

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

RAFAEL ZIMAK FIGUEIREDO

**Expressão dos microRNAs miR-126, miR-133b e miR-221
associados a apoptose em ratos submetidos a isquemia cerebral
focal e ao exercício físico**

Ribeirão Preto – SP

2021

RAFAEL ZIMAK FIGUEIREDO

**Expressão dos microRNAs miR-126, miR-133b e miR-221
associados a apoptose em ratos submetidos a isquemia cerebral
focal e ao exercício físico**

Versão Original

Dissertação 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 - SP

2021

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.

Figueiredo, Rafael Zimak

Expressão dos microRNAs miR-126, miR-133b e miR-221 associados a apoptose em ratos submetidos a isquemia cerebral focal e ao exercício físico . Ribeirão Preto, 2021.

62 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica Cirúrgica.

Orientador: Tirapelli, Prof. Dr. Luís Fernando.

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

FOLHA DE APROVAÇÃO

FIGUEIREDO, Rafael Zimak

Expressão dos microRNAs miR-126, miR-133b e miR-221 associados a apoptose em ratos submetidos a isquemia cerebral focal e ao exercício físico

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, programa

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof; Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

De tudo ficaram três coisas...
A certeza de que estamos começando...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar...
Façamos da interrupção um caminho novo...
Da queda, um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro!

Fernando Sabino

Dedico esta dissertação à minha família, por todo apoio, carinho, amor, incentivo e suporte durante minha vida, possibilitando meus aprendizados e conquistas. Muito obrigado, Kelly, Antônio Henrique, Elizabeth e Taís.

AGRADECIMENTOS

Com o final de uma etapa, devemos nos lembrar que tivemos uma base para iniciar. Agradeço à minha família, o apoio, carinho, incentivo e amor. A presença de vocês é fundamental para minha evolução.

Agradeço à Kelly, sempre minha referência, principalmente por sua capacidade de desejar e buscar os objetivos. Amiga, companheira e esposa que sempre me estimulou e incentivou a seguir em frente e a evoluir. Te amo.

Agradeço ao Professor Luís Fernando Tirapelli, meu orientador nesta jornada, por todo ensinamento, paciência e incentivo. Sua capacidade de ensinar é única.

Agradeço à Professora Daniela Pretti da Cunha Tirapelli, pelo incentivo, receptividade, ensinamentos e oportunidades nesta jornada e de me possibilitar de trabalhar e aprender em um centro de excelência. Seus conselhos foram fundamentais nesta conquista e de grande importância para minha vida profissional e acadêmica.

Agradeço a todos os colegas do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Todos foram muito importantes neste ciclo de aprendizagem e desenvolvimento. Agradeço em especial, Lucas Porsani, Fermino Neto, Múcio Assis e Paulo Novaes, que foram fundamentais na construção deste trabalho.

Agradeço aos colegas de trabalho que me deram suporte neste período de aprendizado, colaborando para que fosse possível eu cumprir esta etapa. Neste período estive em mais de uma empresa e em diferentes equipes, com certeza todos colaboraram.

Agradeço aos amigos Juca e Thiago, pela excelentes conversas, incentivo e companheirismo e Heitor e Kátia pela inspiração de seguir neste caminho.

Agradecimento especial aos professores e funcionários da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

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

RESUMO

FIGUEIREDO, R.Z. **Expressão dos microRNAs miR-126, miR-133b e miR-221 associados a apoptose em ratos submetidos a isquemia cerebral focal e ao exercício físico.** 2021. 62f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021

INTRODUÇÃO: O acidente vascular cerebral (AVC) é uma das principais causas de morte e incapacidade no Brasil e no mundo. O grande impacto na qualidade de vida da população e no sistema de saúde justifica que busquemos alternativas relevantes para diminuição da incidência e melhora no tratamento e recuperação dos pacientes acometidos por essa doença. O exercício físico aparece como importante ferramenta neste cenário, sendo já apontada como possível abordagem terapêutica de prevenção de doenças crônicas não contagiosas. Estudos demonstraram que o exercício físico quando utilizado de maneira sistemática e organizada produz efeitos positivos na qualidade de vida e saúde do indivíduo. Neste contexto aparecem biomarcadores como os miRNAs que respondem ao exercício físico e estão diretamente relacionados a diversos mecanismos epigenéticos. Portanto, explicar os mecanismos moleculares envolvidos durante a prática de exercício físico levarão a um melhor entendimento de cada estímulo e a dose a ser utilizada para melhor resposta a cada situação, sendo assim uma promissora abordagem para a evolução da prescrição e controle de treinamentos e processos de recuperação de várias doenças, entre elas o AVC. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Foram utilizando 48 ratos da linhagem Wistar, divididos em quatro grupos experimentais: grupo controle, grupo isquemia, grupo exercício físico e grupo exercício + isquemia. A metodologia PCR em tempo real foi utilizada para analisar a expressão dos miRNAs: miR-126, miR-133b e miR-221. **RESULTADOS E CONCLUSÃO:** No nosso estudo observamos diferença significativa na expressão do miR-221 entre o grupo controle e os demais grupos. Entretanto, os microRNAs: miR-126 e miR-133b não apresentam diferenças significativas de expressão entre os grupos.

Palavras-chave: Isquemia cerebral, exercício físico; microRNAs, apoptose

ABSTRACT

FIGUEIREDO, R.Z. **Expression of microRNAs miR-126, miR-133b and miR-221 associated with apoptosis in rats submitted to focal cerebral ischemia and physical exercise.** 2021. 62p. Dissertation (Master Degree) – Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2021

INTRODUCTION: Stroke is one of the main causes of death and disability in Brazil and worldwide. The great impact on the quality of life of the population and on the health system justifies that we seek relevant alternatives to reduce the incidence and improve the treatment and recovery of patients affected by this disease. Physical exercise appears as an important tool in this scenario, being already pointed out as a possible therapeutic approach for the prevention of non-contagious chronic diseases. Studies have shown that physical exercise when used in a systematic and organized way produces positive effects on the individual's quality of life and health. In this context, biomarkers such as miRNAs that respond to physical exercise and are directly related to several epigenetic mechanisms appear. Therefore, explaining the molecular mechanisms involved during physical exercise will lead to a better understanding of each stimulus and the dose to be used to better respond to each situation, thus being a promising approach for the evolution of prescription and control of training and processes recovery from various diseases, including stroke.

MATERIALS AND METHODS: Forty-eight Wistar rats were used, divided into four experimental groups: control group, ischemia group, physical exercise group and exercise + ischemia group. Real-time PCR methodology was used to analyze the expression of miRNAs: miR-126, miR-133b and miR-221.

RESULTS AND CONCLUSION: In our study we observed significant difference in miR-221 expression between the control group and the other groups. However, microRNAs: miR-126 and miR-133b do not show significant differences in expression between groups.

Keywords: Cerebral ischemia, physical exercise, microRNA, apoptosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Organograma dos grupos de estudo e os procedimentos envolvidos.....32

Figura 2 - A. Desenho ilustrando a posição final do fio obstruindo a origem da ACME (M) (no detalhe superior direito) e a ligadura da ACE-E na região onde foi introduzido o fio obstrutor (seta). (TIRAPELLI, 2007, COM PERMISSÃO).....35

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão do microRNA-126 entre os grupos estudados. Não houve diferença significativa entre os Grupos Controle, Exercício Físico, Isquemia Cerebral e Exercício Físico + Isquemia Cerebral ($p= 0,8104$, Kurskall Wallis test)..... 40
- Gráfico 2.** Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão do microRNA-133b entre os grupos estudados. Não houve diferença significativa entre os Grupos Controle, Exercício Físico, Isquemia Cerebral e Exercício Físico + Isquemia Cerebral ($p= 0,1136$, Kurskall Wallis test)..... 41
- Gráfico 3.** Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão do microRNA-221 entre os grupos estudados. Houve diferença significativa entre o Grupo Controle e os grupos Exercício Físico, Isquemia Cerebral e Exercício Físico + Isquemia Cerebral ($p= 0,0322$, Kurskall Wallis test, pós-teste de Dunn´s) . 42
- Gráfico 4.** Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão dos microRNA-126, microRNA-133b, miRNA-221 no grupo controle. Não houve diferença significativa entre os Grupos Controle, Exercício Físico, Isquemia Cerebral e Exercício Físico + Isquemia Cerebral ($p= 0,9113$, Kurskall Wallis test)... 43
- Gráfico 5.** Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão dos microRNA-126, microRNA-133b, miRNA-221 no grupo Exercício Físico. Não houve diferença significativa entre os Grupos Controle, Exercício Físico, Isquemia Cerebral e Exercício Físico + Isquemia Cerebral ($p= 0,2199$, Kurskall Wallis test)... 44
- Gráfico 6.** Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão dos microRNA-126, microRNA-133b, miRNA-221 no grupo Isquemia Cerebral. Não houve diferença significativa entre os Grupos Controle, Exercício Físico, Isquemia Cerebral e Exercício Físico + Isquemia Cerebral ($p= 0,1965$, Kurskall Wallis test)..... 45
- Gráfico 7.** Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão dos microRNA-126, microRNA-133b, miRNA-221 no grupo Exercício Físico + Isquemia. Não houve diferença significativa entre os Grupos Controle, Exercício Físico, Isquemia Cerebral e Exercício Físico + Isquemia Cerebral ($p= 0,4803$, Kurskall Wallis test). 46

LISTA DE SIGLAS

| | |
|--------|---|
| AVC | Acidente vascular cerebral |
| BDNF | Brain-derived neurotrophic factor |
| °C | Grau Celsius |
| cm | Centímetro |
| cDNA | DNA complementar |
| CT | Cycle Threshold |
| DEPC | Dietilpirocarbonato |
| EDTA | Ácido etilenodiaminotetracético |
| µl | microlitro |
| ml | mililitro |
| min | minuto |
| miRNA | MicroRNA |
| mRNA | RNA mensageiro |
| ng | nanograma |
| NGF | Nerve growth factor |
| PBS | Salina fosfatada tamponada |
| PCR | Reação em cadeia polimerase |
| RISC | RNA induced silence complex |
| RNA | Ácido Ribonucleico |
| ROS | Reactive oxygen species |
| RQ-PCR | Transcrição reversa quantitativa da PCR |
| rpm | Rotações por minuto |
| SNC | Sistema nervoso central |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA | 17 |
| 2.1 Isquemia Cerebral | 17 |
| 2.2 Exercício Físico | 19 |
| 2.3 Exercício físico e isquemia cerebral | 21 |
| 2.4 Marcadores moleculares e exercício físico..... | 23 |
| 3 JUSTIFICATIVA | 27 |
| 4 OBJETIVOS | 29 |
| 5 MATERIAL E MÉTODOS | 31 |
| 5.1 Animais..... | 31 |
| 5.2 Grupos experimentais | 31 |
| 5.3 Procedimentos gerais..... | 33 |
| 5.4 Programa de exercício físico em esteira | 36 |
| 5.5 Análise da expressão gênica tecidual dos miRNA-126, miRNA-133b e do miRNA-221..... | 37 |
| 5.6 Análise estatística | 38 |
| 6 RESULTADOS | 40 |
| 6.1 miRNA 126 | 40 |
| 6.2 miRNA 133b | 41 |
| 6.3 miRNA-221..... | 42 |
| 6.4 Controle..... | 43 |
| 6.5 Exercício Físico | 44 |
| 6.6 Isquemia Cerebral | 45 |
| 6.7 Exercício Físico + Isquemia Cerebral..... | 46 |
| 7 DISCUSSÃO | 48 |
| 8 CONCLUSÃO | 53 |
| 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 55 |

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O Acidente vascular cerebral (AVC) é uma das principais causas de morte e incapacidade no mundo (OMS, 2019; GBD, 2016, FEIGIN, 2010). O impacto nos orçamentos dos departamentos de saúde pública e o aumento da expectativa de vida da população coloca o AVC como uma das doenças mais desafiadoras (DURUKAN; TATLISUMAK, 2007).

A origem mais comum de um AVC é isquêmica, causada geralmente por uma obstrução vascular na circulação cerebral. Se identificado de maneira apropriada e rapidamente é possível ser revertido, liberando o fluxo sanguíneo para irrigar novamente as células. As células do foco isquêmico morrem rapidamente, entretanto, as células ao redor do foco isquêmico, região conhecida como penumbra, podem ser salvas horas e até mesmo dias após a isquemia, criando assim uma janela terapêutica para atendimento do paciente (SANDERSON *et al*, 2013).

O exercício físico é benéfico para a função cerebral, no entanto os mecanismos neurobiológicos envolvidos nesse processo são pouco esclarecidos. Modelos de pesquisas com animais tem identificado alguns destes mecanismos neuroquímicos que atuam nos efeitos do exercício físico sobre o cérebro (VOSS *et al*, 2013). Diversas vias moleculares podem participar dos benefícios do exercício físico ao cérebro e alguns biomarcadores se demonstram alterados após a realização de diferentes tipos de exercícios físicos (COTMAM; BERTCHTOLD, 2002).

MiRNAs possuem papel central em várias vias celulares e moleculares. Evidências acumuladas indicam que os miRNAs podem afetar muitos processos fisiológicos e patológicos como proliferação, homeostase, metabolismo, função imune entre outros. Estudos demonstraram alterações no perfil de expressão dos miRNAs no AVC e revelaram ainda que miRNAs são mediadores chave nos aspectos fisiopatológicos, fazendo destas moléculas promissoras biomarcadores no diagnóstico e prognóstico de pacientes acometidos por AVC, assim como os mesmos ainda apresentam potencial terapêutico (MIRZAEI *et al* 2017). Uma das vantagens é que devido a sua estabilidade, os miRNAs podem ser utilizados como biomarcadores no soro e plasma humano para várias doenças (GORINI; NUNEZ; MAYFIELD, 2013).

Os miRNAs também são considerados biomarcadores do exercício físico. Eles são responsivos ao exercício físico e podem ser utilizados para acompanhamento, avaliação, monitoramento e desenvolvimento de prescrições individualizadas de exercícios, possuindo correlação em sua expressão a diversos tipos de atividade (DENHAM; PRESTES, 2016).

Portanto, identificar miRNAs regulados pelo exercício físico e que tenham alvos proteínas anti e pró-apoptóticas poderia proporcionar o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas na região de penumbra do AVC, onde a morte celular ocorre predominantemente por apoptose.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Isquemia Cerebral

Dados divulgados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2019, demonstraram que os acidentes vasculares cerebrais são a segunda principal causa de morte e a terceira principal causa de incapacidade no mundo. Foram aproximadamente 6 milhões de mortes no mundo, número maior que o apresentado no relatório do ano 2000. Esta condição, de grande causador de mortes e incapacidade tem se mantido ao longo das últimas décadas.

O Ministério da Saúde divulgou em 2019, dados referentes ao estudo Saúde Brasil 2018, que demonstram queda na mortalidade por AVC no país, de aproximadamente 12% entre 2010 e 2016, no entanto; ainda é a segunda principal causa de morte e a principal causa de incapacidade atribuída a doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs).

Além das altas taxas de mortalidade, a incapacidade ocasionada aos indivíduos que sobrevivem causa uma perda de produtividade o que é ainda mais impactante na sociedade quando o acometido é um adulto jovem, no auge de sua carreira e com longo período produtivo pela frente (CHONG *et al*, 2005). Segundo os autores a maior incidência de AVC em adultos jovens ocorre em países em desenvolvimento ou não desenvolvidos.

Além do custo social, existem ainda os altos custos para tratamento pós AVC, que também causam grandes impactos econômicos (RAJSIC *et al*, 2019).

O AVC é a interrupção do fluxo sanguíneo que irriga o cérebro. Esta interrupção pode ocorrer por um bloqueio no vaso sanguíneo (o AVC isquêmico), mais comum, ocorrendo em quase 80% dos casos e o hemorrágico, quando há o rompimento do vaso sanguíneo e consequente extravasamento de sangue no cérebro (MIRZAEI, *et al* 2018).

O processo de isquemia cerebral pode ser global ou focal. A isquemia global afeta a irrigação geral do cérebro podendo ser causada por débito cardíaco insuficiente ou pressão diminuída (ZHOU *et al*, 2016). A isquemia focal está relacionada a oclusão ou rompimento de determinado vaso sanguíneo responsável pela irrigação de uma área do cérebro.

Pode-se também definir a isquemia cerebral global como “completa” caso não haja fluxo sanguíneo cerebral. Esta situação pode ocorrer em uma parada cardíaca. Exames de imagem podem ser utilizados para verificação da área afetada e ajudar na classificação da isquemia como focal ou global (ZAGHLOUL *et al*, 2014).

Em geral, a isquemia causa dois tipos de lesões no cérebro: o primeiro relacionado à perda de fluxo sanguíneo resultando em apoptose e necrose neuroglial, e segundo, por uma fase mais prolongada, uma lesão no tecido cerebral devido à resposta imune produzida pela lesão (SPYCHALA *et al* 2017).

Em nível molecular a isquemia cerebral provoca depleção da Adenosina Trifosfato celular e desencadeia os gatilhos de influxo de cálcio. As altas taxas de cálcio intracelular ativam proteases e lipases levando à destruição da membrana (PATEL; MCMULLEN, 2017).

A apoptose passou a ser amplamente estudada a partir da década de 1960 quando diversos estudos histológicos foram realizados para entender e diferenciar dois tipos de morte celular: a necrose clássica e um processo que envolvia a conversão de células dispersas em massas esféricas de citoplasma (KERR, 2002). Este processo mais tarde, foi chamado de apoptose (KERR, 1972).

A apoptose é conhecida como a morte celular programada e é um complexo mecanismo, ainda em estudo, que possui papel regulatório nos tecidos como também na patogênese de diversas doenças, entre elas: câncer, doenças neurodegenerativas e na isquemia cerebral (PASPARAKIS; VANDENABEELE, 2015).

Ocorre frequentemente por duas principais vias, uma intrínseca e outra extrínseca. A primeira está relacionada à mitocôndria e a segunda via aos receptores de morte celular. Há, no entanto, uma terceira via, menos comum, a via independente das caspases (CHO *et al*, 2018).

Na isquemia cerebral, a necrose é a principal via de morte celular acometendo predominantemente o núcleo do foco isquêmico. Na região da penumbra a apoptose pode causar a morte celular por horas e dias após o AVC. Após a restrição de sangue às células sofrem com a falta de nutrientes e oxigênio (HU; SONG, 2018).

Apesar da alta incidência, os tratamentos terapêuticos para o AVC isquêmico continuam limitados sendo que o único medicamento aprovado é o ativador de plasminogênio tecidual recombinante que pode apresentar muitos efeitos colaterais,

incluindo aumento de risco de hemorragia. Além disto, a perfusão de sangue que acontece posteriormente à trombólise, pode estimular eventos oxidativos e inflamatórios, ocasionando a lesão de isquemia/reperfusão no cérebro (PANG *et al.*,2017).

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, que ocorre após a liberação do fluxo sanguíneo. Após a reperfusão, o retorno do fluxo sanguíneo é relacionado a um agravamento da lesão tecidual seguida de uma intensa resposta inflamatória. Existe uma relação entre o dano da reperfusão e crescimento de espécies reativas de oxigênio (ROS), lesões do endotélio vascular, aumento da permeabilidade vascular e ativação de plaquetas, neutrófilos e citocinas.

Segundo Sanderson *et al* (2013) existe um papel importante da mitocôndria no processo da lesão de reperfusão, através da geração de ROS, falha ou disfunção mitocondrial e apoptose mitocondrial. Ainda segundo os autores, a região diretamente atingida, conhecida como núcleo do foco isquêmico não irá recuperar suas funções, no entanto; as áreas ao redor, conhecidas como penumbra, não são afetadas imediatamente mas podem ser gravemente afetadas pelo efeito da reperfusão, gerando uma morte tardia.

É importante tomar medidas terapêuticas rápidas e práticas não somente para impedir o desenvolvimento de lesões e edema cerebral, mas também para contenção dos prejuízos neurológicos subsequentes, uma vez que a lesão provocada pela isquemia pode continuar avançando nas horas e dias (SANDERSON *et al*, 2013).

Neste contexto, estudos recentes investigam o papel da prática de atividades físicas associadas a doenças cerebrovasculares (SHAMSAEI, 2015).

2.2 Exercício Físico

O relatório intitulado “Recomendações Globais sobre Atividade Física para a Saúde” da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2019, descreve que o principal objetivo do exercício físico é a prevenção primária das doenças crônicas não

transmissíveis (DCNTs), que são responsáveis por 71% das mortes do mundo entre indivíduos de 30 a 70 anos (OMS, 2019).

Apesar de ter sua importância relacionada às DCNTs, ainda se sabe pouco sobre qual tipo de atividade física produz respostas mais rápidas e eficazes nas funções cognitivas do cérebro (KRAMER *et al*, 2006).

É importante salientar que os conceitos de atividade física e exercício são distintos. Segundo a OMS, atividade física é qualquer movimento corporal produzido por músculos esqueléticos com gasto energético. O exercício é uma subcategoria da atividade física e diferencia-se por ser uma atividade repetitiva, planejada e estruturada. Tanto o exercício quanto a atividade física são benéficos para a saúde. Porém, é evidente a necessidade de desenvolver recomendações globais que relacionem frequência, duração, intensidade, tipo e quantidade total de atividade física necessária para a prevenção de DCNTs.

A melhora na condição cardiorrespiratória, o fortalecimento muscular e a diminuição do risco de fraturas são alguns dos benefícios da realização de atividade e exercício físico pois aumentam a força e a massa muscular e promovem ativação neuromuscular. Diversos estudos ao longo dos últimos anos mostraram os efeitos positivos dos exercícios físicos na saúde humana (NEEPER *et al*, 1996).

Estudos demonstram que adultos menos ativos em comparação com os indivíduos mais ativos, possuem menor incidência de doença cardíaca coronária, hipertensão arterial, acidente vascular cerebral, diabetes, alguns tipos de câncer e depressão. Os efeitos da prática de exercício físico são tanto físicos quanto emocionais mesmo quando realizado de diferentes formas (YEH *et al.*, 2017). É importante ressaltar que os efeitos da atividade física sejam avaliados sob amplos aspectos de saúde: biológicos, físicos, psicológicos, emocionais, sociais e cognitivos (WURZ; BRUNET, 2016).

Pareja-Galeano, *et al* (2013) demonstraram que adolescentes que praticavam atividade física, tiveram aumento das proteínas relacionadas à plasticidade neural, principalmente BDNF e IGF-1.

A atividade física e o exercício físico podem atenuar o declínio cognitivo relacionado ao envelhecimento, ou seja, melhoram as funções neurocognitivas. Embora sejam uma intervenção terapêutica simples, possuem eficácia e baixo custo (CHIEFFI *et al.*, 2017).

2.3 Exercício físico e isquemia cerebral

Atualmente, algumas abordagens terapêuticas utilizando-se atividade física estão sendo estudadas em modelos de isquemia cerebral experimental. Estudos clínicos demonstram que a prática de atividade física atua de maneira positiva na manutenção da saúde, nas funções cognitivas e de neuroproteção (NEEPER *et al*, 1996). A integração de vários impulsos neuronais cerebrais permitem alterações plásticas que beneficiam as estruturas encefálicas comprometidas devido a lesão causada pelo processo isquêmico (GARBUZOVA-DAVIS *et al.*, 2013).

Para realização de pesquisas experimentais referentes ao impacto da atividade física na isquemia cerebral, são utilizados principalmente roedores nos protocolos de exercício físico relacionados aos estudos das funções cerebrais e seus mecanismos. Dos principais modelos de atividade física, destacam-se exercícios como natação e esteira, obtendo um estímulo para respostas a um treinamento com predominância do metabolismo aeróbico (AGUIAR; PINHO, 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).

Arrick *et al* (2014) demonstraram que a utilização de exercícios físicos vigorosos em ratos, reduziram a área afetada após a oclusão experimental da artéria cerebral média (ACM).

Nas situações em que o exercício físico antecede a 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 SHAMSAEI *et al.* (2015) existem efeitos protetores do exercício físico sobre danos cerebrais provocados pela isquemia e reperfusão, mas estes efeitos não estão bem elucidados. Os 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 3 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, 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 isquêmico, 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).

Existem dúvidas a respeito do melhor momento para o início da atividade após o evento isquêmico. Um estudo em ratos demonstrou o aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas BAX e CASPASE-3, quando o exercício foi iniciado após 6 horas da isquemia cerebral induzida. Os dados demonstram a presença de uma janela de temporização inicial de 24 horas a 3 dias, a fim de melhorar os benefícios do exercício e evitar possíveis prejuízos que possam dificultar um melhor resultado (LI *et al.*, 2017). Por outro lado, existem estudos que demonstram que a interferência do exercício físico ocorre de diferentes formas no cérebro dos ratos submetidos à isquemia cerebral e, quanto mais cedo é iniciada a reabilitação, maior será a neuroproteção (LIEBELT *et al.*, 2010).

Para elucidar e encontrar mecanismos eficientes para a utilização da atividade física de maneira adequada como abordagem terapêutica, podemos utilizar marcadores moleculares.

2.4 Marcadores moleculares e exercício físico

Evidências científicas indicam a possibilidade dos 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).

Estudos demonstram a importância da proteína Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF) como modulador crítico na plasticidade sináptica no hipocampo. A silenciamento do gene BDNF produz uma deficiência na memória de longo prazo. Esta diminuição da função sináptica pode ser corrigida por fatores externos ou hiperexpressão da BDNF para melhora da neuroplasticidade. Um dos fatores externos descritos é a realização de exercício físico (SHAMSAEI *et al.*, 2015). A deleção do gene BDNF em camundongos, por exemplo, resulta na diminuição das proteínas sinápticas e de suas vesículas, prejudicando a liberação de neurotransmissores. Com o exercício físico, a proteína BDNF promove um aumento da fosforilação da sinapsina I via ativação dos receptores TrkB no terminal pré-sináptico, resultando em liberação de neurotransmissores. É possível que níveis elevados de BDNF induzidos através do exercício facilitem a formação e mobilização de vesículas sinápticas e o prolongamento destes eventos, podendo se traduzir em longas alterações na plasticidade sináptica (LOVATEL *et al.*, 2014).

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

Os microRNAs são pequenas moléculas de RNA (18-25 nucleotídeos), não codificantes que regulam, em nível pós-transcricional, a expressão gênica (DENHAM; PRESTES, 2016). Através da ligação do miRNAs na região 3' do mRNA alvo ocorrerá regulação da tradução de moléculas que são alvos do mRNA. São importantes fatores de regulação epigenética, regulando proliferação, diferenciação e sobrevivência de células tronco (SHI *et al.*, 2016). Estão relacionados também na modulação de diversos processos celulares, apoptose, doenças cerebrovasculares e câncer (TIRAPELLI *et al.*, 2011).

O processo de formação e atividade do miRNA inicia-se através da enzima polimerase II que irá gerar a transcrição do miRNA primário (pri-miRNA) após os quais vão ser sequenciados pela Drosha e Dicer (PORKKA *et al*, 2007). O microRNA primário é processado através de um mecanismo conservador para produzir uma maturação do microRNA. Os microRNAs são processados por um alto regulador a fim de controlar a quantidade de microRNA ativo nas células. Inicialmente um complexo de proteína nuclear que consiste na Drosha (RNase tipo III) entre outras proteínas, clivam *hairpin* em uma sequência longe do microRNA primário para formar o precursor do mesmo. Esses microRNAs vão ser então exportados para o citoplasma onde são transformados por um complexo de proteína contendo o tipo III Dicer, a RNase produz o microRNA maduro. Depois de produzir o RNA maduro ele é carregado para dentro da RISC (Indução silenciosa do RNA). Esse microRNA liga-se ao alvo mRNA afim de reduzir a tradução da proteína. A ligação ocorre pelo reconhecimento da sequência complementar do gene alvo UTR'3. A 5' é o final do microRNA, a região do reconhecimento (LAWLER; CHIOCCA, 2009).

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 promissora 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 líquido cefalorraquidiano e sangue (DOGINI *et al.*, 2013).

Denham; Prestes (2016) demonstraram que existem miRNAs relacionados a atividade física respondendo diretamente ao estímulo.

Pesquisas mostraram que diversos miRNAs circulantes podem ser utilizados como biomarcadores relacionados à resposta a diferentes estímulos em treinamento de força. Os microRNAs miRNA-133b e miRNA-221 tiveram respostas significativas em todos os padrões de treinamento de força testados (CUI *et al* 2017).

O miRNA-126 hiperexpresso pode ser um bom alvo terapêutico na fase aguda do AVC, por diminuir a expressão da expressão de citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão e atenuando a disrupção da barreira hemato-encefálica após

o AVC isquêmico (PAN *et al*, 2020). Podemos acrescentar também que a hiperexpressão do miRNA-126 inibe a apoptose através da via PI3k/Akt via PIK3R2(CHEN *et al* 2016).

Análise realizada em ratos treinados com exercícios moderados, tem efeitos protetivos quando submetidos experimentalmente à oclusão da artéria cerebral média nos estágios agudo e crônico que ocorre através da liberação de miRNA-126 via exossomas, sendo os níveis de miRNA-126 negativamente correlacionada ao volume do infarto e à apoptose celular, enquanto foi positivamente correlacionado à densidade dos microvasos (WANG *et al*, 2020).

A liberação de miRNA-133b em exossomas liberados de células mesenquimas estromais, pós AVC isquêmico, induzido por oclusão da artéria cerebral média promoveu plasticidade neural e recuperação funcional, além de poder ser induzir neuroproteção (XIN *et al*, 2013)

O miRNA-133b hiperexpresso pode exercer efeito protetor na lesão isquêmica, inibindo a apoptose de células neuronais (DAI *et al*,2021).

Análise também realizando a oclusão da artéria cerebral média, demonstrou que o miRNA-221 pode reduzir os danos causados pelo AVC isquêmico agudo. Foi verificado ainda que o miRNA-221 estava hipoexpresso em relação ao grupo controle. (SHAN *et al*, 2021). Outro estudo mostrou que a hiperexpressão do miR-221promove regulação do processo apoptótico através da via PTEN/PI3k/AKT (PENG *et al*, 2020). O papel da via PI3k/AKT no processo apoptótico foi demonstrado em um estudo realizado no córtex de ratos (MENG *et al*, 2017).

A resistência dos miRNAs e sua forte relação a diversos mecanismos do corpo aliados a repostas diretas aos treinamento físico os qualificam como caminho para entendimento de como o exercício físico pode colaborar para diminuir a área afetada em um AVC ou mesmo ajudar na recuperação, diminuindo a depedência ou a incapacidade ocasionada ao paciente.

JUSTIFICATIVA

3 JUSTIFICATIVA

Apesar dos avanços nos estudos da isquemia cerebral, o conhecimento da participação dos miRNAs associados a essa doença ainda é limitado. Também pouco se sabe sobre a relação entre isquemia cerebral, miRNAs e exercícios físicos. Portanto, sabendo que o exercício físico apresenta um potencial terapêutico para evitar e diminuir o impacto causado isquemia cerebral, faz-se necessário novos estudos das suas relações e possíveis impactos associados a utilização de biomarcadores como o miRNA, afim de produzir mais informações para o desenvolvimento de programas de prevenção e tratamento, relacionados ao exercício físico.

OBJETIVOS

4 OBJETIVOS

- Avaliar o perfil de expressão dos miRNAs, miR-126, miR-133b e miR-221 por PCR tempo real, no tecido nervoso de ratos submetidos a um modelo experimental de isquemia cerebral focal associado ao exercício físico.

MATERIAL E MÉTODOS

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados 48 ratos (*Rattus norvegicus*) machos adultos, da linhagem Wistar, pesando 280 a 310 gramas, fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Durante o período pré-operatório, os animais de todos os grupos foram mantidos em gaiolas plásticas (38x23x15cm), com tampa metálica tipo grade, forradas com maravalha. A temperatura ambiente foi mantida em torno de 25°C com exaustão do ar ambiente contínuo e ciclo claro/escuro de 12 horas (início do ciclo às 7:00 horas). Os animais receberam água e ração balanceada (Nuvilab CR1 - Nuvital®) ad libitum, no Biotério do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

5.2 Grupos experimentais

Grupo Controle (C): constituído por 12 animais que após a anestesia e a estabilização das variáveis biológicas, foram submetidos à eutanásia sem a realização do procedimento cirúrgico.

Grupo Isquêmico (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 físico (E): constituído por 12 animais submetidos a um programa de exercício físico em esteira durante 4 semanas. A eutanásia foi realizada após o término do programa de exercício físico sem a realização de procedimento cirúrgico.

Grupo exercício físico e 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 (Figura 1).

Durante o procedimento cirúrgico, a oclusão foi realizada utilizando-se fios obstrutores recobertos por silicone em uma das extremidades (CARLOTTI; COLLI; KAZUO, 2001; KOIOSUMY *et al.*, 1986). Os fios (Mononylon 4.0 – Ethicon) foram mantidos estendidos por 24 horas para corrigir as curvaturas formadas pela posição em que são embalados e em seguida, foram seccionados em segmentos de 25 mm, com lâmina de barbear de aço e por fim, colocados entre as folhas de um livro, deixando-se uma de suas extremidades livre. Esta extremidade foi recoberta com uma cama de silicone (Silon F – Dimetil Polissiloxano, Aroma de Menta e Corante Artificial) e do catalisador (Silon C – Octoato de Estanho e Silicato de Etila) da Herp Produtos Dentários LTDA, na proporção de 5:1, com a utilização de microscópio cirúrgico (D.F.Vasconcelos). A mistura foi colocada na extremidade de uma pinça de microcirurgia e então distribuída suavemente sobre o fio, para maior uniformidade possível. A extensão da camada de silicone utilizada foi de 5mm, medida com uma régua milimétrica colocada ao lado do fio durante o procedimento.

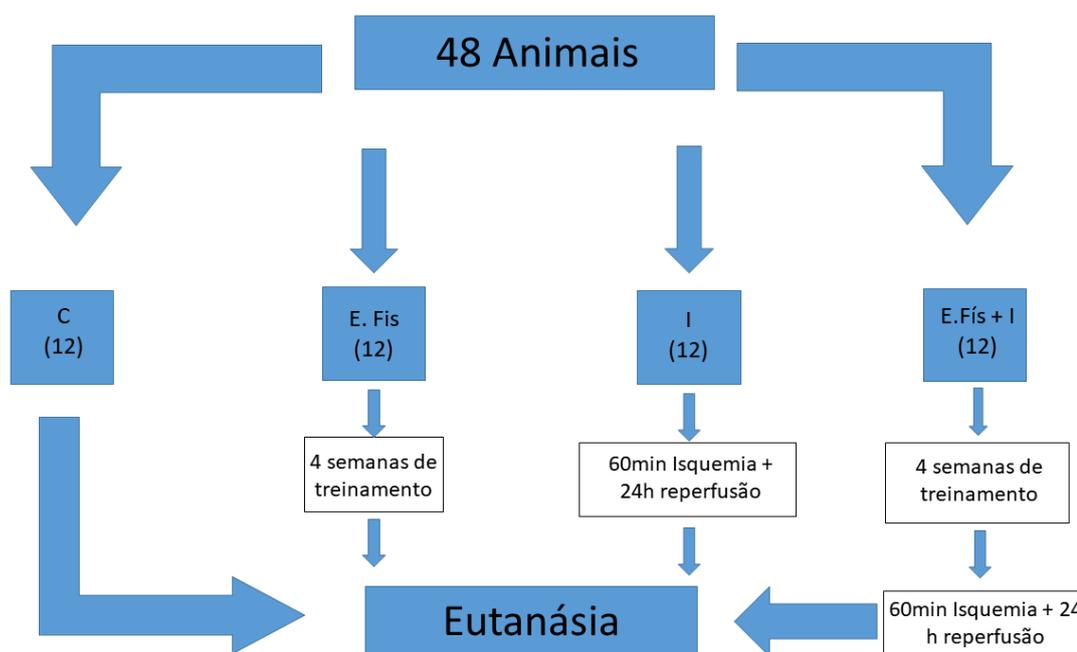


Figura 1 - Organograma dos grupos de estudo e os procedimentos envolvidos.

5.3 Procedimentos gerais

Os procedimentos gerais 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 os passos técnicos descritos no trabalho de Carlotti Jr; Colli e Kazuo (2001).

Os animais foram distribuídos nos respectivos grupos aleatoriamente, após sorteio realizado antes do procedimento cirúrgico. Cada animal foi pesado e submetido à anestesia geral por inalação de halotano, sob uma campânula de vidro. Assim que a movimentação espontânea terminava, os animais foram transferidos para uma prancha de madeira, mantidos em decúbito dorsal e entubados manualmente com uma cânula orotraqueal, somente após tração digital da língua para o exterior. 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.

Os animais foram então fixados com esparadrapos à prancha de madeira pelos seus membros. A artéria ventral da cauda foi dissecada e canulada com catéter calibre PE 10, que conectado na outra extremidade a um catéter peridural, foram conectados a um transdutor de pressão, para registro contínuo da pressão arterial média, da frequência cardíaca (biomonitor modelo 78339A – Hewlett Packard Company, USA) e para coleta de amostras sanguíneas.

A manutenção da vaporização foi controlada de acordo com a pressão arterial média, para que fosse mantida entre 80 e 100 mmHg. 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. Para os animais dos grupos I, a coleta foi repetida nos quinze minutos finais da isquemia, para as dosagens dos mesmos parâmetros.

Um novo exame para verificar os parâmetros gasométricos foi realizado quando os valores de pCO_2 não estavam nos parâmetros aceitáveis (entre 34 e 42 mmHg). Para isso, alterações na pressão endotraqueal ou na frequência do respirador foram realizadas. A temperatura corporal foi controlada com um

termômetro digital posicionado no reto do animal e mantida entre 37 - 38°C com incidência de uma fonte de calor (lâmpada incandescente 220 V), quando necessário. Após a estabilização do animal, o procedimento cirúrgico para indução da isquemia foi iniciado.

O procedimento cirúrgico para oclusão da ACM foi iniciado com a tricotomia da região cervical anterior, incisão mediana da pele, tela subcutânea e do músculo platísmo, seguido pelo tracionamento digital lateral até a exposição do músculo esternomastóideo ínfero-lateralmente, o músculo omohióideo látero-superiormente e o músculo esternohióideo medialmente.

O campo operatório foi exposto com dois afastadores tipo gancho, com leve tração, sendo um medial e outro lateral, e fixos com esparadrapo na prancha, para facilitar a visualização das estruturas anatômicas. Posteriormente, o microscópio cirúrgico (DF – Vasconcelos) foi introduzido no campo operatório para a identificação e exposição da bainha carótica e então da artéria carótida comum esquerda (ACCE). A dissecação prosseguiu superiormente até sua bifurcação com a identificação da artéria carótida interna esquerda (ACIE) e da artéria carótida externa esquerda (ACEE).

A ACE foi dissecada no sentido cranial e seus ramos coagulados e seccionados. A ACI também foi dissecada em todo o seu trajeto extracraniano, 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 5 mm (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.

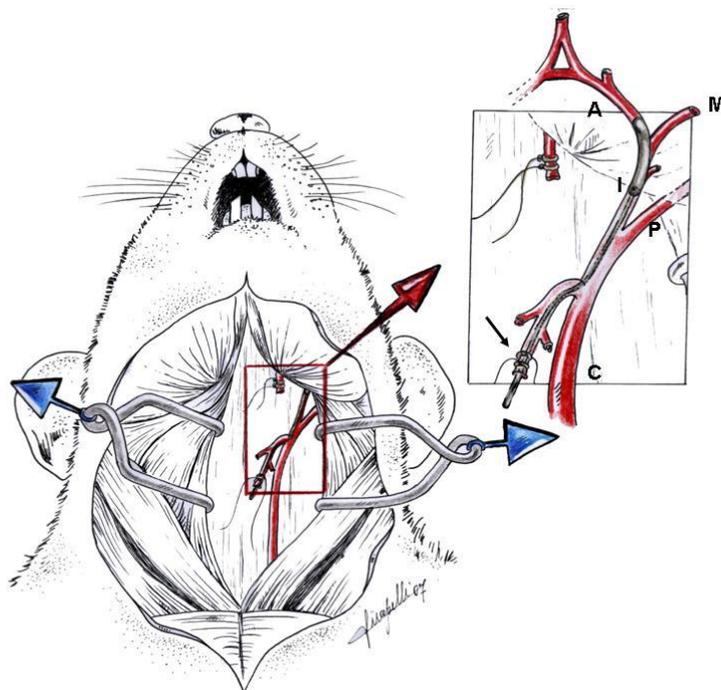


Figura 2 - A. Desenho ilustrando a posição final do fio obstruindo a origem da ACME (M) (no detalhe superior direito) e a ligadura da ACE-E na região onde foi introduzido o fio obstrutor (seta). (TIRAPELLI, 2007, COM PERMISSÃO).

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.

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 indicou que o fio penetrou o suficiente para ocluir o óstio de origem da ACM (Figura 2) (CARLOTTI; COLLI; KAZUO, 2011; KOIOSUMY *et al*, 1986).

O coto da ACE foi ligado com fio 10-0 para evitar refluxo de sangue e o microclipe da ACCE foi retirado, permitindo sua reperusão. Os animais foram mantidos em condições estáveis durante o período de isquemia. Depois de decorrido o período de 60 minutos de isquemia focal, procedeu-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. Ligou-se definitivamente o coto proximal da ACE (fio de algodão 4.0 – Ethicon), retirando-se os clampes temporários. Em seguida a pele e a tela subcutânea foram fechadas com fio mononylon 3-0.

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

Após decorrido o período de reperfusão previsto (24 horas), o animal foi anestesiado através da inalação de halotano (colocado sob uma campânula de vidro) e em seguida, foi posicionado em decúbito dorsal em uma prancha de madeira. A retirada do encéfalo foi iniciada com uma tesoura de Mayo, através de um corte transversal na região nugal para separação do crânio da coluna vertebral.

Em seguida foi efetuado um corte interorbital, seguido de um corte sagital occipito-frontal, permitindo o afastamento lateral dos ossos por meio de tração digital auxiliado por pinças hemostáticas. Dessa forma, o encéfalo foi exposto e removido após secção dos nervos cranianos, utilizando-se micropinça. Durante estes procedimentos, os encéfalos foram submetidos à irrigação contínua com soro fisiológico à 0°C em uma placa de Petri.

5.4 Programa de exercício físico em esteira

Dos quatro grupos do estudo, somente dois grupos foram submetidos a sessões de treinamento prévio ao procedimento cirúrgico de indução da isquemia.

Os animais passaram por um período de aclimatação por cinco dias com velocidades (5 a 18m/min) e durações (5 a 15 min) progressivas. O objetivo do período de adaptação foi reduzir os níveis de estresse apresentados durante a manipulação e a utilização de esteira (MANCHADO *et al*, 2005).

O protocolo é composto por um período total de 4 semanas. O aquecimento consiste 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 ficaram por 30 min sempre com 0° de inclinação (STRADECKI-COHAN, 2017).

Os animais que demonstraram quaisquer sinais de cansaço ou inadaptação ao uso da esteira, tiveram o exercício interrompido. Durante os treinos não foram utilizados choques elétricos nos animais, somente leves toques com as mãos para estimulá-los. Na situação de persistência, este animal foi retirado da esteira para que

pudesse descansar e se recuperar. O treino só recomeçou quando o animal estava completamente recuperado.

5.5 Análise da expressão gênica tecidual dos miRNA-126, miRNA-133b e do miRNA-221.

Para a análise da expressão gênica, foi obtido de cada animal um fragmento do tecido nervoso da área isquêmica (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 miRNA-126, miRNA-133b e do miRNA-221. Considerando-se as diferenças causadas por quantidades distintas de cDNA

utilizadas nas reações, os valores de CT determinados para as diferentes amostras, são normalizados. 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 Δ CT. Os valores de Δ CT 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 Δ CT de uma amostra do Δ CT do calibrador (neste caso utilizamos a média das amostras do grupo controle) resulta no $\Delta\Delta$ CT. Esta diferença, em 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 10 μ l, utilizando 5 μ l do reagente específico *Taqman Master Mix*, 0,5 μ l de cada sonda específica e 4,5 μ l 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 Δ CT. 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”.

5.6 Análise estatística

Para a avaliação da expressão dos miRNAs a análise estatística foi realizada utilizando o teste de *Kruskal-Wallis* e pós-teste de comparação múltipla de *Dunns*. Foi utilizado o programa *GraphPad Prism version 9.2 for Windows*, (GraphPad Software, San Diego – Califórnia USA), sendo considerado estatisticamente significantes valores de $p < 0.05$.

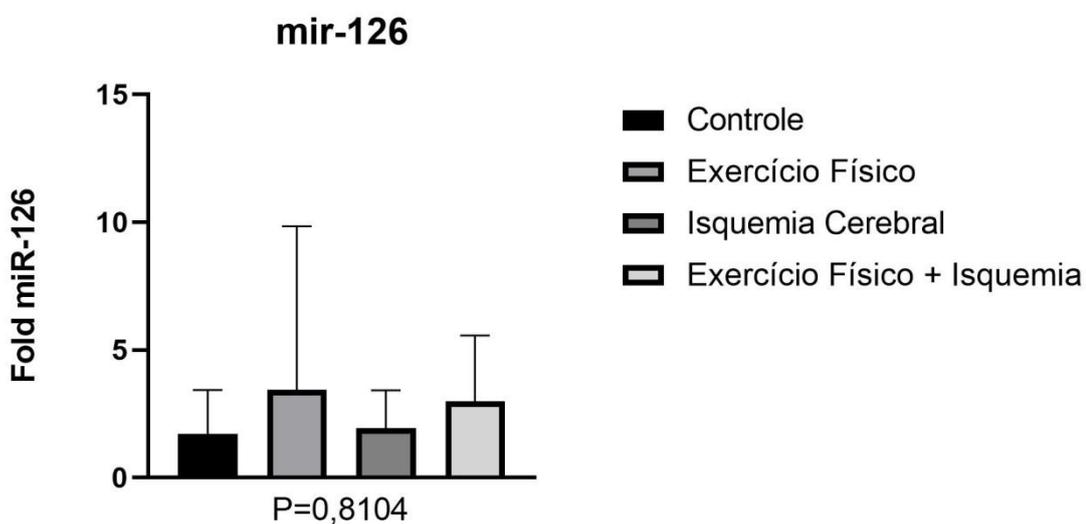
RESULTADOS

6 RESULTADOS

6.1 miRNA 126

Os resultados são apresentados a seguir, a partir de gráficos que mostram a média da expressão dos Mirs estudados nos diferentes grupos.

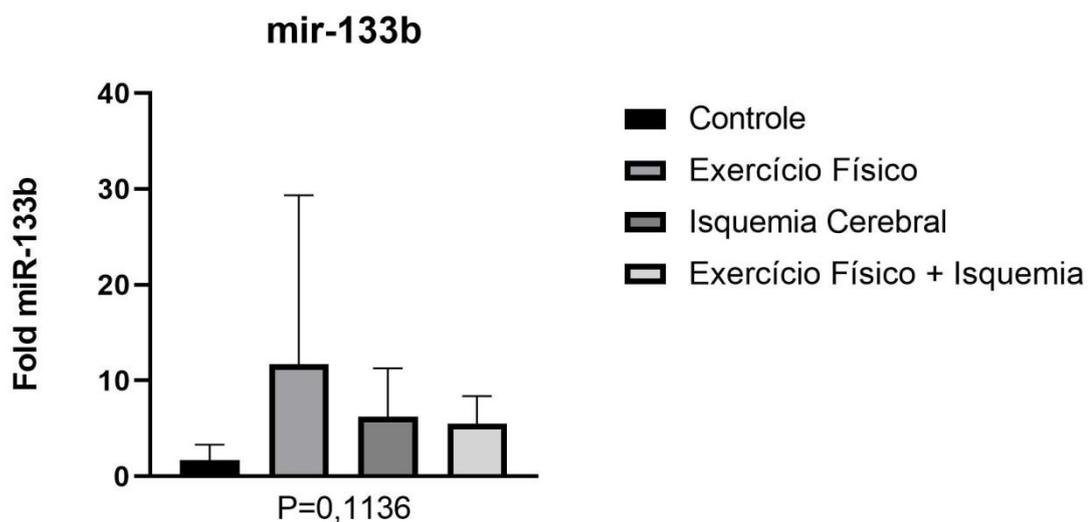
Gráfico 1. Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão do microRNA-126 entre os grupos estudados. Não houve diferença significativa entre os Grupos Controle, Exercício Físico, Isquemia Cerebral e Exercício Físico + Isquemia Cerebral ($p= 0,8104$, Kurskall Wallis test).



Fonte: Elaboração própria (software GaphPad Prism versão 9.2)

6.2 miRNA 133b

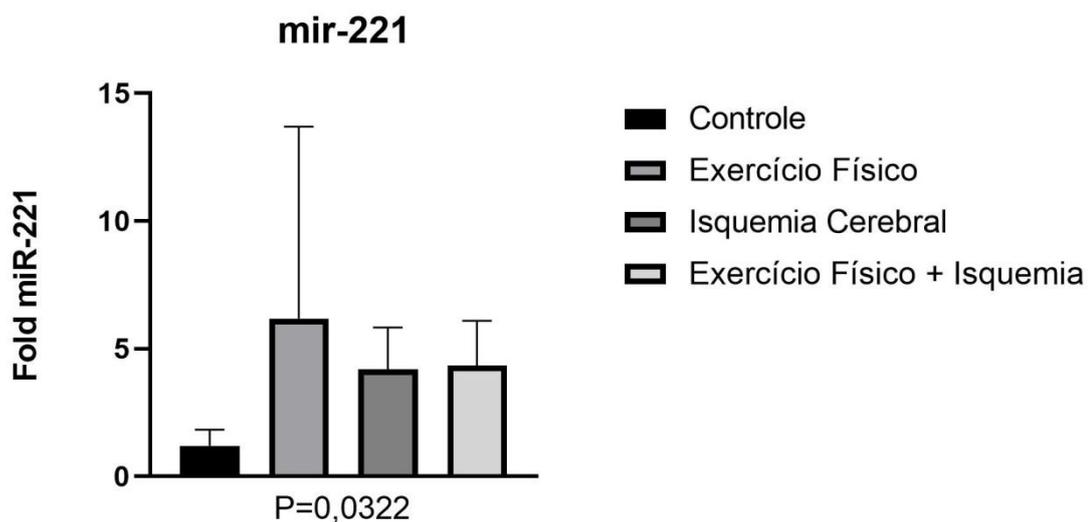
Gráfico 2. Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão do microRNA-133b entre os grupos estudados. Não houve diferença significativa entre os Grupos Controle, Exercício Físico, Isquemia Cerebral e Exercício Físico + Isquemia Cerebral ($p= 0,1136$, Kurskall Wallis test).



Fonte: Elaboração própria (software GaphPad Prism versão 9.2)

6.3 miRNA-221

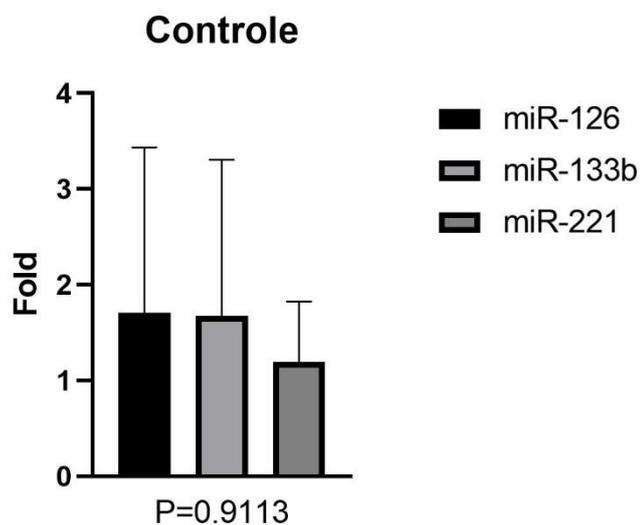
Gráfico 3. Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão do microRNA-221 entre os grupos estudados. Houve diferença significativa entre o Grupo Controle e os grupos Exercício Físico, Isquemia Cerebral e Exercício Físico + Isquemia Cerebral ($p= 0,0322$, Kurskall Wallis test, pós-teste de Dunn's).



Fonte: Elaboração própria (software GaphPad Prism versão 9.2)

6.4 Controle

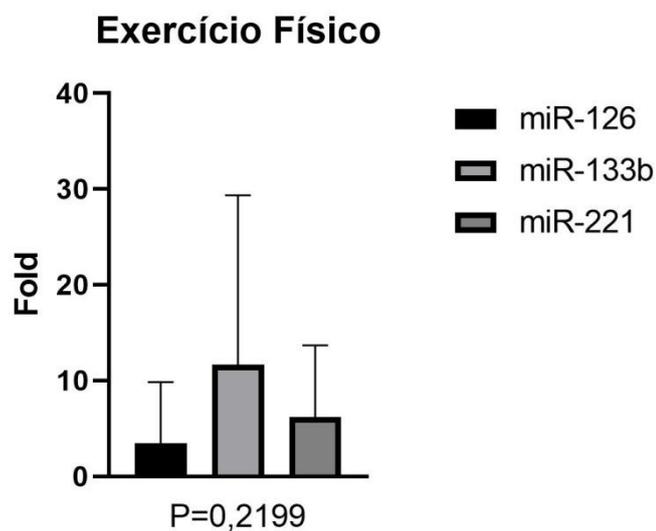
Gráfico 4. Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão dos microRNA-126, microRNA-133b, miRNA-221 no grupo controle. Não houve diferença significativa entre os Grupos Controle, Exercício Físico, Isquemia Cerebral e Exercício Físico + Isquemia Cerebral ($p= 0,9113$, Kurskall Wallis test).



Fonte: Elaboração própria (software GaphPad Prism versão 9.2)

6.5 Exercício Físico

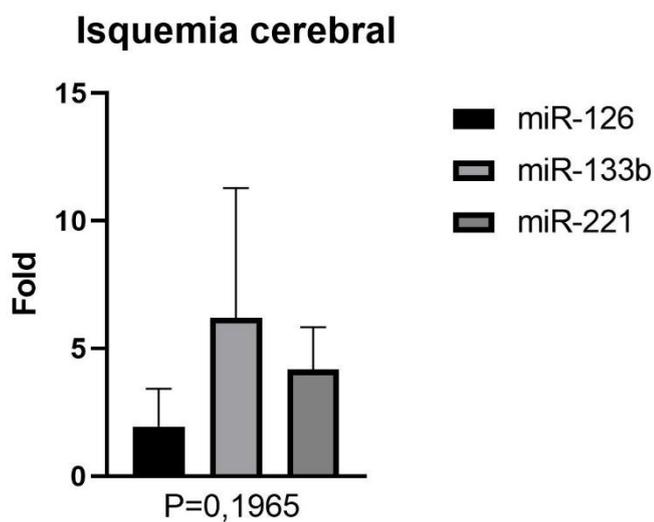
Gráfico 5. Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão dos microRNA-126, microRNA-133b, miRNA-221 no grupo Exercício Físico. Não houve diferença significativa entre os Grupos Controle, Exercício Físico, Isquemia Cerebral e Exercício Físico + Isquemia Cerebral ($p=0,2199$, Kurskall Wallis test).



Fonte: Elaboração própria (software GaphPad Prism versão 9.2)

6.6 Isquemia Cerebral

Gráfico 6. Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão dos microRNA-126, microRNA-133b, miRNA-221 no grupo Isquemia Cerebral. Não houve diferença significativa entre os Grupos Controle, Exercício Físico, Isquemia Cerebral e Exercício Físico + Isquemia Cerebral ($p= 0,1965$, Kurskall Wallis test).

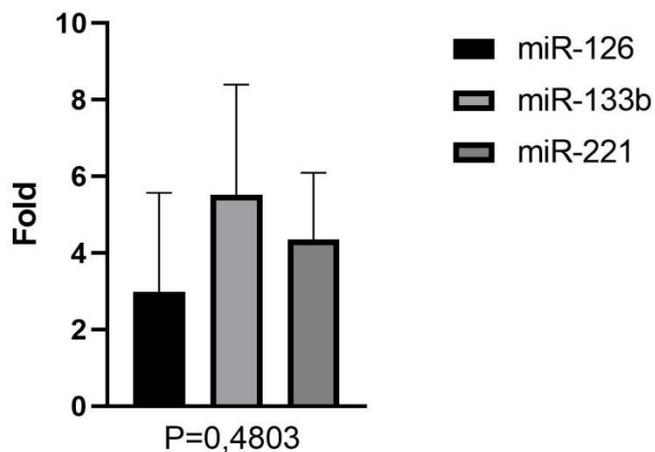


Fonte: Elaboração própria (software GaphPad Prism versão 9.2)

6.7 Exercício Físico + Isquemia Cerebral

Gráfico 7. Representação da média dos valores (\pm erro padrão) da expressão dos microRNA-126, microRNA-133b, miRNA-221 no grupo Exercício Físico + Isquemia. Não houve diferença significativa entre os Grupos Controle, Exercício Físico, Isquemia Cerebral e Exercício Físico + Isquemia Cerebral ($p= 0,4803$, Kurskall Wallis test).

Exercício Físico + Isquemia



Fonte: Elaboração própria (software GaphPad Prism versão 9.2)

DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

O MicroRNA-126 apresenta-se na literatura como um importante fator junto à patogênese do acidente vascular cerebral e doenças cardiovasculares em geral, promovendo a remodelação vascular e diminuindo a fibrose. A diminuição da expressão de MIR-126 pode contribuir para a disfunção cardíaca após acidente vascular cerebral, segundo pesquisa com camundongos submetidos à oclusão da artéria cerebral média distal (CHEN *et al.*, 2016). Esses autores observaram parâmetros hemodinâmicos e a função cardíaca em desenho experimental onde os animais passaram por eutanásia após 28 dias do evento isquêmico. Os animais exibiram prognóstico ruim em relação aos dados da função cardíaca, tais como redução significativa da fração de ejeção cardíaca e aumento da hipertrofia dos miócitos, estresse oxidativo, entre outros. Os autores também observaram que o evento isquêmico diminuiu significativamente a expressão do miR-126 no soro e no coração e aumentou os genes alvo do miR-126.

A expressão e o valor prognóstico de curto prazo da expressão do miR-126 em pacientes com acidente vascular cerebral agudo foram investigados em estudo recente por QI *et al.*; (2020). Os pacientes com condição leve ou bom prognóstico tiveram maior expressão de miR-126 quando comparado aos pacientes com condição grave ou mau prognóstico. Os autores concluíram que os níveis de expressão de miR-126 estão associados à função neurológica e prognóstico em pacientes com acidente vascular cerebral agudo.

Estudo anterior do nosso grupo de pesquisa analisou o cerebelo de ratos submetidos à oclusão da artéria cerebral média distal por 90 minutos, seguida de reperfusão por 48 horas em modelo de alcoolismo e concluiu que o miR-126 apresentou aumento de expressão no grupo isquêmico isolado e correlação com a apoptose celular nos ratos isquêmicos associado ao modelo de álcool crônico. Portanto, os danos celulares ocorreram mesmo que em áreas distantes do foco isquêmico (SILVA *et al.*; 2019).

O miR-126 também está envolvido na regulação da síntese do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). Seu papel é a regulação de importantes funções fisiológicas tais como desenvolvimento e crescimento de neurônios, apoptose, neurogênese e neuroregeneração. A redução do nível de BDNF está relacionada a neurodegeneração. O exercício físico regular de longa duração e/ou

treinamento de intensidade moderada e alta, induz um aumento do nível dos receptores BDNF nas regiões cerebrais responsáveis pela atividade motora, evitando a neurodegeneração (MATCZYNSKA *et al.*; 2019).

O exercício físico tem muitos efeitos benéficos em diferentes doenças, incluindo as cardiovasculares. A expressão de miR-126 no tecido cardíaco foi analisada por PCR em tempo real em estudo experimental com ratos sendo seu aumento relacionado à angiogênese miocárdica (GHORBANZADEH *et al.*; 2017; GHIASI *et al.*; 2020).

Em nosso estudo não observamos diferença estatística significativa do miR-126 quando comparamos os grupos estudados, mas pudemos observar que o mesmo apresentou hipoexpressão no grupo controle e no grupo isquêmico quando comparado aos outros grupos: exercício físico e exercício físico associado à isquemia, podendo sugerir um possível envolvimento desse miRNA com o exercício físico, o que corrobora com muitos estudos da literatura, incluindo o estudo de Matczynska e colaboradores (2019).

Os baixos níveis de expressão do miR-126 observados em nosso estudo no grupo isquêmico corroboram com os achados de Chen e colaboradores (2016) que também constataram a hipoexpressão desse miRNA no soro e no coração em modelo experimental de isquemia. Ainda baseado no estudo de Chen e colaboradores (2016), assim como com os achados do nosso estudo prévio de Silva e colaboradores (2019), podemos sugerir que o miR-126 apresenta um padrão de expressão não associado diretamente com o foco isquêmico mas com o tecido nervoso de uma forma geral e até mesmo sistemicamente.

O miR-133b é considerado um miRNA específico do músculo esquelético, e tem sua expressão alterada de acordo com o tipo e intensidade de treinamento físico, assim como outros miRNAs (BANZET *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2017). O miR-133b demonstrou-se hipoexpresso em modelo *in vitro* de células neuronais do hipocampo de camundongo HT22 com depleção de oxigênio e glicose, e em modelo *in vivo* de camundongos C57BL/6J submetidos a oclusão da artéria cerebral média em comparação ao grupo sham (DAI *et al.*, 2021).

Huang *et al.* (2017) utilizaram células tronco mesenquimais (CTM) como agentes terapêuticos multifuncionais para transfecção do miR-133b em ratos submetidos à oclusão da artéria cerebral média, e encontraram que as CTMs transfectadas com miR-133b aumentaram significativamente o número de astrócitos

sobreviventes e sugerem que estas aumentam a sobrevivência celular e a recuperação de células isquêmicas lesadas.

Nossos resultados apesar de não apontarem diferença estatística significativa, não corroboram com o trabalho de Dai e colaboradores (2021), pois foi possível observar aumento da expressão do miR-133b nos grupos exercício físico, isquêmico e exercício físico associado à isquemia, em comparação ao grupo controle. Portanto, podemos sugerir que possivelmente a diferença no modelo animal utilizado possa influenciar e que novos estudos precisam ser realizados a fim de investigar o potencial do miR-133b desencadeado pelo exercício físico associado à isquemia cerebral como proposto por Huang e colaboradores (2017).

Dados clínicos demonstram que os níveis de miR-221 estão reduzidos em pacientes com isquemia cerebral, indicando que esse miRNA é um biomarcador promissor e possível alvo terapêutico em pacientes com acidente vascular cerebral (PENG, 2020; SHAN *et al.* 2021; SØRENSEN, 2014; Tsai, 2013). No modelo animal de obstrução da artéria cerebral média, Shan *et al.* (2021) também observaram níveis reduzidos da expressão de miR-221 em camundongos. Por outro lado, neste mesmo estudo, foi demonstrado que o pré-tratamento com um mimetizador de miR-221, injetado intracerebroventricular, reduziu o volume do infarto cerebral e melhorou os déficits comportamentais nesse modelo animal. Esse efeito foi associado à atenuação da secreção de citocinas pró inflamatórias (IL-6, MCP-1, VCAM-1, and TNF- α), da expressão de quimiocinas (CCL2 e CLL3) e da infiltração de macrófagos e micróglia nas regiões cerebrais isquêmicas.

Recentemente Peng *et al.* (2020) demonstraram que o miR-221 está envolvido na modulação da função de células endoteliais. Os autores demonstraram que a inibição do miR-221 reduziu a viabilidade, migração e habilidade de invasão e promoveu apoptose de células endoteliais humanas da veia umbilical, enquanto o aumento do miR-221 promoveu efeito contrário por meio da regulação da via PTEN/PI3K/AKT. Sabendo-se disso, é possível inferir que a função das células endoteliais também possa exercer um papel regulatório na expressão do miR-221. O aumento do fluxo sanguíneo durante a reperfusão cerebral e exercício físico, ao promover o estiramento das células endoteliais causado pelo atrito das células sanguíneas (*shear stress*) pode ter sido um fator que estimulou o aumento dos níveis de miR-221 observados em nosso estudo. De fato, outros estudos já demonstraram que o exercício físico modula a expressão do mir-221, elevando seus

níveis em diversas situações patológicas, como por exemplo, nas doenças cardiovasculares (SOUZA, 2015; BARBER, 2019).

Em nosso estudo, não observamos redução da expressão do miR-221 nos animais submetidos à obstrução da artéria cerebral média comparado ao grupo controle. Ao contrário, foi observado aumento significativo desses níveis. Diferente dos estudos anteriores citados (PENG, 2020; SHAN *et al.* 2021; SØRENSEN, 2014; Tsai, 2013), em nosso protocolo, utilizamos o modelo de isquemia-reperfusão com oclusão de 60 minutos e perfusão de 24 horas da ACM. Assim, é possível que a perfusão tenha sido o fator responsável pela elevação da expressão do miR-221, a fim de promover um efeito neuroprotetor por meio da supressão da resposta inflamatória. Similarmente, o exercício físico promoveu aumento significativo dos níveis de miR-221 quando comparado ao grupo controle, porém; não foi detectado elevação adicional no grupo isquêmico associado ao exercício comparado ao isquêmico. Esses achados sustentam nossa hipótese de que a perfusão tenha sido o fator que promoveu a maior expressão do miR-221, assim como o exercício físico.

Nas análises de comparação dos níveis expressão entre os miRNAs também não observamos diferenças estatísticas significativas, mas o miR-126 apresentou mais expresso no controle que os miR-133b e miR-221 o que não foi observado nos demais grupos e podemos sugerir um padrão de hipoexpressão desse miRNA como observado na literatura.

Apesar de não observarmos diferença estatística, houve maior expressão do miR-221 miRNA no grupo exercício físico que pode ser observada também discretamente no grupo exercício físico associado à isquemia cerebral, o que nos leva a sugerir o envolvimento revelante da modulação desse miRNA associada ao exercício físico. O mesmo padrão de expressão associado aos grupos de exercício físico foi observado para o miR-126, também sem diferença estatística. Isso nos leva a sugerir possível especificidade desses miRNAs com o exercício físico. Entretanto, mais estudos são necessários para identificar microRNAs que tenham potencial para uso na prática clínica.

CONCLUSÃO

8 CONCLUSÃO

- Observamos diferença estatística significativa na expressão do miR-221 quando comparamos grupo o controle aos grupos estudados: exercício físico, isquemia cerebral e exercício físico associado à isquemia cerebral.
- Não observamos diferença estatística significativa na expressão dos miRNAs miR-126 e miR-133b entre os grupos estudados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, A.S.; PINHO, R.A.; **Efeitos do exercício físico sobre o estado redox cerebral**. Revista Brasileira de Medicina do Esporte, 2007.

ARYA, K.N.; PANDIAN, S.; VERMA, R.; GARG, R.K.; 2011. **Movement therapy induced neural reorganization and motor recovery in stroke: a review**. J Bodyw Mov Ther. 15:528–537 [PMID 21943628]

ARRICK, D.M.; YANG, S.; LI, C.; CANANZI, S.; MAYHAN, W.G.; **Vigorous exercise training improves reactivity of cerebral arterioles and reduces brain injury following transient focal ischemia**. Microcirculation, v. 21, n.6, p.516-523, 2014.

BANZET, S.; CHENNAOUI, M.; GIRARD, O.; RACINAIS, S.; DROGOU, C.; CHALABI, H.; KOULMANN, N. **Changes in circulating microRNAs levels with exercise modality**. J Appl Physiol (1985). 2013 Nov 1;115(9):1237-44. doi: 10.1152/jappphysiol.00075.2013. Epub 2013 Aug 15.

BARBER, J.; ZELLARS, K.N.; BARRINGHAUS, K.G.; BOUCHARD, C.; SPINALE, F.G.; SARZYNSKI, M.A. **The Effects of Regular Exercise on Circulating Cardiovascular-related MicroRNAs**. Scientific Reports. 2019. 9:7527.https://doi.org/10.1038/s41598-019-43978-x

CARLOTTI JR, C.G.; COLLI BO, KAZUO JY. **Avaliação da isquemia cerebral pela respiração mitocondrial**. Arquivos Neuropsiquiatria. v. 59, p. 365-371, 2001.

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.

CHEN, L.; WANG, J.; WANG, B.; YANG, J.; GONG, Z.; ZHAO, X.; ZHANG, C. **MiR-126 inhibits vascular endothelial cell apoptosis through targeting PI3K/Akt signaling**. Ann Hematol 95:365–374, 2016

CHIEFFI, S.; MESSINA, G.; VILLANO, I.; MESSINA, A.; VALENZANO, A.; MOSCATELLI, F.; SALERNO, M.; SULLO, A.; AVOLA, R.; MONDA, V.; CIBELLI, G.; MONDA, M. **Neuroprotective Effects of Physical Activity: Evidence from Human and Animal Studies**. Front Neurol. 2017 May 22;8:188. doi: 10.3389/fneur.2017.00188.

CHO, E.Y, et al. **Apoptosis of enterocytes and nitration of junctional complex proteins promote alcohol-induced gut leakiness and liver injury**. Journal of hepatology. v. 69, n.1, p. 142-153, 2018

CHONG, J.Y.; SACCO, R.L. **Epidemiology of Stroke in Young Adults: Race/Ethnic Differences.** Journal of Thrombosis and thrombolysis, v. 20, n.2,p. 77-83, 2005

CHUNG, J.Y.; KIM, M.W.; BANG, M.S.; KIM, M. **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.

COTMAN, C.W.; BERCHTOLD, N.C. **Exercise: a behavioral interentionto enhance brain health and plasticity,** Trends in neurosciences, v. 25, n.6, p. 295-301, 2002.

CROCE, C.M.; CALIN, G.A. **miRNAs, cancer, and stem cell division.** Cell 2005;122: 6-7.

CUI, S. et al. **Time-course responses of circulating microRNAs to three resistance training protocols ins healthy young men.** Scientific Reports. 7, 2203, 2017

DAI, Q.; MA, Y.; XOU, Z.; ZHANG, L.; YANG, H.; LIU, Q.; WANG, J. **Downregulation of circular RNA HECTD1 induces neuroprotection against ischemic stroke through the microRNA-133b/TRAF3 pathway.** Life Sciences 264, 2021

DAMÁZIO, L.C.M.; MELO, R.T.R.; LIMA, M.C.; PEREIRA, V.G.; RIBEIRO R.I.M.A.; ALVES, N.R.; MONTEIRO, B.S.; NATALI, A.J.; DEL CARLO, R.J.; COSTA MALDONADO, I.R.S.C.; **Physical exercise promotes neuroprotection structural and functional in rats with cerebral ischemia .** Revista Neurociencias, v. 23, n. 4, p. 581–588, 2015.

DE SMAELE, E.; FERRETTI, E.; GULINO, A. **MicroRNAs as biomarkers for CNS cancer and other disorders.** Brain Res, v. 1338, p. 100-11, Jun 2010. ISSN1872-6240. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899310007663>>

DENHAM, J.; PRESTES, P.R. **Muscle-Enriched MicroRNAs Isolated from Whole Blood Are Regulated by Exercise and Are Potential Biomarkers of Cardiorespiratory Fitness.** Front Genet, v. 15, n7, 2016.

DOGINI, D.B.; AVANSINI, S.H.; VIEIRA, A.S.; LOPES-CENDES, I. **MicroRNA regulation and dysregulation in epilepsy.** Front Cell Neurosci, v. 7, p. 172, Oct 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24109432> >.

DORNBOS, D. 3RD.; ZWAGERMAN, N.; GUO, M.; DING, J.Y.; PENG, C.; ESMAIL, F.; SIKHARAM, C.; GENG, X.; GUTHIKONDA, M.; DING, Y. **Preischemic exercise reduces brain damage by ameliorating metabolic disorder in ischemia/reperfusion injury.** J Neurosci Res 91:818–827. 2013. [PMID 23553672].

DURUKAN, A.; TATLISUMAK, T. **Acute ischemic stroke: Overview of mayor experimental rodend models pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia.** Pharmacology, Biochemistry and Behavior 87: 179-197, 2007

FEIGIN, V.L.; FOROUZANFAR, M.H.; KRISHNAMURTHI, R.; MENSAH, G.A.; CONNOR, M.; BENNETT, D.A.; **Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study 2010 (GBD 2010) and the GBD Stroke Experts Group. Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010.**

FERNANDES. J.; ARIDA, R.M.; GOMEZ-PINILLA, F. **Physical exercise as an epigenetic modulator of brain plasticity and cognition.** Neurosci Biobehav Rev. 2017 Jun 27;80:443-456. doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.06.012. [Epub ahead of print]

GARBUZOVA-DAVIS, S.; RODRIGUES. C.O.M.; HERNANDEZ-ONTIVEROS, D.G.; TAJIRI, N.; FRISINA-DEYO, A.; BOFFELI, S.M.; ABRAHAM, J.V.; PABON, M.; WAGNER, A.; ISHIKAWA, H.; SHINOZUKA, K.; HALLER, E.; SANBERG, P.R.; KANEKO, Y.; BORLONGAN, C.V.. **Blood-Brain Barrier Alterations Provide Evidence of Subacute Diaschisis in an Ischemic Stroke Rat Model.** PLoS ONE, v. 8, n. 5, 2013.

GBD. **Global, regional, and national burden of stroke, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Stydy 2019.** The Lancet 18, 439-58, 2019

GHIASI, R.; ALIHEMMATI, A.; NADERI, R. **The impacts of garlic and voluntary training alone or together on myocardial miR-126 and miR-210 gene expressions and angiogenesis in healthy rats.** J Cardiovasc Thorac Res. 2020;12(3):195-202. doi: 10.34172/jcvtr.2020.33. Epub 2020 Aug 31. PMID: 33123325; PMCID: PMC7581846.

GHORBANZADEH, V.; MOHAMMADI, M.; DARIUSHNEJAD, H.; ABHARI, A.; CHODARI, L.; MOHADDES, G. **Cardioprotective Effect of Crocin Combined with Voluntary Exercise in Rat: Role of Mir-126 and Mir-210 in Heart Angiogenesis.** Arq Bras Cardiol. 2017 Jul;109(1):54-62. doi: 10.5935/abc.20170087. Epub 2017 Jun 29. PMID: 28678929; PMCID: PMC5524476.

GORINI, G.; NUNEZ, Y.O.; MAYFIELD, R.D.; **Integration of miRNA and protein profiling reveals coordinated neuroadaptations in the alcohol-dependent mouse brain.** PLoS One, n. 8, v. 12, 2013

HU, H.J.; SONG, M. **Disrupted ionic homeostasis in ischemic stroke and new therapeutic targets**. Journal of stroke and cerebrovascular diseases. v. 26, n.23, 2706-2719, 2017

HUANG, B.; JIANG, X.C.; ZHANG, T.Y.; HU, Y.L.; TABATA, Y.; CHEN, Z.; PLUCHINO, S.; GAO, J.Q. **Peptide modified mesenchymal stem cells as targeting delivery system transfected with miR-133b for the treatment of cerebral ischemia**. Int J Pharm. 2017 Oct 5;531(1):90-100. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.08.073. Epub 2017 Aug 18.

HUI, A.; HOW, C.; ITO, E.; LIU, F.F. **Micro-RNAs as diagnostic or prognostic markers in human epithelial malignancies**. BMC Cancer, v. 11, p. 500, Nov 2011. ISSN 1471-2407. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3260334/pdf/1471-2407-11-500.pdf>

KERR, J.F.R. **History of events leading to the formulation of the apoptosis concept**. Toxicology, v.181-182 p. 471-474, 2002

KERR, J.F.R.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. **Apoptosis: A Basic Biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics**. Br. Journal Cancer. v. 26, p. 239-257, 1972

KOIOSUMI, J.; YOSHIDA, Y.; NAKAZAA, T.; ONEDA, G. **Experimental studies os ischemic brain edema. 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in wich recirculation can be introduced in the ischemic area**. Jpn. J. Stroke, v. 8, p. 1-8, 1986

KRAMER, A.F.; ERICKSON, K.I.; COLCOMBE, S.J. **Exercise, cognition and the aging brain**. Journal of Appl. Physiology. v.101, p. 1237-1242, 2006

LAWLER, S.;CHIACCA, A.**Emerging functions of microRNAs in glioblastoma**. J Neurooncol,v.92, p.297-306,2009

LI, F.; SHI, W.; ZHAO, E.Y.; GENG, X.; LI, X.; PENG, C.; SHEN, J.; WANG, S.; DING, Y.; **Enhanced Apoptosis From Early Physical Exercise Rehabilitation Following Ischemic Stroke**. Journal of Neuroscience Research 95:1017–1024, 2017.

LIEBELT, B.; PAPAPETROU, P.; ALI, A.; GUO, M.; JI, X.; PENG, C.; ROGERS, R.; CURRY, A.; JIMENEZ, D.; DING, Y.;. **Exercise preconditioning reduces neuronal apoptosis in stroke by up-regulating heat shock protein-70 (heat shock protein-72) and extracellular-signal-regulated-kinase 1/2**. Neuroscience, v. 166, n. 4, p. 1091–1100, 2010.

LOVATEL, G.A.; BERTOLDI, K.; ELSNERB, V.R.; PIAZZA, F.V.; BASSO, C.G.; MOYSÉS, F.D.O.S.; WORM, P.V.; NETTO, C.A.; MARCUZZO, S.; SIQUEIRA, I.R. **Long-term effects of pre and post-ischemic exercise following global cerebral ischemia on astrocyte and microglia functions in hippocampus from Wistar rats.** Brain Research, v. 1587, n. 1, p. 119–126, 2014.

MANCHADO, F.B.; GOBATTO, C.A.; CONTARTEZE, R.V.L.; PAPOTI, M.; MELLO, M.A.R. **Maximal lactate steady in running rats.** JEP Online; 8:4-11.2005

MAŁCZYŃSKA, P.; PIOTROWICZ, Z.; DRABAREK, D.; LANGFORT, J.; CHALIMONIUK, M. ROLA mózgowego czynnika neurotroficznego (BDNF) w procesach neurodegeneracji oraz w mechanizmach neuroregeneracji wywołanej wzmożoną aktywnością fizyczną [**The role of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in neurodegenerative processes and in the neuroregeneration mechanisms induced by increased physical activity**]. Postepy Biochem. 2019 Mar 22;65(1):2-8. Polish. doi: 10.18388/pb.2019_251. PMID: 30901514.

MENG, Y.; WANG, W.; KANG, J.; WANG, X.; SUN, L. **Role of the PI3K/AKT signalling pathway in apoptotic cell death in the cerebral cortex of streptozotocin-induced diabetic rats.** Experimental and Therapeutic Medicine. 13; 2417-2422, 2017

MIRZAEI, H. et al. **MicroRNA: Relevance to stroke diagnosis, prognosis, and therapy.** Journal of Cellular Physiology, v. 233, p 856-865, 2018

NEEPER, S.A.; GÓMEZ-PINILLA, F.; CHOI, J.; COTMAN, C.W. **Physical activity increases mRNA for Brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor in rat brain.** Brain research , v. 726, p.49-56, 1996

OMS - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. PAHO *website*. https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5692:oms-lanca-plano-de-acao-global-sobre-atividade-fisica-para-reduzir-comportamento-sedentario-e-promover-a-saude&Itemid=839 .Acesso em 11/10/2019 às 07h55

PAN, J.; QU, M.; LI, Y.; WANG, L.; ZHANG, L.; WANG, Y.; TANG, Y.; TIAN, H.; ZHANG, Z.; YANG, G. **MicroRNA-126-3p/-5p Overexpression Attenuates Blood-Brain Barrier Disruption in a Mouse Model of Middle Cerebral artery Occlusion.** Stroke. 51:619-627. 2020. DOI 10.1161/STROKEAHA.119.027531.

PANG, Q. et al. **Role of caveolin-1/vascular endothelial growth factor pathway in basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis and neurogenesis after treadmill training following focal cerebral ischemia in rats.** Brain Research, v. 1663, p.9-19, 2017.

PAREJA-GALEANO H, et al. **Impact of exercise training on neuroplasticity-related growth factors in adolescents.** J Musculoskelet Neuronal Interact., v. 13, n. 3, p 368-371

PASPARAKIS, M.;VANDERNABELLE, P.**Necroptosis and its role in inflammation TL - 517.** Nature, v.517 VN, n. 7534, p311-320, 2015.

PATEL, R.A.G.; MCMULLEN, P.W. **Neuroprotection in the treatment os acute ischemic stroke,** Progress in cardiovascular diseases, v.59, p. 542-548, 2017

PENG, H.; YANG, H.; XIANG, X.; LI, S. **MicroRNA-221 participates in cerebral ischemic stroke by modulating endothelial cell function by regulating the PTEN/PI3K/AKT pathway.** Experimental and Therapeutic Medicine. 19: 443-450, 2020.

PORKKA, P.K.; PFEIFFER, J.M.; ALTERING, K.K.; VESSELLA, L.R.; TAMMELA, J.L.T.; VISAKORP,T. **MicroRNA Expression profiling in Prostate Cancer.** Cancer Res, v.67, p.6130-6135, 2007

QI, R.; LIU, H.; LIU, C.; Xu, Y.; LIU, C. **Expression and short-term prognostic value of miR-126 and miR-182 in patients with acute stroke.** Exp Ther Med. 2020 Jan;19(1):527-534. doi: 10.3892/etm2019.8227. Epub 2019 Nov 21. PMID: 31897098; PMCID: PMC6923740.

RAJSIC, S.; GOTHE, H.; BORBA, H.; SROCZYNSKI, G.; VUJICIC, J.; TOELL, T.; SIEBERT, U. **Economic burden of stroke: a systematic review on post-stroke care. The European Journal of Health Economics.** 20: 107-134, 2020.

SANDERSON, T.H.; REYNOLDS, C.A.; KUMAR, R.; PRZYLENK, K.; HUTTEMANN, M. **Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury i brain; Pivotal Role of the Mitochondrial Membrane Potential in Reactive Oxygen Species Genaration.** Mol Nerubology, v. 47(1), p. 9-23, 2013

SHAMSAEI, N.; ERFANI, E.; FEREDONI, M.; SHAHBAZI, A. **Exercise preconditioning exhibits neuroprotective effects on hippocampal CA1 neuronal damage after cerebral ischemia.** Neural Regeneration Research, v. 10, n. 8, p. 1245–1250, 2015.

SHAN, Y.; HU, J.; LV, H.; CUI, X.; DI, W. **miR-221 Exerts Neuroprotective Effects in Ischemic Stroke By Inhibiting the Proinflammatory Response.** Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases. 30: 1-9, 2021.

SHI, X.F., et al. **miRNA-486 regulates angiogenic activity and survival of mesenchymal stem cells under hypoxia though modulating AKT signal.** Biochemical and biophysical research Communications.v. 47, p. 670-677, 2016.

SILVA, G.J.J.; BYE, A.; EL AZZOUZI, H.; WISLØFF, U. **MicroRNAs as Important Regulators of Exercise Adaptation**. *Prog Cardiovasc Dis*. 2017 Jun-Jul;60(1):130-151. doi: 10.1016/j.pcad.2017.06.003. Epub 2017 Jun 28.

SILVA, J.P.D.; LIZARTE NETO, F.S.; CIRINO, M.L.A.; CARVALHO, C.A.M.; CARLOTTI, C.G. JR.; COLLI, B.O.; TIRAPELLI, D.P.D.C.; TIRAPELLI, L.F. **Analysis of Caspase-9 protein and microRNAs miR-21, miR-126 and miR-155 related to the apoptosis mechanism in the cerebellum of rats submitted to focal cerebral ischemia associated with an alcoholism model**. *Arq Neuropsiquiatr*. 2019 Oct 24;77(10):689-695. doi: 10.1590/0004-282X20190126. PMID: 31664344.

SOUZA, R.W.A.; FERNANDEZ, G.J.; CUNHA, J.P.Q.; PIEDADE, W.P.; SOARES, L.C.; SOUZA, P.A.T.; DE CAMPOS, D.H.S.; OKOSHI, K.; CICOGNA, A.C.; DAL-PAI-SILVA, M.; CARVALHO, R.F. **Regulation of cardiac microRNAs Induced by aerobic exercise training during heart failure**. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.2015. 309. H1629 –H1641.

SØRENSEN, S.; NYGAARD, A.; NIELSEN, M.; JENSEN, K.; CHRISTENSEN, T. **miRNA Expression Profiles in Cerebrospinal Fluid and Blood of Patients with Acute Ischemic Stroke**. *Transl. Stroke Res*. 2014. doi:10.1007/s12975-014-0364-8

SPYCHALA, M.S.; HONARPISHEH, P.; MCCULLOUGH, L.D.; **Sex Differences in Neuroinflammation and Neuroprotection After Ischemic Stroke**. *Journal of Neuroscience Res*. v.95, n.1-2, p. 462-471.

STRADECKI-COHAN, H.M.; YOUNG, M.; COHAN, C.H.; SAUL, I.; GARVIN, A.A.; PEREZ, E.; DAVE, K.; WRIGHT, C.B.; SACCO, R.L.; PEREZ-PINZON, M.A. **Physical Exercise Improves Cognitive Outcomes in 2 Models of Transient Cerebral Ischemia**. *Stroke*. 48(8): 2306-2309,2017.

TIRAPELLI, L.F. et al. **Apoptosis in Glioma cells treated with PDT**. *Photomedicine and Laser Surgery*, v.29, n.5, p. 305-309, 2011

TSAI, P.; LIAO, Y.; WANG, Y.; LIN, H.; LIN, R.; JUO, S. **Serum microRNA-21 and microRNA-221 as potential biomarkers for cerebrovascular disease**. *J. Vasc. Res*. 2013 (50) 346-354. DOI 10.1159/000351767

VOSS, M.W. et al. **Neurobiological markers os exercise-related brain plasticity in older adults**. *Brain Behav Immun*, v28, p.90-99, 2013.

WANG, J.; LIU, H.; CHEN, S.; ZHANG, W.; CHEN, Y.; YANG, Y. **Moderate exercise has beneficial effects on mouse ischemic stroke by enhancing the functions of circulating endothelial progenitor cell-derived exosomes**. *Experimental Neurology*, 330. 2020

WURZ, A.; BRUNET, J.; **The Effects of Physical Activity on Health and Quality of Life in Adolescent Cancer Survivors: A Systematic Review**, JMIR Cancer, v.24 n. 1, 2016.

YEH, H.; STONE, J.A.; CHURCHILL, S.M.; BRYMER, E; DAVIDS, K. **Physical and Emotional Benefits of Diferente Exercise Environments Designed for Treadmill Running**. International Journal of Environmental Research and Public Health v. 14, n. 7, p. 752, 2017.

ZAGHLOUL, N. et al. **Overexpression of extracellular superoxide dismutase protects against brain injury induced by chronic hypoxia**. PLoS ONE, v.9, n.9. p. 1-11, 2014

ZHOU, Q.; SHI, C.; LV, Y.; ZHAO, C.; JIAO, Z.; WANG, T. **Circulating microRNAs in Response to Exercise Training in Healthy Adults**. Frontiers in Genetics, 2016 11:262. doi: 10.3389/fgene.2020.00256