

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO NA MIOPATIA MUSCULAR
ESQUELÉTICA INDUZIDA PELA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA:
PARTICIPAÇÃO DOS MICRORNAS NO PERFIL DE FIBRAS

Bruno Rocha de Avila Pelozin

São Paulo

2022

BRUNO ROCHA DE AVILA PELOZIN

EFEITO DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO NA MIOPATIA MUSCULAR
ESQUELÉTICA INDUZIDA PELA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA:
PARTICIPAÇÃO DOS MICRORNAS NO PERFIL DE FIBRAS
VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada à Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (EEFE-USP), como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Estudos Biodinâmicos da Educação Física e Esporte.

Orientador: Prof. Dr. Tiago Fernandes

São Paulo

2022

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

Pelozin, Bruno Rocha de Avila
Efeito do Treinamento Físico Aeróbico na Miopatia Muscular
Esquelética Induzida pela Insuficiência Cardíaca: participação dos
microRNAs no perfil de fibras / Bruno Rocha de Avila Pelozin. – São
Paulo: [s.n.], 2022. 136p.

Dissertação (Mestrado) - Escola de Educação Física e Esporte da
Universidade de São Paulo.
Orientador: Prof. Dr. Tiago Fernandes

1. Treinamento físico aeróbico 2. Insuficiência cardíaca 3. microRNAs
I. Título

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: PELOZIN, Bruno Rocha de Avila.

Título: Efeito do Treinamento Físico Aeróbio na Miopatia Muscular Esquelética Induzida pela Insuficiência Cardíaca: participação dos microRNAs no perfil de fibras.

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

Data: ____/____/____.

Banca Examinadora:

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ **Julgamento:** _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ **Julgamento:** _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ **Julgamento:** _____

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** – Contribuição dos sistemas na redução da função e capacidade física em pacientes com insuficiência cardíaca. Musc: musculatura. Adaptado de Del Buono e colaboradores (2019). 29
- FIGURA 2** – Desenho do protocolo experimental. PA: pressão arterial; FC: frequência cardíaca; VO₂: consumo de oxigênio; n: número de amostra..... 43
- FIGURA 3** – Visão esquemática do protocolo de TFA de natação. MC: massa corporal. 44
- FIGURA 4** – Aparato de treinamento físico de natação para ratos..... 44
- FIGURA 5** – Análise microscópica de corte histológico do músculo sóleo avaliado por imunohistoquímica. Laminina marcada em verde identificada a lâmina basal da fibra muscular, MHC-I β marcada em vermelho identifica as fibras do tipo I, as escuras tipo II e as mescladas as intermediárias e o Hoechst marcado em azul identificada os núcleos das fibras..... 51
- FIGURA 6** – Análise de integridade do RNA do músculo sóleo por eletroforese em gel de agarose. 55
- FIGURA 7** – Progressão da hipertensão arterial e desenvolvimento da insuficiência cardíaca. Desenho experimental **(A)**; Valores pré e pós protocolo de TFA da Pressão Arterial Sistólica **(B)**; Dados ecocardiográficos de massa do ventrículo esquerdo (VE), fração de ejeção do VE e fração de encurtamento VE (FS) **(C)**; Imagem representativa do ecocardiograma **(D)**; Dados de edema pulmonar e hepático **(E)**; Quociente respiratório, linha tracejada vermelha representa a média pós TFA (MPT) **(F)**; Valores pré e pós protocolo de TFA do consumo de oxigênio (VO₂) pico **(G)**; VO₂ durante o teste máximo pós TFA. Área pontilhada em verde representa a diferença dos grupos treinados **(H)**; Frequência cardíaca (FC) de repouso pós TFA **(I)**. Grupos: Wky (n=10), indica ratos Wistar Kyoto sedentários; Wky-T (n=9), Wistar Kyoto treinados; Shr-IC (n=10), ratos espontaneamente hipertensivos sedentários insuficientes cardíacos; Shr-IC-T (n=9), ratos espontaneamente hipertensivos sedentários insuficientes cardíacos treinados. Cada ponto representa uma amostra biológica. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. \$Pré-TFA vs Pós-TFA, p < 0,05; * vs WKY, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001; ****, p < 0,0001; ‡ vs SHR-IC, p < 0,01; ‡‡, p < 0,0001. 67
- FIGURA 8** – Mudanças fenotípicas musculares na insuficiência cardíaca. Massa muscular esquelética do músculos selecionados **(A)**; Massa dos tecidos adiposos **(B)**;

Conteúdo de triglicerídeo muscular do músculo sóleo **(C)**; Expressão gênica de miosinas de cadeia pesada (Myh) 1 a 7 **(D)**; Imagem representativa e análise histológica para distribuição de tipo de fibra **(E)**; Área de secção transversa da fibra muscular do tipo I **(F)** e tipo II **(G)**. Grupos: Wky (n=9), indica ratos Wistar Kyoto sedentários; Wky-T (n=9), Wistar Kyoto treinados; Shr-IC (n=9), ratos espontaneamente hipertensivos sedentários insuficientes cardíacos; Shr-IC-T (n=9), ratos espontaneamente hipertensivos sedentários insuficientes cardíacos treinados. Cada ponto representa uma amostra biológica. Os resultados estão expressos como média ± EPM. * vs WKY, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001; ****, p < 0,0001; † vs SHR-IC, p < 0,05; ‡, p < 0,01; ††, p < 0,001; ‡‡, p < 0,0001. 70

FIGURA 9 – Mudanças metabólicas musculares na insuficiência cardíaca. Quantidade de ATP na musculatura esquelética **(A)**; Quantidade de lactato plasmático **(B)**; Expressão de genes envolvidos no metabolismo glicolítico e oxidativo **(C)**; Atividade enzimática **(D)**; Conteúdo mitocondrial **(E)**; Respiração mitocondrial de fibras isoladas **(F)**; Expressão proteica dos complexos mitocondriais (I-V) **(G)**. Grupos: Wky (n=9), indica ratos Wistar Kyoto sedentários; Wky-T (n=9), Wistar Kyoto treinados; Shr-IC (n=9), ratos espontaneamente hipertensivos sedentários insuficientes cardíacos; Shr-IC-T (n=9), ratos espontaneamente hipertensivos sedentários insuficientes cardíacos treinados. Cada ponto representa uma amostra biológica. Os resultados estão expressos como média ± EPM. * vs WKY, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001; ****, p < 0,0001; † vs SHR-IC, p < 0,05; ‡, p < 0,01; ††, p < 0,001. 73

FIGURA 10 – Expressão de miRNAs alterados na insuficiência cardíaca e corrigidos pelo treinamento físico aeróbio. Vulcano plot da expressão dos miRNAs insuficiência comparado ao controle **(A)**; miRNAs diferencialmente expresso nos grupos experimentais comparado ao controle **(B)**; A análise de componentes principais (PCA) da expressão dos miRNAs dos grupos experimentais em comparação ao controle **(C)**; *Heatmap* dos miRNAs alterados pela IC e corrigidos estatisticamente pelo treinamento físico aeróbio **(D)**; Vias de processos biológicos enriquecidas, dos genes alvos dos miRNAs **(E)**; Análise do número de alvos para cada miRNA selecionado **(F)**; Confirmação da expressão dos miRNAs selecionados por RT-qPCR **(G)**; Correlação entre a expressão dos miRNAs e o consumo de oxigênio (VO₂) pico **(H)**. Grupos: Wky, indica ratos Wistar Kyoto sedentários; Wky-T, Wistar Kyoto treinados; Shr-IC, ratos espontaneamente hipertensivos sedentários insuficientes cardíacos; Shr-IC-T, ratos espontaneamente hipertensivos sedentários

insuficientes cardíacos treinados. Foram utilizado 3 amostras por grupo para realizar as análises de *microarray* e 9 amostras para as demais análises. Cada ponto representa uma amostra biológica. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * vs WKY, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ****, $p < 0,0001$; † vs SHR-IC, $p < 0,05$; ‡, $p < 0,01$ 77

FIGURA 11 – Expressão proteica da via PCG1 α – PPAR β/δ – miRNAs-208b e -499 na regulação da MHC- β . Análise bioestatística da predição dos alvos do miRNAs-205 e -499 **(A)**; Expressão gênica dos reguladores do metabolismo **(B)**; Expressão proteica da via PCG1 α – PPAR β/δ – miRNAs-208b e -499 na regulação da MHC- β **(C)**. Grupos: Wky (n=8), indica ratos Wistar Kyoto sedentários; Wky-T (n=8), Wistar Kyoto treinados; Shr-IC (n=8), ratos espontaneamente hipertensivos sedentários insuficientes cardíacos; Shr-IC-T (n=8), ratos espontaneamente hipertensivos sedentários insuficientes cardíacos treinados. Cada ponto representa uma amostra biológica. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * vs WKY, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; † vs SHR-IC, $p < 0,05$ 80

FIGURA 12 – Expressão dos miRNAs alvos em pacientes insuficientes cardíacos. Desenho experimental **(A)**; Expressão dos miRNAs **(B)**; Correlação entre a expressão dos miRNAs com o consumo de oxigênio VO₂ máximo atingido no teste de esforço **(C)**. Grupos: Controle (n=10), indica voluntários saudáveis sedentários; IC (n=10), pacientes com insuficiência cardíaca sedentários; IC-TR (n=10), pacientes com insuficiência cardíaca treinados. Cada ponto representa uma amostra biológica. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ 83

FIGURA 13 – Papel do treinamento físico aeróbio na regulação do fenótipo e metabolismo na miopatia muscular esquelética induzida pela insuficiência cardíaca por meio do eixo de regulação dos miRNAs-205 e 328a. 109

FIGURA S1 – Valores hemodinâmicos e do teste máximo. Pressão arterial diastólica **(A)**; Pressão arterial média **(B)**; Distância percorrida durante o teste máximo em metros **(C)**. Todos os resultados representam os dados pré e pós TFA. Grupos: Wky (n=10), indica ratos Wistar Kyoto sedentários; Wky-T (n=9), Wistar Kyoto treinados; Shr-IC (n=10), ratos espontaneamente hipertensivos sedentários insuficientes cardíacos; Shr-IC-T (n=9), ratos espontaneamente hipertensivos sedentários insuficientes cardíacos treinados. Cada ponto representa uma amostra biológica. Os resultados

estão expressos como média \pm EPM. \$\$Pré-TFA vs Pós-TFA, $p < 0,01$; *** vs WKY, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$; $\ddagger\ddagger$ vs SHR-IC, $p < 0,0001$ 129

FIGURA S2 – Massa corporal em gramas **(A)**; Acompanhamento da massa corporal durante o protocolo **(B)**. Grupos: Wky (n=10), indica ratos Wistar Kyoto sedentários; Wky-T (n=9), Wistar Kyoto treinados; Shr-IC (n=10), ratos espontaneamente hipertensivos sedentários insuficientes cardíacos; Shr-IC-T (n=9), ratos espontaneamente hipertensivos sedentários insuficientes cardíacos treinados. Cada ponto representa uma amostra biológica. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. 130

FIGURA S3 – Análises de bioinformática. Vias enriquecidas para os miRNAs diferencialmente expressos na insuficiência cardíaca e recuperados pelo treinamento físico **(A)**; Vias enriquecidas para os genes alvos do cluster de miRNAs não selecionados **(B)**; Correlação entre a expressão dos miRNAs e o tipo de fibra muscular **(C)**. 131

FIGURA S4 – Metabolismo do músculo esquelético. Respiração média mitocondrial na fibra isolada **(A)**; Razão controle respiratório **(B)**; Expressão de genes dos complexos mitocondriais **(C)**. Todos os resultados representam os dados pré e pós TFA. Grupos: Wky (n=10), indica ratos Wistar Kyoto sedentários; Wky-T (n=9), Wistar Kyoto treinados; Shr-IC (n=10), ratos espontaneamente hipertensivos sedentários insuficientes cardíacos; Shr-IC-T (n=9), ratos espontaneamente hipertensivos sedentários insuficientes cardíacos treinados. Cada ponto representa uma amostra biológica. Os resultados estão expressos como média \pm EPM..... 130

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** – Definição de insuficiência cardíaca, de acordo com a fração de ejeção do ventrículo esquerdo. *BNP > 35-50 pg/mL ou NT-proBNP > 125 pg/mL. BNP: peptídeo natriurético do tipo B; FEVE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo; ICFe: insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida; ICFei: insuficiência cardíaca com fração de ejeção intermediária; ICFeP: insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada; NT-proBNP: fração N-terminal do peptídeo natriurético do tipo B. Adaptado de Rohde e colaboradores (2018)..... 25
- TABELA 2** – Sequência de primers dos genes para análise de RT-qPCR. Sequência 5' – 3' dos primers. 59
- TABELA S1** – Dados da avaliação ecocardiográfica. Grupos: Wky (n=10), indica ratos Wistar Kyoto sedentários; Wky-T (n=9), Wistar Kyoto treinados; Shr-IC (n=10), ratos espontaneamente hipertensivos sedentários insuficientes cardíacos; Shr-IC-T (n=9). Os resultados estão expressos como média ± EPM. * vs WKY, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001; ****, p < 0,0001; † vs SHR-IC, p < 0,05; ‡, p < 0,01; ††, p < 0,001. 132
- TABELA S2** – Classificação das 50 vias enriquecidas para os genes alvos dos miRNAs-1-3p, -30c-1-3p, -30c-2-3p, -96-5p, -99b-3p, -140-3p, -191a-5p, -182, -205, -208b-3p, -328a-5p, -466-3p, -499-3p, -665, -667-5p..... 133
- TABELA S3** – Classificação das 10 vias enriquecidas ranqueada pelo número de genes alvos envolvidos com o miRNA-1. 134
- TABELA S4** – Consumo de oxigênio (VO₂) máximo e dados clínicos dos voluntários..... 135

LISTA DE SIGLAS, ABREVIACÕES E SMBULOS

3'-UTR : Região 3' não traduzida

ABCA1: ATP-binding cassette transporter A1

Acad11: Acyl-CoA Dehydrogenase Family Member 11

ADP: Adenosina difosfato

AMPK: Proteína quinase ativada por AMP

APOA1: Apolipoproteína A1

ATP: Adenosina trifosfato

cDNA: DNA complementar

CEUA: Comitê de tica no Uso de Animais

CPT-1: Carnitina O-palmitoiltransferase 1

CS: Citrato sintase

Ct: Limiar comparativo de ciclo

DAVID: Database for annotation visualization of Integrated Discovery

DCVs: Doenças cardiovasculares

dKO: Duplo knockout

DTNB: cido ditionitrobenzico

EEFE-USP: Escola de Educa Física e Esporte da Universidade de São Paulo

EPM: Erro padrão da média

ERR: Receptor relacionado ao estrognio

F6: frutose-6-fosfato

FAB5P: Ligante de ácido graxo 5

FATP1 : Proteína transportadora de ácido graxo 1

FC: Frequência cardíaca

FDR: Taxa de falsas descobertas

FE: Fração de Ejeção

FeO2: Fração expirada de oxigênio

FiO2: Fração de oxigênio inspirada

G6PDH: Glicose-6-fosfato desidrogenase
GLUT4: Transportador de glicose 4
GO: Gene Ontology
HA: Hipertensão arterial
HDAC4: Histona-desacetilase 4
HIF1 α : Fator induzido por hipóxia-1 alfa
HK: Hexoquinase
HNF4A: Fator nuclear hepático 4 alfa
IC: Insuficiência Cardíaca
ICB-USP: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
ICFEi: Insuficiência cardíaca de fração de ejeção intermediária
ICFEp: Insuficiência cardíaca de fração de ejeção preservada
ICFEr: Insuficiência cardíaca de fração de ejeção reduzida
IGF-I: Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LCAD: Ácil-Coa desidrogenase de cadeia pequena
LDH: Lactato desidrogenase
LPL: Lipoproteína lipase
MC: Massa corporal
MCAD: Ácil-Coa desidrogenase de cadeia média
MEF2A: Myocyte-specific enhancer factor-2 A
MHC: Miosina de cadeia pesada
miRNA: microRNAs
mRNA: RNA mensageiro
MTCO1: Mitochondrially Encoded Cytochrome C Oxidase 1
mtDNA: DNA mitocondrial
MYH: Gene da miosina de cadeia pesada
MyoD: Myogenic differentiation
ncRNA: RNA não codificantes

ND1: NADH dehydrogenase 1
NRF1: Fator respiratório nuclear 1
PA: Pressão arterial
PDH: Piruvato desidrogenase
PDK: Piruvato desidrogenase quinase
PEP: Fosfenolpiruvato
PFK: Fosfato de frutoquinase
PGC1 α : PPAR gama co-ativador 1 alfa
PK: Piruvato-quinase
PPAR: Peroxisome proliferator-activated receptor
PTEN: Homólogo de tensina e fosfatase
PUR β : Purine-rich negative regulatory element
QR: Quociente respiratório
RPKM: Reads per kilobase of transcript per milion mapped reads
Rplp0: 60S acidic ribosomal protein P0
RT-qPCR: PCR quantitativo em tempo real
RXR: Complexo retinóico X receptor
SHR: Ratos espontaneamente hipertenso
SOX6: SRY-Box 6
SREBP: Elemento de ligação a proteína esterol
TFA: Treinamento físico Aeróbio
VCO₂: Volume de gás carbônico
VE: Ventrículo esquerdo
VO₂: Consumo de oxigênio
WKY: Ratos Wistar Kyoto
 β -actin: beta-actina

RESUMO

Pelozin, B.R.A. **Efeito do treinamento físico aeróbio na miopatia muscular esquelética induzida pela insuficiência cardíaca: participação dos microRNAs no perfil de fibras.** 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2022.

A progressão da hipertensão arterial pode levar ao quadro de insuficiência cardíaca (IC), principal causa de morte no mundo. A IC é acompanhada por alterações no músculo esquelético, conhecida como miopatia muscular esquelética. Essas alterações afetam a o fenótipo e função muscular e são responsáveis por reduzir a tolerância ao esforço físico. O treinamento físico aeróbio (TFA) já demonstrou exercer papel terapêutico na IC e na melhora da tolerância ao esforço físico, porém os mecanismos moleculares relacionados as essas alterações ainda não são totalmente compreendidos. O objetivo do presente trabalho foi elucidar mecanismos moleculares envolvendo TFA e alterações fenotípicas e funcionais do músculo esquelético de ratos insuficientes cardíacos de etiologia hipertensiva. Para isso, o trabalho foi aprovado no Comitê de Ética USP, sob o No.2020/01. No qual, 20 ratos machos espontaneamente hipertensos (SHR) e 20 ratos Wistar Kyoto (WKY), com 9 meses de idade, divididos em: WKY sedentários (WKY), treinados (WKY-T), SHR insuficientes cardíacos (SHR-IC) e treinados (SHR-IC-T). O TFA foi composto por 10 semanas de natação, 60min/sessão, 1x/dia, 5x/semana, com 5% de sobrecarga corporal. Após o TFA avaliou-se: (1) parâmetros hemodinâmicos e funcionais cardíacos como pressão arterial, função cardíaca (ecodopplercardiograma) e consumo de oxigênio pico; (2) parâmetros fenotípicos do músculo sóleo como tipagem de fibra, área de secção transversa e expressão gênica de miosina de cadeia pesada; (3) parâmetros funcionais metabólicos e mitocondriais como expressão de genes e atividade enzimática do metabolismo glicolítico e oxidativo, quantidade de ATP muscular, lactato plasmático, densidade e função mitocondrial; (4) avaliação do *microarray* para miRNAs e seleção dos miRNAs envolvidos no fenótipo e metabolismo muscular; (5) expressão proteica dos alvos dos miRNAs selecionados; (6) avaliação da expressão dos miRNAs selecionados no músculo esquelético de humanos. Análise estatística: ANOVA uma duas vias, seguido por teste Tukey. Resultados expressos em média \pm EPM. A progressão da hipertensão arterial induziu a IC com fração de ejeção preservada nos animais, com mudança no fenótipo e metabolismo muscular esquelético caracterizando a miopatia muscular. Essa alteração foi orquestrada pelo aumento da expressão dos miRNAs-205 e -328a que por meio da via de sinalização PGC1 α - PPAR β/δ - miRNA-208b e -499 controlou as alterações no tipo de fibra I para II e mudança do metabolismo oxidativo para glicolítico. Por outro lado, o TFA foi eficiente em reduzir a expressão dos miRNAs-205 e 328a normalizando o fenótipo e metabolismo muscular esquelético, reduzindo a miopatia muscular e melhorando a tolerância ao esforço físico. Ainda, a expressão do miRNAs alterados no modelo animal pela IC foram próximas às encontradas nos pacientes e normalizadas com o TFA, demonstrando o efeito terapêutico do TFA na miopatia muscular pela regulação dos miRNAs.

Palavras-chave: treinamento físico aeróbio; insuficiência cardíaca; tolerância ao esforço físico; microRNAs.

ABSTRACT

Pelozin, B.R.A. **Effect of aerobic physical training on skeletal muscle myopathy induced by heart failure: participation of microRNAs in fiber profile.** 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2022.

The arterial hypertension progression can lead to heart failure (HF), the main cause of death in the world. HF is accompanied by changes in skeletal muscle, known as skeletal muscle myopathy. These alterations affect muscle phenotype and function and are responsible for reducing exercise tolerance. Aerobic exercise training (AET) has already been shown to play a therapeutic role in HF and in improving exercise tolerance. However, the molecular mechanisms related to these changes are still not fully understood. The objective of the present work was to elucidate molecular mechanisms involving AET and phenotypic and functional changes in the skeletal muscle on hypertensive etiology HF. The present work was approved by the USP Ethics Committee under No.2020/01. Which, 20 male spontaneously hypertensive rats (SHR) and 20 Wistar Kyoto rats (WKY), 9 months old, divided into sedentary WKY (WKY), trained (WKY-T), SHR with HF (SHR-HF) and trained (SHR-HF-T). The AET consisted of swimming trains for 10 weeks, 60min/session, 1x/day, 5x/week, with 5% of body overload. After AET, we evaluated: (1) hemodynamic and cardiac functional parameters such as blood pressure, cardiac function (doppler echocardiogram), and peak oxygen consumption; (2) soleus muscle phenotypic parameters such as fiber typing, cross-sectional area, and myosin heavy-chain gene expression; (3) metabolic and mitochondrial functional parameters such as gene expression and enzymatic activity of glycolytic and oxidative metabolism, amount of muscle ATP, plasma lactate, mitochondrial density, and function; (4) microarray evaluation for miRNAs and selection of miRNAs involved in muscle phenotype and metabolism; (5) protein expression of selected miRNA targets; (6) expression of selected miRNAs in human skeletal muscle. Statistical analysis: two-way ANOVA, followed by the Tukey test. Results are expressed as mean \pm SEM. The progression of arterial hypertension-induced HF with preserved ejection fraction in the animals, with a change in phenotype and skeletal muscle metabolism characterizing muscle myopathy. This alteration was orchestrated by the increase in the expression of miRNAs-205 and -328a which, through the PGC1 α - PPAR β/δ - miRNA-208b and -499 signaling pathway, controlled changes in fiber type I to II and change in oxidative metabolism to glycolytic. On the other hand, AET was efficient in reducing the expression of miRNAs-205 and 328a, normalizing skeletal muscle phenotype and metabolism, reducing muscle myopathy, and improving tolerance to physical exertion. Also, the expression of miRNAs altered in the animal model by HF was close to those found in patients and normalized with AET, demonstrating the therapeutic effect of AET in muscle myopathy by regulating miRNAs.

Key-words: aerobic physical training; cardiac insufficiency; tolerance to physical exertion; microRNAs.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	18
2 JUSTIFICATIVA	21
3 OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo Geral	23
3.2 Objetivos Específicos.....	23
4 REVISÃO DE LITERATURA	25
4.1 Insuficiência cardíaca.....	25
4.2 Alterações musculares esqueléticas na insuficiência cardíaca.....	28
4.3 Treinamento físico aeróbio e insuficiência cardíaca.....	32
4.4 MicroRNAs.....	34
4.5 miRNAs, músculo esquelético e treinamento físico	35
5 MATERIAL E MÉTODOS	42
5.1 Animais	42
5.2 Desenho experimental	42
5.3 Protocolo de treinamento físico aeróbio.....	43
5.4 Avaliação da pressão arterial e da frequência cardíaca de repouso.....	44
5.5 Avaliação da tolerância ao esforço físico máximo.....	45
5.6 Consumo de oxigênio de pico.....	45
5.7 Avaliação da utilização de substratos energéticos.....	46
5.8 Avaliação da função e morfologia cardíaca – ecodopplercardiograma.....	46
5.9 Coleta das amostras	47
5.10 Avaliação da massa muscular esquelética	48
5.11 Avaliação da atividade enzimática no metabolismo oxidativo e glicolítico	48
5.12 Quantificação do triglicerídeo muscular	49

5.13 Avaliação imuno-histoquímica do músculo esquelético	50
5.14 Função mitocondrial em fibras musculares isoladas.....	51
5.15 Níveis de lactato plasmático	52
5.16 Determinação do ATP muscular	53
5.17 Avaliação do conteúdo mitocondrial.....	53
5.18 Extração de RNA total.....	54
5.19 miRNA Microarrays	55
5.20 Expressão de miRNAs	56
5.20.1 Síntese de cDNA para miRNAs	56
5.20.2 RT-qPCR para expressão de miRNAs.....	56
5.21 Predição bioinformática.....	57
5.21.1 Análise funcional de enriquecimento de ontologias gênicas.....	57
5.21.2 Análise dos componentes principais.....	58
5.22 Expressão gênica.....	58
5.21.1 Síntese de cDNA para expressão gênica	60
5.21.2 RT-qPCR para análise da expressão gênica.....	60
5.23 Análise da expressão de proteínas	60
5.23.1 Immunoblotting	61
5.24 Análise da expressão de miRNAs em humanos	62
5.25 Estatística	62
6 RESULTADOS.....	63
6.1 Progressão da hipertensão arterial induz a insuficiência cardíaca acompanhado da redução da tolerância ao esforço físico.....	63
6.2 O treinamento físico aeróbio reduz a atrofia muscular prevenindo miopatia musculatura esquelética induzida pela insuficiência cardíaca	67
6.3 O treinamento físico aeróbio reestabelece o conteúdo de ATP melhorando a atividade enzimática oxidativa, preservando o conteúdo e função mitocondrial evitando a miopatia esquelética induzida pela insuficiência cardíaca	70
6.4 Expressão de microRNAs controla alterações fenotípicas e metabólicas na miopatia muscular	74
6.5 miRNAs-205 e -328a regulam a via de PGC1 α - PPAR β/δ - miRNA-208b e -499 no controle fenotípico e metabólico na miopatia muscular induzida pela insuficiência cardíaca	77

6.6 A expressão dos miRNAs alterados pela miopatia muscular em humanos	80
7 DISCUÇÃO	83
7.1 Caracterização da insuficiência cardíaca e os efeitos terapêuticos do treinamento físico aeróbio.....	86
7.2 Efeitos patológicos da insuficiência cardíaca na expressão de miRNAs nas alterações fenotípicas e metabólicas da musculatura esquelética e os efeitos terapêuticos do treinamento físico aeróbio	91
7.3 Expressão dos miRNAs-1, -205, 208b e -499 em pacientes insuficientes cardíacos e o efeito do treinamento físico aeróbio	109
8. CONCLUSÃO	111
REFERÊNCIAS.....	112
SUPLEMENTO	129
ANEXO	136

1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCVs) são as principais causas de morte em todo o mundo e somadas representam aproximadamente 17,6 milhões de mortes ao ano, representando 31% dos óbitos (BENJAMIN et al., 2017; NAGHAVI et al., 2017; VIRANI et al., 2021). No Brasil, esses números não são diferentes e em 2019 as DCVs ocuparam 28% das causas de morte no país (BARROSO et al., 2021). Entre os diversos fatores de risco modificáveis que predispõem ao desenvolvimento e progressão das DCVs, a hipertensão arterial (HA) ganha destaque, por conta da sua progressão ser silenciosa e assintomática e frequentemente associada a insuficiência Cardíaca (IC), quer como causa ou como fator de agravamento da patologia (BOZKURT et al., 2016; BARROSO et al., 2021; ZHOU et al., 2021).

A IC é considerada a via final comum da maioria das cardiopatias e outras doenças do aparelho circulatório (O'CONNOR et al., 2009; FLORIDO et al., 2018). Classificada como uma síndrome clínica de mau prognóstico, acomete o sistema cardíaco, reduzindo a sua função e afetando diversos órgãos alvos como cérebro, rins, artérias e músculo esquelético. A IC é caracterizada por sintomas típicos como baixa tolerância ao esforço físico, fadiga e dispneia a pequenos esforços (CRIMI et al., 2009; FLORIDO et al., 2018; DEL BUONO et al., 2019; BOZKURT et al., 2021a).

Atualmente, é debatido a importância de órgãos além do coração na causa da intolerância ao esforço físico, com crescente destaque para alterações na musculatura esquelética como principal fator (DEL BUONO et al., 2019). O primeiro estudo que propôs estudar o músculo esquelético e esses sintomas, foram Chim e colaboradores (1997), o qual elencaram as anormalidades estruturais e funcionais provenientes da IC, como uma das principais causas para a intolerância ao esforço nos pacientes (CHIM et al., 1997). Dentre as alterações observadas na musculatura esquelética, destacam-se alterações no fenótipo, com atrofia muscular, rarefação microvascular e aumento de fibras predominantemente glicolíticas em detrimento das fibras oxidativas; no metabolismo energético, com redução da quantidade e atividade de enzimas oxidativas, redução na densidade mitocondrial e redução na produção de adenosina

trifosfato (ATP) (HAMBRECHT et al., 1997; ANKER et al., 1997; BACURAU et al., 2009; CUNHA et al., 2012; BRUM et al. 2014; KENNEL et al, 2015; DEL BUONO et al., 2019).

Devido a prevalência crescente e grande morbimortalidade, a IC tem representado nas últimas décadas um grave problema de saúde pública (O'CONNOR et al., 2009; FLORIDO et al., 2018; VIRANI et al., 2021). Embora grandes avanços tenham sido feitos no entendimento das DCVs, os mecanismos envolvidos nas anormalidades do músculo esquelético permanecem pouco elucidados. Assim, compreender as vias que afetam a estrutura e a função do sistema muscular esquelético pode ter implicações clínicas importantes (KENNEL et al, 2015; LIU et al., 2015, 2017). Com o propósito de mapear todos os elementos funcionais do genoma humano, em 2012, foi dado início ao consórcio intitulado "*The Encyclopedia of DNA Elements*" (ENCODE), que por meio de métodos de mapeamento do genoma, foi descoberto que 2,95% do material genético possui transcritos com o potencial de codificar em proteína e todo o restante apresenta pouca ou nenhuma expressão proteica (ENCODE, 2012 e LUO et al., 2021). Inicialmente, considerados como "lixos do DNA" por não codificarem proteínas, os ácidos ribonucleicos (RNAs) não codificantes (ncRNAs) atualmente estão relacionados com inúmeras alterações na regulação da expressão de genes por ação epigenéticas transcricionais e pós-transcricionais (LEYPOLD; SPEICHER, 2021). Dentre os ncRNAs, os microRNAs (miRNAs) foram os mais estudados e demonstraram ser fundamentais para o controle pós-transcricional pela ligação do miRNA ao RNA mensageiro (mRNA) alvo, levando em alguns casos a sua degradação e principalmente a repressão da tradução proteica (O'BRIEN et al., 2018).

No sistema cardiovascular e muscular esquelético, os miRNAs regulam o desenvolvimento, a inflamação, o trofismo, a fibrose e a regeneração (MCMULLEN; DREW, 2016; POLLER et al., 2018, GOMES et al., 2018; PELOZIN et al., 2022). Desde 2007, uma série de estudos demonstraram que miRNAs específicos estão envolvidos no desenvolvimento de DCVs contribuindo para a repressão/ativação de genes biologicamente importantes (VAN ROOIJ; OLSON, 2007; BÁTOKAI; THUM, 2012; QUIAT; OLSON, 2013; GEBERT; MACRAE, 2019). Desta forma, muitos aspectos do quadro da IC de etiologia hipertensiva no nível molecular ainda são desconhecidos e a elucidação desses processos regulados por miRNAs e identificação de novos alvos de miRNA na

patogênese da doença é uma estratégia muito valiosa que pode, eventualmente, levar ao desenvolvimento de novas abordagens para o diagnóstico precoce e/ou tratamento da doença.

O treinamento físico aeróbio (TFA) vem sendo utilizado como uma importante terapia não farmacológica para aliviar os sintomas da intolerância ao esforço físico, melhorando a qualidade de vida e reduzir a hospitalização de pacientes com IC (PONIKOWSKI et al., 2016; DEL BUONO et al., 2019). A redução na capacidade aeróbica é considerada como um grande indicador de morte precoce, tanto para indivíduos saudáveis quanto para aqueles com doenças associadas (MYERS et al., 2002; BOOTH et al., 2017). Além disso, ratos artificialmente selecionados para exibir alta capacidade aeróbica intrínseca apresentam maior expectativa de vida ($\cong 45\%$), quando comparados com ratos com baixa capacidade aeróbica (KOCH et al., 2011). De fato, a prática da atividade física aeróbica é eficaz em melhorar a mobilidade em idosos (PAHOR et al., 2014) e está associada à prevenção de um amplo espectro de distúrbios e doenças ao longo da vida adulta (FIUZA-LUCES et al., 2013; BOOTH et al., 2017; MOREIRA et al., 2020).

Estudos recentes demonstram que TFA tem a capacidade de modular a expressão de miRNAs em diferentes tecidos como o músculo esquelético e o cardíaco, promovendo o controle angiogênico e hipertrófico (NIELSEN et al., 2010; FERNANDES et al., 2011; SOCI et al., 2016; GOMES et al., 2018; MOREIRA et al., 2020). A capacidade de conferida ao TFA, na modulação de miRNAs, pode auxiliar a homeostase vascular e muscular. Entretanto, estudos avaliando o papel dos miRNAs nas alterações fenotípicas e metabólicas muscular esquelética tanto na IC de etiologia hipertensiva quanto induzidos pelo TFA ainda não estão completamente elucidados. Em nosso Laboratório, nos últimos anos temos demonstrado o importante efeito terapêutico do TFA nas alterações musculares e cardiovasculares desencadeada pela HA durante a progressão da doença (FERNANDES et al., 2012; ROQUE et al., 2013; NEVES et al., 2014; JORDAO et al., 2017). Embora estudos prévios tenham avançado no entendimento da miopatia muscular induzida pelas DCVs e efeito do TFA sobre estes processos, há poucos estudos na literatura sobre os mecanismos moleculares e a continuação desses estudos se fez necessária e relevante.

2 JUSTIFICATIVA

Os dados epidemiológicos mais recentes mostram que a IC atinge mais de 23 milhões de pessoas no mundo, com taxa de sobrevivência de apenas 35% nos cinco anos após o diagnóstico (ROHDE et al., 2018; FLORIDO et al., 2018; BOZKURT et al., 2021a). Só nos Estados Unidos da América, a doença atinge cerca de 6 milhões de cidadãos, levando a um milhão de hospitalizações e uma a cada nove mortes nos principais estados do país (VIRANI et al., 2021).

Projeções atuais, para os Estados Unidos da América, apontam que entre os anos de 2012 e 2030 a taxa de diagnósticos aumente 46% para a IC, o que irá afetar mais de 8 milhões de pessoas com mais de 18 anos e gerando um custo estimado anual de 70 bilhões de dólares (VIRANI et al., 2021).

A HA representa um fator de risco contínuo para as DCVs, afetando em média 32,5% da população brasileira adulta (FLORIDO et al., 2018). Recentemente, a HA atingiu proporções epidêmicas, e estima-se que 25% dos adultos terão hipertensão em 2025 no mundo (JUSIC; DEVAUX, 2019). Somente em nosso país, as doenças que atingem o aparelho circulatório têm sido a principal causa de morte. Em 2007 ocorreram 308.466 óbitos e segundo os dados do Ministério da Saúde, em 2009 ocorreram 91.970 internações por DCVs, com custo global de R\$165.461.644,33. Além da alta prevalência da doença, sua progressão está diretamente relacionada com diversas complicações, como acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio, doenças vasculares e o desenvolvimento da IC (JUSIC; DEVAUX, 2019).

Considerando os fatos, o estudo se justifica devido à investigação do efeito terapêutico do TFA ser não somente fundamental na prevenção primária da HA e redução dos gastos públicos, mas como uma intervenção não farmacológica, diminuindo a incidência de diagnósticos relacionados à patologia e melhorando o prognóstico para os próximos eventos cardiovasculares.

Embora haja crescente interesse a respeito do papel dos miRNAs no desenvolvimento da IC, ainda muito pouco se sabe sobre a influência na patologia. Além disso, justifica-se o estudo pelo fato de que o entendimento dos mecanismos reparatórios induzidos pelo TFA sobre a expressão de miRNAs em animais hipertensos poderá

elucidar grandes eventos do quadro patológico associados à IC, desta forma contribuindo para o tratamento das alterações do sistema muscular esquelético.

Dados prévios do nosso laboratório corroboram com os da literatura na tentativa de explicar os efeitos benéficos do TFA sobre a expressão de miRNAs na modulação de genes relacionados com a musculatura esquelética e o sistema cardiovascular (FERNANDES et al., 2015; PEREIRA et al., 2020; PELOZIN et al., 2022; RODRIGUES et al., 2022). Entretanto, entendemos que o próximo passo seria relacioná-lo de forma direta às alterações músculo esquelético induzida pela IC; haja visto que, embora de suma importância, pouco se tem publicado a respeito desse contexto sobre miRNA, TFA e DCVs. Além disso, é razoável supor que o conhecimento dos miRNAs induzidos pelo TFA, os quais podem oferecer benefícios para os sintomas e malefícios acarretados pela doença, poderão servir de base para o desenvolvimento de futuras estratégias terapêuticas para com a musculatura esquelética, aumentando assim a sobrevida e a melhora da qualidade de vida dos pacientes com IC de etiologia hipertensiva.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito do treinamento físico aeróbio na miopatia muscular esquelética de animais com insuficiência cardíaca de etiologia hipertensiva. Ainda, verificar o papel dos miRNAs no perfil de fibras e metabolismo desses animais.

3.2 Objetivos Específicos

A partir do objetivo geral do estudo foram formulados alguns objetivos específicos relacionados à cada etapa do projeto.

3.2.1 Avaliar o efeito da IC de etiologia hipertensiva em um modelo experimental de ratos espontaneamente hipertenso (SHR) sobre os parâmetros abaixo:

- evolução da massa corporal;
- comportamento da pressão arterial e da frequência cardíaca de repouso;
- capacidade de realização do esforço físico máximo e do consumo de oxigênio de pico;
- morfologia muscular esquelética;
- atividades enzimáticas glicolíticas e oxidativas;
- função mitocondrial em fibras musculares isoladas;
- análise do *microarray* do músculo sóleo;
- análise dos miRNAs selecionados para respostas fenotípicas e metabólicas;
- a avaliação da expressão de genes envolvidos no metabolismo e no tipo de fibra muscular;
- a avaliação expressão proteica dos alvos dos miRNAs selecionados.

3.2.2 Avaliar o efeito terapêutico do TFA no modelo experimental de IC de etiologia hipertensiva sobre os parâmetros abaixo:

- evolução da massa corporal;

- comportamento da pressão arterial e da frequência cardíaca de repouso;
- capacidade de realização do esforço físico máximo e do consumo de oxigênio de pico;
- morfologia muscular esquelética;
- atividades enzimáticas glicolíticas e oxidativas;
- função mitocondrial em fibras musculares isoladas;
- análise dos miRNAs selecionados para respostas fenotípicas e metabólicas;
- a avaliação da expressão de genes envolvidos no metabolismo e no tipo de fibra muscular;
- a avaliação expressão proteica dos alvos dos miRNAs selecionados.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Insuficiência cardíaca

A IC é uma síndrome clínica de mau prognóstico caracterizada por anormalidade cardíaca estrutural e/ou funcional, associada à intolerância aos esforços, edema pulmonar, redução da longevidade e atualmente atingindo mais de 23 milhões de pessoas no mundo, com taxa de sobrevivência de apenas 35% nos cinco anos após o diagnóstico (ROHDE et al., 2018; FLORIDO et al., 2018; BOZKURT et al., 2021a). Só nos Estados Unidos da América, a doença atinge cerca de 6 milhões de cidadãos, levando a um milhão de hospitalizações e uma a cada nove mortes nos principais estados do país (VIRANI et al., 2021). Projeções atuais, para os Estados Unidos da América, estima que entre os anos de 2012 e 2030 haja um aumento de 46% no diagnóstico de IC, afetando mais de 8 milhões de pessoas com mais de 18 anos e gerando um custo anual estimado de 70 bilhões de dólares (VIRANI et al., 2021).

As associações americanas, brasileiras e europeias de cardiologia, em suas diretrizes, classificam o paciente com IC perante sua fração de ejeção. Pacientes que apresentam a fração de ejeção $\leq 40\%$, são classificados com IC com fração de ejeção reduzida (ICFEr), entretanto os pacientes com $\geq 50\%$, são classificados com IC com fração de ejeção preservada (ICFEp). Também, é possível encontrar paciente na zona cinzenta, chamados de intermediários, possuindo suas frações entre 40-50%, denominados pacientes com IC de fração de ejeção intermediária (ICFEi) (PONIKOWSKI et al., 2016; ROHDE et al., 2018; BOZKURT et al., 2021b). O padrão ouro para a classificação da FE, e conseqüentemente o tipo de IC, é o ecodopplercardiograma, porém outros biomarcadores podem auxiliar na classificação (TABELA 1).

TABELA 1 – Definição de insuficiência cardíaca, de acordo com a fração de ejeção do ventrículo esquerdo. *BNP > 35-50 pg/mL ou NT-proBNP > 125 pg/mL. BNP: peptídeo natriurético do tipo B; FEVE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo; ICFEr: insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida; ICFEi: insuficiência cardíaca com fração de ejeção intermediária; ICFEp: insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada; NT-proBNP: fração N-terminal do peptídeo natriurético do tipo B. Adaptado de Rohde e colaboradores (2018).

Tipo	ICFEr	ICFEi	ICFEp
Função ventricular	FEVE < 40%	FEVE 40 – 49%	FEVE ≥ 50%
Biomarcadores	BNP e NT-proBNP elevados*	BNP e NT-proBNP elevados*	BNP e NT-proBNP elevados*
Ecodopplercardiograma	Alteração estrutural e disfunção sistólica	Alteração estrutural e/ou disfunção diastólica	Alteração estrutural e/ou disfunção diastólica

Atualmente os valores de estratificação da IC por meio da FE, tem demonstrado que metade dos pacientes possuem uma fração de ejeção dentro do normal esperado ($\geq 50\%$), podendo variar a prevalência de 51% a 63% a depender do estudo (DUNLAY et al., 2017; PFEFFER et al., 2019; MISHARA, KASS, 2021). Com o avanço da idade a ICFEp se torna ainda mais prevalente, assim como maior incidência ocorra em mulheres do que em relação aos homens (DUNLAY et al., 2017). Na última década, pode se observar um aumento da prevalência dos casos de ICFEp, em relação a ICFEr, justificado pela melhora na expectativa de vida mundial e o avanço da idade na população combinado com os avanços nos tratamentos aos pacientes com DCVs e sobrevida desses pacientes (DUNLAY et al., 2017; MISHARA, KASS, 2021). Porém, atualmente, tanto o diagnóstico quanto o tratamento de pacientes com ICFEp, especificamente, ainda são desafiadores e merecem atenção especial (MARCONDES-BRAGA et al., 2021).

Na associação de diversas DCVs com a IC, a HA é a mais importante causa de ICFEp com 60% a 80% dos casos (BOZKURT et al., 2016; DUNLAY et al., 2017; ROHDE et al., 2018; VIRANI et al., 2021). Números maiores são encontrados no estudo de Framingham, em que 5.143 pacientes acompanhados, 91% dos casos de IC apresentados eram de pacientes hipertensos (DAWBER et al., 1951); chegando a um valor de risco duas vezes maior em homens e três vezes em mulheres com HA em desenvolver IC (BOZKURT et al., 2016). Porém, a maior incidência ainda é em idosos e mulheres com histórico de HA (YANCY et al., 2013). Corroborando, o estudo *Systolic Hypertension in the Elderly* (SPRINT) demonstrou que a busca pela redução na pressão arterial (PA) sistólica, junto ao tratamento da das DCVs, pode reduzir a incidência de IC nesses pacientes (WRIGHT et al., 2015). É importante salientar que no estudo de Framingham, a prevalência das fases iniciais a ICFEr se encontravam assintomáticos em 5% dos casos, porém na ICFEp 36% dos pacientes se encontram assintomáticos,

possivelmente subjugando incidência real de pacientes com ICFEp (DAWBER et al., 1951).

Por se tratar de uma condição frequentemente assintomática, a busca por tratamentos para a HA geralmente é tardia, dificultando os tratamentos e possibilitando a evolução da HA para o quadro de IC. Corroborando a essa ideia, Estudo recente, publicado na prestigiada revista Lancet, alertou que 40-50% dos pacientes hipertensos nunca foram diagnosticados; e que mesmo aqueles pacientes diagnosticados, 10-20% não realiza tratamento ou não conseguem manter a doença controlada (NCD-RisC, 2021). No mundo, milhares de casos são diagnosticados a cada ano; no Brasil 36 milhões (32,5%) de indivíduos adultos são afetados pela doença hipertensiva, porém com o avanço da idade esses números pioram, chegando a mais de 70% dos idosos (MALACHIAS et al., 2016; BAROSSO et al., 2021). Sozinha, a HA é reconhecida por aumentar todas as causas de morte independente do fator de risco (BOZKURT et al., 2016), representando 45% das mortes associadas às DCVs (BAROSSO et al., 2021). No mundo, a elevação da pressão arterial sistólica foi o principal fator de risco para comorbidades, sendo responsável por 10,4 milhões de mortes (NAGHAVI et al., 2017; BAROSSO et al., 2021). Atualmente, mesmo com o tratamento medicamentoso, a taxa de doentes continua aumentando e sua alta prevalência somada à alta incidência de desenvolvimento de IC, geram grande preocupação para a saúde pública.

Por se tratar de uma doença complexa, a busca de um modelo com características próximas às dos encontrados no pacientes com ICFEp, com surgimento da HA de forma espontânea e progrida para a IC, o modelo de animais SHR apresenta uma boa ferramenta para o estudo. Desde o desenvolvimento da cepa de animais espontaneamente hipertensos, por Okamoto e Aoki em 1963, o modelo genético de hipertensão é o mais estudado na literatura e a sua importância tem sido creditada à similaridade da sua fisiopatologia com a hipertensão essencial (primária) em humanos. Os SHR nascem normotensos e começam a desenvolver HA com 5 semanas de idade, já apresentando um nível de pressão considerado como hipertensão espontânea entre a 7^a e a 14^a semanas, atingindo um platô entre a 20^a e 24^a semanas, não havendo influência sexual nesse desenvolvimento (YAMORI, 1984).

A hipertensão do SHR adulto está associada a um aumento da resistência periférica total e um débito cardíaco normal (POTTS et al., 1998). Com o desenvolvimento da HA, o SHR desenvolve uma progressiva hipertrofia cardíaca (THOMAS et al., 1997). O débito cardíaco permanece em níveis normais com o progresso da hipertensão, até que nos estágios finais a função cardíaca começa a ser comprometida, quando, então, o débito cardíaco começa a reduzir-se em função de uma IC congestiva (FROHLICH, 1977). Deste modo, a função sistólica cardíaca é preservada nesses animais até 1 ano de idade, mas falha com o passar do tempo. A progressão da doença em SHR parece ser um modelo ideal para mimetizar a IC de etiologia hipertensiva em humanos devido às alterações nos parâmetros cardíacos, hemodinâmicos e neuro-humorais relevantes durante a transição da hipertrofia compensada para a IC. Outra vantagem é que esse modelo não requer intervenções técnicas e não é acometido pela elevada taxa de mortalidade por cirurgia ou intervenção medicamentosa. Por outro lado, esse modelo é limitado pela longa duração até o desenvolvimento da IC (MUDERS; ELSNER, 2000).

4.2 Alterações musculares esqueléticas na insuficiência cardíaca

O sintoma clínico mais marcante no paciente com IC é a intolerância ao esforço físico. Esse sintoma é definido como a incapacidade de executar atividades físicas, acompanhado por dispneia, fadiga precoce e redução no consumo oxigênio (VO_2) máximo. Dificulta a execução das atividades diárias, reduzindo a qualidade de vida e aumentando a mortalidade nesses pacientes (PIÑA et al., 2003; DEL BUONO et al., 2019; KELLER-ROSS et al., 2019). Os fatores patológicos que levam aos sintomas de intolerância aos esforços, ainda não são tão bem compreendidos, apesar dos anos de investigação (LANG et al., 1997; SAMUEL et al., 2021). As alterações cardíacas centrais, por muitos anos, foram relacionadas exclusivamente aos sintomas de fadiga, porém atualmente compreende-se que modificações estruturais e funcionais periféricas também são importantes pela sintomatologia destes pacientes (JOSIAK et al., 2014). É importante salientar que essas alterações, bem como os sintomas, podem ocorrer mesmo em pacientes estáveis e em utilização de terapia medicamentosa; afetando os

pacientes de diferentes classes funcionais da IC, com ou sem fração de ejeção reduzida (MANCINI et al., 1989; BEKFANI et al., 2016).

Del Buono e colaboradores (2019) resumiram as possíveis causas da intolerância aos esforços em quatro pilares: (1) redução da reserva cardíaca e da (2) reserva pulmonar, (3) disfunção muscular esquelética, (4) danos vasculares, entre outros (FIGURA 1). Dentre estes pilares, as mudanças musculares esqueléticas têm papel de destaque, como uma das principais causas responsáveis pela intolerância ao esforço (PIEPOLI et al., 2013). Sendo assim, os estudos da miopatia muscular esquelética na IC abre um caminho para novos tratamentos e intervenções nesses pacientes.

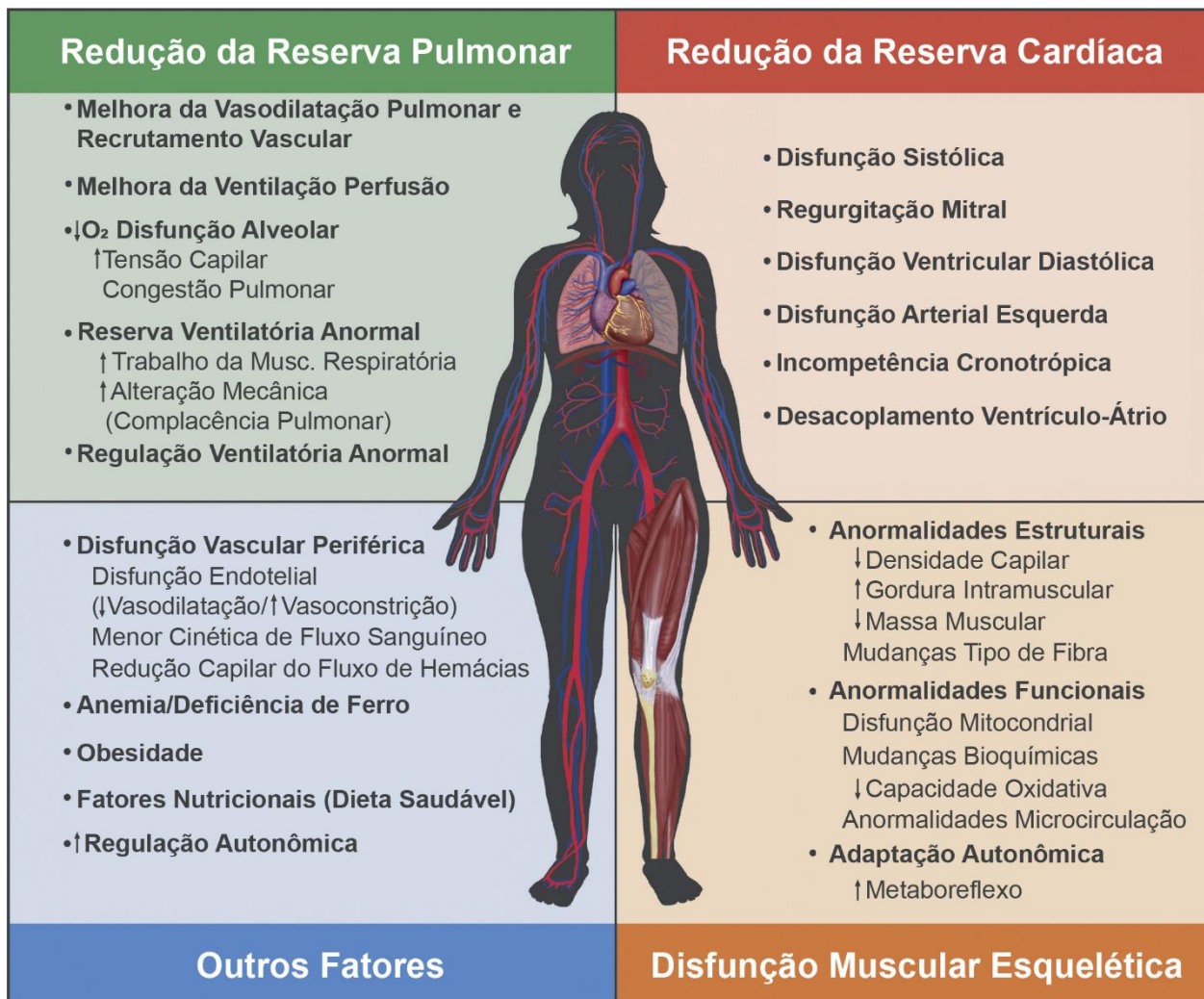


FIGURA 1 – Contribuição dos sistemas na redução da função e capacidade física em pacientes com insuficiência cardíaca. Musc: musculatura. Adaptado de Del Buono e colaboradores (2019).

Na IC, a miopatia esquelética afeta músculos grandes e pequenos envolvidos na postura, locomoção e respiração. Por meio de biópsia muscular e estudos utilizando marcadores celulares, foi possível encontrar inúmeras modificações musculares esqueléticas nos pacientes com IC que justificam a intolerância ao esforço. Algumas dessas alterações são: (1) diminuição da massa muscular; (2) mudança no perfil dos tipos de fibra muscular; (3) disfunção mitocondrial; (4) diminuição da circulação periférica acompanhada pela redução da rede microvascular; (5) e redução do VO_2 pico. Além disso, alterações no acoplamento excitação-contração também está associada à disfunção muscular e à redução da força (BRUM et al., 2014; KENNEL et al., 2015; OKADA et al., 2015; DEL BUONO et al., 2019).

Em 2016, a diretriz europeia de cardiologia começou a considerar a redução da massa muscular como fator importante na progressão da IC, considerada como preditor independente de mortalidade nos pacientes com IC grave de ambos os sexos (ANKER, 1997; VON HAEHLING, 2018). A redução da massa muscular é representada pela diminuição da área de secção transversa do músculo associada a um desequilíbrio do balanço de síntese/degradação proteica, evidenciada em pacientes com IC comparado a indivíduos saudáveis (MANCINI et al., 1989; MANCINI et al., 1992; MIDDLEKAUFF et al., 2010). Além da atrofia muscular, as alterações no acoplamento excitação-contração também contribuem para a fadigabilidade e a fraqueza do músculo esquelético na IC. Em ratos com IC grave, os baixos níveis de Ca^{2+} sarcoplasmático no músculo esquelético foram associados a uma reduzida taxa de liberação e recaptção do Ca^{2+} no retículo sarcoplasmático. Esta resposta é parcialmente explicada pela expressão reduzida de proteínas envolvidas na homeostase intracelular de Ca^{2+} nos músculos esqueléticos (BUENO et al., 2010).

Avaliações morfológicas revelaram que a IC induz alteração nos tipos de fibras muscular tanto em humanos quanto em animais. As fibras musculares sofrem mudanças do tipo I, predominantemente oxidativas, para o tipo II, glicolíticas (MANCINI et al., 1989; MIDDLEKAUFF et al., 2010; NEGRÃO et al., 2015). Essas alterações podem justificar uma fadiga precoce pela utilização de metabolismo mais glicolítico e mais suscetível a fadiga. Observa-se elevação no pH mesmo sem alteração de fluxo, uma característica de células prioritariamente anaeróbicas. Ainda, a redução do VO_2 no decorrer da

progressão da doença se traduz na piora da capacidade física desses pacientes e está ligada diretamente com alterações no sistema metabólico e muscular esquelético (MANCINI et al., 1989; MIDDLEKAUFF et al., 2010; NEGRÃO et al., 2015; VON HAEHLING, 2018).

Estudos mostram que o músculo esquelético de indivíduos hipertensos, assim como de animais SHR, contêm uma maior porcentagem de fibras de contração rápida e glicolítica comparados aos seus controles normotensos (LEWIS et al., 1994; BORTOLOTTO et al., 1999; NAGATOMO et al., 2009; FERNANDES et al., 2012). Segundo Bortolotto e colaboradores (1999), em todos os estágios de hipertensão avaliados (4, 16 e 24 semanas), o músculo sóleo de SHR continha uma maior proporção de fibras do tipo II do que o músculo sóleo de ratos normotensos, bem como de fibras híbridas; fibras estas que contêm dois tipos de isoforma de miosina de cadeia pesada (MHC) em uma mesma fibra muscular isolada. Embora os estudos relatam uma mudança no perfil de fibras musculares esqueléticas na HA, nenhum deles observou alteração na massa muscular em animais hipertensos até 24 semanas de idades (BORTOLOTTO et al., 1999; NAGATOMO et al., 2009; FERNANDES et al., 2012).

Curiosamente, Carvalho e colaboradores (2003) determinaram, no músculo sóleo, mudanças na expressão das isoformas de MHC, no diâmetro dos tipos de fibras e na atrofia muscular durante a transição da hipertrofia ventricular para IC induzida por estenose aórtica. Os animais desenvolveram uma miopatia muscular, caracterizada por diminuição na porcentagem das fibras do tipo I e aumento da frequência das fibras do tipo IIa, no estágio de hipertrofia cardíaca (após 18 semanas) e na IC (após 28 semanas). Entretanto, a atrofia das fibras do tipo IIa ocorreu somente durante a transição para a IC. Damatto e colaboradores (2013) foram pioneiros na observação de sinais e sintomas de IC em animais SHR idosos (com 18 meses de idade), os quais apresentaram importante redução da fração de ejeção e mudanças fenotípicas características, como alteração nas isoformas de MHC e atrofia do músculo sóleo.

Utilizando-se marcadores radioativos, foi possível identificar uma maior depleção de fosfocreatina em animais insuficientes cardíacos (MIDDLEKAUFF et al., 2010) e uma redução na densidade e função mitocondrial (MANCINI et al., 1989; MIDDLEKAUFF et al., 2010; CAMPOS et al., 2017). A utilização de ácidos graxos é essencial para

atividades de maior duração, independente da intensidade. A redução na utilização deste substrato, com um maior uso de fosfocreatina, demonstra uma predominância do metabolismo glicolítico para obtenção de energia e essa mudança no metabolismo poderia justificar a fadiga precoce.

A circulação periférica nos pacientes com IC se encontra prejudicada devido à redução do fluxo sanguíneo para a periferia. Uma das explicações para tal acontecimento são ativações em maior número do sistema nervoso simpático levando a vasoconstrição periférica, dificultando a chegada do substrato energético e do oxigênio, favorecendo uma anaerobiose precoce (MANCINI et al., 1992; MIDDLEKAUFF et al., 2010; NEGRÃO et al., 2015; VON HAEHLING, 2018). Além disso, uma redução no número de vasos arteriolar e capilar dispostos em paralelo contribui consideravelmente para o aumento da resistência periférica total e redução do fluxo sanguíneo para a periferia. Assim, tanto a IC quanto a HA aparecem amplamente associadas com um desequilíbrio do tônus vasomotor, participando ativamente no aumento da vasoconstrição, o que repercute em um aumento da resistência vascular periférica com a oclusão arteriolar e capilar na microcirculação culminando no quadro de rarefação capilar (LÉVY et al., 2001, BACURAU et al., 2009; FERNANDES et al., 2012).

Em conjunto, todas essas alterações musculares contribuem para o aumento da fatigabilidade muscular e acúmulo de lactato em resposta ao exercício na IC.

4.3 Treinamento físico aeróbio e insuficiência cardíaca

Tratar o paciente com IC é um trabalho sensível, depende de interações multiprofissionais para auxílio do uso correto de medicamentos, alimentação e exercícios físicos. Sabe-se que o TFA melhora a qualidade de vida e reduz a hospitalização e a mortalidade por todas as causas (MANCINI et al., 1989; O'CONNOR et al., 2009; FLYNN et al., 2009; VON HAEHLING, 2018; MOREIRA et al., 2020). Por ser eficiente em reduzir a intolerância ao esforço (BOZKURT et al., 2016) e reverter o quadro de miopatia esquelética, o TFA é a modalidade de treinamento mais empregada na IC. Dessa forma, o TFA na IC é amplamente recomendado pela diretriz norte americana (AHA – *American Heart Association*), com nível de evidência Classe 1A, sendo uma atividade segura e efetiva para melhora dos pacientes (BOZKURT et al., 2016).

Diversas são as evidências sobre os benefícios do TFA na IC, demonstrando que o mesmo é uma importante estratégia não farmacológica coadjuvante ao tratamento da IC, não somente por promover importantes adaptações no controle neuro-hormonal (NEGRÃO et al., 2015) e na função cardíaca (BRUM et al., 2014; CAMPOS et al. 2017), mas também por propiciar diferentes adaptações bioquímicas, estruturais e funcionais na musculatura esquelética (BACURAU et al., 2009; BUENO et al., 2010; CUNHA et al., 2012; KENNEL et al., 2015; SANTOS et al., 2014), melhorando a tolerância ao esforço físicos, qualidade de vida, diminuindo as hospitalizações e a mortalidade desses pacientes (HAMBRECHT et al., 1997).

O TFA atua de maneira significativa na redução da atrofia muscular na IC., promovendo melhoras significativas na vasodilatação dependente do endotélio (WANG et al., 2005) e aumento da densidade capilar na IC. Além das alterações fenotípicas, são observadas melhoras no metabolismo muscular, como aumento da densidade mitocondrial, atividade de enzimas oxidativas e melhora do metabolismo oxidativo e transporte de ácidos graxos (HAMBRECHT et al., 1997; BACURAU et al., 2009, BUENO et al., 2010; CUNHA et al., 2012; SANTOS et al., 2014; KENNEL et al., 2015; CAMPOS et al., 2017).

Em animais, observam-se níveis reduzidos de noradrenalina muscular e estresse oxidativo associados à melhora da capacidade de exercício e restabelecimento do trofismo muscular (CUNHA et al., 2012). Essas melhoras são reconhecidas em diversas etiologias da IC, tais como, infarto do miocárdio, transgênicos com hiperatividade simpática e estenose aórtica (BACURAU et al., 2009; BRUM et al., 2014; SOUZA et al., 2014; SANTOS et al., 2014), entretanto nenhum estudo até o momento reporta os efeitos do TFA sobre a miopatia muscular em animais com IC de etiologia hipertensiva em SHR.

Apesar desse importante papel do exercício na prevenção e no tratamento das DCVs, os mecanismos envolvidos nestas alterações musculares não são totalmente compreendidos. Além disso, muitos aspectos do desenvolvimento da HA, na transição para a IC em níveis moleculares, ainda são desconhecidos. O advento do perfil transcricional usando *microarrays* de mRNA e nos sequenciamento de RNA em larga escala tem rendido importantes *insights* sobre a função dos diferentes tecidos, bem como a identificação de marcadores sistêmicos sob diversas condições patológicas. A

descoberta de pequenos RNAs, incluindo miRNAs e outros ncRNAs, proporcionaram um avanço técnico e científico para a genética em sistemas biológicos.

4.4 MicroRNAs

Os miRNAs são moléculas de RNA de fita simples, com um tamanho de aproximadamente 17-22 nucleotídeos, não codificadores de proteínas, atuando principalmente na repressão da tradução de proteínas em plantas e animais. Os miRNAs regulam a atividade de até $\cong 50\%$ do genoma humano (HARTMANN; THUM, 2011) e foram descritos por participarem de um amplo espectro de doenças humanas (VAN ROOIJ; OLSON, 2007; QUIAT; OLSON, 2013). Desde sua descoberta em 1993, novos miRNAs foram identificados com mais de 38.000 sequências de miRNAs maduros, de mais de 271 tipos de organismos diferentes, catalogados no banco de dados de bioinformática, como o site miRBase.

Os miRNAs são inicialmente transcritos como miRNAs primários, chamados de pri-miRNA, que apresentam uma estrutura de dupla hélice do tipo *hairpin* ($\cong 300$ nucleotídeos). No núcleo o pri-miRNA é clivado por uma enzima endonuclease do tipo 3 conhecida como Drosha e seu cofator DGCR8. A molécula resultante do processamento de Drosha é denominada pre-miRNA, que será transportado do núcleo para o citoplasma pela exportina 5. Seguindo o transporte para o citoplasma, o pre-miRNA é processado por outra endonuclease do tipo 3 conhecida como Dicer, que cliva o pre-miRNA e dá origem a um pequeno e imperfeito duplex (dupla fita) de RNA que contém tanto a fita de miRNA maduro e sua fita antisense. Finalmente, o miRNA é incorporado a um complexo de proteínas RISC (do inglês *RNA-induced silence complex*), o qual contém proteínas da família argonauta como principais componentes de atuação na catálise a qual realiza. Apenas uma das fitas do duplex de miRNA permanece no complexo RISC para controlar a expressão pós-transcricional portanto, exercendo seus efeitos regulatórios ligando-se à região 3' não traduzida (3'-UTR) dos mRNA alvo (VAN ROOIJ; OLSON, 2007; THUM, 2012; JUSIC & DEVAUX, 2019). A regulação pós-transcricional realizada pelos miRNAs na região 3'-UTR depende do grau de complementaridade com o mRNA alvo, sendo que o pareamento completo com o mRNA alvo acarreta na degradação do mRNA, enquanto

o pareamento imperfeito com o alvo leva a inibição da tradução proteica. Devido ao fato de miRNAs possuírem sequências pequenas e agirem sem a necessidade de pareamento completo, um único miRNA pode regular muitos alvos gênicos, além de cooperarem no controle dos próprios miRNAs (BRENNECKE, 2005).

Mudanças modestas em um grupo de miRNAs podem afetar a expressão de vários, ou centenas, de genes com o objetivo de regular uma rede específica de sinalização (por exemplo, o controle do metabolismo celular). O uso de *microarray* de miRNA e gene complementados por *software* de predição bioinformática para identificar grupos de miRNAs, redes de sinalização relacionados e gene alvo pode nos ajudar no sentido da importância biológica dos miRNAs (DRUMMOND et al., 2010; JUSIC, DEVAUX, 2019). Desta forma, o entendimento dos mecanismos regulados por diferentes ncRNAs revelam uma área promissora de investigação que pode contribuir futuramente para o entendimento dos processos moleculares induzido por condições fisiológicas e patológicas.

4.5 miRNAs, músculo esquelético e treinamento físico

O desenvolvimento do músculo esquelético é orquestrado por redes evolutivamente conservadas de fatores de transcrição que regulam a expressão de genes envolvidos no crescimento, diferenciação e contratilidade muscular (WILLIAMS et al., 2009). Estudos recentes revelaram que, além de ativar os genes envolvidos na diferenciação e contração muscular, estes fatores de transcrição miogênico ativam a expressão de um conjunto de miRNAs com a função de "ajustar" a saída dessas redes de transcrição, resultando em respostas celulares precisas para os sinais de desenvolvimento, fisiologia e patologia. A integração destes pequenos RNAs no programa transcricional muscular expande ainda mais a precisão e a complexidade da regulação de genes nas células musculares, uma vez que miRNAs são capazes de regular vários mRNAs e podem ser alvos de muitos miRNAs (ZHAO et al., 2007; WILLIAMS et al., 2009; SIRACUSA et al., 2018; MYTIDOU et al., 2021).

Os *myomiRs* são a classe de miRNAs específicos do músculo e atualmente conta com o miRNAs-1, -133a e b, -206, -208a e b, -486 e -499. Dentre esses, o miRNA-208a

é somente expresso do tecido cardíaco, assim como os miRNAs-133b e -206 são exclusivos da musculatura esquelética (WINBANKS et al., 2014; ABKHOOIE et al., 2021). Os *myomiRs* têm sido estudados pela importante contribuição no desenvolvimento e homeostase muscular, chegando a representar 25% dos miRNAs expressos no músculo esquelético; reconhecidos por controlarem o crescimento, a diferenciação e a contratilidade muscular (CHEN et al., 2006; CALLIS et al., 2007; CHEN et al., 2010; LIU et al., 2012; GOMES et al., 2018).

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

Van Rooij e colaboradores (2009), identificaram a presença de 2 miRNAs codificados pelos genes da MHC. O gene da miosina de cadeia pesada (Mhy) 7 codifica o miRNA-208b, o qual tem uma sequência *seed* idêntica ao do miRNA-208a; e difere dele por apenas 3 nucleotídeos na região 3'. Um terceiro membro dessa família é o miRNA-499, codificado pelo gene Myh7b e que compartilha grande homologia com o Mhy7. Estes dois miRNAs são bastante expressos em músculo com perfil oxidativo, como o sóleo, por apresentarem fibras do tipo I com predominância de MHC-I β .

Similar ao ocorrido com a deleção do miRNA-206 no músculo esquelético, a deleção do miRNA-208b ou do miRNA-499 não alterou a expressão de outro miRNA no sóleo, e a análise do tipo de fibra apresentou pouca ou nenhuma diferença no número de fibras musculares do tipo I, em qualquer um dos animais mutantes em comparação com o tipo selvagem. Porém, com a geração do animal duplo *knockout* (dKO) para os miRNAs-208b e -499 verificou-se uma perda substancial de fibras musculares do tipo I no sóleo dos dKO. A perda de fibras lentas nos camundongos dKO também foi evidenciada pela redução da expressão proteica e gênica de MHC-I β , e um concomitante aumento na expressão de isoformas de miosina rápida tipo IIa e IIx e tipo IIb (VAN ROOIJ et al., 2009).

Por outro lado, a superexpressão do miRNA-499 foi suficiente para induzir uma completa conversão de todas as fibras rápidas no sóleo para um perfil de fibras lentas do tipo I. Notavelmente, quando os animais foram submetidos a um teste de tolerância ao esforço físico em esteira, os que superexpressavam o miRNA-499 correram 50% a mais do que os controles tipo selvagem, indicando uma maior resistência aeróbia resultante da reprogramação de fibras musculares com indução de predomínio de fibras do tipo I, contração lenta e metabolismo oxidativo. Além disso, os autores investigaram possíveis alvos desses miRNAs relacionadas ao controle de MHC-I β . Os achados mostram que os fatores de transcrição SRY-Box 6 (SOX6), *purine-rich negative regulatory element* (PUR β) e SP3 são alvos dos miRNA-208b e -499 no músculo esquelético, e que animais dKO tem aumento na expressão desses fatores (VAN ROOIJ et al., 2009). Outros estudos também mostraram que SOX6, PUR β e SP3 inibem a expressão de MHC-I β no músculo esquelético implicado na mudança do perfil de fibras musculares (HAGIWARA et al., 2007; JI et al., 2007). McCarthy e colaboradores (2009) observaram que a expressão dos miRNAs-208b e -499 foram reduzidas em animais com atrofia muscular em resposta a suspensão dos membros posteriores. Esta desregulação dos miRNAs foi associada com o aumento da expressão de SOX6 e inibição na expressão de MHC-I β muscular.

Corroborando, um outro estudo mostrou que a sinalização do receptor nuclear *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR) exerce o controle sobre o tipo de fibra muscular por meio dos miRNAs-208b e -499 (GAN et al., 2013). O PPAR β/δ (beta/delta) tem ganhado destaque na literatura por controlar os tipos de fibra e metabolismo muscular esquelético. O PPAR β/δ demonstrou desempenhar um papel chave no desenvolvimento de fibras do tipo I. Animais transgênicos com superexpressão muscular do gene PPAR β/δ têm um aumento da proporção de fibras do tipo I (LUQUET et al., 2003; WANG et al., 2004; EHRENBORG; KROOK, 2009). No músculo esquelético, o PPAR β/δ tem uma expressão mais pronunciada comparada ao PPAR α (alfa), além de sua expressão ser maior em fibras musculares do tipo I oxidativa em comparação com as fibras musculares tipo II glicolíticas (BRAISSANT et al., 1996; De LANGE et al., 2004; WANG et al., 2004).

Estudos têm mostrado que a superexpressão de PPAR gama co-ativador 1 alfa (PGC1 α) no músculo esquelético (LIN et al., 2002) conduz a efeitos metabólicos semelhantes às da superexpressão de PPAR β/δ (WANG et al., 2004). Assim, o aumento da expressão de PPAR β/δ ou do seu co-ativador PGC1 α aumenta a formação de fibras do tipo I. Por outro lado, a ablação de PPAR β/δ muscular promove menor proporção de fibras musculares do tipo I e menor expressão de PGC1 α no músculo esquelético, sugerindo que PPAR β/δ pode regular, pelo menos em parte, a expressão basal de um dos seus importantes cofatores (SCHULER et al., 2006; EHRENBORG, KROOK, 2009).

Animais transgênicos com superexpressão de PPAR β/δ muscular apresentam uma maior capacidade aeróbia (LUQUET et al., 2003; WANG et al., 2004; EHRENBORG; KROOK, 2009; GAN et al., 2013) e auxilia a preservação dos níveis de glicose durante a atividade física (FAN et al. 2017). Em contraste, a expressão excessiva de PPAR α resulta na capacidade reduzida para realização de exercício aeróbio (EHRENBORG; KROOK, 2009; GAN et al., 2013). Camundongos que expressavam PPAR β/δ no músculo foram carinhosamente apelidados de "camundongos maratonistas", por serem capazes de correr duas vezes mais comparado ao controle selvagem (WANG et al., 2004). Além disso, em animais controle, o TFA de natação de 6 semanas (45 minutos por dia, 5 dias por semana) resultou no aumento na expressão proteica de PPAR β/δ no músculo tibial anterior (LUQUET et al., 2003). O aumento da expressão da proteína após TFA também tem sido relatada em estudos com seres humanos (RUSSEL et al., 2003; WATT et al., 2004; FRITZ et al., 2006). Por outro lado, os níveis gênicos de PPAR β/δ no músculo esquelético foram reduzidos em indivíduos com lesão da medula espinal (KRAMER et al., 2006).

Recentemente o PPAR β/δ , tem demonstrado o potencial de regular a expressão de inúmeros genes envolvidos no catabolismo, transporte e metabolismo da glicose e lipídeos. Fan e colaboradores (2017), demonstraram que o PPAR β/δ além de responsável por uma mudança no perfil de tipos de fibra, participavam diretamente na mudança aumentando a expressão de genes *gatekeepers* do metabolismo mitocondrial, como piruvato desidrogenase quinase 4 (Pdk4) e carnitine palmitoyl transferase 1B (Cpt1b). A ativação da sinalização de PPAR β/δ melhorou o metabolismo oxidativo e potencial aeróbio em ratos com disfunção ventricular isquêmica (ZIZOLA, et al., 2015).

Outros genes com papéis importantes no metabolismo lipídico parecem ser afetados pela expressão de PPAR β/δ , como Cd36 e lipoproteína lipase (Lpl) (EHRENBORG; KROOK, 2009). Assim, o PPAR β/δ apresenta uma interessante via, para o controle metabólico e de tipos de fibras na musculatura esquelética.

Curiosamente, Gan e colaboradores (2013) mostraram que a expressão do miRNA-208b foi significativamente aumentada em animais com superexpressão de PPAR β/δ muscular, mas não era detectável em músculo de animais com superexpressão de PPAR α . Similar, a expressão do miRNA-499 foi aumentada em animais com superexpressão de PPAR β/δ , mas drasticamente reduzida no músculo de animais com superexpressão de PPAR α . Resultados semelhantes foram obtidos em miócitos esqueléticos por cultura celular, utilizando-se células transgênicas ou superexpressão de PPAR por adenovírus em miócitos controles. Os autores também mostraram que a inibição dos miRNAs-208b e -499 com o uso de antisense em animais com superexpressão de PPAR β/δ foi suficiente para inibir a expressão de MHC-I β , indicando que a sinalização de PPAR β/δ ocorre via ação dos miRNAs-208b e -499 para o controle do perfil de fibras e metabolismo muscular. Além disso, os autores também identificaram que outro receptor nuclear, o receptor relacionado ao estrogênio (ERR) γ/β (gama/beta), estava aumentado em animais com superexpressão de PPAR β/δ , atuando *downstream* a via de PPAR β/δ , ativando a transcrição dos genes Myh7 e Myh7b, consequentemente aumentando a expressão dos miRNAs-208b e -499.

Coletivamente, os resultados indicam que há um circuito mediado pelo receptor nuclear/ miRNA no controle do perfil de fibras muscular, em que PPAR β/δ ativa ERR γ/β , aumentando a transcrição dos miRNAs-208b e -499, induzindo um programa de contração lenta por inibir repressores da transcrição de genes de contração lenta, tais como SOX6, PUR β e SP3, o que aumentaria a proporção de fibras do tipo I. Com a análise de predição bioinformática dos genes alvos dos miRNAs via miRWalk (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk>), verificamos que os miRNAs-205 e -328a alvejam a proteína PPAR β/δ , podendo fazer uma regulação *upstream* na via de controle do perfil de fibras e metabolismo muscular; um mecanismo ainda desconhecido na literatura. Embora o PPAR β/δ não tenha ainda sido validado como gene alvo dos miRNAs-205 e -328a, os dados nos levam a acreditar que há um conjunto de miRNAs

agindo sinergicamente, como os miRNAs-205, -208b, -328a e -499, para a regulação do metabolismo e tipo de fibra, contribuindo para a homeostase muscular. Não há estudos na literatura que tenham investigado miRNAs que regulam a expressão de PPAR tanto em condições fisiológicas quanto em patológicas. Entretanto, estudos mostram que os miRNAs-23 (SAFDAR et al., 2009), -494 (YAMAMOTO et al., 2012) e -696 (AOI et al., 2010) alvejam o gene *Pgc1 α* , aumentando sua expressão tanto na sessão aguda quanto em resposta ao TFA no controle da biogênese mitocondrial.

A expressão de outros *myomiRs* também foram reportadas em resposta ao exercício. O aumento do miRNA-1 no músculo esquelético de camundongos após 3 horas de uma única sessão de exercício físico aeróbio foi observado por Safdar e colaboradores (2009). Este aumento foi associado à redução na expressão do seu alvo histona-desacetilase 4 (HDAC4), um repressor transcricional da expressão gênica muscular, assim como pelo aumento dos fatores de regulação miogênica como *myogenic differentiation* (*MyoD*), e desse modo, promoveriam o remodelamento da lesão ocasionado pela sessão de treinamento (SAFDAR et al., 2009; CHEN et al., 2010). Por outro lado, o efeito crônico do exercício levou a uma diminuição na expressão do miRNA-1 associada a hipertrofia muscular em favorecimento a expressão de genes importantes no crescimento muscular (MCCARTHY; ESSER, 2007). Além disso, o treinamento resistido com a ingestão de aminoácidos também diminuiu a expressão do miRNA-1 em homens jovens (DRUMMOND et al., 2008). Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I) é um alvo do miRNA-1, o que pode explicar, em parte, o fenótipo hipertrófico durante as respostas iniciais de sobrecarga advindas do treinamento físico (MCCARTHY; ESSER, 2007; ELIA et al., 2009). Ainda, o miRNA-1 já demonstrou estar envolvido no controle do metabolismo, função mitocondrial e no controle da insulina (RODRIGUES et al., 2021).

Mediante a literatura apresentada, poucos estudos foram publicados investigando o efeito do TFA na expressão de miRNAs no músculo esquelético em DCVs. Esclarecer o papel do TFA como um regulador de miRNAs em modelos de atrofia e disfunção metabólica muscular pode trazer novas respostas no que concerne aos mecanismos chave da função, trofismo e regeneração muscular. Deste modo, a identificação de perfis de miRNAs específicos para determinada patologia e em tecido específico abre

perspectivas para estudos futuros, utilizando miRNAs como biomarcadores de diagnóstico clínico e como agentes terapêuticos.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

Para realização do estudo foram utilizados 20 ratos machos espontaneamente hipertensos (SHR) com 9 meses de idade e 20 ratos machos Wistar Kyoto (WKY), como controles do SHR. Os animais provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) foram mantidos em gaiolas plásticas em grupos de 3 ou 4 animais por caixa e separados por grupo experimental. A temperatura ambiente do biotério foi mantida entre 22-24 °C, com luz controlada em ciclo invertido de claro-escuro de 12 em 12 horas. Água e comida foram administradas *ad libitum*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, sendo este projeto de pesquisa, aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (EEFE-USP) número 2020/01 conforme mostrado no Anexo A.

5.2 Desenho experimental

Para realização do estudo, os animais recebidos do Biotério Central do ICB-USP, com 4 semanas de idade, foram mantidos no biotério da EEFE-USP durante 32 semanas até o início do protocolo de TFA de natação, com intuito de avaliar a progressão da HA nos animais. Uma semana antes do início do protocolo de TFA, os animais foram aleatoriamente divididos em 4 grupos experimentais (n=10/ grupo): ratos Wistar Kyoto sedentários (WKY); ratos Wistar Kyoto treinados (WKY-T); ratos espontaneamente hipertensos insuficientes cardíacos (SHR-IC); ratos espontaneamente hipertensos insuficientes cardíacos treinados (SHR-IC-T). Ainda nessa semana, foram realizadas as análises hemodinâmicas, VO₂ pico, metabólicas, teste de tolerância ao esforço e aferição da massa corporal (MC).

O protocolo de TFA de natação foi iniciado na semana 0 e realizado por 10 semanas consecutivas, como descrito no *Item 5.3*. Após 24 horas da última sessão de treinamento, os animais com 46 semanas de idade foram submetidos as mesmas

avaliações realizadas no período pré protocolo de TFA acrescido do exame de ecocardiografia. As avaliações foram realizadas com 24 horas de intervalo para a última sessão do TFA, com o intuito de diminuir os efeitos de interferência do pós treinamento. Nas 24 horas seguintes, foi realizado a eutanásia dos animais. A coleta dos tecidos e sangue foi realizada, como descrita no *Item 5.9*, os materiais armazenados foram utilizados para análises bioquímicas, morfológicas e moleculares posteriores ao sacrifício. O prazo de 48 horas para a eutanásia foi mantido para descartar os efeitos agudos do treinamento e o destreino (CRAIG et al., 1991).

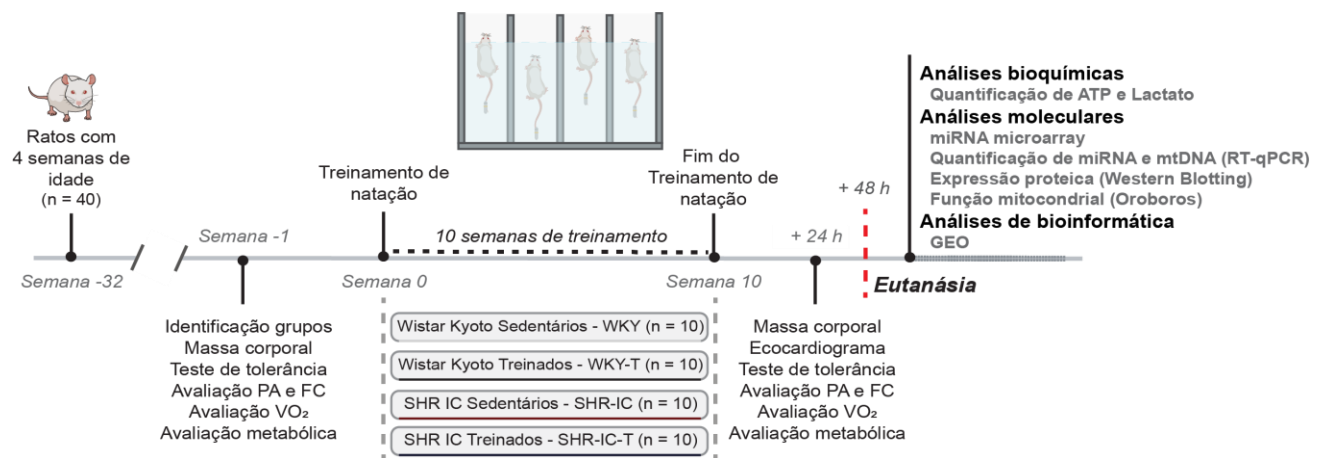


FIGURA 2 – Desenho do protocolo experimental. PA: pressão arterial; FC: frequência cardíaca; VO₂: consumo de oxigênio; n: número de amostra.

5.3 Protocolo de treinamento físico aeróbio

O TFA de natação foi realizado segundo protocolo de Medeiros e colaboradores (2004). Os animais foram treinados durante 10 semanas, com sessões de 60 min, 1 vez ao dia, 5 vezes por semana e com aumento gradual da sobrecarga de trabalho (peso na cauda em porcentagem da MC) até atingir 4% da MC (FIGURA 3).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Semanas	
0	1,5	2	2	3	3,5	4	4	4	4	4	Carg(%MC)
30	40	50	60	40	50	60	60	60	60	60	Tempo (min)

FIGURA 3 – Visão esquemática do protocolo de TFA de natação. MC: massa corporal.

O protocolo utilizado foi caracterizado como treinamento de baixa a moderada intensidade e longa duração, sendo efetivo na promoção de adaptações cardiovasculares e no aumento da capacidade oxidativa muscular. Os ratos foram identificados e pesados semanalmente para a correção da sobrecarga de treinamento em função do aumento da MS. O treinamento foi realizado em um sistema de natação específico para ratos, com baias de treinamento individualizado e água aquecida a 32 °C e água filtrada (FIGURA 4).



FIGURA 4 – Aparato de treinamento físico de natação para ratos.

5.4 Avaliação da pressão arterial e da frequência cardíaca de repouso

A PA foi aferida por pletismografia de cauda (Kent Scientific, RTBP1001 *rat tail blood pressure system for rats and mices*, Litchfield, USA) em todos os grupos experimentais pré e pós protocolo experimental. Os animais foram mantidos acordados, em repouso e sob restrição de movimentos para que as medidas fossem realizadas. Os animais já haviam sido submetidos ao protocolo de aferição em outros dois momentos anteriores, minimizando os erros de medidas da análise.

O equipamento de registro da PA de cauda consiste em um manguito de borracha adaptado a região proximal da cauda e ligado ao equipamento pletismógrafo para insuflar e desinflar gradualmente o manguito de 1 a 250/300 mmHg. Na região distal da cauda foi acoplado um transdutor de pulso pneumático para detecção da onda de pulso e registrado no sistema de aquisição de sinais (MP100 WSW, Biopac Systems, Santa

Bárbara, CA, USA) com uma frequência de amostragem de 1000 Hz. Este método de medida indireta da PA permite quantificar a PA sistólica, média, diastólica e a frequência cardíaca (FC) durante período experimental.

5.5 Avaliação da tolerância ao esforço físico máximo

Os animais foram submetidos a avaliação de tolerância ao esforço físico pré e pós TFA. Após 2 sessões de adaptação à caixa metabólica, os ratos foram submetidos ao teste progressivo escalonado de esforço máximo em esteira rolante de acordo com Brooks e White (1978). Os animais foram posicionados individualmente sobre a esteira rolante para o início do teste, a velocidade de partida foi de 6 m/min, com incrementos de velocidade de 3 m/min a cada 3 minutos até a exaustão dos animais. Os animais foram estimulados por toques manuais, para que não ficassem parados na esteira. O critério para a determinação da exaustão do animal e interrupção do teste foi o momento em que o rato não foi mais capaz de correr dentro da caixa metabólica mediante o incremento de velocidade da esteira. Foi avaliado o tempo (min), a velocidade (m/min) e a distância (m) percorrida por cada animal, para comparar a resposta de desempenho dos animais entre os grupos.

5.6 Consumo de oxigênio de pico

Para obtenção do VO_2 pico, foi utilizada avaliação de tolerância ao esforço físico, como descrito no *Item 5.5*, no qual os gases respirados dentro da caixa metabólica foram avaliados.

O VO_2 pico foi mensurado por determinação da fração expirada de oxigênio (FeO_2) durante o teste de exercício progressivo até exaustão. Neste protocolo, os ratos foram colocados numa caixa metabólica sobre a esteira rolante, que serviu como câmara de mistura dos gases expirados. Esta câmara é conectada a um tubo na forma de “T”, para a retirada de amostras de ar (1.000 mL/min) para ser analisada a FeO_2 em um analisador de gases. A outra via do tubo em “T” é utilizada para a aspiração do ar em fluxo contínuo (2.500 mL/min), regulável por bomba aspiradora. A parte da frente da caixa metabólica possui uma abertura de 2 mm da superfície, que permite a entrada de

ar ambiente unidirecional sugado pela bomba aspiradora. O fluxo de ar na caixa metabólica é de 3.500 mL/min.

O rato foi colocado dentro da caixa metabólica por um período de repouso de 30 minutos para o registro do estado basal e durante cada estágio (3 min) de exercício realizado foram analisadas as FeO_2 dos gases contidos no ar da caixa metabólica. Consideramos as frações expiradas dos trinta últimos segundos de cada estágio, como a determinação do VO_2 pico para cada estágio. Ao atingir a exaustão, o rato foi mantido na caixa metabólica por aproximadamente 3 minutos e as frações expiradas registradas, foram usadas para verificar a recuperação do animal e o funcionamento dos analisadores. O VO_2 foi calculado através da seguinte fórmula matemática: $VO_2 = \text{fluxo de ar} \times (\text{fração de oxigênio inspirada } (FiO_2) - FeO_2) / MC$. Os valores são expressos em $mL \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$.

5.7 Avaliação da utilização de substratos energéticos

Para avaliar a utilização de substratos energético em nível basal dos animais, foi utilizado o quociente respiratório (QR), a análise da quantidade de gás carbônico produzida pela quantidade de oxigênio consumido na combustão de alimentos. Assim, com o QR podemos inferir diretamente a contribuição relativa para o metabolismo da oxidação de carboidratos e gorduras e quantificá-las (SIMONSON; DEFRONZO, 1990).

A análise foi realizada durante período de repouso de 30 minutos dos animais antes do começo do teste de VO_2 pico. Os dados utilizados foram o valor da produção de dióxido de carbono dividido volume de oxigênio consumido, na seguinte fórmula: $QR = \text{volume de gás carbônico } (VCO_2) / VO_2$. Valores a partir de $QR = 1$, demonstram uma utilização maior de carboidratos como substrato energético, assim como, valores abaixo de $QR = 1$ e próximos de 0,7 representam uma maior utilização de lipídeos como substrato energético.

5.8 Avaliação da função e morfologia cardíaca – ecodoppler cardiograma

Com a finalidade de avaliar a função e a morfologia do ventrículo esquerdo (VE), de forma não invasiva, foi realizado o exame ecocardiográfico transtorácico com doppler.

A análise foi realizada nos 4 grupos experimentais ao final do protocolo experimental, com o intuito de averiguar se animais com HA crônica desenvolvem disfunção cardíaca.

As medidas ecocardiográficas seguiram as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia (LANG *et al.*, 2005). Durante o exame ecocardiográfico, os animais foram anestesiados com uma mistura contendo cetamina e xilasina (50 e 10 mg/Kg, respectivamente, i.p.). O animal anestesiado foi colocado em decúbito dorsal em uma mesa cirúrgica apropriada. Utilizado o equipamento *Vivid 9* (GE Healthcare) com transdutor de 4 a 12 MHz, que permite imagens com 2 ou 3 cm de profundidade. As imagens foram armazenadas em *pen-drive* e analisadas posteriormente. As dimensões e massa do VE foram adquiridas pelo *modo-M*. A FC sob anestesia foi mantida em valores similares nos animais de ambos os grupos para que alterações na mesma não interfiram na contratilidade miocárdica *per se* (efeito escada ou Bowditch).

As medidas realizadas para a morfologia foram a massa do VE, diâmetro diastólico do VE, diâmetro sistólico do VE, espessura do septo, da parede posterior e espessura relativa da parede. Para as medidas de função foram analisados os parâmetros de fração de ejeção do ventrículo, fração de encurtamento (FS), débito cardíaco, volume sistólico final, volume diastólico final, tempo de desaceleração da onda E, pico da onda A e da onda E, razão E/A, tempo de ejeção, tempo de relaxamento isovolumétrico, tempo de contração isovolumétrico e índice de performance miocárdica.

5.9 Coleta das amostras

Finalizado o período dos protocolos experimentais, os animais foram submetidos à anestesia prévia (isoflurano com dose de 3-5% por via inalatória) e sacrificados por decapitação, 48 horas após a última sessão de TFA. Neste momento as amostras de sangue foram coletadas para separação de soro e plasma. O sangue mantido em gelo foi centrifugado a 1.500 g durante 10 minutos a uma temperatura de 4 °C. Após centrifugação os sobrenadantes foram armazenados a -80 °C.

Após a coleta do sangue, os músculos gastrocnêmio, plantar, sóleo e tibial anterior bem como pulmões, fígado, gordura retroperitoneal e epididimal foram cuidadosamente dissecados e pesados. Pulmões e fígado foram submetidos à secagem em estufa (37 °C) e pesados a cada 24 horas até que não houvesse mais alteração de massa,

permitindo o cálculo da razão massa úmida:massa seca como um índice de edema pulmonar e hepático respectivamente. Os tecidos musculares gastrocnêmio, plantar, sóleo, cardíacos e a aorta após coletados foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C para serem utilizados nas análises histológica, bioquímica e biologia molecular. Os demais tecidos foram descartados. Os tecidos musculares esqueléticos, utilizados para a análise histologia, foram submetidos a agentes crioprotetores antes do congelamento. A tíbia foi retirada e medida com paquímetro para posterior normalização do peso dos tecidos dos animais.

5.10 Avaliação da massa muscular esquelética

Com o intuito de avaliar a atrofia da musculatura esquelética foi realizado um cálculo de razão, tanto entre o peso úmido dos músculos e a MC total do animal (mg/g).

5.11 Avaliação da atividade enzimática no metabolismo oxidativo e glicolítico

Com o intuito de determinar a atividade do metabolismo no tecido músculo esquelético dos animais, foi analisado a atividade de enzimas chaves para o metabolismo glicolítico: hexoquinase (HK: EC 2.7.1.1); fosfato de frutoquinase (PFK: EC 2.7.1.56); piruvato-quinase (PK: EC 2.7.1.40); e a atividade enzimática do metabolismo oxidativo: citrato sintase (CS: EC 4.1.3.7) e Carnitina O-palmitoiltransferase 1 (CPT-1: EC 2.3.1.21). Para essas análises o 50 mg do tecido muscular do sóleo foi homogeneizado em 500 µL de 50 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA (pH 7,4), e adicionado a coquetel de inibidor de protease e 50 µL de TritonX100 1%. Os homogenato foi centrifugado a 12.000 rpm a 4 °C por 10 minutos para separar o sobrenadante do homogenato final e diluído em 10x com o mesmo tampão de homogeneização. O ensaio foi realizado por meio do espectrofotômetro SpectraMax Plus (Molecular Devices) e os resultados dos ensaios para a atividade enzimática foram expressos como µmol/min por grama de tecido.

Para determinar a atividade máxima da HK o tampão de ensaio foi consistido de 75 mM Tris-HCl, 7,5 mM MgCl₂, 0,8 mM EDTA, 1,5 mM KCl, 4 mM β-mercaptoetanol, 0,05% TritonX100, 0,4 mM NADP⁺, 2,5 mM ATP, 1,4 U glicose-6-fosfato desidrogenase

(G6PDH) e o homogenato. A reação foi iniciada com adição de 1 mM de glicose e as absorbâncias foram lidas em placas UV a 340nm (CRABTREE; NEWSHOLME, 1972).

A atividade máxima da PFK também foi avaliada em placa UV a 340nm e a reação constituirá de 50 mM Tris-HCl, 2 mM MgSO₄, 5 mM KCl, 0,05% TritonX100, 2U lactato desidrogenase (LDH), 4U PK, 1mM ATP, 0,2 mM NADH, 2 mM fosfenolpiruvato (PEP) e o homogenato. A reação foi iniciada com adição de 3 mM de frutose-6-fosfato (F6P) (ENSER et al., 1967).

A reação para determinar a atividade da PK constituiu de 100 mM KH₂PO₄, 10 mM MgCl₂, 80 mM KCl, 0,05% TritonX100, 9U LDH, 0,17 mM NADH e 5 mM adenosina difosfato (ADP). A adição do homogenato e de 2 mM de PEP iniciou a reação. As leituras das absorbâncias foram realizadas a 340 nm em placa UV de 96 poços (ZAMMIT; NEWSHOLME, 1978).

A atividade máxima da CS foi determinada em tampão de ensaio (pH 8,1) constituído de 100 mM de Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,2 mM ácido ditionitrobenzóico (DTNB), 0,1 mM acetil-CoA, TritonX100 0,05% (v/v) e o homogenato. A reação foi iniciada com a adição de 1 mM de oxalacetato e as absorbâncias lidas a 412 nm (ALP; NEWSHOLME; ZAMMIT, 1976).

A atividade máxima da CPT-1, foi determinada em tampão de ensaio (pH 8,1) constituído de 60 mM de Tris-HCl, 1,5 mM EDTA, 0,25 mM de DTNB, TritonX100 0,05% (v/v), 0,035 mM palmitoil-CoA e o homogenato. A reação foi iniciada com a adição de 1,25 mM L-carnitina e as absorbâncias lidas a 412 nm (BIEBER; ABRAHAM; HELMRATH, 1972).

5.12 Quantificação do triglicerídeo muscular

Com o intuito de quantificar a quantia de triglicerídeos no músculo sóleo, 50 mg do tecido muscular foi homogeneizado em 500 µL de 50 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA (pH 7,4), e adicionado a coquetel de inibidor de protease e 50 µL de TritonX100 1%. Os homogenato foi centrifugado a 12.000 rpm a 4 °C por 10 minutos para separar o sobrenadante do homogenato final e diluído em 10x com o mesmo tampão de homogeneização. A quantificação do triglicerídeo foi realizado usando kit comercial

triglicérides monoreagente (Bioclin, K117, Brasil). O ensaio é baseado nas reações enzimáticas colorimétricas e absorvância foi medida em placas de 96 poços, com o volume final de 0,2 mL no espectrofotômetro SpectraMax Plus (Molecular Devices) e os resultados dos ensaios para a atividade enzimática foram expressos como mg/mL.

5.13 Avaliação imuno-histoquímica do músculo esquelético

O músculo sóleo foi dissecado e extraído cuidadosamente fixado em uma massa de montagem à base de *tissue tek* e posteriormente cortado transversalmente no aparelho criostato (Leica CM1850, Leica Mycrossystems, Germany) na espessura de 10 µm.

Foi feita a imunofluorescência para MHC-Iβ conhecida como a isoforma da fibra muscular esquelética do tipo I. Brevemente, as secções musculares colocadas em laminas histológicas foram previamente fixadas em formalina (Sigma-Aldrich, HT501128, Brasil) 10% por 10 minutos em temperatura ambiente, permeabilizadas em 0,2% de Triton X-100 (Bio-rad, 01-0407, EUA) e 1% albumina sérica bovina (BSA, Sigma-Aldrich, A2153, Brasil) diluídos em PBS (Phosphate Buffer Saline, Tampão Fosfato Salino, Sigma-Aldrich, P4417, Brasil) por 10 minutos. O bloqueio foi feito em 10% *goat serum* (Sigma-Aldrich, G0923, Brasil) em PBS por 45 minutos. As lâminas foram incubadas com solução contendo os anticorpos primários para MHC-Iβ (diluição 1:5000, *Anti-Slow Skeletal Myosin Heavy Chain*, Abcam, ab1083, EUA) para marcação das fibras do tipo I; e para Laminina (diluição 1:100, *Anti-Laminin*, L9393, Sigma-Aldrich, EUA) para a marcação das membranas basais proporcionando a análise da área de secção transversa das fibras musculares e possibilitando a marcação das demais fibras musculares negativas para tipo I, com 1,5% de *goat serum*, os respectivos anticorpos secundários fluorescentes para MHC-Iβ (diluição 1:500; Alexa Flour 568 goat anti-mouse, Life Technologies, A11004, EUA) e Laminina (diluição 1:500, Alexa Flour 488 goat anti-rabbit, Life Technologies, A11008, EUA) e Hoechst (diluição 1:1000, Hoechst 33258, Life Technologies, EUA) para a marcação dos núcleos (FIGURA 5). Após 30 minutos de lavagem com 0,2% de Triton X-100 em PBS as lâminas foram cobertas com lamínulas utilizando-se glicerol tamponado (60% Glicerol, 40% Tris-HCL 0,1M pH 9,3).

A captura das imagens foi realizada com amplificação de 200x em objetiva de 20x. A aquisição das imagens foi processada em computador acoplada a um microscópio de fluorescência e conectado a um sistema de vídeo por meio de um programa de imagens (Leica Qwin, Leica Microsystems, Alemanha). Foi calculada a área da secção transversa das fibras musculares em μm^2 e o percentual de fibras do tipo I e tipo II por meio do programa Image-Pro Plus (Media Cybernetics Silver Spring, MD). Foram analisados 10 campos de cada corte histológico, na tentativa de avaliar o tecido por inteiro.

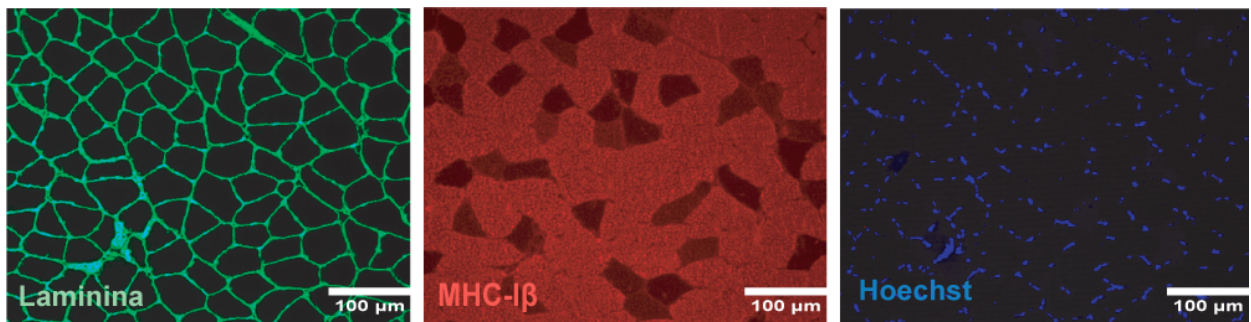


FIGURA 5 – Análise microscópica de corte histológico do músculo sóleo avaliado por imuno-histoquímica. Laminina marcada em verde identificada a lâmina basal da fibra muscular, MHC-I β marcada em vermelho identifica as fibras do tipo I, as escuras tipo II e as mescladas as intermediárias e o Hoechst marcado em azul identificada os núcleos das fibras.

5.14 Função mitocondrial em fibras musculares isoladas

Para a avaliação de função mitocondrial em animais, foi realizado o ensaio de consumo de O_2 em fibras musculares permeabilizadas, isoladas do músculo sóleo de ratos.

A preparação das fibras musculares permeabilizadas e o ensaio de consumo de O_2 foram realizadas conforme descrito por (ANDERSON et al., 2009) e serão brevemente descrita a seguir. Após a sua extração, o músculo sóleo foi colocado em um tampão de isolamento (60mM K-MES, 35 mM KCl, 7,23 mM K₂EGTA, 2,77 mM CaK₂EGTA, 20 mM imidazole, 0,5 mM DTT, 20 mM taurina, 5,7 mM ATP, 15 mM PCr, 6,6 mM MgCl₂-6H₂O, pH 7.1, 4 °C), onde os tecidos conectivos e gordura foram retirados, e pequenos feixes

de fibras foram gentilmente separados ao longo do eixo longitudinal, formando pequenos *bundles*. Posteriormente, os *bundles* foram tratados com 30 µg/mL de saponina, detergente que permeabiliza a membrana sarcolemal e mantém as membranas mitocôndrias intactas. Após a permeabilização, os *bundles* foram lavados em um tampão de ensaio (110 mM K-MES, 35 mM KCl, 1 mM EGT, 5 mM K₂HPO₄, 3 mM MgCl₂·6H₂O, 5 mg/mL BSA, 0,05 mM piruvato e 0,02 mM malato, pH 7.4, 4 °C) e mantidas neste tampão a 4 °C, em mesma oscilatória, até o início dos ensaios, não passando de 2 horas entre o tratamento e análise.

O experimento foi realizado em tampão de ensaio, aquecido a 37 °C, utilizando-se o equipamento Oroboros (OROBOROS O2K Oxygraph, Oroboros Instruments). Após adição dos *bundles* a câmara com tampão de ensaio, foi adicionado 5 µL de blebistatina (5 mM) para evitar a contração involuntária do tecido. As medidas do estado 2 foram realizadas com a adição de 40 µL succinato (10 mM), 20 µL glutamato (10mM) e 6,7 µL malato (2 mM); para o estado 3, foi adicionado 9 µL de ADP (4 mM); logo após o estado 3 verificou-se a integridade da mitocôndria, adicionando 10 µL de citocromo C (10 µM); no estado 4 foi adicionado 5 µL de oligomicina (2 µg/mL); no estado 3u foi adicionado 5 µL de FCCP (Carbonyl cyanide p-trifluoro-methoxyphenyl hydrazone, C₁₀H₅F₃N₄O) (0,5 µM) (desacoplador); e ao fim do ensaio, com o intuito de parar a respiração mitocondrial, foi adicionado 5 µL de rotenona (5 µM) e 20 µL de antimicina A (10 µM). As adições foram demonstradas de forma ilustrativa na Figura S3A.

Ao final de cada experimento, as fibras permeabilizadas foram lavadas em água ultrapura, a fim de remover os sais, e foram pesadas para posterior correção dos dados adquiridos. A análise foi realizada com os dados do consumo de oxigênio, através do software Datalab 5 (Oroboros, Inc) e Origin (OriginLab), os resultados foram expressos em nmol O₂/min⁻¹/mg proteína⁻¹.

5.15 Níveis de lactato plasmático

Com o intuito de medir as concentrações plasmáticas de lactato, foi pipetados e 6 µL de amostra do plasma sanguíneo dos animais, previamente retirado no sacrifício e armazenado no refrigerador, em placas de Elisa. Além das amostras, o branco ou padrão

foram pipetados no mesmo volume (6 μ L) e 300 μ L da mistura dos reagentes A e B (relação de 4:1, respectivamente). A placa foi homogeneizada e em seguida mantida em espectrofotômetro a 37 °C por 5 minutos, a absorbância foi determinada em 550 nm. O kit utilizado para medir o lactato plasmático foi Lactato Enzimático (Cod. MS10009010258), da empresa Lab Test.

5.16 Determinação do ATP muscular

A determinação do ATP músculo esquelético foi realizada por meio da combinação da enzima (luciferase)/substrato (D-luciferin), no qual na presença de ATP a enzima cliva o substrato e produz luz. Após a retirada do músculo sóleo dos animais, 50 mg do tecido foram imediatamente homogeneizados em 1 mL de ácido tricloroacético (1%) para que ocorra a precipitação das proteínas e preservação do ATP, conforme descrito previamente por Stanley (1986). As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi congelado em freezer -80 °C. Previamente às análises, o pH das amostras foi ajustado para 7,0 e as concentrações foram determinadas pela emissão de luz no comprimento de onda 560 nm, de acordo com o descrito no protocolo *ATP Determination Kit* (A22066, Invitrogen, EUA). O resultado foi expresso em picomoles por miligrama de proteína. O ensaio baseia-se na clivagem de ATP e O₂, emitindo luz, conforme equação abaixo.



5.17 Avaliação do conteúdo mitocondrial

Para inferir o conteúdo mitocondrial, foi quantificado o número de cópias do DNA mitocondrial (mtDNA). Inicialmente o DNA total do músculo sóleo foi isolado utilizando o kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Hilden, NW., Alemanha) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. As concentrações de DNA foram determinadas por medida de absorbância de 260 nm, e a pureza do DNA extraído foi determinada pelo cálculo da razão das absorbâncias de 260 e 280 nm. Na sequência, o número de cópias do mtDNA foi estimado pela expressão dos genes codificados pela mitocôndria *mitochondrially*

encoded cytochrome C oxidase I (Mtco1) e *NADH dehydrogenase 1* (Nd1) em relação ao gene codificado pelo núcleo *60S acidic ribosomal protein P0* (Rplp0). A reação de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) (Item 5.22.2) foi realizada utilizando os seguintes primers: Mtco1 (sense 5'- ATC AAA TGA TCC CCC GCC AT -3', antisense: 5'- GTG GAC GAA GCC AGC TAT GA -3'); Nd1: (sense 5'- TGG CCT TCC TCA CCC TAG TA -3', antisense: 5'- TTA GGG GGC GTA TGG GTT CT -3'); Rplp0 (sense 5'- CCT TCC CAC TGG CTG AAA AG -3', antisense: 5'- GAC TTG GTG TGA GGG GCT TAG -3').

Os resultados foram expressos utilizando o método de limiar comparativo de ciclo (Ct) como descrito pelo produtor do sistema. O cálculo do número de cópias do mtDNA relativo ao DNA nuclear foi realizado utilizando a fórmula: $2 \times 2^{\Delta Ct}$, no qual ΔCt é o Ct do gene nuclear subtraído do Ct do gene mitocondrial de interesse. Os dados estão expressos tanto em número de cópias para cada gene mitocondrial, como em porcentagem de todos os genes mitocondriais com relação ao grupo Controle (WKY).

5.18 Extração de RNA total

O RNA total foi extraído de 50 mg de músculo homogeneizado em 1 mL de Trizol (Invitrogen) e a extração seguindo as instruções do fabricante. O RNA precipitado foi lavado com etanol 70% para eliminar resíduos de fenol e sal, e solubilizado em água ultrapura. A concentração das amostras de RNA total foi quantificada usando o espectrofotômetro NanoDrop (NanoDrop Technologies, USA).

A integridade do RNA foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 0.5µg/mL de brometo de etídeo. O gel foi imerso em tampão TAE 1x e a eletroforese realizada a 100 volts por aproximadamente 40 minutos. A quantidade das amostras foi avaliada pela análise da intensidade das bandas correspondentes às subunidades do RNA ribossomal 28S e 18S. Amostras que apresentaram algum grau de degradação foram descartadas.

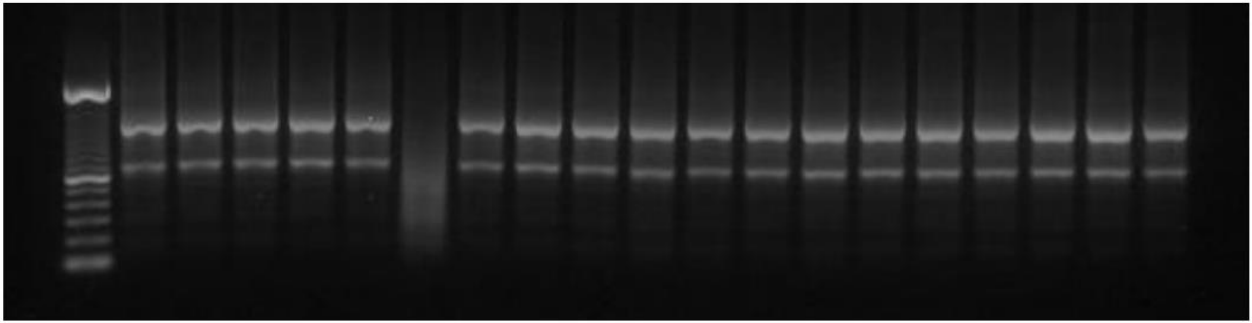


FIGURA 6 – Análise de integridade do RNA do músculo sóleo por eletroforese em gel de agarose.

5.19 miRNA Microarrays

O estudo de miRNA microarray no músculo sóleo foi realizado em trabalho anterior. Porém, seus dados foram utilizados para esse estudo com intuito de avaliar alguns miRNAs diferencialmente expressos envolvidos com as vias do metabolismo energético. Dessa forma, uma breve explicação do método aplicado foi descrita abaixo.

O miRNA microarray realizado pela companhia LC Sciences (Houston, TX) a partir de 5 µg de RNA total utilizando a tecnologia microfluídica µParaflo®. Para cada grupo experimental utilizou-se um pool do músculo sóleo de dois animais, desta forma resultando em um número de 3 análises por grupo (n=3). Brevemente, a hibridização foi feita *overnight* em um *chip* microfluídico. No *chip*, cada *probe* consiste de um nucleotídeo modificado quimicamente que codifica segmentos complementares ao miRNA alvo e um segmento espaçador de propilenoglicol para estender o segmento codificante a partir do substrato. O microarray abrange todos os miRNAs transcritos disponíveis na última versão do sistema Sanger miRBase (*Release 20.0*). A detecção pós-hibridização realizada, utilizando um fluoróforo diferente para cada amostra. A hibridização das imagens foram coletadas utilizando um scanner laser GenePix 4000B (Molecular Device, Sunnyvale, CA) e digitalizada usando o software de análise de imagem Array-Pro (Media Cybernetics, Bethesda, MD).

Os dados gerados foram analisados primeiro subtraindo o *background* e então normalizando os sinais para balancear as intensidades dos fluoróforos de forma que a razão da expressão diferencial possa ser calculada. O perfil de miRNAs expressos no

sóleo dos animais insuficientes cardíacos (SHR-IC) foi comparado com o perfil de expressão do sóleo de animais normotensos controle (WKY) e insuficientes cardíacos treinados (SHR-IC-T) por ANOVA de 2 vias e foram considerados estatisticamente significativos os valores de $p < 0,05$.

Na sequência das análises, foram utilizados sites de bioinformática (miRBase Targets, TargetScan, MiRanda, PicTar) para busca dos alvos destes miRNAs, os quais devem estar relacionados com as anormalidades do músculo esquelético. A partir destes, foram selecionados miRNAs mais diferencialmente expressos para ter sua expressão inicialmente confirmada por RT-qPCR e então iniciar os estudos da via molecular.

5.20 Expressão de miRNAs

Foram feitas as análises da expressão dos miRNAs-1-3p (NC_051353.1), -205 (NC_051348.1), -208b-3p (NC_051350.1), -328a-5p (NC_051354.1) e -499-3p (NC_051338.1) no músculo esquelético.

5.20.1 Síntese de cDNA para miRNAs

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

5.20.2 RT-qPCR para expressão de miRNAs

Para 20 µL da reação de PCR foram incluídos 1,33 µL do produto RT, 10 µL de TaqMan 2X Universal PCR master mix II (No AmpErase UNG), 1 µL de primer (TaqMan microRNA Assay 20X) e 7,67 µL de água livre de nucleases. As reações foram incubadas a 95 °C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. As fluorescências foram lidas em detector ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems). Foi utilizado o U6 snRNA como normalizador para análise de cada miRNA testado. Os resultados foram expressos utilizando o método de limiar comparativo de ciclos ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) e expressos em porcentagem do controle.

5.21 Predição bioinformática

Foram utilizados 8 sites de bioinformática [miRBase Targets (<http://microrna.sanger.ac.uk/targets/v4/>), TargetScan (www.targetscan.org/), MiRanda (www.microrna.org), PicTar (pictar.mdc-berlin.de/) miRWalk (www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/), MicroT4 (diana.imis.athenainnovation.gr); MirDB (mirdb.org); PITA (genie.weizmann.ac.il)], para realizar a predição dos alvos dos miRNAs selecionados envolvidos no controle fenotípico e metabólico muscular.

5.21.1 Análise funcional de enriquecimento de ontologias gênicas

A análise funcional de enriquecimento de ontologias gênicas foi realizado primeiramente através da identificação dos possíveis alvos dos 15 miRNAs selecionados do *microarray*, que estavam alterados devido a IC de etiologia hipertensiva e foram atenuados pelo TFA, com o auxílio dos programas listados no tópico anterior 5.17. Lembrando que só foi considerado um alvo predito, aqueles detectados ao menos em 4 programas. Posteriormente, com os alvos preditos para cada miRNA foi realizado análise funcional *Gene Ontology* (GO) e das vias *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) envolvidas nessas interações, com o intuito de estabelecer a relevância biológica das interações entre os miRNAs e os mRNA. As análises funcionais foram realizadas, utilizando o programa *Database for annotation, visualization of Integrated Discovery* (DAVID), (david.ncifcrf.gov/summary.jsp). Primeiramente, foi adicionado à lista

de genes alvo para cada miRNA no DAVID, posteriormente todos os genes foram analisados juntos e de forma agrupada com o seu miRNA alvo. Após a seleção dos miRNAs que para o estudado, foi realizado uma última análise com o grupo dos miRNAs selecionados e o grupo dos não selecionados. Para as buscas, foi usado o algoritmo de agrupamento difuso, e busca nos processos biológicos (*Biological Process*). Os resultados foram apresentado pelo ranking de enriquecimento e pelo número de genes preditos para a via. Os valores de p enriquecidos corrigidos por Benjamini menores que 0,05 foram apresentados. Na apresentação de gráficos envolvendo as vias de enriquecimento, foi utilizado o valor de p -Log.

5.21.2 Análise dos componentes principais

Para elaboração do gráfico de análise dos componentes principais (PCA), utilizamos a expressão de todos os miRNAs foram filtrados da matriz contendo todas as 12 amostras com dados de contagem de leitura normalizados. Os dados foram então transformados em log2 para normalizar as variações das contagens de leitura entre as amostras. *Scree plots* foram usados para identificar os principais componentes principais com base em uma proporção de porcentagem que explica a variância entre diferentes amostras ou cluster de amostras do conjunto de dados.

5.22 Expressão gênica

Avaliação da expressão gênica de Acyl-CoA Dehydrogenase Family Member 11 (Acad11) (NM_032169), Acox1 (NM_017340.2), Acsf5 (NM_053607.2), proteína quinase ativada por AMP (Ampk) (NM_006251), Atp5f1 (NM_134365.2), Cd36 (NM_031561.2), Ciclofilina (NM_120034.2), Cox5a (NM_145783.1), Cpt1b (NM_013200.2), ligante de ácido graxo 5 (Fabp5) (NM_145878.2), Hk1 (NM_001393711.1), Ldh-alfa (Ldha) (NM_017025.2), Ldh-beta (Ldhb) (NM_012595.2), Lpl (NM_012598.2), Mtco1 (NM_00123248.1), Myh1 (NM_001135158.1), Myh2 (NM_001135157.1), Myh4 (NM_019325.1), Myh7 (NM_017240.2), Ndufb8 (NM_001106360.3), Pdk4 (NM_053551.2), Pgc1a (NM_031347.1), Ppara (NM_0131961), Ppard (NM_013141.2),

Rip140 (NM_001100560.2), Sdhd (NM_001100539.1), Uqcrc2 (NM_001006970.1). Para a reação foram utilizados primers específicos para cada gene, desenhados de acordo com as sequências disponíveis no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) utilizando a ferramenta Primer-BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast). A sequência dos primers para os genes estão disponíveis na Tabela 2.

TABELA 2 – Sequência de primers dos genes para análise de RT-qPCR. Sequência 5' – 3' dos primers.

mRNA	Forward primer:	Reverse primer:
Acad11	GTCTTCTGTATGACAGAGCCCA	GGAGACTCCGTTCTTCCCAA
Acox1	AGATAATTGGCACCTACGCC	AAGTTTTCCCAAGTCCCCCA
Acs15	GGCCAAACAGAATGCACAG	GGAGTCCCAACATGACCTG
Ampk	AGGAAGAATCCTGTGACAAGCAC	CCGATCTCTGTGGAGTAGCAGT
Atp5f1	ATGTGAGCGGCCATCTTGTT	TGCCTGTAAAACCCCTGGAC
Cd36	ACTCTCTCCTCGGATGGCTA	TCTATGTGGCCTGGTTCAACTAA
Ciclofilina	AATGCTGGACCAACACAAA	CCTTCTTTCACCTTCCCAA
Cox5a	GTGCTGTTGCGATCTTGGAGG	TCCTTGGGAAGCCCATCGAA
Cpt1b	CAAACCTGAGCTGTGCTGAC	GGTACACACCCCTAAGGATACC
Fabp5	AGGAGTAGGGCTGGCTCTTA	GGTGCAGACCGTCTCAGTT
Hk1	CTGGGCTTCACCTTCTCATT	TCGCAAGTGGGTTCTTCATAC
Ldha	GTGCACTAAGCGGTCCCAA	GGCAAGCTCATCAGCCAAGT
Ldhd	AAGATGGTGGTGGACAGTGC	TGCCGTACATTCCCTTCACC
Lpl	TCCATGGATGGACGGTGACA	TGGCCACATCATTCCCACC
MTCO1	ATCAAATGATCCCCCGCCAT	GTGGACGAAGCCAGCTATGA
Myh1	CCTCATAAAGCTTCAAGTTCAGACC	AGCCTCGATTCGCTCCTTTT
Myh2	ATGACTGTGACCTGCTTCGG	GCCAGCTTTTTCTTGGCCTC
Myh4	CATCTGGTAACACAAGAGGTGC	AAGGCTTGTCTGAGCCTCG
Myh7	CTGGCACCGTGGACTACAAT	GCCCTTGTCTACAGGTGCAT
Ndufb8	GAGCGTCGGAGAAGGTGAAG	TGGTCATGTGGAAGGCTCTC
Pdk4	GTGCAAAGATGCTCTGCGAT	TGGCCCTCATGGCATTCTTG
Pgc1a	GGACATGTGCAGCCAAGACTCT	CACTTCAATCCACCCAGAAAGCT
Ppara	CCTGCCTTCCCTGTGAACT	ATCTGCTTCAAGTGGGGAGA
Ppard	AAACCCACGGTAAAGGCGG	TGGCCACTTCTCTTTCTCC
Rip140	GCTAACCTGGGAAGGAGGGA	GTCTACTGCGCACCTTTAGGA
Sdhd	GGGCAAGCAACAGTATCTGC	CCAGCGATAAGCCTGCATGA
Uqcrc2	AAAGGGCAACTGCTAGAGCC	TGGGGCAACTTTGAGGGAAT

5.21.1 Síntese de cDNA para expressão gênica

Foram utilizados 2 µg de RNA total, extraídos a partir do músculo sóleo dos ratos. As amostras foram incubadas com 0,5 µg/mL de oligo dT12-18 a 65 °C por 5 minutos, para obtenção da primeira fita de cDNA. A transcrição reversa das amostras foi realizada em volume total de 20 µL contendo 3U de RNAsin (Promega, Madison, USA), 10 mM de dNTPs, 0,1 M de DTT, 1X tampão de enzima, e 2.5U de SuperScript Reverse Transcriptase II (Invitrogen, Brasil). Após incubação por 1 hora a 42 °C, a temperatura foi elevada a 95 °C por 5 minutos e as amostras foram rapidamente colocadas em gelo para desnaturação de híbridos RNA-cDNA formados.

5.21.2 RT-qPCR para análise da expressão gênica

O RT-qPCR para análise da expressão gênica foi realizada pelo sistema de detecção do produto específico amplificado no equipamento 7500 Real Time PCR System (Applied-Biosystems) na presença do composto fluorescente SYBR-Green PCR Master Mix. A otimização da reação do real time PCR foi feita conforme as instruções do fabricante, corrigido para volume final de 20 µL por reação. As condições de PCR serão padrão (protocolo do kit SYBR-Green master mix) e todos os reagentes foram fornecidos pelo kit, inclusive a enzima polimerase AmpliTaq-Gold (Applied-Biosystems). Depois da otimização, os *primers* foram utilizados na concentração de 200 nM para detecção e quantificação relativa da expressão do gene da ciclofilina (gene controle-interno). Os resultados foram expressos utilizando o método de limiar comparativo de ciclos ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) e expressos em porcentagem do controle.

5.23 Análise da expressão de proteínas

A expressão proteica dos alvos dos miRNAs foi analisada pela técnica de Western Blot. Para isso, as amostras de sóleo foram homogeneizadas em tampão de extração contendo um coquetel de inibidores de proteases e fosfatases. Posteriormente, as amostras foram mantidas em gelo e rapidamente centrifugadas (3.000 rpm por 10 minutos). O sobrenadante foi utilizado para quantificar a concentração total de proteínas.

Em seguida, cada amostra foi diluída em tampão Laemmli na proporção de 1:4, submetida a uma centrifugação de 30 segundos, e o sobrenadante submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 8 a 15%) no aparelho para minigel (Mini-Protean). Em cada gel foi aplicado como padrão um marcador de peso molecular com valores estabelecidos em: miosina (205-195 kDa), galactosidase (116 kDa), albumina bovina (80 kDa) e ovalbumina (49,5 kDa).

5.23.1 Immunoblotting

A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose utilizando-se o aparelho da Bio-Rad e com duração de 1 hora sob 120 volts. No tampão usado para realizar a transferência será acrescentado SDS 0,1% para melhorar a eluição das proteínas de alto peso molecular. Com a finalidade de bloquear as ligações inespecíficas, a membrana foi incubada em 10 mL de solução bloqueadora (leite desnatado Molico 5%, Tris 10 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,02%) a 4 °C overnight. Em seguida, a membrana de nitrocelulose foi incubada com o anticorpo primário que se liga à proteína que se pretende detectar, formando um complexo anticorpo-proteína. Depois de lavar a membrana para remover o anticorpo não ligado, ela foi exposta ao anticorpo secundário conjugado a *horseadish peroxidase*, direcionado a porções espécies-específicas do anticorpo primário.

Foram utilizados como anticorpos primários no estudo PUR β , SOX6, SP3 e Total OXPHOS (1:1000, Acbam, MA, EUA); PGC1 α , PPAR α , PPAR β/δ e AMPK (1:1000, Santa Cruz, CA, EUA); p-AMPK_{Thr172} (1:1000, Cell Signaling Tech., MA, EUA). Em seguida, as membranas foram lavadas 3 x 10 minutos com TBS-T, incubadas por 2 horas com os respectivos anticorpos secundários (Amersham Biosciences, NJ, EUA) conjugados à peroxidase. Posteriormente o complexo foi detectado mediante reação de quimiluminescência usando o aparelho ChemiDoc (BioRad, CA, USA) e os blots foram visualizados e quantificados (número de *pixels*) pelo sistema *Scion Image*, fornecido gratuitamente pela NHI (EUA) via internet. As proteínas beta-actina (β -actin) (1:1000, Santa Cruz, CA, EUA) e GAPDH (1:1000, Cell Signaling Tech., MA, EUA) foi utilizada como normalizador.

5.24 Análise da expressão de miRNAs em humanos

As amostras do vasto lateral de humanos, extraído por biopsia e utilizada para a análise da expressão dos miRNAs alvos foram gentilmente cedidas pelos professores e pesquisadores Dra. Lígia de Moraes Corrêa, Dra. Maria Urbana Rondon e Dr. Carlos Eduardo Negrão. Essas amostras foram extraídas no ano de 2013, sob aprovação do comitê de ética HC/FMUSP, número CAPPesq:814-10. Os dados clínicos dos pacientes também cedidos e utilizados, foram concedidos após adição dos experimentos junto ao comitê de ética. Todos os dados pessoais como nome e documentos foram mantidos em sigilo pelo pesquisador principal.

A extração do RNA total, síntese do cDNA e expressão dos miRNAs foram realizadas de forma semelhante como já descrito (*Itens 5.17 e 5.19*).

5.25 Estatística

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

Os dados foram analisados utilizando a análise de variância ANOVA de duas vias (TFA e IC como fatores independentes) e de medidas repetidas para comparar os valores dos grupos e teste de Tukey como *post-hoc*. As análises de correlação foram realizadas através do método de Pearson. As análises foram realizadas com o *Software* GraphPad (Califórnia, EUA). Foi adotado para todos os experimentos um $p < 0,05$ de significância. Todos os resultados foram apresentados na forma de média \pm erro padrão da média (EPM).

6 RESULTADOS

A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na miopatia muscular esquelética induzida pela IC de etiologia hipertensiva e os possíveis efeitos terapêuticos do TFA perante essas alterações, representa um tópico de intensa investigação, que, apesar dos avanços recentes no entendimento desses mecanismos (DEL BUONO et al., 2019; RAMIREZ-VELEZ et. al., 2022), ainda exhibe importantes lacunas. Com esse objetivo, os resultados a seguir buscam identificar os miRNAs envolvidos na miopatia muscular e os possíveis efeitos terapêuticos do TFA na expressão desses transcritos.

6.1 Progressão da hipertensão arterial induz a insuficiência cardíaca acompanhado da redução da tolerância ao esforço físico

Até o momento, poucos trabalhos buscaram investigar os efeitos crônicos da HA na musculatura esquelética de ratos (ATRAKCHI et al., 1994; DAMATTO et al., 2013), porém nenhum trabalho correlacionou essas alterações com a expressão dos miRNAs. Com o objetivo de caracterizar o impacto da progressão da HA, 20 ratos SHR e 20 ratos WKY, como controles do SHR, foram mantidos no biotério por 32 semanas. Ao completarem 9 meses de idade, os animais foram submetidos às avaliações pré TFA e divididos aleatoriamente em grupos sedentários e treinados para início do TFA de natação, realizado durante 10 semanas (FIGURA 7A). Como esperado, os animais SHR apresentaram maiores valores de PA sistólica em repouso, tanto no período pré como no pós TFA, em comparação aos seus respectivos controles que não apresentaram alteração pressórica (FIGURA 7B). Entretanto, o TFA foi capaz de reduzir a PA sistólica no grupo SHR treinado quando comparado aos seus valores pré TFA, embora a redução não tenha alcançado valores limítrofes. Por outro lado, a não realização do TFA nos animais SHR sedentários foi responsável pelo aumento ainda maior da PA sistólica ao longo do protocolo experimental. Os valores de PA diastólica e média seguiram o mesmo padrão de alteração observado na PA sistólica (FIGURA S1A e S1B).

A análise ecocardiográfica demonstrou que a progressão da HA promoveu alterações morfológicas importantes no coração dos grupos SHR, com aumento da

massa do VE (FIGURA 7C), acompanhado da redução no diâmetro sistólico e diastólico do VE, aumento do septo intraventricular, da parede posterior e da espessura relativa das paredes quando comparado ao grupo WKY (TABELA S1), esses resultados são representado na Figura 7D. Ademais, o TFA induziu o aumento da massa do VE nos animais saudáveis treinados e reestabeleceu parcialmente os parâmetros de diâmetro diastólico do VE, septo intraventricular e parede posterior no grupo SHR treinado (FIGURA 7C e TABELA S1). Em relação a função cardíaca, o grupo SHR sedentário apresentou importante redução na fração de ejeção e encurtamento do VE (FIGURA 7C), acompanhado da piora nos parâmetros diastólicos e global cardíacos quando comparadas ao grupo WKY (TABELA S1). Por outro lado, o TFA restabeleceu totalmente a função sistólica, quando comparado ao controle, mitigando parcialmente as alterações nos parâmetros diastólicos e global (FIGURA 7C e TABELA S1). Ainda, os animais dos grupos SHR apresentaram aumento na razão peso úmido pelo peso seco dos pulmões e fígado quando comparados ao grupo controle (FIGURA 7E). Esses resultados demonstrando que a HA crônica induziu ao remodelamento cardíaco adverso acompanhado de disfunção cardíaca, edema pulmonar e hepático, no qual o TFA exerceu um efeito protetor para a disfunção cardíaca, porém não exerceu efeitos positivos na congestão.

Além das alterações cardíacas, os dados do QR demonstram que animais dos grupos SHR apresentaram alteração na taxa metabólica basal pré TFA com valores de QR se aproximando de 1, sugerindo um metabolismo prioritariamente glicolítico e diferente do encontrado no grupo WKY (FIGURA 7F). Em condições saudáveis, o TFA aparentemente não interferiu no metabolismo do grupo WKY-T, porém pós TFA o grupo SHR treinado apresentou menores valores no QR, sugerindo o aumento na utilização de gorduras como substrato energético, o que não ocorreu no grupo SHR sedentário.

Em relação a tolerância ao esforço físico, os grupos não apresentaram diferenças no VO_2 pico e na distância percorrida no teste máximo no momento pré TFA (FIGURA 7G e S1C), porém a progressão da HA nas 10 semanas do protocolo experimental foi suficiente para reduzir o VO_2 pico e a distância percorrida no teste máximo do grupo SHR sedentários. Entretanto, o TFA não só preveniu a redução do VO_2 pico no grupo SHR treinado como melhorou o VO_2 a níveis iguais ao do grupo WKY-T (FIGURA 7G),

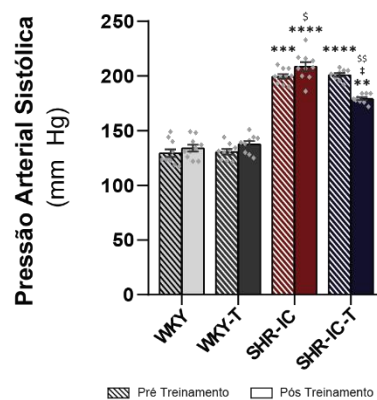
alcançando velocidades e tempo de duração no teste máximo próximas às encontradas no grupo saudável treinado (FIGURA 7H). Como esperado, os animais que realizaram o TFA apresentaram bradicardia de repouso pós TFA (FIGURA 7I).

Os resultados demonstram que a progressão da HA induziu a disfunção cardíaca com fração de ejeção preservada, com sinais de edema pulmonar e hepático, mudança no metabolismo acompanhado da intolerância ao esforço físico no grupo SHR sedentário, caracterizado como animais insuficientes cardíacos de etiologia hipertensiva (SHR-IC), e o TFA foi capaz de reduzir a PA, mitigando parcialmente os sinais e sintomas da IC no grupo treinado (SHR-IC-T).

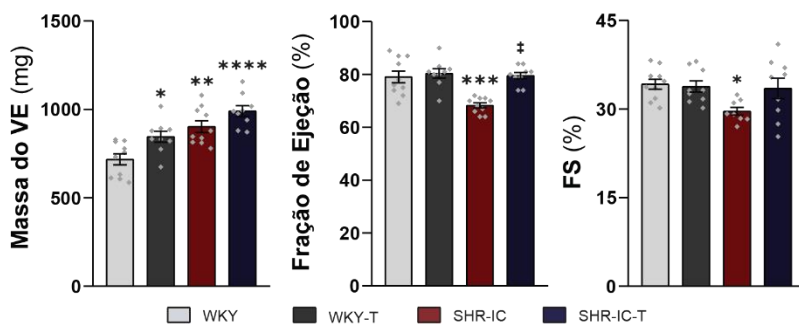
A



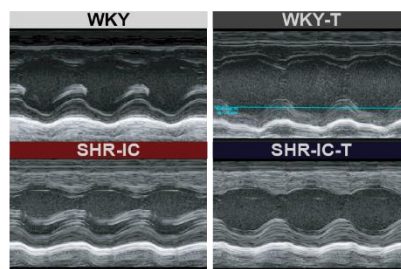
B



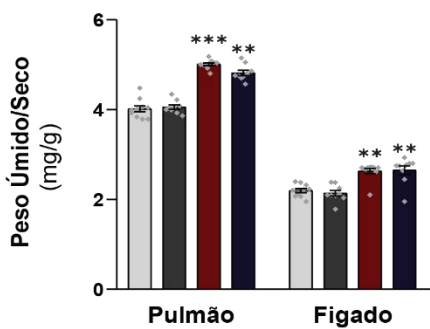
C



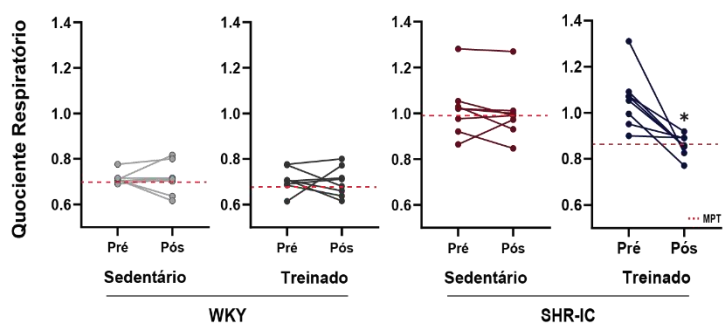
D



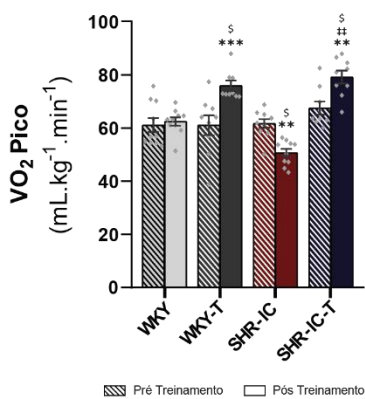
E



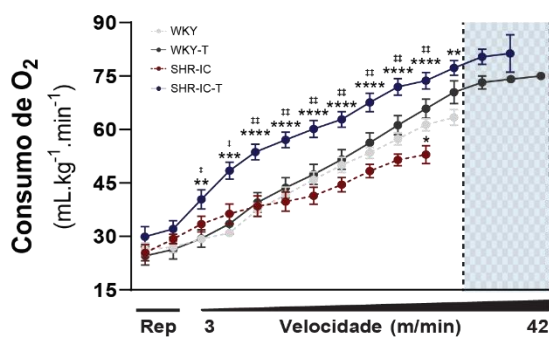
F



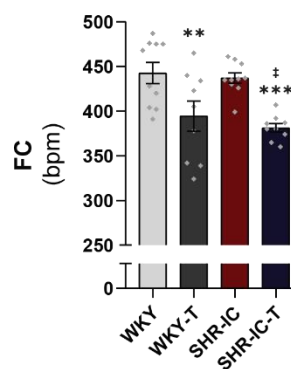
G



H



I



Pós Treinamento

FIGURA 7 – Progressão da hipertensão arterial e desenvolvimento da insuficiência cardíaca. Desenho experimental **(A)**; Valores pré e pós protocolo de TFA da Pressão Arterial Sistólica **(B)**; Dados ecocardiográficos de massa do ventrículo esquerdo (VE), fração de ejeção do VE e fração de encurtamento VE (FS) **(C)**; Imagem representativa do ecocardiograma **(D)**; Dados de edema pulmonar e hepático **(E)**; Quociente respiratório, linha tracejada vermelha representa a média pós TFA (MPT) **(F)**; Valores pré e pós protocolo de TFA do consumo de oxigênio (VO_2) pico **(G)**; VO_2 durante o teste máximo pós TFA. Área pontilhada em verde representa a diferença dos grupos treinados **(H)**; Frequência cardíaca (FC) de repouso pós TFA **(I)**. Grupos: Wky (n=10), indica ratos Wistar Kyoto sedentários; Wky-T (n=9), Wistar Kyoto treinados; Shr-IC (n=10), ratos espontaneamente hipertensivos sedentários insuficientes cardíacos; Shr-IC-T (n=9), ratos espontaneamente hipertensivos sedentários insuficientes cardíacos treinados. Cada ponto representa uma amostra biológica. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. \$Pré-TFA vs Pós-TFA, $p < 0,05$; * vs WKY, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$; ‡ vs SHR-IC, $p < 0,01$; ‡‡, $p < 0,0001$.

6.2 O treinamento físico aeróbio reduz a atrofia muscular prevenindo miopatia muscular esquelética induzida pela insuficiência cardíaca

A miopatia muscular esquelética é uma das principais causas da intolerância ao esforço físico, e essas alterações abrangem a mudança fenotípica e funcional da musculatura esquelética (PANDEY et al., 2021). Com isso, avaliamos a massa do músculo esquelético dos animais com intuito de encontrar alterações fenotípicas induzidas pela IC. Não foi observado nenhuma alteração da MC durante o protocolo experimental de ambos os grupos (FIGURA S2A e S2B), porém foi possível observar uma menor massa nos 3 músculos coletados do grupo SHR-IC em comparação ao grupo WKY (FIGURA 8A). De forma interessante, no grupo SHR-IC-T, o TFA foi capaz de prevenir a redução da massa do músculo sóleo e mitigar perda no músculo gastrocnêmio, porém sem afetar o músculo plantar, quando comparados ao grupo WKY. Dessa forma,

o TFA demonstra um efeito protetor na atrofia muscular de forma mais eficaz nos músculos predominantes oxidativos e mistos, em detrimento do músculo predominantemente glicolítico. Em relação ao tecido adiposo, os grupos que realizaram o TFA apresentaram um menor volume das gorduras retroperitoneal e epididimal, porém sozinha a IC foi capaz de reduzir a gordura no grupo SHR-IC e levou a uma perda mais acentuada no grupo SHR-IC-T (FIGURA 8B). A redução do tecido adiposo nos animais dos grupos SHR foi acompanhada de uma menor biodisponibilidade de triglicerídeos muscular no sóleo quando comparado ao controle (FIGURA 8C). A redução da massa muscular e adiposa configura um quadro de caquexia cardíaca, demonstrando que a progressão da HA e estabelecimento da IC atingem de forma importante tanto musculatura esquelética como o tecido adiposo. Para caracterizar as alterações fenotípicas no músculo esquelético, o músculo sóleo, predominantemente oxidativo, foi escolhido por ser diretamente afetado pela IC e protegido pelo efeito terapêutico do TFA de forma mais eficiente.

As análises de expressão gênica demonstram que a atrofia muscular no sóleo foi acompanhada da reprogramação na expressão das miosinas de cadeia pesada, com redução da expressão da Myh7, gene responsável pela expressão da fibra de tipo I e aumento da expressão das formas Myh1, Myh2 e Myh4 (FIGURA 8D). A modulação na expressão gênica das miosinas de cadeia pesada modificou a proporção de distribuição dos tipos de fibra, apresentando menores porcentagens de fibras marcadas pelo anticorpo MHC-I β em detrimento das fibras de tipo II no grupo SHR-IC, quando comparado ao controle (FIGURA 8E). Além da redistribuição no tipo de fibras, também foi observado uma redução da área de secção transversa das fibras tipo I (FIGURA 8F) e tipo II (FIGURA 8G) para o grupo SHR-IC em comparação ao controle. Por outro lado, o TFA foi capaz de restabelecer a expressão das miosinas de cadeia pesada, sem afetar a Myh2, sendo efetivo na recuperação da proporção de distribuição dos tipos de fibra no grupo Shr-IC-T, reduzido a porcentagem de fibras tipo II e aumentando a área de secção em ambos os tipos de fibra muscular (FIGURA 8D-G).

Juntos esses resultados, demonstram as alterações fenotípicas induzidas pela IC, geraram um estado de caquexia cardíaca, nos animais dos grupos SHR-IC, com atrofia da musculatura esquelética e do tecido adiposo; mudança na expressão gênica das

miosinas de cadeia pesada; mudança na distribuição do tipo de fibra, com maiores quantidade de fibras tipo II no músculo sóleo; redução na área de secção transversa. Por outro lado, o TFA preveniu a atrofia muscular com maior eficiência nos músculos predominantemente oxidativo e misto, restabelecendo a expressão gênica, o perfil de fibras e a área de secção transversa. Dessa forma o TFA é capaz de prevenir a miopatia muscular nesses animais.

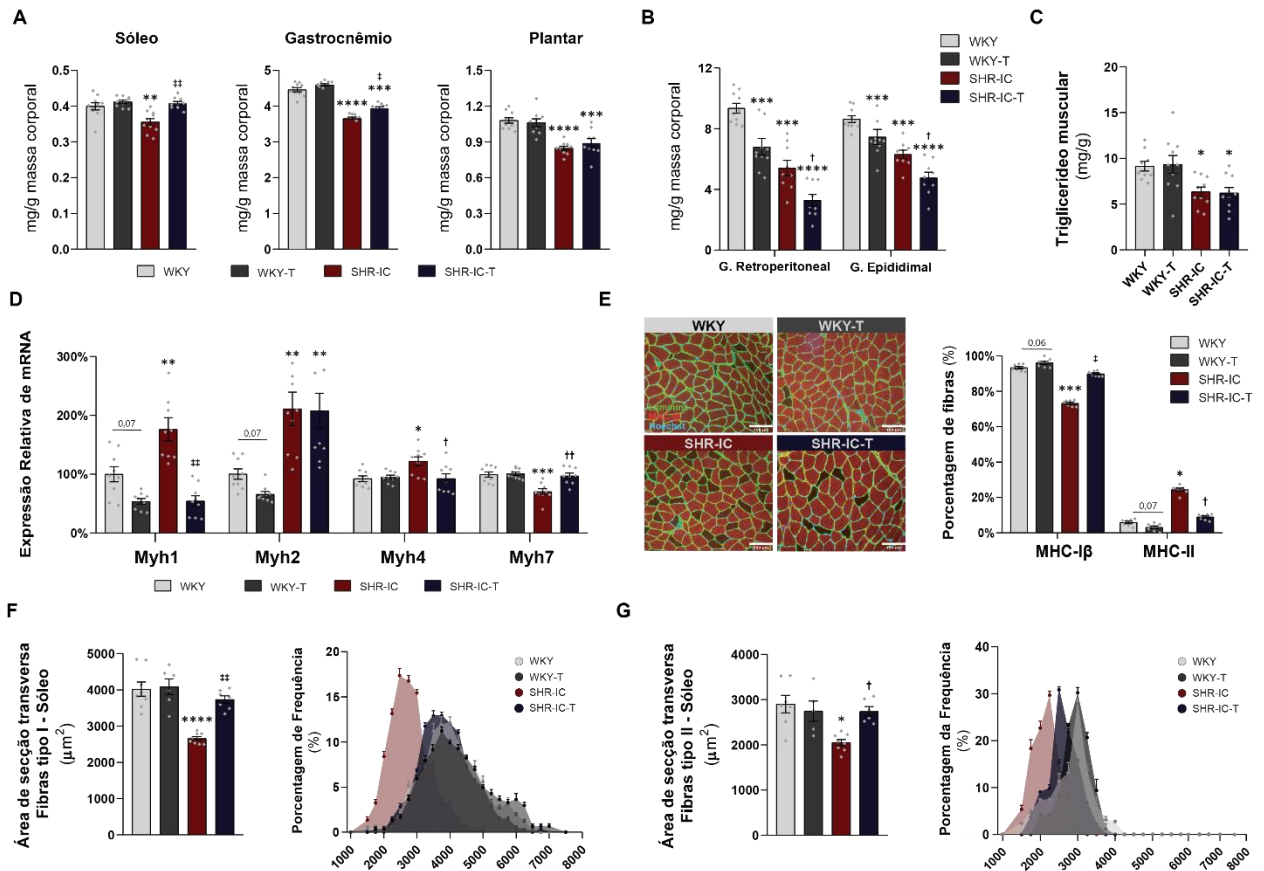


FIGURA 8 – Mudanças fenotípicas musculares na insuficiência cardíaca. Massa muscular esquelética do músculos selecionados **(A)**; Massa dos tecidos adiposos **(B)**; Conteúdo de triglicérideo muscular do músculo sóleo **(C)**; Expressão gênica de miosinas de cadeia pesada (Myh) 1 a 7 **(D)**; Imagem representativa e análise histológica para distribuição de tipo de fibra **(E)**; Área de secção transversa da fibra muscular do tipo I **(F)** e tipo II **(G)**. Grupos: Wky (n=9), indica ratos Wistar Kyoto sedentários; Wky-T (n=9), Wistar Kyoto treinados; Shr-IC (n=9), ratos espontaneamente hipertensivos sedentários insuficientes cardíacos; Shr-IC-T (n=9), ratos espontaneamente hipertensivos sedentários insuficientes cardíacos treinados. Cada ponto representa uma amostra biológica. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * vs WKY, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$; † vs SHR-IC, $p < 0,05$; ‡, $p < 0,01$; ††, $p < 0,001$; ‡‡, $p < 0,0001$.

6.3 O treinamento físico aeróbio restabelece o conteúdo de ATP melhorando a atividade enzimática oxidativa, preservando o conteúdo e função mitocondrial evitando a miopatia esquelética induz pela insuficiência cardíaca

A IC é responsável por importantes alterações metabólicas na musculatura estriada (BERTERO et al., 2018). Como forma de quantificar as alterações metabólicas na miopatia muscular, primeiramente analisamos o conteúdo de ATP muscular e a quantidade de lactato plasmático nos grupos experimentais. Observamos no grupo SHR-IC uma redução na produção de ATP, juntamente com o aumento na quantidade de lactato em comparação ao grupo WKY (FIGURA 9A e 9B). Entretanto, o TFA preveniu a redução na quantidade de ATP e parcialmente reduziu o lactato plasmático no grupo SHR-IC-T. Ainda, observamos o aumento de expressão dos genes *Pdk4* e *Ldha*, envolvidos na regulação do metabolismo glicolítico em ambos os grupos SHR, e redução na expressão do gene *Acad11*, somente no grupo SHR-IC quando comparado ao controle (FIGURA 9C). Por outro lado, o TFA induziu mudanças na expressão de genes envolvidos metabolismo glicolítico com aumento da expressão de *Hk1* e redução de *Ldhb* e *Pdk4* no grupo WKY-T, porém não foi observado alterações na expressão gênica

decorrente do TFA no grupo SHR-IC-T. O aumento na expressão dos genes *Pdk4* e *Ldha* nos animais dos grupos SHR justifica o aumento do lactato plasmático, o qual é convertido do piruvato pela enzima LDHA, que é sensível a níveis elevados de piruvato possivelmente acumulados pelo aumento de PDK4, proteína responsável pela redução da conversão de piruvato em acetil-CoA impedindo a entrada no ciclo de Krebs. No grupo SHR-IC-T é possível observar o aumento na expressão pontual de *Lpl* e *Fabp5* responsáveis pela quebra de triglicerídeos em ácidos graxos e do transporte deles para o citosol.

Como demonstrado anteriormente, a biodisponibilidade de triglicerídeo está reduzida no músculo sóleo de ambos os grupos SHR (FIGURA 8C), a baixa quantidade de substratos pode interferir na produção energética via o metabolismo oxidativo, proveniente da betaoxidação, impactando na produção de ATP como visto no grupo SHR-IC. Porém, a discreta melhora na expressão de *Lpl* e *Fabp5* não justificaria a maior produção de ATP no grupo SHR-IC-T, que também não apresentou aumento na expressão de genes envolvidos no metabolismo glicolítico. Dessa forma, para identificar os responsáveis pela melhora na produção de ATP no grupo SHR-IC-T, avaliamos a atividade enzimática das três reações chaves do metabolismo glicolítico e duas enzimas do metabolismo oxidativo e transporte de ácidos graxos. Observamos, no grupo SHR-IC, que a atividade enzimática da HK, PFK e PK (glicolíticas), assim como, as atividades da CS e CPT1 (oxidativas) estavam reduzidas (FIGURA 9D). Por outro lado, o TFA foi essencial em prevenir a redução na atividade da HK e PFK e melhorar a atividade das enzimas oxidativas CS e CPT1 no grupo SHR-IC-T, possivelmente sendo responsável pela melhora na produção de ATP encontrada no grupo IC treinado.

Na IC a redução na quantidade e função mitocondrial está diretamente relacionada ao desenvolvimento da miopatia muscular e piora na tolerância ao esforço (DEL BUONO et al., 2019; RAMIREZ-VELEZ et. al., 2022), ainda as alterações fenotípicas ocasionadas devido a miopatia esquelética e responsável por alterações no tipo de fibra muscular poderiam afetar o conteúdo mitocondrial, já que as fibras tipo I são reconhecidas pelo grande número de mitocôndrias (SCHIAFFINO & REGGIANI, 2011). Com o objetivo de verificar a alteração no conteúdo mitocondrial, realizamos a extração do mtDNA e quantificamos o número de cópias do mtDNA corrigido pela quantidade de DNA nuclear.

Observamos uma redução em média de 39% do material genético mitocondrial para o grupo SHR-IC (FIGURA 9E). Por outro lado, os animais do grupo SHR-IC-T apresentaram um aumento no conteúdo mitocondrial em direção ao nível do grupo controle. Para analisar a função mitocondrial muscular, isolamos a fibra muscular dos grupos experimentais e medimos o consumo de oxigênio mitocondrial. Observamos no grupo SHR-IC a redução da respiração mitocondrial, com menores valores na respiração máxima estimulado por ADP e FCCP (estados 3 e 3u) e na respiração não dependente de ATP (estado 4), demonstrando que a função mitocondrial e a produção de ATP está prejudicada no grupo IC (FIGURA 9F). Por outro lado, o TFA melhorou a função com aumento da respiração mitocondrial nos estados 3, 3u, 4 e basal (Estado 2), alcançando níveis próximos dos encontrados no grupo saudável e treinado (WKY-T). O resultado médio do consumo dos grupos durante os experimentos foi representado na Figura S3A, também não foi observado alterações no controle respiratório (FIGURA S3B).

De forma interessante, a redução no conteúdo mitocôndria não gerou alterações na expressão gênica dos complexos mitocondriais entre os grupos experimentais (FIGURA S3C), porém a expressão proteica dos complexos mitocôndrias II, III e V estão reduzidas no grupo SHR-IC, possivelmente por efeito pós transcricional (FIGURA 9G). Entretanto, o TFA foi capaz de prevenir a redução da expressão proteica nesses complexos. Juntos, os resultados demonstram que a IC induziu as alterações metabólicas aliada a mudanças fenotípicas características da miopatia muscular. Ainda, destacam a função terapêutica do TFA em melhorar a atividade enzimática oxidativa, preservando o conteúdo e função mitocondrial e restabelecendo a produção de ATP, sem alterar a expressão de genes envolvidos no metabolismo e prevenindo a miopatia muscular. Porém, ainda está claro qual o mecanismo responsável por essas alterações.

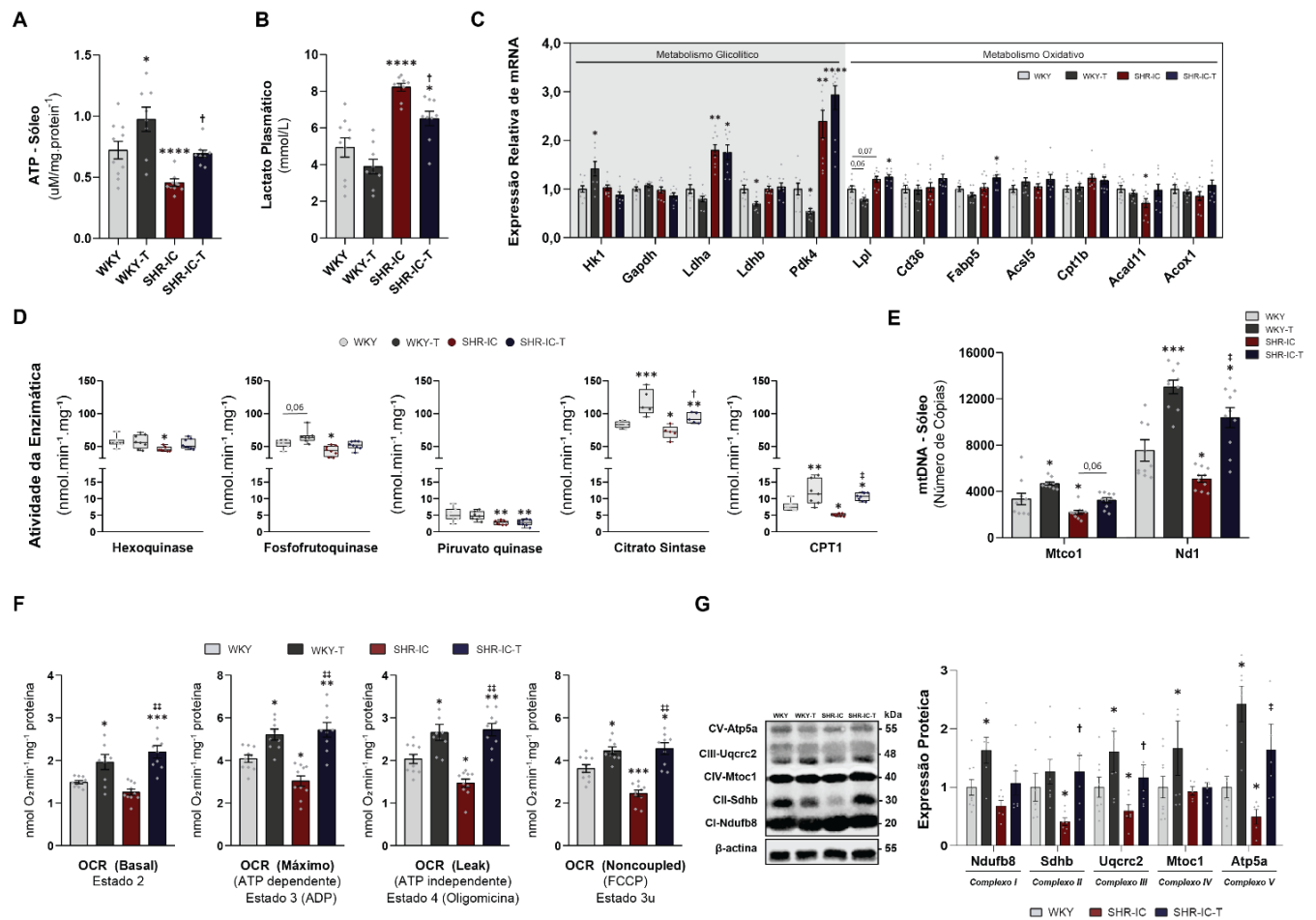


FIGURA 9 – Mudanças metabólicas musculares na insuficiência cardíaca. Quantidade de ATP na musculatura esquelética (**A**); Quantidade de lactato plasmático (**B**); Expressão de genes envolvidos no metabolismo glicolítico e oxidativo (**C**); Atividade enzimática (**D**); Conteúdo mitocondrial (**E**); Respiração mitocondrial de fibras isoladas (**F**); Expressão proteica dos complexos mitocondriais (I-V) (**G**). Grupos: Wky (n=9), indica ratos Wistar Kyoto sedentários; Wky-T (n=9), Wistar Kyoto treinados; Shr-IC (n=9), ratos espontaneamente hipertensivos sedentários insuficientes cardíacos; Shr-IC-T (n=9), ratos espontaneamente hipertensivos sedentários insuficientes cardíacos treinados. Cada ponto representa uma amostra biológica. Os resultados estão expressos como média ± EPM. * vs WKY, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$; † vs SHR-IC, $p < 0,05$; ‡, $p < 0,01$; ††, $p < 0,0001$.

6.4 Expressão de microRNAs controla alterações fenotípicas e metabólicas na miopatia muscular

Com o objetivo de avaliar os miRNA diferencialmente expressos na miopatia muscular induzida pela IC de etiologia hipertensiva e selecionar aqueles restabelecidos pelo TFA, analisamos os dados do *microarray* previamente realizado no laboratório. Dos 727 miRNAs presentes no chip, com base no *release* versão 20.0 do Sanger miRBase para ratos, 228 miRNAs foram expressos no músculo sóleo com níveis maiores que 32 unidades arbitrárias (a.u). Desses miRNAs detectados, 76 miRNAs (17 com expressão reduzida e 59 aumentada) foram diferencialmente expressos no músculo sóleo do grupo SHR-IC comparado ao grupo controle (FIGURA 10A). A análise PCA demonstra a diferença na expressão dos miRNAs entre os animais do grupo SHR-IC e WKY-T e que o TFA foi capaz de recuperar a expressão dos miRNAs para níveis mais próximos do grupo WKY-T (FIGURA 10B e 10C).

Do primeiro *pull* de 76 miRNAs alterados na miopatia muscular, foi identificado que o TFA normalizou estatisticamente 15 desses miRNAs, aumentando a expressão em 6 miRNAs (miRNAs-99b-3p, -140-3p, -191a-5p, -208b-3p, -466c-3p e -499-5p) e reduzindo em 9 miRNAs (miRNAs-1-3p, -30c-1-3p, -30c-2-3p, -96-5p, -182, -205, -328a-5p, -665 e -668) como demonstrado no *heatmap* (FIGURA 10D). Desses 15 miRNAs selecionados devido ao efeito do TFA, realizamos o estudo *in silico* da integração miRNA-mRNA e posteriormente a análise de anotação funcional GO para identificar as 50 vias de sinalização mais enriquecidas para os genes alvos dos miRNAs selecionados. Das 50 vias mais enriquecidas, 15 vias eram relacionadas com regulação morfológica e metabólica destacadas em vermelho (TABELA S2). Individualmente, realizamos a análise de enriquecimento para os genes alvos de cada miRNA selecionado e identificamos que 4 miRNAs possuíam duas ou mais vias enriquecidas para processos morfológicos ou metabólicos (miRNAs-205, 2 vias; -208b, 3 vias; - 328a, 4 vias; e 499, 5 vias) e foram escolhidos para prosseguir no estudo. Os outros miRNAs não apresentaram alvos enriquecidos para os processos biológicos de interesse (FIGURA S4A). Esses miRNAs sobressalentes passaram por uma segunda rodada de análises, em que foi identificado o número de genes envolvidos em vias metabólicas e morfológicas. Dentre os miRNAs reanalisados, o miRNA-1, apresentou muitos genes envolvendo vias enriquecidas para

processos metabólicos (TABELA S3). Das 10 vias com mais genes envolvidos, o miRNA-1 apresentou 7 vias enriquecidas, somando mais de 500 genes ligados aos processos metabólicos, justificando a sua seleção.

Por fim, realizamos o cluster dos miRNAs selecionados (miRNAs-1, -205, -208b, -328a, e -499) e identificamos diversas vias enriquecidas para controle morfológico e do metabolismo (FIGURA 10E). Um segundo cluster com os outros miRNAs não selecionados, não apresentou enriquecimento para vias de regulação metabólica ou morfológica (FIGURA S4B). Ainda, observamos que esses miRNAs possuem um grande número de genes preditos (FIGURA 10F). Após as análises de bioinformática, realizamos a confirmação da expressão dos 5 miRNAs selecionados no *microarray* por RT-qPCR. Desses, 3 miRNAs tiveram suas expressões aumentadas (miRNAs-1, -205 e -328a) e 2 reduzidas (miRNAs-208b e -499) no grupo SHR-IC em comparação ao grupo WKY. Por outro lado, o grupo SHR-IC-T restabeleceu os níveis de expressão iguais ao controle (FIGURA 10G).

A expressão destes miRNAs foi correlacionada com a capacidade física dos animais, no qual observamos uma correlação positivamente para os miRNAs-208b e -499 e negativa para os miRNAs-328a e -205 em relação ao VO_2 pico alcançados no teste máximo (FIGURA 10H), não havendo correlação entre o miRNA-1. Ainda, a expressão destes miRNAs parece estar correlacionado com a mudança no fenótipo muscular, com correlação positiva para os miRNAs-208b e -499 e negativa para os miRNAs-328a e -205 em relação a porcentagem de fibras tipo I (FIGURA S4C). Novamente, o miRNA-1 não teve correlação com a porcentagem de fibras tipo I. Esses resultados demonstram que os miRNAs selecionados possuem alvos gênicos enriquecidos para as vias morfológicas e metabólicas e que possivelmente possuem papel chave para a regulação do fenotípica e metabólica na miopatia muscular provocada pela IC e os efeitos protetores induzidos pelo TFA.

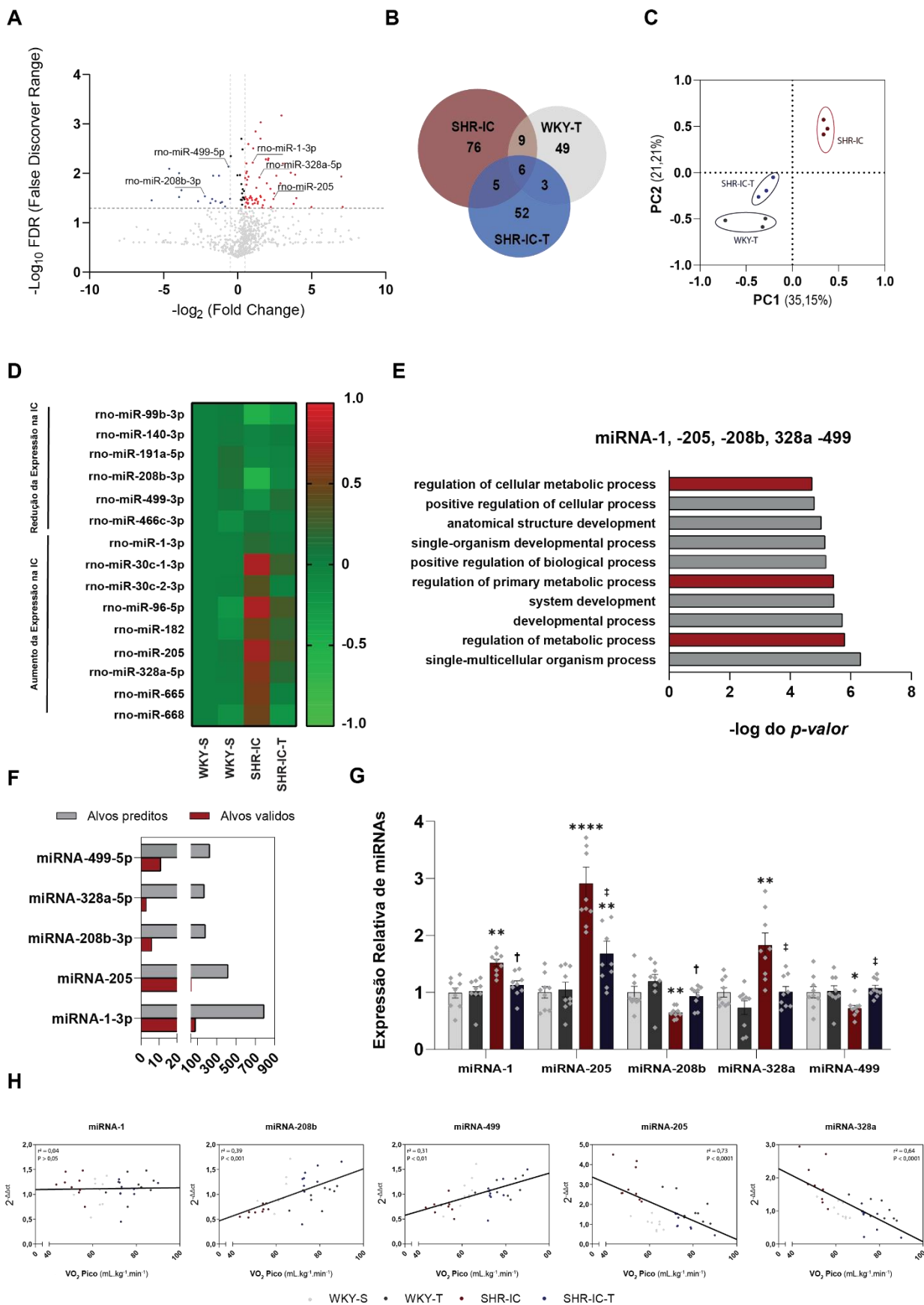


FIGURA 10 – Expressão de miRNAs alterados na insuficiência cardíaca e corrigidos pelo treinamento físico aeróbio. Vulcano plot da expressão dos miRNAs insuficiência comparado ao controle **(A)**; miRNAs diferencialmente expresso nos grupos experimentais comparado ao controle **(B)**; A análise de componentes principais (PCA) da expressão dos miRNAs dos grupos experimentais em comparação ao controle **(C)**; *Heatmap* dos miRNAs alterados pela IC e corrigidos estatisticamente pelo treinamento físico aeróbio **(D)**; Vias de processos biológicos enriquecidas, dos genes alvos dos miRNAs **(E)**; Análise do número de alvos para cada miRNA selecionado **(F)**; Confirmação da expressão dos miRNAs selecionados por RT-qPCR **(G)**; Correlação entre a expressão dos miRNAs e o consumo de oxigênio (VO_2) pico **(H)**. Grupos: Wky, indica ratos Wistar Kyoto sedentários; Wky-T, Wistar Kyoto treinados; Shr-IC, ratos espontaneamente hipertensivos sedentários insuficientes cardíacos; Shr-IC-T, ratos espontaneamente hipertensivos sedentários insuficientes cardíacos treinados. Foram utilizado 3 amostras por grupo para realizar as análises de *microarray* e 9 amostras para as demais análises. Cada ponto representa uma amostra biológica. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * vs WKY, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ****, $p < 0,0001$; † vs SHR-IC, $p < 0,05$; ‡, $p < 0,01$.

6.5 miRNAs-205 e -328a regulam a via de PGC1 α - PPAR β/δ - miRNA-208b e -499 no controle fenotípico e metabólico na miopatia muscular induzida pela insuficiência cardíaca

Estudo recentes demonstram que a expressão de PPAR β/δ , importante fator de transcrição responsável pelo controle metabólico e fenotípico muscular, está reduzido em animais SHR (YANG et al., 2022). Ainda, nossas análises *in silico* demonstram que os miRNAs-205 e 328a são alvos preditos para PPAR β/δ e PGC1 α (FIGURA 11A), outro

importante co-fator de transcrição importante na biogênese mitocondrial e controle do metabolismo e conhecido por regular a expressão de PPAR β/δ (SCHULER et al., 2006).

Para verificar a possibilidade dessa via de sinalização e buscar outros possíveis candidatos responsáveis pela regulação metabólica e fenotípica, quantificamos a expressão do gene Ppard e Pgc1a, junto a expressão de Ppara e Ampk também importantes na regulação do metabolismo. Não observamos alteração na expressão gênica de Ppara, Ppard e Pgc1a no grupo SHR-IC, porém foi possível observar uma redução nos níveis de expressão de Ampk em ambos os grupos SHR (FIGURA 11B). O TFA parece não ter efeito na expressão de Ampk no grupo SHR-IC-T, entretanto foi observado o aumento na expressão de Ppard nos animais submetidos ao TFA. Como mencionado anteriormente, os miRNAs-205 e -328a são possíveis alvos pós transcricional do Ppard e de Pgc1a (FIGURA 11A). Estudos recentes também demonstram uma importante regulação do miRNA-1 na expressão de AMPK (RODRIGUES et al., 2021), com o motivo de identificar a ação pós transcricional desses miRNAs, realizamos a análise da expressão proteica desses alvos. A expressão de PPAR α não foi alterada nos grupos experimentais. Entretanto, a expressão de PPAR β/δ e PGC1 α está reduzida na condição de miopatia muscular induzida pela IC e o TFA foi capaz de prevenir essa redução da expressão, possivelmente por redução da expressão dos miRNAs-205 e -328a. Por outro lado, a expressão de AMPK está aumentada no grupo WKY-T, e não apresentou alteração nos animais dos grupos SHR.

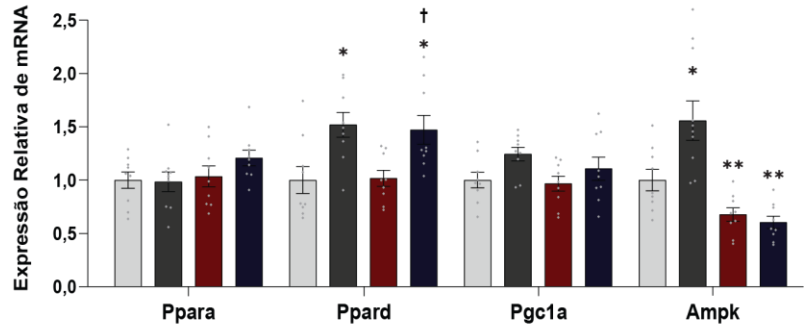
A via de sinalização PPAR β/δ é responsável pelo controle de expressão da MHC-I β , por meio do aumento dos miRNAs-208b e -499 que controlam a tradução de PUR β , SP3 e SOX6 (VAN ROOIJ et al., 2009; GAN et al., 2015). Com isso buscamos investigar as proteínas responsáveis no controle de expressão da MHC-I β . Observamos um aumento na expressão proteica de SP3 e PUR β nos animais do grupo SHR-IC. Por outro lado, o TFA preveniu esse aumento no grupo SHR-IC-T (FIGURA 11C).

Os resultados demonstram uma possível regulação via PGC1 α - PPAR β/δ na expressão desses miRNAs-208b e -499 reduzidos na miopatia muscular, via regulação *upstream* dos miRNAs-205 e -328a que apresentaram um aumento na expressão devido à miopatia muscular induzida pela IC.

A

PPARGC1A TATGTCTCACTGTGTTTGAAGGA
 |||||
 rno_mir_205 TGTCTGAG-GCCACCTTACTTCT
 PPARD CCTGCCCACTGCAGCTGCCT
 |||||
 rno_mir_328a ACTCGGG-GAGGACGGGGGG

B



C

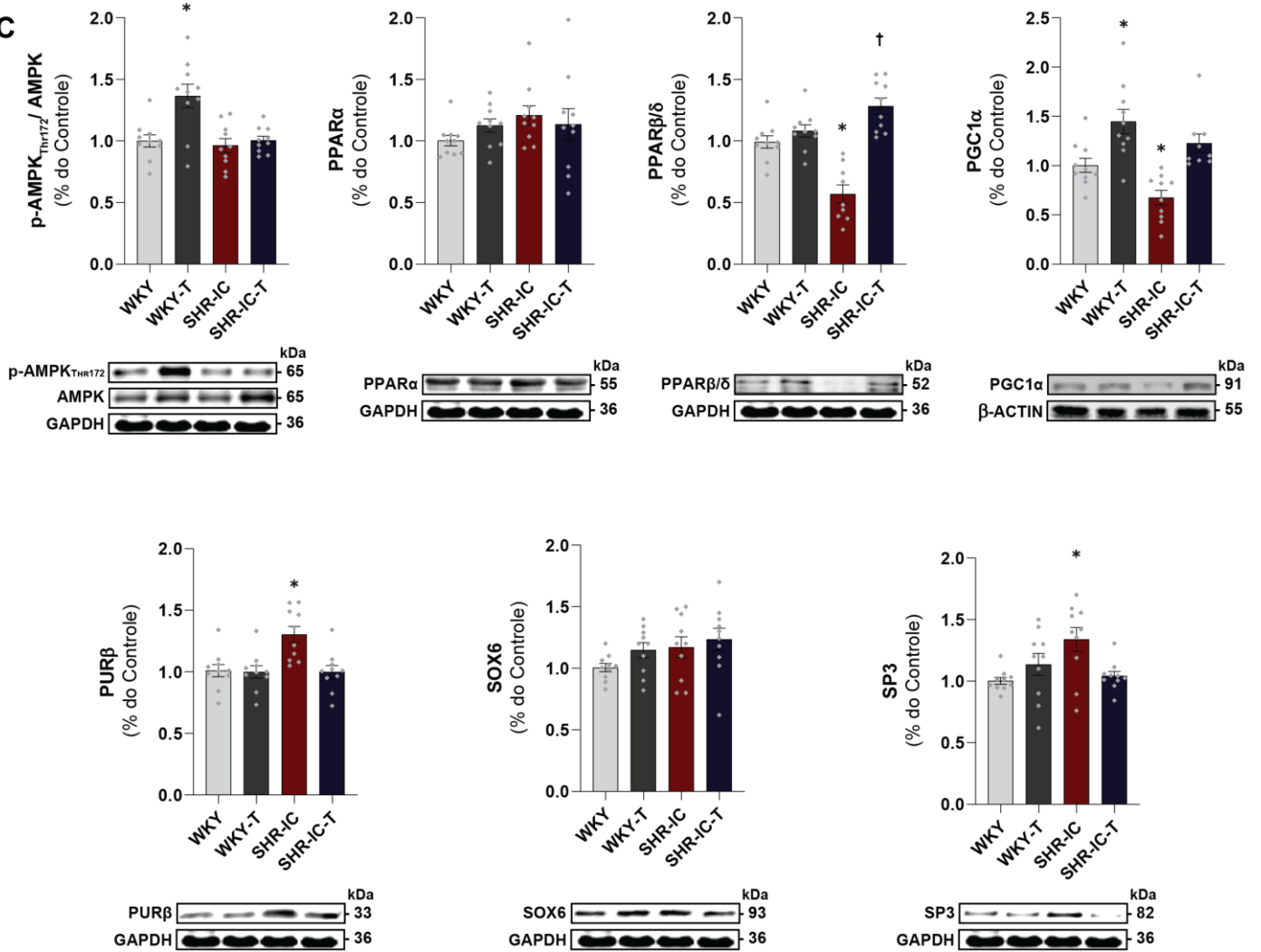


FIGURA 11 – Expressão proteica da via PCG1 α – PPAR β/δ – miRNAs-208b e -499 na regulação da MHC- β . Análise bioestatística da predição dos alvos do miRNAs-205 e -499 **(A)**; Expressão gênica dos reguladores do metabolismo **(B)**; Expressão proteica da via PCG1 α – PPAR β/δ – miRNAs-208b e -499 na regulação da MHC- β **(C)**. Grupos: Wky (n=8), indica ratos Wistar Kyoto sedentários; Wky-T (n=8), Wistar Kyoto treinados; Shr-IC (n=8), ratos espontaneamente hipertensivos sedentários insuficientes cardíacos; Shr-IC-T (n=8), ratos espontaneamente hipertensivos sedentários insuficientes cardíacos treinados. Cada ponto representa uma amostra biológica. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * vs WKY, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; † vs SHR-IC, $p < 0,05$.

6.6 A expressão dos miRNAs alterados pela miopatia muscular em humanos

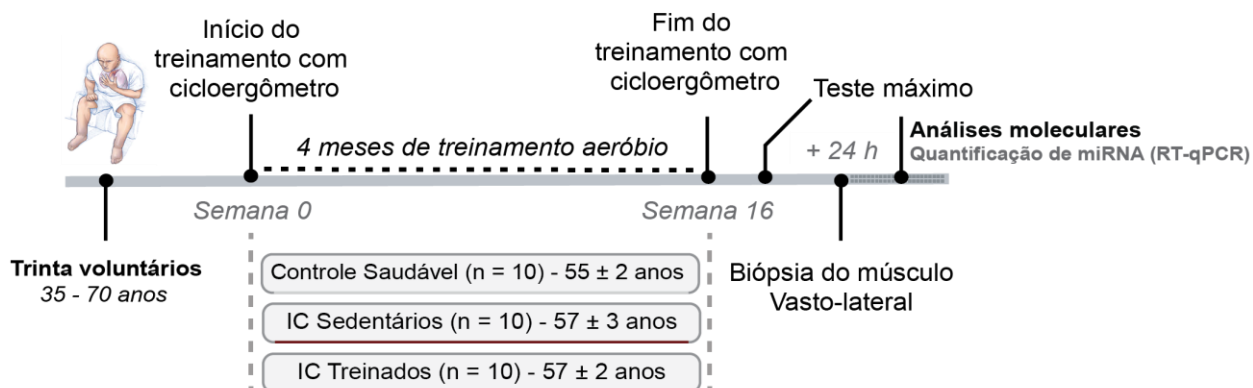
Como perspectiva translacional da expressão destes miRNAs na miopatia muscular e os efeitos do TFA, investigamos a expressão de 4 miRNAs selecionados em pacientes com IC. Para isso, 30 voluntários foram divididos em 3 grupos: controle saudável (Controle), IC sedentários (IC) e IC treinados (IC-TR). O grupo IC-TR realizou 4 meses de TFA em cicloergômetro; os grupos controle e IC não participaram do protocolo de treinamento, mantendo a sua rotina normal com baixo nível de atividade e foram considerados sedentários. Após o protocolo experimental, todos os voluntários foram submetidos ao teste máximo para avaliação do VO₂ máximo e 24 horas após o teste foi realizado a biópsia do músculo vasto lateral em todos os grupos. As amostras de tecidos foram armazenados para posterior análise da expressão de miRNAs (FIGURA 12A), os dados do teste máximo e dados clínicos dos pacientes estão descritos na Tabela S4.

Assim como no modelo animal, o grupo IC apresentou redução significativa na expressão do miRNA-499, acompanhado da redução do miRNA-208b apesar de não alcançar os valores estatísticos ($p = 0,07$). Houve também o aumento na expressão dos miRNAs-1 e -205 no grupo IC (FIGURA 12B). Por outro lado, o TFA preveniu a o aumento na expressão dos miRNAs-1, -208b e -499, similar ao encontrado no modelo animal. O

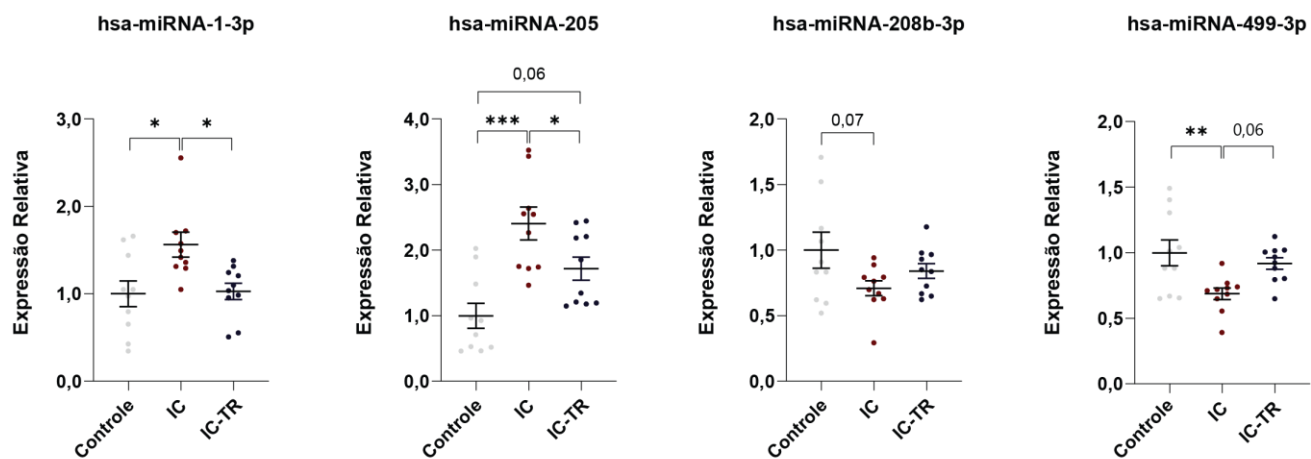
aumento na expressão do miRNA-205, vista no modelo animal e nos pacientes, foi parcialmente restabelecida quando comparada ao controle saudável (FIGURA 12B).

Para avaliar a possível relação da expressão dos miRNAs com a capacidade física dos voluntários, foi realizado a correlação da expressão dos miRNAs com o VO₂ máximo alcançado no teste de esforço máximo. Observamos uma correlação positiva entre os miRNAs-208b e -499, por outro lado a redução do miRNA-205 parece estar correlacionada negativamente com o VO₂ máximo (FIGURA 12C). Novamente, o miRNA-1 não apresentou correlação com a capacidade física. Junto esses resultados demonstram que a expressão dos miRNAs selecionados possuem um perfil próximo do encontrado nos animais insuficientes cardíacos, possivelmente realizando o controle do fenótipo e metabólico nesses pacientes.

A



B



C

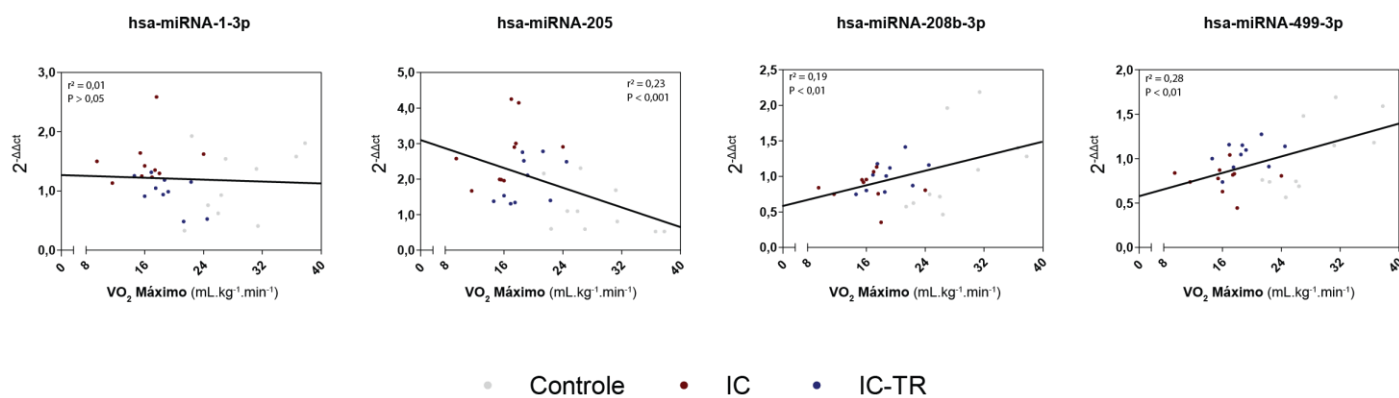


FIGURA 12 – Expressão dos miRNAs alvos em pacientes insuficientes cardíacos. Desenho experimental **(A)**; Expressão dos miRNAs **(B)**; Correlação entre a expressão dos miRNAs com o consumo de oxigênio VO_2 máximo atingido no teste de esforço **(C)**. Grupos: Controle (n=10), indivíduos saudáveis sedentários; IC (n=10), pacientes com insuficiência cardíaca sedentários; IC-TR (n=10), pacientes com insuficiência cardíaca treinados. Cada ponto representa uma amostra biológica. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

7 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas a alta prevalência da IC representa um grande problema para a saúde pública, sendo responsável por inúmeras internações e alta taxa de mortalidade (BEIJAMIN et al., 2020). A HA é o maior fator de risco modificável responsável pelo desenvolvimento da IC, porém sua causa primária ainda permanece em discussão e mais estudo são necessários para entender os mecanismos responsável pela progressão da doença (CHOBANIAN et al., 2003; COFFMAN, 2011; DI PALO et al., 2020). A manutenção dos níveis pressóricos é necessária para permitir adequada perfusão sanguínea para órgãos periféricos, porém o aumento crônico da resistência vascular periférica impede o fluxo sanguíneo adequado e conseqüentemente leva à disfunção de órgãos alvos necessários para manter a homeostase do organismo. O comprometimento de órgãos alvos como cérebro, coração, rins e músculo esquelético está intimamente associado a complicações da progressão da HA (COFFMAN, 2011).

Estudo recente, publicado na prestigiada revista Lancet, alertou que 40-50% dos pacientes hipertensos nunca foram diagnosticados; e que mesmo aqueles pacientes diagnosticados, 10-20% não realizam tratamento ou não conseguem manter a doença controlada (NCD-RisC, 2021). A justificativa mais coerente para a baixa adesão ao tratamento farmacológico é o fato de a HA ser uma condição frequentemente assintomática e silenciosa, possibilitando a demora na procura por tratamento médico por parte dos pacientes. Entretanto, o não tratamento da HA permite que a doença progrida para o seu estágio final a IC, um processo complexo caracterizado em quatro níveis principais: disfunção diastólica isolada; disfunção diastólica com hipertrofia cardíaca; ICfEp; ICfEr (MESSERLI et al., 2017). Uma vez a IC estabelecida, a fadiga precoce e dispnéia a pequenos esforço são eventos recorrentemente relatados pelos pacientes, sendo um sintoma clássico da doença e caracterizado como intolerância ao esforço físico (BIU et al., 2010; DEL BUONO et al., 2019; KELLER-ROSS et al., 2019). Dentre as possíveis causas para a intolerância ao esforço físico, as alterações músculo esqueléticas representadas pela alteração do fenótipo e metabolismo muscular ocupam um papel chave para compreensão dos mecanismo resultante da fadiga (PIEPOLI et al., 2013).

Agindo na contramão das DCVs, o TFA é considerado uma das abordagens terapêuticas mais significativas em contrapor e prevenir o avanço das doenças cardíacas (DI PALO et al., 2020). Especificamente na HA, o TFA é responsável em reduzir os níveis pressóricos elevados, poupando órgãos alvos e mitigando os efeitos progressivos da doença (ROSSONI et al., 2011; ROQUE et al., 2013; CAMPOS et al., 2015). Por outro lado, na IC o TFA vem sendo utilizado como importante ferramenta na redução de sintomas de fadiga, melhorando a tolerância ao esforço e a qualidade de vida dos pacientes (PONIKOWSKI et al., 2016; DEL BUONO et al., 2019). Apesar dos inúmeros estudos que investigaram os efeitos do TFA sobre a progressão da HA e a IC no sistema cardíaco, poucos estudos procuraram investigar tanto os efeitos deletérios da doença e os possíveis efeitos terapêuticos do TFA na musculatura esquelética.

Os miRNAs são ncRNAs que vem ganhando importante destaque na regulação pós-transcricional e estão envolvidos em praticamente todos os processos biológicos (JUSIC & DEVAUX, 2019). A alteração na expressão destes miRNAs, mesmo que pequena, pode resultar na disfunção celular e desenvolvimento de patologias (WOJCIECHOWSKA et al., 2017). Apesar de décadas de estudos e inúmeros avanços no entendimento das funções dos miRNAs nas DCVs, ainda pouco se sabe sobre a influência desses transcritos na miopatia muscular induzida pela IC e atualmente, ainda não há estudo que buscaram estudar o perfil da expressão dos miRNAs no músculo esqueléticos de pacientes e animais com IC de etiologia hipertensiva.

No presente estudo, utilizamos o modelo de hipertensão espontânea (SHR), com o objetivo de investigar os danos causados pela progressão da HA de forma próxima ao encontrado no curso natural da doença. Sendo assim, animais SHR com 9 meses de idade e seus respectivos controles WKY, foram utilizados para investigar as alterações músculo esqueléticas induzidas pela miopatia muscular, além de verificar o papel terapêutico do TFA na tentativa de prevenir essas alterações. Ainda, o estudo se propõem a investigar a expressão dos miRNAs no estado patológico e os possíveis efeitos do TFA nessa expressão desses transcritos.

Os resultado do estudo demonstram que o TFA atenuou a progressão da HA reduzindo os níveis de PA: 1) melhorando os sinais e sintomas da IC, prevenindo parte do remodelamento cardíaco adverso e totalmente a intolerância os esforço físico; 2)

reduzindo as alterações fenotípicas musculares, como a atrofia muscular e mudança na proporção do tipo de fibra; 3) melhorando o metabolismo, com aumento na atividade de enzimas glicolíticas e oxidativas; 4) melhorando a densidade e função mitocondrial; 5) prevenindo parcialmente a expressão diferencial dos miRNAs no sóleo; 6) normalizando a expressão de proteínas essenciais para o controle do tipo de fibra e metabolismo muscular.

7.1 Caracterização da insuficiência cardíaca e os efeitos terapêuticos do treinamento físico aeróbio

Estudos epidemiológicos vêm demonstrando nas últimas décadas a relação inversa existente entre o nível de condição física e o desenvolvimento das DCVs (MYERS et al., 2002; NYSTORIAK et al. 2018). Desta forma, a inatividade física está associada com maior risco de desenvolvimento da HA, sendo o TFA regular um componente essencial na prevenção e tratamento da HA, restabelecendo os níveis pressóricos e evitando a progressão da doença até a IC.

Como esperado, observamos que os animais dos grupos SHR apresentaram níveis elevados de PA comparados ao grupo controle no início do protocolo experimental. Entretanto, ao final das 10 semanas de TFA, demonstramos que o treinamento de baixa intensidade e longa duração foi eficaz de reduzir a PA no grupo SHR-IC-T em comparação aos valores pressóricos pré TFA. Esses resultados são condizentes com os encontrados na literatura, corroborando com estudos anteriores que observaram a redução da pressão arterial em animais geneticamente hipertensos e humanos após a execução de programas de TFA (LATERZA et al., 2007; ZAMO et al., 2010; ROQUE et al., 2013; CAMPOS et al., 2015). Ademais, já foi demonstrado que o TFA é capaz de prevenir a HA se empregado antes do estabelecimento da doença (ZAMO et al., 2010). Importante ressaltar que estudos anteriores do nosso grupo, em animais SHR de diferentes idades, demonstraram que a idade é uma variável importante para o controle pressórico envolvendo o TFA (dados não publicados). Esses resultados, salientam a importância do tempo para o início do TFA e que quanto mais cedo o treinamento foi instituído maior será o controle dos níveis pressóricos. Em nosso trabalho, possivelmente

aos 9 meses de vida a progressão da HA estabeleceu um quadro crônico, no qual as alterações e mecanismos envolvidos no controle da PA não são mais passíveis de alteração pelo TFA, apresentando redução nos níveis pressóricos para o grupo SHR-IC-T, porém acima valores considerados limítrofes.

Nesse sentido, uma meta-análise, demonstrou que os benefícios do TFA estão relacionados ao quanto antes é iniciado a prática regular do exercício físico e por quanto tempo ela é mantida, indicando que programas de atividade física superior a 3 meses, iniciados logo no descobrimento das DCVs pode apresentar melhores resultados (HAYKOWSKY, 2011). Por outro lado, os efeitos do TFA sobre a PA parecem depender da presença da HA. Estudos já demonstraram que a resposta da PA permanece inalterada em animais e humanos normotensos submetidos a protocolos de TFA (NEGRÃO et al., 1993; FERNANDES et al., 2011; Da SILVA et al., 2012). No presente estudo, não houve diferença significativa em relação a PA entre o grupo WKY.

Os animais SHR são utilizados amplamente para estudar o remodelamento cardíaco e a hipertrofia ventricular esquerda compensada, a qual pode evoluir progressivamente para a forma descompensada e progredir para o quadro de IC (DIWAN & DORN, 2007; DRAZNER, 2011). Inicialmente, os ratos SHR foram introduzidos por OKAMOTO & AOKI (1963) como um modelo genético de hipertensão e rapidamente ocuparam lugar de destaque nas pesquisas, por sua grande semelhança com a HA essencial que ocorre nos seres humanos. A hipertrofia ventricular esquerda nesse modelo é causada pela sobrecarga de pressão, induzindo a um aumento desproporcional da espessura da parede e desenvolvimento de hipertrofia concêntrica (GARCIARENA et al., 2009; DRAZNER, 2011; MESSERLI et al., 2017). Após o estabelecimento precoce da HA e hipertrofia cardíaca, os animais SHR permanecem com a hipertrofia de forma compensada por um longo período até o aparecimento da disfunção cardíaca (CAMPOS et al., 2015). Estudos demonstram que a partir dos 16 meses de idade os animais SHR começam a apresentar sinais clínicos de IC, tais como congestão pulmonar e hipertrofia ventricular direita (BING et al., 1995; ROSSONI et al., 2011; DAMATTO et al., 2013; PAGAN, 2015). E sem o devido tratamento medicamentoso, os animais evoluem para morte dentro de duas a quatro semanas.

Em nosso estudo, observamos que a progressão da HA nos grupos SHR induziu o remodelamento adverso das estruturas cardíacas, com o aumento da massa ventricular esquerda, septo, parede posterior e espessura relativa da parede. Entretanto, ao término de 10 semanas, o TFA foi eficiente em prevenir as alterações cardíacas induzidas pela HA, reduzindo os valores de septo e parede posterior, sem alterar a espessura relativa da parede. Ainda, é possível observar um aumento da massa do VE, apesar de não estatístico, em relação ao grupo SHR-IC, possivelmente induzida pela somatório da HA com o TFA. As alterações cardíacas encontradas no grupo SHR-IC-T são próximas das observadas no grupo WKY-T, sugerindo que o TFA possivelmente contrapôs os estímulos patológicos da HA e induziu nos animais uma hipertrofia ventricular excêntrica com aumento mais proporcional na espessura da parede, decorrente do aumento da sobrecarga de volume do treinamento, caracterizando uma hipertrofia cardíaca mais próxima da forma fisiológica do que patológica. A análise da expressão de genes de reprogramação fetal, como MHC- β cardíaca, permitiria o melhor estabelecimento da hipertrofia cardíaca, porém estudos anteriores do nosso grupos demonstram que o TFA foi eficiente em prevenir a expressão desses genes em diversas idade e modelos (FERNANDES et al., 2011; SOCI et al., 2011; Da SILVA et al., 2012; CAMPOS et al., 2015). O TFA também seria responsável pelo aumento do diâmetro do cardiomiócitos acompanhada por angiogênese, redução do conteúdo de colágeno e dos fatores inflamatórios, todos fatores que influenciariam positivamente a redução das características patológicas (ROSSONI et al., 2011; PAGAN et al., 2015).

Já está bem caracterizado na literatura que animais SHR idosos (com 16 meses de idade) apresentam redução da função cardíaca com menores valores de fração de ejeção e dilatação ventricular, importantes indicativos de transição da hipertrofia cardíaca compensada para a IC decorrente do avanço da idade (DIWAN & DORN, 2007; DRAZNER, 2011). Diferente dos estudos anteriores, nosso estudo demonstrou que animais SHR com HA crônica aos 9 meses de idade apresentam hipertrofia com disfunção cardíaca já estabelecida, além de sinais e sintomas clínicos de IC com edema pulmonar e hepático, caquexia cardíaca e intolerância aos esforços. Foi observado no grupo SHR-IC redução da fração de ejeção, débito cardíaco e aumento do volume diastólico e sistólico final comparados ao grupo WKY. Entretanto, o TFA conseguiu

normalizar os valores de fração de ejeção e débito cardíaco no grupo SHR-IC-T, melhorando a função sistólica desses animais. A disfunção diastólica nos animais dos grupos SHR foi observada pela alteração na razão da onda e/onda a, redução do tempo de encurtamento, aumento no tempo de relaxamento isovolumétrico e no índice de performance global comparado ao WKY. Novamente, o TFA conseguiu normalizar parcialmente estes parâmetros no grupo SHR-IC-T contribuindo para uma melhora da complacência ventricular. Assim, o TFA reduziu a pressão arterial e cooperou para um atraso dos sinais cardíacos da IC no grupo SHR-IC-T.

Embora o prejuízo na função miocárdica tenha sido evitado pelo TFA, sinais de congestão com o edema pulmonar e hepático não foram prevenidos pelo treinamento. Assim, demonstramos que animais SHR, de meia idade (9 meses) podem demonstrar tanto disfunção cardíaca, como sinais e sintomas típicos da IC. Anteriormente, embora já demonstrado disfunção cardíaca em animais jovens (KOKUBO et al., 2005), somente animais a partir de 16 meses haviam demonstrado quadros de IC (DRAZNER et al., 2011; DAMATTO et al., 2013; PAGAN et al., 2015). Esses resultados concluem que aos 9 meses de idade os animais já parecem estar na fase de transição para a hipertrofia descompensada, com sinais de IC e que o TFA pode prevenir o quadro patológico aos 9 meses. Porém, ainda são necessários mais estudos para melhor caracterizar esses períodos, e demonstrar se com o envelhecimento o TFA conseguiria ou não manter os efeitos positivos contra a IC, estabelecendo assim uma melhor compreensão da progressão da HA para a IC em modelos SHR.

Importante sintoma da IC, a intolerância ao esforço físico leva a redução das atividades diárias e expectativa de vida do paciente insuficiente cardíaco (PONIKOWSKI et al., 2016; DEL BUONO et al., 2019). A melhora da capacidade física representada pela maior tolerância à realização do esforço físico e do VO_2 são adaptações da musculatura esquelética e cardíaca induzidas pelo TFA (EVANGELISTA & KRIGER 2006; SOUZA et al., 2014). A capacidade aeróbia pode ser medida pelo VO_2 máximo alcançado em um protocolo de teste máximo, representando a capacidade máxima do organismo de extrair o oxigênio demandado em um certo esforço (DENADAI et al., 2004).

Inicialmente, os resultados de VO_2 pico não apresentaram diferenças em momento pré TFA, entre os grupos experimentais. Entretanto, ao final do protocolo de treinamento

os animais submetidos ao TFA de natação de baixa intensidade foi capaz de melhorar a capacidade física, aumentando a distância percorrida no teste máximo e o VO_2 pico, em comparação ao controle saudável. Em contraste, o grupo SHR-IC que permaneceu sedentário apresentou valores inferiores do VO_2 pico comparado ao WKY, demonstrando que a IC induziu a intolerância ao esforço físico.

A redução nas atividades diárias, devido a intolerância ao esforço físico é um sintoma comum em pacientes e já foi demonstrados em outros estudos com animais e pacientes insuficientes cardíacos (CUNHA et al., 2012; GOMES-SANTOS et al., 2014; FLEG et al., 2015; HAYKOWSKY et al., 2015). Ademais, estudo utilizando animais com IC de etiologia hipertensiva (SHR idosos com 16 semanas de idade) não avaliaram o VO_2 , entretanto os autores demonstram uma melhora da tolerância ao esforço físico, avaliada pela distância percorrida quando comparado ao controle saudável (ROSSONI et al., 2011; PAGAN et al., 2015).

Além das adaptações periféricas já descritas, o exercício físico aeróbio realizado regularmente promove importantes adaptações autonômicas e hemodinâmicas que podem influenciar o sistema cardiovascular (RONDON & BRUM, 2003). Dentre elas, o comportamento da frequência cardíaca de repouso, denominada bradicardia, é considerada um fator fundamental para verificar as adaptações e eficácia do TFA. Essa adaptação é observada tanto em animais como em humanos (CAMPOS et al., 2015; CUNHA et al., 2012). No presente estudo, observamos que os grupos submetidos ao protocolo de TFA apresentaram redução significativa da FC de repouso após o TFA, o que não foi encontrado nos animais que não realizaram o treinamento. A bradicardia de repouso parece sofrer influência direta da modalidade de treinamento e da DCV de base (BRUM et al., 2004). Em ratos normotensos, submetidos ao TFA em esteira rolante a redução da FC, parece ser responsável pela atividade cardíaca intrínseca (EVAGELISTA et al., 2005), entretanto animais submetidos ao protocolo de TFA de natação parecem ter a FC reduzida devido ao aumento do tônus vagal (MEDEIROS et al., 2004). Além disso, em ratos hipertensos a bradicardia está associada a uma redução do tônus simpático cardíaco (GAVA et al., 1995).

7.2 Efeitos patológicos da insuficiência cardíaca na expressão de miRNAs nas alterações fenotípicas e metabólicas da musculatura esquelética e os efeitos terapêuticos do treinamento físico aeróbio

Nas últimas décadas, os miRNAs têm demonstrado a sua flexibilidade em participar de diversas funções da musculatura esquelética, promovendo a homeostase celular ou desencadeando processos patológicos (SOKOL & AMBROS, 2005; LIU et al., 2021; VECHETTI et al., 2021). Desta forma, o entendimento desses transcritos pode trazer respostas importantes sobre os danos musculares induzidos pela IC. Nesse sentido, nenhum estudo procurou investigar a expressão dos miRNAs no músculo de animais insuficientes cardíacos de etiologia hipertensiva e o possível impacto do TFA na expressão desses pequenos transcritos. Esclarecer o papel do TFA como regulador dos miRNAs permite entender esses processos e trazer novas perspectivas no desenvolvimento de terapias.

Atualmente, estabelecer a relação dos miRNAs com o seus alvos *downstream* preditos é complexo, não só devido a interação direta com os seus respectivos genes alvos, mas pelas milhares de interações de miRNAs com outros miRNAs, criando uma rede complexa de regulação com diversos níveis pós-transcricionais (LANCETA et al., 2010). Assim, a modulação na expressão de somente um miRNA pode desencadear diversas vias tanto fisiológicas quanto patológicas, agindo em centenas de genes e diversas vias específicas. O uso atual de *microarray* em conjunto as análises sofisticadas de bioinformática permitem identificar os miRNAs e suas redes de sinalização, facilitando a busca por miRNAs diferencialmente expresso em uma certa condição e de seus alvos preditos (DRUMMOND et al., 2010). Com o intuito de mapear a expressão dos miRNAs diferencialmente expressos na miopatia muscular de animais com IC, realizamos a análise de *microarray* e traçamos o perfil de expressão desses transcritos no músculo sóleo dos animais.

O presente estudo demonstrou que dos 228 miRNAs expressos no músculo, 76 foram diferencialmente expressos na IC em comparação ao controle saudável. Ainda, as análises de PCA dos grupos demonstraram um perfil de expressão antagônico entre os grupos SHR-IC ao grupo WKY-T, sendo que o TFA aproximou o perfil de expressão dos

SHR-IC-T ao do controle treinado. Do primeiro *pull* de 76 miRNAs diferencialmente expressos, o TFA foi capaz de normalizar a expressão de 15 miRNAs, sendo 6 miRNAs reduzidos e 9 miRNAs aumentados pela IC e corrigidos estatisticamente pelo TFA. Desses miRNAs selecionados, realizamos análise de bioinformática para as integrações miRNA-mRNA e posteriormente as análises de anotação funcional GO. Identificamos 5 miRNAs que estariam ligados a funções de controle fenotípico e metabólico (miRNAs-1-3p, -205, 208b-3p, -328a-5p e -499-5p). Os miRNAs selecionados na última etapa tiveram a sua expressão confirmada por RT-qPCR. Dentre os selecionados, os miRNAs-1-3p, 208b-3p e 499-5p são miRNAs específicos do músculo esquelético e participam da classe de *myomiRs*.

Estudos já demonstraram que a deleção de *myomiRs* individualmente não apresentou grande impacto sobre o fenótipo muscular esquelético de camundongos (CALLIS et al., 2007; VAN ROOIJ et al., 2007, 2009; WILLIAMS et al., 2009; LIU et al., 2012; KIRBY et al., 2015). Por exemplo, a deleção do miRNA-206, específico do músculo esquelético de camundongos, não gerou grandes alterações no fenótipo muscular, sem afetar a massa no sóleo, morfologia ou distribuição do tipo de fibra (WILLIAMS et al., 2009). Entretanto, no mesmo estudo, animais *knockout* para o miRNA-206, apresentaram piora na recuperação muscular pós cirurgia de desnervação. Em estudo semelhante, o grupo do professor OLSON demonstrou que o miRNA-208a, *myomiR* específico cardíaco, é necessário para gerar hipertrofia cardíaca em resposta ao estresse (VAN ROOIJ et al., 2007). O mesmo grupo, demonstrou que a deleção dos miRNAs-208b e -499, isoladamente não apresentaram alterações no fenotípico muscular (VAN ROOIJ et al., 2009). Coletivamente, estes achados demonstram que os *myomiRs* são necessário para a homeostase muscular e auxiliam nas respostas ao estresse por meio da regulação da expressão gênica (LUENG & SHARP, 2010); entretanto a deleção isolada desses miRNAs não parece ser deletéria ou implicar em grandes modificações no músculo esquelético desses animais. Uma possível explicação, seria de que os miRNAs poderiam sobrepor os genes alvos entre os membros da família de *myomiRs*. Confirmando essa hipótese, o grupo da professora Van Rooij (2009) realizou o dKO nos miRNAs-208b e -499, o que levou a uma perda substancial de fibras musculares do tipo I no músculo sóleo. Essa perda de fibras lentas, também foi evidenciada pela redução

da expressão gênica e proteica de MHC-I β , concomitante ao aumento na expressão de isoformas de miosina rápida tipo IIa, IIx e IIb, o que não era observado com a deleção isolada dos miRNAs (VAN ROOIJ et al., 2009). Curiosamente o dKO (miRNAs-208b e -499) exibiu uma redução da resistência aeróbia resultante da reprogramação de fibras musculares. Similar a esses resultados, outros membros da família de *myomiRs*, como o miRNAs-133a e -133a-2, quando silenciados sinergicamente apresentam danos cardíacos e miopatia muscular, alteração não observada na deleção isolada desses transcritos (LIU et al., 2008, 2011).

Até o presente momento, a literatura não havia demonstrado a redução sinérgica dos miRNAs-208b e -499 no músculo esquelético decorrente das DCVs. Entretanto, o presente trabalho demonstrou que a IC reduziu a expressão de ambos os miRNAs-208b e -499, levando a mudança fenotípica da musculatura, com a reprogramação gênica das miosinas de cadeia pesada e reduzindo a capacidade física nesses animais, dados muito próximos dos encontrados nos animais dKO (VAN ROOIJ et al., 2009). Ainda, o TFA foi capaz de restabelecer a expressão dos miRNAs e prevenir o estabelecimento da miopatia muscular nos animais do grupo SHR-IC-T.

Corroborando aos achados do estudo, McCarthy e colaboradores (2009) observaram que a expressão dos miRNAs-208b e -499 está reduzida em animais com atrofia muscular em resposta a suspensão dos membros posteriores. A redução desses miRNAs estaria associada ao aumento da expressão de SOX6, alvo dos miRNAs, com inibição da expressão de MHC-I β muscular. Em nosso trabalho, observamos a redução dos miRNAs com o aumento simultâneo da expressão de seus alvos PUR β e SP3, porém sem alterar a expressão de SOX6 no grupo SHR-IC. Ambas as proteínas PUR β , SP3 e SOX6 são alvos dos miRNA-208b e -499 e têm sido descritas como inibidoras da expressão de MHC-I β no músculo esquelético, implicando na mudança no perfil de fibras musculares (HAGIWARA et al. 2007; Ji et al. 2007; VAN ROOIJ et al., 2009). No estudo clássico, Ji e colaboradores (2007) demonstraram interações físicas e funcionais entre as proteínas SP3 e PUR β na repressão da MHC-I β muscular. O mecanismo de ação da PUR β depende da ligação ao elemento regulatório negativo da MHC-I β (d β NRE-S), uma vez ligado inibe a expressão do seu gene repórter, reduzindo a expressão da Myh7. Esses resultados corroboram com os dados encontrados no grupo IC, no qual o aumento

na expressão de PUR β e redução na expressão gênica de Myh7 e menor quantidade de fibras marcadas pelo anticorpo MHC-I β , demonstrando uma programação na porcentagem de fibras tipo I para tipo II no músculo sóleo do grupo SHR-IC.

O prejuízo do aporte sanguíneo promove lesão de órgãos alvos, como encontramos no músculo dos animais SHR-IC e em outras DCVs, proporcionando a mudança na distribuição dos tipos de fibra muscular em direção ao aumento de fibras tipo II, acompanhado do desenvolvimento de atrofia muscular (NAKATANI et al., 2002; NAGAMOTO et al., 2009; BACURAU et al., 2009; CUNHA et al., 2012; SOUZA et al., 2014). A origem para essa transição no tipo de fibra I para II ainda permanece pouco conhecida, porém evidências relatam que alterações metabólicas no músculo alteram os níveis de miRNA, que em seguida contribuem para promoção de adaptação tecidual (KIRBY et al., 2015).

Componente principal responsável contração no músculo esquelético, as MHC são comumente classificadas baseadas na velocidade de contração e resistência a fadiga (BLAAUW et al., 2013). Porém, devido a próxima relação com o metabolismo podemos classificá-las perante a sua predominância metabólica. Por exemplo, as fibras de contração lenta, tem sua energia proveniente principalmente do metabolismo oxidativo advindo da respiração mitocondrial, enquanto as fibras de contração rápida recebem a energia derivada da geração de ATP do metabolismo glicolítico. Baseados nisso, as fibras podem ser classificadas em de contração lenta e oxidativas (fibras tipo I), de contração rápida e oxidativa (tipo IIa), rápida e glicolítica (tipo IIb) e de contração intermediária (tipo IIx) (SCHIAFFINO et al., 2011).

É importante salientar que apesar da descrição distinta, as fibras musculares são estruturas dinâmicas, com alta capacidade de se adaptar a novas demandas energéticas e viabilidade de substratos, permitindo que esse metabolismo se altere dependente da demanda imposta ao músculo esquelético (CHEMELLO et al., 2011; SCHIAFFINO et al., 2011). Essas alterações podem decorrer de estímulos fisiológicos como o do treinamento físico ou patológicos como das DCVs. Nesse sentido, as alterações fenotípicas podem desencadear alterações metabólicas, assim como alterações metabólicas poderiam criar alterações na musculatura esquelética.

Em relação ao metabolismo, no presente estudo observamos no grupo SHR-IC uma redução do conteúdo de ATP muscular e aumento do lactato plasmático. Esses resultados demonstram uma redução da efetividade da geração de ATP possivelmente decorrente da miopatia muscular. Estudos clássicos, com pacientes insuficientes cardíacos, demonstraram que a IC é responsável por uma reprogramação metabólica prematura no músculo esqueléticos, com alteração do metabolismo oxidativo muscular para o metabolismo glicolítico e incorrendo na menor produção de ATP e biodisponibilidade muscular (SULLIVAN et al., 1990; MINOTTI et al., 1991; DREXLER et al., 1992; MANCINI et al., 1992; ZIZOLA et al., 2013). Ademais, essas alterações no metabolismo esquelético tiveram importantes implicações na capacidade funcional desses pacientes (MANN et al., 2003; VELLOSO et al., 2008). A realização de biópsias do músculo esquelético de pacientes com IC demonstram que a mudança fenotípica, com aumento das fibra IIa e IIx, desencadeia a redução de enzimas oxidativas e de lipólise (OPASICH et al., 1996) e essas alterações também podem ser vista em modelos animais (SIMONINI et al., 1996).

As fibras tipo I são capazes de gerar todo o ATP necessário para o funcionamento celular, por meio da oxidação mitocondrial. Por outro lado, as fibras tipo II utilizam do metabolismo glicolítico para gerar energia de forma rápida, produzindo quantidades de ATP por um menor período (SCHIAFFINO et al., 2011). A alta produção de ATP por meio da oxidação mitocondrial, deriva de um melhor maquinário mitocondrial presente nas fibras tipo I. Estudos demonstram que em ratos a fração do volume ocupado pelas mitocôndrias, nos músculos predominantemente oxidativos (fibras tipo I) alcança 10%, porém na musculatura de maior proporção de fibras predominantemente glicolíticas (fibras IIa e IIx) os valores caem para 2,2% (SCHIAFFINO et al., 1970; EISENBERG et al., 1983). Em humanos, os valores não são tão diferentes, com densidade mitocondrial de 6% nas fibras tipo I, 4,5% nas fibras IIa e 2,3 % nas fibras IIx (HOWALD et al, 1985).

Em nosso estudo demonstramos que a densidade e função mitocondrial está diretamente relacionado com a redução da produção de ATP e mudanças no metabolismo oxidativo, no qual o grupo SHR-IC apresentou menores valores no número de cópias do mtDNA e consumo de oxigênio em fibras isoladas, com menor consumo

nos estados 3 (dependente de ADP), 3u (com desacoplador FCCP) e 4 (ATP independente), sem alteração no controle respiratório.

Corroborando aos nossos achados, Drexler e colaboradores (1992) descreveram que a densidade mitocondrial está reduzida em pacientes com IC, o que ocasiona uma ineficiência na oxidação mitocondrial, acompanhado de menores valores no VO_2 máximo, demonstrando que essa redução estaria colaborando com a diminuição da tolerância ao esforço. Outros autores enfatizam que a miopatia muscular desencadeada pela IC estaria relacionada com anormalidades na função e estrutura mitocondrial, levando a redução no metabolismo oxidativo muscular nesses pacientes (SCHREPPER et al., 2012; ZIZOLA et al., 2013). Ainda, uma série de anormalidades na estrutura das mitocôndrias já foram documentada, dentre elas um menor número de mitocôndrias independentemente do tipo de fibra seria possível observar em pacientes insuficientes cardíacos (MANCINI et al., 1992b; ZIZOLA et al., 2013).

Até o momento, o método mais utilizado para investigar a função mitocondrial é a avaliação das atividades da cadeia de transporte de elétrons, atividade enzimática do metabolismo oxidativo e ATP sintase, todas essas análises geralmente feitas de tecidos congelados. Poucos estudos utilizaram fibras musculares permeabilizadas, por saponina com o intuito de quantificar a fosforilação oxidativa mitocondrial, em contrapartida as fibras cardíacas vem sendo o principal alvo de investigação (ROSCA et al., 2013). Nesse sentido, a avaliação da respiração mitocondrial demonstraram uma redução no estado 3 em fibras cardíacas permeabilizadas de ratos (SANBE et al., 1994; GARNIER et al., 2003), cachorros (SHAROV et al., 1998) e humanos (SHAROV et al., 2000) em modelos de constrição da artéria aorta ou devido à IC isquêmica. Ademais, já foi demonstrado que as reduções da função mitocondrial observadas nessas fibras estaria diretamente relacionadas a alteração na densidade mitocondrial ocasionada pela IC (SHAROV et al., 1998; LAMIEUX et al., 2011). Em modelos de IC em ratos, também foi observado uma redução da função mitocondrial em fibras cardíacas, principalmente pela redução na utilização de ácidos graxos (GONG et al., 2003; DOENST et al., 2010). No músculo esquelético a IC induz repostas similares da função mitocondrial no tecido cardíaco (GARNIER et al., 2003; SCHREPPER et al., 2012). Diferente do encontrado em nosso estudo, animais submetidos a constrição da artéria aorta e que desenvolveram IC

apresentaram redução no controle respiratório (LINDENMAYER et al., 1968; SORDAHL et al., 1973).

Em nosso estudo, observamos que a redução da densidade e função mitocondrial observada no grupo SHR-IC foram revertidas nos grupos que realizaram o TFA, demonstrando o efeito positivo na prevenção das alterações patológicas na mitocôndria do músculo esquelético. Até o momento, poucos estudos procuraram investigar intervenções do TFA na melhora da função mitocondrial e do metabolismo oxidativo na musculatura esquelética (ZIZOLA et al., 2013). Porém, o treinamento físico já demonstrou ser eficiente em aumentar a densidade mitocondrial e melhorar a capacidade oxidativa da musculatura de voluntários saudáveis (HOLLOSZKY & COYLE, 1984; AMARAL et al., 2000, 2001). Adamopoulos e colaboradores (1993), demonstraram que 8 semanas de TFA em bicicleta ergométrica foi capaz de corrigir parcialmente as alterações metabólicas induzidas pela IC, porém não as normalizá-las (ADAMOPOULOS et al., 1993, 2001). Outros estudos demonstram a melhora da função mitocondrial e do metabolismo oxidativo no músculo de pacientes IC (HAMBERCHT et al., 2000; GIELEN et al., 2003). Atualmente, é proposto uso de agonistas de AMPK e PPAR β/δ tratamento farmacológico, com o intuito de modular o metabolismo oxidativo e a função mitocondrial, mas essas drogas ainda não foram sistematicamente testados em humanos (ZIZOLA et al., 2013).

Nosso estudo também avaliou a alteração da expressão gênica de transcritos possivelmente responsáveis por alterações no metabolismo glicolítico e oxidativo. Em relação ao metabolismo glicolítico observamos um aumento marcante nos genes Pdk4 e Ldha nos animais dos grupos SHR. A enzima mitocondrial piruvato desidrogenase (PDH), participa do metabolismo glicolítico levando a glicose para o ciclo de Krebs e produção de ATP, por meio da reação irreversível de oxidação carboxílica do piruvato. Essa reação produz acetil-CoA com a perda do carbono da glicose em CO₂. A entrada do acetil-CoA no ciclo de Krebs é a responsável por gerar ATP advinda da glicólise, o que faz dessa enzima ter um controle central na utilização de glicose e preservação dos ácidos graxos, pois PDH participa do fluxo da glicose para malonil-CoA via a produção de acetil-CoA mitocondrial; malonil-CoA, pode servir como precursora da síntese de ácidos graxos nos adipócitos. No músculo o acúmulo de malonil-CoA regula a utilização de ácidos graxos

por meio da inibição de CPT1. Por causa dessa reação a supressão de PDH é essencial para manter as reservas de glicose e utilizar os ácidos graxos. A atividade da PDH é regulada pela enzima PDK, responsável por inibir a reação e limitar a oxidação do piruvato. (PATEL et al., 2006; SUGDEN et al., 2006; RARDIN et al., 2009). A enzima LDHA possui importante papel na conversão deste piruvato em lactato (FENG et al., 2018). O aumento na expressão de Pdk4 e Ldha responde diretamente o aumento de lactato plasmático encontrado no grupo SHR-IC, no qual o aumento na expressão de Pdk4 impede a entrada de piruvato em forma de acetil-CoA no ciclo de Krebs, sendo convertido em lactato pela enzima Ldha que está aumentada. Lembrando, que estudo o professor Brooks (2009), por meio da análise da cinética do lactato, demonstram que a maior quantidade de lactato disponível no corpo deriva da contração muscular, que é disponibilizada pela corrente sanguínea para chegar a outros tecidos e servir como fonte de energia, formando uma comunicação célula a célula. Isso sugere que esse aumento no lactato viria principalmente da musculatura esquelética (BROOKS et al., 2020).

Por outro lado, a redução do lactato plasmático que encontramos no grupo SHR-IC-T, possivelmente ocorreu pela melhora no metabolismo glicolítico, com melhora na função das enzimas HK, PFK, enzimas chaves de eventos irreversíveis do metabolismo glicolítico e com melhora da oxidação mitocondrial pela maior atividade da enzima CS, e melhora da atividade de CPT1. Essas alterações também são responsáveis pela melhora na produção de ATP. No grupo SHR-IC todas as atividades enzimáticas estavam prejudicadas quando comparado ao grupo controle, demonstrando o efeito negativo da miopatia muscular.

Estudos demonstraram que enzimas chaves do metabolismo estão reduzidas no músculo esquelético em decorrência da IC, incluindo as enzimas do metabolismo oxidativo como CS e a succinato desidrogenase e do metabolismo glicolítico com redução na atividade da enzima HK no músculo esquelético (SULLIVAN; 1991; MANCINI et al., 1992). Essas mudanças estão relacionadas à redução do ciclo de Krebs que leva a redução na produção de ATP (DREXLER et al., 1992; MATTAUER et al., 2001). Outras enzimas, importantes do metabolismo também já demonstraram terem suas concentrações totais de creatina quinase e as específicas musculares de creatina quinase reduzidas, junto ao aumento da LDH no músculo de pacientes com IC

(MATTAUER et al., 2001). Em outro estudo Bacurau e colaboradores (2009), investigaram a atividade enzimática em animais com IC, decorrente do aumento da atividade simpática. Os autores observaram uma marcante mudança no fenotípico muscular e redução da tolerância ao esforço concomitante ao aumento na atividade enzimática de HK com redução na atividade CS. Entretanto, o TFA de esteira rolante por oito semanas foi capaz de aumentar a expressão de CS, sem alterar a de HK.

As adaptações fisiológicas resultantes do TFA proporcionam uma maior habilidade do sistema cardiorrespiratório em oferecer oxigênio e substratos energéticos para o tecido muscular. A enzima CS é uma das mais importantes na geração de energia via metabolismo aeróbio (VIGELSØ et al., 2014). Nesse estudo a atividade enzimática da CS do músculo sóleo foi aumentada nos grupos que realizaram o protocolo de TFA em relação ao controle. Estudos demonstram resultados semelhantes ao encontrado no presente estudo (ROQUE et al., 2013; SHULTZ et al., 2013). Por outro lado, estudos demonstram que a redução do metabolismo oxidativo é um evento marcante na IC e pode ser evitada pelo TFA regular, aliviando muitos sintomas induzidos pela IC (Souza et al., 2014).

Esses estudo corroboram com nossos resultados, sugerindo que as mudança fenotípicas muscular encontradas no grupo SHR-IC desencadeou alterações metabólicas com redução na atividade enzimática e na densidade e função mitocondrial, levando ao quadro de miopatia muscular e a intolerância ao esforço. Por outro lado, o TFA foi eficaz em controlar as alterações fenotípicas e prevenir a mudança no metabolismo evitando alterações severas no músculo esquelético dependente da miopatia.

A expressão dos miRNAs vem demonstrando ser necessária para a manutenção metabolismo, sendo a mínima alteração na expressão desses transcritos pode desencadear disfunção metabólica e implicações de doenças como diabetes, obesidade, doença hepática e DCVs (AGBU & CARTHEW, 2021). Atualmente, na literatura inúmeros trabalhos têm demonstrado que os miRNAs possuem o potencial na regulação do metabolismo glicolítico. Dentre estes, o miRNA-19a ganhou destaque por impedir a gliconeogênese, reduzindo a expressão de homólogo de tensina e fosfatase (PTEN) em células hepáticas. Outros miRNAs, como miRNAs-27, -29, -451-1 já demonstraram ser capaz de reduzir a liberação de glicose do fígado para a circulação, limitando a expressão

de enzimas responsáveis pelo transporte da glicose (LIANG et al., 2013; ZHUO et al., 2016; WANG et al., 2019). Em relação ao metabolismo de lipídeos, os miRNAs-33, -128-1, -144, e -148a se destacam por controlar o fluxo de lipídios para dentro célula, regulando a expressão de proteínas como Apolipoproteína A1 (APOA1) e *ATP-binding cassette transporter A1* (ABCA1) (TALL et al., 2008; GERIN et al., 2010). Os miRNA-33a e -33b também são importantes por regularem a oxidação de ácidos graxos por meio do controle de enzimas responsáveis pela betaoxidação (TALL et al., 2008; GERIN et al., 2010).

Fatores de transcrição gênica são frequentemente regulados por miRNAs e desempenham papéis importantíssimos na regulação metabólica (WANG et al., 2020; AGBU & CARTHEW, 2021). Por exemplo, o miRNA-34a via fator nuclear hepático 4 alfa (HNF4A) é responsável pela metabolização de lipídios em resposta ao acúmulo desses substratos (XU et al., 2015). O miRNA-7 também já demonstrou ser responsável pelo controle de elemento de ligação a proteína esterol 1 e 2 (SREBP1 e 2), fatores importante para o metabolismo de lipídeos e sua expressão já demonstrou ser aumentada por via de sinalização de PPAR α (AGBU & CARTHEW, 2021). Outros miRNAs também parecem estar envolvidos com a família dos PPARs, o miRNA-122 protege o fígado contra a lesão hepática alcoólica, inibindo a transcrição do fator induzido por hipóxia-1 alfa (HIF1 α), o qual regula a expressão do fator de transcrição PPAR γ , regulador chave na síntese de lipídeos (XU et al., 2015; ZHANG et al., 2017). O miRNA-155 também demonstrou regular a expressão de insulina por meio da repressão de PPAR γ (YING et al., 2017).

A família dos PPARs, compostas pelas isoformas PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ e exibem distinta expressão em tecidos, porém apresentam funções no controle metabólico próximas (PORTIUS et al., 2017). A função dos PPARs depende da ativação específica de ligantes, ainda no citoplasma e após a ligação são translocados para o núcleo formando um complexo retinóico X receptor (RXR) e controlam a expressão de outros genes por meio de elementos responsivos ao PPAR na área promotora de genes (PETERS et al., 2012). Por meio desses complexos regulatórios, os PPARs exercem um grande controle na expressão de genes chaves do metabolismo glicolítico e de lipídeos (AHMDIAN et al., 2013; MONTAIGE et al., 2021).

No presente trabalho, a expressão proteica de PPAR β/δ está reduzida, juntamente com PGC1 α no grupo SHR-IC por outro lado, o TFA foi eficiente em prevenir a redução da expressão dessas proteínas. Ainda, não observamos mudanças na expressão de PPAR α e AMPK, apresentando alteração somente para AMPK em animais saudáveis que realizaram o TFA.

Apesar de não ter a expressão proteica modificada nos grupos experimentais, PPAR α é um importante regulador de genes envolvidos no metabolismo de lipídeos. Durante o jejum prolongado, a ativação de AMPK aumenta a sinalização via PPAR α para aumentar a fosforilação e interação com PGC1 α consequentemente adaptando o metabolismo para a utilização de ácidos graxos com o intuito de preservar a glicose (PAWLAK et al., 2015; DUBOIS et al., 2017). O grupo WKY-T apresentou um aumento de AMPK, proteína essencial para sinalização e aumento da produção de ATP e redução do dispêndio energético e consumo de ATP, possuindo um importante papel no metabolismo glicolítico (HERZIG et al., 2018). Embora, o grupo da Professora Rodrigues tenha demonstrado que AMPK é um alvo confirmado para o miRNA-1 (RODRIGUES et al., 2021; CHEN et al., 2022), em nosso estudo a redução na expressão do miRNA-1 não alterou a expressão proteica de AMPK. Esse resultado corrobora com as correlações, no qual o miRNA-1 não teve correlação com as alterações fenotípicas e metabólicas. Entretanto, o aumento de AMPK, no grupo WKY-T, pode ser o responsável pelo aumento da expressão de PGC1 α , via ativação direta de PGC1 α e independente da sinalização de PPAR α (JÄGER et al., 2007).

Estudos recentes têm focado os esforços em identificar miRNAs na musculatura esquelética, responsáveis por afetar PGC1 α (MCCORMICK et al., 2017). PGC1 α é um co-fator de transcrição importantíssimo para a homeostase e biogênese mitocondrial, controlando o metabolismo energético oxidativo (LISANG & WARD et al., 2006). O miRNA-696 é alvo para o PGC1 α e seus alvo *downstream* são a PDK4 e a proteína envolvida no complexo mitocondrial (COIXV) (AOI et al., 2010). O miRNA-696 também pode afetar a oxidação de ácidos graxos na mitocôndria e reduzir diretamente os níveis de mtDNA (AOI et al., 2010). A redução do miRNA-133a, outro *myomiR* parece estar diretamente relacionada com a redução da expressão de PGC1 α e NRF1 resultando na redução do conteúdo mitocondrial e por consequência da tolerância ao esforço (NIE et

al., 2016b). Por outro lado, o miRNA-494 demonstrou controlar a biogênese mitocondrial e função por meio da inibição da tradução de proteínas importantes, resultando na perda da capacidade oxidativa mitocondrial (GRECO et al., 2009) o mesmo miRNA foi relacionado a redução no consumo basal de oxigênio (IWASAKI et al., 2015)

A atividade de PGC1 α está relacionado a PPAR β/δ e a transcrição de genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos e termogênese em camundongos (GROSS et al., 2017). Além disso, como o promotor PGC1 α contém um elemento de resposta PPAR, responsável pela expressão de PPAR β/δ a nível transcricional (SCHULER et al., 2006; GAM et al., 2015). Dentre a família de PPARs, a isoforma mais expressa na musculatura esquelética é o PPAR β/δ (SALVADO et al., 2012). Estudo com animais insuficientes cardíacos, submetidos a constrição da artéria aorta, demonstram que a oxidação de ácidos graxos está afetada no coração desses animais, com uma mudança no metabolismo oxidativo para glicolítico atribuído pela repressão de PPAR β/δ , por meio da ativação de dois miRNAs-199a e -214 (AZZOUZI et al., 2013).

Corroborando a esses achados, Liu e colaboradores (2011) desenvolveram um modelo transgênico cardíaco específico para PPAR β/δ por ativação de tamoxifeno. O aumento da expressão de PPAR β/δ em fase adulta, após a ativação via tamoxifeno, induziu ao aumento de transcrição de genes envolvidos no metabolismo de ácidos graxos e glicose, expressão de genes envolvidos na biogênese mitocondrial e no metabolismo oxidativo. Por outro lado, a deleção cardíaca de PPAR β/δ resultou na redução de expressão de CPT1, LCAD e PDK4 (CHENG et al., 2004), levando a redução basal no consumo de ácidos graxos com redução das reservas de ATP demonstrando uma maior atividade de AMPK, aumentando a participação do metabolismo glicolítico (CHENG et al., 2004). Ainda, a deficiência de enzimas de lipase, para a quebra de triglicerídeos, a qual é responsável de gerar os ligantes endógenos PPAR β/δ , resulta na falha da oxidação de ácidos graxos, acúmulo excessivo de lipídeos, e foi observado na IC e cardiomiopatia (BANKE et al., 2010; HAEMMERLE et al., 2011; LAHEY et al., 2014).

Ainda, poucos estudos demonstram os efeitos de PPAR β/δ no músculo esquelético afetado pelas doenças DVCs, porém no tecido cardíaco, em modelos de infarto e reperfusão, a expressão de PPAR β/δ gerou um efeito cardioprotetor (KAPOOR et al., 2010), por meio da proteção do metabolismo oxidativo e redução da apoptose

(YUE et al., 2003; AZZOUZI et al., 2011). No coração, tanto PPAR α como PPAR β/δ ativam a expressão de genes codificadores envolvido no transporte mitocondrial de ácidos graxos como (CPT1), na oxidação de ácidos graxos pela mitocôndria (Acil-Coa desidrogenase de cadeia média (MCAD) e pequena (LCAD) e de genes relacionados ao transporte de ácidos graxos (proteína transportadora de ácidos graxos 1 (FATP1) e CD36). O aumento na expressão de PPAR β/δ também implica no aumento da expressão de genes envolvidos com o transporte de glicose como transportador de glicose 4 (GLUT4) e glicólise (PFK e HK) (BURKART et al., 2007). Em nosso estudo observamos o aumento na atividade enzimática CPT1, HK e PFK no grupo SHR-IC-T, possivelmente pelo aumento de PPAR β/δ no músculo esquelético. Estudo recente, demonstrou que a expressão de PPAR β/δ é afetada pela HA, estando reduzida no músculo esquelético de animais SHR jovens. Entretanto, a expressão é normalizada nos animais que realizaram TFA (YANG et al., 2022).

O estudo de Yang e colaboradores (2022), demonstra que possivelmente o TFA possa regular a expressão de PPAR β/δ , que estaria desregulado em animais hipertensos jovens, porém ainda não há relatos da expressão de PPAR β/δ sobre a progressão da HA. Outros estudo, já demonstraram que o estímulo do treinamento físico, via PPAR β/δ muscular induz a melhora do metabolismo oxidativo e preservação de glicose e glicogênio muscular melhorando a resistência durante o teste máximo (MONTAIGNE et al., 2021). A superexpressão de PPAR β/δ no músculo de camundongos já demonstrou promover a melhora do metabolismo oxidativo e aumentou a biogênese mitocondrial protegendo PGC1 α da degradação e induzindo a expressão fator respiratório nuclear 1 (NRF1) (KOH et al., 2017). Em estudos utilizando células C2C12 e camundongos, foi demonstrado que os estímulos do TFA aumentaram a expressão de PPAR β/δ e via sinalização de NRF1 e *myocyte-specific enhancer factor-2 A* (MEF2A) houve o aumento a expressão de GLUT4 (KOH et al., 2019). Além disso, em animais controle, o TFA de natação durante 6 semanas, com sessões de 45 minutos, 5 vezes na semana, resultou no aumento na expressão proteica de PPAR β/δ no músculo tibial anterior (LUQUET et al., 2003). O aumento da expressão da proteína pós TFA também foi relacionada em estudo com seres humanos (RUSSEL et al., 2003; WATT et al., 2004; MAHONEY et al., 2005; FRITZ et al., 2006). Por outro lado, os níveis gênicos de PPAR β/δ no músculo

esquelético foram reduzidos em indivíduos com lesão de medula espinhal (KRAMER et al., 2006).

Em nosso estudo observamos uma redução de triglicerídeos muscular, e possivelmente essa redução no grupo SHR-IC pode reduzir as funções de ligantes essenciais para o funcionamento de PPAR β/δ ; por outro lado, o TFA não alterou as reservas de triglicerídeos, porém aumentou a expressão de genes essenciais para a quebra e transporte de ácidos graxos como Fabp5 e Lpl. Junto os resultados demonstram que PPAR β/δ participa da sinalização gênica e atividade enzimática regulando o metabolismo energético, o consumo de ácidos graxos e oxidação da glicoses, por meio da ativação de sinalizadores e transportadores do transporte de ácidos graxos, junto de uma biogênese mitocondrial e oxidação mitocondrial.

Além das funções do controle metabólico, estudos recentes demonstraram que a sinalização de PPAR β/δ desempenha um papel chave no desenvolvimento de fibras tipo I. No músculo esquelético, PPAR β/δ tem uma expressão pronunciada em fibras musculares do tipo I em comparação com as fibras musculares tipo II (BRAISSANT et al., 1996; MUOIO et al., 2002; De LANGE et al., 2004; WANG et al., 2004). Ainda, animais transgênicos com superexpressão muscular do gene PPAR β/δ têm um aumento da proporção de fibras tipo I (LUQUET et al., 2003; WANG et al., 2004; EHRENBORG & KROOK, 2009).

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

As alterações fenotípicas e metabólicas da superexpressão de PPAR β/δ muscular são responsáveis por uma maior capacidade aeróbia (LUQUET et al., 2003 WANG et al., 2004, EHRENBORG & KROOK, 2009, GAN et al., 2013). Camundongos transgênicos para PPAR β/δ foram apelidados de “camundongos maratonistas”, pois conseguem

correr duas vezes mais quando comparado aos camundongos selvagens (WANG et al., 2004). Em contraste, a expressão excessiva de PPAR α resulta na redução da capacidade física e intolerância ao esforço físico (EHREMBORG & KROOK, 2009, GAN et al., 2013).

Curiosamente, GAN e colaboradores (2013) mostraram que a expressão do miRNA-208b foi significativamente aumentada em animais com superexpressão de PPAR β/δ muscular, mas não era detectável em músculo de animais com superexpressão de PPAR α . Similar, a expressão do miRNA-499 é aumentada em animais transgênicos para PPAR β/δ , mas reduzida em animais com superexpressão de PPAR α . Resultados semelhantes foram obtidos em miócitos esqueléticos transgênicos que superexpressão PPAR. Os autores também demonstram que a inibição dos miRNAs-208b e -499 é suficiente em animais transgênicos para PPAR β/δ , foi o suficiente para inibir a tradução de MHC- β , demonstrando que a via de sinalização de PPAR β/δ ocorre via ação dos miRNAs-208b e -499 para o controle do perfil fibras e metabolismo muscular. Além disso, os autores identificaram que outro receptor nuclear o ERR γ têm sua expressão aumentada em animais transgênicos para PPAR β/δ , atuando de forma *downtream* a via de PPAR β/δ e ativando a transcrição de genes Myh7 e My7b, consequentemente aumentando a expressão dos miRNAs-208b e -499.

Nossos resultados apontam que há um circuito mediado pelo receptor nuclear e os miRNAs no controle do perfil de fibras musculares induzidos pela miopatia muscular da IC. Nenhum outro trabalho havia apontado que esse via de sinalização de PPAR β/δ possivelmente ativaria ERR γ , aumentando a transcrição dos miRNAs-208b e -499 que induz a reprogramação do tipo de fibra por inibir repressores da transcrição de genes como PUR β e SP3. Por outro lado, nosso estudo não identificou nenhuma alteração na expressão de PPAR α , mas que o TFA foi capaz de prevenir a mudança na distribuição do tipo de fibra no grupo SHR-IC-T, normalizando a expressão de PPAR β/δ e dos miRNAs e mantendo o fenótipo oxidativo muscular.

A análise de predição dos alvos a partir dos miRNAs diferencialmente expressão na IC, verificamos que os miRNAs-205 e -328a almejam a proteína PPAR β/δ , podendo participar de uma regulação *upstream* na via de controle do perfil de fibras e metabolismo muscular; um mecanismo ainda desconhecido não estudado na literatura. Nosso

resultados, demonstram pela primeira vez, que os miRNAs-205 e -328a estão aumentados na miopatia muscular induzida pela IC, regulando sinergicamente a expressão de PGC1 α e PPAR β/δ , responsáveis pela regulação do metabolismo e tipo de fibra e que o TFA contribui para a regulação desses miRNAs induzindo a melhor da função musculatura esquelética e reduzindo os efeitos patológicos da miopatia muscular (FIGURA 13). Reiteramos, que ainda não há na literatura, estudos que demonstram miRNAs capazes de regular a expressão de PPAR tanto em condições fisiológicas como patológicas. Entretanto, estudo já demonstraram que os miRNAs-23 (SAFADAR et al., 2009) -494 (YAMAMOTO et al., 2012) e -696 (AOI et al., 2010) alvejam o gene de Pgc1a, aumentando a sua expressão tanto em uma sessão aguda quanto em resposta ao TFA aeróbio no controle da biogênese mitocondrial.

Durante as análises de bioinformática, o miRNA-1 foi selecionado para o estudo por possuir um grande número de genes envolvidos nas mudanças fenotípicas e metabólicas, porém ao longo do estudo a expressão do miRNA-1 não demonstrou correlação com o consumo metabólico e a distribuição de fibras do tipo I. Porém, a expressão dos miRNA vêm sendo sugeridas no controle da atrofia muscular (XU et al., 2012), dentre os miRNAs que vem ganhando destaque o miRNA-1, onde já demonstrou que pode controlar a atrofia muscular via ação de receptores glicocorticóides e da miostatina, um regulador negativo do crescimento muscular (KUKRETI et al., 2013). Os autores propuseram um modelo pelo qual o miRNA-1 inibe a expressão de proteínas importantes como a proteína do choque térmico 70 (HSP70), reduzindo a fosforilação de Akt e aumento da FoxO3 e proteínas relacionadas com a atrofia, resultando no desbalanço síntese e degradação do músculo esquelético. Outro estudo, demonstra que o miRNA-1 estaria envolvido na regulação da atrofia muscular agindo sinergicamente com o miRNA-27, demonstrando que ambos esses miRNAs são regulados pela miostatina, sugerindo que esses miRNAs podem ser um regulador central da resposta atrofia muscular (SHEN et al., 2013).

Em nosso trabalho demonstramos que a atrofia muscular ocorre nos animais com 9 meses de idade por conta da progressão da HA. O grupo SHR-IC, apresentou uma redução da massa muscular inerente ao tipo metabolismo, com redução nos músculos plantar (glicolítico), gastrocnêmio (misto) e sóleo (oxidativo). Ainda, no músculo sóleo foi

possível observar uma redução na secção transversa em ambos os tipos de fibras I e II. Por outro lado, o TFA foi eficiente em prevenir a atrofia de forma mais efetiva nos músculos oxidativos e misto em detrimento dos músculos glicolíticos no grupo SHR-IC-T.

A idade avançada poderia ter contribuído para essa atrofia, estudos recentes têm o interesse de examinar os miRNAs que estão envolvidos com o envelhecimento. O aumento da expressão dos miRNAs primários pri-miRNA1-1, -1-2, -133a e -133a-2 foram encontrados alterados em idosos quando comparados a jovens (DRUMMOND et al, 2008). Outro estudo, demonstrou que a expressão do miRNA-1 está reduzida em idosos submetidos a 12 semanas de treinamento resistido (MUELLER et al., 2011). Porém estudos adicionais são necessários para melhor entender o papel do miRNA-1 na atrofia.

Mediante a literatura apresentada, muitos estudo demonstram o papel dos miRNAs na miopatia muscular na mais variadas doenças (MCCORMICK et al., 2017; CHEN et al., 2020; YEDIGARYAN et al., 2021), porém até o momento não há estudos que relacionam o papel dos miRNAs na miopatia muscular esquelética induzida pela IC.

O primeiro estudo a demonstrar a atrofia do músculo sóleo em animais SHR de meia idade (6-7 meses de idade) ocorreu em 1994 (ATRAKCHI et al., 1994), porém nenhum outro trabalho se dispôs a estudar a trofia em animais de meia idade. Entretanto, Damatto e colaboradores (2013) já demonstraram que ratos SHR idosos (18 meses) e portadores de IC, o avanço da doença foi capaz de gerar a atrofia do músculo sóleo. Em outros modelos, também foi demonstrado a redução da massa muscular do sóleo durante a transição da hipertrofia cardíaca para a IC em resposta a estenose aórtica (CARVALHO et al., 2003). Embora escassos, estudos com pacientes hipertensos, ainda em fase de transição para a IC, demonstram que a perda da massa muscular não é uniforme entre eles, indicando uma prevalência de 61% de pacientes hipertensos não obesos com sarcopenia (HAN et al., 2014). Por outro lado, estudo com pacientes IC demonstram que atrofia muscular e caquexia pode ocorrer em 20-40% dos pacientes (FÜLSTER et al., 2013; HAJAHMADI et al., 2017; SPRINGER et al., 2017), na área de secção transversa está principalmente reduzida na musculatura de fibras tipo II (CROSSLAND et al., 2019).

Salientamos, que em diversas etiologias em animais e pacientes a perda da musculatura esquelética adjunto da intolerância ao esforço são indicativos de mau prognóstico para o portador da IC (BACURAU et al., 2009; CUNHA et al., 2012; GIELEN et al., 2012; HAYKOSWAY et al., 2013; MOREIRA et al., 2013; SOUZA et al., 2014; BRUM et al., 2014). Nesse sentido, destacamos que o papel do TFA é um ótima estratégia terapêutica significativa para minimizar e prevenir as perdas decorrentes das DCVs (BRUM et al., 2014) que embora não promova aumento. Embora o TFA não promova aumento na área de secção transversa no músculo de indivíduos saudáveis, como ocorre no treinamento resistido (FOLLAND & WILLIAMS, 2007), em animais com atrofia muscular o TFA foi capaz de restaurar a massa muscular a níveis considerados saudáveis (BACURAU et al., 2009; CUNHA et al., 2012; MOREIRA et al., 2013; SOUZA et al., 2014; BRUM et al., 2014).

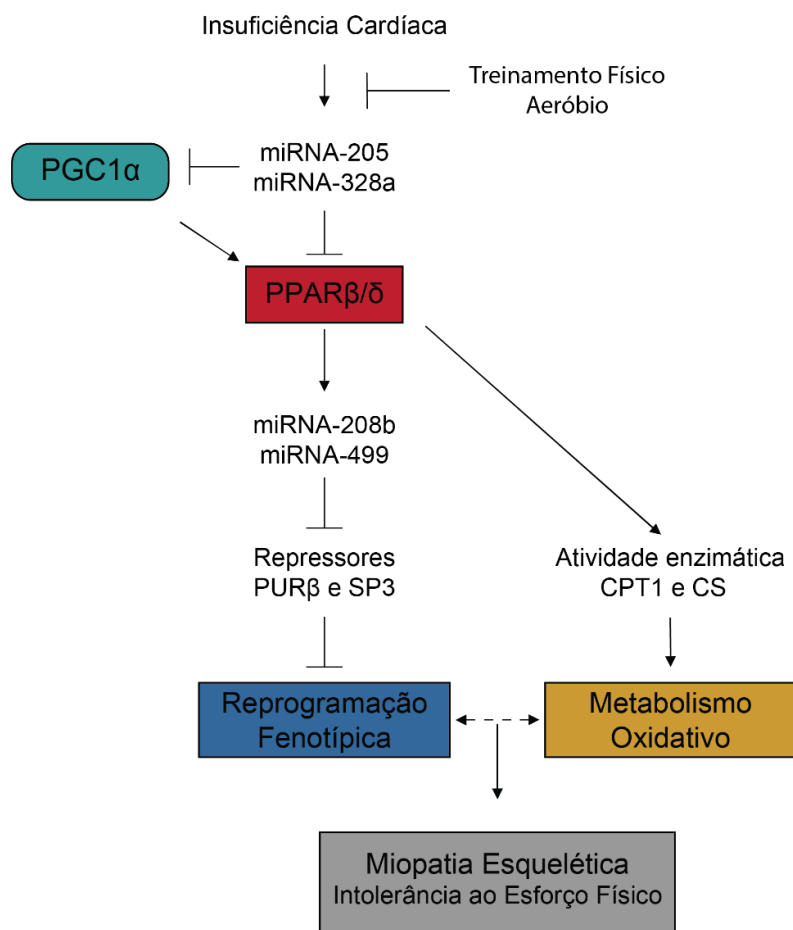


FIGURA 13 – Papel do treinamento físico aeróbio na regulação do fenótipo e metabolismo na miopatia muscular esquelética induzida pela insuficiência cardíaca por meio do eixo de regulação dos miRNAs-205 e 328a.

7.3 Expressão dos miRNAs-1, -205, 208b e -499 em pacientes insuficientes cardíacos e o efeito do treinamento físico aeróbio

A relação entre a expressão de miRNAs, a IC e o músculo esquelético ainda é amplamente desconhecido (MURACH et al., 2017). Muitos dos estudos que buscaram investigar a expressão dos miRNAs, seja no tecido cardíaco ou muscular, em pacientes com IC optaram por investigar a expressão na circulação, devido a maior facilidade de ser um processo menos invasivo.

A análise de *myomiRs* na circulação de pacientes identificou que o miRNA-1 e -133 estão altamente expressos independentes da DVCs (Kuwabara et al., 2011). Em estudo recentes, foi observado que os *myomiRs* tem sua expressão alterada sangue de devido a HA em humanos e em modelos animais, com redução na expressão do miRNAs-133a e -206 e aumento para os miRNAs-1, -208b e -499 (JUSIC; DEVAUX, 2019). Por outro lado, foi observado em pacientes com IC um aumento na expressão do miRNA-1 (NAGA et al., 2009; Bostjancic et al., 2010; Sluijter et al., 2010; LAI et al., 2015) , redução na expressão do miRNA-133a e b (Bostjancic et al., 2010; CARE et al., 2009; Danowski et al., 2013) e do miRNA-499 (Ikeda et al., 2007). Por outro lado, Matkovich e colaboradores (2012) encontraram a expressão aumentada do miRNA-499 e a expressão do miRNA-208b parece não alterar na doença (Ikeda et al., 2007). Outro estudo que avaliou pacientes com IC avançada, observaram aumento na expressão do miRNA-1 (AKATA et al., 2014). Estudo de Schipper e colaboradores (2008), avaliaram em pacientes com estado avançado de IC a expressão dos miRNAs-1, -133a e -133b estava reduzida nesses pacientes, porém após introdução do equipamento que auxilia na função ventricular, a expressão do miRNAs foi reestabelecida a parâmetros normais. Além destes *myomiRs*, outros miRNAs apresentaram modificação na expressão em pacientes com IC como o miRNA-21 (VILLAR et al., 2013; LAI et al., 2015), miRNA-24 (Ikeda et

al., 2007), miRNA-29b ; (LAI et al., 2015), miRNA-199 (Ikeda et al., 2007; LAI et al., 2015) e miRNA-214 (Ikeda et al., 2007).

Esses resultados corroboram com os encontrados no presente estudo, no qual a expressão dos miRNA-1 está aumentada e do miRNA-499 está reduzida e sem alteração do miRNA-208b. Ainda nenhum estudo procurou avaliar a expressão dos miRNAs-205 e -328a. Em nosso estudo, o TFA preveniu a modulação na expressão desses miRNAs, um resultado próximo do encontrado quando é melhorada a função ventricular.

Estudos que investigaram a expressão dos miRNAs em atletas maratonistas observaram o aumento na expressão dos *myomiRs* (miRNAs-1, -133 e -206) na circulação de maratonistas e que esses transcritos possuem uma correlação positiva com o VO₂ máximo desses atletas (MOOREN et al., 2014). Em outro estudo, atletas de maratona apresentaram níveis maiores na circulação dos miRNAs-1, -133a, -146a, -206, -208a,-499 (BAGGISH et al., 2014). Estudos também demonstraram que o TFA de endurance de 12 semanas o aumento de miRNA-1, -133a, -133b, -206 na circulação (NIELSEN et al., 2010). Outros estudo propuseram investigar a expressão dos miRNAs após TFA e observaram a redução dos miRNAs -1, 133, 206 no músculo esquelético (Kirby et al., 2015) e até mesmo menores períodos de treinamento como 10 semanas induziram o aumento na modulação dos miRNAs-1, -133a, -133b, -181a, -9, -23a, -23b e -31 (WINBANKS et al., 2014). Esses estudos corroboram no entendimento do TFA como um poderoso modulador da expressão dos miRNAs, o que no presente trabalho induziu a melhor no fenótipo e metabolismo no músculo esqueléticos de animais IC de etiologia hipertensiva e que também foram observados em pacientes com IC.

8. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que as alterações presentes na miopatia muscular esqueléticas advindas da progressão da hipertensão arterial e estabelecimento da insuficiência cardíaca, envolve a alteração de um conjunto de miRNAs e genes alvos comprometidos na regulação do fenótipo e metabolismo muscular. E que o treinamento físico aeróbio exerce um papel terapêutico efetivo no restabelecimento da morfologia e função muscular pela modulação dos miRNAs.

REFERÊNCIAS

- ABKHOOIE L. et al. Potential Roles of MyomiRs in Cardiac Development and Related Diseases. **Curr Cardiol Rev.**, v.17, p.e010621188335, 2021.
- ADAMOPOULOS S. et al. Physical training improves skeletal muscle metabolism in patients with chronic heart failure. **J Am Coll Cardiol.**, v.21, p.1101–1106, 1993.
- ADAMOPOULOS S. et al. Physical training reduces peripheral markers of inflammation in patients with chronic heart failure. **Eur Heart J.**, v.22, p.791–797, 2001.
- AGBU, P.; CARTHEW, R. W. MicroRNA-mediated regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v.22, p.425–438, 2021.
- AHMADIAN, M.J. et al. “PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future,” **Nature Medicine**, v.19, p. 557–566, 2013.
- AKAT KM, Moore-McGriff D, Morozov P, Brown M, Gogakos T, Correa Da Rosa J, Mihailovic A, Sauer M, Ji R, Ramarathnam A, Totary-Jain H, Williams Z, Tuschl T, Schulze PC. Comparative RNA-sequencing analysis of myocardial and circulating small RNAs in human heart failure and their utility as biomarkers. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.111. p.11151-11156, 2014.
- ALP, P. R. et al. Activities of citrate synthase and NAD⁺-linked and NADP⁺ linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. **The Biochemical Journal**, v.154, p.689-700, 1976.
- AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, v.431, p.350-355, 2004.
- ANKER, S. D. et al. The influence of muscle mass, strength, fatigability and blood flow on exercise capacity in cachectic and noncachectic patients with chronic heart failure. **European Heart Journal**, v.18, p.259-269. 1997.
- AOI, W et al. The microRNA miR696 regulates PGC1 α in mouse skeletal muscle in response to physical activity. **The American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v.298, p.E799-806, 2010.
- BACURAU, A. V. N. et al. Sympathetic hyperactivity differentially affects skeletal muscle mass in developing heart failure: role of exercise training. **Journal of Applied Physiology**, v.106, p.1631-1640, 2009.
- BAGGISH A. L. et al. Rapid upregulation and clearance of distinct circulating microRNAs after prolonged aerobic exercise. **J. Appl. Physiol.**, v.116, p.522-531, 2014.
- BANKE, N. H. et al. Preferential oxidation of triacylglyceride- derived fatty acids in heart is augmented by the nuclear receptor PPAR α . **Circ. Res.**, v.107, p.233–241, 2010.
- BARROSO, W. K. B. Diretrizes brasileiras de hipertensão arterial – 2020. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.116, p.516-658, 2021.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell**, v.116, p.281-297, 2004.

BÁTKAI, S.; THUM, T. MicroRNAs in Hypertension: Mechanisms and therapeutic targets. **Current Hypertension Reports**, v.2, p.79-87, 2012.

BEKFANI, T. et al. Sarcopenia in patients with heart failure with preserved ejection fraction: impact on muscle strength, exercise capacity and quality of life. **Int. J. Cardiol.**, v. 222, p.41-46, 2016.

BENJAMIN E. J. et al. Heart Disease and Stroke Statistics 2017 Update: a report from the American Heart Association. **Circulation**, v.135, p.e146–603, 2017.

BENJAMIN E. J. et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. **Circulation**, v 141, p.e33, 2020.

BERTERO, E.; MAACK, C. Metabolic remodelling in heart failure. **Nat. Rev. Cardiol.**, v.15, p.457–470, 2018.

BIEBER, L. L. et al. A rapid spectrophotometric assay for carnitine palmitoyltransferase. **Analytical biochemistry**, v. 50, n. 2, p. 509–518, 1972.

BLAAUW B.; SCHIAFFINO S.; REGGIANI C. Mechanisms modulating skeletal muscle phenotype. **Compr. Physiol.**, v.3, p.1645-1687, 2013.

BOOTH F. W. et al. Role of Inactivity in Chronic Diseases: Evolutionary insight and pathophysiological mechanisms. **Physiol Rev.**, v.97, p.1351-1402, 2017.

BORTOLOTTO, S. K. et al. Fiber type populations and Ca²⁺ activation properties of single fibers in soleus muscles from SHR and WKY rats. **American Journal of Physiology Cell Physiology**, v.276, p.628-637, 1999.

BOSTJANCIC E. et al. MicroRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-208 are dysregulated in human myocardial infarction. **Cardiology**, v.115, p.163–169, 2010.

BOZKURT, B. et al. Contributory Risk and Management of Comorbidities of Hypertension, Obesity, Diabetes Mellitus, Hyperlipidemia, and Metabolic Syndrome in Chronic Heart Failure: A scientific statement from the American Heart Association. **Circulation**, v.134, p.535-578, 2016.

BOZKURT, B. et al. Universal Definition and Classification of Heart Failure: a report of the Heart Failure Society of America, Heart Failure Association of the European Society of Cardiology, Japanese Heart Failure Society and Writing Committee of the Universal Definition of Heart Failure. **Journal of Cardiac Failure**, v.27, p.387-413, 2021. (A)

BOZKURT, B. et al. 2021 ACC/AHA Key Data Elements and Definitions for Heart Failure: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Data Standards (Writing Committee to Develop Clinical Data Standards for Heart Failure). **Circulation Quality and Outcomes**, v.1, p.476-569, 2021. (B)

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

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

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

BROOKS G. A. Cell-cell and intracellular lactate shuttles. **J Physiol.**, v.587, p.5591-5600, 2009.

BROOKS G. A. Lactate as a fulcrum of metabolism. **Redox Biol.**, v.35, p.101454, 2021.

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

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

BUENO C. R. Jr et al. Aerobic exercise training improves skeletal muscle function and Ca^{2+} handlingrelated protein expression in sympathetic hyperactivityinduced heart failure. **J. Appl. Physiol.** v.109, p.702-709, 2010.

BUI, A. L.; HORWICH, T. B.; FONAROW, G. C. Epidemiology and risk profile of heart failure. **Nat. Rev. Cardiol.**, v.8, p.30-41, 2011.

BURKART, E. M. et al. Nuclear receptors PPARbeta/delta and PPARAlpha direct distinct metabolic regulatory programs in the mouse heart. **J. Clin. Invest.**, v.11, p.3930–3939, 2007.

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

CAMPOS, J. C. et al. Exercise reestablishes autophagic flux and mitochondrial quality control in heart failure. **Autophagy**, v. 13, p. 1304-1317, 2017.

CARE A. et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med.*, v.13, p.613–618, 2007.

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

CHEMELLO, F. et al. Microgenomic analysis in skeletal muscle: expression signatures of individual fast and slow myofibers. **PLoS One**, v.6,p.e16807, 2011.

CHEN J. et al. miR-1/AMPK-Mediated Glucose and Lipid Metabolism under Chronic Hypothermia in the Liver of Freshwater Drum, *Aplodinotus grunniens*. **Metabolites**, v.12, p.697, 2022.

CHEN R. et al. Regulation of Skeletal Muscle Atrophy in Cachexia by MicroRNAs and Long Non-coding RNAs. **Front Cell Dev Biol.**, v.8, p.577010, 2020.

CHEN, J. F. et al. microRNA1 and microRNA206 regulate skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by repressing Pax7. **The Journal of Cell Biology**, v.190, p.867-879, 2010.

CHEN, J. F. et al. The role of microRNA1 and microRNA133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. **Nature Genetics**, v.38, p.228-233, 2006.

CHENG, L. et al. Cardiomyocyte- restricted peroxisome proliferator- activated receptor- delta deletion perturbs myocardial fatty acid oxidation and leads to cardiomyopathy. **Nat. Med.**, v.10, p.1245–1250, 2004.

CRABTREE, B.; NEWSHOLME, E. A. The activities of phosphorylase, hexokinase, phosphofructokinase, lactate dehydrogenase and the glycerol 3-phosphate dehydrogenases in muscles from vertebrates and invertebrates. **The Biochemical Journal**, v. 126, n. 1, p. 49–58, 1972.

CRAIG, B. W. et al. The influence of training-detraining upon the heart, muscle and adipose tissue of female rats. **Mech Ageing Dev.**, v.57, p.49-61, 1991

CRIMI, E., et al. Mechanisms by which exercise training benefits patients with heart failure. **Nat. Rev. Cardiol.**, v.6, p.292-300, 2009.

CROSSLAND H. et al. The impact of immobilisation and inflammation on the regulation of muscle mass and insulin resistance: different routes to similar end-points. **J Physiol.**, v.2597, p.1259–1270, 2019.

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

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

DANOWSKI, N. et al. Decreased expression of miR-133a but not of miR-1 is associated with signs of heart failure in patients undergoing coronary bypass surgery. **Cardiology**, v.125, p.125–130, 2013.

DAVALOS, A. et al. miR-33a/b contribute to the regulation of fatty acid metabolism and insulin signaling. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v.108, p.9232–9237, 2011.

DAWBERT, T. R.; MEADORS, G. F.; MOORE, F. E. Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study. **Am. J. Public. Health Nations. Health**, v.41, p.279-281, 1951.

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

DEL BUONO, M. G. et al. Exercise intolerance in patients with heart failure. **JACC**, v.73 p.2209-2225, 2019.

DI PALO K. E.; BARONE N. J. Hypertension and Heart Failure: Prevention, Targets, and Treatment. **Heart Fail Clin**, v.16, p.99-106, 2020.

DOENST T. et al. Decreased rates of substrate oxidation ex vivo predict the onset of heart failure and contractile dysfunction in rats with pressure overload. **Cardiovasc Res.**, v.86, p.461–470, 2010.

DREXLER H. et al. Alterations of skeletal muscle in chronic heart failure. **Circulation**, v.85, p.1751–1759, 1992.

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

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

DUBOIS, V., Eeckhoutte, J., Lefebvre, P. & Staels, B. Distinct but complementary contributions of PPAR isotypes to energy homeostasis. **J. Clin. Invest.**, v.127, p.1202–1214, 2017.

DUNLAY, S. M. Epidemiology of heart failure with preserved ejection fraction. **Nature Reviews Cardiology**, v.14, p.591-602, 2017.

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

EISENBERG, B. R. Quantitative ultrastructure in mammalian skeletal muscle. In: Handbook of Physiology. Skeletal Muscle. **Bethesda**, MD: Am. Physiol. Soc. chapt. 3, p. 73–112, 1983.

EL AZZOUZI, H. et al. “The Hypoxia-Inducible MicroRNA Cluster miR-199a~214 targets myocardial PPAR δ and impairs mitochondrial fatty acid oxidation,” *Cell Metabolism*, v.18, p. 341–354, 2013.

EL AZZOUZI, H. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gene profiling uncovers insulin-like growth factor-1 as a PPAR α target gene in cardioprotection. **J. Biol. Chem.**, v.286, p.14598–14607, 2011.

ELIA, L. et al. Reciprocal regulation of microRNA1 and insulinlike growth factor1 signal transduction cascade in cardiac and skeletal muscle in physiological and pathological conditions. **Circulation**, v.120, p.2377-2385, 2009.

ENCODE PROJECT CONSORTIUM. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. **Nature**, v.489, p.57–74, 2012.

ENSER, M. B. et al. Metabolism of triglyceride fatty acid by the perfused rat heart. **The Biochemical journal**, v. 104, n. 1, p. 306–317, 1967.

FAN, W. et al. PPAR δ promotes running endurance by preserving glucose. **Cell Metabolism**, v.25, p. 1186-1193, 2017.

FENG Y. et al. Lactate dehydrogenase A: A key player in carcinogenesis and potential target in cancer therapy. **Cancer Med.**, v.7, p.6124-6136, 2018.

FERNANDES, T. et al. Aerobic exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves regulatory MicroRNAs, decreased angiotensin-converting enzyme-angiotensin II, and synergistic regulation of angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin (17). **Hypertension**, v.58, p.1829, 2011.

FERNANDES, T. et al. Exercise training prevents the microvascular rarefaction in hypertension balancing angiogenic and apoptotic factors: role of microRNAs 16, 21, and 126. **Hypertension**, v.59, p.51320, 2012.

FERNANDES, T. et al. Aerobic exercise training promotes physiological cardiac remodeling involving a set of microRNAs. **Am. J. Physiol. Circ. Physiol.**, v.309, p.H543-H552, 2015.

FERREIRA, M. M. T. et al. Exercise training ameliorates adrenergic control in spontaneously hypertensive rats. **Clin. Exp. Hypertens.**, v.43, p.101-111, 2021.

FIUZALUCES, C. et al. Exercise is the real polypill. **Physiology**, v.28, p.33058, 2013.

FLORIDO, R. et al. Six-year changes in physical activity and the risk of incident heart failure: ARIC study. **Circulation**, v.137, p.2142–2151, 2018.

FLYNN, K. E. et al. Effects of exercise training on health status in patients with chronic heart failure: HFACTION randomized controlled trial. **JAMA**, v. 301, p.1451-1459, 2009.

FRITZ, T. et al. Low-intensity exercise increases skeletal muscle protein expression of PPAR δ and UCP3 in type 2 diabetic patients. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v.2, p.492–498, 2006.

FROHLICH, E. D. The adrenergic nervous system and hypertension: State of the art. **Mayo. Clin. Proc.**, v.52, p.3618, 1977.

FÜLSTER, S. et al. Muscle wasting in patients with chronic heart failure: results from the studies investigating co-morbidities aggravating heart failure (SICA-HF). **Eur Heart J.**, v.34, p.512–519, 2013.

GAN, Z. et al. Nuclear receptor/microRNA circuitry links muscle fiber type to energy metabolism. **J Clin Invest.**, v.123, p.2564-2575, 2013.

GAN, Z. et al. Nuclear receptor/microRNA circuitry links muscle fiber type to energy metabolism. **The Journal of Clinical Investigation**, v.123, p.2564-2575, 2013.

GARNIER, A. et al. Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. **J Physiol.**, v.551, p.491–501, 2003.

GERIN, I. et al. Expression of miR-33 from an SREBP2 intron inhibits cholesterol export and fatty acid oxidation. **J. Biol. Chem.**, v.285, p.33652–33661, 2010.

GIELEN, S. et al. Anti-inflammatory effects of exercise training in the skeletal muscle of patients with chronic heart failure. **J Am Coll Cardiol.**, v.42, p.861–868, 2003.

- GOMES, C. P. C et al; Cardioline™ network. Noncoding RNAs and exercise: pathophysiological role and clinical application in the cardiovascular system. **Clin. Sci.**, v.18, p.925942, 2018.
- GONG, G. et al. Oxidative capacity in failing hearts. **Am J Physiol.**, v.285, p.H541– H548, 2003.
- GRECO, S. et al. Common micro-RNA signature in skeletal muscle damage and regeneration induced by Duchenne muscular dystrophy and acute ischemia. **FASEB J.**, v.23, p.3335–3346, 2009.
- GROSS, B. et al. PPARs in obesity- induced T2DM, dyslipidaemia and NAFLD. **Nat. Rev. Endocrinol.**, v.13, p.36–49, 2017.
- HAEHLING, S. Von et al. Muscle wasting and cachexia in heart failure: mechanisms and therapies. **Nature Reviews Cardiology**, v.14, p.323-341, 2017.
- HAEMMERLE, G. et al. ATGL- mediated fat catabolism regulates cardiac mitochondrial function via PPAR- α and PGC-1. **Nat. Med.**, v.17, p.1076–1085, 2011.
- HAGIWARA, N. et al. Sox6 is required for normal fiber type differentiation of fetal skeletal muscle in mice. **Developmental Dynamics**, v.236, p.2062-2076, 2007.
- HAJAHMADI, M. et al. Muscle wasting in young patients with dilated cardiomyopathy. **J Cachexia Sarcopenia Muscle.**, v.8, p.542–548, 2017.
- HAMBRECHT, R. et al. Effects of exercise training on left ventricular function and peripheral resistance in patients with chronic heart failure. A randomised trial. **JAMA**, v.283, p.3095–3101, 2000.
- HAMBRECHT, R. et al. Effects of endurance training on mitochondrial ultrastructure and fiber type distribution in skeletal muscle of patients with stable chronic heart failure. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v.29, p.1067-1073, 1997.
- HARTMANN, D.; THUM, T. MicroRNAs and vascular (dys)function. **Vascular Pharmacology**, v.55, p.92-105, 2011.
- HERZIG, S.; SHAW, R. J. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v.19, p.121-135, 2018.
- HOWALD, H. et al. Influence of endurance training on the ultrastructure composition of different muscle fibre types in humans. **Pflügers Arch.**, v.403, p.369–376, 1985.
- IKEDA, S. et al. Altered microRNA expression in human heart disease. **Physiol Genomics**, v.31, p.367-373, 2007.
- IWASAKI, H. et al. MicroRNA-494 plays a role in fiber type-specific skeletal myogenesis in human induced pluripotent stem cells. **Biochem Biophys Res Commun.**, v.468, p.208-13, 2015.
- JÄGER, S. et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . **Proc Natl Acad Sci USA**, v.104, p.12017-12022, 2007.

Jl, J. et al. Puralpha and Purbeta collaborate with Sp3 to negatively regulate betamyosin heavy chain gene expression during skeletal muscle inactivity. **Molecular and Cellular Biology**, v.27, p.1531-1543, 2007.

JORDÃO C. P. et al. Aerobic swim training restores aortic endothelial function by decreasing superoxide levels in spontaneously hypertensive rats. **Clinics.**, v.72, p.310-316, 2017.

JOSIAK, K. et al. "Skeletal myopathy in patients with chronic heart failure: significance of anabolic-androgenic hormones." **J. Cachexia Sarcopenia and Muscle**, v.5, p.287-296, 2014.

JUSIC, A.; DEVAUX, Y. Noncoding RNAs in hypertension. **Hypertension**, v.74, p.477-492, 2019.

KAPOOR, A. et al. Activation of peroxisome proliferator- activated receptor- beta/delta attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in the rat. **Shock**, v.34, p.117–124, 2010.

KELLERROSS, M. L. et al. Skeletal muscle fatigability in heart failure. **Front. Physiol.**, v.10, p.129, 2019.

KENNEL, P. J. et al. Skeletal muscle changes in chronic cardiac disease and failure. **Compr. Physiol.**, v.5, p.1947-1969, 2015.

KIM, V. N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.6, p.376-385, 2005.

KOCH, L. G. et al. Intrinsic aerobic capacity sets a divide for aging and longevity. **Circ. Res.**, v.109, p.1162-1172, 2011.

KOH, J. H. et al. PPAR β is essential for maintaining normal levels of PGC-1 α and mitochondria and for the increase in muscle mitochondria induced by exercise. **Cell Metab.**, v.25, p.1176–1185.e5, 2017.

KRÄMER, D. K. et al. Human skeletal muscle fibre type variations correlate with PPARalpha, PPARdelta and PGC1alfa mRNA. **Acta Physiologica**, v.188, p.207–216, 2006.

KUWABARA, Y. et al. Increased microRNA-1 and micro- RNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage. **Circ Cardiovasc Genet.**, b.4, p.446–454, 2011.

LAHEY, R. et al. Dietary fat supply to failing hearts determines dynamic lipid signaling for nuclear receptor activation and oxidation of stored triglyceride. **Circulation**, v.130, p.1790–1799, 2014.

LAI, K. B. et al. Micro-RNA and mRNA myocardial tissue expression in biopsy specimen from patients with heart failure. **Int J Cardiol.**, v.199, p.79–83, 2015.

LANG, C. C. et al. Skeletal muscle mass and exercise performance in stable ambulatory patients with heart failure. **J. Appl. Physiol.**, v.82, p.257-261, 1997.

LANG, R. M. et al. Recommendations for Chamber Quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. **Journal of the American Society of Echocardiography**, v.8, p.1440-14463, 2005.

LEJEMTEL, T. H. et al. Failure to augment maximal limb blood flow in response to one-leg versus two-leg exercise in patients with severe heart failure. **Circulation**, v.74, p.245–251, 1986.

LEMIEUX, H. et al. Mitochondrial respiratory control and early defects of oxidative phosphorylation in the failing human heart. **Int J Biochem Cell Biol.**, v.43, p.1729–1738, 2011.

LÉVY, B. I. et al. Microcirculation in hypertension: a new target for treatment? **Circulation**, v.104, p.735-740, 2001.

LEYPOLD, N. A.; SPEICHER, M. R. Evolutionary conservation in noncoding genomic regions. **Trends. Genet.**, v.21, p.S0168-9525, 2021.

LIANG, H.; WARD, W. F. PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. **Adv. Physiol. Educ.**, v.30, p.145–151, 2006.

LIANG, J. et al. MicroRNA-29a-c decrease fasting blood glucose levels by negatively regulating hepatic gluconeogenesis. **J. Hepatol.**, v.58, p.535–542, 2013.

LINDENMAYER, G. E.; SORDAHL, L. A.; SCHWARTZ, A. Reevaluation of oxidative phosphorylation in cardiac mitochondria from normal animals and animals in heart failure. **Circ Res.**, v.23, p.439–450, 1968.

LIU, Q. et al. Non-coding RNA basis of muscle atrophy. **Mol Ther Nucleic Acids.**, v.26, p.1066-1078, 2021.

LIU, J. et al. Peroxisome proliferator- activated receptor β/δ activation in adult hearts facilitates mitochondrial function and cardiac performance under pressure- overload condition. **Hypertension**, v.57, p.223–230, 2011.

LIU, X.; Platt, C.; Rosenzweig, A. The role of microRNAs in the cardiac response to exercise. **Cold Spring Harb Perspect Med.**, v.7, p.19, 2017.

LIU, X. et al. miR-222 is necessary for exercise-induced cardiac growth and protects against pathological cardiac remodeling. **Cell Metab.**, v.21, p.584–595, 2015.

LUO Y. et al. New developments on the Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) data portal. **Nucleic Acids Res.**, v.48, p.D882–D889, 2020.

LUQUET, S. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor delta controls muscle development and oxidative capability. **The FASEB Journal**, v.17, p.2299–2301, 2003.

MALACHIAS, M. V. B. et al. 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial: capítulo 1 conceituação, epidemiologia e prevenção primária. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.107, supl. 3, p. 16, 2016.

MANCINI, D. M. et al. Respiratory muscle function and dyspnea in patients with chronic congestive heart failure. **Circulation**, v.86, p.909–918, 1992.

MANCINI, D. M. et al. Contribution of skeletal muscle atrophy to exercise intolerance and altered muscle metabolism in heart failure. *Circulation*, v.85, p.1364–1373, 1992.

MANCINI, D. M. et al. Contribution of intrinsic skeletal muscle changes to ³¹P NMR skeletal muscle metabolic abnormalities in patients with chronic heart failure. **Circulation**, v.80, p.1338-1346, 1989.

MANN, D. L.; REID, M. B. Exercise training and skeletal muscle inflammation in chronic heart failure: feeling better about fatigue. **J Am Coll Cardiol.**, v.42, p.869–872, 2003.

MANCINI, D. M.; et al. Contribution of skeletal muscle atrophy to exercise intolerance and altered muscle metabolism in heart failure. **Circulation**, v.85, p.1361-1373, 1992.

MARCONDES-BRAGA, F. G. et al. Atualização de tópicos emergentes da Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca – 2021. **Arq. Bra. Cardiol.**, v.116, p.1174-1212, 2021.

MATKOVICH, S. J. et al. Direct and indirect involvement of microRNA-499 in clinical and experimental cardiomyopathy. **Circ Res.**, v.111, p.521–531, 2012.

McCARTHY, J. J. et al. Evidence of MyomiR network regulation of betamyosin heavy chain gene expression during skeletal muscle atrophy. **Physiological Genomics**, v.39, p.219-226, 2009.

McCARTHY, J. J.; ESSER, K. A. MicroRNA1 and microRNA133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy. **Journal of Applied Physiology**, v.102, p.306-313, 2007.

McCORMICK, R.; GOLJANEK-WHYSALL, K. MicroRNA Dysregulation in Aging and Pathologies of the Skeletal Muscle. **Int Rev Cell Mol Biol.**, v.334, p.265-308, 2017.

MCMULLEN, J. R.; DREW, B. G. Long noncodingRNAs (lncRNAs) in skeletal and cardiac muscle: potential therapeutic and diagnostic targets? **Clin. Sci.**, v.130, p.2245-2256, 2016.

MESSERLI, F. H.; RIMOLDI, S. F.; BANGALORE, S. The Transition From Hypertension to Heart Failure: Contemporary Update. **JACC Heart Fail**, v.5, p.543-551, 2017.

METTAUER, B. et al. Oxidative capacity of skeletal muscle in heart failure patients versus sedentary or active control subjects. **J Am Coll Cardiol.**, v.38, p.947–954, 2001.

MIDDLEKAUFF, H. R. Making the case for skeletal myopathy as the major limitation of exercise capacity in heart failure. **Circ. Heart Fail.**, v. 3, p. 537-546, 2010.

MINOTTI, J. R. et al. Impaired skeletal muscle function in patients with congestive heart failure. Relationship to systemic exercise performance. **J Clin Invest.**, v.88, p.2077–2082, 1991.

MISHARA, S.; KASS, D. A. et al. Cellular and molecular pathobiology of heart failure with preserved ejection fraction. **Nature Reviews Cardiology**, v.18, p.400-423, 2021.

MONTAIGNE, David; BUTRUILLE, Laura; STAELS, Bart. PPAR control of metabolism and cardiovascular functions. Nature reviews. **Cardiology**, v.18, p. 809–823, 2021.

MOOREN, F. C. et al. Circulating microRNAs as potential biomarkers of aerobic exercise capacity. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v.306, p.H557-H563, 2014.

MOOREN, F. C. et al. Circulating microRNAs as potential biomarkers of aerobic exercise capacity. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v.306, p.H557-H563, 2014.

MOREIRA, J. B. N.; WOHLWEND, M.; WISLØFF, U. Exercise and cardiac health: physiological and molecular insights. **Nature Metabolism**, v.2, p.829-839, 2020.

MUDERS, F., ELSNER, D. Animal models of chronic heart failure. **Pharmacological Research**, v.41, p.605-612, 2000.

MURACH, K. A.; McCARTHY, J. J. MicroRNAs, heart failure, and aging: potential interactions with skeletal muscle. **Heart Fail Rev.**, v.22, p.209-218, 2017.

MYERS, J. et al. Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing. **N. Engl. J. Med.**, v.346, p.793-801, 2002.

MYTIDOU, C. et al. Muscle-derived exosomes encapsulate myomiRs and are involved in local skeletal muscle tissue communication. **FASEB J.**, v.35, p.e21279, 2021.

NAGA, P. S. V. et al. Unique microRNA profile in end-stage heart failure indicates alterations in specific cardiovascular signaling networks. **J Biol Chem.**, v.284, p.27487–27499. 2009.

NAGATOMO, F. et al. Skeletal muscle characteristics of rats with obesity, diabetes, hypertension, and hyperlipidemia. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v.16, p.576-585, 2009.

NAGHAVI, M. et al. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **Lancet (London England)**, v.390, p.1151-1210, 2017.

NEGRAO, C. E. et al. Effects of exercise training on neurovascular control and skeletal myopathy in systolic heart failure. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 308, p. 792-802, 2015.

NEVES, V. J. et al. Exercise training in hypertension: Role of microRNAs. **World J. Cardiol.**, v.6, p.713-727, 2014.

NIELSEN, S. et al. Muscle specific microRNAs are regulated by endurance exercise in human skeletal muscle. **The Journal of Physiology**, v.588, p.4029-4037, 2010.

NYSTORIAK, M. A.; BHATNAGAR, A. Cardiovascular Effects and Benefits of Exercise. **Front Cardiovasc Med.**, v.5 p.135, 2018.

O'BRIEN, J. et al. Overview of MicroRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v.9, p.402, 2018.

O'CONNOR, C. M. et al. Efficacy and safety of exercise training in patients with chronic heart failure. **JAMA**, v.301, p.1439, 2009.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Jap. Circ. J.**, v.27, p.282-293, 1963.

OPASICH, C. et al. Biochemical analysis of muscle biopsy in overnight fasting patients with severe chronic heart failure. **Eur Heart J.**, v.17, p.1686–1693, 1996.

PAHOR, M. et al. LIFE study investigators: Effect of structured physical activity on prevention of major mobility disability in older adults: the LIFE study randomized clinical trial. **JAMA**, v.311, p.2387-2396, 2014.

PANDEY, Ambarish et al. Exercise Intolerance in Older Adults With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: JACC State-of-the-Art Review. **JACC**, v. 78, n. 11, p. 1166–1187, 2021.

PATEL, M. S.; KOROTCHKINA, L. G. Regulation of the pyruvate dehydrogenase complex. **Biochem. Soc. Trans.**, v.34, p.217–222, 2006.

PAWLAK, M.; LEFEBVRE, P.; STAELS, B. Molecular mechanism of PPAR α action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non- alcoholic fatty liver disease. **J. Hepatol.**, v.62, p.720–733, 2015.

PELOZIN, B. R. A. et al. mTOR signaling-related microRNAs as cardiac hypertrophy modulators in high-volume endurance training. **J Appl Physiol (1985)**, v.132, p.126-139, 2022.

PEREIRA, N. et al. Noncoding RNAs in the Cardiovascular System: Exercise Training Effects. **In: Muscle Cells - Recent Advances and Future Perspectives.** [s.l.] IntechOpen, 2020. p. 1-13.

PETERS, J. M.; SHAH, Y. M.; GONZALEZ, F. J. "The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention," **Nature Reviews Cancer**, v.12, p. 181–195, 2012.

PFEFFER, M. A.; SHAH, A. M.; BORLAUG, B. A. Heart failure with preserved ejection fraction in perspective. **Circulation Research**, v.124, p.1598-1617, 2019.

PIEPOLI, M. F.; COATS, A. J. The 'skeletal muscle hypothesis in heart failure' revised. **Eur. Heart J.**, v.34, p.486-488, 2013.

PIÑA, I. L. et al. Exercise and heart failure: A statement from the American Heart Association Committee on exercise, rehabilitation, and prevention. **Circulation**, v.4, p1210-1225, 2003.

POLLER, W. et al. Noncoding RNAs in cardiovascular diseases: diagnostic and therapeutic perspectives. **Eur. Heart J.**, v.39, p.2704–2716, 2018.

- PONIKOWSKI, P. et al. 2016 ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: the task force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the european society of cardiology (esc). developed with the special contribution of the heart failure association (hfa) of the esc. **Eur. J. Heart Fail**, v. 18, p. 891-975, 2016.
- PORTIUS, D.; SOBOLEWSKI, C.; FOTI, M. MicroRNAs-Dependent Regulation of PPARs in Metabolic Diseases and Cancers. **PPAR Res.**, v.2017, p.7058424, 2017.
- POTTS, J. T. et al. Reduction in arterial compliance alters carotid baroreflex control of cardiac output in a model of hypertension. **Am. J. Physiol.**, v.43, p.H1121-H1131, 1998.
- QUIAT, D.; OLSON, E. N. MicroRNAs in cardiovascular disease: from pathogenesis to prevention and treatment. **The Journal of Clinical Investigation**, v.123, p.11-18, 2013.
- RAMÍREZ-VÉLEZ, R. et al. Revisiting skeletal myopathy and exercise training in heart failure: Emerging role of myokines. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 138, p. 155348, 2022.
- RARDIN, M. et al. Monitoring phosphorylation of the pyruvate dehydrogenase complex. **Anal. Biochem.**, v.389, p.157–164, 2009.
- RODRIGUES, A. C. et al. Intramuscular Injection of miR-1 Reduces Insulin Resistance in Obese Mice. **Front Physiol.**, v.12, p.676265, 2021.
- RODRIGUES, L. F. et al. Skeletal Muscle Angiogenesis Induced by Volume-Dependent Aerobic Exercise Training: Effects on miRNAs-27a/b and Oxidant-Antioxidant Balance. **Antioxidants (Basel)**, v.11, p.651, 2022.
- RODRIGUES, A. C. et al. Intramuscular Injection of miR-1 Reduces Insulin Resistance in Obese Mice. **Front. Physiol.**, v.12, p.676-265, 2021.
- ROHDE, L. E. P. et al. Diretriz brasileira de insuficiência cardíaca crônica e aguda. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 111, p.436-539, 2018.
- ROQUE, F. R. et al. Aerobic exercise reduces oxidative stress and improves vascular changes of small mesenteric and coronary arteries in hypertension. **British Journal of Pharmacology**, v.168, p.686-703, 2013.
- ROSCA, M. G.; HOPPEL, C. L. Mitochondrial dysfunction in heart failure. **Heart Fail Rev.**, v.18, p.607-622, 2013.
- ROTTIERS, V. et al. MicroRNAs in metabolism and metabolic diseases. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.**, v.76, p.225–233, 2011.
- RUSSELL, A. P. et al. Endurance training in humans leads to fiber typespecific increases in levels of peroxisome proliferatoractivated receptorgamma coactivator1 and peroxisome proliferatoractivated receptoralpha in skeletal muscle. **Diabetes**, v.52, p.2874-2881, 2003.
- SAFDAR, A. et al. miRNA in the regulation of skeletal muscle adaptation to acute endurance exercise in C57Bl/6J male mice. **PLoS One**, v.4, p.e5610, 2009.

SALVADO, L. et al. "Targeting PPAR β/δ for the treatment of type 2 diabetes mellitus," **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v.16, p. 209–223, 2012.

SAMUEL, T. J. et al. Left ventricular diastolic dysfunction and exercise intolerance in obese heart failure with preserved ejection fraction. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, v.320, p.H1535-H1542, 2021.

SANBE, A, et al. Improvement of cardiac function and myocardial energy metabolism of rats with chronic heart failure by long-term coenzyme Q10 treatment. **J Pharmacol Experi Ther.**, v.269, p.51–56, 1994.

SANTOS I. L. G. Effects of exercise training on circulating and skeletal muscle renin-angiotensin system in chronic heart failure rats. **PLoS One**, v. 23, p: e98012, 2014.

SCHIAFFINO; S.; HANZLIKOVA, V.; PIEROBON, S. Relations between structure and function in rat skeletal muscle fibers. **J Cell Biol.**, v.47, p.107–119, 1970.

SCHIAFFINO, Stefano; REGGIANI, Carlo. Fiber types in mammalian skeletal muscles. **Physiological reviews**, v. 91, n. 4, p. 1447–1531, 2011.

SCHIPPER, M. E. et al. Changes in Regulatory MicroRNA Expression in Myocardium of Heart Failure Patients on Left Ventricular Assist Device Support. **The J. Heart Lung Transp.**, v.27, p.1282–1285, 2008.

SCHREPPER, A. et al. Biphasic response of skeletal muscle mitochondria to chronic cardiac pressure overload—role of respiratory chain complex activity. **J Mol Cell Cardiol.**, v.52, p.125–135, 2012.

SCHULER, M. et al. PGC1 alpha expression is controlled in skeletal muscles by PPAR beta, whose ablation results in fibertype switching, obesity, and type 2 diabetes. **Cell Metabolism**, v.4, p.407-414, 2006.

SHAROV, V. G. et al. Abnormal mitochondrial function in myocardium of dogs with chronic heart failure. **J Mol Cell Cardiol.**, v.30, p.1757–1762, 1998.

SHAROV, V. G. et al. Abnormal mitochondrial respiration in failed human myocardium. **J Mol Cell Cardiol.**, v.32, p.2361–2367, 2000.

Simonini A, Long CS, Dudley GA, Yue P, McElhinny J et al. Heart failure in rats causes changes in skeletal muscle morphology and gene expression that are not explained by reduced activity. *Circ Res.*, v.79, p.128–136, 1996.

SIMONSON, D. C.; DEFRONZO, R. A. Indirect calorimetry: methodological and interpretative problems. **Am. J. Physiol.**, v.258, p.E399-E412, 1990.

SIRACUSA, J.; KOULMANN, N.; BANZET, S. Circulating myomiRs: a new class of biomarkers to monitor skeletal muscle in physiology and medicine. **J. Cachexia Sarcopenia Muscle.**, v.9, p.20-27, 2018.

SLUIJTER, J. P. et al. MicroRNA-1 and -499 regulate differentiation and proliferation in human-derived cardiomyocyte progenitor cells. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v.30, p.859–868, 2010.

- SOCI, U. P. R. et al. Epigenetic control of exercise training-induced cardiac hypertrophy by miR208. **Clin. Sci. (Lond)**, v.130, p.2005-2015, 2016.
- SORDAHL, L.A. et al. Mitochondria and sarcoplasmic reticulum function in cardiac hypertrophy and failure. **Am J Physiol.**, v.224, p.497–502, 1973.
- SOUZA, R. W. et al. Aerobic exercise training prevents heart failure-induced skeletal muscle atrophy by anticatabolic, but not anabolic actions. **PLoS One**, v.9, p. e110020. 2014.
- SPRINGER, J.; SPRINGER, J. I.; ANKER, S. D. Muscle wasting and sarcopenia in heart failure and beyond: update 2017. **ESC Heart Fail.**, v.4, p.492–498, 2017.
- STANLEY, J. C.; LAMBADARIOS, J. A.; NEWSHOLME, E. A. Absence of effects of dietary wheat bran on the activities of some key enzymes of carbohydrate and lipid metabolism in mouse liver and adipose tissue. **Br J Nutr.**, v.55, p.287-294, 1986.
- SUGDEN, M. C.; HOLNESS, M. J. Mechanisms underlying regulation of the expression and activities of the mammalian pyruvate dehydrogenase kinases. **Arch. Physiol. Biochem.**, v.112, p.139–149, 2006.
- SULLIVAN, M. J.; GREEN, H. J.; COBB, F. R. Skeletal muscle biochemistry and histology in ambulatory patients with long-term heart failure. **Circulation**, v.81, p.518–527, 1990.
- TALL, A. R. et al. HDL, ABC transporters, and cholesterol efflux: implications for the treatment of atherosclerosis. **Cell Metab.**, v.7, p.365–375, 2008.
- THOMAS, C. J. et al. ANP enhances bradycardic reflexes in normotensive but not spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v.5, p.1126-1132, 1997.
- THUM, T. MicroRNA therapeutics in cardiovascular medicine. **EMBO Molecular Medicine**, v.4, p.314, 2012.
- VAN ROOIJ, E.; OLSON, E. N. MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. **The Journal of Clinical Investigation**, v.117, p.2369-2376, 2007.
- VAN ROOIJ, E. et al. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. **Science**, v.316, p.575-579, 2007.
- VAN ROOIJ, E. et al. Family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. **Dev. Cell**, v. 17, p.662-673, 2009.
- VECHETTI IJ, J. R. et al. The role of extracellular vesicles in skeletal muscle and systematic adaptation to exercise. **J Physiol.**, v.599, p.845-861, 2021.
- VELLOSO, C. P. Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I. **Br J Pharmacol.**, v.154, p.557–568, 2008.
- VIGELSØ, A.; ANDERSEN, N. B.; DELA, F. The relationship between skeletal muscle mitochondrial citrate synthase activity and whole body oxygen uptake adaptations in response to exercise training. **Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.**, v.6, p.84-101, 2014.

- VILLAR, A. V. et al. Myocardial and circulating levels of microRNA-21 reflect left ventricular fibrosis in aortic stenosis patients. **Int J Cardiol.**, v.167, p.2875–2881, 2013.
- VIRANI, S. S. et al. Heart Disease and Stroke Statistic-2021 Update: a report from american heart association. **Circulation**, v.23, p.e254-e743, 2021.
- VON HAEHLING, S. Muscle wasting and sarcopenia in heart failure: a brief overview of the current literature. **ESC Heart Fail**, v. 5, n. 6, p. 10741082, Dez. 2018.
- WANG, L. et al. A microRNA linking human positive selection and metabolic disorders. **Cell**, v.183, p.684–701, 2020.
- WANG, M. et al. Tissue Doppler imaging provides incremental prognostic value in patients with systemic hypertension and left ventricular hypertrophy. **Journal of Hypertension**, v.23, p.183-191, 2005.
- WANG, S. et al. Micro-RNA-27a/b negatively regulates hepatic gluconeogenesis by targeting FOXO1. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.317, p.E911–E924, 2019.
- WANG, Y. X. et al. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. **PLOS Biology**, v.2, p.e294, 2004.
- WATT, M. J. et al. Suppression of plasma free fatty acids upregulates peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and delta and PPAR coactivator 1alpha in human skeletal muscle, but not lipid regulatory genes. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.33, p.533-544, 2004.
- WILLIAMS, A. H. et al. MicroRNA control of muscle development and disease. **Current Opinion in Cell Biology**, v.21, p.461-469, 2009.
- WINBANKS, C. E. et al. MicroRNAs differentially regulated in cardiac and skeletal muscle in health and disease: potential drug targets? **Clin Exp Pharmacol Physiol.**, v.41, p.727-737, 2014.
- WOJCIECHOWSKA, A.; BRANIEWSKA, A.; KOZAR-KAMIŃSKA, K. MicroRNA in cardiovascular biology and disease. **Adv. Clin. Exp. Med.**, v.26, p.865-874, 2017.
- WRIGHT, J. T. et al. A randomized trial of intensive versus standard blood-pressure control. **N. Eng. J. Med.**, v.273, p.2103-2116, 2015.
- XU, Y. et al. A metabolic stress-inducible miR-34a/HNF4alpha pathway regulates lipid and lipoprotein metabolism. **Nat. Commun.**, v.6, p.7466, 2015.
- YAMAMOTO, H. MicroRNA494 regulates mitochondrial biogenesis in skeletal muscle through mitochondrial transcription factor A and Forkhead box j3. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.15; p.e1419-1427, 2012.
- YAMORI, Y. Development of the spontaneously hypertensive rat (SHR) and of various spontaneous rat models, and their implications. In: De Jong W (ed). **Handbook of Hypertension: Experimental and Genetic Models of Hypertension.**, 22439, 1984.

- YANG, M. et al. Effects of Exercise Training on PPAR β/δ Expression in Skeletal Muscle of Rats with Spontaneous Hypertension. **Med Sci Sports Exerc.**, v. 54, n. 8, p. 1309–1316, 2022.
- YEDIGARYAN, L.; SAMPAOLESI, M. Therapeutic Implications of miRNAs for Muscle-Wasting Conditions. **Cells**, v.10, p.3035, 2021.
- YING, W. ET al. Adipose tissue macrophage-derived exosomal miRNAs can modulate in vivo and in vitro insulin sensitivity. **Cell**, v.171, p.372–384, 2017.
- YUE, T. et al. Activation of peroxisome proliferator- activated receptor- alpha protects the heart from ischemia/reperfusion injury. **Circulation**, v.108, p.2393–2399, 2003.
- ZAMMIT, V. A.; NEWSHOLME, E. A. Properties of pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in relation to the direction and regulation of phosphoenolpyruvate metabolism in muscles of the frog and marine invertebrates. **The Biochemical journal**, v. 174, n. 3, p. 979–987, 1978.
- ZHANG, M. et al. MicroRNA27a regulates hepatic lipid metabolism and alleviates NAFLD via repressing FAS and SCD1. **Sci. Rep.**, v.7, p.14493, 2017.
- ZHAO, Y. et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA12. **Cell**, v.129, p.303-317, 2007.
- ZHOU, B. et al. Global epidemiology, health burden and effective interventions for elevated blood pressure and hypertension. **Nature Reviews Cardiology**, p.1-18, 2021.
- ZHUO, S. et al. MicroRNA-451 negatively regulates hepatic glucose production and glucose homeostasis by targeting glycerol kinase-mediated gluconeogenesis. **Diabetes**, v.65, p.3276–3288, 2016.
- NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Worldwide trends in hypertension prevalence and progress in treatment and control from 1990 to 2019: a pooled analysis of 1201 population-representative studies with 104 million participants. **Lancet**, v.398, p.957-980, 2021.
- ZIZOLA, C. et al. Activation of PPAR δ signaling improves skeletal muscle oxidative metabolism and endurance function in an animal model of ischemic left ventricular dysfunction. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v.308, p.H1078-H1085, 2015.
- ZIZOLA, C.; SCHULZE, P. C. Metabolic and structural impairment of skeletal muscle in heart failure. **Heart failure reviews**, v. 18, p.623–630, 2013.

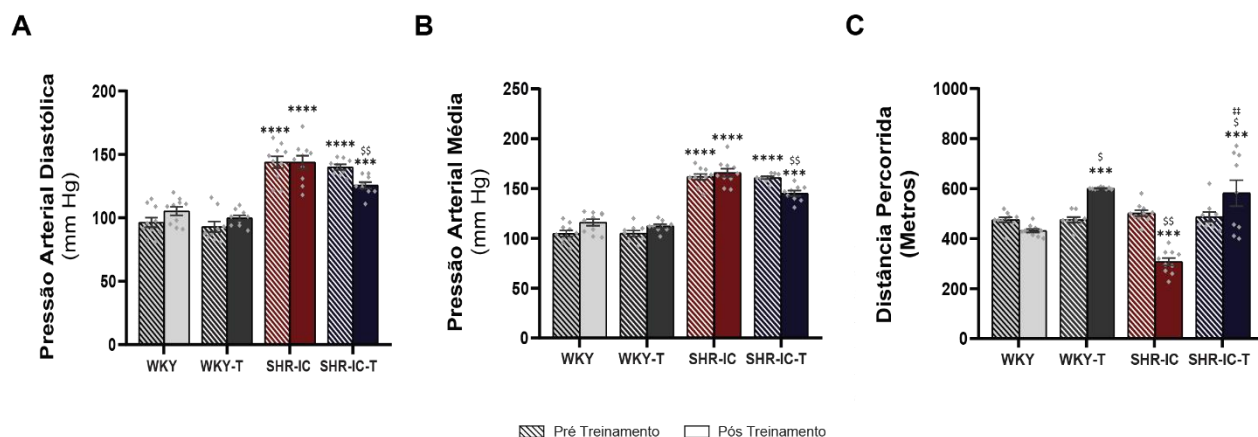


FIGURA S1 – Valores hemodinâmicos e do teste máximo. Pressão arterial diastólica (**A**); Pressão arterial média (**B**); Distância percorrida durante o teste máximo em metros (**C**). Todos os resultados representam os dados pré e pós TFA. Grupos: Wky (n=10), indica ratos Wistar Kyoto sedentários; Wky-T (n=9), Wistar Kyoto treinados; Shr-IC (n=10), ratos espontaneamente hipertensivos sedentários insuficientes cardíacos; Shr-IC-T (n=9), ratos espontaneamente hipertensivos sedentários insuficientes cardíacos treinados. Cada ponto representa uma amostra biológica. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. \$\$Pré-TFA vs Pós-TFA, $p < 0,01$; *** vs WKY, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$; †† vs SHR-IC, $p < 0,0001$.

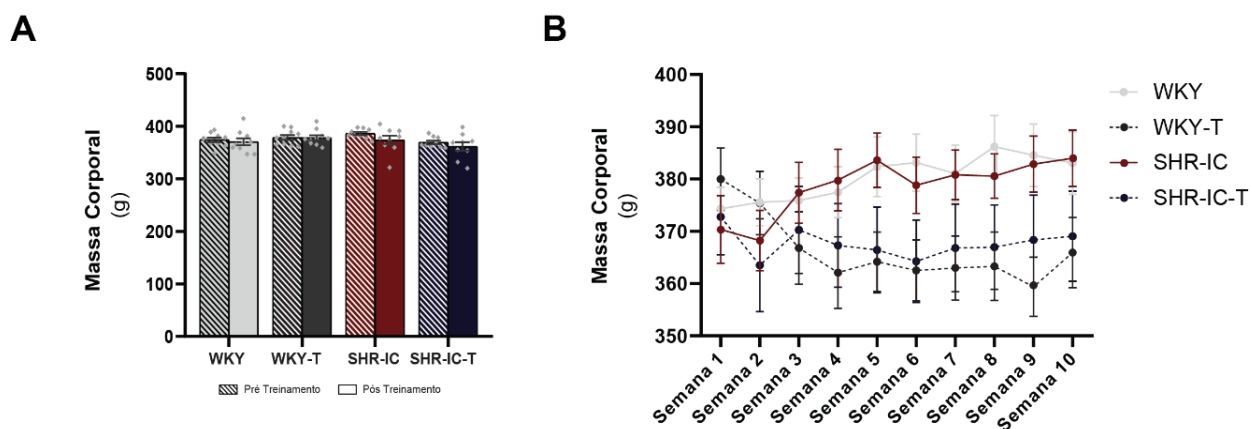


FIGURA S2 – Massa corporal em gramas **(A)**; Acompanhamento da massa corporal durante o protocolo **(B)**. Grupos: Wky (n=10), indica ratos Wistar Kyoto sedentários; Wky-T (n=9), Wistar Kyoto treinados; Shr-IC (n=10), ratos espontaneamente hipertensivos sedentários insuficientes cardíacos; Shr-IC-T (n=9), ratos espontaneamente hipertensivos sedentários insuficientes cardíacos treinados. Cada ponto representa uma amostra biológica. Os resultados estão expressos como média \pm EPM.

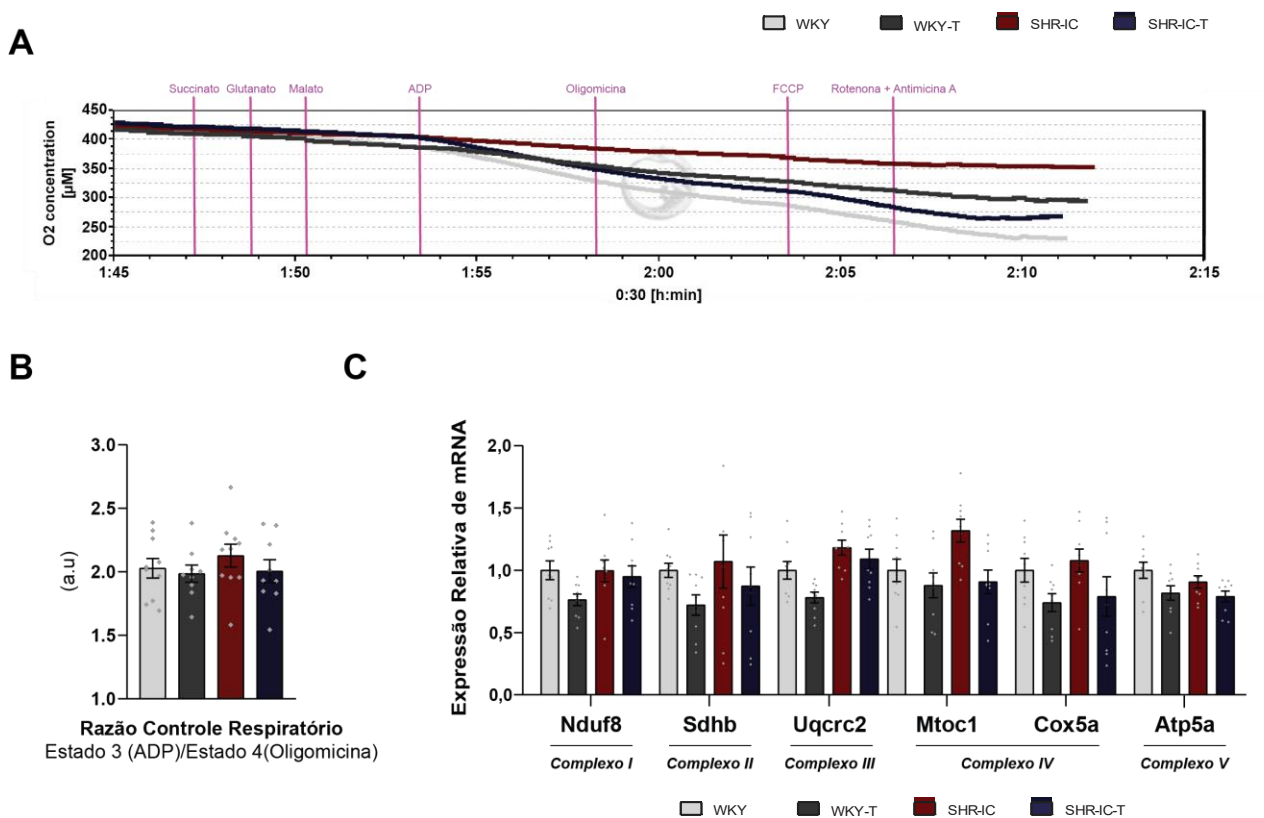


FIGURA S3 – Metabolismo do músculo esquelético. Respiração média mitocondrial na fibra isolada **(A)**; Razão controle respiratório **(B)**; Expressão de genes dos complexos mitocondriais **(C)**. Todos os resultados representam os dados pré e pós TFA. Grupos: Wky (n=10), indica ratos Wistar Kyoto sedentários; Wky-T (n=9), Wistar Kyoto treinados; Shr-IC (n=10), ratos espontaneamente hipertensivos sedentários insuficientes cardíacos; Shr-IC-T (n=9), ratos espontaneamente hipertensivos sedentários insuficientes cardíacos treinados. Cada ponto representa uma amostra biológica. Os resultados estão expressos como média \pm EPM.

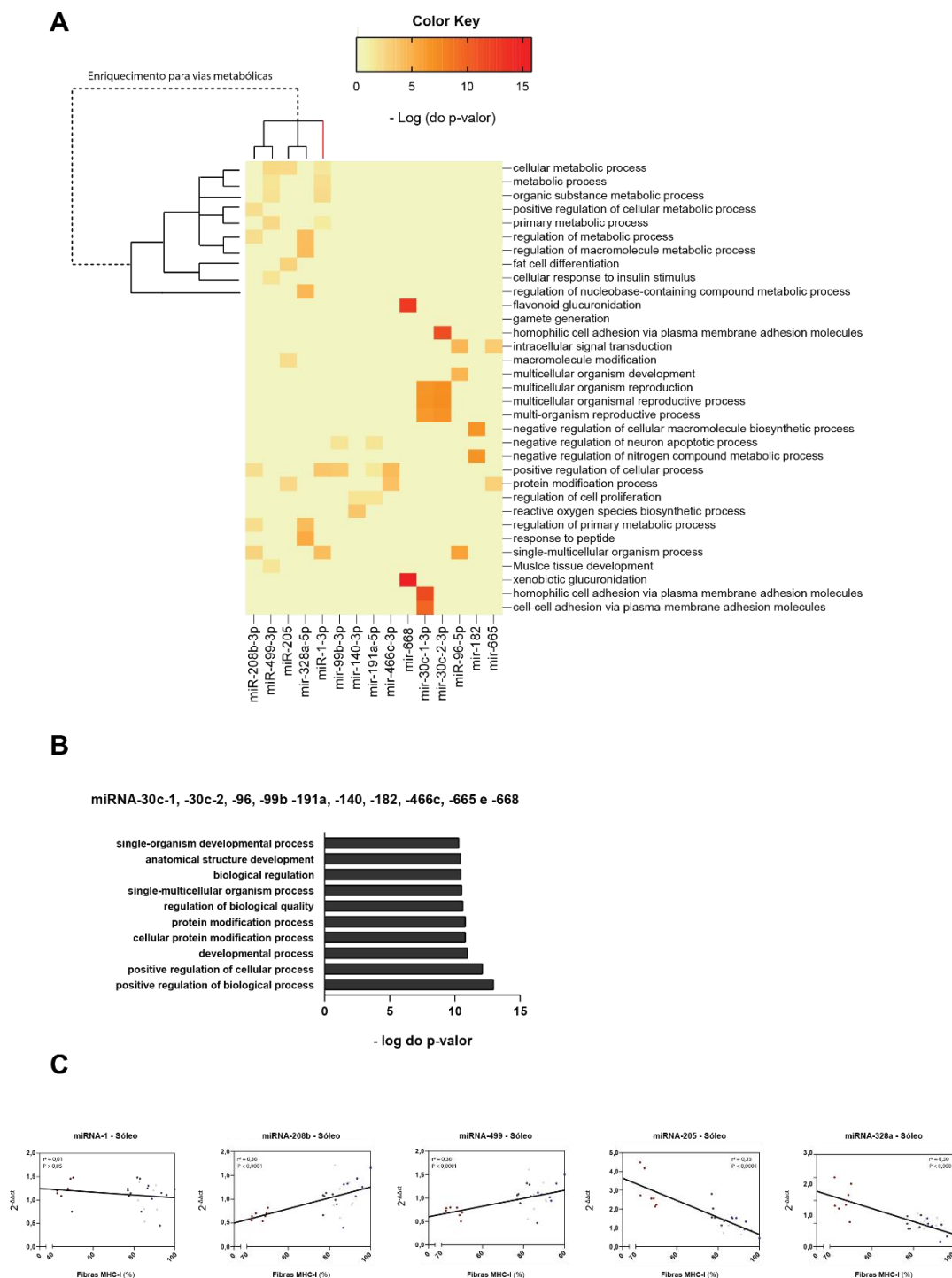


FIGURA S4 – Análises de bioinformática. Vias enriquecidas para os miRNAs diferencialmente expressos na insuficiência cardíaca e recuperados pelo treinamento físico (**A**); Vias enriquecidas para os genes alvos do cluster de miRNAs não selecionados (**B**); Correlação entre a expressão dos miRNAs e o tipo de fibra muscular (**C**).

TABELA S1 – Dados da avaliação ecocardiográfica. Grupos: Wky (n=10), indica ratos Wistar Kyoto sedentários; Wky-T (n=9), Wistar Kyoto treinados; Shr-IC (n=10), ratos espontaneamente hipertensivos sedentários insuficientes cardíacos; Shr-IC-T (n=9). Os resultados estão expressos como média \pm EPM. * vs WKY, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$; † vs SHR-IC, $p < 0,05$; ‡, $p < 0,01$; ††, $p < 0,001$.

Parametros	WKY	WKY-T	SHR-IC	SHR-IC-T
Morfologia Cardíaca				
DSVE (mm)	5,9 \pm 0,08	6,4 \pm 0,16	5,6 \pm 0,14	5,7 \pm 0,21
DDVE (mm)	9,1 \pm 0,09	9,5 \pm 0,16	8,5 \pm 0,13 *	9,0 \pm 0,08 †
Septo (mm)	1,7 \pm 0,05	1,7 \pm 0,08	2,2 \pm 0,10 ****	1,9 \pm 0,03 *†
PP (mm)	1,6 \pm 0,05	1,7 \pm 0,04	2,4 \pm 0,09 ****	1,9 \pm 0,08 *‡
ERP	0,55 \pm 0,03	0,62 \pm 0,02 *	0,81 \pm 0,07 **	0,82 \pm 0,06 ***
Função Sistólica				
DC (ml/mim)	195 \pm 4,01	209 \pm 5,50	168 \pm 6,20 *	207 \pm 8,58 ††
VSF (ml)	0,06 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01 *	0,09 \pm 0,11 *
VDF (ml)	0,26 \pm 0,01	0,27 \pm 0,02	0,38 \pm 0,01 ****	0,29 \pm 0,01 ‡
Função Diastólica				
Razão E/A	2,3 \pm 0,11	2,3 \pm 0,14	3,1 \pm 0,08 **	2,3 \pm 0,22 ‡
Onda E (cm/s)	83 \pm 2,26	81 \pm 2,79	64 \pm 3,86 ****	59 \pm 2,50 **
Onda A (cm/s)	37 \pm 2,55	36 \pm 1,48	21 \pm 1,06 ****	26 \pm 3,68 *
TD onda E (m/s)	25 \pm 1,99	34 \pm 3,67 *	16 \pm 1,16 *	24 \pm 1,86 †
TE (m/s)	78 \pm 1,43	78 \pm 0,80	73 \pm 0,95 *	81 \pm 1,62 ††
TRIV (m/s)	26 \pm 1,90	28 \pm 1,11	43 \pm 2,28 ****	36 \pm 2,01 **‡
TCIV (m/s)	17 \pm 0,80	14 \pm 0,47 *	17 \pm 1,15	16 \pm 0,38
Função Global				
IPM	0,56 \pm 0,02	0,55 \pm 0,02	0,75 \pm 0,04 ***	0,65 \pm 0,04

TABELA S2 – Classificação das 50 vias enriquecidas para os genes alvos dos miRNAs-1-3p, -30c-1-3p, -30c-2-3p, -96-5p, -99b-3p, -140-3p, -191a-5p, -182, -205, -208b-3p, -328a-5p, -466-3p, -499-3p, -665, -667-5p.

#	Gene Ontology Enrichment Analysis performed	Gene Ontology	Gene Count	%	P-Value
1	positive regulation of biological process	GO:0048518	590	33,5	8,40E-16
2	positive regulation of cellular process	GO:0048522	540	30,7	2,40E-14
3	developmental process	GO:0032502	630	35,8	2,50E-14
4	single-multicellular organism process	GO:0044707	644	36,6	3,10E-14
5	anatomical structure development	GO:0048856	613	34,8	3,70E-14
6	system development	GO:0048731	520	29,6	9,60E-14
7	cellular protein modification process	GO:0006464	414	23,5	1,50E-13
8	protein modification process	GO:0036211	414	23,5	1,50E-13
9	single-organism developmental process	GO:0044767	616	35	1,80E-13
10	multicellular organism development	GO:0007275	557	31,7	2,50E-13
11	regulation of cellular metabolic process	GO:0031323	581	33	2,30E-12
12	regulation of metabolic process	GO:0019222	609	34,6	2,40E-12
13	anatomical structure morphogenesis	GO:0009653	330	18,8	2,60E-12
14	macromolecule modification	GO:0043412	423	24	7,30E-12
15	regulation of primary metabolic process	GO:0080090	572	32,5	9,10E-12
16	positive regulation of metabolic process	GO:0009893	357	20,3	1,20E-11
17	regulation of biological quality	GO:0065008	398	22,6	1,40E-11
18	positive regulation of cellular metabolic process	GO:0031325	337	19,2	2,30E-11
19	cellular metabolic process	GO:0044237	945	53,7	2,30E-11
20	localization	GO:0051179	592	33,7	5,30E-11
21	regulation of macromolecule metabolic process	GO:0060255	566	32,2	9,50E-11
22	positive regulation of macromolecule metabolic process	GO:0010604	330	18,8	2,60E-10
23	animal organ development	GO:0048513	400	22,7	3,20E-10
24	nervous system development	GO:0007399	285	16,2	3,90E-10
25	cellular component organization	GO:0016043	607	34,5	5,20E-10
26	metabolic process	GO:0008152	1017	57,8	7,10E-10
27	organic substance metabolic process	GO:0071704	975	55,4	2,00E-09
28	cardiovascular system development	GO:0072358	145	8,2	2,50E-09
29	circulatory system development	GO:0072359	145	8,2	2,50E-09
30	vacuolar transport	GO:0007034	54	3,1	2,90E-09
31	cellular macromolecule metabolic process	GO:0044260	780	44,3	3,00E-09
32	protein ubiquitination	GO:0016567	104	5,9	3,70E-09
33	head development	GO:0060322	129	7,3	4,10E-09
34	central nervous system development	GO:0007417	148	8,4	4,80E-09
35	establishment of localization	GO:0051234	474	26,9	4,80E-09
36	positive regulation of RNA metabolic process	GO:0051254	184	10,5	6,80E-09
37	cell projection organization	GO:0030030	185	10,5	6,90E-09
38	positive regulation of nitrogen compound metabolic process	GO:0051173	221	12,6	8,90E-09
39	regulation of developmental process	GO:0050793	270	15,3	9,00E-09
40	cellular component organization or biogenesis	GO:0071840	615	35	9,70E-09
41	positive regulation of nucleobase-containing comp. met. processes	GO:0045935	208	11,8	1,20E-08
42	cellular protein metabolic process	GO:0044267	505	28,7	1,30E-08
43	vesicle-mediated transport	GO:0016192	157	8,9	1,50E-08
44	regulation of cellular component organization	GO:0051128	279	15,9	1,80E-08
45	brain development	GO:0007420	122	6,9	1,80E-08
46	transport	GO:0006810	456	25,9	2,00E-08
47	primary metabolic process	GO:0044238	928	52,8	2,00E-08
48	positive regulation of molecular function	GO:0044093	199	11,3	2,60E-08
49	tissue development	GO:0009888	224	12,7	2,70E-08
50	positive regulation of catalytic activity	GO:0043085	167	9,5	2,90E-08

TABELA S3 – Classificação das 10 vias enriquecidas ranqueada pelo número de genes alvos envolvidos com o miRNA-1.

Gene Ontology Enrichment Analysis performed	Gene Ontology	Gene Count	%	P-Value
rno-mir-1-3p				
single-organism process	GO:0044699	140	77	1,70E-02
biological regulation	GO:0022610	124	68	1,90E-02
cellular macromolecule metabolic process	GO:0044260	122	67	4,20E-03
macromolecule metabolic process	GO:0043170	116	64	1,30E-02
metabolic process	GO:0008152	113	62	1,00E-02
organic substance metabolic process	GO:0071704	104	57	6,30E-03
cellular metabolic process	GO:0044237	101	56	3,70E-02
primary metabolic process	GO:0044238	100	55	5,70E-02
regulation of cellular process	GO:0050794	89	49	8,60E-03
regulation of biological process	GO:0050789	83	46	6,50E-03

TABELA S4 – Consumo de oxigênio (VO₂) máximo e dados clínicos dos voluntários.

	Controle (n = 10)	IC (n = 10)	IC-TR (n = 10)	P
Características Físicas				
Idade (anos)	55 ± 2	57 ± 3	57 ± 2	0,83
Massa corporal (kg)	69 ± 3	72 ± 4	76 ± 6	0,79
IMC (kg/m ²)	25 ± 1	29 ± 2	28 ± 1	0,63
Sexo				
Homens (n)	6	6	7	0,23
Mulheres (n)	4	4	3	
Teste de esforço máximo				
VO ₂ máximo	28 ± 2	16 ± 4	19 ± 3	<0,0001
Classe funcional				
NYHA-II (n)	-	9	8	0,58
NYHA-III (n)	-	1	2	
Etiologia da IC				
Isquêmica (n)	-	6	4	0,25
Hipertensiva (n)	-	2	2	
Idiopática (n)	-	1	3	
Chagástica (n)	-	1	1	
Medicamentos				
Betabloqueadores (n)	-	10	9	1
ACEI/ARB (n)	-	10	9	1
Espironolactona (n)	-	10	10	0,36
Diuréticos (n)	-	9	10	0,31
Estatinas (n)	-	6	5	0,67
AAS (n)	-	6	5	0,31
Digoxin (n)	-	1	3	0,37
Hipoglicemiantes (n)	-	3	2	0,72
Comorbidades				
Diabetes (n)	-	3	2	0,72
Dislipidemia (n)	-	6	6	0,9
Hipertensão (n)	-	8	9	0,69
Parâmetros Hemodinâmicos				
FEVE (%)	58 ± 1	25 ± 1	26 ± 2	<0,05
FC (BPM)	64 ± 7	68 ± 3	65 ± 2	0,92
PAS (mmHg)	120 ± 2	121 ± 4	121 ± 6	0,99

ANEXO A – Parecer de aprovação do CEUA (Comissão de Ética no Uso de animais) da Escola de Educação Física e Esportes da Universidade de São Paulo EEFE/USP.



São Paulo, 09 de junho de 2020.

CERTIFICAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada “Papel do eixo regulados microRNA-2-5/PPAR β na miopatia muscular esquelética induzida pela insuficiência cardíaca: efeito do treinamento físico aeróbico”, registrada com o número 2020/01 sobre a responsabilidade do Prof. Dr. Tiago Fernandes e do aluno Bruno Rocha Avila Pelozin – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6899, de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO(A) EEFE-USP, em reunião de 03/07/2018.

Finalidade () Ensino (X) Pesquisa Científica

Vigência da autorização:

Espécie/linhagem/raça: SHR (spontaneously hipertensive Rats) Wistar Kyoto)

Nº de animais: 40 de cada linhagem

Peso/Idade: 300-500g/3-12 meses

Sexo: Macho

Origem: Biotério Central da USP

Reiteramos a importância de apresentar Relatório Parcial na metade do projeto e Relatório Final ao término da vigência do projeto. Lembramos ainda que qualquer alteração no projeto inicial deve ser comunicada à CEUA, incluindo alteração no número de animais utilizados, bem como a origem dos referidos animais.



Prof. Dr. Guilherme Giannini Artioli
Coordenador da CEUA
EEFE-USP

Ao Prof. Dr. Tiago Fernandes
Docente EEFE-USP

Av. Professor Mello Moraes, 65
CEP 05508-900 | São Paulo - SP | Brasil
55 11 3091-3077 | www.eefe.usp.br