

# O TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO INIBE A SINALIZAÇÃO APOPTÓTICA MUSCULAR ESQUELÉTICA MEDIADA POR VEGF-VEGR2 EM RATOS ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS



AEROBIC EXERCISE TRAINING INHIBITS SKELETAL MUSCULAR APOPTOTIC SIGNALING  
MEDIATED BY VEGF-VEGR2 IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS

Tiago Fernandes<sup>1</sup>  
Flávio de Castro Magalhães<sup>1,2</sup>  
Everton Crivoi do Carmo<sup>1</sup>  
Edilamar Menezes de Oliveira<sup>1</sup>

1. Laboratório de Bioquímica da Atividade Motora, Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo-USP, São Paulo, SP, Brasil.
2. Laboratório de Biologia do Exercício, Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, Minas Gerais, Brasil.

## Correspondência:

Edilamar Menezes de Oliveira  
Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo  
Departamento de Biodinâmica do Movimento do Corpo Humano  
Av. Professor Mello Moraes, 65 – Butantã - 05508-900 – São Paulo, SP, Brasil  
E-mail: edilamar@usp.br

## RESUMO

O treinamento físico aeróbio (TF) tem sido utilizado como um importante tratamento não farmacológico da hipertensão arterial (HA), uma vez que ele corrige a rarefação microvascular e reduz a pressão arterial. Estudos mostram que as anormalidades microvasculares estão diretamente associadas às alterações do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e do VEGF receptor 2 (VEGFR2), bem como a um desequilíbrio da sinalização apoptótica na HA. Entretanto, pouco se conhece sobre os efeitos do TF sobre estes parâmetros na HA. Nós hipotetizamos que o TF recupere os fatores angiogênicos e promova um equilíbrio entre as proteínas anti e pró-apoptóticas da família Bcl-2 potencialmente, contribuindo para a revascularização e regressão da doença. Ratos espontaneamente hipertensos (SHR, n = 14) e Wistar Kyoto (WKY, n = 14) com 12 semanas de vida e divididos em quatro grupos: SHR, SHR treinado (SHR-T), WKY e WKY treinado (WKY-T) foram estudados. Como esperado, 10 semanas de TF foram efetivas em reduzir a pressão arterial em SHR-T. Além disso, o TF promoveu bradicardia de repouso nos grupos de animais treinados (WKY-T e SHR-T), sendo considerado como um importante marcador de TF aeróbio. O TF também corrigiu a rarefação capilar em SHR-T e esta resposta se deve em grande parte por uma recuperação dos níveis periféricos de VEGF e um aumento na expressão de VEGFR2. Em paralelo, foi observada uma normalização das vias apoptóticas, com aumento da expressão de proteínas antiapoptóticas (Bcl-2 e Bcl-x) e redução das pró-apoptóticas (Bad) acompanhada pela fosforilação de Bad. Estes resultados sugerem que o TF promove revascularização periférica na HA dependente de um fino balanço de reguladores positivos e negativos de angiogênese.

**Palavras-chave:** treinamento físico, hipertensão arterial, VEGF, apoptose, músculo esquelético.

## ABSTRACT

*Aerobic exercise training (ET) has been established as an important non-pharmacological treatment for hypertension, since it corrects the microvascular rarefaction and decreases blood pressure. Studies have shown that microvascular abnormalities are directly associated with changes in the vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor 2 (VEGFR2), as well as with imbalance of apoptotic signaling in hypertension. However, little is known about these mechanisms in hypertension. We hypothesized that ET restores angiogenic factors and promotes balance between anti and pro-apoptotic proteins of the Bcl-2 family, potentially contributing to revascularization and the disease regression. Twelve-week old male Spontaneously Hypertensive Rats (SHR, n=14) and Wistar Kyoto Rats (WKY, n=14) were randomly assigned into 4 groups: SHR, trained SHR (SHR-T), WKY and trained WKY (WKY-T) were studied. As expected, ten weeks of ET were effective in reducing blood pressure in SHR-T group. In addition, ET promoted resting bradycardia in trained groups (WKY-T and SHR-T), being considered an important marker of aerobic ET. ET has also corrected the capillary rarefaction in SHR-T and this response is partly due to recovery of the peripheral levels of VEGF and increase in VEGFR2 expression. Concomitantly, normalization of the apoptotic pathway was observed, with increased expression of the anti-apoptotic proteins (Bcl-2 and Bcl-x) and reduction of the pro-apoptotic protein (Bad), followed by phosphorylation of the Bad protein and decrease in the Bad/Bcl-x association. These data suggest that ET promotes peripheral revascularization in hypertension dependent on a fine balance between positive and negative regulators of angiogenesis.*

**Keywords:** exercise training, hypertension, VEGF, apoptosis, skeletal muscle.

## INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial (HA) é uma síndrome multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA) que afeta aproximadamente um bilhão de indivíduos em todo mundo, re-

presentando um dos fatores de risco mais relevantes na etiologia das doenças cardiovasculares (DCV)<sup>1,2</sup>.

O débito cardíaco normal acompanhado de um aumento da resistência vascular periférica são considerados as maiores marcas da HA

essencial em adultos, demonstrando que a PA elevada é associada a um dano na microcirculação<sup>3,4</sup>. Consideráveis dados mostram que anormalidades microvasculares, tais como redução do fluxo sanguíneo e rarefação microvascular, são claras evidências do distúrbio do processo angiogênico e maior destruição dos vasos na HA<sup>3-6</sup>.

Vários fatores têm sido apontados como responsáveis pela disfunção endotelial e pela falha no processo angiogênico na HA. Entre eles destaca-se o crucial papel do óxido nítrico (NO)<sup>7</sup> e do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF)<sup>8</sup>, bem como o equilíbrio de estimuladores e inibidores de apoptose mediados principalmente pela família linfoma de células B2 (Bcl-2)<sup>9</sup>.

O VEGF é reconhecido como uma proteína reguladora chave da angiogênese fisiológica tanto na fase embrionária como pós-natal. Funciona também como um potente fator pró-sobrevivência para células endoteliais, induzindo a expressão de proteínas antiapoptóticas e inibindo as pró-apoptóticas<sup>8</sup>.

A família Bcl-2 vem sendo intensivamente investigada por ser uma família de proteínas indutoras e repressoras de morte por apoptose que participam ativamente da regulação da apoptose<sup>10</sup>. Os membros da família Bcl-2 como Bcl-2 e Bcl-xL inibem a apoptose, pois previnem a liberação de citocromo c e são chamados de reguladores antiapoptóticos. Por outro lado, Bad, Bax e Bak são proteínas pró-apoptóticas por induzirem a liberação de citocromo c<sup>11</sup>. O citocromo c liga-se ao fator de ativação das proteases pró-apoptóticas 1 (Apaf-1) o qual, através de alterações conformacionais dependentes de ATP, oligomeriza-se e forma o apoptossomo, um complexo que ativará a pró-caspase 9. Esta pró-caspase 9 ativada desencadeia o sinal para a ativação das caspases 3, 6 e 7 resultando num processo amplificado e catalítico resultando no processo apoptótico<sup>12</sup>.

Evidências acumuladas indicam que uma redução da sobrevivência das células endoteliais na microcirculação pode causar rarefação em indivíduos hipertensos; embora os mecanismos das vias pró e/ou antiapoptóticas não tenham ainda sido bem investigadas<sup>13</sup>. Estudos mostram que o estresse oxidativo promove apoptose de célula endotelial na microcirculação e induz rarefação em SHR. De fato, estudos posteriores comprovaram que o tratamento crônico com antioxidantes reduziu a apoptose das células endoteliais em microvasos e preveniu a rarefação estrutural em ratos espontaneamente hipertensos (SHR)<sup>14</sup>.

Ensaios clínicos e meta-análises têm mostrado que o treinamento físico aeróbio (TF) provoca redução nos níveis de PA em indivíduos hipertensos<sup>15,16</sup>. Estudos com animais de experimentação também têm mostrado redução significativa na PA em SHR<sup>17-19</sup>.

Estudos apontam importantes efeitos do TF aeróbio sobre a microcirculação em SHR, tais como aumento na densidade capilar e razão capilar: fibra no músculo esquelético e cardíaco, promovendo uma completa reversão da rarefação capilar ocorrida na HA. Além disso, o exercício aeróbio normaliza a resistência vascular periférica para a musculatura esquelética e a razão parede: luz arteriolar<sup>17</sup>. O restauro da rede microvascular pode contribuir determinantemente para o efeito da diminuição da PA através da redução da resistência vascular periférica, a qual vem sendo intitulada como a responsável pela HA essencial em adultos<sup>3,4,17-19</sup>.

O aumento no fluxo sanguíneo para a musculatura esquelética promovido pelo TF aeróbio e o conseqüente aumento do estresse de cisalhamento apresentam correlação direta com o aumento na liberação de NO e VEGF, que também contribui para o aumento do fluxo, pois leva não somente à vasodilatação dependente do endotélio, como à angiogênese, sendo considerados por muitos pesquisadores o sinal primário para o remodelamento vascular<sup>20</sup>. Em condições fisiológicas, a manutenção, a formação e/ou a perda de capilares são dependentes de um fino balanço de reguladores positivos e negativos de angiogênese<sup>9</sup>.

Mediadores da sinalização celular já têm sido identificados como

determinantes na recuperação da rede microvascular na HA, porém estudos com abordagem não farmacológica, como o TF, no que concerne à regulação dos fatores angiogênicos e anti e pró-apoptóticas musculares ainda não foram estudadas. Portanto, a proposta para este estudo é verificar: 1) o possível prejuízo dos fatores angiogênicos e o desequilíbrio das proteínas anti e pró-apoptóticas associados ao dano microvascular em SHR; e 2) o efeito do TF sobre a correção da rarefação capilar e de seus mediadores celulares, potencialmente contribuindo para a regressão da HA.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais experimentais

Para realização do presente estudo foram utilizados 28 SHR, com 12 semanas de vida, em que o quadro de HA já está estabelecido, e 28 ratos machos Wistar Kyoto (WKY), como controles do SHR. Os animais foram provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Os ratos estavam pesando entre 240 e 270g no início do protocolo.

Os animais utilizados neste estudo foram mantidos em gaiolas plásticas em grupos de três ou quatro animais por caixa e separados por grupo experimental. A temperatura ambiente do biotério foi mantida entre 22-24°C, com luz controlada em ciclo invertido de claro-escuro de 12 em 12 horas. Água e comida foram administradas *ad libitum*.

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, sendo este projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (EEFE-USP) (nº 2007/35).

### Identificação dos animais

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos com sete animais em cada grupo, conforme o protocolo experimental:

- ratos Wistar-Kyoto (WKY);
- ratos Wistar-Kyoto treinados (WKY-T);
- ratos espontaneamente hipertensos (SHR);
- ratos espontaneamente hipertensos treinados (SHR-T).

### Protocolo de treinamento físico aeróbio

O TF de natação foi realizado segundo protocolo de Medeiros *et al.*<sup>21</sup>. Os animais foram treinados durante 10 semanas, sessões de 60 min, uma vez ao dia, cinco vezes por semana, com aumento gradual da sobrecarga de trabalho (peso na cauda em porcentagem do peso corporal) até atingir 4% do peso corporal. O protocolo utilizado foi caracterizado como treinamento de baixa a moderada intensidade e longa duração, sendo efetivo na promoção de adaptações cardiovasculares e no aumento da capacidade oxidativa muscular. Os ratos foram identificados e pesados semanalmente, para a correção da sobrecarga de treinamento em função do aumento do peso corporal.

Pré e pós o período de TF os animais foram submetidos a análises hemodinâmicas e, posteriormente, foram mortos por anestesia com injeção intraperitoneal de pentobarbital de sódio (80mg/kg), e as amostras necessárias foram coletadas e armazenadas adequadamente para análises histológicas e moleculares.

### Avaliação das respostas hemodinâmicas

A PA foi realizada pré e pós-período de TF por pletismografia de cauda (sistema da KENT SCIENTIFIC RTBP1001 para ratos e camundongos, Litchfield, EUA), nos quatro grupos de animais. Os animais estavam acordados, em repouso e mantidos sob restrição de movimentos para que as medidas fossem realizadas. Para evitar erros de medida e

análise, os ratos foram submetidos a um período de uma semana de ambientação com a técnica de medida.

O equipamento de registro da PA de cauda consiste em um manguito de borracha que é adaptado à região proximal da cauda, que está ligado ao pletoímetro para insuflar e desinsuflar gradualmente o manguito de 1 a 250/300mmHg. Numa região mais distal da cauda é acoplado um transdutor de pulso pneumático para detecção dos sinais de passagem da onda de pulso de PA na artéria caudal e registrado no sistema de aquisição de sinais. Este método de medida indireta da PA permite quantificar a PA e a frequência cardíaca (FC) ao longo de todo o período do protocolo.

### Análise da razão capilar por fibra

A razão capilar por fibra do músculo sóleo foi avaliada por meio da reação histoquímica para miosina ATPase no pH 10,3, como descrito por Sillau e Banchemo<sup>22</sup> e quantificada pela análise de 10 campos não sobrepostos, com uma amplificação de 200x, distribuídos de uma maneira randômica usando um sistema computacional morfométrico (Leica Quantimet 500, Cambridge, UK). Para calcular a razão capilar por fibra, o número total de capilares foi dividido pelo número total de fibras contabilizadas no mesmo campo. Somente vasos com um diâmetro menor que 12µm foram contabilizados.

### Determinação da expressão de proteínas

O músculo sóleo foi homogeneizado em tampão de lise hipotônico contendo tampão fosfato de potássio 50mM (pH 7,0), sucrose 0,3M, DTT 0,5mM, EDTA 1mM (pH 8,0), PMSF 0,3mM, NaF 10mM e coquetel de inibidor de fosfatase (1:100). O homogenato foi centrifugado por 10 minutos a 4°C com 12.000rpm. O sobrenadante foi transferido para tubos de 1,5ml e a concentração de proteína das amostras foi analisada por meio do método de Bradford<sup>23</sup>. As amostras foram armazenadas em freezer -80°C até o momento da utilização.

Alíquotas do homogeneizado, 30µg de proteína foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl pH 6,8 240mM; SDS 0,8%; β-mercaptoetanol 200mM; 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, 6-12%: dependendo do peso molecular da proteína), que consiste na migração de moléculas com carga, numa solução, decorrente da aplicação de um campo elétrico no aparelho para minigel (Mini Protean, BioRad, EUA). Posteriormente, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences, NJ, EUA), do mesmo modo que foram separadas 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 com o anticorpo primário que se liga à proteína que se pretende detectar, formando um complexo anticorpo-proteína. Depois de lavar a membrana para remover o anticorpo não ligado, ela foi exposta ao anticorpo secundário conjugado a *horse radish peroxidase* (HRP), direcionado a porções espécies-específicas do anticorpo primário.

Foram utilizados como anticorpos primários o VEGF (Rabbit polyclonal, 1:1000, Santa Cruz, CA, EUA), VEGFR1 (Rabbit polyclonal, 1:1000, Santa Cruz, CA, EUA), VEGFR2 (Rabbit polyclonal, 1:1000, Santa Cruz, CA, EUA), Bcl-x (Rabbit polyclonal, 1:1000, Cell Signaling Tech., MA, EUA), Bcl-2 (Rabbit polyclonal, 1:1000, Cell Signaling Tech., MA, EUA), Bad (Rabbit polyclonal, 1:1000, Cell Signaling Tech., MA, EUA) e p-Bad<sup>ser112</sup> (Rabbit polyclonal, 1:1000, Cell Signaling Tech., MA, EUA). Em seguida, as

mesmas foram lavadas 3x10 min com TBS-T, incubadas por duas horas com os respectivos anticorpos secundários (IgG anti-rabbit, anti-rabbit, anti-rabbit, anti-rabbit, anti-rabbit, anti-rabbit, anti-rabbit e anti-rabbit; Amersham Biosciences, NJ, EUA) conjugados à peroxidase. Posteriormente, o complexo foi detectado mediante reação de quimiluminescência (ECL) e os *blots* foram visualizados e quantificados (número de *pixels*) pelo sistema Scion Image, fornecido gratuitamente pela NIH (EUA) via internet. O gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi utilizado como normalizador.

### ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando a análise de variância ANOVA de duas vias (TF e HA como fatores independentes), para comparar os valores dos grupos e teste de Tukey como *post hoc* (Statistica software, StatSoft, Inc., Tulsa, OK, EUA). Foi adotado para todos os experimentos um  $p < 0,05$  de significância. Todos os resultados foram apresentados na forma de média ± erro padrão da média (EPM).

### RESULTADOS

#### Parâmetros hemodinâmicos: pressão arterial e frequência cardíaca

Os valores de PA expressos em milímetros de mercúrio (mmHg) e da FC expressos em batimentos por minuto (bpm) pré e pós-TF estão representados na figura 1.

Na figura 1A, pré-TF, podemos observar que os grupos de SHR apresentavam níveis elevados de PAS (184 ± 3,9mmHg), PAD (150 ± 4,7mmHg) e PAM (167 ± 5,3mmHg) comparados aos grupos controle, WKY (127 ± 3; 99 ± 2,4; 110 ± 3,2mmHg, respectivamente), indicando que a HA estava estabelecida. Não foram encontradas alterações da FC entre os grupos pré-TF (WKY: 390 ± 12; WKY-T: 393 ± 8; SHR: 409 ± 8; SHR-T: 416 ± 6bpm).

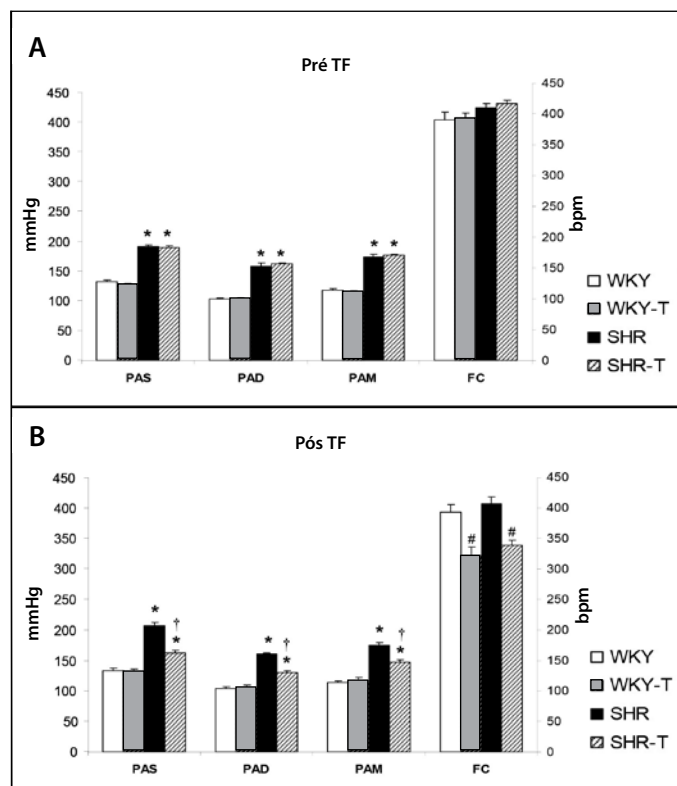
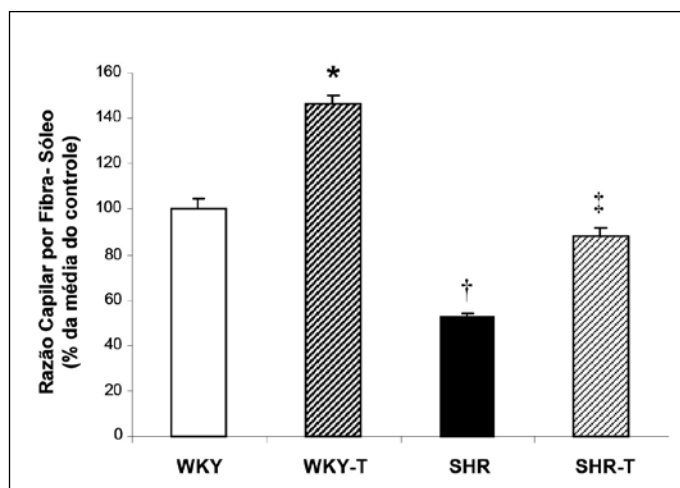


Figura 1. Parâmetros hemodinâmicos. Pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de repouso pré-TF (A) e pós-TF (B) de ratos WKY e SHR submetidos ao protocolo experimental. Os resultados foram expressos como média ± EPM. \* p < 0,001 vs. WKY e WKY-T; # p < 0,01 vs. WKY e SHR; † p < 0,001 vs. SHR. TF: treinamento físico.

Pós-TF, representado pela figura 1B, observa-se que o TF de natação de baixa intensidade e longa duração foi eficaz em reduzir a PAS, PAD e a PAM do grupo SHR-T ( $162 \pm 4,4$ ;  $131 \pm 2$ ;  $147 \pm 7,8$ mmHg, respectivamente) comparado ao grupo SHR ( $207 \pm 5,5$ ;  $160 \pm 2,5$ ;  $175 \pm 3,6$ mmHg, respectivamente), sem nenhuma alteração da PAS, PAD e PAM nos grupos de animais controle, WKY e WKY-T. Além disso, observamos uma bradicardia de repouso nos grupos de animais treinados, portanto, reduzindo os valores de FC destes grupos quando comparados aos grupos mantidos sedentários no mesmo período experimental (pós-TF- WKY:  $393 \pm 12$ ; WKY-T:  $322 \pm 14$ ; SHR:  $407 \pm 11$ ; SHR-T:  $338 \pm 8$ bpm).

### Determinação da razão capilar por fibra muscular esquelética

A figura 2 mostra a razão capilar por fibra pela avaliação histoquímica do músculo esquelético sóleo por meio da reação da ATPase miosínica. Como esperado, a rarefação capilar foi observada no grupo SHR comparado ao grupo WKY. Por outro lado, o TF foi efetivo em aumentar 47% o número de capilares pela análise da razão capilar por fibra no grupo WKY-T e corrigiu a rarefação capilar no grupo SHR-T quando comparado ao grupo WKY (WKY:  $1,2 \pm 0,06$ ; WKY-T:  $1,8 \pm 0,04$ ; SHR:  $0,7 \pm 0,02$  e SHR-T:  $1,1 \pm 0,04$  n° de capilares/ fibra muscular).



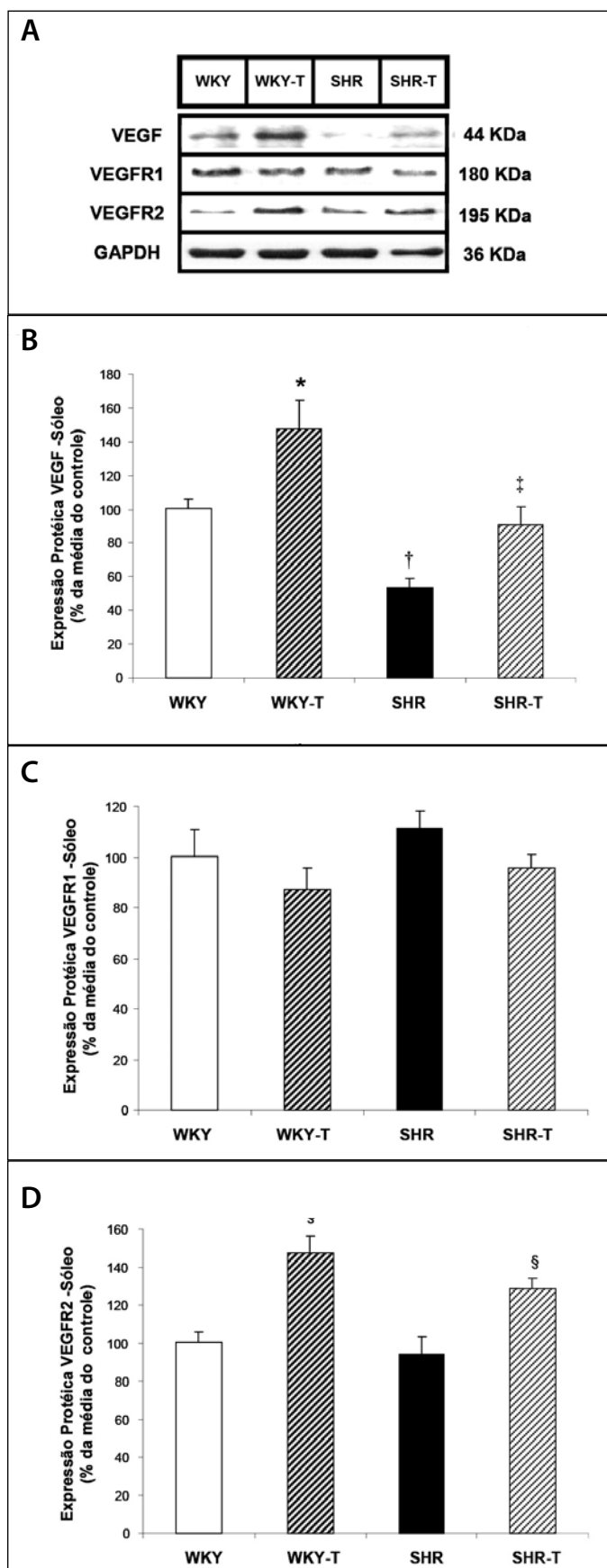
**Figura 2.** Efeito do TF sobre a análise de razão capilar por fibra muscular pelo método de histoquímica por meio da reação ATPase miosínica. Os dados foram representados na forma de porcentagem da média do controle  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  vs. WKY, SHR e SHR-T; †  $p < 0,05$  vs. WKY, WKY-T e SHR-T; ‡  $p < 0,05$  vs. WKY-T e SHR. TF: treinamento físico.

### Quantificação dos fatores angiogênicos: VEGF, VEGFR1 e VEGFR2

A figura 3 mostra os níveis proteicos avaliados por *western blot* de VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 no músculo sóleo. Comparado ao grupo WKY sedentário, o TF aumentou os níveis proteicos periféricos de VEGF e VEGFR2 no grupo WKY-T (figuras 3 – B e C, respectivamente). Por outro lado, no grupo SHR os níveis proteicos de VEGF foram significativamente menores comparados aos níveis proteicos do grupo WKY, porém o TF conseguiu restaurar os níveis de VEGF no grupo SHR-T (figura 3B). Além disso, a recuperação de VEGF no grupo SHR-T foi acompanhada por um aumento nos níveis proteicos do VEGFR2 (figura 3C). Entretanto, não existiu nenhuma diferença significativa nos níveis proteicos do VEGFR1 entre todos os grupos estudados (figura 3D).

### Quantificação de fatores anti e pró-apoptóticos: família Bcl-2

Recentes estudos têm demonstrado que os mecanismos envolvidos na inibição do processo angiogênico estão associados a um aumento na expressão de vários genes relacionados à apoptose, considerando um significativo aumento na morte de células endoteliais no músculo esquelético<sup>9</sup>.



**Figura 3.** Efeito do TF aeróbico sobre os fatores angiogênicos musculares esqueléticos na hipertensão arterial. Blots representativos de VEGF, VEGFR1, VEGFR2 e GAPDH de WKY, WKY-T, SHR, SHR-T (A). Níveis proteicos de VEGF, VEGFR1 e VEGFR2 no músculo sóleo analisados por *western blot*, respectivamente (B-D). As bandas-alvo foram normalizadas pela proteína GAPDH muscular esquelética. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  vs. WKY, SHR e SHR-T; †  $p < 0,05$  vs. WKY, WKY-T e SHR-T; ‡  $p < 0,05$  vs. WKY-T e SHR; §  $p < 0,05$  vs. WKY e SHR. TF: treinamento físico.

Os autores investigaram vias regulatórias chave que controlam a resposta molecular para apoptose, principalmente a família Bcl-2. Essas proteínas interagem funcionalmente por atuarem umas sobre as outras no controle do processo apoptótico. Sabe-se, principalmente, que as proteínas Bcl-2 e Bcl-x suprimem e as proteínas Bad e p-Bad<sup>ser112</sup> promovem apoptose<sup>10-12</sup>.

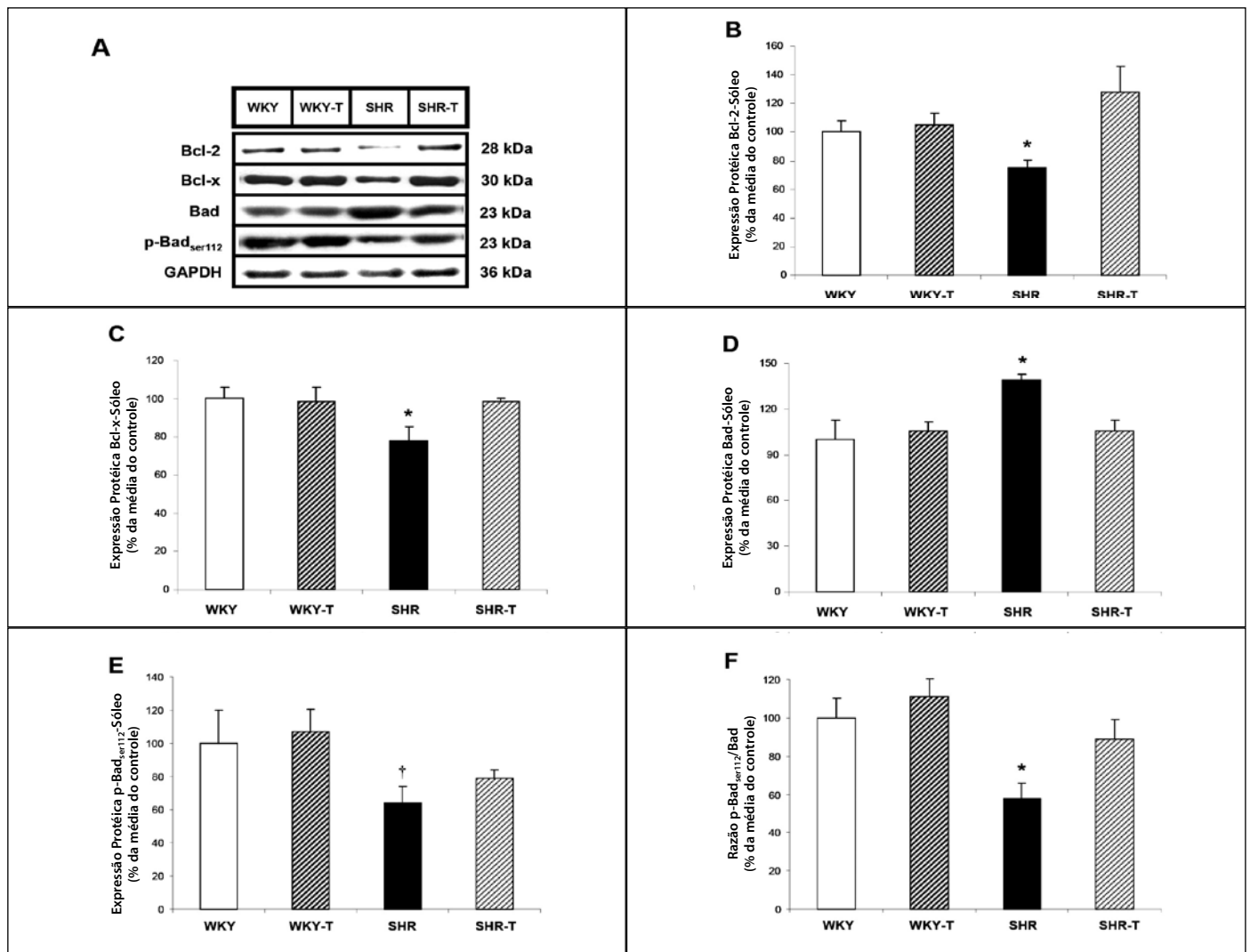
A figura 4 mostra os níveis proteicos avaliados por *western blot* de Bcl-2, Bcl-x, Bad e p-Bad<sub>ser112</sub> no músculo sóleo. Os níveis proteicos das proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e Bcl-x foram similares entre os grupos WKY e WKY-T (figuras 4 – B e C, respectivamente). Além disso, nenhuma mudança nos níveis proteicos da proteína pró-apoptótica Bad assim como no seu sítio de fosforilação na Serina 112 foram observadas no grupo WKY-T comparado ao seu controle sedentário WKY (figuras 4 – D e E, respectivamente). Em contraste, o grupo SHR apresentou um pronunciado aumento nos níveis proteicos da proteína pró-apoptótica Bad e diminuição desses níveis no seu sítio de fosforilação Serina 112, bem como da razão p-Bad<sub>ser112</sub>/Bad comparados ao grupo WKY (figuras 4 – D, E e F, respectivamente), acompanhados por uma redução dos níveis proteicos das proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e Bcl-x (figuras 4 – B e C, respectivamente). Interessantemente, como mostrado pelas figuras 4 – A-F, o TF restaurou os níveis proteicos das proteínas anti e pró-apoptóticas no grupo SHR-T, trazendo para valores similares ao grupo controle.

## DISCUSSÃO

No presente estudo foi utilizado o modelo de SHR e seus controles WKY para estudar a influência da HA essencial sobre as mudanças na microcirculação muscular esquelética. Além disso, avaliamos o efeito do TF sobre a correção da rarefação capilar e os possíveis mecanismos envolvidos nessas alterações, favorecendo a regressão da doença.

Os principais resultados do estudo mostram que o TF aeróbio sobre a HA: 1) reduziu a PA acompanhada de bradicardia de repouso; 2) corrigiu a rarefação capilar; 3) normalizou os níveis de VEGF muscular e aumentou a expressão do VEGFR2; e 4) desativou as vias apoptóticas periféricas.

O desequilíbrio no controle do tônus vascular observado na microcirculação na HA pode ser o resultado da excessiva vasoconstrição causando a oclusão de arteríolas de resistência e a não perfusão de capilares, induzindo a rarefação microvascular e a diminuição da condutância em paralelo da microcirculação muscular esquelética<sup>3-6</sup>. Além disso, estudos demonstram que a *shear stress* endotelial conduz para uma sustentada liberação de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e a ausência de fluxo sanguíneo, e portanto de NO, poderia conduzir a disfunção endotelial acompanhada por apoptose periférica e posteriormente perda de vasos não perfundidos na hipertensão, promovendo assim o quadro de rarefação microvascular. Dessa forma, a angiogênese é, sem dúvida, um fator essencial para indivíduos hipertensos, visto que



**Figura 4.** Efeito do TF aeróbio sobre as proteínas regulatórias da apoptose muscular esquelética na hipertensão arterial. Blots representativos de Bcl-2, Bcl-x, Bad, p-Bad<sub>ser112</sub> e GAPDH de WKY, WKY-T, SHR, SHR-T (A). Níveis proteicos de Bcl-2, Bcl-x, Bad e p-Bad<sub>ser112</sub> no músculo sóleo analisados por western blot, respectivamente (B-F). As bandas-alvo foram normalizadas pela proteína GAPDH muscular esquelética. Os resultados estão expressos como média ± EPM. \* p < 0,05 vs. WKY, WKY-T e SHR-T; † p < 0,05 vs. WKY e WKY-T. TF: treinamento físico.

melhora o aporte sanguíneo para os tecidos reduzindo a PA, que está prejudicada pela alta resistência vascular periférica<sup>3,4,13,19</sup>.

Considerando as evidências, o VEGF é considerado o mais importante regulador da angiogênese, quimiotaxia e sobrevivência da célula endotelial, impossibilitando a ativação das vias de sinalização de apoptose, consequentemente a perda do capilar<sup>8</sup>. De fato, a deleção ou inibição do VEGF na musculatura esquelética de camundongos adultos tem mostrado efeitos nocivos, principalmente uma redução significativa na densidade capilar com apoptose das células endoteliais teciduais<sup>23</sup>.

Sabe-se que a resposta angiogênica mediada pela prática do exercício físico aeróbio regular envolve diversos mecanismos, tais como o aumento do fluxo sanguíneo, desencadeando o aumento do *shear stress* e da tensão na parede dos capilares, a hipóxia ativando o fator induzido pela hipóxia (HIF-1 $\alpha$ ), o sistema renina angiotensina, entre outros, os quais são responsáveis pela indução de fatores de crescimento vascular, principalmente o VEGF<sup>24</sup>. Apesar de a literatura mostrar que diversos fatores atuam como potenciais precursores de angiogênese no músculo esquelético, o VEGF juntamente com a eNOS foram descritos como os mais importantes na promoção de formação de capilares com o TF aeróbio<sup>24</sup>. Além disso, a interação de VEGF com seu principal receptor angiogênico, o VEGFR2, receptor do tipo tirosina quinase, promove ativação de uma cascata de sinalização intracelular mediada principalmente pela via da PI3K/Akt que estimula a expressão de genes, como a eNOS, comprometidos principalmente com a vasodilatação, angiogênese e sobrevivência das células endoteliais<sup>8,24,25</sup>.

Interessantemente, o VEGFR2 é mostrado ter baixa expressão em SHR e a utilização de terapia gênica como forma de tratamento da HA com o uso de transferência gênica de VEGF foi efetivo em melhorar o prejuízo da angiogênese e a proliferação endotelial em SHR<sup>26</sup>.

De fato, um prejuízo dos fatores angiogênicos periféricos no grupo SHR observado neste trabalho confirma os dados demonstrados pela literatura supracitada, uma vez que nossos resultados apontam os níveis proteicos de VEGF na microcirculação de SHR marcadamente reduzidos comparados aos do WKY, ocorrendo em paralelo à rarefação capilar. Dessa forma, parece concebível que as anormalidades da estrutura vascular seguidas da perda de capilares são uma clara evidência do distúrbio do processo angiogênico que impossibilita a regeneração de microvasos funcionais no músculo esquelético de hipertensos.

Sabidamente, a rarefação capilar ocorre em paralelo à ativação da via apoptótica que repercute prejudicialmente sobre a angiogênese e a sobrevivência celular endotelial no músculo esquelético<sup>9</sup>. As proteínas Bcl-2/Bcl-x e Bad são importantes reguladores apoptóticos que atuam inibindo ou promovendo a apoptose, respectivamente<sup>10,27</sup>.

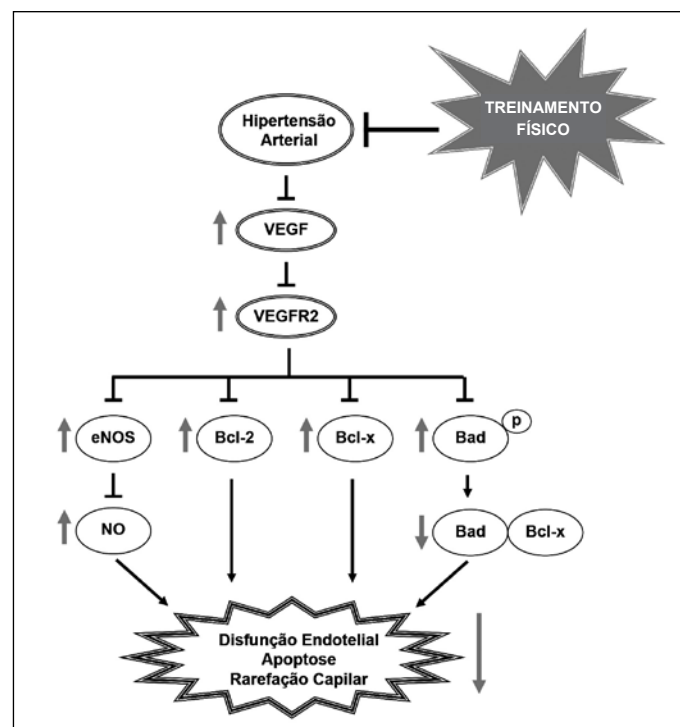
Como mencionado, os sinais de sobrevivência endotelial envolvidos pela interação VEGF/VEGFR2 são predominantemente mediados pela via PI3K/AKT/eNOS implicados no aumento de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 e Bcl-x<sup>28</sup>, inibindo assim a ativação das caspases, consequentemente a apoptose, bem como favorecendo a angiogênese. Por outro lado, esta cascata de ativação pode inibir a atividade pró-apoptótica de Bad<sup>29</sup>. Entretanto, como observamos uma redução nos níveis de VEGF em SHR, este controle dos mecanismos indutores e repressores de apoptose ficam prejudicados, culminando em uma redução da sobrevivência da célula endotelial e na promoção da rarefação microvascular na HA.

De fato, estudos da literatura evidenciam uma aumentada sinalização apoptótica do músculo sóleo em SHR comparado ao WKY, com aumento da expressão da proteína pró-apoptótica Bax, da atividade da caspase 3 e da fragmentação do DNA assim como redução nos níveis proteicos de Bcl-2<sup>27</sup>.

Consistente com os dados da literatura em mostrar maior expressão

de proteínas pró-apoptóticas e redução das antiapoptóticas na HA, nossos resultados indicam que o músculo sóleo de SHR apresenta um aumento na expressão de Bad e uma redução de Bcl-2 e Bcl-x. Sabe-se que a atividade pró-apoptótica de Bad é dependente da sua defosforilação; por outro lado, inibir a atividade de Bad representa manter o peptídeo em forma inativa, ou seja, fosforilado<sup>29</sup>. De fato, comprovamos o aumento da atividade pró-apoptótica de Bad em SHR, uma vez que verificamos uma diminuição da Bad fosforilada na Ser112 e da razão p-Bad<sub>ser112</sub>/Bad. Além disso, nossos resultados mostraram que uma redução da síntese de NO endotelial acompanhada por um aumento na expressão proteica de iNOS poderia contribuir para uma moderada troca da homeostase redox em direção a um estado pró-oxidante, corroborando para a ativação da via de sinalização pró-apoptótica microvascular uma vez que o estresse oxidativo mediado pela HA promove prejuízo da resposta vasodilatadora e apoptose da célula endotelial associada à perda de microvasos<sup>13,14</sup>.

Consistentes com os dados da literatura, o TF restaurou os níveis de VEGF acompanhado por aumento na expressão de VEGFR2. Além disso, pela primeira vez na literatura, mostramos que os níveis dos fatores antiapoptóticos Bcl-2 e Bcl-x foram normalizados na HA quando induzidos pelo TF, trazendo para valores semelhantes aos do WKY, ao passo que a sinalização pró-apoptótica foi reduzida com uma normalização dos níveis de Bad. Sabe-se que a Bad se transloca para a mitocôndria e forma um complexo pró-apoptótico com Bcl-x. A heterodimerização de Bad com Bcl-x previne o efeito antiapoptótico de Bcl-x. Dessa forma, observamos que esta translocação é inibida pelo aumento dos fatores de sobrevivência como VEGF e VEGFR2 pelo TF que induz a fosforilação de Bad, conduzindo para seu sequestro citosólico, consequentemente impedindo a sinalização apoptótica (figura 5).



**Figura 5.** Mecanismo hipotetizado de sinalização de sobrevivência celular e angiogênese mediado pela interação VEGF-VEGFR2: prejuízo na hipertensão arterial e correção pós-TF. A hipertensão arterial diminuiu os níveis de VEGF, comprometendo, portanto, a sinalização mediada por sua interação com o VEGFR2, conduzindo para uma redução de eNOS e da biodisponibilidade de NO, assim como alteração da sinalização de sobrevivência com redução das proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e Bcl-x e aumentando a atividade pró-apoptótica pela defosforilação de Bad e maior interação Bad-Bcl-x. Interessantemente, sinalizado pelas setas em vermelho, o TF corrigiu estes parâmetros mediados pela hipertensão arterial, regredindo a doença. TF: treinamento físico, p: fosforilação.

Assim, os resultados obtidos sugerem que a permanência e a formação de novos capilares podem ser dependentes do balanço entre os fatores angiogênicos e apoptóticos, uma vez que interagem de maneira sinérgica para prevenir anormalidades microvasculares e manter a homeostase vascular. Além disso, um aumento dos níveis proteicos de VEGF e VEGFR2 sem significantes mudanças na sinalização apoptótica microvascular no grupo WKY-T comparado ao controle WKY pode representar uma potencial via de sinalização de angiogênese induzida pelo TF aeróbio.

## AGRADECIMENTOS

À FAPESP (No. 2007/56771-4 e No. 2010/50048-1) e ao MCT/CNPq 14/2009 (No. 480391/2009-2) e CNPq (No. 307591/2009-3) pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa.

---

Todos os autores declararam não haver qualquer potencial conflito de interesses referente a este artigo.

---

## REFERÊNCIAS

1. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, et al. Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension* 2003;42:1206-52.
2. Pereira M, Lunet N, Azevedo A, Barros H. Differences in prevalence, awareness, treatment and control of hypertension between developing and developed countries. *J Hypertens* 2009;27:963-75.
3. Lévy BI, Ambrosio G, Pries AR, Struijker-Boudier HAJ. Microcirculation in hypertension: a new target for treatment? *Circulation* 2001;104:735-40.
4. Feihl F, Liaudet L, Waeber B, Lévy BI. Hypertension: A disease of the microcirculation?. *Hypertension* 2006;48:1012-7.
5. Greene AS, Tonellato PJ, Lui J, Lombard JH, Cowley AW Jr. Microvascular rarefaction and tissue vascular resistance in hypertension. *Am J Physiol* 1989;256:126-31.
6. Antonios TF, Singer DR, Markandu ND, Mortimer PS, MacGregor GA. Rarefaction of skin capillaries in borderline essential hypertension suggests an early structural abnormality. *Hypertension* 1999;34:655-8.
7. Dulak J, Józkowicz A, Dembinska-Kiec A, Guevara I, Zdzienicka A, Zmudzinska-Grochot D, et al. Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:659-66.
8. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med* 2005;9:777-94.
9. de Resende MM, Amaral SL, Munzenmaier DH, Greene AS. Role of endothelial cell apoptosis in regulation of skeletal muscle angiogenesis during high and low salt intake. *Physiol Genomics* 2006;25:325-35.
10. Borner C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol* 2003;39:615-47.
11. Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res* 1998;82:1111-29.
12. Slee EA. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase -9-dependent manner. *J Cell Biol* 1999;144:281-92.
13. Gobé G, Browning J, Howard T, Hogg N, Winterford C, Cross R. Apoptosis occurs in endothelial cells during hypertension-induced microvascular rarefaction. *J Struct Biol* 1997;118:63-72.
14. Kobayashi N, DeLano FA, Schmid-Schönbein GW. Oxidative stress promotes endothelial cell apoptosis and loss of microvessels in the spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2114-21.
15. Hagberg JM, Park JJ, Brown MD. The role of exercise training in the treatment of hypertension: an update. *Sports Med* 2000;30:193-206.
16. Whelton SP, Chin A, Xin X, He J. Effect of aerobic exercise on blood pressure: a metaanalysis of randomized, controlled trials. *Ann Intern Med* 2002;136:493-503.
17. Amaral SL, Zorn TM, Michelini LC. Exercise training normalizes wall-to-lumen ratio of the gracilis muscle arterioles and reduces pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2000;18:1563-72.
18. Amaral SL, Silveira NP, Zorn TM, Michelini LC. Exercise training causes skeletal muscle venular growth and alters hemodynamic responses in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2001;19:931-40.
19. Melo RP, Jr Martinho E, Michelini LC. Training-induced, pressure-lowering effect in SHR wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles. *Hypertension* 2003;42:851-7.
20. Moyna NM, Thompson PD. The effect of physical activity on endothelial function in man. *Acta Physiol Scand* 2004;180:113-23.
21. Medeiros A, Oliveira EM, Gianolla R, Casarini DE, Negrão CE, Brum PC. Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. *Braz J Med Biol Res* 2004;37:1909-17.
22. Sillau AH, Banchemo N. Visualization of capillaries in skeletal muscle by the ATPase reaction. *Pflugers Arch* 1977;369:269-71.
23. Tang K, Breen EC, Gerber HP, Ferrara NM, Wagner PD. Capillary regression in vascular endothelial growth factor-deficient skeletal muscle. *Physiol Genomics* 2004;18:63-9.
24. Prior BM, Yang HT, Terjung RL. What makes vessels grow with exercise training? *J Appl Physiol* 2004;52:1119-28.
25. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003;9:669-76.
26. Wang H, Olszewski B, Rosebury W, Wang D, Robertson A, Keiser JA. Impaired angiogenesis in SHR is associated with decreased KDR and MT1-MMP expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;315:363-8.
27. Quadrilatero J, Rush JW. Increased DNA fragmentation and altered apoptotic protein levels in skeletal muscle of spontaneously hypertensive rats. *J Appl Physiol* 2006;101:1149-61.
28. Nör JE, Christensen J, Mooney DJ, Polverini PJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. *Am J Pathol* 1999;154:375-84.
29. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997;91:231-41.
30. Fernandes T, Nakamura JS, Magalhães FC, Roque FR, Lavini-Ramos C, Schetter IT, Coelho V, Krieger JE, Oliveira EM. Exercise training restores the endothelial progenitor cells number and function in hypertension: implications for angiogenesis. *J Hypertens* 2012;30:2133-43.