. 9, p. 814-26, 2011.
- AMARAL, S. L. et al. Time course of training-induced microcirculatory changes and of vegf expression in skeletal muscles of spontaneously hypertensive female rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 41, n. 5, p. 424-31, 2008.
- AMARAL, S. L.; ZORN, T. M.; MICHELINI, L. C. Exercise training normalizes wall-to-lumen ratio of the gracilis muscle arterioles and reduces pressure in spontaneously hypertensive rats. **J Hypertens**, v. 18, n. 11, p. 1563-72, 2000.
- BAREL, M. et al. Exercise training prevents hyperinsulinemia, muscular glycogen loss and muscle atrophy induced by dexamethasone treatment. **Eur J Appl Physiol**, v. 108, n. 5, p. 999-1007, 2010.
- BRASSELET, C. et al. Collagen and elastin cross-linking: a mechanism of constrictive remodeling after arterial injury. **American Journal Physiol Heart Circ Physiology**, 289:H2228–H2233, 2005.
- BECKTOLD, A. et al. Genetic predisposition to hypertension sensitizes borderline hypertensive rats to the hypertensive effects of prenatal glucocorticoid exposure. **J physiol**, v.586, n.2, p. 673-684, 2008.
- BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Molecular immunology**, v. 39, n. 11, p. 615-647, 2003.
- BRAUN, T. et al. Early dexamethasone treatment induces placental apoptosis in sheep. **Reprod Sci**, v. 22, n. 1, p. 47-59, 2015.
- BRUM, P. C. et al. Exercise training increases baroreceptor gain sensitivity in normal and hypertensive rats. **Hypertension**, v. 36, n. 6, p. 1018-22, 2000.
- BURGI, K. et al. Tyrosine hydroxylase immunoreactivity as indicator of sympathetic activity: simultaneous evaluation in different tissues of hypertensive rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 300, n. 2, p. 264-71, 2011.

CARDOSO, M. M. et al. Effect of dexamethasone on prevention of postoperative nausea, vomiting and pain after caesarean section: a randomised, placebo-controlled, double-blind trial. **Eur J Anaesthesiol**, v. 30, n. 3, p. 102-5, 2013.

CAVALCANTI, R. A. et al. Low-intensity treadmill exercise-related changes in the rat stellate ganglion neurons. **J Neurosci Res**, v. 87, n. 6, p. 1334-42, 2009.

CARVALHO, M. H. C. et al. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Rev. Bras. Hipertens.**, 8:76-88,2001.

CHAMORRO-JORGANES, A. et al. MicroRNA-16 and microRNA-424 regulate cell-autonomous angiogenic functions in endothelial cells via targeting vascular endothelial growth factor receptor-2 and fibroblast growth factor receptor-1. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.31, p. 2595-2606, 2011.

CHEN, T. et al. Insulin ameliorates miR-1-induced injury in H9c2 cells under oxidative stress via Akt activation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 369, n. 1-2, p. 167-174, 2012.

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

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

CONSTANTINO, P. B. et al. Exercise attenuates dexamethasone-induced hypertension through an improvement of baroreflex activity independently of the renin-angiotensin system. **Steroids**, 2017.

DELANO, F. A.; BALETE, R.; SCHMID-SCHOENBEIN, G. W. Control of oxidative stress in microcirculation of spontaneously hypertensive rats. **Am J physiol Heart Circ**, v. 288, p. 805-812, 2005.

DIONISIO, T. J. et al. Aerobic training prevents dexamethasone-induced peripheral insulin resistance. **Horm Metab Res**, v. 46, n. 7, p. 484-9, Jun 2014.

DODIC, M. et al. Altered cardiovascular haemodynamics and baroreceptor-heart rate reflex in adult sheep after prenatal exposure to dexamethasone. **Clin Sci (Lond)**, v. 97, n. 1, p. 103-9, Jul 1999.

DODIC, M. et al. Impaired cardiac functional reserve and left ventricular hypertrophy in adult sheep after prenatal dexamethasone exposure. **Circ Res**, v. 89, n. 7, p. 623-9, Sep 28 2001.

FAGARD, R. H. Resistant hypertension. **Heart**, v. 98, n. 3, p. 254-261, 2012.

FERNANDES, T. Caracterização do perfil de microRNAs e genes alvo muscular esquelético envolvidos na rarefação microvascular de ratos espontaneamente hipertensos: papel do treinamento físico, 2015. 289 F. **Tese (Doutorado em Ciências)**, Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

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**, v. 59, n. 2, p. 513-20, 2012.

FERNANDES, T et al. Exercise training restores the cardiac microrna-16 levels preventing microvascular rarefaction in Obese Zucker rats. **Obesity facts**, 2018.

FERRARA, N. Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. **Kidney international**, v. 56, n. 3, p. 794-814, 1999.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 29, n. 6, p. 789-791, 2009.

FISH, J. et al. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. **Dev Cell**. v.15, n. 2, p. 272-284, 2008.

FRANKLIN, S. S. et al. Beyond blood pressure: Arterial stiffness as a new biomarker of cardiovascular disease. **Journal of the American Society of Hypertension**. 2(3):140-51, 2008.

FRIESE, R. S. MicroRNA-22 and promoter motif polymorphisms at the Chga locus in genetic hypertension: functional and therapeutic implications for gene expression and the pathogenesis of hypertension. **Human Molecular Genetic**, v. 22, n. 18, p. 3624-3640, 2013.

FU, S. et al. Overall and abdominal obesity indicators had different association with central arterial stiffness and hemodynamics independent of age, sex, blood pressure, glucose, and lipids in Chinese community-dwelling adults. **Clinical interventions in aging**.8:1579-1584, 2013.

GERBER, H.; DIXIT, V.; FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 21, p. 13313-13316, 1998.

GHORBANZADEH, V. et al. Cardioprotective Effect of Crocin Combined with Voluntary Exercise in Rat: Role of Mir-126 and Mir-210 in Heart Angiogenesis. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, 2017.

GILSON, H. et al. Myostatin gene deletion prevents glucocorticoid-induced muscle atrophy. **Endocrinology**, v. 148, n. 1, p. 452-60, Jan 2007.

GIOZZET, V. A. et al. Dexamethasone treatment in vivo counteracts the functional pancreatic islet alterations caused by malnourishment rats. **Metabolism**, v.57, n.5, p.617-24, 2008.

GREENE, A. S. et al. Microvascular rarefaction and tissue vascular resistance in hypertension. **Am J Physiol**, v. 256, p. H126-131,1989.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte celular por apoptose. **Rev Bras Cancerol**, v. 53, n. 3, p. 335-43, 2007.

GUÉRIN, A. P. et al. Arterial Stiffness and vascular calcifications in end-stage renal disease. **Nephrol Dial Transplant**. 15:1014-1021, 2000.

GUO, H. et al. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. **Nature**, v. 466, n. 7308, p.835-840, 2010.

GUSTAFSSON, T. et al. Exercise-induced expression of angiogenesis-related transcription and growth factors in human skeletal muscle. **Am J Physiol**, v.206, p. H679-H685, 1999.

HANSEN, A. H. et al. Exercise training normalizes skeletal muscle vascular endothelial growth factor levels in patients with essential hypertension. **J Hypertension**, v.28, p.1176-1185, 2010.

HARBER-ABEL, F.A. et al. Exercise-induced angiogenesis correlates with the up-regulated expression of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in human skeletal muscle. **Eur J Appl Physiol**, v.112, n. 1, p.1555-62, 2012.

HARTMANN, D.; THUM, T. MicroRNAs and vascular (dys)function. **Vascular Pharmacology**, v. 55, p. 92-105, 2011.

HERRERA, N. A. et al. Exercise training attenuates dexamethasone-induced hypertension by improving autonomic balance to the heart, sympathetic vascular modulation and skeletal muscle microcirculation. **Journal of Hypertension**, 2016.

HERRERA, N. A. et al. Exercise Training Prevents Dexamethasone-induced Rarefaction. **Journal of cardiovascular pharmacology**, 2017.

HERRERA, N. A. et al. In vivo vascular rarefaction and hypertension induced by dexamethasone are related to phosphatase PTP1B activation not endothelial metabolic changes. **Free Radical Biology and Medicine**, 2020.

HIGA-TANIGUCHI, K. T. et al. Exercise training-induced remodeling of paraventricular nucleus (nor)adrenergic innervation in normotensive and hypertensive rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 292, n. 4, p. R1717-27, 2007.

HO, Q. T.; KUO, C. J. Vascular endothelial growth factor: biology and therapeutic applications. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 7, p. 349-1357, 2007.

JESUS, I. et al. Training counteracts DEX-induced microvascular rarefaction by improving the balance between apoptotic and angiogenic proteins. **Steroids**, 2020.

JI, R. et al. MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of microRNA in vascular neointimal lesion formation. **Circulation Research**, v. 100, p. 1579-1588, 2007.

JUNG, S. et al. Treadmill exercise reduces spinal cord injury-induced apoptosis by activating the PI3K/Akt pathway in rats. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 7, n. 3, p. 587-593, 2014.

KRUG, A. L. et al. High-intensity resistance training attenuates dexamethasone-induced muscle atrophy. **Muscle Nerve**, 2015.

KUBIS, N. et al. Role of microvascular rarefaction in the increased arterial pressure in mice lacking for the endothelial nitric oxide synthase gene (eNOS3). **Journal of Hypertension**, v. 20, p. 1581-1587, 2002.

- KUMAI, T. et al. Involvement of tyrosine hydroxylase up regulation in dexamethasone-induced hypertension of rats. **Life Sci**, v. 67, n. 16, p. 1993-9, 2000.
- LAUGHLIN, M.H.; ROSEGUINI, B. Mechanism for exercise training-induced increases in skeletal muscle blood flow capacity: differences with interval sprint training versus aerobic endurance training. **J Physiol Pharmacol**, v. 59, n. 7, p. 71-78, 2008.
- LEE, R. C. et al. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, p. 843-954, 1993.
- LEVY, B. L. et al. Microcirculation in hypertension. A new target for treatment? **Circulation**, v. 104, p. 735-740, 2001.
- LI, X. et al. Bone mineral density is negatively associated with arterial stiffness in men with hypertension. **The Journal of Clinical Hypertension**, p. 1-7, 2016.
- MA, K. et al. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 285, n. 2, p. E363-71, Aug 2003.
- MACEDO, A. G. et al. Low-intensity resistance training attenuates dexamethasone-induced atrophy in the flexor hallucis longus muscle. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 143, p. 357-64, Sep 2014.
- MACEDO, A. G. et al. Time-course changes of catabolic proteins following muscle atrophy induced by dexamethasone. **Steroids**, v. 107, p. 30-6, Mar 2016.
- MANCIA, G. et al. ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). **European Heart Journal**, v. 34, n. 28, p. 2159-2219, 2013.
- MARDANI, D.; BIGDELIAN, H. Prophylaxis of dexamethasone protects patients from further post-operative delirium after cardiac surgery: A randomized trial. **J Res Med Sci**, v. 18, n. 2, p. 137-43, 2013.
- MARTINEZ, D. G. et al. Effects of long-term exercise training on autonomic control in myocardial infarction patients. **Hypertension**, v. 58, n. 6, p. 1049-56, 2011.
- MASSON, G. S. et al. Time-dependent effects of training on cardiovascular control in spontaneously hypertensive rats: role for brain oxidative stress and inflammation and baroreflex sensitivity. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e94927, 2014.
- MIRABELLI, P. et al. Early effects of dexamethasone and anti-VEGF therapy in an inflammatory corneal neovascularization model. **Experimental eye research**, v. 125, p. 118-127, 2014.
- MIZUNO, M. et al. Dynamic exercise training prevents exercise pressor reflex overactivity in spontaneously hypertensive rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 309, n. 5, p. H762-70, Sep 2015.
- MONDO, C. K. et al. Anti-oxidant effects of atorvastatin in dexamethasone-induced hypertension in the rat. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 33, n. 11, p. 1029-34, 2006.

- MOURA, S. A. et al. Local drug delivery system: inhibition of inflammatory angiogenesis in a murine sponge model by dexamethasone-loaded polyurethane implants. **J Pharm Sci**, v. 100, n. 7, p. 2886-95, 2011.
- MUNTER, P.; ROCELLA, H.E.J.; WELTON, P.K. The impact of JNC-VI guidelines on treatments recommendations in the us population. **Hypertension**, v. 30, p. 897-902, 2002.
- NAKAO, S. et al. Larger therapeutic window for steroid versus VEGF-A inhibitor in inflammatory angiogenesis: surprisingly similar impact on leukocyte infiltration. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 53, n. 7, p. 3296-302, 2012.
- NEVES, V. et al. Exercise training in hypertension: Role of microRNAs. **World Journal of Cardiology**, v. 6, n. 8, p. 713-727, 2014.
- NICASTRO, H. et al. Effects of leucine supplementation and resistance exercise on dexamethasone-induced muscle atrophy and insulin resistance in rats. **Nutrition**, v. 28, n. 4, p. 465-71, Apr 2012.
- NICOSIA, R. F.; NICOSIA, S. V.; SMITH, M. Vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and insulin-like growth factor-1 promote rat aortic angiogenesis in vitro. **The American journal of pathology**, v. 145, n. 5, p. 1023, 1994.
- ONG, S. L. et al. The effect of alpha-lipoic acid on mitochondrial superoxide and glucocorticoid-induced hypertension. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2013, p. 517045, 2013.
- OVERTON, J.M; VAN NESS, J.M.; TAKATA, J.H. Effects of chorinic exercise on blood pressure in Dahl-salt- sensitives rats. **Am J Hypertens**, v.11,p.73-80, 1998.
- PASQUINELLI, A. E. et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. **Nature**, v. 408, p. 86-89, 2000.
- PESCATELLO, L. S. et al. American College of Sports Medicine position stand. Exercise and hypertension. **Med Sci Sports Exerc**, v. 36, n. 3, p. 533-53, 2004.
- PICON, R.V. et al. Trends in prevalence of hypertension in Brazil: a systematic review with meta-Analysis. **Plos One** , v.7, p. 1-10, 2012.
- PIZZI, O. et al. Velocidade de onda de pulso – o método e suas implicações prognósticas na hipertensão arterial. **Rev Bras Hipertens**, v. 13, n. 1, p. 59-62, 2006.
- QUINTAVALLE, C. et al. ApoptomiRs in vascular cells: Their role in physiological and pathological angiogenesis. **Vascular Pharmacology**, v. 55, n. 4, p.87-91, 2011.
- RAFACHO, A. et al. Dexamethasone-induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and protein expression in pancreatic rat islets. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 85, n. 5, p. 536-45, May 2007.
- REBEYROL, C. et al. Glucocorticoids reduce inflammation in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. **Cell Signal**, v. 24, n. 5, p. 1093-9, 2012.

REINHART, B. J. et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 403, p. 901-906, 2000.

ROY, H.; BHARDWAJ, S.; YLÄ-HERTTUALA, S. Biology of vascular endothelial growth factors. **FEBS letters**, v. 580, n. 12, p. 2879-2887, 2006.

SAKAUE, M.; HOFFMAN, B. B. Glucocorticoids induce transcription and expression of the alpha 1B adrenergic receptor gene in DTT1 MF-2 smooth muscle cells. **J Clin Invest**, v. 88, n. 2, p. 385-9, Aug 1991.

SANTOS, C. L.; RAFACHO, A.; BOSQUEIRO, J. R. Efeitos da administração de Dexametasona *in vivo* sobre glicemia, insulinemia e substratos circulantes são dependentes do tempo de tratamento. **BiosciJ**, v. 23, n. 3, p. 101-110, 2007.

SANZ, A.B. et al. Mechanisms of renal apoptosis in health and disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 19, n. 9, p. 1634-1642, 2008.

SATO, K. Topical ocular dexamethasone decreases intraocular pressure and body weight in rats. **J Negat Results Biomed**, v.12, n.15, 2016.

SEMENZA, G. L. Life with oxygen. **Science**, v. 318, n. 5847, p. 62-64, 2007.

SCHEUER, D. A. et al. Glucocorticoids act in the dorsal hindbrain to increase arterial pressure. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 286, n. 1, p. H458-67, Jan 2004.

SCHNEITER, P.; TAPPY, L. Kinetics of dexamethasone-induced alterations of glucose metabolism in healthy humans. **Am J Physiol**, v. 275, n. 5 Pt 1, p. E806-13, Nov 1998.

SHI, L. et al. Mechanism and therapeutic potential of microRNAs in hypertension. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 10, 2015.

SMALL, E. M.; OLSON, E. N. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. **Nature**, v. 469, n. 7339, p. 336-342, 2011.

SILVA, A. S. et al. Cardiovascular and autonomic alterations in rats with Parkinsonism induced by 6-OHDA and treated with L-DOPA. **Life Sci**, v. 127, p. 82-9, Apr 15 2015.

SILVA, G. J. et al. Acute and chronic effects of exercise on baroreflexes in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v.30, n.3 Pt 2, p. 714-9, 1997.

SILVA, N. D. J. et al. Swimming training in rats increases cardiac MicroRNA-126 expression and angiogenesis. **Medicine and science in sports and exercise**, 2012.

SILVAN, G. et al. The effect of long-term exposure to combinations of growth promoters in Long Evans rats: part 1: Endocrine adrenal function. **Anal Chim Acta**, v. 586, n. 1-2, p. 246-51, Mar 14 2007.

STERN, N. et al. The role of corticosteroids in the regulation of myocardial NA, K-ATPase in normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Clinical Science**, v. 66, p. 421-426, 1983.

- SUAREZ, Y.; SESSA, W.C. MicroRNAs as novel regulators of angiogenesis. **Circulation Research**, v. 104, p. 442-454, 2009.
- SUN, H.X. et al. Essential role of microRNA-155 in regulating endothelium-dependent vasorelaxation by targeting endothelial nitric oxide synthase. **Hypertension**, v.6, p. 1407-1414, 2012.
- SUZUKI, H. et al. Role of renin-angiotensin system in glucocorticoid hypertension in rats. **Am J Physiol**, v. 243, n. 1, p. E48-51, Jul 1982.
- URBICH, C. et al. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. **Cardiovascular Research**, v. 79, p. 581-588, 2008.
- VOGT, C. J.; SCHMID-SCHONBEIN, G. W. Microvascular endothelial cell death and rarefaction in the glucocorticoid-induced hypertensive rat. **Microcirculation**, v. 8, n. 2, p. 129-39, 2001.
- WANG, D. et al. microRNA-205 controls neonatal expansion of skin stem cells by modulating the PI(3)K pathway. **Nature Cell Biology**, v.15, n.10, p.1153-1163, 2013.
- WANG, H. et al. Impaired angiogenesis in SHR is associated with decreased KDR and MT1-MMP expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 315, p. 363-368, 2004.
- WANG, L. L.; OU, C. C.; CHAN, J. Y. Receptor-independent activation of GABAergic neurotransmission and receptor-dependent nontranscriptional activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt pathway in short-term cardiovascular actions of dexamethasone at the nucleus tractus solitarii of the rat. **Mol Pharmacol**, v. 67, n. 2, p. 489-98, Feb 2005.
- WANG, S. et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. **Developmental Cell**, v. 15, p. 261-271, 2008.
- WATANABE, T. et al. Effect of dexamethasone on plasma free dopamine: dopaminergic modulation in hypertensive patients. **Hypertens Res**, v. 18 Suppl 1, p. S197-8, Jun 1995.
- WEBER, M. et al. Mir-21 is induced in endothelial cells by shear stress and modulates apoptosis and eNOS activity. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 393, n. 3, p. 643-648, 2010.
- WEINSTEIN, S. P. et al. Dexamethasone inhibits insulin-stimulated recruitment of GLUT4 to the cell surface in rat skeletal muscle. **Metabolism**, v. 47, n. 1, p. 3-6, Jan 1998.
- XAVIER-VIDAL, R. Inhibition of nitric oxide synthesis for four days induces vascular abnormalities and myocardial infarct areas but not significant arterial hypertension. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 11, n. 2, p. 132-136, 2012.
- YUE, X. microRNA-295 functions as a tumor suppressor in human glioblastoma cells by targeting VEGF-A. **Oncology Reports**, v. 27, n. 4, p. 1200-1206, 2012

ANEXO 1



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Bauru



DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa intitulado **"A influência do treinamento físico em ratos espontaneamente hipertensos tratados com dexametasona: contribuição dos microRNAs"** (Processo nº 836/2016 Vol. 1), sob responsabilidade da Prof^ª. Dr^ª. Sandra Lia do Amaral, foi aprovado "ad referendum" pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências** da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Câmpus de Bauru.

Bauru, 05 de agosto de 2016.

Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini

*Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Ciências de Bauru - UNESP*

COMISSAO DE ETICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA
Av. Engº Luiz Edmundo Carrijo Coube, 14-01 - Vargem Limpa - Bauru-SP - CEP: 17.033-360
Fone: (14) 3103-6073 - email: dta@fc.unesp.br