

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE**

**PAPEL DO microRNA-146a E SEU GENE ALVO VASORINA NO
REMODELAMENTO DA ARTÉRIA CARÓTIDA APÓS LESÃO POR CATETER
BALÃO: EFEITO TERAPÊUTICO DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBICO**

Noemy Pinto Pereira

SÃO PAULO

2020

Noemy Pinto Pereira

**PAPEL DO microRNA-146a E SEU GENE ALVO VASORINA NO
REMODELAMENTO DA ARTÉRIA CARÓTIDA APÓS LESÃO POR CATETER
BALÃO: EFEITO TERAPÊUTICO DO TREINAMENTO FÍSICO AERÓBICO
VERSÃO CORRIGIDA**

Dissertação entregue á Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Mestre em ciências.

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Edilamar Menezes de Oliveira.

Coorientador: Prof^o DR. Tiago Fernandes.

São Paulo

2020

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

Pereira, Noemy Pinto

Papel do microRNA-146a e seu gene alvo vasorina no remodelamento da artéria carótida após lesão por cateter balão: efeito terapêutico do treinamento físico aeróbico / Noemy Pinto
Pereira. – São Paulo : [s.n.], 2019.

87p.

Dissertação (Mestrado) - -Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo.

Orientadora: Profa. Dra. Edilamar Menezes de Oliveira

1. Treinamento físico I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: Pereira, Noemy

Título: Papel do microrna-146a e seu gene alvo vasorina no remodelamento da artéria carótida após lesão por cateter balão: efeito terapêutico do treinamento físico aeróbico

Dissertação entregue á Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Mestre em ciências.

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Edilamar Menezes de Oliveira.

Coorientador: Prof^o Dr. Tiago Fernandes.

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

- À minha orientadora Profa. Dr^a. Edilamar Menezes de Oliveira, não só pela orientação, mas pela oportunidade de aprendizagem, pela compreensão, paciência e por estar ao meu lado nessa caminhada.
- Ao meu coorientador Prof. Dr. Tiago Fernandes pela aprendizagem, paciência e acima de tudo a amizade, sou grata por toda a vida.
- À Dr^a. Fernanda Roque Redondo pela aprendizagem, por ajudar mesmo de longe, pela compreensão e amizade.
- Aos meus colegas do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Exercício e do Laboratório de Fisiologia Molecular do Exercício, EEFE – USP, em especial ao Ney Robson (por tudo que faz pelos alunos e pela amizade).
- Ao meu colaborador M. Ian Phillips, PhD, DSc, FAHA, Norris Professor of Applied Life Sciences, Keck Graduate Institute in Claremont, California.
- À minha família pelo apoio, em especial à minha irmã Andressa Pereira, pelo companheirismo, amor e por ser a melhor irmã do mundo.
- Ao meu pai que me apoiou e acreditou em mim e infelizmente não conseguiu me acompanhar até o final dessa jornada.
- Á minha mãe guerreira, que lutou em cima de uma máquina de costura para dar as filhas uma oportunidade de estudar.
- Á todos os meus amigos, em especial à Aline Vasques, Philippe Blanco e toda sua família (pela atenção e carinho), Janaína e Wellington.
- À Deus, que me proporciona tudo nessa vida.
- Á FAPESP/ SPRINT - (2014/50673-4 – “A new therapeutic approach to arterial repair and regeneration by exercise training and microRNAs targeted to Vasorin”). EEFE-USP e Keck Graduate Institute, Claremont, Califórnia. EUA. Colaboração com Prof Dr. Ian Phillips, onde realizamos todas as imagens de Confocal apresentados nesta dissertação. Pelo apoio financeiro.
- Projeto financiado pela chamada MCTI-CNPq – No. 18/2015. Programa de Cooperação com Centro Internacional para Engenharia Genética e Biotecnologia. Brasil-Itália. Processo: 405264/2015-1. Colaboração com Prof. Dr. Mauro Giacca.
- À FAPESP (2016/26156-5), CNPq e CAPES pelo suporte financeiro.

RESUMO

A reestenose é uma resposta fibroproliferativa que acontece na parede dos vasos após uma lesão mecânica, geralmente seguida do procedimento de angioplastia, ocasionando obstrução vascular. O remodelamento do vaso, causado pela lesão mecânica, ocasiona proliferação, crescimento e migração das células do músculo liso vascular (CMLV, do inglês *Vascular Smooth Muscles Cells*) da camada média para a camada íntima, acompanhado por fibrose, acarretando neoíntima e estreitamento do lúmen vascular.

O papel dos microRNAs (miRNAs) vêm sendo amplamente estudados na lesão vascular, haja vista que apresentam um grande potencial terapêutico para o tratamento de doenças. O miRNA-146a tem ganhado destaque nas doenças fibroproliferativa, uma vez que este regula genes alvos envolvidos no remodelamento vascular. O treinamento físico (TF) apresenta-se como um importante modulador da expressão de miRNAs, sendo considerado uma terapia não farmacológica para o tratamento de doenças cardiovasculares (DCVs) pela sua capacidade de induzir diversas adaptações benéficas.

Diante desse cenário, nosso objetivo foi avaliar a linha temporal da reestenose e verificar o papel terapêutico do TF aeróbico na regressão da formação da neoíntima, diminuindo a expressão do miRNA-146a e aumentando a expressão de seu alvo vasorina (VASN) no controle da reestenose e também avaliar mecanismos moleculares relacionados com o aumento da neoíntima vascular como: TGF- β (*Transforming Growth Factor Beta*), PCNA (índice de proliferação do inglês *Proliferating Cell Nuclear Antigen*), ADAM-17 (metaloprotease 17), NF- κ B (*Nuclear Factor Kappa Beta*) e KLF4 (Krüppel-Like Factor 4).

Para isso, utilizamos um protocolo de TF aeróbico (natação) de moderada intensidade, com quatro grupos experimentais de ratos *Wistar*: lesionado com cateter balão treinado (LT), *sham* treinado (ST) e seus respectivos controles lesionado sedentário (LS) e Sham sedentário (SS).

Foi possível observar que a um aumento na capacidade física dos animais que passaram pelo protocolo de TF de natação, assim como uma manutenção da massa corporal e da pressão arterial sistólica e média. Também foi possível observar que o TF foi capaz de prevenir a formação exacerbada de neoíntima vascular e capaz de manter o diâmetro do lúmen.

Em relação aos mecanismos moleculares envolvidos na prevenção da neoíntima foi observado que o TF aeróbico modula o miRNA 146a, onde houve uma redução do mesmo. Observamos que houve um aumento da expressão gênica e proteica da VASN. Isso nos leva a entender que o TF foi capaz de prevenir a reestenose por meio do aumento da expressão da VASN que por sua vez inibe diretamente a ativação da cascata inflamatória que começa com ativação do TGF- β e que ativa diversas citocinas inflamatórias. Tornando viável o TF aeróbico para a prevenção de exacerbada formação de neoíntima vascular.

Palavras chaves: Lesão por cateter balão; TF aeróbico; microRNA; Vasorina; Reestenose.

ABSTRACT

Restenosis is a fibroproliferative response that occurs on the vessel wall after a mechanical injury, usually followed by the angioplasty procedure, causing vascular obstruction. The remodeling of the vessel, caused by mechanical injury, causes proliferation, growth, and migration of vascular smooth muscle cells from the media layer to the intima layer, accompanied by fibrosis, causing neointima and narrowing of the lumen vascular.

In this type of vascular injury microRNAs (miRNAs) have been widely studied as biomarkers and gene therapy, opening therapeutic perspectives for the treatment of fibroproliferative diseases where the decrease in the expression of miR-146a is a highlight in this type of disease. The miRNA expression can be modulated by exercise training (ET), and it has been studied as non-pharmacological therapy for cardiovascular diseases, promoting several adaptations.

Therefore, our aim was to evaluate the restenosis timeline and verify the therapeutic role of aerobic ET in the regression of neointima formation, decreasing the expression of miRNA-146a and increasing the expression of its vasorin target (VASN) in the control of restenosis and also evaluate molecular mechanisms related to the increase in vascular neointima such as: TGF- β (Transforming Growth Factor Beta), PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen proliferation index), ADAM-17 (metalloprotease 17), NF- κ B (Nuclear Kappa Factor Beta) and KLF4 (Krüppel-Like Factor 4).

For this, we used an aerobic ET protocol (swimming) of moderate intensity, with four experimental groups of Wistar rats: injured with balloon catheter and trained (LT), trained sham (ST) and their respective controls, injured with balloon catheter and sedentary (LS) and sedentary Sham (SS).

It was possible to observe that there was an increase in the physical capacity of the animals that went through the swimming ET protocol, as well as a maintenance of body mass and systolic and mean arterial pressure. It was also possible to observe that the ET was able to prevent the exacerbated formation of vascular neointima and capable of maintaining the diameter of the lumen.

Regarding the molecular mechanisms involved in the prevention of neointima, it was observed that aerobic ET modulates miRNA 146a, where there was a reduction in it. We observed that there was an increase in VASN gene and protein expression. This leads us to understand that ET was able to prevent restenosis by increasing the expression of VASN, which in turn directly inhibits the activation of the inflammatory pathways that begins with TGF- β activation and which activates several inflammatory cytokines. Making aerobic ET viable for the prevention of exacerbated formation of vascular neointima.

Keywords: Balloon Catheter injury; Aerobic Exercise Training; microRNA; Vasorin; Restenosis.

Lista de ilustrações

Figura 1- Representação da angioplastia por cateter balão:	20
Figura 2- Biogêneses dos miRNAs e seu mecanismo de ação, (AMBROS, 2004).	25
Figura 3- Desenho experimental para o estudo 1.....	28
Figura 4- Desenho experimental do Estudo 2.....	29
Figura 5. Passo a passo da cirurgia de lesão por cateter balão.	30
Figura 6- Protocolo de Treinamento Físico (Natação).....	32
Figura 7- Morfologia da Artéria Carótida Comum lesionada (esquerda), mostrando formação de neoíntima.....	38
Figura 8- Imagem representativa das medidas morfológicas da Artéria Carótida.	38
Figura 9- Formação da camada neoíntima.	39
Figura 10- Área total da camada média.	40
Figura 11- Diâmetro do lúmen.	41
Figura 12- Curso de formação da neoíntima.	41
Figura 13- Curso de formação da neoíntima.	42
Figura 14- Expressão do miR-146a em porcentagem.	43
Figura 15- Expressão do gene VASN normalizado pelo GAPDH expresso em porcentagem, na artéria carótida esquerda.....	44
Figura 16- Expressão do TGF- β normalizado pelo GAPDH expresso em porcentagem, na artéria carótida esquerda.	45
Figura 17- Massa Corporal dos animais.....	46
Figura 18- PA sistólica e PA média.....	48
Figura 19- Frequência Cardíaca.....	49
Figura 20- Teste de esforço físico máximo	50
Figura 21- Peso do tecido cardíaco (VE - Ventrículo Esquerdo, VD - Ventrículo Direito e Átrio)	51
Figura 22- Peso do tecido muscular esquelético.....	52
Figura 23- Atividade da enzima citrato sintase (%).....	52
Figura 24- Formação da camada neoíntima	53
Figura 25- Camada média	54
Figura 26- Diâmetro do Lúmen	55
Figura 27- Expressão do miRNA 146a da Artéria Carótida Esquerda (ACE) por RT-PCR	56
Figura 28- Expressão do mRNA VASN da Artéria Carótida Esquerda (ACE) por RT-PCR	57
Figura 29- Expressão do mRNA Adam-17 da Artéria Carótida Esquerda (ACE) por RT-PCR	57
Figura 30- Expressão do mRNA TGF- β da Artéria Carótida Esquerda (ACE) por RT-PCR	58
Figura 31- Expressão do mRNA NF- κ B da Artéria Carótida Esquerda (ACE) por RT-PCR.....	59
Figura 32- Expressão do mRNA KLF4 da Artéria Carótida Esquerda (ACE) por RT-PCR	59
Figura 33- Expressão do mRNA PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) da Artéria Carótida Esquerda (ACE) por RT-PCR	60
Figura 34- Expressão Proteica da VASN Artéria Carótida Esquerda por WB.....	61
Figura 35- Via de sinalização e conclusão do estudo.....	70

Lista de abreviaturas

Ang II – Angiotensina II
ACC – Artéria Carótida Comum
ACI – Artéria Carótida Interna
ACE – Artéria Carótida Externa
CE - Células Endoteliais
CMLV – Células do Músculo Liso Vascular
DCVs – Doenças Cardiovasculares
ET-1 – Endotelina 1
EGF - *Epidermal Growth Factor*
eNOS – Óxido Nítrico Sintase
HE - Hematoxilina-Eosina
HDL – Lipoproteína de Alta Densidade
IFN- γ – Interferon Gama
IRAK1- Interleucina 1- receptor associado a quinase 1
IL – Interleucina
Jab 1 – *Jagged1*
KLF - Krüppel-Like Factor
LDL - Lipoproteína de Baixa Densidade
LEI – Lâmina Elástica Interna
LEE – Lâmina Elástica Externa
MCP1 - Monócito Quimioatrativo de Proteína 1
MEC - Matriz Extracelular
MMPs - Metaloproteinases de Matriz
miRNAs - microRNAs
NO - Nitric Oxide
NF- $\kappa\beta$ - Nuclear Factor Kappa Beta
Notch2 – Neurogenic Locus Notch Homolog Protein
OMS – Organização Mundial da Saúde
PCNA - antígeno nuclear de proliferação celular do inglês *Proliferating Cell Nuclear Antigen*
PDGF - Platelet-Derived Growth Factor
RRL – Repetições Ricas em Leucina
SHR – Rato espontaneamente hipertenso - *Spontaneously Hypertensive Rat*
TGF- β - Transforming Growth Factor Beta
Th – T hepper
TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa
TRAF6 – TNF receptor associado ao fator 6
VCAM1 – Proteína 1 de Adesão Celular Vascular
VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VASN – VASORINA do inglês *vasorin*

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. JUSTIFICATIVA.....	13
3. OBJETIVOS	13
3.1. <i>Objetivo geral.....</i>	13
3.2. <i>Objetivos específicos.....</i>	14
4. REVISÃO DE LITERATURA	15
4.1. <i>Endotélio vascular.....</i>	15
4.2. <i>Células do Músculo Liso Vascular</i>	16
4.3. <i>Aterosclerose.....</i>	17
4.4. <i>Angioplastia</i>	19
4.5. <i>Reestenose</i>	20
4.6. <i>Treinamento Físico e Reestenose.....</i>	22
4.7. <i>microRNAs.....</i>	23
4.8. <i>Biogênese e mecanismo de ação dos miRNAs.....</i>	24
4.9. <i>miRNA-146a, treinamento físico e doenças vasculares</i>	25
4.11. <i>VASN</i>	27
5. MATERIAL E MÉTODOS	28
5.1. <i>Amostra</i>	28
5.2. <i>Protocolo e desenho experimental.....</i>	28
5.3. <i>Lesão arterial por cateter balão</i>	29
5.3.1. <i>Caracterização da lesão por cateter balão - Estudo 1.....</i>	31
5.4. <i>Protocolo de treinamento físico aeróbico</i>	31
5.5. <i>Medida indireta da pressão arterial e frequência cardíaca.....</i>	32
5.6. <i>Avaliação do esforço físico máximo</i>	32
5.7. <i>Eutanásia e coleta do tecido</i>	33
5.8. <i>Avaliação morfológica vascular.....</i>	33
5.8. <i>Extração de RNA total.....</i>	33
5.9. <i>Síntese de cDNA para miRNAs.....</i>	34
5.10. <i>Reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR) para expressão de miRNAs</i>	34
5.11. <i>Expressão gênica do gene alvo (VASN) do miRNA-146a</i>	34
5.11.1. <i>Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) para análise da expressão gênica</i>	35
5.12. <i>Atividade da enzima citrato sintase.....</i>	35
5.13. <i>Análise da expressão de proteínas por Western Blotting.....</i>	36
5.14. <i>Análise estatística</i>	37
6. RESULTADOS DO ESTUDO 1.....	37
6.1. <i>Morfologia das artérias carótidas ao longo do tempo</i>	37
6.2. <i>Expressão de miRNAs.....</i>	42
6.3. <i>Expressão gênica</i>	43
7. RESULTADOS DO ESTUDO 2	45
7.1 <i>Massa Corporal</i>	45
7.2 <i>Pressão Arterial</i>	46
7.3 <i>Frequência Cardíaca</i>	48
7.4 <i>Teste de Esforço Físico Máximo.....</i>	49
7.5 <i>Peso dos Tecidos.....</i>	50
7.6 <i>Atividade da Enzima Citrato Sintase</i>	52
7.7 <i>Morfologia das artérias carótidas</i>	53
7.7.1 <i>Formação da neointima</i>	53

7.7.2 Área da Média.....	53
7.7.3 Diâmetro do Lúmen.....	55
7.8 miRNA-146a e genes alvos - Reestenose.....	56
7.9 Quantificação da proteína VASN na Reestenose.....	60
8. DISCUSSÃO	61
8.1. ESTUDO 1.....	62
8.1. Caracterização da reestenose por cateter balão (estudo 1).....	62
8.1.1. Expressão do miRNA-146a, VASN e TGF- β na artéria lesionada (estudo 1).....	63
8.2. ESTUDO 2.....	65
8.2.1. Marcadores do treinamento físico aeróbico sobre as respostas hemodinâmicas.....	65
8.2.2. Teste de esforço físico máximo.....	65
8.2.3. Pressão Arterial e Frequência Cardíaca.....	66
8.2.4 Morfologia das artérias carótidas e formação da neoíntima.....	67
8.2.5 Expressão do miRNA-146a e expressão gênica.....	68
9. CONCLUSÃO.....	71
10. PERSPECTIVAS.....	71
11. LIMITAÇÕES	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
12. ATIVIDADES REALIZADAS	84
12.1. Disciplinas cursadas (Anexo 1 - Ficha do Aluno).....	84
12.2. Atividades acadêmicas, eventos científicos e publicações.....	86
12.3. Eventos científicos:.....	86
12.4. Artigos científicos e capítulos de livro:.....	87

1. INTRODUÇÃO

A reestenose é uma resposta proliferativa que ocorre na parede dos vasos após uma lesão mecânica. É uma complicação comum pós-procedimentos de angioplastia, na qual é introduzido um *stent*, ou ocasionada por outras intervenções mecânicas diretamente nas artérias ou veias. Cerca de 30 a 60% dos pacientes desenvolvem a reestenose após alguns meses da angioplastia de cateter balão (BAUTERS, ISNER, 1997; ABURAHMA et al., 2009).

O modelo de lesão por cateter balão é um modelo para o estudo, em animais, da lesão mecânica causada na parede vascular onde gera aumento da proliferação, crescimento e migração das células do músculo liso vascular (CMLVs) da camada média para a camada íntima. Além disso, ocorre um aumento da formação e degradação de matriz extracelular (MECs) no local lesionado, o que favorece a aceleração do ciclo celular. Desta forma, ocorre um aumento exacerbado da camada íntima, tornando a reestenose um processo fibroproliferativo, que produz um estreitamento do lúmen do vaso (ZHANG, YANG, JENNINGS, 2004; KRIEGER, 2008).

Devido a lesão mecânica causada pelo cateter ocorre um remodelamento do vaso e como isso ocorre diversas alterações hemodinâmicas e moleculares nas CMLV, as quais alteram o perfil contrátil característico para um perfil mais sintético. Esse perfil sintético das CMLV é caracterizado pelo aumento de mediadores pró-inflamatórios e da proliferação celular, o que pode aumentar o risco de reestenose (SANSBURY, SPITE, 2016; HO et al., 2010).

A lesão por cateter balão em animais experimentais é um modelo experimental robusto que favorece o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na reestenose, assim como TGF- β (*Transforming Growth Factor Beta*), NF- κ B (*Nuclear Factor Kappa Beta*) entre outros fatores. Dentre esses mecanismos, pode ser destacado o papel dos microRNAs (miRNAs), uma vez que os miRNA apresentam um papel importante no remodelamento vascular (SAMANTA et al., 2016; POLIMENI, DE ROSA, INDOLFI, 2013; GARERI, DE ROSA, INDOLFI, 2016).

O treinamento físico (TF) é considerado uma ferramenta não farmacológica para o tratamento de doenças cardiovasculares (DCVs), além de ser um importante modulador dos miRNAs. Nosso laboratório demonstrou que a expressão do miRNA-146a está aumentada em aorta de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), e quando submetidos ao TF aeróbico, a expressão deste miRNA diminuiu (dados não publicados). Diante disto, verificamos que um dos genes alvo do miRNA-146a é a proteína de membrana vasorina (VASN). A VASN desempenha um papel fundamental na inibição da formação de neointima, pois regula negativamente a citocina inflamatória, TGF- β . Portanto, uma vez aumentada, a VASN diminui fatores inflamatórios, contribuindo para a inibição da formação de

neoíntima (WU et al., 2014; MALAPEIRA et al., 2010; IKEDA et al., 2004; FERNANDES et al., 2015; DABEK et al., 2006; BOBIK, 2006).

Assim, avaliar se o TF aeróbico altera a expressão do miRNA-146a e da VASN na artéria carótida de ratos lesionados com cateter balão, bem como analisar se um dos mecanismos de reparo dos vasos lesionados ocorre por meio da interação entre VASN e a via TGF- β , ajudará a entender os mecanismos moleculares ainda não compreendidos, trazendo grandes contribuições para a comunidade científica.

2. JUSTIFICATIVA

As DCVs são consideradas um grave problema de saúde pública, as quais são responsáveis por 29,4% de todas as mortes registradas em nosso país em um ano (OPAS/OMS, 2017; GOMES, 2011) e por grande ônus aos cofres públicos. Dentro dessa classificação de doenças encontram-se as doenças estenosantes (que causam diminuição do lúmen do vaso). Cerca de 20% dos pacientes acometidos por ataque isquêmico tem estenose com uma diminuição de aproximadamente 70% do lúmen do vaso (BALLOTTA et al., 2007), sendo que, de 30 a 60% dos pacientes que passam por angioplastia são acometidos pela reestenose (BAUTERS, ISNER, 1997; ABURAHMA et al., 2009).

Considerando os fatos, o estudo se justifica devido a importância da utilização do TF aeróbico tanto para prevenção quanto tratamento (não farmacológico) das desordens cardiovasculares. Isto, por sua vez, contribui para um aumento na qualidade de vida e sobrevida dos pacientes, bem como, para uma redução nos gastos públicos.

Embora sejam crescentes os estudos, pouco se sabe sobre o papel dos miRNAs sobre a reestenose, ou quais os mecanismos moleculares que permeiam a interação entre eles. Assim, o entendimento dos mecanismos e vias de sinalização induzidas pelo TF e o seu papel sobre a expressão de miRNAs nas CMLV de ratos submetidos a lesão da carótica por cateter balão, poderá elucidar grandes eventos associados a este quadro patológico contribuindo para o tratamento do dano vascular.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo geral desse estudo foi de avaliar a linha temporal da reestenose em ratos *Wistar* lesionados com cateter balão e verificar o papel terapêutico do TF aeróbico na regressão da hiperplasia da neoíntima em artéria carótida esquerda, diminuindo a expressão do miRNA-146a e aumentando a expressão de seu alvo VASN no controle da reestenose.

3.2. Objetivos específicos

De forma específica, esse estudo avaliará o efeito da lesão por cateter balão na artéria carótida e o papel do treinamento aeróbico por natação em ratos *Wistar*:

1. No comportamento da pressão arterial e frequência cardíaca por plestismografia de cauda;
2. Na capacidade de realização no teste de esforço físico máximo;
3. No aumento da atividade da enzima citrato sintase;
4. Na espessura das camadas íntima, adventícia e média na artéria carótida por histologia pela técnica hematoxilina e eosina.
5. Na expressão do miRNA-146a, do gene VASN, TGF- β , PCNA, NF- $\kappa\beta$, Adam-17 e KLF4 através de PCR em tempo real e da expressão da proteína VASN por meio de *Western Blotting*.

4. REVISÃO DE LITERATURA

As DCVs são todas aquelas que afetam o coração e/ou vasos sanguíneos, dentre elas, a doença arterial (doença arterial coronariana, doença isquêmica, doença arterial periférica). Há quinze anos estas doenças lideram o índice de mortalidade mundial, sendo que, em 2016, foram responsáveis por 31% das mortes globais. Segundo estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS), até 2030, estas doenças continuarão sendo a principal causa de morte. A alta incidência desse grupo de doenças dá-se devido à diversos fatores, incluindo: fatores de riscos (alcooolismo, tabagismo, sedentarismo e obesidade); fatores genéticos e fatores patológicos (diabetes *mellitus*, síndrome metabólica, hipertensão). Corroborando com estes fatores, o aumento do consumo de sódio e má alimentação da população, propicia o desenvolvimento de DCVs, principalmente relacionadas à aterosclerose, em decorrência do alto consumo de gordura (WHO, 2014, 2016; PAHO/WHO, 2015; MENDIS, PUSKA, NORRVING, 2011).

A maioria dessas doenças estão relacionadas com a mudança da morfologia vascular. Os vasos de calibre médio e grande são morfologicamente compostos de: uma camada de células endoteliais (CE) formando a camada íntima; uma lâmina elástica interna (LEI) que separa as camadas íntima e média; diversas camadas de CMLV, formando a camada média, essa camada é rica em fibras elásticas organizadas em camadas compactas separadas e alternadas por camadas de CMLV, que são nutridas tanto por difusão quanto por *vasa vasorum* (arteríolas advindas de fora do vaso); uma lâmina elástica externa (LEE), separando as camadas média e adventícia; a camada de MEC, contendo fibroblastos dispostos longitudinalmente, fibras nervosas e *vasa vasorum* formando a camada adventícia (AIRES, 2008).

4.1. Endotélio vascular

O endotélio vascular, uma monocamada celular que reveste a superfície do lúmen vascular, constitui uma interface ativa, situada entre a circulação e a parede vascular, formando a íntima vascular. O endotélio, em seu estado fisiológico, controla a permeabilidade vascular regulando a entrada e saída de diversas moléculas. O endotélio mantém a fluidez do sangue e modula a vasomotricidade, ajustando o calibre dos vasos às constantes alterações hemodinâmicas e humorais locais e a própria estrutura vascular. Sua integridade é essencial na regulação do tônus vascular, do fluxo sanguíneo, da perfusão tissular e à proteção contra espasmo, trombose e à própria aterogênese (VANHOUTTE et al., 2009; MARSH, COOMBES, 2005).

O endotélio é importante na função vasoconstritora e vasorelaxante, pois influenciam a reatividade das CMLV subjacentes responsáveis pela vasoconstrição e vasodilatação, através da

produção de fatores de relaxamento, como prostaciclina e óxido nítrico (NO), inibindo a agregação plaquetária e mediadores inflamatórios, como a P-selectina e a proteína 1 de adesão celular vascular (VCAM-1). Um derivado importante do endotélio é o NO, que é sintetizado a partir do L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase endotelial. Os fatores de contração, como a endotelina 1 (ET-1), que em condições de desequilíbrio com o NO, causa a proliferação das CMLV. Uma vez que o endotélio tem a facilidade de comunicação com outras células, em situação patológica, isso acelera o fluxo migratório das moléculas de adesão no sentido da íntima vascular e as CEs interagem com as plaquetas circulantes e, quando em contato com o colágeno que compõe a MEC, por exemplo, aderem à parede vascular formando um trombo, como é o caso da aterosclerose (SCHAFER, 1997; KRIEGER, 2008; BUSSE, FLEMING, 1995; ARMSTEAD et al., 1997).

Alguns fatores de risco associados as DCVs como dislipidemia, hipertensão arterial, ou até mesmo procedimentos cirúrgicos como a angioplastia provocam agressão ao endotélio vascular, fazendo com que haja uma disfunção do mesmo e assim causando a perda das funções fisiológicas de proteção, o que caracteriza a disfunção endotelial, isso vai fazer com que as CE liberem fatores de crescimento e acelere o processo de proliferação das CMLVs (LARSEN, MATCHKOV, 2016; GOMES, BUFFOLO, 2006; BARTER et al., 2004).

4.2. Células do Músculo Liso Vascular

As células do músculo liso vascular são os principais componentes celulares das paredes normais dos vasos sanguíneos, elas desempenham um papel importante na regulação da pressão sanguínea e na distribuição sanguínea de vários tecidos do corpo através da contração e relaxamento dinâmicos em resposta a estímulos vasoativos, como hormônios, metabólitos e neurotransmissores. Estudos revelaram que há dois fenótipos distintos de CMLVs na parede do vaso, que são os fenótipos contrátil diferenciado e os proliferativos sintéticos (ZHOU et al., 2018; ZHANG, 2008; BASATEMUR et al., 2019).

As CMLVs contráteis são caracterizados por proteínas contráteis específicas, canais de íons e receptores de superfície celular que regulam o processo contrátil, já as sintéticas, também chamadas de secretoras, são caracterizadas por significativa atividade de proliferação e migração, como a produção de uma grande quantidade de matriz extracelular durante o desenvolvimento, em resposta às mudanças fisiológicas (como exercícios a longo prazo) e lesões patológicas (como nas condições de inflamação, hipertensão, diabetes), nesse último caso pode acontecer mudanças irreversíveis do fenótipo contrátil para o sintético (PIN et al., 2016).

Estudos têm demonstrado que as CMLVs desempenham um papel primordial no processo de formação do trombo vascular na aterosclerose, incluindo maior síntese de matrix extracelular,

produção de múltiplas proteases e alterações na contratilidade vascular, nas quais a proliferação e apoptose das CMLVs desempenham um papel importante no processo de espessamento da íntima vascular e formação de placa aterosclerótica (PAULY et al., 1994). À medida que a aterosclerose se desenvolve, o fenótipo CMLV muda para uma natureza mais proliferativa, com contração reduzida, aumento de proteoglicanos, mas expressão reduzida dos marcadores típicos do músculo liso (BASATEMUR et al., 2019). Um estudo detectou que à medida que a placa aterosclerótica cresce, apoptose principalmente em macrófagos e CMLV foram detectadas nas placas. Foi sugerido que os macrófagos desempenham um papel na indução do processo apoptótico nas VSMCs, o que pode desencadear a ruptura da placa e a apoptose crônica das CMLVs promove a progressão da aterosclerose (BENNETT, EVAN, SCHWARTZ, 1995).

Portanto, as CMLVs não são apenas os componentes da camada média dos vasos sanguíneos, mas também células endócrinas importantes que secretam vários fatores de sinalização que promovem o remodelamento arterial no caso de estímulos patológicos. Múltiplos fatores, carga mecânica regional, estímulos patológicos e mutações genéticas, mediam a expressão gênica de CMLVs por diferentes vias de sinalização que envolvem os receptores de membrana CMLV, canais de cálcio, miRNAs, metilação de DNA e modificação de histonas. Isso resulta na regulação de fenótipos de CMLVs, na expressão de proteínas relacionadas à rigidez e na produção de matrix extracelular. Essas alterações subsequentemente afetam a rigidez, migração e proliferação das CMLVs, bem como a remodelação da matrix extracelular, desempenhando, portanto, um papel na fisiologia e doenças vasculares comuns.

4.3. Aterosclerose

A aterosclerose é uma doença crônica inflamatória que acomete as artérias de médio ou grande porte, geralmente nas áreas de bifurcação, devido ao fluxo não laminar, levando à uma disfunção endotelial e a uma inibição em moléculas anti-inflamatórias, como o NO. Dentre os diversos fatores desencadeadores dessa doença (tabagismo, obesidade, diabetes *mellitus*) está a dislipidemia, onde há um grande número de lipoproteínas plasmáticas. Devido ao fluxo turbulento ou não laminar, ocorre lesões endoteliais e as lipoproteínas infiltram-se para as camadas mais profundas, de acordo com o seu tamanho. Neste sentido, as lipoproteínas de alta densidade (HDL), por serem menores, voltam para a luz vascular com maior facilidade em comparação às lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que são maiores e, portanto, ficam retidas na média vascular (TALL et al., 2000; BARTER et al., 2004).

O aumento das LDLs induz ao consumo de NO devido à sua oxidação e, a partir disso, há um aumento na produção de radicais livres, ocorrendo a liberação de citocinas plasmáticas, com isso as LDLs oxidadas são captadas por monócitos, ocasionando a migração dos mesmos para a média vascular. Dentro da placa de ateroma, os monócitos se diferenciam dos macrófagos e engolem lipídios

modificados por meio de receptores sequestradores, como SR-A1 e CD36. Esses macrófagos cheios de lipídios, chamados células espumosas, têm fenótipo alterado e função imunológica (TANIYAMA, GRIENGLING, 2003; MOLAVI, MEHTA, 2004; JESSUP et al., 2002).

Na tentativa de reparar o processo inflamatório desencadeado pelo excesso de células espumosas, as CMLV começam a migrar e proliferar, englobando essas células espumosas e levando-as para íntima vascular. Os linfócitos T acompanham os monócitos, passando para média vascular, liberando mais citocinas, portanto, atraindo ainda mais monócitos. Os macrófagos que estão ricos em colesterol sofrem apoptose e assim, são englobados por outros macrófagos, o que favorece uma maior infiltração dos mesmos para a íntima e, conseqüentemente, contribui para um espessamento dessa camada vascular, diminuindo o fluxo sanguíneo (SPRINGER, 1994; GROYER et al., 2006).

Assim como os macrófagos, os linfócitos T estão presentes nas lesões endoteliais. Na aterogênese, o marcador de inflamação mais expresso é o CD4⁺ T hepper 1 (Th-1) e Th-2 liberados através dos linfócitos T. O Th-1 produz citocinas, que incluem a interferon gama (IFN- γ), o fator de necrose tumor alfa (TNF- α), a interleucina-12 (IL-12) e a interleucina-18 (IL-18), capazes de amplificar a resposta inflamatória. O IFN- γ e TNF- α são considerados citocinas pró-aterogênicas, enquanto as interleucinas-12 e 18 podem promover a diferenciação do Th-1 (SONG, LEUNG, SCHINDLER, 2001; KLEEMANN, ZADELAAR, KOOISTRA, 2008; INAGAKI et al., 2002). O TNF- α , tem uma função pró-trombótica e inflamatória, além de ativar os monócitos na fase inicial da formação da placa aterosclerótica, atuando na produção de radicais livres (VADDI et al., 1994; STEELE et al., 1996; LIBBY, 2002).

Um outro fator importante é a enzima conversora de angiotensina (ECA), estudos demonstram que esse mecanismo está amplamente ligado a formação da lesão aterosclerótica (OHISHI et al., 1997). A ECA é importante na contratilidade e crescimento da musculatura lisa vascular, contribuindo para o desenvolvimento da hiperplasia da camada íntima e hipertrofia da média (DZAU; LOPEZ-LLASACA, 2005).

A associação da disfunção endotelial com o Sistema Renina-Angiotensina está relacionado com o aumento da expressão de Angiotensina II (Ang II), isso quando comparamos com um organismo em seu estado fisiológico (WATANABE, 2005). A Ang II é produzida na parede vascular e é capaz de gerar hiperplasia da íntima independentemente de efeitos hemodinâmicos ou neurohumorais e também estimula a transcrição de diversos genes e moléculas que levam a modificações na função vascular, que participa da cascata inflamatória, como metaloproteinases de matriz (MMPs), monócito quimioatrativo de proteína 1 (MCP-1), VCAM, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), interleucinas, TNF- α e TGF- β (NAFTILAN, 1994; ROSS, 1999) (DZAU E LOPEZ-LLASACA, 2005).

As células espumosas juntamente com as citocinas inflamatórias acabam sendo vascularizadas por capilares provenientes da camada adventícia. Estes capilares, por sua vez, somados ao processo de necrose, contribuem para o extravazamento de sangue para a luz vascular, atraindo mais fatores inflamatórios e fatores de adesão plaquetárias, que tentam reter os micro vazamentos. Isso faz com que ocorra a formação de placas trombóticas, que diminuem ainda mais, ou interrompem o fluxo sanguíneo. Em alguns casos, essas placas de ateroma podem soltar-se do lúmen e formar coágulos e dependendo do local provoca infarto do miocárdio (coágulo na artéria coronária) e/ou acidente vascular cerebral (coágulo nas artérias cerebrais) (SANTOS-GALLEGO, PICATOSTE, BADIMÓN, 2014; BOBRY SHEV et al., 2016).

Na aterosclerose, a incidência de acidentes vasculares encefálicos é de 70% e quase 100% dos pacientes podem sofrer infarto agudo do miocárdio. Essa doença está entre as principais causas de morbidade e mortalidade no mundo (WHO, 2014), sendo que os principais fatores de risco são: hipertensão arterial, tabagismo, alcoolismo, dislipidemia, diabetes *mellitus*, sobrepeso/obesidade e sedentarismo (FLORIDO et al., 2016).

4.4. Angioplastia

Atualmente, existem algumas formas para amenizar ou prevenir a aterosclerose. A angioplastia, também chamada de angioplastia transluminal percutânea (ATP), foi introduzida em 1977 por *Andreas Gruentzig*, e é uma das principais técnicas cirúrgicas para a desobstrução arterial (MURPHY, RAHIMTOOLA, GRÜNTZIG, 1978). É um procedimento invasivo utilizado para desobstruir artérias e veias estenóticas que consiste na introdução de um cateter (um tubo pequeno e fino com um pequeno balão em sua extremidade) na circulação, através de um vaso de grande porte e conduzi-lo, através da radioscopia, até o local da artéria que está parcialmente ou totalmente obstruída; assim, o balão é inflado até que a placa de ateroma seja comprimida na parede do vaso restaurando o fluxo sanguíneo, assim como mostra a FIGURA 1. O balão é insuflado com um controlador de pressão para não inflar demais e, portanto, evitar danos ao vaso (LEVINE et al., 2011).

Porém a angioplastia com balão cria dissecação do vaso, e com essa lesão mecânica do cateter ocorre subsequente oclusão. Esse problema com a angioplastia com balão levou ao desenvolvimento de *stents* que poderiam atuar como uma sustentação do vaso e comprimir externamente o leito epitelial vascular, o *stent* são pequenos cilindros trançados e expansíveis, que são inseridos no local onde o cateter balão comprimiu as placas de ateroma, permitindo que a região se mantenha dilatada e impedir o reestreitamento do vaso. A princípio os *stents* foram eficazes na solução do problema da lesão mecânica dos vasos pela angioplastia com balão, mas introduziram um novo problema, a trombose e a reestenose que engloba o *stent*, podendo levar a morte. Os *stents* de aço cirúrgico têm uma taxa de

reestenose entre 20% e 50%. Foi então que surgiu uma nova solução, os *stents* farmacológicos, que é composto por aço cirúrgico, um polímero para a liberação do medicamento, e o medicamento antiproliferativo. Porém esses *stents* causava trombose tardia, já que o medicamento impedia a reendotelização do vaso. Os *stents* que estão sendo desenvolvidos tornam os *stents* mais finos e têm polímeros bioabsorvíveis, nenhum polímero, outra frente em evolução possível nos *stents* são os *stents* revestidos de drogas, isentos de polímeros, mas a taxa de trombose ainda é elevada já que essa complicação está atribuída à grande estrutura do *stent* (120 microns) (TAN, SCHATZ, 2016; STEFANINI et al., 2017; KONISHI et al., 2018; GAROT et al., 2017; DOROS et al., 2017; BARTON et al., 2014).

A técnica de angioplastia mostrou-se eficiente, porém o problema ainda não foi totalmente solucionado, no qual a lesão vascular provocada pela angioplastia ainda ocasiona trombose e reestenose tardia, por isso se faz necessário estudos para solução desse problema de saúde.

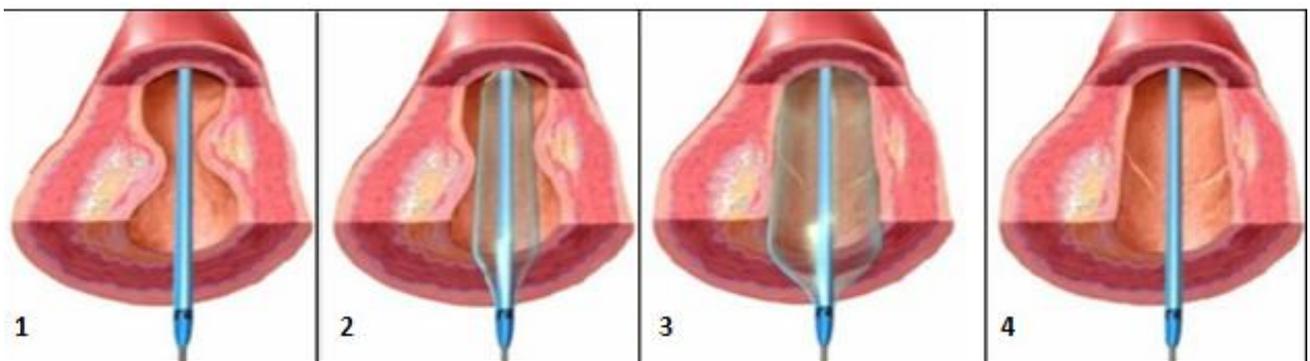


Figura 1- Representação da angioplastia por cateter balão:

1- Introdução do cateter balão no vaso com placas de ateroma, 2- cateter é inflado, 3- compressão da placa de ateroma na parede do vaso, 4- retirada do cateter balão do vaso e restauração do fluxo sanguíneo. **FONTE:** Adaptada da American Heart Association Learn and Live

4.5. Reestenose

A reestenose é uma resposta proliferativa que ocorre na parede dos vasos após uma lesão. Geralmente é uma complicação comum pós-procedimentos de angioplastia, colocação de *stent*, ou outras intervenções mecânicas, diretamente nas artérias ou veias, atingindo cerca de 30 a 60% dos pacientes, meses após a cirurgia (BAUTERS, ISNER, 1997; ABURAHMA et al., 2009). A lesão do cateter balão remodela a parede do vaso, resultando na proliferação, crescimento e migração das CMLV da camada média para íntima e formação e degradação de MEC para o local lesionado. Isto por sua vez, resulta na aceleração no ciclo celular, exacerbando a formação de neoíntima e tornando a reestenose em um processo fibroproliferativo produzido pelo estreitamento no lúmen do vaso (ZHANG, YANG, JENNINGS, 2004; KRIEGER, 2008).

Com o remodelamento do vaso lesionado diversas mudanças hemodinâmicas e moleculares são observadas; sendo uma das mudanças o processo da diferenciação do fenótipo das CMLV de contrátil para sintético, gerando uma diminuição das proteínas contráteis nessas células. Um dos fatores que mais contribui para mudança de fenótipo das CMLV é a hemodinâmica, no qual o estresse de cisalhamento (*shear stress*) é uma das mudanças mais importantes.

O estresse de cisalhamento é a força tangencial que o sangue exerce sobre as CEs. Este estresse é determinante para o diâmetro vascular, sendo que, em condições fisiológicas, a tensão de cisalhamento é diretamente proporcional à velocidade do fluxo, e a viscosidade sanguínea é inversamente proporcional ao cubo do raio vascular. Assim, o aumento do fluxo sanguíneo é importante para favorecer o aumento do raio do vaso e, portanto, normalizar o *shear stress*. Para isso, o endotélio induz a liberação de importantes vasodilatadores como o NO e a prostaciclina. É importante ressaltar que, em condições patológicas, o fluxo sanguíneo passa de um fluxo laminar para um fluxo turbulento (LIU, ROUBIN, KING, 1989; LANGILLE, BENDECK, KEELEY, 1989; GLAGOV et al., 1993; DOBRIN, LITTOOY, ENDEAN, 1989).

O perfil sintético das CMLV é caracterizado pelo aumento de mediadores pró-inflamatório. Essas células são mais proliferativas, produzindo de 25 a 45 vezes mais colágeno do que uma célula com o perfil contrátil, portanto, aumentando o risco de reestenose. Um fator importante é a Ang II, que ativa os fatores de crescimento autócrinos, como o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e o TGF- β , e estimula a síntese proteica, causando hipertrofia e proliferação celular. Essa Ang II pode ativar espécies reativas de oxigênio que auxiliam na produção tanto do NF- $\kappa\beta$, MMPs, que tem a função de degradação de MEC, bem como outros fatores altamente inflamatórios. Neste sentido, a Ang II vem apresentando um papel adverso em vasos acometidos por alguma patologia, visto que esse peptídeo vasoativo ativa fatores de transcrição para genes modificadores da função celular, tais como: MMPs, MCP-1, VCAM, VEGF entre outros (ZAFARI et al., 1998; TAKAYANAGI et al., 2012; SEN, PACKER, 1996; HO et al., 2010; GEISTERFER, PEACH, OWENS, 1988; DZAU, LOPEZ-ILASACA, 2005).

O PDGF na reestenose tem importante papel sobre a regulação da migração das CMLV e na proliferação tardia. O TGF- β contribui para o aumento da MEC na hiperplasia da íntima (ROSS R, MASUDA J, RAINES EW, GOWN AM, KATSUDA S, 1990; FINGERLE et al., 1989; CHEN, HOSHI, MCKEEHAN, 1987).

A MEC é constituída basicamente por colágenos, fibras elásticas, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e as glicoproteínas de matriz e em cada camada vascular tem uma função distinta. A MEC também pode regular a proliferação celular, apoptose, migração, adesão e diferenciação das

células que a circunda, em condições patológicas pode promover a diferenciação das CMLV (STRAUSS et al., 1994; FORRESTER et al., 1991).

Existem diversos fatores que desencadeiam a reestenose: a camada endotelial fissurada, estiramento mecânico, agregação de fatores plaquetários e fatores de crescimento, formação de placa trombótica e a reação inflamatória. O risco de reestenose pós-procedimento de angioplastia foi diminuído com a introdução dos *stents* farmacológicos, que liberam um medicamento antiproliferativo para evitar a hiperplasia da íntima, porém esse procedimento tem uma grande incidência de trombose tardia, pois os *stents* farmacológicos prejudicam o processo de cura do vaso e também retardam o processo de endotelização (INDOLFI, PAVIA, ANGELILLO, 2005; BAVRY et al., 2006). Dessa forma, novas terapias necessitam emergir para o tratamento de distúrbios vasculares fibroproliferativos.

Os mecanismos moleculares envolvidos com a reestenose que levam ao remodelamento vascular não são totalmente compreendidos e um modelo utilizado para o estudo desses processos é o de lesão por cateter balão, que consiste na intervenção mecânica para provocar lesão vascular simulando uma angioplastia em animais experimentais para compreender alterações e respostas vasculares e conseqüentemente à hiperplasia da camada íntima dos vasos (WEI, MOHAMED, 2016; TULIS, 2007; ACCORSI-MENDONÇA et al., 2004). Esse modelo traz perspectiva de novos tratamentos através da avaliação de possíveis agentes terapêuticos, por exemplo, os miRNAs. O papel dos miRNAs nos processos fisiopatológicos cardiovasculares e a resposta vascular a lesão vem sendo amplamente estudados, tanto como biomarcadores quanto empregados como uma terapia gênica em uma perspectiva terapêutica para o tratamento de DCVs (SAMANTA et al., 2016; POLIMENI, DE ROSA, INDOLFI, 2013; GARERI, DE ROSA, INDOLFI, 2016).

4.6. Treinamento Físico e Reestenose

O TF aeróbico vem sendo amplamente estudado para o tratamento de DCVs, visto que o mesmo, induz tanto à adaptações cardiovasculares quanto musculares, respiratória e metabólica, dependendo do volume e intensidade empregados (WU et al., 2014; MEDEIROS et al., 2004; HARBER et al., 2012; BRUM et al., 2004). Já é bem estabelecido que o TF aeróbico promove hipertrofia cardíaca fisiológica, redução da pressão arterial em repouso (somente em indivíduos em estado patológico), diminuição da frequência cardíaca basal, melhora da reatividade vascular e da espessura das camadas média e íntima dos vasos e também acarreta benefício na função endotelial (MOREAU et al., 2006; FERNANDES et al., 2011; DE SOUZA et al., 2000). Além dessas adaptações cardiovasculares, o TF pode propiciar adaptações metabólicas como diminuição dos níveis de triglicérides séricos, do colesterol total, das lipoproteínas de baixa densidade e aumento das

lipoproteínas de alta densidade e também aumenta a sensibilidade insulínica (WOOTEN, BIGGERSTAFF, BEN-EZRA, 2009; WAY et al., 2016).

O TF também desempenha um importante efeito benéfico na função vasomotora, no qual ocorre um aumento na vasodilatação dependente do endotélio e a uma atenuação da resposta vasoconstritora. Isso se dá devido a alterações hemodinâmicas ocorridas durante o treino, que por sua vez altera a biodisponibilidade de NO e diminui as espécies reativas de oxigênio. O NO, sintetizado pela óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) que está envolvido no remodelamento vascular também pode inibir a formação de neointima (VON DER LEYEN et al., 1995; SESSA et al., 1994; MOROI et al., 1998; JANSSENS et al., 1998; INDOLFI et al., 2002; GIELEN et al., 2011).

Um estudo de INDOLFI et al. (2002) comprovou que em animais lesionados por cateter balão e que passaram pelo protocolo de exercício físico aeróbio, o número de células positivas para antígeno nuclear de proliferação celular PCNA (índice de proliferação do inglês *Proliferating Cell Nuclear Antigen*) era mais baixo do que seu controle sedentário, isso diminuiu a área neointima, esse fato pode ser devido a um efeito antiproliferativo da atividade aumentada da eNOS.

Com a importância dos mecanismos citados, mostrando que o TF promove respostas fisiológicas estruturais e moleculares no sistema vascular, e que a lesão mecânica causada pelo cateter balão vai ao encontro dessas respostas, promovendo estímulos patológicos neste tecido, e compreendendo que os estudos ainda não elucidaram totalmente os mecanismos de regulação dessas vias, faz-se necessário um maior estudo de mecanismos biomoleculares que possam estar regulando a reestenose, como as respostas geradas a partir da inibição ou superexpressão de miRNAs.

4.7. microRNAs

Os miRNAs são pequenos RNAs com aproximadamente 25 nucleotídeos, de fita simples, não codificadores de proteínas, agindo como reguladores pós-transcricionais pela ligação da região não traduzida 3' UTR do RNA mensageiro (mRNA) alvo, atua na regulação pós-transcricional, principalmente de plantas e animais. Assim, regulam negativamente a síntese proteica (KIM, 2005; ERIKSSON, TASKINEN, LEPPÄ, 2006; AMBROS, 2004). Há uma estimativa de que mais de 60% dos genes codificadores de proteínas são diretamente regulados por miRNAs (FRIEDMAN et al., 2009). Um único miRNA pode regular vários mRNAs e mais de um miRNA pode regular um único mRNA, podendo obter uma vasta probabilidade combinatória de regulação de expressão gênica (KREK et al., 2005).

O primeiro miRNA descoberto foi em 1993, por Lee e colaboradores (LEE, FEINBAUM, AMBROS, 1993), onde eles associaram o lin-4 ao desenvolvimento larval (*C. elegans* – nematódes), mais tarde foi descoberto que o lin-4 atuava a nível pós-transcricional com complementariedade com

a região 3' UTR do mRNA da proteína lin-14 (LAU et al., 2001; AMBROS, 2004). Sete anos depois foi descoberto o segundo miRNA que foi denominado let-7, no qual tem complementariedade na região 3'UTR da proteína lin-41, foi constatado que o let-7 e o lin-14 eram conservados não só em nematódes como em metazoários, com homologia em moscas, camundongos e humanos, assim ocorrendo a hipótese que pequenas moléculas pudessem desempenhar funções importantes inclusive em humanos, o que abriu uma perspectiva na descoberta de novos miRNAs e suas funções e mecanismo de regulação (PASQUINELLI et al., 2000).

Desde sua descoberta, já são conhecidas mais de 28.000 sequencias de miRNAs maduros (capaz de exercer uma função biológica), em mais de 200 organismos diferentes, isso segundo o banco de dados de bioinformática miRBase.

4.8. Biogênese e mecanismo de ação dos miRNAs

Os miRNAs são transcritos pela enzima RNA polimerase II, no núcleo celular, que a partir do genoma geram um transcrito primário chamado pri-miRNA, que após passar por clivagens realizadas por complexos enzimáticos, poderão tornar-se miRNAs maduros e só assim são capazes de cumprir suas funções biológicas (HE, HANNON, 2004; CZECH, HANNON, 2011). Os pri-miRNAs possuem estrutura de dupla hélice do tipo *hairpin*, ainda no núcleo sofrem ação de um complexo enzimático denominado Drosha, e seu cofator essencial DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*), clivando em moléculas menores, contendo um trecho dupla fita, com uma alça em fita simples. Ao serem processadas pela Drosha, os pri-miRNAs passam a ser denominados pré-miRNAs, ou seja, moléculas precursoras de miRNAs maduros, e que apresentam cerca 70 nucleotídeos (KIM, 2005). Estes pré-miRNAs são então transportados para o citoplasma celular através de uma proteína de exportação nuclear dependente de GTP chamada exportina 5. Já no citoplasma, os pré-miRNAs sofrem a ação de uma terceira enzima, uma ribonuclease do tipo III conhecida como Dicer, originando moléculas de RNA em dupla fita (duplex), que possuem entre 17 e 25 nucleotídeos, sendo uma dessas fitas é o miRNA maduro, e a outra, sua fita *anti-sense* (THUM, 2012; OLENA, PATTON, 2010). O produto da clivagem da Dicer é, então, incorporado por um complexo chamado RISC (*RNA-induced silence complex*), que é consistido primordialmente por proteínas do tipo Argonautas, (RAND et al., 2005; CZECH, HANNON, 2011). Através da ação dessas proteínas Argonautas, apenas uma das fitas do duplex permanece no complexo RISC, podendo exercer sua função reguladora da expressão pós-transcricional do seu gene alvo, enquanto que a outra fita, anti-sense, com menor estabilidade, será degradada (SCHWARZ et al., 2003; CARTHEW, SONTHEIMER, 2009). Assim, a partir da fita de miRNA maduro, a regulação da expressão endógena de genes ocorre através do pareamento do miRNA, majoritariamente através de uma pequena região entre os segundo e oitavo nucleotídeos na

extremidade 5`UTR dessa molécula, conhecida como região *seed*, à extremidade 3`UTR do seu mRNA alvo, sendo, portanto, a região de preferência para o acoplamento dos miRNAs aos seus mRNA alvos (LEWIS, BURGE, BARTEL, 2005; LAU et al., 2001). Dessa forma, através da ligação miRNA-complexo RISC à região *seed* (semente) da 3`UTR do mRNA alvo, há a efetivação do mecanismo de regulação pós-transcricional negativa do miRNA, podendo ocorrer de duas formas. A primeira é dada pela degradação total do mRNA alvo do miRNA, que ocorre quando há pareamento, ou complementariedade, perfeito entre os nucleotídeos dessas moléculas (LEWIS et al., 2003). A segunda ocorre através da complementariedade imperfeita entre o miRNA em questão, e seu mRNA alvo. Quando há esse tipo de pareamento, o processo de tradução do mRNA é inibido, sem que haja sua total degradação, resultando em repressão da tradução proteica, assim como mostra a FIGURA 2 (LEWIS, BURGE, BARTEL, 2005; LEWIS et al., 2003).

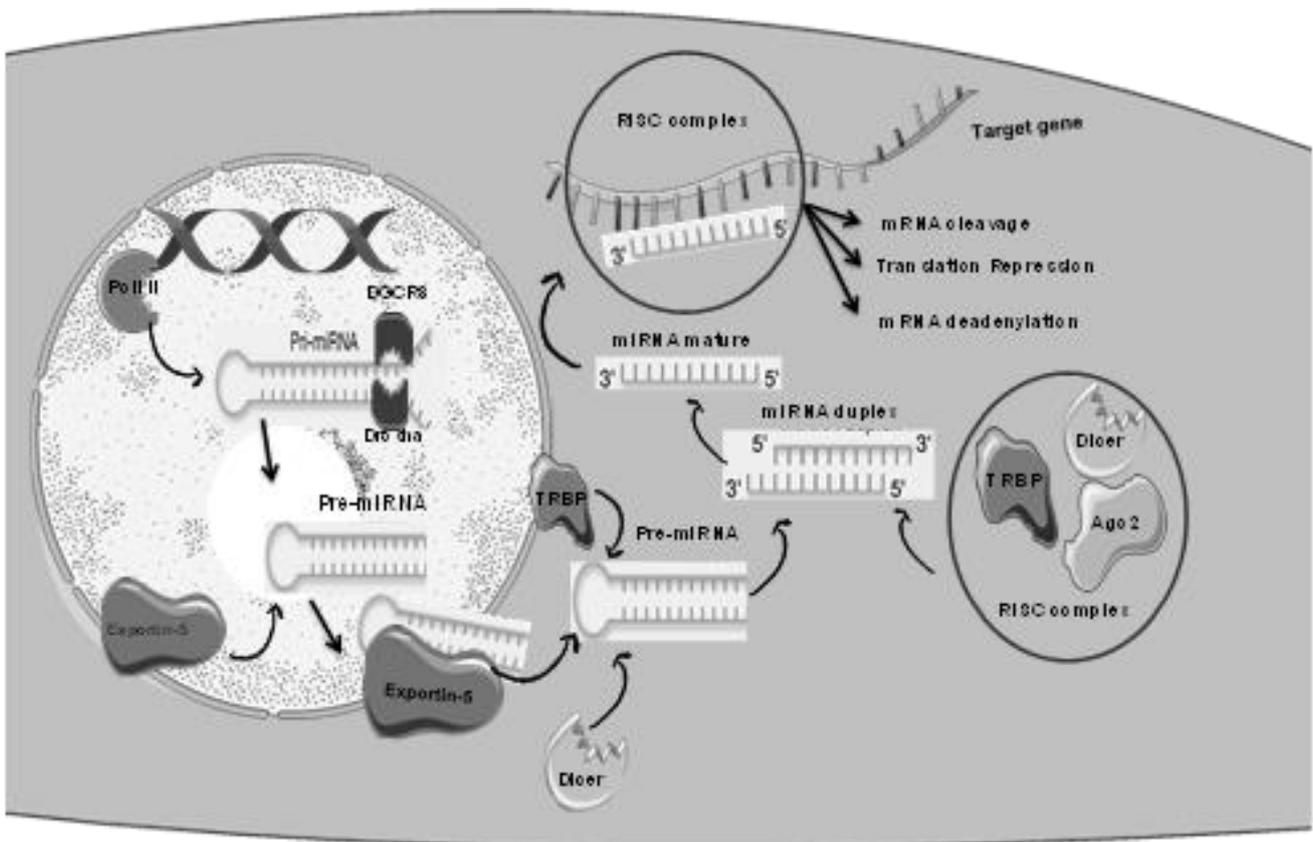


Figura 2- Biogênese dos miRNAs e seu mecanismo de ação, (AMBROS, 2004).

4.9. miRNA-146a, treinamento físico e doenças vasculares

Os miRNAs são importantes na regulação patológica de doenças vasculares proliferativa, essas tem como base a grande formação de neointima, e tem uma alta expressão de miRNAs na parede do vaso pós-angioplastia (JI et al., 2007; HOSIN et al., 2014). Na lesão vascular, os miRNAs podem

mediar à comunicação célula a célula, entre as CMLV e CE e também outros tipos de células na parede do vaso (HERGENREIDER et al., 2012).

Os miRNAs estão envolvidos na modulação das CEs na resposta do vaso lesionado, estes modulam a integridade vascular, angiogênese, proliferação, migração e apoptose. Já na modulação das CMLV podem participar da migração, proliferação, diferenciação e apoptose (GARERI, DE ROSA, INDOLFI, 2016).

Já foi demonstrado, por exemplo que a expressão do miRNA-146 correlaciona-se negativamente com a produção de citocinas pró-inflamatórias, Taganov e seus colaboradores demonstraram que quando os monócitos humanos são expostos a componentes bacterianos, eles induzem NF- κ B por uma via dependente do gene MyD88, que então regula positivamente a expressão do miRNA-146, assim esse miRNA diminui os níveis de proteínas IRAK1 e TRAF6, os autores propuseram que o miRNA-146 controla a sinalização de receptores do tipo *Toll-like* e citocinas por meio de um ciclo de regulação de feedback negativo, envolveu uma regulação negativa da proteína IRAK-1 associada ao receptor de IL-1 e também ao TRAF 6 fator associado ao receptor de TNF (TAGANOV et al., 2006).

Um estudo de Wu e seus colaboradores (2015), também comprovaram a interação entre o miRNA-146a e a via de sinalização do NF- κ B, onde estudos anteriores a esse já sugeriram que a via NF- κ B é ativada nas CMLVs e que essas células mostram crescimento e proliferação anormais durante a ativação dessa via. No estudo de Wu, foi demonstrado que com a superexpressão do miRNA-146a, nas CMLVs de ratos com doença coronariana, ocorre o aumento de apoptose dessas células e verificou-se que a inibição do sinal da via de NF- κ B suprime a apoptose nas CMLVs desses ratos (WU et al., 2015).

Um estudo de SUN et al., (2011) atestou que a transcrição do miR-146a é regulada pelo fator transcricional KLF-4 (*Krüppel-like factor 4*) e fator transcricional KLF-5 (*Krüppel-like factor 5*) e que desempenham um papel importante na promoção de proliferação de CMLV (*in vitro*) e quando a artéria carótida é lesionada com cateter balão, simulando uma angioplastia, ocorre hiperplasia vascular da neoíntima (*in vivo*). Ji et al., (2007) também constatou um aumento no miR-146a em artérias lesadas, originando uma notável formação de neoíntima. Nesse estudo foi observado pela primeira vez a expressão de vários miRNAs na parede do vaso pós-angioplastia. No estudo de CHEN et al., (2009) foi comprovado que diversos miRNAs desempenham papéis como proliferação, diferenciação celular e apoptose, nas respostas inflamatórias de monócitos e macrófagos com estimulação de lipoproteínas de baixa densidade oxidada que são primordiais no desenvolvimento da aterosclerose. CAO et al., (2015) observou que os níveis de miR-146a e miR-21 estavam aumentados em placas ateroscleróticas e que esses miRNAs suprimem a expressão de Notch2 (*Neurogenic locus notch homolog protein*) que

é uma proteína de membrana e Jag1 (*Jagged1*) é uma proteína de superfície celular, esses fornecem um importante *feedback* negativo sobre a proliferação das CMLV em resposta a lesão vascular, portanto as inibições desses miRNAs podem apresentar uma nova estratégia para prevenção de doenças vasculares fibroproliferativas. Contudo, pouco se sabe sobre os mecanismos de ação do miRNA-146a. Outro modulador de expressão de miRNAs é o TF, que também está sendo investigado como terapia não farmacológica para DCV.

Um estudo com o perfil de expressão de miRNAs na aorta torácica de ratos normotensos submetidos a diferentes volumes de TF por natação, feito em nosso laboratório, obteve dados preliminares que demonstraram a expressão do miRNA-146a estava aumentada em aorta de ratos espontaneamente hipertensos (SHR), entretanto animais controles saudáveis quando submetidos ao TF a expressão deste miRNA estava diminuída. Em análise de bioinformática por *sites* de predição de miRNAs mostrou que o miRNA-146a é capaz de ligar-se na região 3' UTR da VASN, gene já validado como alvo molecular do miRNA-146a, sendo validado em nosso laboratório.

4.11. VASN

A VASN é uma proteína de membrana possuindo uma região extracelular que contém 10 matrizes em *tandem* de repetições ricas em leucina (RRL), um domínio com homologia com o fator de crescimento epidérmico (EGF) e um domínio com homologia com a fibronectina do tipo III, que é proteoliticamente desviado por um domínio de Desintegrina e Metaloprotease 17 (Adam-17) e secretado como VASN solúvel (sVASN). É possível que, além de TGF- β , o sVASN possa se ligar a várias proteínas e, portanto, seja dotado com papéis versáteis correspondentes (MALAPEIRA et al., 2010).

Essa proteína é predominantemente expressa nas CMLV do sistema vascular e para o esclarecimento das funções biológicas da mesma, foi comprovado que essa proteína se liga diretamente ao TGF- β modulando negativamente e inibindo-o; esse fator atua como uma citocina anti-inflamatória (IKEDA et al., 2004). TGF- β é uma citocina que controla a proliferação e a diferenciação celular. Essa citocina está envolvida no processo de reestenose pós-angioplastia, devido à participação na síntese de MEC e proliferação de CMLV, portanto o TGF- β pode agravar a formação de neoíntima na parede do vaso, por formar fibrose (IKEDA et al., 2004; DABEK et al., 2006). O estudo de IKEDA (2004) também observou que o aumento da expressão de VASN inibe a formação de neoíntima.

Assim, o TF aeróbico pode modular a expressão do miRNA-146a que por sua vez controla negativamente a expressão da VASN e o remodelamento vascular na lesão induzida pelo cateter balão.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Amostra

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo EEFE-USP (n° 2016/03) e segue os princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Esse trabalho está de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

A amostra foi de 12 ratos *Wistar* machos com oito semanas de idade para o estudo 1 e para o estudo 2 foram 40 ratos machos também com oito semanas de idade com massa corporal de aproximadamente 350 gramas, alocados no biotério de experimentação do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Exercício, localizado no Departamento de Biodinâmica do Movimento Humano da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (EEFE-USP). O estudo 2 foi separado em 2 lotes, sendo o primeiro com 18 animais e o segundo com 20 animais; todos animais apresentavam as características descritas acima. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas (três ou quatro animais por caixa), ambiente com ciclos de período claro/escuro invertido (12h/12h) e temperatura controlada de 22° a 24° C. Água e ração foram oferecidas *ad libitum* sendo a ração normoproteica (12% de proteína). Os animais foram identificados por números e foram semanalmente pesados. Todos os animais foram produzidos no biotério do Instituto de Ciências Biomédicas – central.

5.2. Protocolo e desenho experimental

Para a realização do Estudo 1, os animais foram divididos em 4 grupos: 20, 40, 60 e 80 dias após a lesão (n= 3 cada grupo), conforme o protocolo experimental (FIGURA 3).

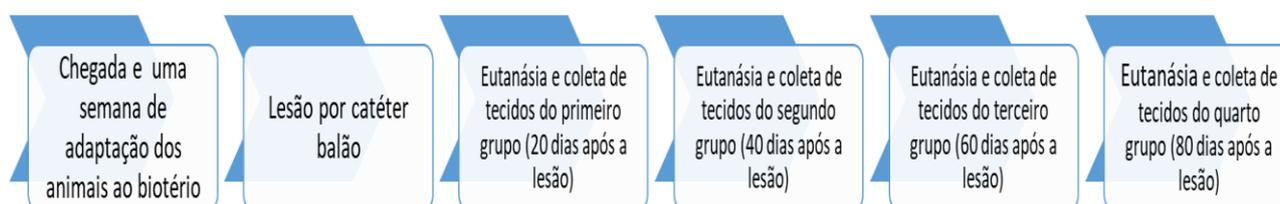


Figura 3- Desenho experimental para o estudo 1.

Para a realização do Estudo 2, os animais foram divididos em quatro grupos experimentais (n= 4/5 por grupo), conforme o protocolo experimental demonstrado na FIGURA 4.

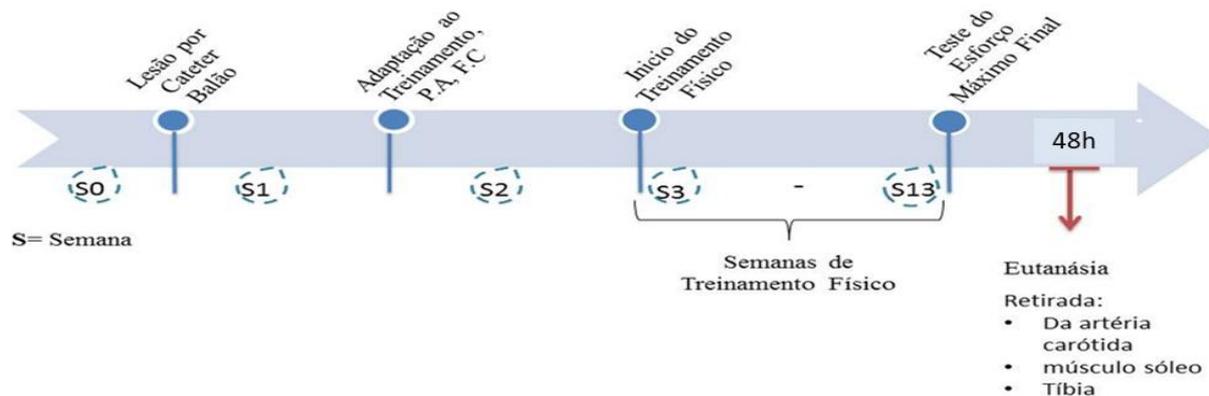


Figura 4- Desenho experimental do Estudo 2.

S0 = semana de chegada dos animais no biotério.

Os grupos do estudo 2 foram divididos em:

Sham Sedentário = SS

Lesionado Sedentário = LS

Sham Treinado = ST

Lesionado Treinado = LT

5.3. Lesão arterial por cateter balão

O material cirúrgico foi autoclavado antes da cirurgia e o local onde as cirurgias foram realizadas foi provido com os materiais cirúrgicos, álcool, iodo, fio de sutura, cateter balão, lupa e algodão.

A lesão com cateter balão (Fogarty 2F, Edwards Lifesciences) foi realizada na artéria carótida esquerda de ratos machos Wistar (250-300g) anestesiados com injeção intraperitoneal de ketamina (80 mg/kg) e xilazina (7 mg/kg) (WEI, MOHAMED, 2016). Logo após a anestesia foi realizada uma incisão longitudinal reta no meio do pescoço, o tecido conjuntivo e os músculos foram divulsionados e os músculos foram mantidos separados com o auxílio do fórceps para expor a artéria carótida (FIGURA 5). A artéria carótida está ligada ao nervo vago; com cautela a artéria carótida foi separada distalmente do nervo vago até a bifurcação (entre a artéria carótida interna e externa), foi usado fios de algodão número 4.0 para conter o fluxo sanguíneo e foi feita uma pequena incisão na porção direita da bifurcação, onde foi introduzido o cateter balão (Fogarty 2F, Edwards Lifesciences). O cateter foi introduzido através da artéria carótida externa e deslizado até a artéria carótida comum e então foi inflado com 0,2 ml de solução fisiológica e arrastado com movimentos giratórios em direção à bifurcação, desinsuflado e novamente posicionado na artéria carótida comum, insuflado e arrastado. Este procedimento foi realizado três vezes para que se lesionasse a maior parte do endotélio vascular. Assim foi feita a retirada do cateter e o fluxo da artéria carótida externa foi interrompida na porção

próxima à bifurcação para evitar o sangramento e restabelecer o fluxo sanguíneo. Após a retirada do cateter, a artéria carótida externa foi ligada com fio de sutura 4.0 e o local da incisão na pele foi suturado com fio 4.0 e foi utilizado anti-septico (FIGURA 5). Após o efeito da anestesia, foi administrado analgésico e anti-inflamatório dipirona (400 mg/Kg), via oral. Alguns animais foram anestesiados e submetidos ao procedimento sem a utilização do cateter balão (ratos *sham-operados*). Esse procedimento foi realizado apenas para o Estudo 2.

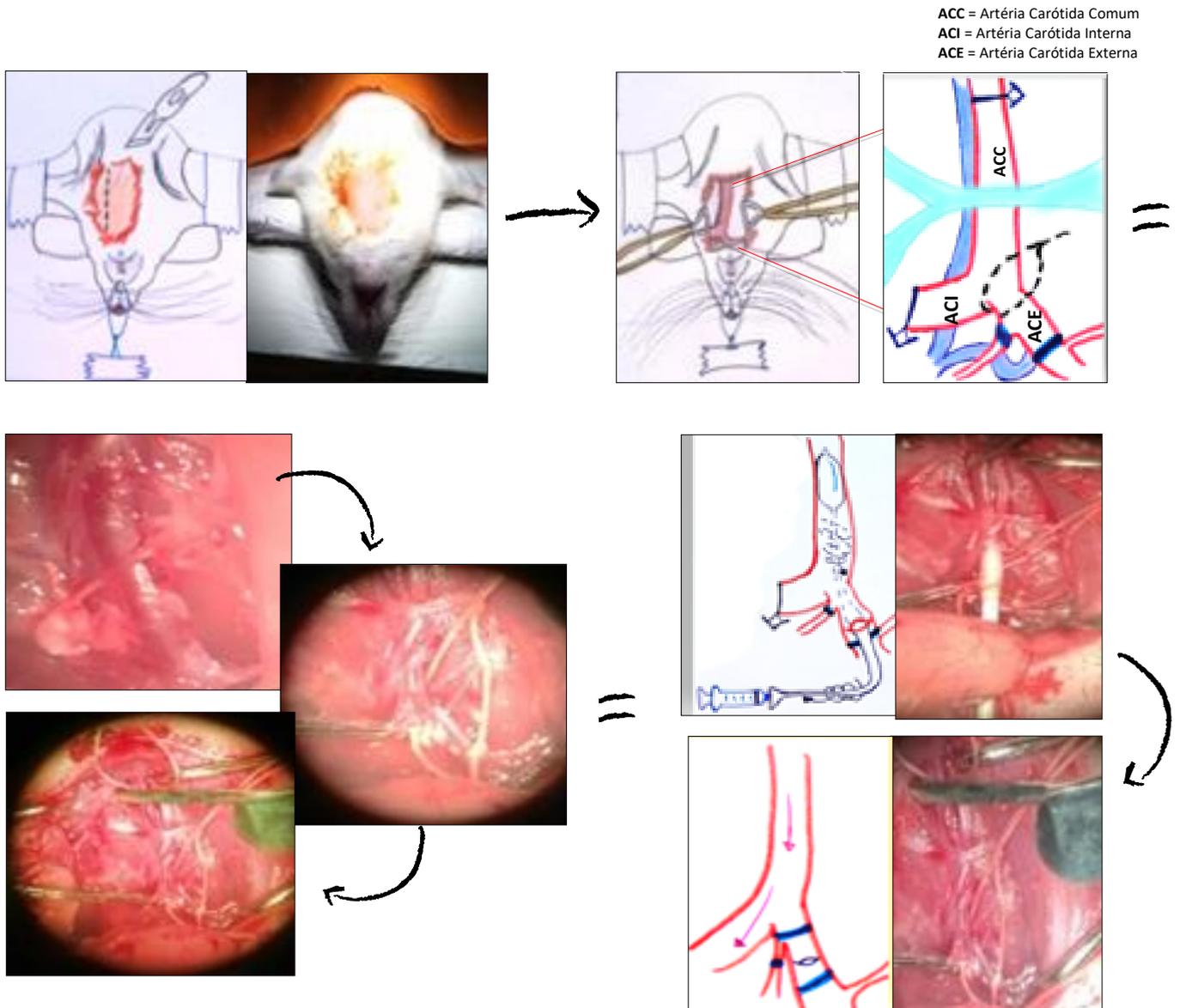


Figura 5. Passo a passo da cirurgia de lesão por cateter balão.

As camadas musculares foram divulsionadas do lado esquerdo da traqueia. **2-** A ACI foi pinçada com um grampo vascular e o mesmo foi feito com o ACC, de modo que o fluxo sanguíneo foi interrompido, a ACE foi suturada com fio tamanho 4.0 e foi feita uma pequena incisão, no qual foi inserido o cateter. **3-** O cateter foi retirado e os grampos também, retornando o fluxo sanguíneo, a ACE foi suturada na porção onde o cateter entrou, os músculos foram colocados de volta em seus respectivos lugares e a pele foi suturada.

5.3.1. Caracterização da lesão por cateter balão - Estudo 1

O modelo de lesão do balão da artéria carótida em ratos é um método importante e bem estabelecido na literatura para estudar os mecanismos moleculares e celulares envolvidos na diferenciação, formação neointimal e remodelamento vascular. *A artéria carótida esquerda é tipicamente lesionada e a artéria carótida direita é usada como controle.*

O espessamento neointimal representando a proliferação das células CMLV geralmente atinge seu pico de formação neointimal após duas semanas de lesão, geralmente as artérias são retiradas nesse ponto, porém não há caracterização de tempo na literatura, acima de 50 dias pós lesão, em que o vaso permanece lesionado e se esta formação de neointimal continua por períodos prolongados, sendo poucos estudos que utilizaram o tempo prolongado (GEISTERFER, PEACH, OWENS, 1988; GABELER et al., 2002a).

Portanto, o objetivo do Estudo 1 foi caracterizar o modelo animal de lesão por cateter-balão, que caracteriza a reestenose e identificar se a lesão persiste por longos períodos, para que possamos prosseguir para o estudo 2, já que o protocolo de TF do estudo 2 tem uma duração de 85 dias. Diante disto, os animais foram randomizados em 4 grupos (20, 40, 60 e 80 após a lesão) e eutanasiados de acordo com o tempo percorrido após a lesão vascular, para verificar se a reestenose persistia ao longo do tempo.

Para os dois estudos, foi utilizado o procedimento de lesão de cateter balão descrito acima. Para o estudo 1, após esse procedimento os grupos foram eutanasiados de acordo com seus grupos: 20, 40, 60 e 80 dias após a lesão.

5.4. Protocolo de treinamento físico aeróbico

Os grupos ST e LT foram submetidos ao protocolo de treinamento de natação adaptado de (MEDEIROS et al., 2004), onde treinaram cinco vezes por semana durante 60 minutos em um sistema de natação com a água aquecida aproximadamente a 30°C, durante 10 semanas e com aumento gradual da sobrecarga de trabalho até atingir 3% do peso corporal adaptado a cauda do animal. Este protocolo foi caracterizado como treinamento de moderada intensidade e longa duração, sendo efetivo na promoção de adaptações cardiovasculares e no aumento da capacidade oxidativa muscular (MEDEIROS et al., 2004). Antes do início do protocolo, os animais foram adaptados durante duas semanas ao TF de natação, com aumento gradual do volume do TF.



Figura 6- Protocolo de Treinamento Físico (Natação).
Ajuste de carga através do peso corporal (3%), na cauda.

5.5. Medida indireta da pressão arterial e frequência cardíaca

A medida indireta da pressão arterial sistólica e frequência cardíaca nos quatro grupos experimentais foram determinadas pela técnica de pletismografia de cauda (BUÑAG, 1973), utilizando um sistema para ratos e camundongos da *KENT SCIENTIFIC RTBP1001 Litchfield, USA*. Para evitar erros de medida e análise, os ratos foram submetidos a uma semana de adaptação com a técnica de medida. Os animais estavam acordados, em repouso e foram mantidos sob restrição de movimentos para que as medidas fossem realizadas. Os animais foram mantidos sob aquecimento a 37°C durante 10-15 minutos para permitir a dilatação da artéria caudal. Após este período, um manguito de pressão e um sensor de pulso foram colocados na região proximal da cauda do animal. Para obter os valores de pressão arterial de cada animal, foram realizadas em média 10 medidas por sessão. Os animais foram submetidos às medidas de pressão arterial antes do período inicial do protocolo experimental e ao final do mesmo.

5.6. Avaliação do esforço físico máximo

Para realização do protocolo de avaliação do esforço físico máximo, os animais foram adaptados previamente em esteira rolante durante três dias, quinze minutos por dia, no quarto dia os animais dos quatro grupos foram posicionados individualmente sobre a esteira rolante, iniciando o teste de esforço. A velocidade inicial foi de 6 metros/minuto (sem inclinação), usamos um protocolo escalonado com incrementos de velocidade de 3 m/min a cada 3 min, até ser atingida a velocidade máxima suportada pelos animais. O critério para a determinação da exaustão do animal e a interrupção

do teste foi o momento em que o rato não conseguiu mais correr dentro da caixa mediante o incremento de velocidade da esteira.

Esta avaliação foi feita pré e pós o período de treinamento, para comparar a resposta de desempenho do animal entre os grupos. Embora o teste em esteira não seja específico ao TF que foi realizado no presente estudo, utilizamos esse teste para auxiliar na verificação da eficácia do TF como predição de uma melhora na capacidade de realização de esforço. Foi comparado o tempo (min), a velocidade (m/min) e a distância (m) percorrida por cada rato.

5.7. Eutanásia e coleta do tecido

Quarenta e oito horas após a última sessão de TF os animais de todos os grupos foram eutanasiados com uma dose excessiva de anestésico, que é composta de uma mistura de ketamina (180mg/kg corporal) e xilazina (20mg/kg corporal). Após a eutanásia, segmentos da artéria lesionadas foram coletadas e fixados em paraformaldeído a 4% em solução fosfato (pH 7,2 - 7,4). Os músculos sóleo, plantáris e gastrocnêmio e o coração foram cuidadosamente dissecados, pesados em uma balança de precisão e congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C para serem utilizados nas análises bioquímicas e biologia molecular (GEHAKA LTDA). A tíbia foi retirada e medida com paquímetro para normalização do peso tecidual.

5.8. Avaliação morfológica vascular

Após a eutanásia, segmentos da artéria carótida foram coletadas e fixados em paraformaldeído a 4% em solução fosfato (pH 7,2 - 7,4). Em seguida as artérias foram transferidas a um molde com meio de congelamento para tecidos *Tissue Tek – OCT (Bayer)*, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C até a sua utilização. Cortes transversais de 10 μm de espessura foram realizados em um criostato e colocados sobre uma lâmina de vidro para análise histológica.

Os cortes foram corados com hematoxilina - eosina (HE). As imagens foram capturadas e analisadas utilizando um sistema computacional morfométrico (*Leica Quantimet 500, Cambridge, UK*) com uma objetiva de 10x. Os parâmetros morfológicos da artéria carótida analisados foram o diâmetro do lúmen (μm^2) e a área do lúmen (μm^2), a área da camada média (μm^2) e a relação parede lúmen entre os grupos estudados. Para as medidas de diâmetro a simetria da circunferência foi corrigida usando o perímetro ($D = \text{circunferência}/\pi$).

5.8. Extração de RNA total

Foi homogeneizada a artéria carótida em 300 μl ml de *TRLzol® Reagent (Invitrogen)* e a extração seguida conforme instruções do fabricante. O RNA precipitado foi lavado com etanol 75%

para eliminar resíduos de fenol e sal, e solubilizado em água tratada com DEPC. A concentração das amostras de RNA total foi quantificada usando o espectrofotômetro *NanoDrop* (*NanoDrop Technologies, USA*).

A integridade foi verificada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 0.5µg/ml de *Nancy-1520* (*Sigma, USA*). O gel foi imerso em tampão TAE 1X e a eletroforese realizada a 100 volts por aproximadamente 60 minutos. A quantidade das amostras foi avaliada pela análise da intensidade das bandas correspondentes às subunidades do RNA ribossomal 28S e 18S, onde a relação 28S/18S deverá ser aproximadamente 2. Amostras que apresentou algum grau de degradação foram descartadas.

5.9. Síntese de cDNA para miRNAs

cDNA para análise de miRNAs foi sintetizado a partir do RNA total utilizando *primers* específicos para o miRNA-146a (MIMAT0000449) analisado de acordo com o protocolo *TaqMan miRNA Assay* (*Applied Biosystems, CA, USA*). Foram utilizados 10ng/ul de RNA em 1 µl. Foi preparada uma RT *master mix* com dNTPs 100mM, *multiscribe reverse transcriptase* 50U/ml, tampão 10x para a enzima, inibidores de RNase 20U/ml, totalizando 7µl. Foram adicionados 3 µl de *primer* e água livre de nuclease para completar o volume de 15µl de reação. A reação de PCR foi realizada a 16°C por 30 min, 42°C por 30 min, 85°C por 5 min e após as amostras foram mantidas a -20°C.

5.10. Reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-PCR) 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 miRNA Assay 20X*) e 7,67 µl de água livre de nucleases. As reações foram incubadas a 95°C por 10 min, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 min. As fluorescências foram lidas em detector *ABI PRISM 7500* (*Applied Biosystem, CA, USA*). Foi utilizado o U6 snRNA como normalizador para análise de cada miRNA testado.

5.11. Expressão gênica do gene alvo (VASN) do miRNA-146a

Síntese de cDNA para expressão gênica

Foram utilizados 500 ng de RNA total, extraídos a partir da artéria carótida dos ratos. As amostras foram incubadas com 0,5 ng/mL de oligo dT (12-18) a 65°C por 5 min, 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, CA, USA). 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.

5.11.1. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) para análise da expressão gênica

A análise da expressão gênica foi feita pelo sistema de detecção do produto específico amplificado no equipamento 7500 *real-time PCR System* (Applied-Biosystems, CA, USA) 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 foram padrão (protocolo do *kit SYBR-Green master mix*) e todos os reagentes foram fornecidos pelo kit, inclusive a enzima polimerase *AmpliTaq-Gold* (Applied-Biosystems, CA, USA).

Depois da otimização, os *primers* foram utilizados na concentração de 200 nM para detecção e quantificação relativa da expressão do gene da 18S: *forward* 5'- GACGATCAGATACCGTCG TAGTTC -3', *reverse* 5'-GTTTCAGCTTTGCAACCATACTCC-3', controle interno para os demais genes para o estudo 2 e GAPDH: *forward* 5'-TCTTGTGCAGTGCCAGCCTC-3', *reverse* 5'-CAAGAGAAGGCAGCCCTGGT-3', como controle interno no estudo 1. Sequência dos *primers* utilizados no *real-time PCR*: VASN: *forward* 5'-GAGAGCCACGTCACACTGG-3', *reverse* 5'-CAAAGTCGGCGTAGTCAAGC-3', TGF-β: *forward* 5'-GGCGGTGCTCGCTTTGTA-3', *reverse* 5'-GCGGGTGA CTCTTTGGC-3', PCNA: *forward* 5'-GTAGCAAGAGGTGTCGTCCA-3', *reverse* 5'-GCCAGCTTGGTCTACTCAGA-3', ADAM17: *forward* 5'-AACAAGGTGTGCGGCAACTC-3', *reverse* 5'-GCACTTCTTCTGGGCCGTCT-3', NF-κβ: *forward* 5'- TGGGAATGGTGAGG TCACTCT-3', *reverse* 5'- TCCTGAACTCC AGCACTCTCTTC-3', KLF4: *forward* 5'- CGGAAAAGAACAGCCACCCA-3', *reverse* 5'-GAATTTCCACCCACAGCCGTC-3'. O produto da geração do PCR foi monitorizado por medição do aumento da fluorescência provocada pela ligação de *SYBR green* na cadeia dupla de DNA em cada fase de anelamento. A curva de dissociação observada na análise de *SYBR green* foi gerada no final da reação para verificar se um único produto foi amplificado. Cada amostra foi analisada em triplicata. Quantidades relativas de expressão do gene alvo foram comparadas após a normalização dos valores de controle interno (ΔCT). Mudanças em vezes na expressão dos mRNAs foram calculados utilizando as diferenças em valores dos ΔCT entre os grupos ($\Delta\Delta CT$) e a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK, SCHMITTGEN, 2001).

5.12. Atividade da enzima citrato sintase

O aumento da atividade das enzimas oxidativas presentes na mitocôndria é um indicativo da otimização do metabolismo aeróbico. A enzima citrato sintase catalisa a primeira reação do ciclo de Krebs, onde ocorre a condensação do acetil coenzima A (acetil-CoA) com o oxaloacetato para formar citrato e coenzima A (CoA).

Para avaliar a atividade da enzima citrato sintase o músculo sóleo foi homogeneizado a 4°C em tampão de extração (pH 7,4) contendo Tris-base (50 mM) e EDTA (1 mM). As amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm durante 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para a realização da cinética enzimática. A quantificação da proteína no homogenato foi realizada segundo o método de BRADFORD, (1976). A atividade máxima da enzima foi determinada segundo ALP, NEWSHOLME, ZAMMIT (1976) a partir de quantificação do complexo formado entre a coenzima A com o ácido 5,5'-ditio-bis 2 nitrobenzóico (DTNB), adicionado ao meio, formando um complexo amarelo. O tampão de ensaio consistiu em Tris-base (100 mM), DTNB (0,4 mM), acetil-CoA (1,24 mM), Triton X-100 1% (v/v) e o homogeneizado. A reação foi iniciada pela adição de oxaloacetato (18,9 mM) ao meio e a leitura foi realizada a 25°C durante um intervalo de 10 minutos, em 412 nm com o uso do Victor (Victor3 1420 Multilabel Counter / PerkinElmer, Waltham, MA, USA). O resultado da atividade da enzima foi expresso em valores de $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{proteína}^{-1}$.

5.13. Análise da expressão de proteínas por Western Blotting

As amostras da artéria carótida foram homogeneizadas em tampão de RIPA contendo Tris-Base (20 mM), NaCl (137 mM), NP-40 (1%), Glicerol (10%) e coquetel de inibidores de fosfatase e protease (Sigma, USA). O homogeneizado foi centrifugado por 10 minutos a 4°C com 12000 rpm. O sobrenadante foi transferido para tubos e a concentração de proteína das amostras foi analisada pelo método de ácido bicinchonínico (BCA) (SMITH et al., 1985). Alíquotas do homogeneizado, 40 µg de proteína foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl pH 6,8 240mM; SDS 0,8%; β-mercaptoetanol 200 mM; Glicerol 40% e Azul de bromofenol 0,02 %). A análise dos níveis proteicos foi realizada pela técnica de *Western Blotting*. Para isso, foi utilizada a técnica de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE 10%), que consiste na migração de moléculas com carga, numa solução, decorrente da aplicação de um campo elétrico no aparelho para minigel (*Mini Protean*). Posteriormente, as proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose (*Amersham Biosciences, Piscataway, NJ*), do mesmo modo que foi separada no SDS-PAGE. As membranas foram coradas com *Ponceau S*, para a verificação das bandas proteicas obtidas pela eletroforese. A fim de bloquear ligações inespecíficas, a membrana foi incubada em solução contendo caseína, proteína que compete com os sítios de ligação e reduz a absorção inespecífica de conjugados da peroxidase. Em seguida, a membrana de nitrocelulose foi incubada overnight a 4 °C no seu anticorpo primário: VASN

(*Santa Cruz, USA, código: BC068575.1*), VASORIN (*Goat policlonal, 1:500*) e β -actina (*Rabbit policlonal, 1:1000*), que foi usado como normalizador. Depois de lavar a membrana para remover o anticorpo não ligado, a mesma foi exposta ao anticorpo secundário conjugado a *horseadish peroxidase* (HRP), direcionado a porções espécies-específicas do anticorpo primário. Posteriormente o complexo foi detectado mediante reação de quimiluminescência (ECL), visualizado e quantificado (número de pixels) pelo sistema *Image*, fornecido gratuitamente pela NIH (EUA) via internet.

5.14. Análise 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 resultados foram apresentados em média \pm erro padrão. A diferença entre as médias foi analisada mediante ANOVA (análise de variância) *One-Way e Two-Way*. Em caso de significância foi adotado o post-hoc de *Tukey* ou *Bonferroni* (seguido de ANOVA *Two-Way*) para comparação das médias individuais utilizando o *GraphPad Prism Software, San Diego, CA, EUA*). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de $P < 0,05$.

6. RESULTADOS DO ESTUDO 1

Nesse tópico, descreveremos os resultados do estudo 1 que foi feito com ratos *Wistar* de 8 semanas de idade, os quais foram divididos em quatro grupos de 3 animais em cada grupo.

6.1. Morfologia das artérias carótidas ao longo do tempo

A FIGURA 7 mostra as características morfológicas de uma artéria carótida com uma grande hiperplasia da neoíntima. As lâminas foram coradas com HE. As artérias contralaterais que foram usadas como controles apresentam uma única camada de CE, três a quatro camadas de células de músculo liso, posicionadas em sentido circular ao lúmen do vaso.

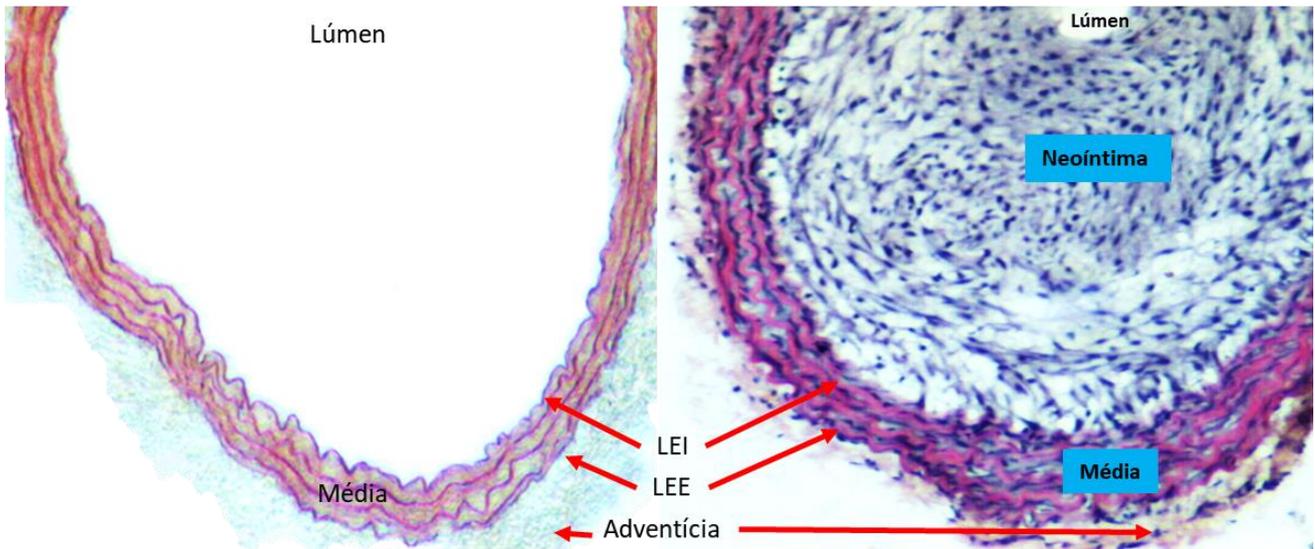


Figura 7- Morfologia da Artéria Carótida Comum lesionada (esquerda), mostrando formação de neointima.

A íntima é uma monocamada de CE que revestem a lâmina elástica interna (LEI). A camada média é o espaço entre a LEI e a lâmina elástica externa (LEE). A adventícia é a camada externa. A proliferação e migração de CMLV levam à formação de neointima e espessamento da camada média. A imagem foi capturada com ampliação de 40x. Lado direito da imagem, uma artéria com reestenose, ao lado esquerdo uma artéria em seu estado fisiológico.

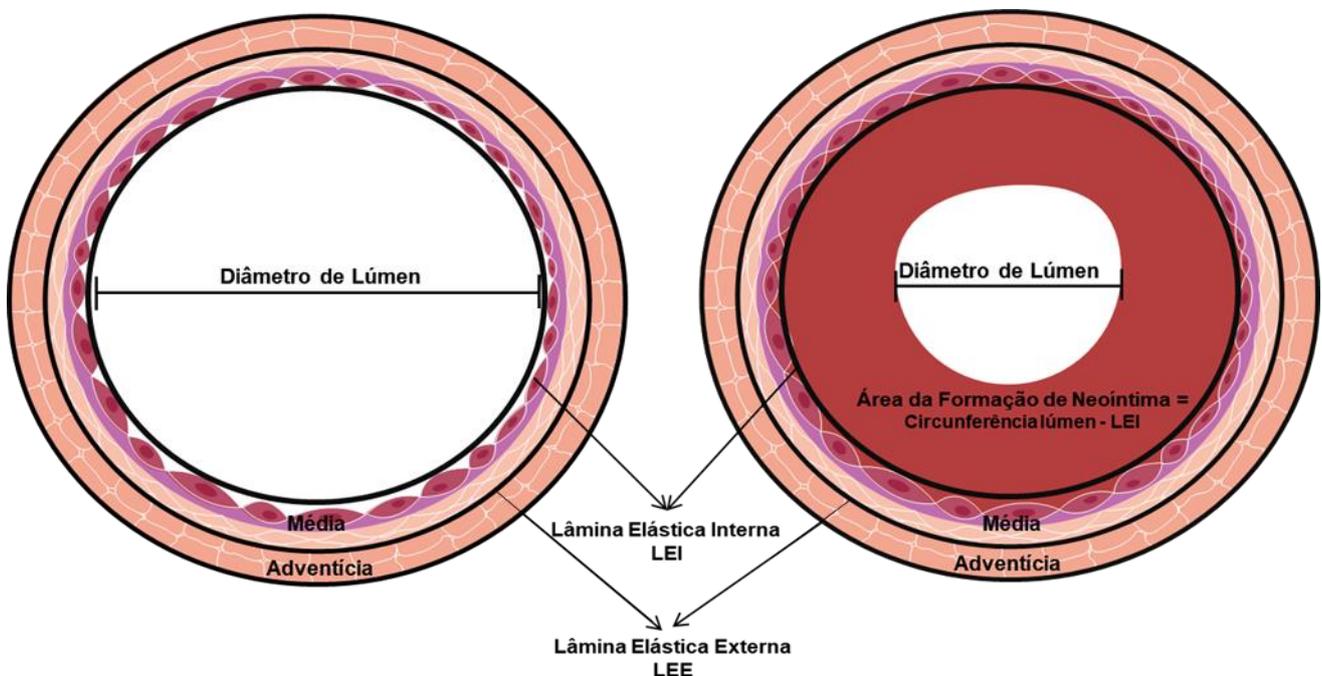


Figura 8- Imagem representativa das medidas morfológicas da Artéria Carótida.

A direita está uma simulação de uma artéria lesionada por cateter balão e a esquerda uma artéria em seu estado fisiológico (sem formação de neointima).

Vinte dias após a lesão por cateter balão, observamos a formação da camada neoíntima entre a túnica média, resultando na proliferação e migração das CMLV em direção à luz do vaso. No grupo de 20 dias, a neoíntima foi aumentada em comparação a artéria contra lateral (lado direito), sem lesão, que foi usado como controle ($0,008 \pm 0,001 \text{ mm}^2$, $p = 0,0006$), ao passo que no grupo de 40 dias, observamos um aumento exacerbado em comparação ao grupo de 20 dias ($0,016 \pm 0,001 \text{ mm}^2$, $p < 0,0001$). No grupo de 40 dias, foi observado o pico de formação da neoíntima (FIGURA 9). No grupo de 40 dias, ocorre a diminuição da camada neoíntima. Essa resposta foi observada no grupo de 60 dias após a lesão em comparação ao grupo controle ($0,011 \pm 0,001 \text{ mm}^2$, $p < 0,0001$). No grupo de 60 dias, a camada neointimal se estabiliza e o grupo de 80 dias é semelhante ao grupo 60 dias. Entretanto, a área da íntima é significativamente maior do que quando comparada ao controle. No grupo de 80 dias, a camada neointimal foi estabilizada ($0,012 \pm 0,001 \text{ mm}^2$, $p < 0,0001$).

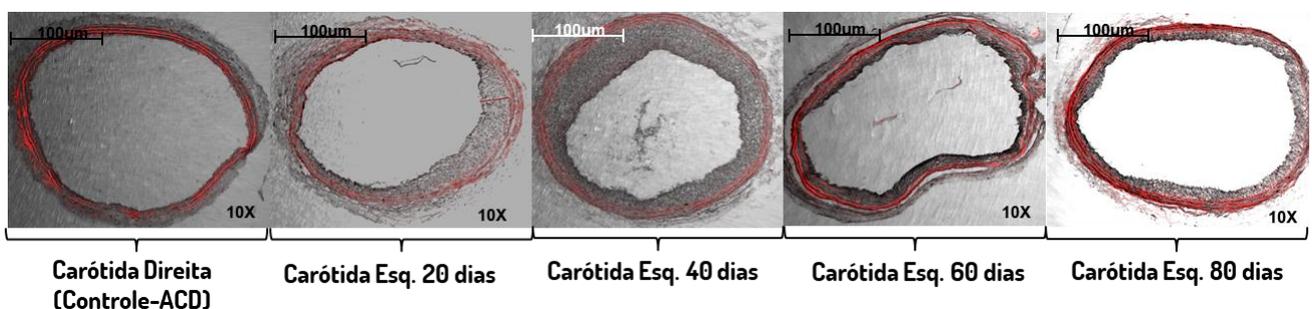
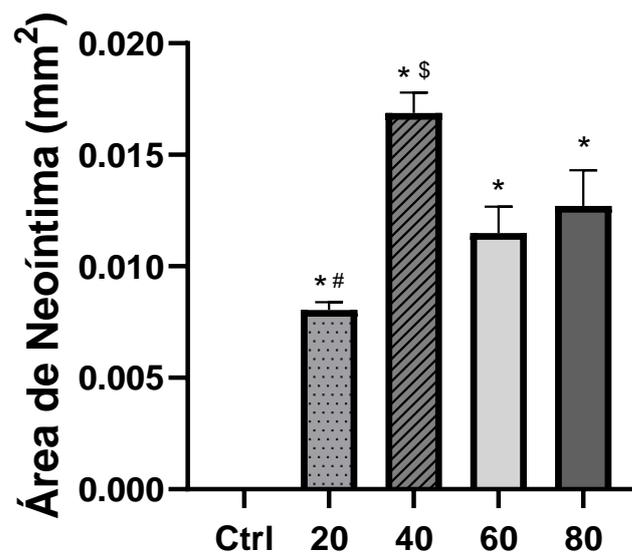


Figura 9- Formação da camada neoíntima.

Área neoíntima foi determinada através da diferença entre a lâmina elástica interna e o lúmen (LEI-Lúmen). Os dados foram representados por média e desvio padrão, a unidade de medida foi o mm².

* <0,0001 vs. Ctrl (controle, artéria carótida direita), # <0,005 vs. 40, 60, 80; \$ <0,05 vs. 60, 80 (ANOVA *One-Way*). (n=3).

Em relação à área da camada média (FIGURA 10), o único grupo em que não mudou em relação à artéria contra lateral, controle, foi o grupo de 80 dias. Os grupos 20, 40 e 60 dias após a lesão obtiveram aumento de 94% (p=0,0079), 82% (p=0,019) e 70% (p=0,03), respectivamente, em relação ao seu controle. A única interação entre os grupos da artéria lesionada foi uma diminuição da área da camada média do grupo 80 dias (p=0,05) em comparação com o grupo de 20 dias.

Foi observado um aumento da área total da camada média esquerda nos grupos 20 (0,33 ± 0,04), 40 (0,31 ± 0,04), 60 (0,29 ± 0,04, p= 0,01) em comparação a artéria direita controle, enquanto que para o grupo 80 dias não houve diferença estatística. Na artéria carótida direita, a área da camada média permaneceu a mesma entre os diferentes tempos, o que já era esperado, uma vez que essa artéria não passava pelo processo de lesão.

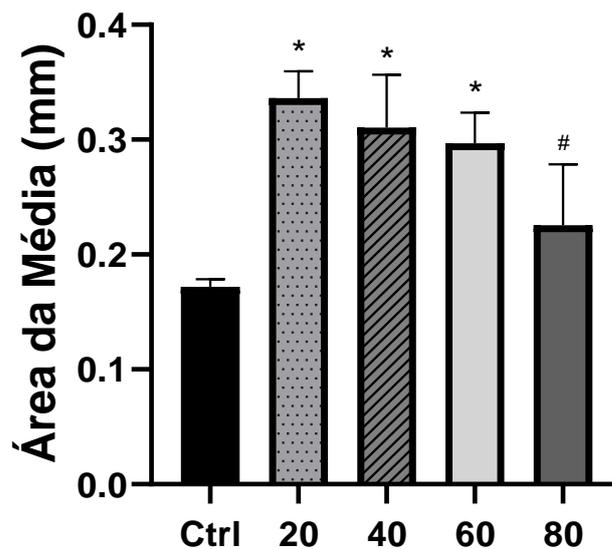


Figura 10- Área total da camada média.

Área da camada média da carótida esquerda (LEE-LEI), a área da camada média da carótida direita não foi diferente entre os grupos. *p <0,05 vs. Ctrl (controle, artéria carótida direita). #p <0,05 vs. 20 dias. (ANOVA *Two-Way*). Os dados foram representados em média e desvio padrão. (n=3).

Em relação ao diâmetro do lúmen nas artérias carótidas esquerda e direita (controle) (FIGURA 11), foi observado diminuição de 76%, 97%, 79% e 56% nos grupos 20, 40, 60 e 80 dias após a lesão em comparação ao controle (p < 0,05).

Por fim, foi observado uma diferença do lúmen nos grupos 40 ($p=0,0004$) e 80 dias ($p=0,0006$) em comparação ao grupo 20 dias e também no lúmen dos grupos 40 ($p=0,005$) e 60 dias ($p<0,005$) em comparação ao grupo 80 dias, e o grupo 40 ($p<0,0001$) é diferente em relação ao grupo de 60 dias ($p<0,0001$).

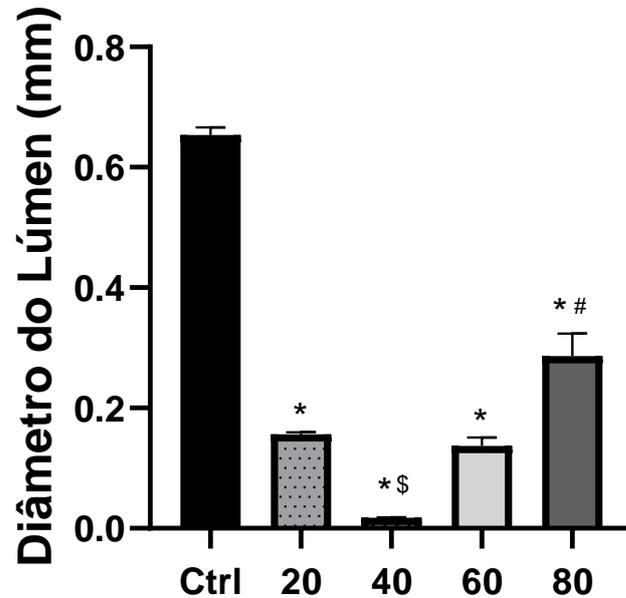


Figura 11- Diâmetro do lúmen.

O diâmetro do lúmen foi mensurado por ANOVA *One Way*. Os dados foram representados por média e desvio padrão, * $p < 0,05$ vs. Ctrl (controle, artéria carótida direita), # $p < 0,05$ vs. 20, 40, 60, \$ $p < 0,05$ vs. 20, 60. O diâmetro foi corrigido pela fórmula $\text{Diâmetro} = \text{circunferência} / \pi$. ($n=3$).

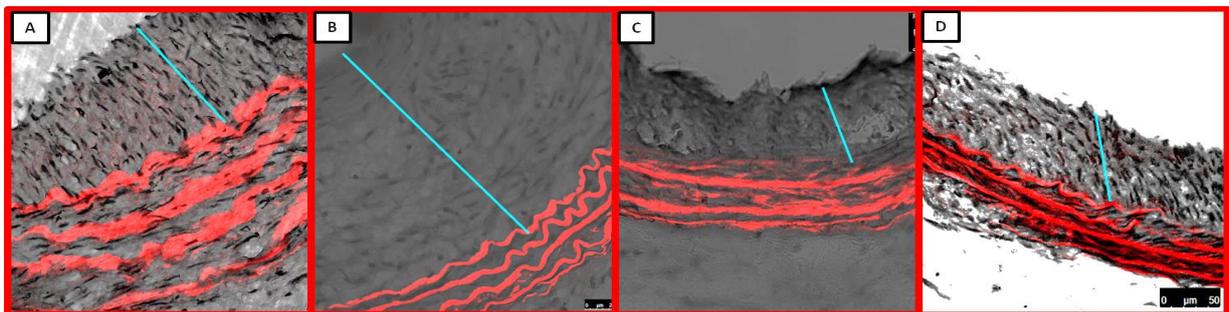


Figura 12- Curso de formação da neointima.

Corte histológico das artérias carótida direita e esquerda (lesionada). Coloração com hematoxilina e eosina mostrando o curso da lesão. Após 20, 40, 60 e 80 dias de lesão ($n = 3$ / grupo). Barra azul indica a formação neointimal. A= 20 dias B= 40 dias, C= 60 dias e D= 80 dias. As imagens foram capturadas com ampliação de 60x em um microscópio Confocal.

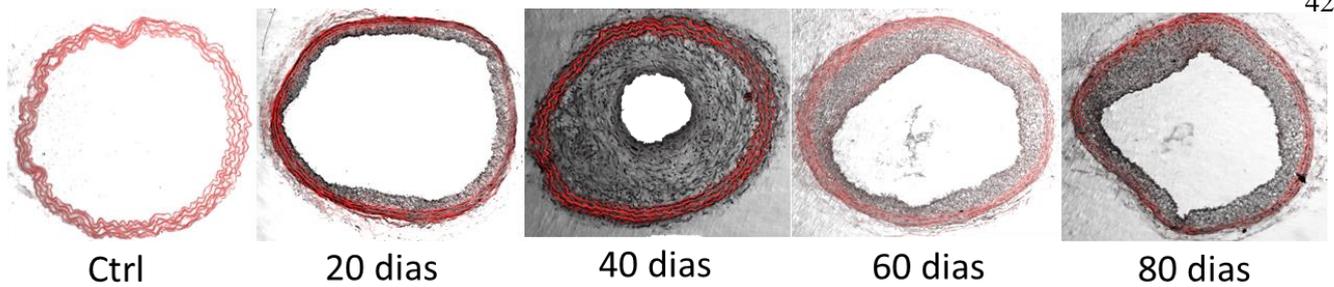


Figura 13- Curso de formação da neointima.

Corte histológico das artérias carótida direita e esquerda (lesionada). Coloração com hematoxilina e eosina. Imagens feitas no microscópio confocal. Após 20, 40, 60 e 80 dias de lesão (n = 3 / grupo). Seta preta indica a formação neointimal. As imagens foram capturadas ampliação de 10x.

6.2. Expressão de miRNAs

Como já citado, a expressão do miRNA-146a é alterada em doenças vasculares inflamatórias. Diante disso, nós verificamos a expressão do miRNA-146a por RT-PCR (FIGURA 14). A artéria carótida direita de cada grupo foi utilizada como controle da artéria esquerda que foi lesionada com cateter balão. Como pode ser observado na FIGURA 14, o grupo 20 dias ($272,71 \pm 43,1$, $p=0,0002$) apresentou um aumento de aproximadamente 172% em relação ao seu controle, enquanto o grupo 40 dias ($277,31 \pm 9,1$, $p=0,0001$) apresentou um aumento de aproximadamente 177% do seu controle. Os grupos 60 ($135,9 \pm 34,5$) e no grupo de 80 dias ($152,22 \pm 25,8$) não apresentaram diferença estatística significativa. Além disso, foi observado aumento da expressão do miRNA-146a nos grupos 20 e 40 dias em comparação aos grupos 60 (20 dias - $p=0,001$; 40 dias - $p=0,001$) e 80 dias (20 dias - $p=0,006$; 40 dias - $p=0,005$) em relação aos seus controles.

A interação entre os grupos na artéria carótida esquerda o grupo 20 estava aumentado em relação ao grupo de 60 dias ($p=0,001$) e no grupo 80 dias ($p=0,006$), o grupo 40 também está aumentado em relação ao grupo de 60 dias ($p=0,001$) e no grupo de 80 dias ($p=0,005$).

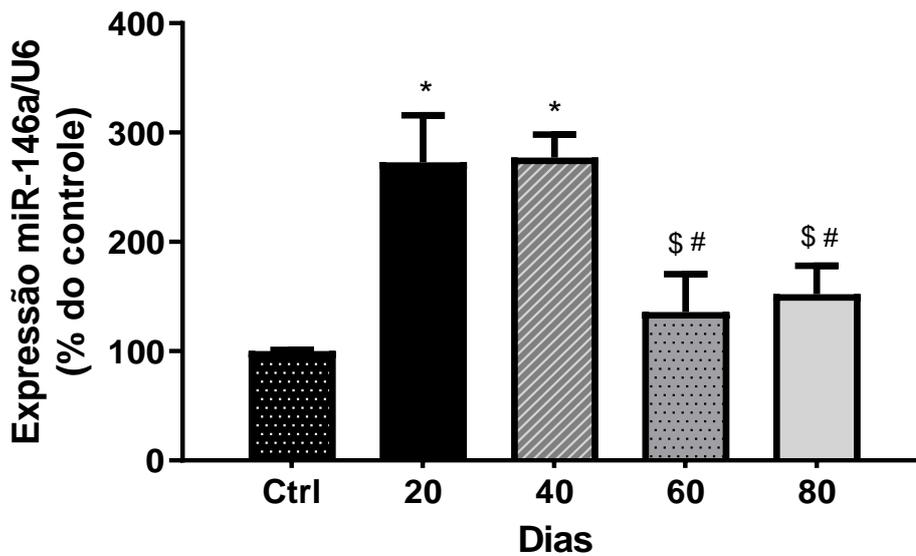


Figura 14- Expressão do miRNA-146a em porcentagem.

* $p < 0,05$ vs. controle (Ctrl), # $p < 0,05$ vs. 20 dias, \$ $p < 0,05$ vs. 40 dias. (ANOVA *One-Way*). Os dados foram representados em média e desvio padrão. (n=3).

6.3. Expressão gênica

Na sequência, nós analisamos a expressão gênica da VASN, uma vez que esse gene é alvo do miRNA-146a, que o regula negativamente. Desta forma, a FIGURA 15 mostra uma diminuição da expressão gênica da VASN nos grupos 40 ($p=0,0001$ – aproximadamente 90%) e 80 dias ($p=0,0001$ - aproximadamente 90%). Já para os grupos 20 e 60 dias, nós não observamos diferença estatística entre as artérias esquerda e direita. Ademais, foi observado que a expressão gênica da VASN estava diminuída na artéria carótida esquerda no grupo 40 dias em comparação ao grupo 60 dias ($p=0,0003$), enquanto, também, foi observada uma diminuição da expressão gênica da VASN no grupo 80 dias em comparação ao grupo 60 dias ($p=0,0003$).

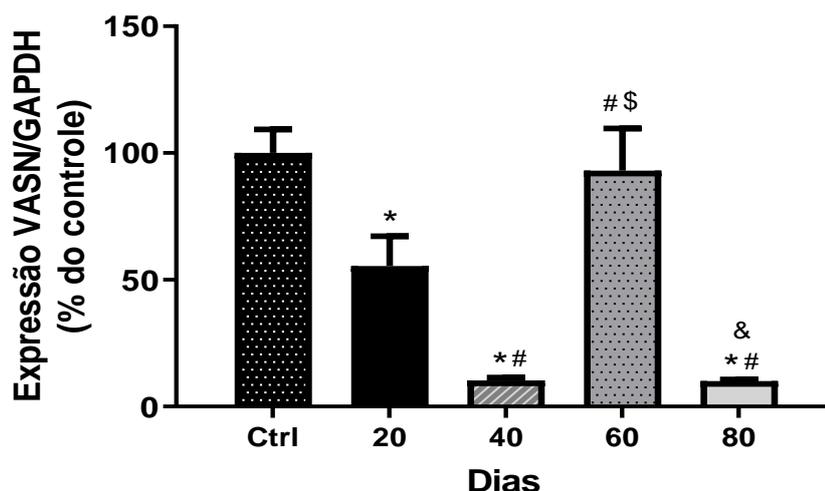


Figura 15- Expressão do gene VASN normalizado pelo GAPDH expresso em porcentagem, na artéria carótida esquerda.

* $p < 0,05$ vs. controle (Ctrl), # $p < 0,05$ vs. 20 dias, \$ $p < 0,05$ vs. 40 dias, & $p < 0,05$ vs. 60 dias. (ANOVA *One-Way*). Os dados foram representados em média e desvio padrão. (n=3).

Como o TGF- β é um fator inflamatório regulado negativamente pela VASN, nossa próxima etapa foi avaliar a expressão gênica de TGF- β . A artéria carótida direita de cada grupo foi utilizada como controle da artéria esquerda que foi lesionada com cateter balão. Assim, a FIGURA 16 mostra que o grupo 20 dias ($p=0,004$) apresentou um aumento de aproximadamente 52%; o grupo 40 dias ($p < 0,0001$) apresentou uma diminuição de aproximadamente 91%; o grupo de 60 dias ($p < 0,0001$) apresentou um aumento de 108%, enquanto que o grupo de 80 dias ($p < 0,0001$) apresentou um aumento de 281%. Todos os grupos foram comparados com seus respectivos controles.

Quando analisada a interação entre os grupos na artéria carótida esquerda, observou-se que a expressão gênica de TGF- β no grupo 20 dias estava diminuída em relação aos grupos 40 ($p < 0,0001$), 60 ($p=0,0004$) e 80 dias ($p < 0,0001$), sendo que o grupo que apresentou maior expressão do TGF- β foi o de 80 dias. Além disso, observou-se que a expressão gênica de TGF- β estava diminuída no grupo 40 dias em comparação aos grupos 60 ($p < 0,0001$) e 80 dias ($p < 0,0001$). Por fim, o grupo 60 dias apresentou uma diminuição da expressão gênica de TGF- β em relação ao grupo 80 dias ($p < 0,0001$).

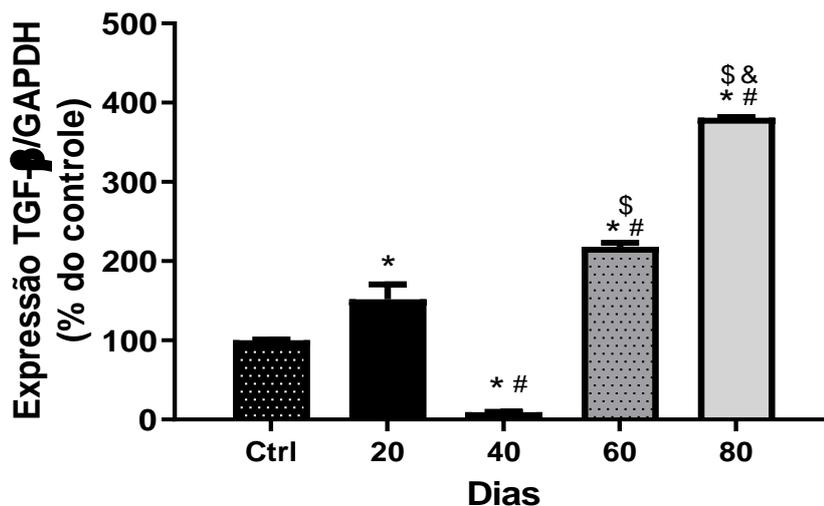


Figura 16- Expressão do TGF-β normalizado pelo GAPDH expresso em porcentagem, na artéria carótida esquerda.

* $p < 0,05$ vs. controle (Ctrl), # $p < 0,05$ vs. 20 dias, \$ $p < 0,05$ vs. 40 dias, & $p < 0,05$ vs. 60 dias. (ANOVA *One-Way*). Os dados foram representados em média e desvio padrão. (n=3).

7. RESULTADOS DO ESTUDO 2

Nesse tópico apresentaremos os resultados parciais o estudo 2, no qual ainda está em desenvolvimento.

7.1 Massa Corporal

A FIGURA 17 mostra a progressão da massa corporal dos grupos desde a semana em que os animais chegaram em nosso biotério com 60 dias de vida (massa inicial), até a semana que os animais foram eutanasiados.

Os animais dos 4 grupos não apresentavam diferença na massa corporal na semana inicial (Pré TF – SS: $344,3 \pm 9$ g, ST: $331,8 \pm 3$ g, LS: $343,1 \pm 10$ g, LT: $341,4 \pm 9$ g), onde houve a randomização dos animais entre treinados e sedentários. Entretanto, é possível observar que na 5ª semana o grupo SS apresenta um aumento da massa corporal, sendo que após a 8ª semana os grupos ST e LT mantem uma progressão da massa corporal mais baixa quando comparado com os grupos SS e LS. Houve uma manutenção da massa corporal dos grupos treinados (ST e LT) ao final do protocolo de TF em relação aos grupos sedentários (SS e LS) (Pós TF – SS: $492,1 \pm 14$ g, ST: $413,8 \pm 5$ g, LS: $485,1 \pm 4$ g, LT: $437,7 \pm 18$ g). A literatura já demonstrou o efeito do TF aeróbico em relação à atenuação da massa corporal, porém depende do protocolo utilizado (frequência, intensidade e duração do exercício). Essa manutenção ou diminuição da massa corporal dá-se devido a um aumento no gasto calórico, pois o TF

eleva o metabolismo basal auxiliando na redução do tecido adiposo, isso pode explicar a diferença entre os animais treinados e sedentários (TOTH, BECKETT, POEHLMAN, 1999).

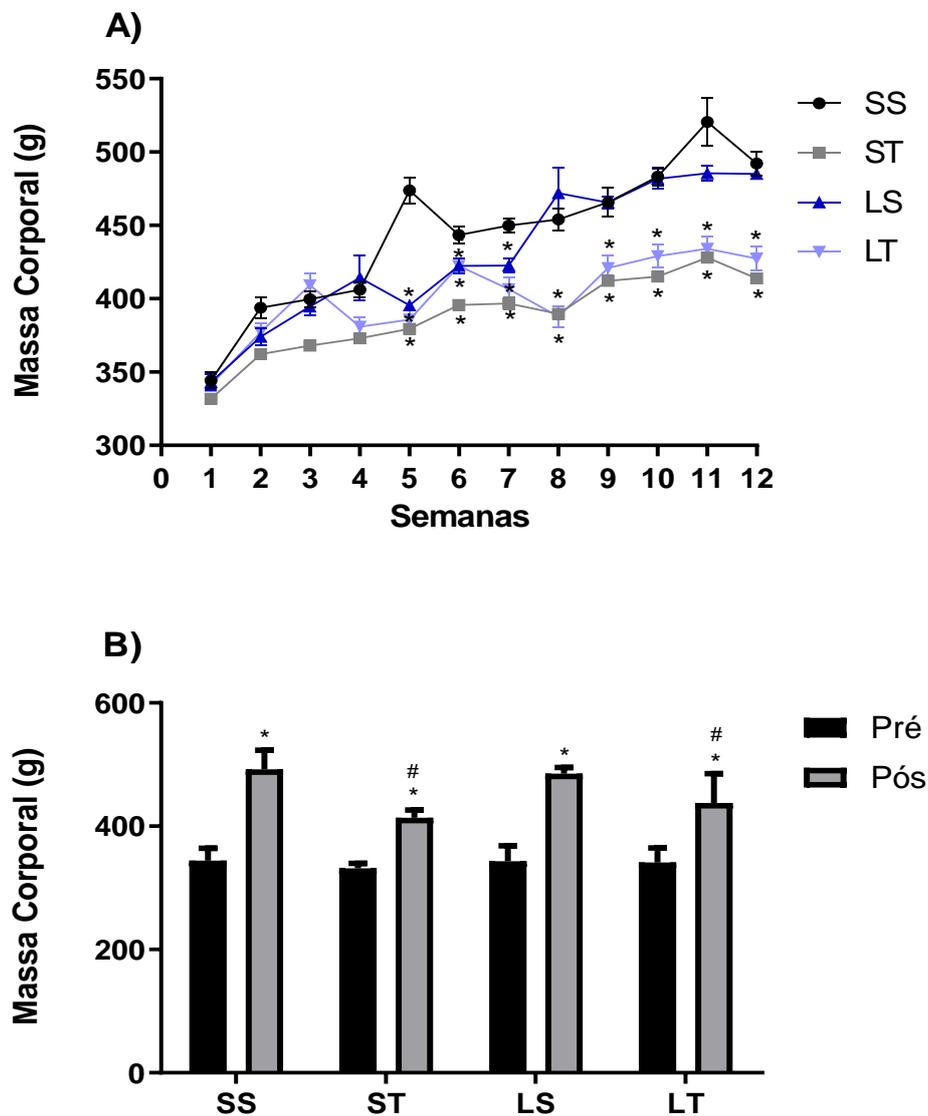


Figura 17- Massa Corporal dos animais

A) Massa corporal ao longo das semanas, após a cirurgia e durante a fase de TF aeróbico; sendo a semana 1 a chegada dos animais no biotério, semana 2 a semana de cirurgia, da 3 a 12 semanas de TF e a semana 12 foi a eutanásia. * $p < 0,05$ vs. ST e LT **B)** Massa corporal pré e pós TF. Resultado expressos em média \pm desvio padrão * $p < 0,001$ vs. pré, # $p < 0,05$ vs. SS e LS (pós). (n=5). A análise estatística utilizada foi ANOVA *Two-Way*.

7.2 Pressão Arterial

Os valores de PA expressos em milímetros de mercúrio (mmHg) pré e pós TF estão representados na FIGURA 18. Na FIGURA 18 A, apresenta a PA sistólica pré e pós TF, podemos observar que todos os grupos eram equivalentes pré TF, ao final do protocolo de treinamento os grupos SS e LT eram diferente o pré do pós TF (SS pré: 119 ± 1 mmHg, SS pós: 133 ± 7 mmHg e LT pré:

121 ± 0,8 mmHg, LT pós: 110 ± 3 mmHg). Os grupos ST e LT apresentaram uma diferença em relação aos seus respectivos grupos controle SS e LS pós TF (Pós TF – SS: 133 ± 7 mmHg; ST: 110 ± 4 mmHg; LS: 123 ± 2 mmHg; LT: 110 ± 3 mmHg). Isso demonstra que o TF de natação de baixa intensidade e longa duração foi eficaz em reduzir a PA sistólica.

A FIGURA 18 B apresenta a PA média pré e pós TF onde todos os grupos eram equivalentes no pré TF e ao após 10 semanas de TF é possível observar que os grupos SS pré TF (117 ± 1,5 mmHg) foi diferente do SS pós (130 ± 2,4 mmHg), onde houve um aumento de 13 mmHg e o grupo LT pré (117 ± 1,7 mmHg) foi diferente do LT pós TF (107 ± 3,3 mmHg) obteve uma diminuição de 10 mmHg.

Comparando os grupos pós TF os grupos ST e LT foram diferentes comparados com seus controles SS e LS (pós TF – SS: 130 ± 2,4 mmHg; ST: 112 ± 11,6 mmHg; LS: 121 ± 3,1 mmHg; LT: 107 ± 3,3 mmHg).

Observa-se que o TF de natação de baixa intensidade e longa duração foi eficaz em reduzir a PAS e PAM dos grupos ST e LT em relação aos grupos controles que eram sedentários (SS e LS).

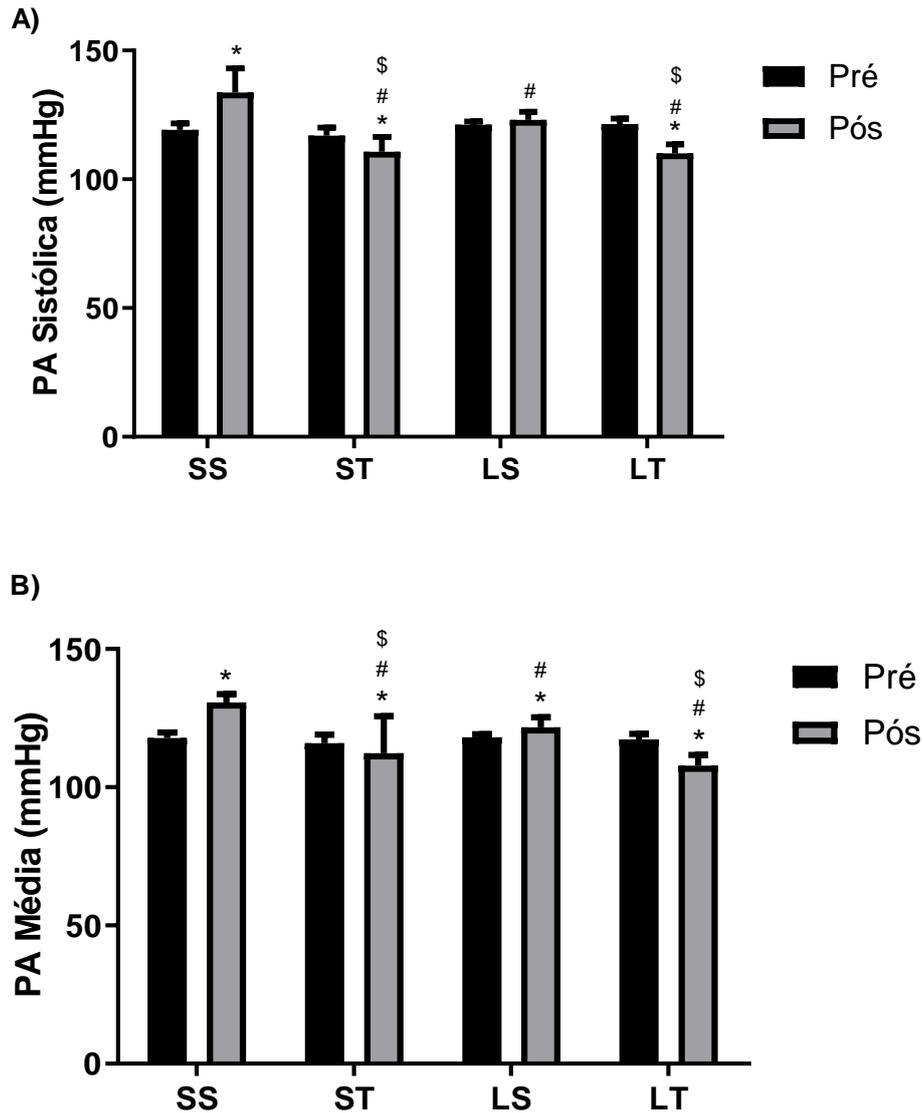


Figura 18- PA sistólica e PA média

A) Pressão Arterial Sistólica pré e pós TF aeróbico * $p < 0,05$ vs. pré; # $p < 0,001$ vs. SS (pós); \$ $p < 0,05$ vs. LS (pós). **B)** Pressão Arterial média pré e pós TF. * $p < 0,05$ vs. pré; # $p < 0,001$ vs. SS (pós); \$ $p < 0,05$ vs. LS (pós). Resultado expressos em média \pm desvio padrão, $n=5$. A análise estatística utilizada foi ANOVA *Two-Way*.

7.3 Frequência Cardíaca

Observamos uma bradicardia de repouso nos grupos treinados, ST e LT, portanto, reduzindo os valores de FC destes grupos quando comparado aos grupos mantidos sedentários no mesmo período experimental (Pós TF- SS: 385 ± 10 ; ST: 377 ± 20 ; LS: $405 \pm 1,2$; LT: $305 \pm 25,8$ bpm).

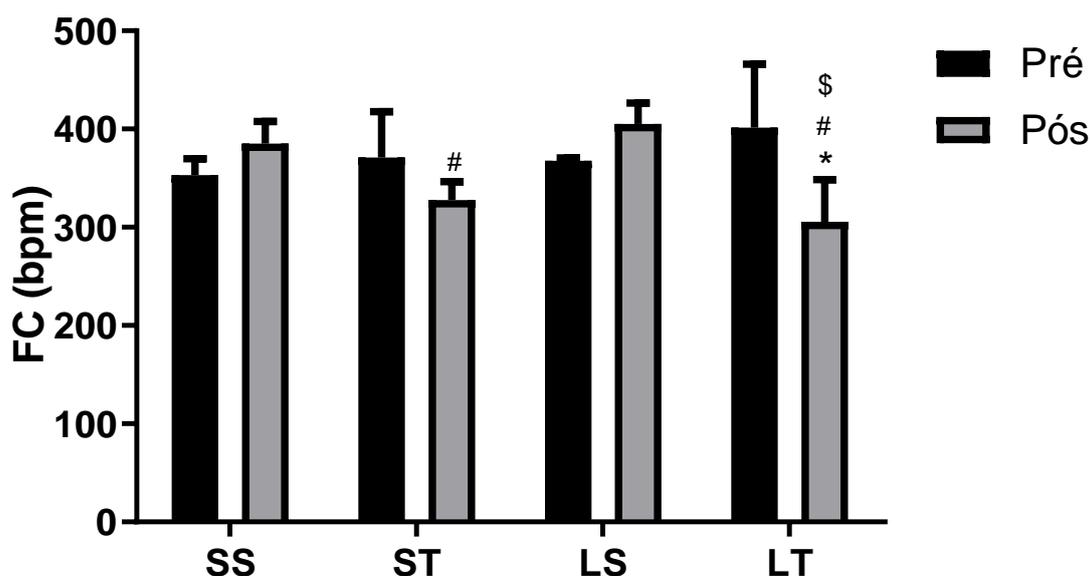


Figura 19- Frequência Cardíaca

FC pré e pós TF aeróbico, * $p < 0,05$ vs. pré; # $p < 0,05$ vs. LS (pós); \$ $p < 0,05$ vs. SS (pós). Resultado expressos em média \pm desvio padrão, $n=5$. A análise estatística utilizada foi ANOVA *Two-Way*.

7.4 Teste de Esforço Físico Máximo

O teste de tolerância ao esforço foi um dos parâmetros avaliados para comprovarmos a eficácia do TF. Os animais foram submetidos ao teste em esteira rolante até a exaustão pré e pós o período de TF de natação. Foram avaliadas as variáveis distância percorrida (m), tempo (min) e velocidade (m.min⁻¹).

Os resultados do teste realizado antes e após as 10 semanas de protocolo experimental estão representados na FIGURA 20. As Figuras 20A, 20B e 20C mostram que os valores de distância percorrida (SS: $408,4 \pm 19,6$; ST: $505,6 \pm 60,7$; LS: $521,3 \pm 64,6$; LT: $512,2 \pm 11,7$ m), tempo (SS: $24 \pm 1,1$; ST: $27,1 \pm 3,6$; LS: $27,5 \pm 4,3$; LT: $27,5 \pm 0,7$ min), e velocidade (SS: $28 \pm 1,4$; ST: $30,7 \pm 3,2$; LS: $30 \pm 4,2$; LT: $31,2 \pm 1,4$ m.min⁻¹), respectivamente, foram semelhantes entre os grupos Pré TF. Entretanto, os animais treinados aumentaram significativamente a distância percorrida (SS: $534,6 \pm 46,7$; ST: $848,2 \pm 85,9$; LS: $516,6 \pm 7,8$; LT: $1145 \pm 49,4$ m), o tempo (SS: $28 \pm 2,5$; LT: $36,3 \pm 3,9$; LS: $27,3 \pm 0,4$; LT: $43,2 \pm 2,3$ min) e a velocidade (SS: $31 \pm 2,8$; ST: $39,7 \pm 3,8$; LS: $31 \pm 1,4$; LT: $46,2 \pm 2,4$ m.min⁻¹) no teste Pós TF.

É importante ressaltar que embora o teste não tenha sido da modalidade específica ao tipo de TF realizado, ele pode proporcionar bons indícios da melhora da capacidade máxima de realização de esforço físico aeróbico, tais como, melhora do metabolismo oxidativo e cardiopulmonar, já é um modelo bem estabelecido na literatura.

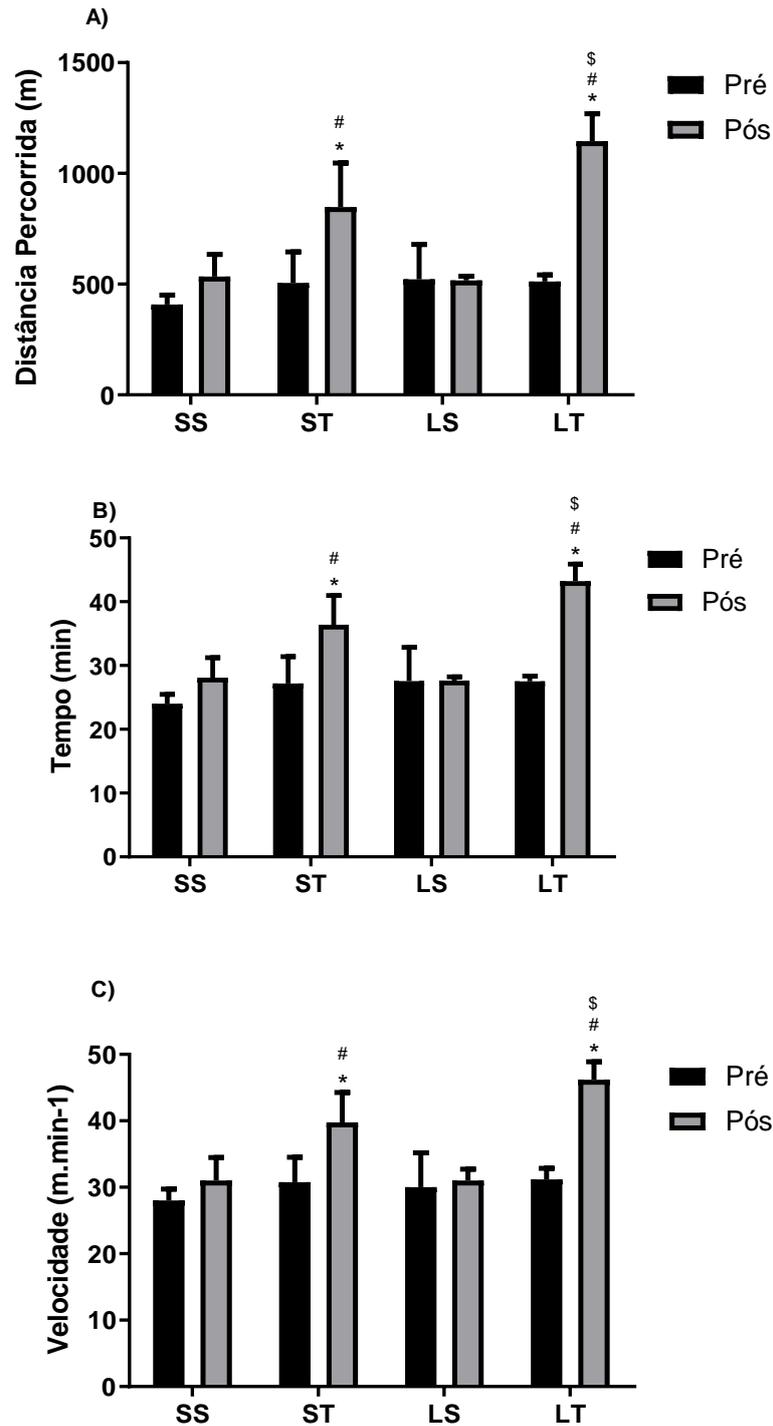


Figura 20- Teste de esforço físico máximo

A) Distância (metros), * $p < 0,01$ vs. pré; # $p < 0,001$ vs. SS e LS (pós), \$ $p < 0,05$ vs. ST (pós). **B)** Tempo (minutos), * $p < 0,01$ vs. pré; # $p < 0,001$ vs. SS e LS (pós), \$ $p < 0,05$ vs. ST (pós). **C)** Velocidade (metros por minutos-1), * $p < 0,01$ vs. pré; # $p < 0,001$ vs. SS e LS (pós), \$ $p < 0,05$ vs. ST (pós). Resultado expressos em média \pm desvio padrão, $n = 5$. A análise estatística utilizada foi ANOVA *Two-Way*.

7.5 Peso dos Tecidos

Um dos parâmetros também considerados para relatar a eficácia de um protocolo de TF é hipertrofia cardíaca. Uma das ferramentas utilizadas para determinar a hipertrofia cardíaca é pelo

aumento do peso do ventrículo esquerdo. Na FIGURA 21, mostra-se que há uma tendência no aumento do peso do VE corrigido pelo comprimento da tíbia dos animais lesionados treinados em comparação aos sedentários (SS: $21,33 \pm 0,30$ mg/mm; ST $20,99 \pm 1,1$ mg/mm; LS: $17,58 \pm 1,2$ mg/mm; LT: $20,9 \pm 4,5$ mg/mm). O peso do ventrículo direito e o átrio não apresentaram diferença de peso entre os grupos.

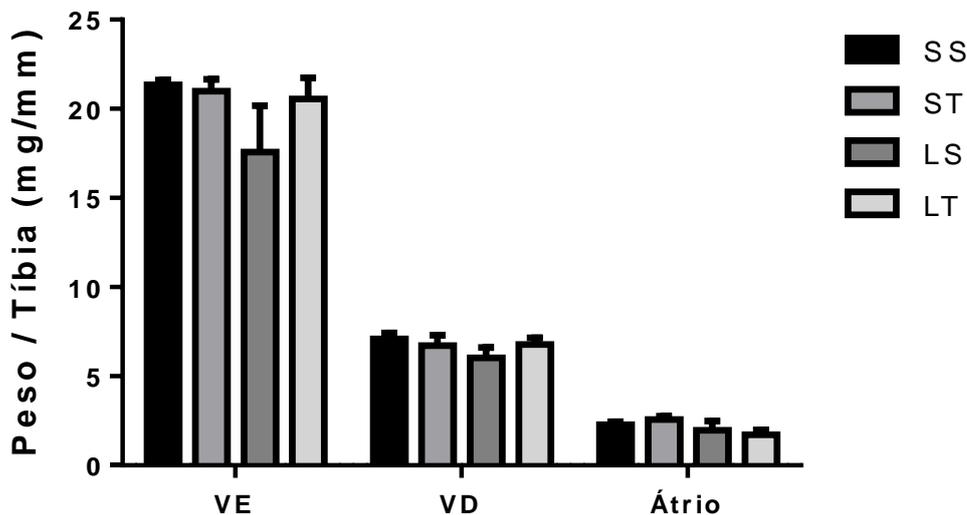


Figura 21- Peso do tecido cardíaco (VE - Ventrículo Esquerdo, VD - Ventrículo Direito e Átrio) O peso dos tecidos foi corrigido pelo comprimento da tíbia. Resultados expressos como média \pm erro padrão, n=5. A análise estatística utilizada foi ANOVA One-Way.

Quando analisados os pesos corrigidos pelo comprimento da tíbia de três músculos esqueléticos, tem-se que tanto o músculo plantar quanto o gastrocnêmio sofreram atrofia frente à DM. Considerando o tipo de estímulo gerado com o TFA de natação, de fato não se almejava que este fosse eficiente em reverter o quadro atrofico, tal qual os dados relatam na FIGURA 21. O sóleo teve como variáveis Pós ES: $5,20 \pm 1,31$ mg/mm; Pós ET: $6,78 \pm 2,28$ mg/mm; Pós DS: $3,64 \pm 0,16$ mg/mm; Pós DT: $3,38 \pm 0,41$ mg/mm. Já o plantar teve como variáveis Pós ES: $10,05 \pm 0,39$ mg/mm; Pós ET: $9,44 \pm 0,57$ mg/mm; Pós DS: $8,22 \pm 0,42$ mg/mm; Pós DT: $7,14 \pm 0,24$ mg/mm. Por fim, o gastrocnêmio teve como variáveis Pós ES: $53,81 \pm 0,94$ mg/mm; Pós ET: $51,86 \pm 2,36$ mg/mm; Pós DS: $39,79 \pm 1,94$ mg/mm; Pós DT: $38,27 \pm 2,09$ mg/mm.

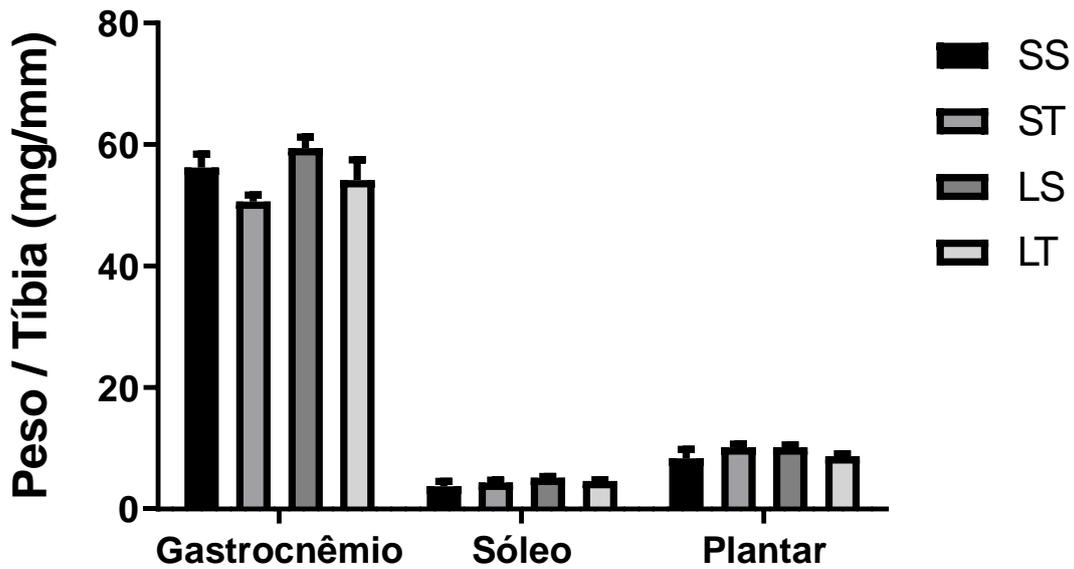


Figura 22- Peso do tecido muscular esquelético

O peso dos tecidos foi corrigido pelo comprimento da tíbia. Resultados expressos como média \pm erro padrão, $n=5$. A análise estatística utilizada foi ANOVA *One-Way*.

7.6 Atividade da Enzima Citrato Sintase

O aumento da atividade das enzimas oxidativas presentes na mitocôndria é um indicativo da otimização do metabolismo aeróbico, por isso este parâmetro também foi analisado para comprovarmos a eficiência do TF. A FIGURA 23 demonstra que houve um aumento da atividade da enzima citrato sintase no músculo sóleo de ratos do grupo controle e lesionado treinado em relação aos grupos controles que se mantiveram sedentários (SS: 100 ± 13 , ST: 146 ± 15 , LS: 90 ± 10 e LT: 132 ± 8 dado em porcentagem).

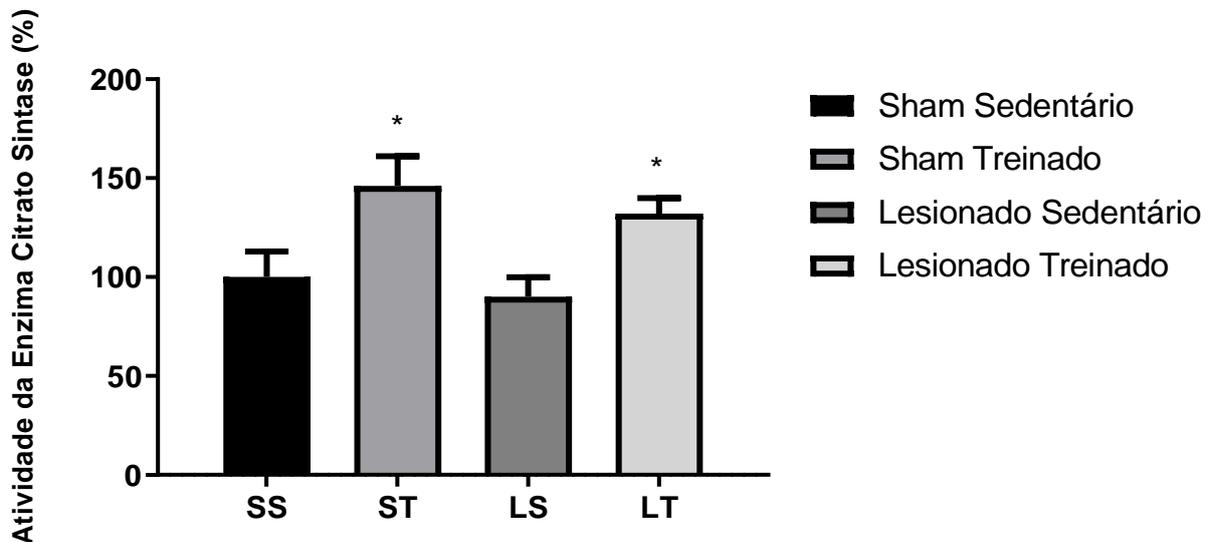


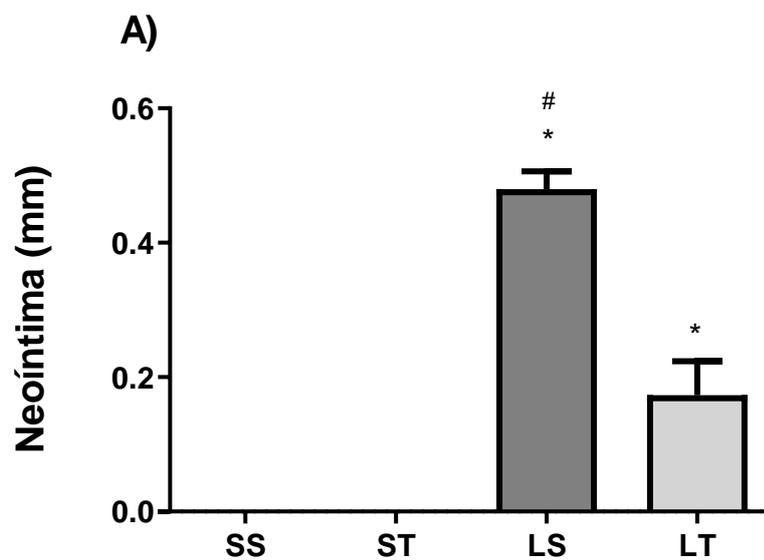
Figura 23- Atividade da enzima citrato sintase (%)

Atividade da enzima citrato sintase no músculo sóleo representada em valores de porcentagem de proteína. * $p=0,05$ vs. SS e LS. Resultado expressos em média \pm desvio padrão, $n=5$. A análise estatística utilizada foi ANOVA *One-Way*.

7.7 Morfologia das artérias carótidas

7.7.1 Formação da neoíntima

A formação da camada neoíntima é um indicativo de que o procedimento de lesão por cateter balão foi eficiente para denudar o endotélio vascular, portanto a FIGURA 24 mostra as características morfológicas das artérias carótidas (esquerda). A figura demonstra que os grupos *Shams*, que não sofreram a lesão, não houve a hiperplasia da íntima, já o grupo lesionado sedentário apresentou um aumento da neoíntima, esse aumento foi amenizado no grupo que lesionado que realizou o TF (LT), (SS: 0 ± 0 , ST: 0 ± 0 , LS: $0,480 \pm 0,05$ e LT: $0,170 \pm 0,1$ mm).



B)

Sham Sedentário

Sham Treinado

Lesionado Sedentário

Lesionado Treinado

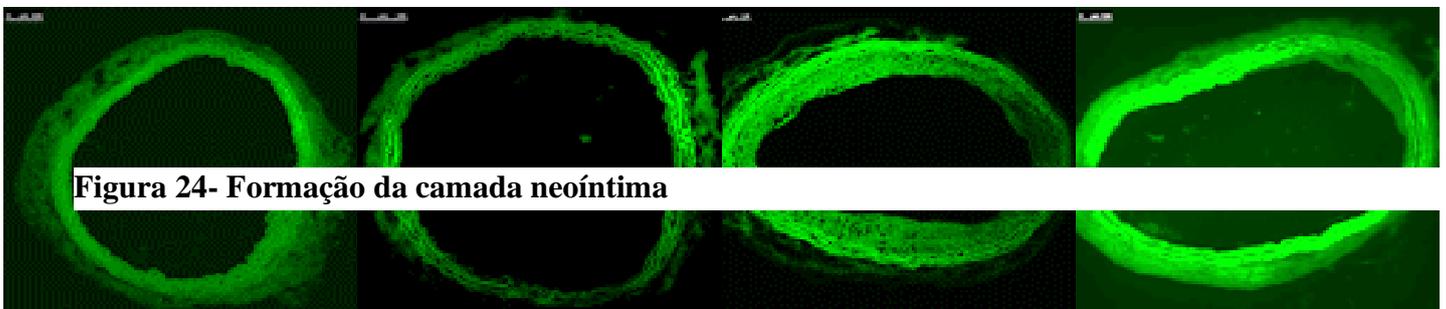
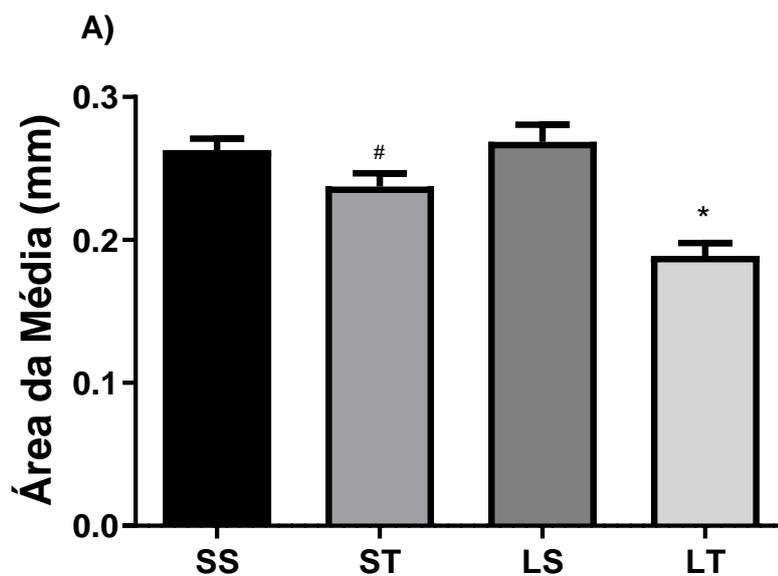


Figura 24- Formação da camada neoíntima

objetiva 10x, com fluorescência intrínseca vascular. Resultado expressos em média \pm desvio padrão, $n=5$. A análise estatística utilizada foi ANOVA *One-Way*.

7.7.2 Área da Média

Devido a migração de CMLV da camada média para a íntima investigamos se a mudança morfológica na camada média, o que é apresentado na FIGURA 25. A figura demonstra que os grupos *Shams*, não houve diferença morfológica na média, já o grupo lesionado treinado apresentou um diminuição da camada média em relação ao seu grupo controle (LS) e também aos grupos SS e ST, (SS: $0,26 \pm 0,02$, ST: $0,23 \pm 0,03$, LS: $0,26 \pm 0,05$ e LT: $0,18 \pm 0,02$ mm).



B)

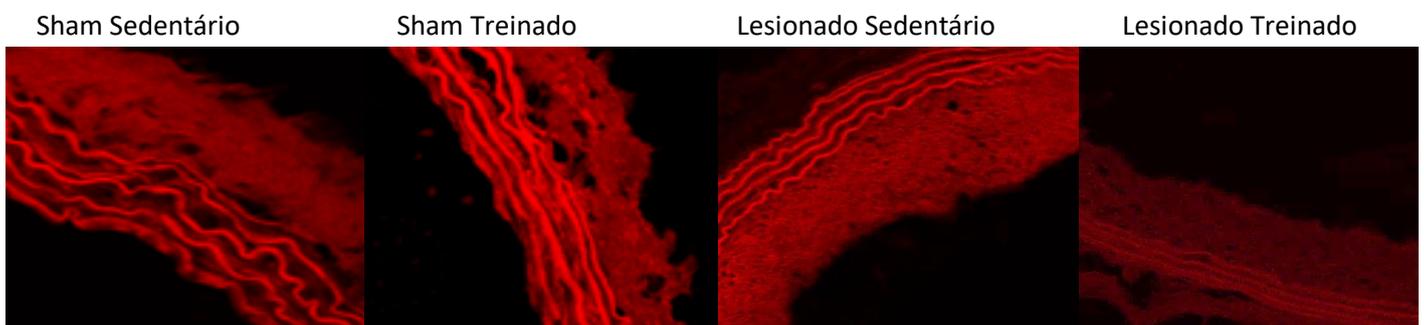


Figura 25- Camada média

Área da camada média foi determinada através da diferença entre a lâmina elástica interna e o lúmen (LEE-LEI), a unidade de medida foi o mm. A) Alteração da camada média, * $p < 0,0001$ vs. SS, ST e LT e # $p < 0,05$ vs. LS. B) Imagens representativas do gráfico A, imagens capturadas em microscopia confocal, na objetiva 10x, com fluorescência intrínseca vascular. Resultado expressos em média \pm desvio padrão, $n=5$. A análise estatística utilizada foi ANOVA *One-Way*.

7.7.3 Diâmetro do Lúmen

O diâmetro do lúmen que compreende o espaço interno ou a cavidade dentro das artérias, no qual a reestenose estreita. Essa medida é apresentada na FIGURA 26. A figura demonstra que entre os grupos *Shams*, não houve diferença morfológica, já o grupo lesionado sedentário apresentou uma diminuição lúmen mais acentuada em relação ao seu grupo controle (SS), o grupo LT não apresentou diferença em comparação aos grupos controle (ST), já em relação ao seu controle sedentário (LS) o lúmen estava aumentado no grupo LT (SS: $0,7 \pm 0,06$, ST: $0,8 \pm 0,06$, LS: $0,4 \pm 0,2$ e LT: $0,6 \pm 0,02$ mm).

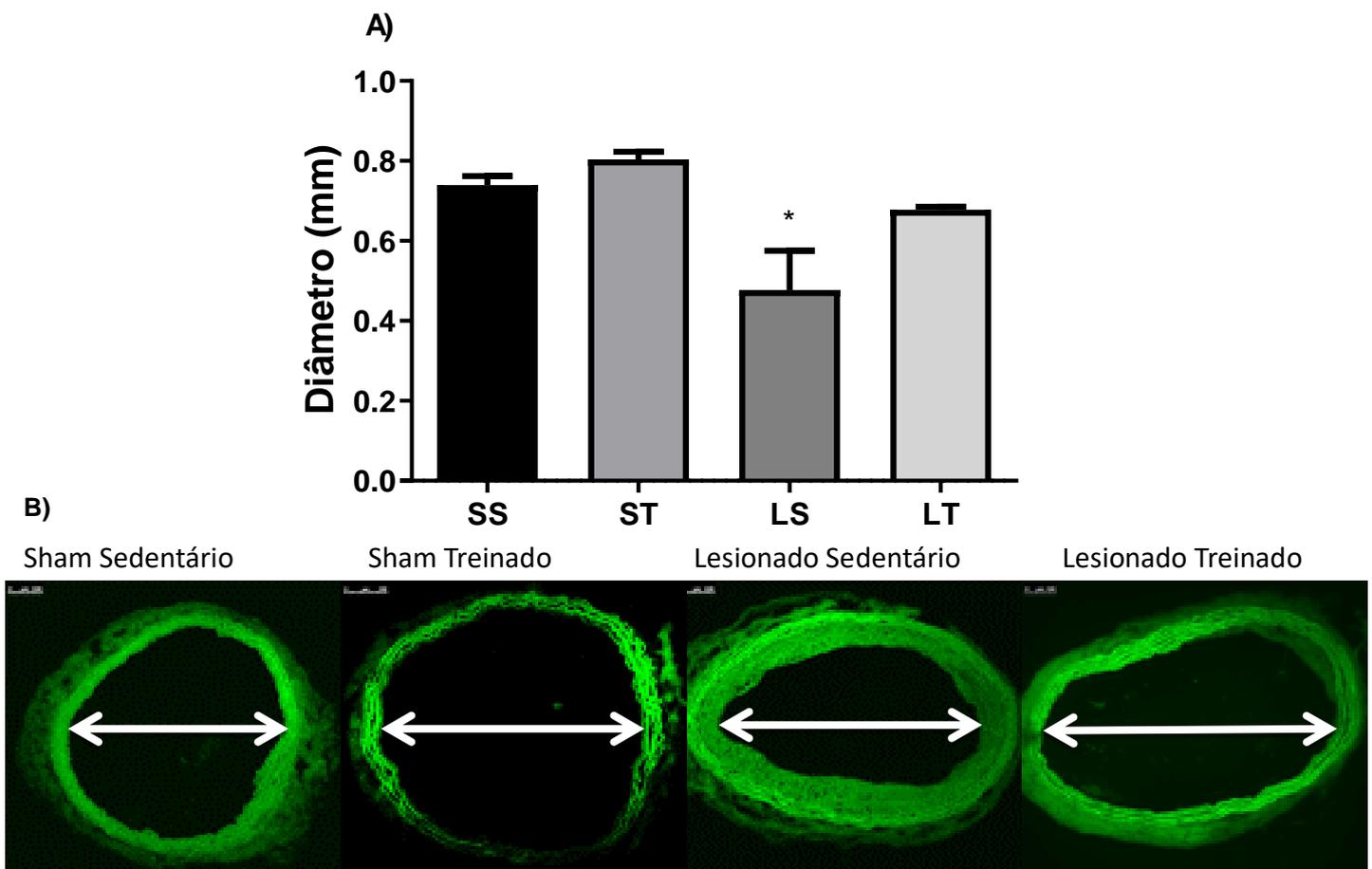


Figura 26- Diâmetro do Lúmen

O diâmetro do lúmen foi corrigido através da fórmula $\text{Diâmetro} = \text{circunferência} / \pi$, a unidade de medida foi o mm. A) Diferença do lúmen vascular, * $p < 0,001$ vs. SS, ST e LT. B) Imagens representativas do gráfico A, imagens capturadas em microscopia confocal, na objetiva 10x, com fluorescência intrínseca

vascular. Resultado expressos em média \pm desvio padrão, n=5. A análise estatística utilizada foi ANOVA *One-Way*.

7.8 miRNA-146a e genes alvos - Reestenose

Com observado na introdução, especula-se que, a hiperplasia da íntima vascular é amenizada com o TF aeróbico, portanto, passou-se às análises gênicas de miRNA e genes-alvos. Na FIGURA 27, é possível se observar que não houve a mudança de expressão entre os grupos *Shams*, já entre os grupos lesionados houve uma redução de 85% na expressão relativa do miRNA-146a do grupo LT quando comparado com o grupo LS. (SS: $100 \pm 4,3$; ST: $147 \pm 23,8$; LS: $231 \pm 26,6$ e LT: $146 \pm 21,1\%$).

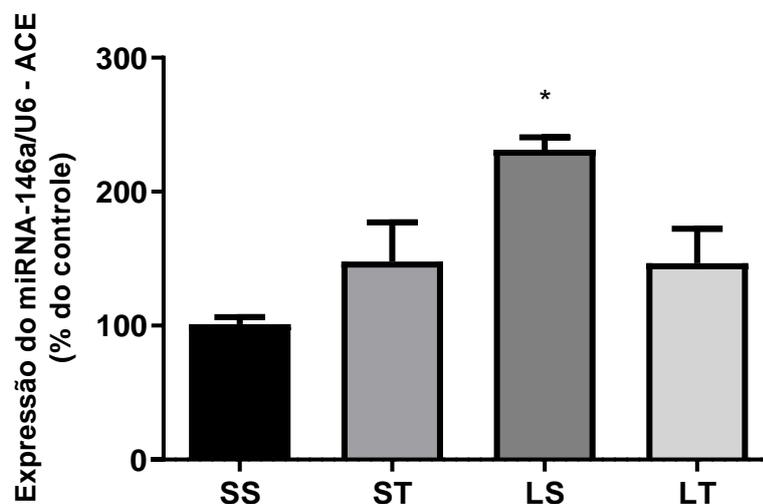


Figura 27- Expressão do miRNA 146a da Artéria Carótida Esquerda (ACE) por RT-PCR

Resultados expressos em média \pm erro padrão. * $p < 0,005$ vs. SS, ST e LT. (n=5). A análise estatística utilizada foi ANOVA *One-Way*.

Com esse resultado, analisou-se na sequência os gene-alvos do miRNA-146a validado em um estudo feito em nosso laboratório (resultado ainda não publicado). Na FIGURA 28, não houve diferença entre os grupos *Shams*, porém, houve um aumento de 44% da expressão da VASN no grupo LT em comparação ao seu controle LS. (SS: $107 \pm 2,6$; ST: $103 \pm 1,9$; LS: $44 \pm 5,4$ e LT: $88 \pm 7,0\%$).

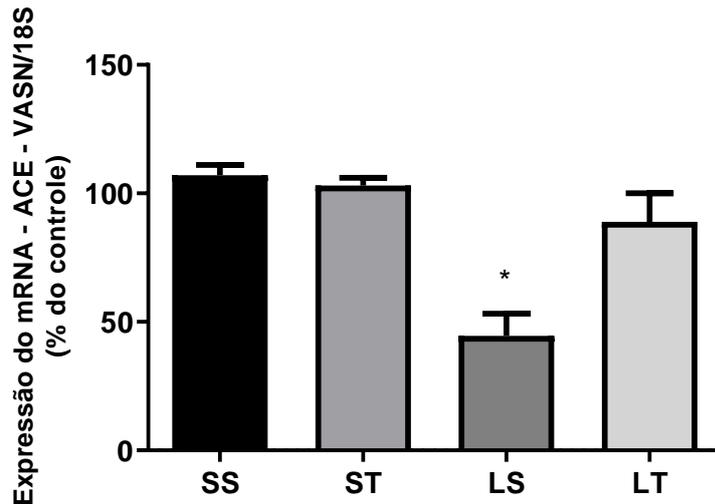


Figura 28- Expressão do mRNA VASN da Artéria Carótida Esquerda (ACE) por RT-PCR
 Resultados expressos em média \pm erro padrão. * $p < 0,005$ vs. SS, ST e LT. (n=5). A análise estatística utilizada foi ANOVA *One-Way*.

Já foi comprovado que a deficiência da metaloprotease Adam-17 prejudica a liberação da VASN, portanto verificamos a expressão desta metaloprotease. Na FIGURA 29 está a expressão do Adam-17 no qual entre os grupos *Shams* a expressão não foi diferente, já entre os grupos lesionado, houve uma diminuição da expressão de Adam-17 do grupo LT em comparação ao LS (SS: $95,4 \pm 3,2$; ST: $113 \pm 6,5$; LS: $441,3 \pm 5,9$ e LT: $65,39 \pm 15,6$ %).

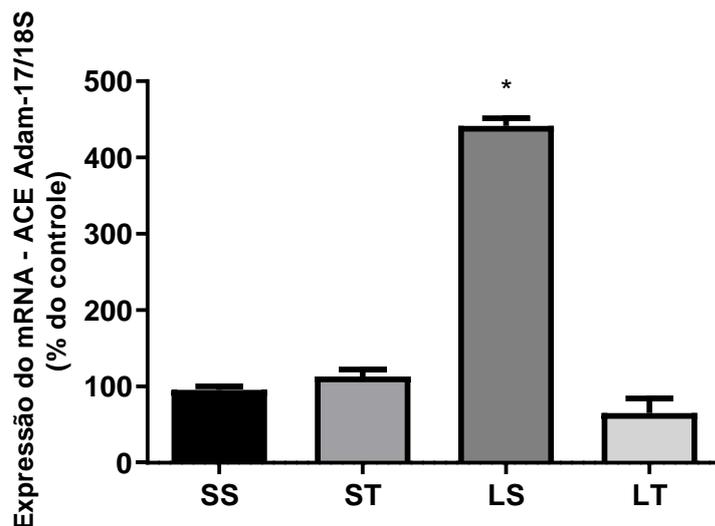


Figura 29- Expressão do mRNA Adam-17 da Artéria Carótida Esquerda (ACE) por RT-PCR
 Resultados expressos em média \pm erro padrão. * $p < 0,0001$ vs. SS, ST e LT. (n=5). A análise estatística utilizada foi ANOVA *One-Way*.

Como o TGF- β é um fator inflamatório regulado negativamente pela VASN, avaliamos a expressão gênica de TGF- β que está representado na FIGURA 30 no qual entre os grupos *Shams* a expressão não foi diferente, já entre os grupos lesionado, houve uma diminuição da expressão de TGF- β do grupo LT em comparação ao LS (SS: $102 \pm 12,5$; ST: $103 \pm 23,04$; LS: $242 \pm 23,13$ e LT: $70 \pm 4,8$ %).

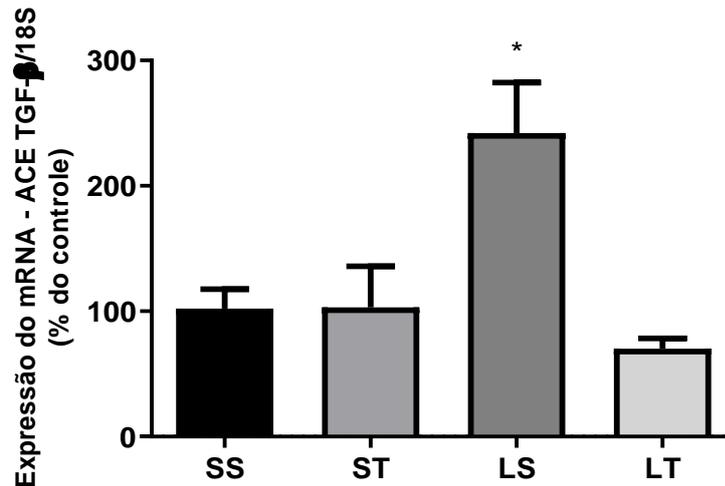


Figura 30- Expressão do mRNA TGF- β da Artéria Carótida Esquerda (ACE) por RT-PCR
Resultados expressos em média \pm erro padrão. * $p < 0,01$ vs. SS, ST e LT. (n=5). A análise estatística utilizada foi ANOVA *One-Way*.

Como o NF- κ β é um fator inflamatório que faz parte da cadeia de sinalização do TGF- β e indiretamente regula negativamente a VASN. Portanto, avaliamos a expressão gênica do NF- κ β que está representado na FIGURA 31 no qual entre os grupos *Shams* a expressão não foi diferente, já entre os grupos lesionado, houve uma diminuição da expressão grupo LT em comparação ao LS (SS: $102 \pm 9,8$; ST: $108,2 \pm 7,3$; LS: $272,1 \pm 29,6$ e LT: $96,2 \pm 3,3$ %).

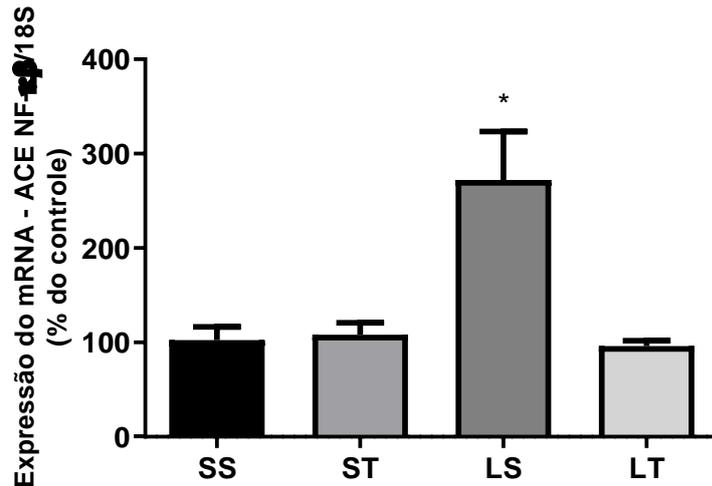


Figura 31- Expressão do mRNA NF-κβ da Artéria Carótida Esquerda (ACE) por RT-PCR

Resultados expressos em média \pm erro padrão. * $p < 0,001$ vs. SS, ST e LT. (n=5). A análise estatística utilizada foi ANOVA *One-Way*.

Assim como o NF-κβ o KLF4 é um fator inflamatório ativado pelo TGF-β que já é descrito que participa do processo da hiperplasia da íntima vascular. Portanto, avaliamos a expressão gênica do mesmo que está representado na FIGURA 32 no qual entre os grupos *Shams* a expressão não foi diferente. Já entre os grupos lesionado, houve uma diminuição da expressão de KLF4 do grupo LT em comparação ao LS (SS: $100 \pm 16,8$; ST: $90,3 \pm 4,6$; LS: $97,4 \pm 2,01$ e LT: $32,7 \pm 11,9$ %).

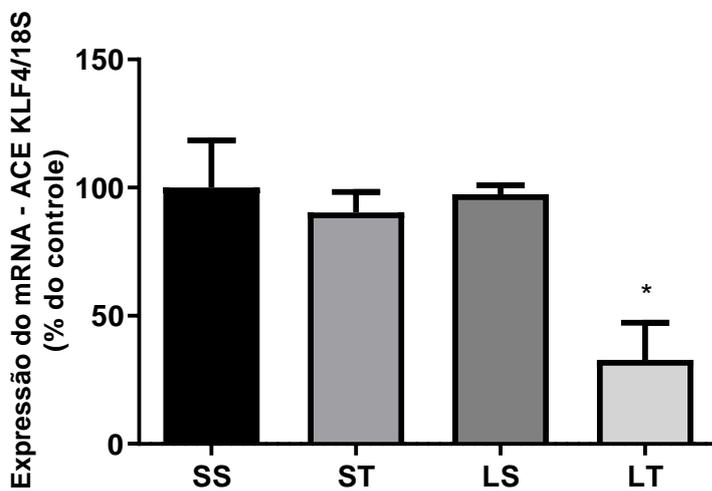


Figura 32- Expressão do mRNA KLF4 da Artéria Carótida Esquerda (ACE) por RT-PCR

Resultados expressos em média \pm erro padrão. * $p < 0,05$ vs. SS, ST e LS (n=5). A análise estatística utilizada foi ANOVA *One-Way*.

Como na hiperplasia da íntima vascular é característica a proliferação e migração de CMLV. Portanto, avaliamos a expressão gênica do PCNA que indica proliferação e o resultado está representado na FIGURA 33 no qual entre os grupos *Shams* a expressão não foi diferente, já entre os

grupos lesionado, houve uma diminuição da expressão de PCNA do grupo LT em comparação ao LS (SS: $106 \pm 8,6$; ST: $67 \pm 5,8$; LS: $156 \pm 14,3$ e LT: $76 \pm 5,8$ %).

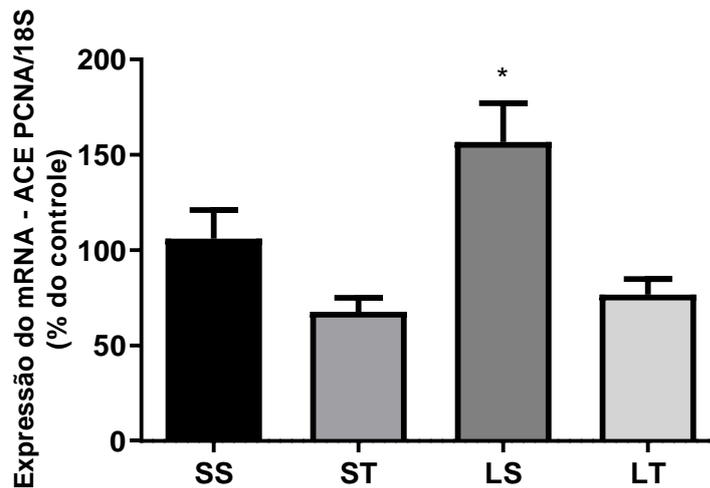


Figura 33- Expressão do mRNA PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) da Artéria Carótida Esquerda (ACE) por RT-PCR

Resultados expressos em média \pm erro padrão. * $p < 0,005$ vs. SS, ST e LT. (n=5). A análise estatística utilizada foi ANOVA *One-Way*.

7.9 Quantificação da proteína VASN na Reestenose

Como a VASN é uma proteína de membrana, com uma expressão maior nas CMLV, conforme está representado na FIGURA 34 A e B respectivamente. As figuras mostram os níveis proteicos de VASN na artéria carótida comum esquerda, analisados por *western blot*. Os grupos SS x ST não apresentou diferença estatística, porém todos os grupos apresentaram diferença em relação ao grupo LT. (SS: $1,02 \pm 0,17$; ST: $0,84 \pm 0,06$; LS: $0,94 \pm 0,02$ e LT: $1,21 \pm 0,08$ unidades arbitrárias).

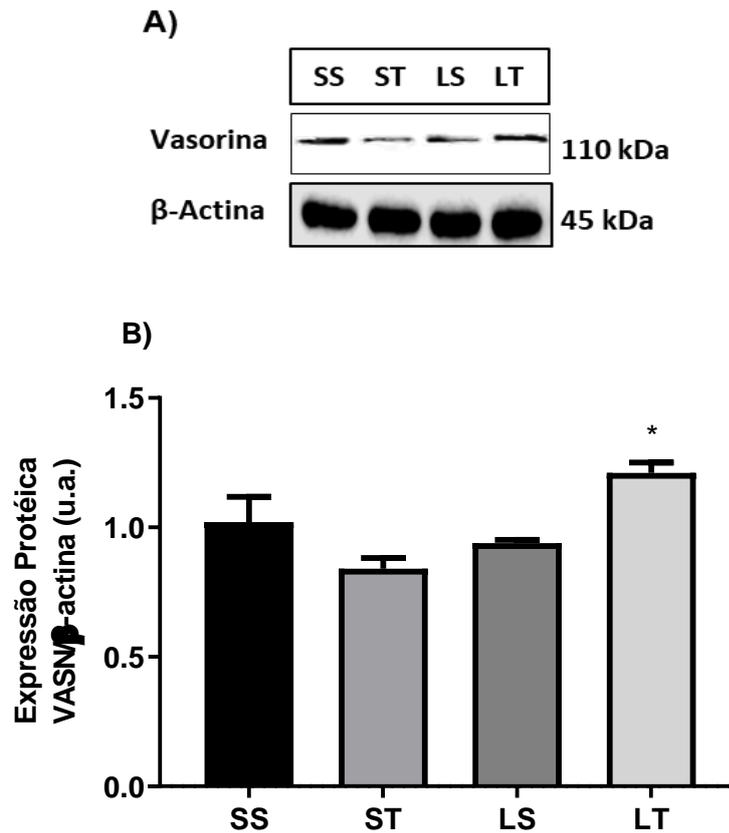


Figura 34- Expressão Proteica da VASN Artéria Carótida Esquerda por WB

Resultados expressos em média \pm erro padrão. * $p < 0,05$ vs. SS, ST e LS. (n=5). A análise estatística utilizada foi ANOVA *One-Way*.

8. DISCUSSÃO

A lesão por cateter balão na artéria carótida comum em ratos é um modelo bastante estudado para avaliar a hiperplasia da íntima vascular e a diminuição do lúmen e assim avaliar estratégias de prevenção e tratamento da reestenose. Apesar desse modelo ser bem estabelecido na literatura, são escassos os estudos a longo prazo sobre os efeitos da lesão endotelial por cateter balão. GABELER et al., (2002b, 2002a), fizeram uma comparação do diâmetro de lúmen, hiperplasia da íntima e área da média pós lesão por cateter balão em 3 artérias (carótida, aorta e a íliaca) durante 16 semanas, verificando que esse modelo é eficaz no estudo da reestenose em até 16 semanas, sendo que na artéria carótida e na íliaca esse resultado foi mais expressivo. Portanto, esse é o único estudo a longo prazo desse procedimento. Devido à escassez de estudos com o protocolo longo justificamos a necessidade inicial de realizarmos a caracterização do modelo de lesão por meio deste método, ao longo do tempo (estudo 1) e verificar se a reestenose persistia, visto que o protocolo de TF de natação aplicado neste estudo possui duração total de 80 dias.

Os principais resultados do estudo 1 foram: 1) aumento da hiperplasia da neoíntima, 2) aumento da área da camada média, 3) diminuição do diâmetro do lúmen vascular, 4) aumento da expressão do miRNA-146a, 5) diminuição do gene alvo do miRNA-146a, a VASN, 6) aumento da expressão do gene TGF- β 1.

Os principais achados do estudo 2 : 1) O TF foi eficaz em manter a massa corporal dos grupos que passaram pelo TF de natação, 2) O TF foi eficaz em aumentar a capacidade física e também em melhorar a capacidade oxidativa, 3) houve bradicardia de repouso nos grupos que passaram pelo TF, 4) o TF foi capaz de diminuir a pressão arterial sistólica e a pressão arterial média, 5) o TF foi capaz de prevenir a hiperplasia exacerbada da íntima vascular, mantendo a área total da média vascular e diâmetro total do lúmen próximos aos níveis fisiológicos, do grupo lesionado treinado, 6) houve uma diminuição da expressão do miRNA-146a no grupo LT, 7) houve um aumento da expressão do gene e da expressão proteica da VASN no grupo LT, 7) houve a manutenção no grupo LT e o aumento da expressão dos genes Adam-17, TGF- β , NF- κ B e PCNA, 8) houve a diminuição da expressão do gene KLF4 no grupo LT.

8.1. ESTUDO 1

8.1. Caracterização da reestenose por cateter balão (estudo 1)

Assim como nos estudos de GABELER et al., (2002a), o estudo 1 demonstrou que a área da neoíntima permanecia espessa ao longo do tempo após a injúria, no entanto o remodelamento vascular foi diferente nos tempos estudados. Aos 20 dias após a lesão ocorreu uma leve hiperplasia intimal, aos 40 dias foi o pico de aumento da neoíntima, no tempo 60 dias a hiperplasia diminuiu e aos 80 dias a mesma estabilizou, ou seja, obteve uma área similar à do grupo com 60 dias. Esse resultado difere dos estudos a longo prazo de GABELER et al., (2002a), em que o pico de formação de neoíntima foi aos 15 dias, nos 20 dias houve um decréscimo de hiperplasia e a partir desse ponto teve um leve aumento até os 110 dias. Porém, os estudos de GABELER et al (2002a e 2002b) foram apenas para comparar a hiperplasia vascular entre uma artéria e outra e não para comparação do tempo e a persistência da hiperplasia vascular. Dessa forma, foram observados os principais resultados: lesão com cateter resultou em uma diminuição do diâmetro do lúmen na artéria carótida comum devido a hiperplasia intimal, na artéria ilíaca houve hiperplasia intimal e remodelação vascular constritiva, sem alteração no diâmetro do lúmen da aorta abdominal. Os autores também chegaram à conclusão de que a artéria carótida comum não possui *vasa vasorum* comparado à artéria ilíaca e a aorta abdominal. Portanto, a artéria carótida comum é eficaz no estudo da reestenose, e assim podemos verificar os mecanismos pelo qual essa doença progride.

Em relação à área da média vascular, que é formada basicamente por CMLV, e como já citado na reestenose, há uma grande migração e proliferação dessas células, portanto, é esperado que a média vascular dos indivíduos lesionados pelo cateter balão esteja mais espessa em relação à artéria controle. A área da média vascular obteve um aumento expressivo no tempo 20 dias e esse aumento foi menor aos 40 e 60 dias, ao passo que no tempo 80 dias não foi diferente em comparação ao seu controle. Este perfil não é bem estabelecido, já que alguns estudos apontam o aumento, enquanto outros não (LIU et al., 2016; INDOLFI et al., 1995; GABELER et al., 2002a).

Uma vez que a íntima vascular aumenta, o lúmen vascular diminui, portanto, resultando em uma diminuição do fluxo sanguíneo e aumento a resistência vascular. Se lúmen continuar diminuindo ocorre a interrupção do fluxo sanguíneo causando uma isquemia e podendo levar a morte (AIRES, 2008). Em nosso estudo o lúmen foi diminuído nos tempos 40, 60 e 80, o que é característico da reestenose. Nos estudos com o modelo de lesão por cateter balão (WEI, MOHAMED, 2016; INDOLFI et al., 2001), geralmente a lesão é causada no endotélio vascular, o cateter retirado e imediatamente após, fármacos são introduzidos, com o intuito de reduzir a hiperplasia da íntima. Atualmente, estudos com vírus adenoassociado têm crescido, os quais são vetores para transportar proteínas, genes e miRNAs, por exemplo, com a hipótese de prevenção da reestenose pós-angioplastia (WEI, MOHAMED, 2016; RICHTER et al., 2000; MANUSCRIPT, CORONARY, ARTERIES, 2013; MAEDA et al., 1997; INDOLFI et al., 1995; GRUCHAŁA et al., 2004; ELLIOTT et al., 2013), porém esses são estudos a curto prazo. Embora a reestenose seja bastante estudada, os mecanismos pelos quais ela avança e os mecanismos pelos quais o TF age sobre essa doença, ainda são pouco elucidados.

8.1.1. Expressão do miRNA-146a, VASN e TGF- β na artéria lesionada (estudo 1)

Os miRNAs estão envolvidos na maioria dos mecanismos da reestenose, na proliferação, migração, apoptose e diferenciação celular (YANG et al., 2016; LIU et al., 2016; GURHA, 2016). Alterações no padrão de expressão dos miRNAs são relevantes para utilização dos mesmos como biomarcadores patológicos ou até mesmo como possíveis ferramentas terapêuticas no tratamento de doenças. No entanto, o papel dos miRNAs não são totalmente esclarecidos na literatura, sendo assim importante o entendimento da ação dos mesmos e sua atuação no remodelamento vascular.

Vários miRNAs vem se destacando por exercer importante papel na regulação do crescimento e apoptose das CMLV. Estudos demonstraram que os miRNA-1, miRNA-21, miRNA-29, miRNA-31, miRNA-143/145 e miRNA-221/222, por exemplo, estão envolvidos na hiperplasia neointimal, regulando as funções das CMLV, como migração e proliferação dessas células. Um exemplo disso é o miRNA-24 que pode regular o fenótipo das CMLV por meio das vias do PDGF e do TGF- β . De fato a

expressão desse miRNA encontra-se reduzida em artérias carótidas lesionadas (YANG et al., 2016; FAN, YANG, 2014; CHAN et al., 2010). Por outro lado, a expressão do miRNA-146a está alta nas artérias carótidas de ratos lesionados por cateter balão (SUN et al., 2011; JI et al., 2007). Interessantemente, estudo prévio realizado em nosso laboratório (dados não publicados) verificou que o miRNA-146a estava aumentado na artéria aorta de ratos espontaneamente hipertensos, o que não foi encontrado nos ratos normotensos. Diante disto e por meio de análise *in silico* em sites de predição de bioinformática, encontramos a VASN como um gene alvo predito para o miRNA-146a. A VASN é uma proteína de membrana predominantemente expressa nas CMLV do sistema vascular e para o esclarecimento das funções biológicas da mesma, o estudo de (IKEDA et al., 2004) demonstrou que essa proteína se liga diretamente ao TGF- β modulando-o negativamente e inibindo-o, exercendo, portanto, uma ação anti-inflamatória (IKEDA et al., 2004).

O TGF- β é uma citocina que controla a proliferação e a diferenciação celular e está envolvida no processo de reestenose pós-angioplastia, devido à sua participação na síntese de MEC e proliferação dos precursores das CMLV. O TGF- β 1 participa da estabilização do vaso nascente e assim como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o VEGF são cruciais na formação do vaso sanguíneo. Portanto o TGF- β pode agravar a formação de neointima na parede do vaso, por formar fibrose e auxiliar na exacerbada migração das CMLV para a íntima vascular (IKEDA et al., 2004; DABEK et al., 2006). O estudo de IKEDA (2004) também observou que o aumento da expressão de VASN inibe a formação de neointima.

No estudo 1, também encontramos um aumento na expressão do miRNA-146a nas artérias lesionadas por cateter balão, em todos os tempos pós reestenose (20, 40, 60 e 80 dias). No entanto, o maior aumento foi encontrado no tempo de 40 dias pós lesão, corroborando com os nossos achados de morfologia, onde o pico de formação de neointima foi aos 40 dias. Como a VASN é um gene alvo do miRNA-146a, também verificamos a sua expressão gênica, e, conforme esperado, esse gene está com uma expressão menor em relação ao grupo controle, em todos os tempos estudados, com a maior diminuição no tempo 40 e 80. Esta proteína tem uma ligação direta com o TGF- β , no qual regula a formação de MEC na hiperplasia da íntima, pois esse fator de crescimento tem um papel fundamental na síntese de sulfato de condroitina e proteoglicana que são componentes da MEC na hiperplasia, como também tem participação na diferenciação celular (PERNOMIAN et al., 2015; MALAPEIRA et al., 2010; IKEDA et al., 2004; BOBIK, 2006).

Nós verificamos que a expressão do gene TGF- β estava aumentada nos tempos 20, 60 e 80, sendo neste último tempo foi onde encontramos a maior expressão deste gene. Este aumento pode estar associado a formação de hiperplasia intimal, o que corrobora com os dados da expressão gênica da VASN, pois são genes inversamente proporcionais. Em conjunto, nossos achados corroboram com a

literatura, uma vez que o miRNA-146a regula negativamente a expressão da VASN em artérias acometidas pela inflamação (como na reestenose e na aterosclerose), e a VASN, por sua vez, regula negativamente o TGF- β , que é um fator importante no crescimento da neoíntima vascular, assim, sua inibição contribui para a diminuição da íntima formada pelo processo inflamatório.

Um dos fatores que regula os miRNAs e tem uma importante função nas doenças estenosantes é o TF. Como foi comprovado no estudo 1, que o modelo de lesão por cateter balão é eficiente para ser utilizado em estudos prolongados, e que o miRNA-146a encontra-se aumentado em artérias acometidas pela reestenose, enquanto a expressão de seus genes alvos está reduzida, podemos dar início ao estudo 2. Nesta segunda etapa, investigamos como o TF age e modula o miRNA-146a e, conseqüentemente, seus genes alvos nas artérias lesionadas por cateter balão.

8.2. ESTUDO 2

8.2.1. Marcadores do treinamento físico aeróbico sobre as respostas hemodinâmicas

Para verificar se o TF foi eficiente para a produção de adaptações aeróbicas, foram mensurados os principais marcadores fisiológicos de treinamento. Foi mensurado a capacidade de trabalho aeróbico por meio do teste de esforço máximo (MEDEIROS et al., 2004; EVANGELISTA et al., 2005), e foi verificado a atividade da enzima citrato sintase.

8.2.2. Teste de esforço físico máximo

O teste de esforço máximo foi utilizado para avaliar o desempenho físico dos animais pré e pós protocolo de treinamento. O teste pré TF permite verificar se todos os grupos iniciaram o protocolo com a mesma capacidade física e o teste pós TF, verificar a eficácia do treinamento nos grupos *sham* treinado e lesionado treinado em comparação aos seus respectivos controles sedentários. Desta forma, os animais foram submetidos ao teste em esteira rolante até a exaustão pré e pós o período de TF de natação. A caracterização da capacidade máxima foi avaliada por meio dos parâmetros, como a distância percorrida, tempo e velocidade máxima de execução do teste. Para esse estudo foi escolhido o parâmetro de distância percorrida (BERNSTEIN, 2003).

Os resultados de distância máxima percorrida, tempo e velocidade atingida no teste de esforço realizado pré TF demonstram que os ratos dos quatro grupos experimentais estudados atingiram valores similares no teste de esforço progressivo. Entretanto, ao final do protocolo experimental os resultados demonstram que os ST e LT obtiveram um aumento na capacidade física, enquanto o grupo LS diminuiu a sua capacidade física e o grupo SS manteve.

Dessa forma, esses resultados mostram o efeito do TF aeróbico sobre a melhora da capacidade física na execução do protocolo de treino, confirmando a relação entre a melhora na

capacidade máxima de realização de esforço físico e TF. Isso corrobora com os estudos que apresentam relação direta entre o TF e a melhora no teste de tolerância física máxima (FERNANDES, SOCI, OLIVEIRA, 2011; EVANGELISTA, KRIEGER, 2006; DUNCKER, BACHE, 2008; D. et al., 2015).

Um indicativo da eficiência do TF aeróbico é o aumento da capacidade oxidativa, avaliada por meio da enzima citrato sintase é uma das mais importantes na regulação das vias metabólicas na geração de energia, pois está presente na primeira reação do ciclo de Krebs, sendo assim gera energia através do metabolismo aeróbico (MCARDLE, KATCH, KATCH, 2013). Nesse sentido, um indicativo importante para saber o aumento da capacidade aeróbia é medir o aumento da enzima citrato sintase. Neste estudo, a atividade da enzima oxidativa citrato sintase no músculo sóleo aumentou 46% no grupo ST e 32% no grupo LT em relação ao grupo *sham* sedentário, demonstrando a efetividade do programa de TF utilizado neste estudo, corroborando e confirmando os dados obtidos, estudos realizados no nosso laboratório demonstram um aumento significativo na atividade da enzima no músculo sóleo induzido pelo TF de natação (SOCI et al., 2016; SILVA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2009; MEDEIROS et al., 2004; EVANGELISTA et al., 2003).

8.2.3. Pressão Arterial e Frequência Cardíaca

O TF além de melhorar a capacidade física também promove adaptações hemodinâmicas que influenciam o sistema cardiovascular (BRUM et al., 2004). Já é estabelecido que a frequência cardíaca de repouso, também conhecida como bradicardia de repouso, é uma adaptação do TF aeróbico, onde os indivíduos treinados tem sua frequência cardíaca de repouso menor do que os sedentários, tanto em estudos experimentais quanto em clínicos (OLIVEIRA et al., 2009; NEGRAO et al., 2010; NEGRÃO et al., 1992; MOSTARDA et al., 2009; MEDEIROS et al., 2004; EVANGELISTA et al., 2005; DE BARROS et al., 2011; BRUM et al., 2004; ALMEIDA, ARAÚJO, 2003). Portanto a bradicardia de repouso é considerada um marcador fisiológico do TF aeróbico.

Neste estudo observamos que os grupos submetidos ao protocolo de TF apresentaram redução significativa na frequência cardíaca de repouso após o final do protocolo experimental quando comparado a sua frequência cardíaca inicial, o que não foi observado nos outros grupos que foram mantidos sedentários e o grupo lesionado sedentário obteve um aumento na FC. Os mecanismos pelo qual a bradicardia ocorre estão amplamente relacionados pelo tipo de TF (BRUM et al., 2004). Em animais controles, normotensos, submetidos ao mesmo protocolo de natação utilizado neste estudo a bradicardia de repouso observada foi devido a um aumento do tônus vagal (MEDEIROS et al., 2004).

O TF promove diminuição da PA em diferentes patologias, tais como hipertensão arterial, insuficiência cardíaca, diabetes entre outras, por outro lado estudos demonstram que a PA permanece

inalterada em humanos e animais normotensos (SILVA et al., 1997; NEGRÃO et al., 1992; EVANGELISTA, KRIEGER, 2006; EVANGELISTA et al., 2003)

No presente estudo, encontramos aumento na PAS e PAM nos grupos SS e LS, já nos grupos ST e LT houve uma diminuição, isso pode ser justificado, pois a medida da PA por plestismografia de cauda não é tão acurada quanto a medida direta através da canulação da artéria carótida (SILVA et al., 1997; MELO, MARTINHO, MICHELINI, 2003; FELIX, MICHELINI, 2007; BRUM et al., 2000). Entretanto, nesse estudo a medida direta não seria viável, pois esse tecido foi lesionado por cateter balão.

8.2.4 Morfologia das artérias carótidas e formação da neoíntima

A hiperplasia da neoíntima é um processo inflamatório em resposta ao dano mecânico do cateter balão, com um espessamento da camada íntima, com proliferação da CMLVs (LIU, ROUBIN, KING, 1989; CHAABANE et al., 2013). Nesse estudo, o TF de natação exerceu um papel importante na prevenção primária da hiperplasia da íntima. Vários fatores podem estar envolvidos com a redução da hiperplasia, já é sabido que o TF aeróbico, por meio do aumento da expressão de eNOS na parede vascular exerce um papel importante na prevenção primária da doença arterial coronariana após lesão vascular (SHEPHARD, BALADY, 1999; SESSA et al., 1994; GIELEN, SCHULER, HAMBRECHT, 2001; FARACI, SIGMUND, 1999).

Um estudo feito por INDOLFI et al., (2002) demonstrou que um programa de TF aumentou a expressão de eNOS e inibiu a hiperplasia da íntima vascular pós procedimento de angioplastia por cateter balão. O efeito anti proliferativo do TF também foi eficaz no procedimento de colocação de *stents*. Os protocolos intervencionistas, como angioplastia com balão ou implante de *stent* coronário, para amenizar a aterosclerose, resultam em um grau acentuado de lesão vascular. Horas após o procedimento, as células endoteliais entram rapidamente no ciclo de replicação para restaurar a continuidade endotelial (VAN BELLE et al., 1998). A perda da monocamada endotelial está associada a uma variedade de consequências deletérias, como a formação de trombos, espessamento neointimal e alterações vasculares negativas. Deve-se ressaltar que todas as ferramentas utilizadas para prevenir reestenose, incluindo a administração de medicamentos baseados em *stents*, pode atrasar maturação e função endotelial normal, aumentando assim o potencial para um evento trombótico tardio (VAN BELLE et al., 1998).

No presente estudo, observamos que a lesão por angioplastia por cateter balão foi eficaz (demonstrado no estudo 1), já que houve o aumento exacerbado da íntima vascular e quando aplicado o protocolo de TF essa hiperplasia foi prevenida comparando o grupo de animais lesionados treinados com os demais grupos experimentais. Também, observamos que a área da média vascular dos animais lesionados sedentários foi diminuída, o que não ocorreu com o grupo lesionado treinado, que manteve

a área da média próximo aos valores dos grupos *shams*. O diâmetro do lúmen como esperado, houve uma diminuição no grupo lesionado sedentário, e foi prevenido pelo TF no grupo lesionado treinado e mantido entre os grupos *shams*.

Um dos mecanismos que levam a esses benefícios do TF pode ser o aumento da biodisponibilidade da VASN nas artérias (IKEDA et al., 2004). Resultados ainda não publicados do nosso laboratório demonstrou que o TF foi capaz de aumentar a expressão gênica da VASN em comparação ao grupo sedentário e que hipertensão arterial reduziu os valores da expressão de VASN nas artérias aortas dos animais SHR em comparação aos demais grupos experimentais.

8.2.5 Expressão do miRNA-146a e expressão gênica

A VASN é uma proteína de superfície celular que foi isolada em aorta de rato em 2004 por (IKEDA et al., 2004). Sua expressão ocorre predominantemente em CMLVs e uma de suas funções é se ligar ao TGF- β atenuando sua via de sinalização intra celular. Após injúria vascular, a expressão da VASN apresenta-se *down*-regulada e reversão da *down*-regulação da VASN diminui a formação da lesão vascular induzida por injúria em artéria de rato, o que se deve, pelo menos em parte, à inibição da sinalização do TGF- β . O estudo também mostrou que a administração *in vivo* de adenovírus recombinante expressando VASN, foi capaz de reduzir o conteúdo de colágeno na área da lesão na aorta de ratos.

MALAPEIRA et al., (2010), mostraram que a VASN é um substrato para a Adam-17 que regula a sinalização de TGF- β . Adam-17 cliva a VASN ancorada na membrana celular e produz VASN solúvel. Esta, por sua vez, liga-se ao TGF- β e o impede de se ligar ao seu receptor tipo II (TGF- β RII). Impedindo essa interação com receptor tipo II, não ocorre o recrutamento do receptor tipo I de TGF- β e não ocorre a fosforilação de Smad2 e Smad3. Interrompe-se, então, a via de sinalização do TGF- β . KRAUTZBERGER et al., (2012), sugerem que a VASN possa também estar associada, como agente antioxidante, ao sistema redox mitocondrial.

PINTUS et al., (2018) observaram que a diminuição da VASN na parede arterial ou nas CMLVs com o envelhecimento é mediada pela ativação da cascata de sinalização Ang II / AT1 / MMP-2. A Ang II diminui a expressão da proteína VASN na parede arterial ou nas CMLVs por meio da ativação do receptor AT1; por outro lado, um bloqueio da sinalização do receptor AT1 aumenta a expressão de VASN nas CMLVs. Ang II não altera acentuadamente os níveis de mRNA da VASN nas CMLVs. O estudo indica que a MMP-2 desempenha um papel importante na diminuição da proteína VASN na parede arterial ou nas CMLVs com o avanço da idade.

Em um estudo feito em nosso laboratório, observamos que o TF promoveu redução do miRNA-146a-5p e a hipertensão promoveu aumento na expressão deste miRNA. Paralelamente a isto, o TF

promoveu aumento na expressão gênica da VASN no grupo treinado em comparação ao grupo sedentário e SHR. Por outro lado, a hipertensão arterial promoveu redução do gene da VASN no grupo SHR em relação ao sedentário. Neste estudo, não ocorreram diferenças estatísticas significativas na expressão gênica de TGF- β 1 nos quatro grupos estudados, tampouco houve diferença estatística na expressão proteica de TGF- β 1 entre os quatro grupos estudados.

O presente estudo mostrou que o TF foi hábil em reduzir a expressão do miRNA-146a em comparação ao grupo LS (FIGURA 27; $p=0,005$). E que, como a proteína de membrana VASN é um alvo validado desse miRNA a expressão gênica estava reduzida no grupo LS, e que o TF manteve aos níveis fisiológicos quando comparado o grupo LT com os grupos *shams* treinado e sedentário (FIGURA 28; $p=0,005$). Ao contrário do estudo que foi feito em nosso laboratório em que a expressão gênica da VASN estava alterada e a expressão proteica não apresentou diferença estatística, o presente estudo observou diferença na expressão proteica, em que no grupo lesionado treinado observamos um aumento da expressão proteica da VASN em comparação aos demais grupos (SS, ST e LS), (FIGURA 34, $p=0,008$). Isso pode ser devido a diferença do leito vascular estudado, enquanto o presente estudo utilizou a artéria carótida o outro estudou artéria aorta.

Além disso, foi possível observar que o TF manteve a expressão do Adam-17 aos níveis dos animais controles, enquanto o grupo LS houve um aumento da expressão gênica de Adam-17 (FIGURA 29, $p<0,0001$). Também, o TF preveniu o aumento na expressão gênica de TGF- β no grupo LT em comparação com LS, FIGURA 30, ($p=0,006$). O TGF- β é uma citocina inflamatória, que desempenha um papel fundamental na resposta vascular à lesão. Vários estudos usando técnicas de transferência de genes mostraram que a sinalização de TGF- β é chave inicial para o desenvolvimento da resposta inflamatória local pós injúria vascular (SCHULICK et al., 1998; NABEL et al., 1993). Por outro lado, o bloqueio da sinalização de TGF- β resultou na inibição da formação neointimal, acompanhada de redução da matriz extracelular, em um modelo de lesão por balão em ratos (KINGSTON et al., 2001). De relevância clínica é a observação de que os níveis de expressão do RNAm do TGF- β nas lesões reestenóticas são maiores do que aqueles nas lesões ateroscleróticas primárias (NIKOL et al., 1992). Essas investigações indicam que o TGF- β funciona como uma citocina fibrogênica em um modelo de lesão por balão e aparentemente agrava a formação neointimal por fibrose motora.

Outra citocina que faz parte da cascata inflamatória é o NF- κ B, onde essa via desempenha um papel importante no crescimento, proliferação e transdução de sinal de diferentes tipos de células. Estudos sugerem que a via NF- κ B é ativada nas CMLVs e que essas as células mostram crescimento e proliferação anormais durante a ocorrência de doença cardíaca (WU et al., 2015; CHENG et al., 2015; BURKITT et al., 2015). Em nosso estudo, a expressão gênica do NF- κ B foi aumentada no grupo

lesionado sedentário, no qual o TF manteve a expressão do grupo lesionado treinado próximo a expressão dos grupos *shams*, (FIGURA 31, $p=0,005$).

O KLF4 também tem um papel importante na inibição da proliferação de CMLVs, promove a diferenciação dessas células ativando diretamente a transcrição de genes marcadores, como Proteína do músculo liso 22-alfa (SM22a) e alfa-actina de músculo liso. A atividade do KLF4 pode ser regulada por modificações pós-traducionais, incluindo fosforilação e acetilação, que podem ser mediadas por diferentes vias de sinalização ativadas pelo receptor A do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) e TGF- β receptor. De fato, o KLF4 pode ser considerado um fator de transcrição único que pode desempenhar um papel central na inibição da proliferação e no aprimoramento da diferenciação das CMLVs (ZHENG, HAN, WEN, 2010). Em nosso estudo, a expressão gênica do KLF4 foi diminuída no grupo lesionado treinado em comparação aos demais grupos (FIGURA 32, $p=0,02$).

Nós também avaliamos o PCNA (antígeno nuclear celular proliferativo), que é um cofator do DNA polimerase-delta, e é um dos índices de proliferação celular. Observamos que a expressão gênica do PCNA no grupo lesionado treinado estava diminuída em relação ao grupo sedentário, isso indica que o TF foi capaz de prevenir a proliferação celular que é característica da reestenose (FIGURA 33, $p=0,004$).

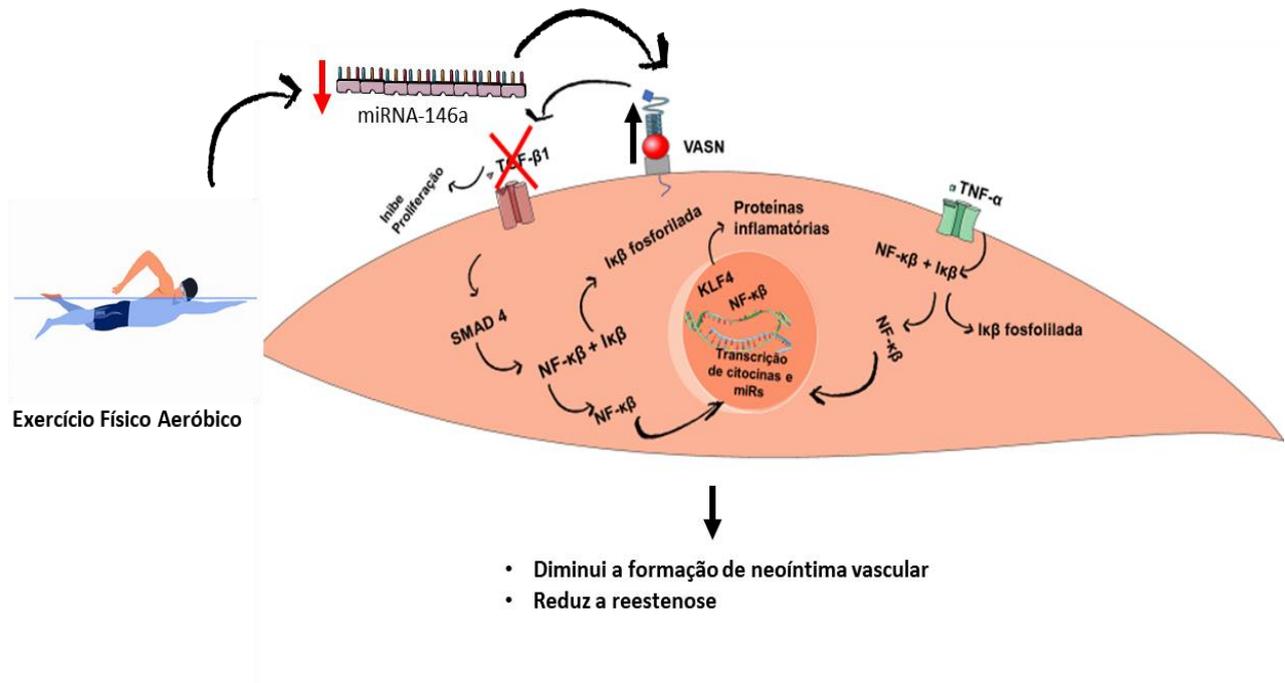


Figura 355- Via de sinalização e conclusão do estudo

O TF foi capaz de reduzir a expressão do miRNA-146a e aumentar a expressão gênica e proteica da VASN que por sua vez inibiu a ativação da cascata inflamatória iniciada pelo TGF- β .

9. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que o TF aeróbico foi capaz de prevenir a reestenose causada pelo dano vascular ocorrido pela angioplastia de cateter balão, já que houve uma redução da hiperplasia da íntima vascular e uma manutenção do diâmetro de lúmen da artéria lesionada. Isso associado com uma redução da expressão do miRNA-146a e aumento da expressão gênica e proteica da VASN pode resultar na redução do perfil inflamatório, proliferação de CMLVs e formação exacerbada da neoíntima.

10. PERSPECTIVAS

Apesar das opções de tratamentos da reestenose disponíveis atualmente como *stents* e cateteres farmacológicos, fármacos anti-plaquetas (pós angioplastia), o índice de reincidência e até mesmo do risco de morte nessa doença ainda afeta a maioria dos pacientes que passaram pelo procedimento de angioplastia. Portanto, o estudo de novas e potenciais terapias, como o uso do TF aeróbico na modulação de miRNAs e seus genes alvos, para amenizar os danos dessa doença deve ser estimulado.

Os dados apresentados contribuem para o nosso conhecimento da participação conjunta do miRNA-146a na diminuição do perfil inflamatório, em artérias de grande porte e também são importantes para elucidar o papel dos miRNAs no exercício físico e na patologia, abrindo perspectivas para novos estudos, utilizando miRNAs como agentes terapêuticos por meio da sua superexpressão ou inibição.

11. LIMITAÇÕES

O estudo realizado apresentou limitações importantes quanto ao tamanho do tecido estudado, as artérias são pequenas para a quantidade de experimento proposto, por isso foi necessário o uso de lotes diferentes de animais para conseguir a quantidade necessária de tecido para estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABURAHMA, A. F. et al. Primary carotid artery stenting versus carotid artery stenting for postcarotid endarterectomy stenosis. **Journal of Vascular Surgery**, v. 50, n. 5, p. 1031–1039, 2009.
- ACCORSI-MENDONÇA, D. et al. The balloon catheter induces an increase in contralateral carotid artery reactivity to angiotensin II and phenylephrine. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 1, p. 79–88, 2004.
- AIRES, M. DE M. Fisiologia. **Fisiologia**, 2008.
- ALMEIDA, M. B.; ARAÚJO, G. S. Efeitos do treinamento aeróbico sobre a frequência cardíaca. **Revista Brasileira De Medicina**, 2003.
- ALP, P. R.; NEWSHOLME, E. A.; ZAMMIT, V. A. Activities of citrate synthase and NAD⁺-linked and NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. **The Biochemical journal**, v. 154, n. 3, p. 689–700, 1976.
- AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, v. 431, n. 7006, p. 350–5, 2004.
- ARMSTEAD, V. et al. Regulation of P-Selectin expression in human endothelial cells by nitric oxide. **Am. J. Physiol.**, v. 273, n. 2 pt 2, p. H740-6, 1997.
- BALLOTTA, E. et al. Progression of atherosclerosis in asymptomatic carotid arteries after contralateral endarterectomy: A 10-year prospective study. **Journal of Vascular Surgery**, v. 45, n. 3, p. 516–522, 2007.
- BARTER, P. J. et al. Antiinflammatory properties of HDL. **Circulation Research**, v. 95, p. 764–772, 2004.
- BARTON, M. et al. Balloon Angioplasty – The Legacy of Andreas Grüntzig, M.D. (1939–1985). **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, 2014.
- BASATEMUR, G. L. et al. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. **Nature Reviews Cardiology**, v. 16, n. 12, p. 727–744, 2019.
- BAUTERS, C.; ISNER, J. M. The biology of restenosis. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 40, n. 2, p. 107–116, 1997.
- BAVRY, A. A. et al. Late Thrombosis of Drug-Eluting Stents: A Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. **The American Journal of Medicine**, v. 119, n. 12, p. 1056–1061, 2006.
- BENNETT, M. R.; EVAN, G. I.; SCHWARTZ, S. M. Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques. **Journal of Clinical Investigation**, 1995.
- BERNSTEIN, D. Exercise assessment of transgenic models of human cardiovascular disease. **Physiological Genomics**, 2003.

- BOBIK, A. Transforming growth factor-beta and vascular disorders. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, n. 8, p. 1712–1720, 2006.
- BOBRYSEV, Y. V et al. Macrophages and Their Role in Atherosclerosis: Pathophysiology and Transcriptome Analysis. **BioMed research international**, v. 2016, p. 9582430, 2016.
- BRUM, P. C. et al. Exercise training increases baroreceptor gain sensitivity in normal and hypertensive rats. **Hypertension**, 2000.
- BRUM, P. C. et al. Adaptações agudas e crônicas do exercício físico no sistema cardiovascular. **Rev Paul Educ Fís**, v. 18, n. ago, n. esp., p. 21–31, 2004.
- BUÑAG, R. D. Validation in awake rats of a tail-cuff method for measuring systolic pressure. **Journal of applied physiology**, v. 34, n. 2, p. 279–82, 1973.
- BURKITT, M. D. et al. NF- κ B1, NF- κ B2 and c-Rel differentially regulate susceptibility to colitis-associated adenoma development in C57BL/6 mice. **Journal of Pathology**, 2015.
- BUSSE, R.; FLEMING, I. Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation. **Ann Med**, v. 27, n. 3, p. 331–40, 1995.
- CAO, J. et al. MicroRNA-146a and -21 cooperate to regulate vascular smooth muscle cell proliferation via modulation of the Notch signaling pathway. **Molecular Medicine Reports**, v. 11, n. 4, p. 2889–2895, 2015.
- CARTHEW, R. W.; SONTHEIMER, E. J. **Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs**Cell, 2009.
- CHAABANE, C. et al. **Biological responses in stented arteries**Cardiovascular Research, 2013.
- CHAN, M. C. et al. Molecular basis for antagonism between PDGF and the TGFB family of signalling pathways by control of miR-24 expression. **EMBO Journal**, 2010.
- CHEN, J. K.; HOSHI, H.; MCKEEHAN, W. L. Transforming growth factor type beta specifically stimulates synthesis of proteoglycan in human adult arterial smooth muscle cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1987.
- CHEN, T. et al. MicroRNA-125a-5p partly regulates the inflammatory response, lipid uptake, and ORP9 expression in oxLDL-stimulated monocyte/macrophages. **Cardiovascular Research**, v. 83, n. 1, p. 131–139, 2009.
- CHENG, H. et al. Leonurine ameliorates kidney fibrosis via suppressing TGF- β and NF- κ B signaling pathway in UUO mice. **International Immunopharmacology**, 2015.
- CZECH, B.; HANNON, G. J. **Small RNA sorting: Matchmaking for argonautes**Nature Reviews Genetics, 2011.
- D., L. et al. MiR-486 mediates the benefits of exercise in attenuating cardiac fibrosis. **Circulation Research**, 2015.

- DABEK, J. et al. Transforming growth factor beta and cardiovascular diseases: the other facet of the “protective cytokine”. **Pharmacological reports : PR**, v. 58, n. 6, p. 799–805, 2006.
- DE BARROS, J. G. et al. Swimming physical training promotes cardiac remodeling and improves blood perfusion in the cardiac muscle of SHR via adenosine-dependent mechanism. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, 2011.
- DE SOUZA, C. A. et al. Regular Aerobic Exercise Prevents and Restores Age-Related Declines in Endothelium-Dependent Vasodilation in Healthy Men. **Circulation**, v. 102, n. 12, p. 1351–1357, 2000.
- DOBRIN, P. B.; LITTOOY, F. N.; ENDEAN, E. D. Mechanical factors predisposing to intimal hyperplasia and medial thickening in autogenous vein grafts. **Surgery**, v. 105, n. 3, p. 393–400, 1989.
- DOROS, G. et al. Rationale of a novel study design for the BIOFLOW V study, a prospective, randomized multicenter study to assess the safety and efficacy of the Orsiro sirolimus-eluting coronary stent system using a Bayesian approach. **American Heart Journal**, 2017.
- DUNCKER, D. J.; BACHE, R. J. Regulation of coronary blood flow during exercise. **Physiological reviews**, v. 88, n. 3, p. 1009–1086, 2008.
- DZAU, V. J.; LOPEZ-ILASACA, M. **Searching for transcriptional regulators of Ang II-induced vascular pathology** *Journal of Clinical Investigation*, 2005.
- ELLIOTT, K. J. et al. ADAM17 silencing by adenovirus encoding miRNA-embedded siRNA revealed essential signal transduction by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 62, p. 1–7, 2013.
- ERIKSSON, M.; TASKINEN, M.; LEPPÄ, S. Mitogen Activated Protein Kinase-Dependent Activation of c-Jun and c-Fos is required for Neuronal differentiation but not for Growth and Stress Response in PC12 cells. **Journal of cellular physiology**, v. 207, n. 1, p. 12–22, 2006.
- EVANGELISTA, F. S. et al. Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. **Braz J Med Biol Res Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 1751–1759, 2003.
- EVANGELISTA, F. S. et al. Loss of resting bradycardia with detraining is associated with intrinsic heart rate changes. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 2005.
- EVANGELISTA, F. S.; KRIEGER, J. E. Small gene effect and exercise training-induced cardiac hypertrophy in mice: an Ace gene dosage study. **Physiological genomics**, 2006.
- FAN, Z. X.; YANG, J. Microribonucleic acids and vascular restenosis. **Saudi Medical Journal**, 2014.
- FARACI, F. M.; SIGMUND, C. D. **Vascular biology in genetically altered mice: Smaller vessels, bigger insight** *Circulation Research*, 1999.
- FELIX, J. V. C.; MICHELINI, L. C. **Training-induced pressure fall in spontaneously hypertensive rats is associated with reduced angiotensinogen mRNA expression within the nucleus tractus**

solitarii. Hypertension. **Anais...**2007

FERNANDES, T. et al. Aerobic exercise training induced LVH involves regulatory microRNAs, decreased ACE-ANG II, and synergistic regulation of ACE2-ANG (1–7). **Hypertension**, v. 58, n. 2, p. 182–189, 2011.

FERNANDES, T. et al. Aerobic exercise training promotes physiological cardiac remodeling involving a set of microRNAs. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 309, n. 4, p. H543-52, 2015.

FERNANDES, T.; SOCI, U. P. R.; OLIVEIRA, E. M. Eccentric and concentric cardiac hypertrophy induced by exercise training: MicroRNAs and molecular determinants. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 9, p. 836–847, 2011.

FINGERLE, J. et al. Role of platelets in smooth muscle cell proliferation and migration after vascular injury in rat carotid artery. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 1989.

FLORIDO, R. et al. Physical Activity, Parental History of Premature Coronary Heart Disease, and Incident Atherosclerotic Cardiovascular Disease in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. **Journal of the American Heart Association**, v. 5, n. 9, 2016.

FORRESTER, J. S. et al. **A paradigm for restenosis based on cell biology: Clues for the development of new preventive therapies** **Journal of the American College of Cardiology**, 1991.

FRIEDMAN, R. C. et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome Research**, v. 19, n. 1, p. 92–105, 2009.

GABELER, E. E. E. et al. A comparison of balloon injury models of endovascular lesions in rat arteries. v. 12, n. C, p. 1–12, 2002a.

GABELER, E. E. E. et al. Endovascular photodynamic therapy with aminolaevulinic acid prevents balloon induced intimal hyperplasia and constrictive remodelling. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, v. 24, n. 4, p. 322–331, 2002b.

GARERI, C.; DE ROSA, S.; INDOLFI, C. MicroRNAs for Restenosis and Thrombosis After Vascular Injury. **Circulation Research**, v. 118, n. 7, p. 1170–1184, 2016.

GAROT, P. et al. 2-Year Outcomes of High Bleeding Risk Patients After Polymer-Free Drug-Coated Stents. **Journal of the American College of Cardiology**, 2017.

GEISTERFER, A A; PEACH, M. J.; OWENS, G. K. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. **Circulation research**, 1988.

GIELEN, S. et al. Exercise-Induced Modulation of Endothelial Nitric Oxide Production. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 2011.

GIELEN, S.; SCHULER, G.; HAMBRECHT, R. Exercise training in coronary artery disease and coronary vasomotion. **Circulation**, v. 103, n. 1, p. E1-6, 2001.

- GLAGOV, S. et al. Mechanical functional role of non-atherosclerotic intimal thickening. **Frontiers of medical and biological engineering : the international journal of the Japan Society of Medical Electronics and Biological Engineering**, 1993.
- GOMES, R. **Doenças cardiovasculares causam quase 30% das mortes no País**. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2011/09/doencas-cardiovasculares-causam-quase-30-das-mortes-no-pais>>. Acesso em: 21 dez. 2016.
- GOMES, W. J.; BUFFOLO, E. Coronary Stenting and Inflammation: Implications for Further Surgical and Medical Treatment. **Annals of Thoracic Surgery**, v. 81, n. 5, p. 1918–1925, 2006.
- GROYER, E. et al. Immunological aspects of atherosclerosis. **Presse Med**, v. 35, n. 3 Pt 2, p. 475–86, 2006.
- GRUCHAŁA, M. et al. Gene transfer into rabbit arteries with adeno-associated virus and adenovirus vectors. **Journal of Gene Medicine**, v. 6, n. 5, p. 545–554, 2004.
- GURHA, P. MicroRNAs in cardiovascular disease. **Current Opinion**, v. 31, p. 1–6, 2016.
- HARBER, M. P. et al. Aerobic exercise training induces skeletal muscle hypertrophy and age-dependent adaptations in myofiber function in young and older men. **Journal of Applied Physiology**, v. 113, n. 9, p. 1495–1504, 2012.
- HE, L.; HANNON, G. J. **MicroRNAs: Small RNAs with a big role in gene regulation** *Nature Reviews Genetics*, 2004.
- HERGENREIDER, E. et al. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. **Nature Cell Biology**, v. 14, n. 3, p. 249–256, 2012.
- HO, K. J. et al. Aspirin-Triggered Lipoxin and Resolvin E1 Modulate Vascular Smooth Muscle Phenotype and Correlate with Peripheral Atherosclerosis. **The American Journal of Pathology**, v. 177, n. 4, p. 2116–2123, 2010.
- HOSIN, A. A. et al. MicroRNAs in atherosclerosis. **Journal of Vascular Research**, v. 51, n. 5, p. 338–349, 2014.
- IKEDA, Y. et al. Vascularin, a transforming growth factor β -binding protein expressed in vascular smooth muscle cells, modulates the arterial response to injury in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 29, p. 10732–10737, 2004.
- INAGAKI, Y. et al. Interferon-gamma-induced apoptosis and activation of THP1 macrophages. **Life Sciences**, v. 71, n. 21, p. 2499–508, 2002.
- INDOLFI, C. et al. Smooth muscle cell proliferation is proportional to the degree of balloon injury in a rat model of angioplasty. **Circulation**, v. 92, n. 5, p. 1230–5, 1995.
- INDOLFI, C. et al. Effects of balloon injury on neointimal hyperplasia in streptozotocin-induced diabetes and in hyperinsulinemic nondiabetic pancreatic islet-transplanted rats. **Circulation**, v. 103, n.

24, p. 2980–6, 2001.

INDOLFI, C. et al. Physical training increases eNOS vascular expression and activity and reduces restenosis after balloon angioplasty or arterial stenting in rats. **Circulation Research**, v. 91, n. 12, p. 1190–1197, 2002.

INDOLFI, C.; PAVIA, M.; ANGELILLO, I. F. Drug-eluting stents versus bare metal stents in percutaneous coronary interventions (a meta-analysis). **The American journal of cardiology**, v. 95, n. 10, p. 1146–1152, 2005.

JANSSENS, S. et al. Human endothelial nitric oxide synthase gene transfer inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation after balloon injury in rats. **Circulation**, 1998.

JESSUP, W. et al. Oxidized lipoproteins and macrophages. **Vascular Pharmacology**, v. 38, n. 4, p. 239–248, 2002.

JI, R. et al. MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation. **Circulation Research**, v. 100, n. 11, p. 1579–1588, 2007.

KIM, V. N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 6, n. 5, p. 376–85, 2005.

KINGSTON, P. A. et al. Adenovirus-mediated gene transfer of a secreted transforming growth factor- β type II receptor inhibits luminal loss and constrictive remodeling after coronary angioplasty and enhances adventitial collagen deposition. **Circulation**, 2001.

KLEEMANN, R.; ZADELAR, S.; KOOISTRA, T. **Cytokines and atherosclerosis: A comprehensive review of studies in mice** **Cardiovascular Research**, 2008.

KONISHI, A. et al. **First approval of improved medical device conditional on use-result survey in Japan — Regulatory review of polymer-free drug-coated biofreedom coronary stent** **Circulation Journal**, 2018.

KRAUTZBERGER, A. M. et al. Expression of vasorin (Vasn) during embryonic development of the mouse. **Gene Expression Patterns**, v. 12, n. 5–6, p. 167–171, 2012.

KREK, A. et al. Combinatorial microRNA target predictions. **Nature genetics**, v. 37, n. 5, p. 495–500, 2005.

KRIEGER, J. E. **Bases Moleculares das Doenças Cardiovasculares: A integração entre a pesquisa e a prática clínica**. 1. ed. São Paulo: [s.n.].

LANGILLE, B. L.; BENDECK, M. P.; KEELEY, F. W. Adaptations of carotid arteries of young and mature rabbits to reduced carotid blood flow. **The American journal of physiology**, 1989.

LARSEN, M. K.; MATCHKOV, V. V. Hypertension and physical exercise : The role of oxidative stress. **Medicina**, v. 52, n. 1, p. 1–9, 2016.

- LAU, N. C. et al. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. **Science**, 2001.
- LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843–854, dez. 1993.
- LEVINE, G. N. et al. 2011 ACCF/AHA/SCAI guideline for percutaneous coronary intervention a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions. **Circulation**, v. 124, n. 23, 2011.
- LEWIS, B. P. et al. Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. **Cell**, 2003.
- LEWIS, B. P.; BURGE, C. B.; BARTEL, D. P. Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. **Cell**, v. 120, n. 1, p. 15–20, jan. 2005.
- LIBBY, P. **Inflammation in atherosclerosis** **Nature**, 2002.
- LIU, M. W.; ROUBIN, G. S.; KING, S. B. Restenosis after coronary angioplasty. Potential biologic determinants and role of intimal hyperplasia. **Circulation**, 1989.
- LIU, Q. et al. MicroRNA-146a inhibits cell migration and invasion by targeting RhoA in breast cancer. **Oncol Rep**, p. 189–196, 2016.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-delta-delta-CT Method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.
- MAEDA, Y. et al. Gene transfer into vascular cells using adeno-associated virus (AAV) vectors. **Cardiovascular research**, v. 35, n. 3, p. 514–21, 1997.
- MALAPEIRA, J. et al. ADAM17 (TACE) regulates TGF b signaling through the cleavage of vasorin. **Oncogene**, v. 30, n. 16, p. 1912–1922, 2010.
- MANUSCRIPT, A.; CORONARY, S.; ARTERIES, P. Successful Transfection of Genes Using AAV-2/9 Vector in Swine Coronary and Peripheral Arteries. v. 175, n. 1, p. 169–175, 2013.
- MARSH, S. A.; COOMBES, J. S. **Exercise and the endothelial cell** **International Journal of Cardiology**, 2005.
- MCARDLE, W. D.; KATCH, F. I.; KATCH, L. V. **Fisiologia do Exercício: Nutrição, Energia e Desempenho Humano**. [s.l: s.n.].
- MEDEIROS, A. et al. Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 12, p. 1909–1917, 2004.
- MELO, R. M.; MARTINHO, E.; MICHELINI, L. C. Training-induced, pressure-lowering effect in SHR: Wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles. **Hypertension**, v. 42,

n. 4 II, p. 851–857, 2003.

MENDIS, S.; PUSKA, P.; NORRVING, B. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. **World Health Organization**, p. 2–14, 2011.

MOLAVI, B.; MEHTA, J. L. Oxidative stress in cardiovascular disease: molecular basis of its deleterious effects, its detection, and therapeutic considerations. **Current Opinion in Cardiology**, 2004.

MOREAU, K. L. et al. Habitual aerobic exercise is associated with smaller femoral artery intima-media thickness with age in healthy men and women. **European journal of cardiovascular prevention and rehabilitation**, v. 13, n. 5, p. 805–11, 2006.

MOROI, M. et al. Interaction of genetic deficiency of endothelial nitric oxide, gender, and pregnancy in vascular response to injury in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 6, p. 1225–1232, 1998.

MOSTARDA, C. et al. Hipertensão e modulação autonômica no idoso: papel do exercício físico Hypertension and autonomic modulation in elders: role of exercise training. **Rev Bras Hipertens**, 2009.

MURPHY, E.; RAHIMTOOLA, S. H.; GRÜNTZIG, A. **TRANSLUMINAL DILATATION FOR CORONARY-ARTERY STENOSIS**The Lancet, 1978.

NABEL, E. G. et al. Direct transfer of transforming growth factor β 1 gene into arteries stimulates fibrocellular hyperplasia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1993.

NEGRÃO, C. E. et al. Vagal and sympathetic control of heart rate during exercise by sedentary and exercise-trained rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 1992.

NEGRAO, M. V et al. Exercise training improves muscle vasodilatation in individuals with T786C polymorphism of endothelial nitric oxide synthase gene. n. 34, p. 71–77, 2010.

NIKOL, S. et al. Expression of transforming growth factor- β 1 is increased in human vascular restenosis lesions. **Journal of Clinical Investigation**, 1992.

OLENA, A. F.; PATTON, J. G. **Genomic organization of microRNAs**Journal of Cellular Physiology, 2010.

OLIVEIRA, E. M. et al. Local renin-angiotensin system regulates left ventricular hypertrophy induced by swimming training independent of circulating renin: a pharmacological study. **Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS**, v. 10, n. 1, p. 15–23, 2009.

OPAS/OMS. **Doenças cardiovasculares**.

PAHO/WHO. **Basic Indicators 2015, Health Situation in the Americas**, 2015.

PASQUINELLI, A. E. et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7

heterochronic regulatory RNA. **Nature**, 2000.

PAULY, R. R. et al. Migration of cultured vascular smooth muscle cells through a basement membrane barrier requires type IV collagenase activity and is inhibited by cellular differentiation. **Circulation Research**, 1994.

PERNOMIAN, L. et al. Vasoprotective effects of neurocompensatory response to balloon injury during diabetes involve the improvement of Mas signaling by TGF β 1 activation. **Vascular Pharmacology**, v. 64, p. 36–48, 2015.

PIN, L. et al. SM22 α inhibits lamellipodium formation and migration via Ras-Arp2/3 signaling in synthetic VSMCs. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 311, n. 5, p. C758–C767, 2016.

PINTUS, G. et al. Reduced vasorin enhances angiotensin II signaling within the aging arterial wall. **Oncotarget**, v. 9, n. 43, p. 27117–27132, 2018.

POLIMENI, A.; DE ROSA, S.; INDOLFI, C. Vascular miRNAs After Balloon Angioplasty. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 23, n. 1, p. 14, 2013.

RAND, T. A. et al. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. **Cell**, 2005.

RICHTER, M. et al. Adeno-associated virus vector transduction of vascular smooth muscle cells in vivo. **Physiol Genomics**, p. 117–127, 2000.

ROSS R, MASUDA J, RAINES EW, GOWN AM, KATSUDA S, ET AL. Localization of PDGF-B protein in macrophages in all phases of atherogenesis. **Science**, v. 248, p. 1009–1012, 1990.

SAMANTA, S. et al. MicroRNA: A new therapeutic strategy for cardiovascular diseases. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 26, p. 407–419, 2016.

SANSBURY, B. E.; SPITE, M. Resolution of Acute Inflammation and the Role of Resolvins in Immunity, Thrombosis, and Vascular Biology. **Circulation Research**, v. 119, n. 1, p. 113–130, 2016.

SANTOS-GALLEGO, C. G.; PICATOSTE, B.; BADIMÓN, J. J. Pathophysiology of acute coronary syndrome. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 16, n. 4, 2014.

SCHAFFER, A. I. Vascular endothelium: in defense of blood fluidity. **The Journal of clinical investigation**, 1997.

SCHULICK, A. H. et al. Overexpression of transforming growth factor β 1 in arterial endothelium causes hyperplasia, apoptosis, and cartilaginous metaplasia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1998.

SCHWARZ, D. S. et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. **Cell**, 2003.

SEN, C.; PACKER, L. Antioxidant and redox regulation of gene transcription. **FASEB J**, 1996.

SESSA, W. C. et al. Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and

endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. **Circulation Research**, v. 74, n. 2, p. 349–53, 1994.

SHEPHARD, R. J.; BALADY, G. J. Exercise as cardiovascular therapy. **Circulation**, 1999.

SILVA, G. J. et al. Acute and chronic effects of exercise on baroreflexes in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, 1997.

SILVA, N. D. DA N. J. et al. Swimming training in rats increases cardiac MicroRNA-126 expression and angiogenesis. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 44, n. 8, p. 1453–1462, 2012.

SMITH, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76–85, 1985.

SOCI, U. P. R. et al. Epigenetic control of exercise training-induced cardiac hypertrophy by miR-208. **Clinical Science**, v. 130, n. 22, p. 2005–2015, 2016.

SONG, L.; LEUNG, C.; SCHINDLER, C. Lymphocytes are important in early atherosclerosis. **Journal of Clinical Investigation**, 2001.

SPRINGER, T. A. **Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm**Cell, 1994.

STEELE, I. C. et al. Cytokine profile in chronic cardiac failure. **European Journal of Clinical Investigation**, 1996.

STEFANINI, G. G. et al. **State of the art: Coronary artery stents - Past, present and future**EuroIntervention, 2017.

STRAUSS, B. H. et al. Extracellular matrix remodeling after balloon angioplasty injury in a rabbit model of restenosis. **Circulation research**, 1994.

SUN, S. et al. miR-146a and Krüppel-like factor 4 form a feedback loop to participate in vascular smooth muscle cell proliferation. **EMBO Rep**, v. 12, n. 1, p. 56–62, 2011.

TAGANOV, K. D. et al. NF- κ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 33, p. 12481–12486, 2006.

TAKAYANAGI, T. et al. Constitutive stimulation of vascular smooth muscle cells by angiotensin ii derived from an adenovirus encoding a furin-cleavable fusion protein. **American Journal of Hypertension**, v. 25, n. 3, p. 280–283, 2012.

TALL, A. R. et al. 1999 George Lyman Duff memorial lecture: Lipid transfer proteins, HDL metabolism, and atherogenesis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 20, n. 5, p. 1185–1188, 2000.

TAN, C.; SCHATZ, R. A. **The History of Coronary Stenting**Interventional Cardiology Clinics, 2016.

- TANIYAMA, Y.; GRIENGLING, K. K. **Reactive Oxygen Species in the Vasculature: Molecular and Cellular MechanismsHypertension**, 2003.
- THUM, T. **MicroRNA therapeutics in cardiovascular medicineEMBO Molecular Medicine**, 2012.
- TOTH, M. J.; BECKETT, T.; POEHLMAN, E. T. Physical activity and the progressive change in body composition with aging: current evidence and research issues. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, 1999.
- TULIS, D. A. Rat carotid artery balloon injury model. **Methods in molecular medicine**, v. 139, p. 1–30, 2007.
- VADDI, K. et al. Increased secretion of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma by mononuclear leukocytes in patients with ischemic heart disease. Relevance in superoxide anion generation. **Circulation**, 1994.
- VAN BELLE, E. et al. **Endothelial regrowth after arterial injury: From vascular repair to therapeuticsCardiovascular Research**, 1998.
- VANHOUTTE, P. M. et al. Endothelial dysfunction and vascular disease. **Acta Physiologica**, v. 196, n. 2, p. 193–222, 2009.
- VON DER LEYEN, H. E. et al. Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: in vivo transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1995.
- WAY, K. L. et al. The Effect of Regular Exercise on Insulin Sensitivity in Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Diabetes & metabolism journal**, v. 40, p. 253–269, 2016.
- WEI, Z.; MOHAMED, T. Vascular Balloon Injury and Intraluminal Administration in Rat Carotid Artery. **J Vis Exp.**, v. 6, n. 2, p. 356–372, 2016.
- WHO. Global status report on noncommunicable diseases. **World Health Organization**, p. 176, 2014.
- WHO. **Global health estimates**. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>>. Acesso em: 6 fev. 2018.
- WOOTEN, J. S.; BIGGERSTAFF, K. D.; BEN-EZRA, V. Responses of LDL and HDL particle size and distribution to omega-3 fatty acid supplementation and aerobic exercise. **J Appl Physiol**, v. 107, p. 794–800, 2009.
- WU, X. D. et al. Effect of aerobic exercise on miRNA-TLR4 signaling in atherosclerosis. **International Journal of Sports Medicine**, v. 35WU, X. D, n. 4, p. 344–350, 2014.
- WU, Z. W. et al. miRNA-146a induces vascular smooth muscle cell apoptosis in a rat model of coronary heart disease via NF-κB pathway. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 14, n. 4, p. 18703–12, 2015.

YANG, J. et al. MicroRNA-24 Attenuates Neointimal Hyperplasia in the Diabetic Rat Carotid Artery Injury Model by Inhi YANG, J. et al. p. 1–14, 2016.

ZAFARI, A. M. et al. Role of NADH/NADPH oxidase–derived H₂O₂ in angiotensin II–induced vascular hypertrophy. **Hypertension**, v. 32, p. 488–495, 1998.

ZHANG, C. MicroRNAs: role in cardiovascular biology and disease. **Clinical Science**, v. 114, n. 12, p. 699–706, 2008.

ZHANG, C.; YANG, J.; JENNINGS, L. K. Attenuation of neointima formation through the inhibition of DNA repair enzyme PARP-1 in balloon-injured rat carotid artery. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 287, n. 2, p. H659-66, 2004.

ZHENG, B.; HAN, M.; WEN, J. K. Role of Krüppel-like factor 4 in phenotypic switching and proliferation of vascular smooth muscle cells. **IUBMB Life**, v. 62, n. 2, p. 132–139, 2010.

ZHOU, N. et al. Vascular Smooth Muscle Cells. Muscle Cell and Tissue. In: **Muscle Cell and Tissue - Current Status of Research Field**. [s.l: s.n.].

12. ATIVIDADES REALIZADAS

12.1. Disciplinas cursadas (Anexo 1 - Ficha do Aluno)

É uma resolução do Programa de Pós-graduação da Escola de Educação Física e Esporte USP, que os alunos de mestrado cumpram 40 créditos aula e cumpram disciplinas obrigatórias (Metodologia da Pesquisa, Estatística, Filosofia da Ciência) para que possam depositar a dissertação e realizar o exame de defesa. As disciplinas obrigatórias já foram cumpridas e até o momento cumpri 35 créditos em aula.

As disciplinas cursadas, o conceito atribuído e a quantidade de créditos obtidos podem ser encontradas no anexo 1.

Avaliação das disciplinas cursadas no período:

EFP5757-4/2 - Docência no Ensino Superior em Educação Física e Esporte (Escola de Educação Física e Esporte).

Essa disciplina é pré-requisito para a realização do programa de aperfeiçoamento ao ensino (PAE). Foi uma disciplina realizada com diversas discussões e trabalho em conjunto, foi uma disciplina em formato de mesa redonda, sentávamos em círculo, para que as discussões de cunho filosófico obtivesse a participação de todos os alunos e para que expressássemos nossas opiniões e assim conseguir chegar a uma conclusão sobre os temas discutidos, no qual o tema geral era docência no ensino superior. Essa disciplina permitiu a reflexão sobre o papel que o professor deve desempenhar na sala de aula, o que é ser um professor, a importância de ser um professor atualizado, a importância do professor na vida do aluno e a partir disso a importância do professor na sociedade.

EFE5748-3/1 Modelos Estatísticos de Medidas Repetidas Aplicadas à Educação Física (Escola de Educação Física e Esporte).

Essa disciplina foi realizada no intuito de aperfeiçoar os conhecimentos primordiais em nosso trabalho. Nessa disciplina aprendemos conceitos e usamos diretamente o software S.A.S, que me permitiu aprender a utilizar outro programa de estatística. Essa disciplina foi primordial ao conhecimento de estatística já que a maior parte do nosso trabalho utilizamos a forma quantitativa e,

portanto, saber lidar com os resultados e excepcional. Aprendemos a lidar com dados faltosos, *outlier* e como utilizar nossos dados de forma ética e correta. Em geral foi uma disciplina enriquecedora.

BMB5764-6/3 Gênese e Regulação da Pressão Arterial (Instituto de Ciências Biomédicas)

Essa disciplina foi longa, com muito conteúdo e repleta de atividades extracurriculares. As aulas teóricas foram ministradas por professores experientes e bem-conceituados no tema da aula, portanto foram de bom proveito todas as aulas teóricas. As aulas práticas foram de extrema importância para obter conhecimento dos equipamentos utilizados em pesquisa para aferir a pressão arterial. Os seminários e discussões que os alunos apresentaram foram primordiais para que o conteúdo fosse fixado e entendido corretamente. Sem dúvida foi a disciplina que eu mais aprendi.

EFE5758-2/1 Metodologia da Pesquisa Quantitativa (Escola de Educação Física e Esporte).

Essa disciplina teve como objetivos conhecer e entender o significado dos paradigmas científicos e da pesquisa científica para o desenvolvimento do conhecimento, conhecer os tipos de conhecimento e suas relações com a pesquisa científica, entender e identificar as variáveis envolvidas no estudo, conhecer, entender e aplicar os diferentes desenhos experimentais para elaboração de testes lógicos. Ainda, conhecer e entender os conceitos de validade, fidedignidade e objetividade, entender a relação entre desenho experimental e o tipo de teste estatístico a ser aplicado, entender a importância da escrita para a comunicação científica.

Essa disciplina junto com a de estatística formam a base do que toda a pessoa que está na área acadêmica deve obrigatoriamente saber. Essa abordou como uma boa pesquisa vem de um bom entendimento do seu desenho experimental. O professor usou um método de aprendizagem de gameificação, que foi excepcional para fixar o conteúdo que é extremamente extenso.

EFP5769-3/2 Caracterização Acadêmica e Profissional da Educação Física e Esporte (Escola de Educação Física e Esporte).

Nessa disciplina discutimos a Educação Física e o Esporte como áreas de conhecimento e de intervenção profissional. Foi uma disciplina de cunho filosófico e durante as aulas discutimos a

respeito do ensino na educação física, assuntos como a Educação Física e o Esporte no contexto da universidade, ocupação e profissão, o movimento disciplinar da Educação Física e Esporte, disciplina acadêmica versus profissão, estrutura interdisciplinar e transdisciplinar entre outros.

MCP5838 Tópicos Avançados sobre o Papel do Exercício Físico na Fisiopatologia Cardiovascular (Incor – Instituto do Coração do Hospital das Clínicas USP)

Essa disciplina foi curta, porém bem proveitosa em relação ao conteúdo e teve como objetivo aumentar os conhecimentos avançados sobre as adaptações celulares, morfológicas e funcionais provocadas pelo exercício físico no sistema cardiovascular.

PAE (programa de aperfeiçoamento no ensino)

É um programa onde o aluno de pós-graduação auxilia o professor nas disciplinas de graduação, podendo o aluno ministrar aulas com a supervisão do professor. O PAE foi realizado na disciplina de graduação EFB0108 Exercício nas doenças crônicas degenerativas, com a supervisão da professora Claudia Forjaz.

12.2. Atividades acadêmicas, eventos científicos e publicações.

Conforme propostas inicialmente, as metas do cronograma de atividades foram cumpridas com êxito.

Durante o período de mestrado foram realizadas as seguintes atividades:

12.3. Eventos científicos:

- Apresentação Oral no XII International Symposium on Vasoactive Peptides, Nova Lima, Belo Horizonte, na data: 19/11/2019 – 23/11/2019.
- Apresentação Oral no XXIII Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular em Araraquara, SP na data: 24/02/2019 – 27/02/2019.
- Visita no laboratório do professor Dr. Ian Phillips, na KGI em Claremont, California-USA, na data 16 – 27/11/2018.
- Apresentação de pôster e apresentação oral no Experimental Biology (EB) em San Diego, CA na data: 21/4 – 25/04/2018;

- Participação no dia 27 de outubro de 2017 do SMART Symposium com o tema Skeletal Muscle Applied Research and Therapy, no Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da USP. O evento reuniu pesquisadores da USP, Unicamp e University of Iowa;
- Participação no dia 11/agosto/2017 no Simpósio - Fronteiras de Conhecimento em RNA e microRNA.

12.4. Artigos científicos e capítulos de livro:

- Capítulo do livro da InTechOpen “Chapter: Non-coding RNAs in the cardiovascular system: exercise training effects” – autores do capítulo: Noemy P. Pereira, MSc; Camila do V. Gomes-Gatto, MSc; Edilamar M. de Oliveira, PhD; Tiago Fernandes, PhD.
- Atualização do capítulo do livro Pollock “células tronco e exercício” – Autores do capítulo “Tiago Fernandes, Noemy Pereira e Edilamar Menezes de Oliveira”.
- Capítulo do livro Springer Nature “Book: Exercise Benefits the Heart: Basic Science and Clinical Evidence Chapter: NO Signaling in the Cardiovascular System and Exercise” autores: Tiago Fernandes, Camila do V. G. Gatto, Noemy P. Pereira, Yahya R. Alayafi, Vander J. das Neves and Edilamar M. de Oliveira.