UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

LUCAS BARBOSA PORSANI

**O papel do exercício físico na apoptose em modelo de isquemia
cerebral experimental**

Ribeirão Preto
2020

LUCAS BARBOSA PORSANI

**O papel do exercício físico na apoptose em modelo de isquemia
cerebral experimental**

Versão Original

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, programa Clínica Cirúrgica – opção Morfologia e Medicina Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Tirapelli

Ribeirão Preto

2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

de Porsani, Lucas Barbosa

O papel do exercício físico na apoptose em modelo de isquemia cerebral experimental.

89 p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Departamento de Cirurgia e Anatomia.

Orientador: Prof. Dr. Luis Fernando Tirapelli.

1. Isquemia cerebral;
2. Exercício Físico;
3. microRNAs;
4. Apoptose.

FOLHA DE APROVAÇÃO

PORSANI, Lucas Barbosa

O papel do exercício físico na apoptose em modelo de
isquemia cerebral experimental

Dissertação apresentada ao Departamento de Cirurgia e
Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo para obtenção título de
Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica – opção:
Morfologia e Medicina Experimental.

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais, que sempre me apoiaram e incentivaram durante toda a minha e dedico também ao meu grande amor Caroline, que sempre esteve ao meu lado, me incentivando e encorajando em todos os momentos. Amo todos vocês.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pela minha criação, pela índole que me foi passada e por todo amor e carinho que recebo até hoje. Sem dúvida essa base familiar foi essencial na minha formação como pessoa e como profissional.

Agradeço ao meu irmão pelos ensinamentos de caráter e responsabilidade e por sempre me incentivar a conquistar meus objetivos.

Agradeço ao meu grande amor Caroline, por sempre estar comigo nas horas boas e por não deixar eu desistir dos sonhos durante as adversidades. Sou muito grato por todo cuidado com nossa família.

Agradeço ao meu orientador Professor Dr. Luis Fernando Tirapelli, pela grande oportunidade de ser seu orientando e poder aprender e absorver tanto conhecimento.

Agradeço a Professora Dra. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli, pela grande oportunidade de fazer parte de um dos melhores e mais produtivos laboratórios da USP, por todas as possibilidades e oportunidades de crescimento durante o meu processo de formação e por todo carinho e respeito ao longo dessa jornada.

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, por toda ajuda e troca de conhecimentos. Agradeço em especial o Fermino pela ajuda e apoio desde o início.

Agradeço por fim a Deus, pela dádiva da vida e por sempre estar ao meu lado.

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

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

RESUMO

RESUMO

Porsani, LB. O papel do exercício físico na apoptose em modelo de isquemia cerebral experimental. 2020. 54f. Dissertação de mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2020.

Introdução: O acidente vascular cerebral (AVC) é um grande problema de saúde pública, com altas taxas de mortalidade e altos níveis de incapacidade. Entre 1990 e 2010, o AVC aumentou da quinta para a terceira principal causa de incapacidade. Além disso, sua incidência tem aumentado entre pessoas mais jovens, situação em que existem sequelas significativas na saúde e aumento nos custos sociais. Há evidências de que o exercício físico promove efeitos neuroprotetores quando utilizado como tratamento terapêutico em modelo de isquemia experimental. Entretanto, os mecanismos de neuroproteção ainda não estão bem elucidados **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar por PCR em tempo real o perfil de expressão dos microRNAs miR-21, miR-16, miR-155 no sangue e no tecido (foco isquêmico) em ratos, após a realização dos treinamentos físicos pré-isquemia cerebral focal. **Materiais e Métodos:** Foram utilizados 48 ratos da linhagem Wistar divididos em quatro grupos experimentais: grupo controle, grupo isquemia, grupo exercício e grupo exercício + isquemia. A metodologia de PCR em tempo real foi utilizada para analisar a expressão dos miRNAs; miR16, miR-21, miR-155, CASPASE-3 e Bcl-2. **Resultados e conclusões:** Em nosso estudo não observamos diferenças estatísticas significativas na expressão dos miRNAs: miR-16, miR-21, miR-155 e dos genes BCL-2 e CASPASE-3 no tecido cerebral nos grupos submetidos à isquemia cerebral e ao exercício físico quando comparados ao grupo controle.

Palavras chaves: Isquemia cerebral, exercício físico, microRNA, apoptose.

ABSTRACT

ABSTRACT

Porsani, LB. **The role of physical exercise in apoptosis in an experimental cerebral ischemia model.** 2020. 54f. Master's dissertation - Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, 2020.

Introduction: Stroke is a major public health problem, with high mortality rates and high levels of disability. Between 1990 and 2010, for example, stroke increased from the fifth to the third leading cause of disability. In addition, its incidence has increased among younger people, a situation in which there are significant health consequences and an increase in social costs. There is evidence that physical exercise promotes neuroprotective effects when used as a therapeutic treatment in an experimental ischemia model. However, the mechanisms of neuroprotection are still not well understood. **Objective:** The objective of this study was to evaluate by real-time PCR the expression profile of the microRNAs miR-21, miR-16, miR-155 in the blood and tissue (ischemic focus) of the animals after the performance of physical training before focal cerebral ischemia. **Materials and Methods:** 48 Wistar rats were used. The animals were divided into four experimental groups: control group, ischemia group, exercise group and exercise + ischemia group. The real-time PCR methodology was used to analyze the expression of miRNAs; miR16, miR-21, miR-155, CASPASE-3 and Bcl-2. **Results and conclusions:** In our study, we did not observe statistically significant differences in the expression of miRNAs: miR-16, miR-21, miR-155 and in the BCL-2 and CASPASE-3 genes in brain tissue in the groups undergoing cerebral ischemia and exercise when compared to the control group.

Keywords: Cerebral ischemia, physical exercise, microRNA, apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema ilustrando as vias de apoptose: extrínseca (por receptores de morte) e intrínseca (mitocondrial).....	28
Figura 2. Esquema da biogênese do MiRNA.....	30
Figura 3 Animal em decúbito dorsal fixo na prancha de madeira após intubação e conectado ao respirador (R).....	37
Figura 4. O desenho (A) e a fotografia (B) representam, após o afastamento da musculatura cervical superficial, a exposição das artérias carótidas comum esquerda (CCE), carótida interna esquerda (CIE) e carótida externa esquerda (CEE) com alguns dos seus ramos cervicais (*)......	38
Figura 5. Desenho ilustrando a ligadura da porção proximal da ACEE (seta), a clampagem da ACCE (A), ACIE (B) e APPE (C) e a secção proximal da artéria carótida externa esquerda (*)......	39
Figura 6. Fotografia ilustrando a introdução do fio obstrutor (seta) no interior da ACEE em direção à ACCE e ACIE, após retirada do microclipe da ACIE (*) para passagem do fio. Clampagem da ACCE e APPE.....	39
Figura 7. A. Desenho ilustrando a posição final do fio obstruindo a origem da ACME (M) (no detalhe superior direito) e a ligadura da ACEE na região onde foi introduzido o fio obstrutor (seta). Por fim, a reperfusão da ACCE (C) é permitida após a retirada do seu microclipe. Artéria carótida interna esquerda (I); artéria cerebral anterior esquerda (A); artéria pterigopalatina esquerda (P).....	40
Figura 8. Corte interorbital.....	41
Figura 9. Encéfalo isolado.....	42

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Representação da média ($\pm$ desvio padrão) da expressão do microRNA-16 nos grupos estudados.....	60
Gráfico 2.	Representação da média ($\pm$ desvio padrão) da expressão do microRNA-21 nos grupos estudados.....	61
Gráfico 3.	Representação da média ($\pm$ desvio padrão) da expressão do microRNA-155 nos grupos estudados.....	62
Gráfico 4.	Representação da média ($\pm$ desvio padrão) da expressão da Bcl-2 nos grupos estudados.....	63
Gráfico 5.	Representação da média ($\pm$ desvio padrão) da expressão da CASPASE-3 nos grupos estudados.....	63

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	Isquemia cerebral	22
2.2	Exercício físico	23
2.2.1	Exercício e isquemia cerebral	23
2.3	Apoptose	25
2.4	MicroRNAs	29
2.4.1	microRNAs e Exercício Físico	30
3	OBJETIVO.....	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1	Grupos experimentais	35
4.2	Protocolo de exercício físico.....	35
4.3	Indução da isquemia cerebral.....	36
4.4	Procedimentos para a retirada do encéfalo	41
4.5	Análise da expressão dos microRNAs	42
4.6	Análise estatística.....	44
5	RESULTADOS	46
5.1	Análise da expressão do miRNA-16.....	46
5.2	Análise da expressão do miRNA-21	47
5.3	Análise da expressão do miRNA-155.....	48
5.4	Análise da expressão da BCL-2	49
5.5	Análise da expressão da CASPASE-3	50
6	DISCUSSÃO	52
7	CONCLUSÃO.....	57
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O acidente vascular cerebral (AVC) é um grande problema de saúde pública, com altas taxas de mortalidade e altos níveis de incapacidade. Entre 1990 e 2010, o AVC aumentou da quinta para a terceira principal causa de incapacidade. Além disso, sua incidência tem aumentado entre pessoas mais jovens, situação em que existem sequelas significativas na saúde e aumento nos custos sociais (LAPPIN, 2017).

Os tratamentos terapêuticos que objetivam a reabilitação do AVC isquêmico continuam limitados e, além disto, a perfusão de sangue que acontece posteriormente à isquemia, pode estimular eventos oxidativos e inflamatórios, ocasionando a lesão de isquemia/reperfusão no cérebro (JOUFFROY; VIVIEN, 2017).

Há evidências que o exercício físico promove efeitos neuroprotetores quando utilizado como tratamento terapêutico em modelo de isquemia experimental. Entretanto, os mecanismos de neuroproteção ainda não estão bem elucidados (SHAMSAEI et al., 2015).

Atualmente, algumas abordagens terapêuticas utilizando-se atividade física estão sendo estudadas na reabilitação em modelos de isquemia cerebral experimental. A prática de exercícios físicos regulares possui uma grande proporção na melhora da qualidade de vida e tem sido utilizada como mecanismo de neuroproteção. A integração de vários impulsos neuronais cerebrais permite alterações plásticas que beneficiam as estruturas encefálicas comprometidas devido à lesão (GARBUZOVA-DAVIS et al., 2013).

A intensidade do exercício físico também influencia as alterações neuronais. O exercício físico de intensidade moderada diminui a apoptose celular, aumenta a presença de fatores neurotróficos, promove a biogênese mitocondrial e a angiogênese (CHAE; KIM, 2009; CHUNG et al., 2013)

Nas situações em que o exercício físico antecede à isquemia cerebral; situação deste presente estudo; o mesmo promove neuroproteção cerebral em ratos e, entre os mecanismos envolvidos, podemos destacar diminuição da reação inflamatória, diminuição do edema cerebral, aumento da síntese do fator neurotrófico derivado do cérebro e do fator de crescimento neuronal (DAMÁZIO et al., 2015).

Segundo Dornbos et al. (2013), o maior benefício do exercício pré-isquêmico é a otimização da capacidade de manutenção do suprimento de energia.

Na tentativa de descrever os efeitos do exercício físico no organismo, alguns biomarcadores estão sendo investigados tais como genes associados a vários mecanismos moleculares, tais como diferenciação, proliferação e a apoptose, assim como os microRNAs que regulam esses mecanismos (HUI et al., 2011).

Jeyaseelan et al. (2008) apresentaram dados sobre os miRNAs expressos em ratos submetidos à oclusão da artéria cerebral média. Estes animais foram reperfundidos por 24 ou 48 horas e as amostras de sangue e tecido cerebral foram colhidas. O perfil de expressão de miRNA foi descrito pela primeira vez e existem evidências de que alguns miRNAs altamente expressos no tecido cerebral isquêmico podem ser detectados em amostras de sangue.

A expressão de miR-15b e miR-16 reduziu o nível de proteína Bcl-2 sugerindo que o Bcl2 é um alvo direto destes microRNAs. Além disso, a superexpressão de miR-15b ou miR-16 pode sensibilizar uma linha celular de câncer gástrico à apoptose (XIA et al., 2008).

O miR-21 tem um importante papel na redução da morte celular causada pela isquemia cerebral (BULLER et al., 2010). Esse miR tem sua eficácia aumentada através da inibição da expressão de vários genes que tem um efeito apoptótico comum, como CASPASE 3 e sua depleção pode ocasionar uma diminuição da proliferação celular e aumento da apoptose (SAUGSTAD, 2010).

Volumes significativos de infarto cerebral e apoptose celular foram induzidos pelo aumento da expressão de miR-155. Os inibidores do miR-155 exibiram efeitos protetores no acidente vascular cerebral isquêmico, incluindo a regulação negativa do tamanho do infarto nos tecidos cerebrais in vivo e apoptose reduzida das células (XING et al., 2016).

O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de expressão dos microRNAs miR-21, miR-16, miR-155 no tecido (foco isquêmico) dos animais após a realização dos treinamentos físicos pré-isquemia cerebral focal por PCR em tempo real.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Isquemia cerebral

A isquemia é caracterizada pela interrupção do fluxo sanguíneo cerebral, obstruindo assim o suprimento de oxigênio e glicose. Essa obstrução pode ser causada por um trombo ou até mesmo por um êmbolo. O sistema nervoso central possui uma atividade metabólica elevada, portanto, necessita de um alta demanda de glicose e oxigênio. Assim, a redução severa ou completa do fluxo sanguíneo decorrente da isquemia, acaba por promover deficiências funcionais e bioquímicas instantâneas nos neurônios (HOSSMANN, 1998). De acordo com a extensão da lesão isquêmica pode-se dividir a isquemia em focal ou global. A focal é caracterizada por uma lesão que acomete uma área limitada do cérebro, como nos casos de trombose ou embolia de uma artéria cerebral. Por outro lado, na isquemia global todo o cérebro é acometido, por exemplo, nos casos de assistolias e na hipotensão arterial prolongada (NAKANO; COLLI; ROSELINO, 2002).

Segundo Shamsaei et al. (2015), a lesão tecidual de um órgão através da isquemia é compreendida no instante da sua reoxigenação no decorrer da reperfusão, que pode ser um processo ainda mais prejudicial do que a própria isquemia. A lesão tecidual é denominada lesão de reperfusão ou lesão isquêmica (I/R). No decorrer da reperfusão, a reparação do fluxo sanguíneo é constantemente relacionada a um agravamento da lesão tecidual e a uma intensa resposta inflamatória. O dano da reperfusão é especialmente observado juntamente ao crescimento de espécies reativas de oxigênio (ROS), lesões do endotélio vascular, aumento da permeabilidade vascular e ativação de plaquetas, neutrófilos e citocinas. Consequentemente após o AVC, ocorre edema cerebral, uma das causas mais relevantes e responsáveis pela morte neuronal, assim como pelo desenvolvimento das lesões cerebrais. Entretanto, é relevante que se tomem medidas práticas não somente para impedir o desenvolvimento de lesões e edema cerebral, mas também para contenção dos prejuízos neurológicos subsequentes. Neste contexto, estudos recentes investigam o papel da prática de atividades física associadas a doenças cerebrovasculares (SHAMSAEI et al., 2015).

2.2 Exercício físico

Exercício físico é definido como qualquer atividade realizada de forma sistemática, composta por repetições e movimentos orientados e com consequente aumento no consumo de oxigênio devido à solicitação muscular. O exercício físico provoca uma série de respostas fisiológicas nos sistemas corporais e, em especial, no sistema cardiovascular, com o objetivo de manter o equilíbrio celular em face ao aumento das demandas metabólicas e do consumo de energia (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Sabe-se que o exercício físico aeróbio de moderada intensidade, quando realizado continuamente, promove efeitos benéficos tanto na prevenção quanto no tratamento das doenças cardiovasculares, e sua prática regular tem sido recomendada por diferentes associações de saúde do mundo. Seus benefícios também têm sido demonstrados na prevenção e no tratamento da hipertensão arterial, diabetes mellitus, dislipidemia, obesidade e osteoporose. Sendo assim, o baixo nível de atividade física ou de condicionamento físico são considerados fatores de risco para o desenvolvimento dessas doenças (GOMES CIOLAC et al., 2004).

2.2.1 Exercício e isquemia cerebral

Atualmente, algumas abordagens terapêuticas utilizando-se atividade física estão sendo estudadas na reabilitação em modelos de isquemia cerebral experimental. A prática de exercícios físicos regulares possui uma grande proporção na melhora da qualidade de vida e tem sido utilizada como mecanismo de neuroproteção. A integração de vários impulsos neuronais cerebrais permite alterações plásticas que beneficiam as estruturas encefálicas comprometidas devido à lesão (GARBUZOVA-DAVIS et al., 2013).

Os roedores são os principais animais utilizados em protocolos de exercício físico relacionados aos estudos das funções cerebrais e seus mecanismos nas pesquisas experimentais. Entre os principais modelos de atividade física, destacam-se os exercícios de atividades voluntárias, tais como atividades em rodas de correr e exercícios forçados como natação e esteira, obtendo um estímulo para respostas a

um treinamento com predominância do metabolismo aeróbico (AGUIAR; PINHO; DE REVISÃO, 2007).

A intensidade do exercício físico também influencia as alterações neuronais. O exercício físico de intensidade moderada diminui a apoptose celular, aumenta a presença de fatores neurotróficos, promove a biogênese mitocondrial e a angiogênese (CHAE; KIM, 2009; CHUNG et al., 2013).

Nas situações em que o exercício físico antecede à isquemia cerebral o mesmo promove neuroproteção cerebral em ratos e, entre os mecanismos envolvidos, podemos destacar diminuição da reação inflamatória, diminuição do edema cerebral, aumento da síntese do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF- brain-derived neurotrophic factor) e do fator de crescimento neuronal (NGF- nerve growth factor) (DAMÁZIO et al., 2015). Segundo Aboutaleb et al. (2015) existem efeitos protetores do exercício físico sobre danos cerebrais provocados pela isquemia e reperfusão, mas estes efeitos não estão bem elucidados. Estes autores também destacam o papel do pré-condicionamento através de exercício físico como neuroprotetor nas lesões induzidas pela isquemia cerebral.

O maior benefício do exercício pré-isquêmico é a otimização da capacidade de manutenção do suprimento de energia, além de diversos outros mecanismos que permitem a contenção nos danos causados no tecido nervoso pela isquemia. Em estudo com modelo animal, enzimas relacionadas ao metabolismo cerebral tais como GLUT1, GLUT3, PFK, AMPK e HIF-1 α estavam aumentadas após três semanas do treinamento físico em ratos permitindo afirmar que o pré-condicionamento aumentou as taxas de metabolismo da glicose e, conseqüentemente um aumento mais rápido e substancial da produção de ATP após o AVC (DORNBOS et al., 2013).

Nas situações em que o exercício acontece após o evento isquêmico, trata-se de um método de reabilitação. Segundo Arya et al. (2011), a recuperação do AVC baseia-se na evidência de neuroplasticidade. As mudanças neuroplásticas na estrutura e função das áreas cerebrais relevantes são induzidas principalmente por métodos específicos de reabilitação que induzem mudanças neuroplásticas promovem maior recuperação funcional e motora além de possuírem efeito de natureza permanente. Durante a última década, novos métodos de reabilitação para pacientes que sofreram AVC foram desenvolvidos. Estes métodos evidenciam a capacidade de reorganização ao nível cortical. Porém, além do estudo e desenvolvimento de técnicas para o tratamento e a reabilitação após o evento, tão ou

mais importante, é o estudo e desenvolvimento de métodos que permitam a prevenção do AVC e/ou a neuroproteção para que os danos sejam contidos (DORNBOS et al., 2013).

Na tentativa de descrever os efeitos do exercício físico no organismo, alguns biomarcadores estão sendo investigados tais como genes associados a vários mecanismos moleculares, entre eles a apoptose, assim como os microRNAs que regulam esses mecanismos.

2.3 Apoptose

Em modelos animais de isquemia, a perda neuronal nas primeiras 24 horas é predominantemente considerada necrótica e, aquelas que ocorrem depois deste período, são apoptóticas. Trabalhos demonstraram que as células da zona de penumbra, se não sofreram intervenção terapêutica nas primeiras horas pós-isquemia, morrem pelo mecanismo de apoptose (GUEGAN et al., 1998; METHA; MANHAS; RAGHUBIR, 2006). Após isquemia, a morte neuronal apresenta característica histológica e bioquímica de apoptose (SIEGELIN et al., 2005).

O termo apoptose foi sugerido por Kerr, Whillie e Currie (1972) e significa perda das folhas no outono, sugerindo morte celular programada. Portanto, apoptose é definida como um processo fisiológico ativo e geneticamente controlado para o suicídio celular. É importante para remover o excesso de células durante o desenvolvimento de vários tecidos e também promover a morte de células que sofrem danos irreparáveis (SIEGELIN et al., 2005).

Após a isquemia cerebral, a apoptose é ativada por vários eventos tais como produção de radicais livres e fator de necrose tumoral, deficiência do fator de crescimento e neutrofinas e dano ao DNA entre outros (CHAN, 2001; MACMANUS; LINNIK, 1997).

As caspases (cisteino-proteinase-aspártico-ase) constituem uma família de 14 proteínas homólogas identificadas e caracterizadas em mamíferos com atividade enzimática. Onze destas proteínas estão presentes nos humanos e são divididas em duas classes: iniciadoras e efetoras. As caspases iniciadoras (CASPASE -2, -8, -9, -10, e -12) são responsáveis pela iniciação da cascata apoptótica. As caspases efetoras (CASPASE-3, -6 e -7) estão verdadeiramente envolvidas na degradação celular através do processo apoptótico (MEHTA; MANHAS; RAGHUBIR, 2006).

A CASPASE 3 é considerada uma das executoras essenciais no processo apoptótico, sendo ativada por uma série de outras caspases (HARRISON et al., 2001). O aumento da expressão neuronal da CASPASE 3 foi observado na isquemia focal transitória (NI et al., 1998) e permanente. Além disso, foi observado o aumento da atividade de CASPASE 3 em estudos após isquemia focal transitória (CHEN et al., 1986; GILLARDON et al., 1997; NAMURA et al., 1998).

Vários estudos sugerem a importância das caspases na morte celular consequente da isquemia e, além disso, que estas proteínas estariam sob rigoroso controle transcricional (HARRISON et al, 2001).

Assim como as caspases, a família de proteínas célula B de linfoma 2 (BCL-2) é um componente necessário e essencial na regulação da morte celular por apoptose. As proteínas desta família podem ser indutoras de apoptose: proteína x associada à BCL-2 (BAX), assassino/antagonista de BCL-2 (BAK); ou podem inibir a apoptose: BCL-2 e forma longa de BCLX (BCL-XL). Portanto, as primeiras agem como moduladores da atividade de caspases e, as outras inibem o processo de apoptose impedindo a liberação do CITOCROMO C (carreador de elétron na cadeia respiratória celular) pelas mitocôndrias (SOBRADO et al., 2003; MEHTA; MANHAS; RAGHUBIR, 2006). A BCL-2 é anti-apoptótica e está localizada na membrana mitocondrial externa. Sua atividade é a inibição da liberação do CITOCROMO C da mitocôndria ou ainda age impedindo que o fator 1 ativador de protease apoptótica (APAF-1) ative a prócaspase-9 formando o apoptossoma na via intrínseca de morte celular, que será descrita a seguir (GOTTLIEB, 2000).

A função pró-apoptótica de BAX e das caspases, juntamente com o papel anti-apoptótico de BCL-2 e BCLX foi sugerido pelos estudos do processo apoptótico no cerebelo em diversos trabalhos experimentais (WULLNER et al., 1998; SELIMI et al., 2000; SELIMI; VOGEL; MARIANI, 2000; CHRYSIS et al., 2001; CONTESTABILE, 2002), incluindo o estudo de Heaton et al. (1999) que avaliaram em especial atenção, as células de purkinje de camundongos transgênicos com hiperexpressão de BCL-2, assim como a função protetora neuronal de BCL-2 em relação à neurotoxicidade ao etanol, durante o desenvolvimento do sistema nervoso central nestes animais.

Conhecidas como inibidoras endógenas de caspases, as proteínas inibidoras da apoptose (IAPs), suprimem de forma efetiva o programa de morte celular. Dentre as IAPs descritas na espécie humana, destaca-se a proteína inibidora de apoptose

ligada ao x (XIAP), que age inibindo diretamente a atividade das CASPASES 9, 3 e 7 (BARCINSKI, 2004; HUANG et al., 2001; SHI, 2002).

A XIAP é um potente inibidor da caspase, com efeitos diferentes da BCL-2. Ela tem ação em um ponto distal da via de morte e sua atividade tem sido mostrada ser fundamental na degeneração neuronal após isquemia e outras lesões (CLEM; DUCKETT, 1997). Xu et al. (2006) descreveram, de acordo com a função da XIAP como um inibidor de caspases, correlação negativa entre os níveis de expressão gênica de XIAP e a ativação de CASPASE 3, no foco isquêmico (striatum) e zona limítrofe (córtex dorsolateral e hipocampo) após isquemia por oclusão da artéria cerebral média (ACM) em ratos, durante 50 minutos e períodos de reperfusão entre 30 minutos e 14 dias.

Existem duas vias dependentes de caspases para a ocorrência da apoptose: a extrínseca ou dos receptores de morte celular e a via mitocondrial ou intrínseca (Figura 1).

Na via extrínseca, a ativação das caspases ocorre com a ligação de substâncias específicas nos receptores de membrana da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF) (R-TNF). Pertencente à família dos R-TNF estão o receptor 1 do fator de necrose tumoral (R-TNF-1) e o CD-95 (conhecido como receptor FAS). Os receptores da família R-TNF são denominados “receptores de morte celular”, pois quando são recrutados, fazem a transdução de sinais para a indução da apoptose (TIRAPELLI, 2011).

Figura 1. Esquema ilustrando as vias da apoptose: extrínseca (por receptores de morte) e intrínseca (mitocondrial) (TIRAPELLI, 2007, COM PERMISSÃO).

A via intrínseca da apoptose é desencadeada por estresse celular que vai desde a falta de fatores tróficos até agentes lesivos ao DNA induzindo aumento da permeabilidade mitocondrial e consequente liberação de substâncias pró-apoptóticas (FERREIRA; ROCHA, 2004). Na via intrínseca ou mitocondrial, a mitocôndria possui uma função essencial na regulação da apoptose pois funciona como um reservatório para proteínas apoptogênicas tais como CITOCROMO C e PRÓ-CASPASES -2, -3, -8 e -9. A mitocôndria é a organela responsável pela geração da energia consumida pela célula. O CITOCROMO C está no interior da mitocôndria participando do processo de fosforilação oxidativa como molécula carreadora de elétrons. Eventualmente, o CITOCROMO C é liberado para o citoplasma onde participa ativamente do processo de apoptose (NICHOLSON; THORNBERRY, 2003).

Quando o CITOCROMO C chega ao citoplasma celular liga-se a uma molécula denominada APAF-1 que, por sua vez, liga-se a prócaspase-9 formando um agregado multimolecular denominado apoptossoma que na presença de ADP ou ATP vai ativar as caspases efetoras e resultando em processos que culminam na morte celular (FERREIRA; ROCHA, 2004).

Estudos recentes demonstram que os miRNAs regulam o mecanismo de apoptose.

2.4 MicroRNAs

Alguns estudos têm demonstrado associação do perfil de expressão dos microRNAs (miRNAs) com o exercício físico, sendo que o tipo de exercício e diferentes intensidades alteram a expressão dos microRNAs.

Os microRNAs são pequenas moléculas de RNA fita simples de 19-25 nucleotídeos que possuem atividade reguladora (RICARTE FILHO; KIMURA, 2006). O gene Lin-4 foi descoberto em 1993 como o primeiro miRNA, onde foi associado à regulação do desenvolvimento larval em *Caenorhabditis elegans*. Esse achado foi ignorado pela comunidade científica por alguns anos, até que foram encontrados evidências de miRNAs em diversos organismos, inclusive em seres humanos (CRUZ, 2010; GARZON et al., 2006; LU et al., 2005).

Estes pequenos RNAs apresentam um papel importante na regulação gênica, diferenciação celular, metabolismo, proliferação celular e apoptose. Apresentam função primordial na regulação de inúmeras vias celulares, e acredita-se que 50% derivam de regiões de íntrons de genes codificadores de proteínas ou então de RNAs não-codificantes (ASIAF et al., 2018; CRUZ, 2010; GARZON et al., 2006).

Vários miRNAs podem se ligar a um RNAm específico, e um único miRNA pode se ligar a vários RNAs mensageiros. Estudos demonstraram que a maioria dos miRNAs podem regular aproximadamente 200 RNAm (CRUZ, 2010). A biogênese dos microRNAs (Figura 2) se inicia com a transcrição de seu gene pela RNAPolimerase II, gerando um transcrito de miRNA primário (pri-miRNA). O pri-miRNA apresenta uma estrutura hairpin que é clivada, ainda no núcleo pela RNase III (Drosha), gerando uma molécula precursora do miRNA maduro denominada pré-miRNA, com cerca de 70 nucleotídeos (PORKKA et al., 2007). Em seguida, o pré-miRNA é transportado ao citoplasma pela exportina-5 (Exp5). No citoplasma, o pré-miRNA é processado pela RNase III (Dicer), gerando um miRNA fita simples de aproximadamente 22 nucleotídeos, cujo produto é incorporado a um complexo multimérico denominado RISC (RNA-inducedsilencecomplex), que inclui proteínas argonautas como principais componentes. Apenas uma das fitas de miRNA permanece no complexo RISC para controlar a expressão pós-transcricional de genes-alvo. Quando uma ligação perfeita

entre um miRNA e seu alvo mRNA ocorre, o RISC induz a degradação do mRNA. Quando uma ligação imperfeita ocorre, a produção da proteína final é bloqueada (RICARTE FILHO; KIMURA, 2006). Atualmente, 2.588 miRNAs foram identificados no genoma humano. Eles são expressos aparentemente em todos os tipos de células e mais de 60% dos genes codificadores de proteínas são alvos conservados destas pequenas moléculas (SAPP et al., 2016).

Figura 1 - ESQUEMA DA BIOGÊNESE DO MICRORNA (RICARTE FILHO; KIMURA, 2006).

2.4.1 microRNAs e Exercício Físico

Evidências científicas indicam a possibilidade de os efeitos do exercício serem mantidos inclusive nas futuras gerações. Esta ação seria explicada através da regulação epigenética da expressão gênica promovendo uma "memória epigenética" para influenciar a função e o comportamento do cérebro a longo prazo. Os mecanismos epigenéticos envolvidos seriam: a metilação de DNA, modificações de histonas e a regulação dos microRNAs (miRNAs) (FERNANDES et al., 2017).

Os microRNAs (miRNAs) são utilizados como biomarcadores para diagnóstico e prognóstico de várias doenças (HUI et al., 2011). Os miRNAs atuam na regulação da expressão de genes que estão envolvidos em diversos processos celulares tais como diferenciação, proliferação e apoptose (CROCE; CALIN, 2005).

Alguns estudos sugerem que o aumento da expressão dos miR-15b e miR-16 promovem a inibição da expressão do BCL 2, e consequente aumento da apoptose. É necessário o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para diminuir a expressão dos miR-15b e miR-16 e conseqüentemente a diminuição da apoptose nos casos de isquemia cerebral, onde estes microRNAs devem ser aumentados levando assim à morte por diminuição da expressão de BCL 2, por exemplo (XIA et al., 2008).

Alguns miRNAs que são altamente expressos no tecido isquêmico podem também ser detectados no sangue. Foi identificada a expressão de 114 miRNAs em amostras de tecido cerebral isquêmico e, 26 destes estavam também presentes no sangue. Alguns dos miRNAs identificados no tecido cerebral foram detectados em 24h e 48 h de reperfusão, respectivamente; demonstrando que a expressão dos miRNAs altera conforme o tempo de reperfusão, que pode ser mais grave do que a lesão isquêmica por si só. Foi também identificada a presença dos miR-15b, miR-16 e miR-21 no tecido isquêmico. O miR-16 além de estar presente no tecido isquêmico também teve expressão no sangue (JEYASEELAN et al., 2008).

O miR-21 tem um importante papel na redução da morte celular causada pela isquemia cerebral (BULLER et al., 2010). O miR-21 tem sua eficácia aumentada através da inibição da expressão de vários genes que tem um efeito apoptótico comum, como CASPASE 3 e sua depleção pode ocasionar uma diminuição da proliferação celular e aumento da apoptose (SAUGSTAD, 2010).

A utilização de miRNAs como biomarcadores é cada vez mais foco de estudos nos últimos anos devido sua função na regulação de uma grande variedade de alvos, tornando estes pequenos RNAs uma possibilidade na detecção precoce de doenças, que pode ser explorada na avaliação de riscos, prognóstico e desenvolvimento de novos alvos terapêuticos (DE SMAELE et al., 2010). A utilização dos microRNAs como biomarcadores é também encorajada pelo fato de que os mesmos podem ser detectados não só a partir de tecidos frescos ou congelados, mas também a partir vários fluidos corporais, tais como líquidos cefalorraquidianos e sangue (DOGINI et al., 2013).

OBJETIVO

3 OBJETIVO

A partir de um modelo experimental em ratos submetidos à isquemia cerebral por oclusão da ACM durante 60 minutos, seguida por reperfusão de 24 horas e após a realização dos treinamentos físicos pré-isquemia focal, o objetivo do trabalho foi avaliar o perfil de expressão dos microRNAs miR-16, miR-21 e miR-155 e de CASPASE-3 e BCL-2 no tecido (foco isquêmico) dos animais por PCR em tempo real.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais:

Grupo Controle (C): constituído por 12 animais que foram anestesiados e suas variáveis biológicas estabilizadas. Nesses animais a eutanásia foi realizada sem a realização do procedimento cirúrgico.

Grupo isquemia (I): constituído por 12 animais submetidos à isquemia focal por oclusão da ACM durante 60 minutos, seguido por reperfusão de 24 horas. Em seguida a eutanásia foi realizada.

Grupo exercício (E): constituído por 12 animais submetidos a um programa de exercício físico em esteira durante quatro semanas. A eutanásia foi realizada após o término do programa de exercício físico sem a realização do procedimento cirúrgico.

Grupo exercício + isquemia (EI): constituído por 12 animais submetidos a um programa de exercício físico em esteira durante quatro semanas e que ao término do programa foram submetidos à isquemia focal por oclusão da ACM durante 60 minutos, seguido por reperfusão de 24 horas. Em seguida a eutanásia foi realizada.

4.2 Protocolo de exercício físico

Do total de animais utilizados nesse trabalho, somente dois grupos foram submetidos aos treinos antes do procedimento cirúrgico.

Antes do início do protocolo de treinamento os animais passaram por um período de aclimação por cinco dias com velocidades (5 a 18m/min) e durações (5 a 15 min) progressivo. O objetivo do período de adaptação foi reduzir os níveis de estresse apresentados durante a manipulação e a utilização da esteira (MANCHADO et al., 2006).

O protocolo foi composto por um período total de quatro semanas. O aquecimento consistiu em 2 min a velocidade de 5 m/min e esta foi gradativamente aumentada até atingir a velocidade de 18 m/min em que os animais permaneceram por 30 minutos sempre com 0° de inclinação (STRADECKI-COHAN, 2017).

Caso o animal demonstrasse quaisquer sinais de cansaço ou inadaptação ao uso da esteira, o exercício seria interrompido.

Durante os treinos não foram utilizados choques elétricos nos animais, somente leves toques com as mãos para estimulá-los. Caso a situação persistisse, este animal seria retirado da esteira para que pudesse descansar e se recuperar. O treino só recomeçou quando o animal estava completamente recuperado.

O sacrifício dos animais ocorreu ao final dos procedimentos experimentais, 36h após a última sessão de treinamento ou após o mesmo período para os grupos sedentários.

4.3 Indução da isquemia cerebral

Todos os procedimentos gerais básicos foram realizados no Laboratório de Neurocirurgia Experimental do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP-USP, seguindo-se o trabalho de Carlotti Jr; Colli e Kasuo (2001).

Os animais foram alocados nos respectivos grupos aleatoriamente, após sorteio realizado antes do procedimento cirúrgico. Inicialmente, cada animal foi pesado e submetido à anestesia geral por inalação de halotano, sob uma campânula de vidro. Assim que a movimentação espontânea cessava, os animais eram transferidos para uma prancha de madeira, e a partir da posição em decúbito dorsal eram entubados após tração digital da língua com uma cânula orotraqueal.

A extremidade da cânula foi conectada a um respirador desenvolvido para animais de pequeno porte (CR-BION – Ribeirão Preto, Brasil), com manutenção da pressão endotraqueal entre 8 a 10 mmHg, iniciando-se a vaporização contínua com halotano (Figura 3).

Figura 3 Animal em decúbito dorsal fixo na prancha de madeira após intubação e conectado ao respirador (R) (TIRAPELLI, 2007, COM PERMISSÃO).

A artéria ventral da cauda foi dissecada e canulada com cateter calibre PE 10, que conectado na outra extremidade a um cateter peridural, eram conectados a um transdutor de pressão, para registro contínuo da pressão arterial média e da frequência cardíaca (biomonitor modelo 78339A – Hewlett Packard Company, USA) e para coleta de amostras sanguíneas.

Após quinze minutos de ventilação mecânica, foi colhida uma amostra de sangue arterial para a realização de gasometria (gasômetro portátil modelo I-STAT portable clinical analyse - ABBOTT Laboratories Inc.) com utilização de cartucho I-STAT cartridge cg8+), para dosagens da $paCO_2$, da paO_2 e do pH e dosagem de glicemia, hemoglobina e hematócrito.

Após a estabilização do animal, o procedimento cirúrgico para indução da isquemia foi iniciado.

O procedimento cirúrgico para oclusão da ACM tinha início com a tricotomia da região cervical anterior, incisão mediana da pele, tela subcutânea e do músculo platisma, seguida pelo tracionamento digital lateral até a exposição dos músculos cervicais e da bainha carótica. Em seguida, a dissecação prosseguia superiormente até

a bifurcação da artéria carótida comum com a identificação da artéria carótida interna esquerda (ACIE) e da artéria carótida externa esquerda (ACEE) (Figura 4).

Figura 4. O desenho (A) e a fotografia (B) representam, após o afastamento da musculatura cervical superficial, a exposição das artérias carótidas comum esquerda (CCE), carótida interna esquerda (CIE) e carótida externa esquerda (CEE) com alguns dos seus ramos cervicais (*) (TIRAPELLI, 2007, COM PERMISSÃO).

A ACE foi dissecada no sentido cranial e seus ramos coagulados e seccionados. A ACI também foi dissecada incluindo a origem da artéria pterigopalatina e sua continuação cranial.

A ACE foi ligada o mais cranial possível com fio de algodão (4.0 – Ethicon), para a introdução retrógrada do fio obstrutor de mononylon 4-0 (2,5 cm de comprimento) com extremidade engrossada com mistura de silicone na extensão de 5mm (por KOIOSUMY et al. (1986); modificada por CARLOTTI JR; COLLI; KAZUO, 2001). Foram colocados microclipes temporários junto à emergência da APP, para impedir a migração do fio obstrutor para o interior da sua luz; na ACC, para interromper o seu fluxo e, na continuação cranial da ACI, para evitar o refluxo de sangue (Figura 5).

Figura 5. Desenho ilustrando a ligadura da porção proximal da ACEE (seta), a clampagem da ACCE (A), ACIE (B) e APPE (C) e a secção proximal da artéria carótida externa esquerda (*) (TIRAPELLI, 2007, COM PERMISSÃO).

A ACE foi seccionada e a partir do seu coto proximal, foi introduzido o fio obstrutor retrogradamente até a ACC e depois cranialmente pela ACI, após a retirada do microclipe que ocluía este vaso, até sentir resistência na sua progressão. Os microclipes da ACC e da APP permaneceram no local (Figura 6).

Figura 6. Fotografia ilustrando a introdução do fio obstrutor (seta) no interior da ACEE em direção à ACCE e ACIE, após retirada do microclipe da ACIE (*) para passagem do fio. Clampagem da ACCE e APPE (TIRAPELLI, 2007, COM PERMISSÃO).

Em seguida, foi medida a distância da bifurcação da ACC até o coto proximal do fio obstrutor, com valor aceitável entre 0.5-0.7 cm, sendo, portanto, a medida do segmento do fio entre a bifurcação da ACC e a sua extremidade distal de 18 a 20 mm. Isto indicava que o fio penetrou o suficiente para ocluir o óstio de origem da ACM (Figura 21).

O coto da ACE foi ligado com fio 10-0 para evitar refluxo de sangue e o microclipe da ACCE foi retirado, permitindo sua reperfusão (Figura 7).

Figura 7. A. Desenho ilustrando a posição final do fio obstruindo a origem da ACME (M) (no detalhe superior direito) e a ligadura da ACEE na região onde foi introduzido o fio obstrutor (seta). Por fim, a reperfusão da ACCE (C) é permitida após a retirada do seu microclipe. Artéria carótida interna esquerda (I); artéria cerebral anterior esquerda (A); artéria pterigopalatina esquerda (P) (TIRAPELLI, 2007, COM PERMISSÃO).

Os animais foram mantidos em condições estáveis durante o período de isquemia. Depois de decorrido o período de 60 minutos de isquemia focal, procedia-se a retirada do fio obstrutor, recolocando o clampe temporário na ACC e ACI para evitar o fluxo de sangue na primeira e o refluxo na segunda. Ligava-se definitivamente o coto proximal da ACE (fio de algodão 4.0 – Ethicon) e retiravam-se os clampes

temporários. Em seguida a pele e a tela subcutânea eram fechadas com fio mononylon 3-0.

Após a reperfusão, a estabilidade dos parâmetros vitais era observada e, em seguida, era feita a sutura contínua da pele com fio mononylon 5-0. Uma vez estável o animal, o anestésico inalatório era suspenso, permitindo sua recuperação e, após a retomada da respiração espontânea, a cânula orotraqueal era retirada e o animal era recolocado à sua gaiola plástica, com oferta livre de água e ração.

4.4 Procedimentos para a retirada do encéfalo

Após o período de 24 horas de reperfusão, o animal foi anestesiado através da inalação de halotano (foi colocado dentro de um pote com tampa) em seguida, posicionado em decúbito dorsal em uma prancha de madeira.

Posteriormente a eutanásia por inalação excessiva de halotano, foi realizado um corte transversal na região nugal para a separação da cabeça e da coluna cervical. Depois, foi realizado um corte interorbital (Figura 8) seguido de um corte sagital occipito-frontal permitindo o afastamento lateral dos ossos por tração digital com auxílio de pinças hemostáticas.

Figura 8. Corte interorbital. (TIRAPELLI, 2007, COM PERMISSÃO).

O encéfalo foi exposto e após sua remoção em bloco e submetidos à irrigação contínua com soro fisiológico à 0°C em uma placa de Petri (Figura 9).

Figura 9. Encéfalo isolado (TIRAPELLI, 2007, COM PERMISSÃO).

As amostras para extração do RNA foram colocadas em criotubos para congelamento em nitrogênio líquido à – 196°C.

4.5 Análise da expressão dos microRNAs

Para a análise da expressão gênica, foi obtido de cada animal um fragmento (retirado com um punch) e 1ml de sangue. As amostras de sangue foram coletadas em tubo com EDTA e centrifugadas 10' por 2500 rpm e o “buffy coat” foi transferido para um tubo de 15ml. A seguir, foi lavado com tampão para lise de glóbulos vermelhos e mantido por 15' em gelo. Na sequência, seguiu-se mais uma centrifugação e mais uma lavagem com tampão lise de glóbulos vermelhos. Para a obtenção do pellet, a amostra foi centrifugada por 10' a 2500 rpm. Adicionou-se 250µl de PBS (phosphate-buffered saline) e 750µl de Trizol (Invitrogen, EUA) para congelamento a -80 °C. Para verificação da integridade do RNA obtido, cada amostra foi ao final da etapa descrita acima, submetida à eletroforese em gel de agarose a 1% para RNA.

Para a síntese do cDNA (DNA complementar) do miRNA, a transcrição reversa foi realizada utilizando o kit comercial High Capacity cDNA Reverse

Transcription (Applied Biosystems). Para cada 5ng de RNA, foi adicionado 0,75µl de RT Buffer; seguido de 0,075µl de dNTP's; 1,5µl de Primers específicos (miRNA ou controle endógeno) e 0,5µl da enzima MultiScribe™, 0,094µl de RNase out (1.9U), completando com água DEPC o volume final de 7,5µl. As amostras foram incubadas no termociclador por 30 min a 16°C, 30 min a 42°C, 5 min a 85°C e, em seguida, realizada a 4°C. Para o PCR em tempo real, foi utilizado 4,5µL do cDNA das amostras diluído 1:4 em um volume final de reação de 10µL.

O método de PCR em tempo real foi utilizado para a expressão diferencial dos microRNAs. A partir do cDNA obtido das amostras, foi realizada a amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) quantitativo em tempo real (RQ-PCR), com a utilização do reagente TaqMan Master Mix (Applied Biosystems).

Foi utilizado o sistema disponível comercialmente TaqMan Assay-on-demand, composto por oligonucleotídeos e sondas (Applied Biosystems) para a análise quantitativa da expressão dos microRNAs. Considerando-se as diferenças causadas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, os valores de CT determinados para as diferentes amostras, são normatizados. O CT determinado para uma amostra (para um determinado gene) é subtraído do CT determinado para um gene house-keeping (neste caso o U6) para o miRNA na mesma amostra, originando o chamado ΔCT . Os valores de ΔCT podem, para um mesmo gene, ser comparados de maneira diferente, obtendo-se uma quantificação relativa da expressão deste gene em diferentes amostras. A cada ciclo, o número de cópias em uma reação de PCR duplica. Assim, o número de ciclos que separa o ΔCT de uma amostra do ΔCT do calibrador (neste caso utilizamos a média das amostras do grupo controle) resulta no $\Delta\Delta CT$. Esta diferença, em termos de nível de expressão gênica relativa, é obtida de forma aproximada, aplicando a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata. A amplificação foi realizada em um volume final de 10µl, utilizando 5µl do reagente específico Taqman Master Mix, 0,5µl de cada sonda específica e 4,5µl de cDNA. Um aparelho de detecção de PCR em tempo real 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) foi utilizado juntamente com o software Sequence Detection System para a obtenção dos valores de CT. Os dados foram então exportados para planilhas do software Excel para cálculo dos valores de ΔCT . O software GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Prism, Inc, San Diego, CA, EUA), foi utilizado para gerar os gráficos e calcular a significância estatística.

As condições padrão de amplificação foram 95°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (anelamento e extensão simultânea). Todas as reações foram realizadas em duplicata e analisadas no aparelho 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Os dados foram constantemente coletados durante o PCR e analisados em ABI-7500 SDS “software package”.

4.6 **Análise estatística**

Para a avaliação da expressão dos microRNAs, a análise estatística foi realizada utilizando o teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de comparação múltipla de Dunns. Foi utilizado o programa Graph Pad Prism version 6.00 for Windows, (GraphPad Software, San Diego – Califórnia USA), sendo considerado estatisticamente significativo valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Análise da expressão do miRNA-16

A expressão do miRNA-16 está representada no gráfico 1. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados. ($p=0,7513$, teste Kruskal Wallis).

Gráfico 1. Representação da média dos valores ($\pm$ erro padrão) da expressão do microRNA-16 entre os grupos estudados. Não houve diferença significativa entre os Grupos Controle, Exercício Físico, Isquemia Cerebral e Exercício Físico + Isquemia Cerebral ($p = 0,7513$, Kruskal Wallis test).

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 6.00).

5.2 Análise da expressão do miRNA-21

A expressão do miRNA-21 está representada no gráfico 2. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados. ($p=0,1310$, teste Kruskal Wallis).

Gráfico 2. Representação da média dos valores ($\pm$ erro padrão) da expressão do microRNA-21 entre os grupos estudados. Não houve diferença significativa entre os Grupos Controle, Exercício Físico, Isquemia Cerebral e Exercício Físico + Isquemia Cerebral ($p = 0,1310$, Kruskal Wallis test).

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 6.00).

5.3 Análise da expressão do miRNA-155

A expressão do miRNA-155 está representada no gráfico 3. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados. ($p=0,0704$, teste Kruskal Wallis).

Gráfico 3. Representação da média dos valores ($\pm$ erro padrão) da expressão do microRNA-155 entre os grupos estudados. Não houve diferença significativa entre os Grupos Controle, Exercício Físico, Isquemia Cerebral e Exercício Físico + Isquemia Cerebral ($p = 0,0704$, Kruskal Wallis test).

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 6.00).

5.4 Análise da expressão da BCL-2

A expressão da BCL-2 está representada no gráfico 4. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados. ($p=0,0360$, teste Kruskal Wallis).

Gráfico 4. Representação da média dos valores ($\pm$ erro padrão) da expressão do gene BCL-2 entre os grupos estudados. Não houve diferença significativa entre os Grupos Controle, Exercício Físico, Isquemia Cerebral e Exercício Físico + Isquemia Cerebral ($p = 0,0360$ Kruskal Wallis test).

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 6.00).

5.5 Análise da expressão da CASPASE-3

A expressão da CASPASE-3 está representada no gráfico 5. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados. ($p=0,1896$, teste Kruskal Wallis).

Gráfico 5. Representação da média dos valores ($\pm$ erro padrão) da expressão do gene CASPASE-3 entre os grupos estudados. Não houve diferença significativa entre os Grupos Controle, Exercício Físico, Isquemia Cerebral e Exercício Físico + Isquemia Cerebral ($p = 0,1896$ Kruskal Wallis test).

Fonte: Elaboração própria (software GraphPad Prism® versão 6.00).

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Evidências demonstram que a prática regular do exercício físico além de promover a saúde geral do nosso corpo, está associada com o baixo risco de mortalidade e diminuição da incidência de doenças crônicas, tais como: doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral, diabetes melitos e vários tipos de câncer.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão de alguns miRNAs e genes que foram previamente relacionados com apoptose em pesquisas que utilizaram animais submetidos ao modelo de isquemia cerebral focal e exercício.

Sabe-se que a família do miR-16 são transcritos do agrupamento microRNA-15a/miR-16-1, que inibem a angiogênese pós-isquemia e também funcionam como supressores tumorais ao associar diretamente ao BCL-2 (BESNIER et al., 2019; PEKARSKY; BALATTI; CROCE, 2018).

Yang et al. (2017) avaliaram o perfil de expressão dos MicroRNAs 15a/16-1 em um modelo de isquemia cerebral utilizando camundongos machos adultos, realizando a administração dos antagomirs 15a/16-1 via venosa na cauda dos animais, submetendo esses animais ao procedimento isquêmico através da oclusão da ACM por um período de 1 hora e 72 horas de reperusão. Os resultados obtidos por esse estudo indicaram que a inibição farmacológica dos MicroRNAs 15a/16-1 reduz a lesão isquêmica através da regulação positiva de proteínas anti-apoptóticas e supressão de moléculas pró inflamatórias.

Horak et al. (2018) analisaram a expressão do miR-16 em jovens universitários submetidos a diversos protocolos de intensidades de treinamento durante 8 semanas. Neste estudo os autores concluíram que as diferentes intensidades estudadas, como, força explosiva, força hipertrófica e treinamento intervalado de alta intensidade não demonstraram diferenças estatísticas na expressão do microRNA-16.

Nossos resultados corroboram com Horak et al. (2018) visto que, também não observamos diferenças nos níveis de expressão do miR-16 nos animais submetidos ao procedimento isquêmico associados ou não ao exercício físico. Sugerindo desta forma que o perfil de expressão do miR-16 deve estar associado provavelmente ao tempo de duração da isquemia cerebral e da sua reperusão.

O miR-21 foi um dos primeiros miRs humano a ser estudado e ainda hoje tem sido muito estudado. Ele está envolvido em importantes processos fisiopatológicos divergentes relacionados a isquemia e reperfusão, como o processo inflamatório e anfigênese (XU et al., 2014).

Os microRNAs tem sido utilizado como possíveis biomarcadores em estudos com apoptose. Em especial, o miR-21 demonstrou ser um forte fator antiapoptótico. Ele é regulado em diversos tipos de câncer, incluindo de mama, colorretais e gliomas. Mas apesar de ser associado com tumor cerebral, o papel do miR-21 em outras doenças neurológicas como o AVC não foi relatado.

Buller et al. (2010) avaliaram a expressão do miR-21 em ratos após o procedimento isquêmico e demonstraram que a superexpressão do miR-21 protege contra a morte neuronal isquêmica.

Diferente dos resultados obtidos pelos autores descritos, nossos resultados não foram estatisticamente significativos. Essa discordância na expressão pode estar relacionada com a técnica utilizada durante o procedimento isquêmico e o tempo de isquemia.

Evidências sugerem que os miRNAs exercem papéis importantes na patogênese da lesão de isquemia e reperfusão. Entre eles o miRNA-155, por ser um microRNA multifuncional é altamente expresso em células epiteliais e células nervosas. Além disso, o miRNA-155 está envolvido em vários processos fisiológicos e patológicos, tais como: diferenciação de linhagem hematopoiética, imunidade, inflamação, câncer e doenças cardiovasculares. (J. CHEN, X. XU, H. JI et al., 2019).

No processo da lesão cerebral isquêmica o miR-155 regula a expressão de proteínas associada a vários mecanismos moleculares entre eles podemos destacar neuroinflamação e apoptose (Suofu Y et al, 2020). Entretanto, estudos demonstram diferentes achados no perfil de expressão do miR-155 após lesão cerebral isquêmica regulando vias moleculares com efeitos opostos. Nesse contexto, Suofu Y et al, 2020 utilizaram camundongos *knockout* para o miR-155 foram submetidos a modelo de isquemia cerebral por 60 minutos por oclusão da artéria cerebral média seguido de até 71 horas de reperfusão. Foram determinados os efeitos do *knockout* do miR-155 no tamanho do infarto cerebral, na incidência e extensão de hemorragia e na avaliação neurológica. Os resultados demonstraram aumento da expressão do miR-155 no grupo isquêmico cerebral em camundongos do tipo selvagem assim como foi

observado redução do volume do infarto e dos déficits neurológicos nos camundongos knockout para o miR-155. Os autores concluíram que o aumento na expressão de miR-155 observado após isquemia cerebral pode ser considerado prejudicial e a sua inibição pode apresentar possível potencial alvo terapêutico.

Nossos resultados corroboram com Suofu et al., 2020, visto que, no grupo isquêmico a expressão do miR-155 apresentou-se elevada e ainda é possível sugerir um papel neuroprotetor do exercício onde foi observada a redução da expressão do mesmo.

A caspase-3 é constituída de uma grande família de proteases de cisteína que exercem papel essencial na sinalização em cascata para a apoptose. Lima et al., 2019, avaliaram os efeitos do pré-condicionamento ao exercício em modelo experimental de isquemia e reperfusão renal em ratos. Os animais foram submetidos ao protocolo de treinamento de cinco dias por semana, durante quatro semanas, com intensidade e duração progressivas. A lesão da IR renal foi induzida por pinçamento da artéria renal bilateral por 45 minutos. Ao término do estudo os animais obtiveram melhorias em diversos aspectos e na diminuição dos níveis de CASPASE-3.

Zhang et al., 2019 usando o modelo de oclusão da artéria cerebral média avaliaram o efeito neuroprotetor do exercício (pré-condicionado por três semanas utilizando Rota-Rod antes da cirurgia) no desempenho motor, volume do infarto e a expressão Bax, Bcl-2 e caspase-3 foram medidas por Western blot. Os resultados demonstraram a diminuição do volume do infarto e da expressão de Bax e caspase-3 assim como o aumento da expressão de Bcl-2.

Diferente dos resultados obtidos por de Lima, Visona, Schor, & Almeida, 2019, nossos resultados não apresentaram diferença estatística significativa, sugerindo que o tempo de isquemia ou o protocolo utilizado no treinamento dos animais, possam ter influência nos níveis de expressão.

Nos nossos resultados não observamos diferença da expressão de CASPASE-3 nos grupos estudados o que nos permite sugerir assim como de Lima, Visona, Schor, & Almeida, 2019 que as diferenças nos desenhos experimentais tanto no que se refere a Isquemia Cerebral (duração do processo isquêmico, tempo de reperfusão e modelo experimental de indução de isquemia) quanto ao exercício físico (modelo e intensidade) podem influenciar nos resultados.

Terashi et al (2019) avaliaram os efeitos neuroprotetores de pré-condicionamento do exercício na apoptose neuronal em ratos submetidos a isquemia cerebral focal por oclusão da artéria cerebral média esquerda com duração de 60 minutos com reperfusão de 48h onde foram avaliados vários parâmetros: volume do infarto cerebral, função neurológica, função motora e pela técnica de TUNEL a expressão de Bcl-2, Bax e caspase-3. Os autores constataram efeitos neuroprotetores do exercício três vezes ou mais por semana através da regulação dessas proteínas.

Li et al., 2017 avaliaram o papel do exercício utilizando Rota-Rod em ratos Sprague-Dawley machos adultos submetidos a oclusão da artéria cerebral média por 2 horas. Foram analisadas proteínas anti e pró-apoptóticas pela técnica de Western blotting. Os resultados demonstraram que o AVC isquêmico aumentou dos níveis de expressão de BAX e caspase-3, sendo que no grupo isquêmico sem associação ao exercício, a morte celular apoptótica aumentou ainda mais, entretanto apenas no grupo de animais submetidos ao exercício 6 horas após a reperfusão, sendo que o mesmo não observado para os períodos de reperfusão de 24 horas ou 3 dias. Também foi constatado que a expressão de Bcl-2 não foi afetada pelo exercício.

Nossos resultados corroboram com o estudo de Li et al., 2017 pois não foram observadas diferenças na expressão de Bcl-2 nos grupos estudados.

Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar o papel do mecanismo de apoptose na isquemia cerebral associada ao exercício físico assim como a regulação dos microRNAs nos alvos associados a esse mecanismo.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Em nosso estudo não observamos diferenças na expressão dos miRNAs: miR-16, miR-21 e miR-155 e nos genes Bcl-2 e CASPASE-3 no tecido cerebral dos grupos submetidos à isquemia cerebral focal e exercício físico nos grupos estudados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, A. S.; PINHO, R. A. **Efeitos do exercício físico sobre o estado redox cerebral***Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbme/v13n5/14.pdf>>. Acesso em: 23 ago. 2018
- ASIAF, A. et al. MicroRNAs in Breast Cancer: Diagnostic and Therapeutic Potential. In: [s.l.] Humana Press, New York, NY, 2018. p. 23–43.
- BESNIER, M. et al. miR-15a/-16 Inhibit Angiogenesis by Targeting the Tie2 Coding Sequence: Therapeutic Potential of a miR-15a/16 Decoy System in Limb Ischemia. **Molecular Therapy. Nucleic Acids**, v. 17, p. 49, 2019.
- BULLER, B. et al. MicroRNA-21 protects neurons from ischemic death. **FEBS Journal**, v. 277, n. 20, p. 4299–4307, 1 out. 2010.
- CHAE, C. H.; KIM, H. T. Forced, moderate-intensity treadmill exercise suppresses apoptosis by increasing the level of NGF and stimulating phosphatidylinositol 3-kinase signaling in the hippocampus of induced aging rats. **Neurochemistry International**, v. 55, n. 4, p. 208–213, 2009.
- CHUNG, J.-Y. et al. Increased Expression of Neurotrophin 4 Following Focal Cerebral Ischemia in Adult Rat Brain with Treadmill Exercise. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e52461, 2013.
- CRUZ, A. T. DA [UNIFESP]. Componentes do ciclo celular ao longo da gênese do melanoma e seus possíveis reguladores. 2010.
- DAMÁZIO, L. C. M. et al. Exercício físico promove neuroproteção estrutural e funcional em ratos com isquemia cerebral. **Revista Neurociências**, v. 23, n. 4, p. 581–588, 2015.
- DE LIMA, W. V. et al. Preconditioning by aerobic exercise reduces acute ischemic renal injury in rats. **Physiological Reports**, v. 7, n. 14, 1 jul. 2019.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61–68, mar. 1997.
- GARZON, R. et al. MicroRNA expression and function in cancer. **Trends in Molecular Medicine**, v. 12, n. 12, p. 580–587, 2006.
- GOMES CIOLAC, E. et al. **Exercício físico e síndrome metabólica***Rev Bras Med Esporte*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbme/v10n4/22048>>. Acesso em: 5 ago. 2018.
- HORAK, M. et al. Exercise-induced circulating microRNA changes in athletes in various training scenarios. **PLoS ONE**, v. 13, n. 1, 1 jan. 2018.
- HOSSMANN, K. Experimental models for the investigation of brain ischemia.

Cardiovascular Research, v. 39, n. 1, p. 106–120, 1 jul. 1998.

JOUFFROY, R.; VIVIEN, B. Reply to Pang et al.: “Early detection of brain death using the Bispectral Index (BIS) in patients treated by extracorporeal cardiopulmonary resuscitation (E-CPR) for refractory cardiac arrest”. **Resuscitation**, v. 121, p. e9, 1 dez. 2017.

LI, F. et al. Enhanced apoptosis from early physical exercise rehabilitation following ischemic stroke. **Journal of Neuroscience Research**, v. 95, n. 4, p. 1017–1024, 1 abr. 2017.

LU, J. et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. **Nature**, v. 435, n. 7043, p. 834–838, jun. 2005.

NAKANO, H.; COLLI, B. O.; ROSELINO, J. E. DE S. Análise da respiração mitocondrial em tecido cerebral de gato após isquemia e reperfusão. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 17, n. suppl 3, p. 34–40, 2002.

PEKARSKY, Y.; BALATTI, V.; CROCE, C. M. BCL2 and miR-15/16: from gene discovery to treatment. **Cell death and differentiation**, v. 25, n. 1, p. 21–26, 2018.
RICARTE FILHO, J. C. M.; KIMURA, E. T. MicroRNAs: nova classe de reguladores gênicos envolvidos na função endócrina e câncer. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 6, p. 1102–1107, dez. 2006.

SHAMSAEI, N. et al. Exercise preconditioning exhibits neuroprotective effects on hippocampal CA1 neuronal damage after cerebral ischemia. **Neural regeneration research**, v. 10, n. 8, p. 1245–50, ago. 2015.

SUOFU, Y. et al. Mir-155 knockout protects against ischemia/reperfusion-induced brain injury and hemorrhagic transformation. **Neuroreport**, v. 31, n. 3, p. 235–239, 5 fev. 2020.

XU, X. et al. miR-21 in ischemia/reperfusion injury: a double-edged sword? **Physiological genomics**, v. 46, n. 21, p. 789–97, 1 nov. 2014.

YANG, X. et al. MicroRNA-15a/16-1 Antagomir Ameliorates Ischemic Brain Injury in Experimental Stroke. **Stroke**, v. 48, n. 7, p. 1941–1947, 2017.

ZHANG, Z. et al. Voluntary exercise promotes neurotrophic factor and suppresses apoptosis in hippocampal ischemia. **Journal of integrative neuroscience**, v. 18, n. 1, p. 65–70, 30 mar. 2019.