

RELAÇÃO DOS BIOMARCADORES CARDIOVASCULARES (microRNAs CIRCULANTES) ÀS RESPOSTAS DA PRESSÃO ARTERIAL AO TREINAMENTO AERÓBIO CONTÍNUO EM HIPERTENSAS

Palavras-Chave: hipertensão arterial, treinamento aeróbio e microRNAs.

Giuliana Martinhão Fiorindo, FEF – Unicamp (bolsista IC); Marina Livia Venturini Ferreira; Henrique Monteiro Lapo; Amanda Veiga Sardeli; Carolina Panzarin, LABDIME, FCA – Unicamp; Liliane Vasconcelos; Matheus Alejandro Bolina Amaral; Adriana Souza Torsoni, LABDIME, FCA – Unicamp; Cláudia Regina Cavaglieri; Alex Castro (Co-orientador); Profa. Dra. Mara Patrícia Traina Chacon-Mikahil (Orientadora), FEF - Unicamp

INTRODUÇÃO:

A hipertensão arterial (HA) é uma doença crônica complexa e um fator de risco para risco cardiovascular, afetando globalmente milhões de pessoas e cerca de 38,1 milhões de brasileiros adultos (BARROSO et al., 2020; IBGE, 2020). Dados mais recentes comparando os períodos pré e pós a pandemia de Covid-19, a prevalência média da HA aumentou em cerca de 3% na população brasileira (GRILLO et al., 2024).

A HA é caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial sistólica (≥ 140 mmHg) e diastólica (≥ 90 mmHg) (BARROSO et al., 2020), e pode ser causada por fatores ambientais, sociais e genéticos (BÁTKAI e THUM, 2012). Diversos mecanismos fisiológicos, como a hiperatividade do sistema nervoso simpático e disfunção endotelial, estão envolvidos na HA, contribuindo para doenças cardiovasculares e renais (BÁTKAI e THUM, 2012).

A terapia para HA inclui abordagens farmacológicas e não farmacológicas. Os exercícios físicos, particularmente os aeróbicos, são eficazes na redução da pressão arterial e na melhora da função cardíaca, podendo diminuir a dosagem de medicamentos ou até mesmo, cessá-los (CAO et al., 2019; FERNANDES et al., 2014). A intensidade, volume e frequência dos exercícios são cruciais para promover estes efeitos (FERNANDES et al., 2014) e quando praticados por hipertensos, de modo geral, devem seguir as orientações de exercício físico para adultos saudáveis (ou seja: 150 a 300 minutos de atividades físicas/semana, em intensidade moderada (BARROSO et al., 2020; BARONE GIBBS et al., 2021). Assim, o treinamento aeróbio é considerado um grande aliado no tratamento da HA. Esse tipo de exercício envolve uma intensidade moderada e duração média a prolongada, envolvendo a contração de grandes grupos musculares de maneira cíclica, aumentando a frequência cardíaca e o gasto energético do indivíduo (MEDINA et al., 2010).

No entanto, a resposta da pressão arterial ao exercício pode variar entre os indivíduos hipertensos (CAO et al., 2019; FERREIRA et al., 2023; FERREIRA et al., 2024). Biomarcadores presentes em fluidos corporais, como por exemplo as citocinas, miocinas, metabólitos, ou ainda microRNAs, podem atuar como preditores da HA e doenças cardíacas (NEVES et al., 2016; WEBER et al., 2014).

Na literatura, é possível identificar uma série de microRNAs que estão envolvidos na HA e no remodelamento cardíaco, impactando sua concentração no sangue ou até mesmo em tecidos (FERNANDES et al., 2015; SHAHEEN et al., 2024). Os microRNAs presentes na corrente sanguínea apresentam mais estabilidade e estudos mostram que eles tendem a sofrer algum tipo de desregulação antes mesmo dos sintomas das doenças começarem a aparecer nos indivíduos (ROMANE et al., 2016). Em específico, o miR-126, apresenta níveis de expressão reduzidos em sujeitos hipertensos, um microRNA associado à angiogênese e sinalização do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que tem se mostrando crucial para a proliferação e migração das células endoteliais e manutenção da integridade vascular (WANG et al., 2008; KONTARAKI et al., 2014).

Assim, os objetivos do presente estudo foram: Etapa 1: realizar uma revisão na literatura e meta análise dos microRNAs presentes em hipertensos submetidos à treinamento aeróbio, e Etapa 2: analisar MicroRNAs circulantes em amostras de soro sanguíneo de mulheres HA submetidas à um protocolo de treinamento aeróbio de 12 semanas e relacioná-los às respostas da Pressão Arterial.

MÉTODOS:

Este estudo está sendo conduzido em duas etapas.

ETAPA 1

A Etapa 1 foi necessária como estratégia metodológica prévia para melhor definição e atualização dos microRNAs alvo a serem utilizados na análise das amostras coletadas. Desta forma, foi inserido no estudo um levantamento bibliográfico (revisão sistemática seguida de meta análise - em desenvolvimento) como descrito a seguir.

Estratégia de busca e seleção dos estudos: Uma busca sistemática foi realizada nas bases de dados PubMed, Web of Science, Scopus e Embase, em 24 de Junho de 2024 com a combinação de sinônimos para os termos “Essential Hypertension”, “MicroRNAs” e “Exercise”. A sintaxe feita no Pubmed foi utilizada como referência para realizar a pesquisa nas outras bases, com suas respectivas sintaxes. Não houve restrição de ano das buscas e a espécie selecionada para primeira análise foi de ratos. Em seguida, foi utilizada a plataforma Mendeley para exclusão de duplicatas e posteriormente foi utilizada a plataforma Rayyan Systematic Reviews system (OUZZANI et al., 2016) para filtrar e realizar a exclusão manual dos artigos que foram excluídos. Os estudos selecionados foram aqueles que tinham os seguintes elementos obrigatórios: ratos HA submetidos a protocolo de treinamento aeróbico. Os critérios de exclusão englobaram estudos sem dados originais (resenhas, capítulos de livros, trabalhos de congressos) sem hipertensão arterial, obesos ou diabéticos, estudos sem intervenção com exercício ou microRNAs ou com outras doenças que não a hipertensão arterial sistêmica (HA pulmonar, doença arterial coronariana, aterosclerose). Posteriormente em uma segunda etapa serão analisados estudos com humanos.

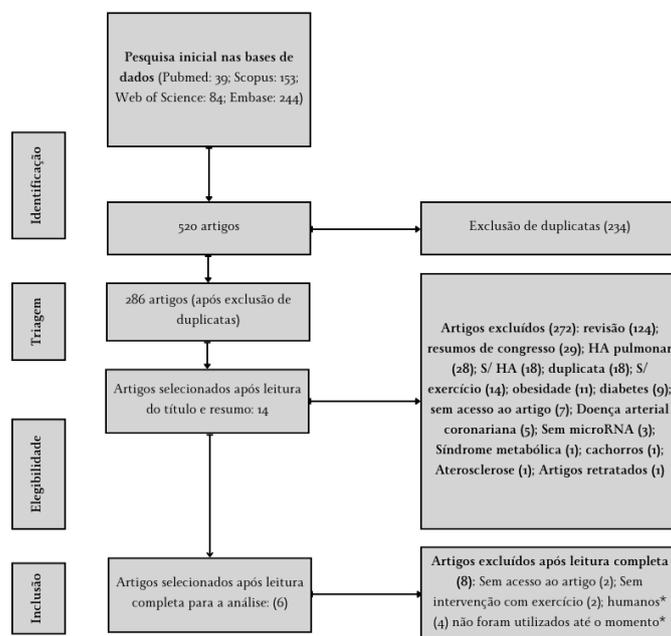


Figura 1. Seleção dos Estudos. *Os estudos com humanos são estudos longitudinais, diferentes dos transversais utilizados nessa análise, portanto, ainda não foram utilizados nesta fase da análise.

Coleta dos dados: A partir dos artigos selecionados foram extraídos os dados de microRNAs analisados, subgrupos, tipo de tecido, e espécie. Para a análise principal, a média, o desvio padrão (DP) e o tamanho da amostra (n) foram utilizados. Quando o desvio padrão não era fornecido no estudo original, o erro padrão (EP) foi convertido para DP utilizando a equação $DP = EP \times \sqrt{n}$. Os intervalos de confiança de 95% foram convertidos para desvio padrão (DP) considerando a equação $(\sqrt{n}) * (UL - LL) / (2 * T.INV(0.05; n - 1))$, onde n é o tamanho da amostra, UL é o limite superior, LL é o limite inferior e T.INV é a função que calcula o inverso à esquerda da distribuição T de Student. A mediana e a amplitude interquartil (AIQ) foram substituídas, respectivamente, pela média e pelo DP de acordo com a equação $DP = (AIQ/1,35)$.

Análise estatística: A meta-análise foi realizada utilizando o software Comprehensive Meta-Analysis (CMA) versão 3.3.070. Como as unidades de medida utilizadas nos estudos foram diferentes, utilizou-se a diferença média padronizada (SMD) para que fosse possível a comparação dos microRNAs nos diferentes estudos. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Quando a inconsistência entre os estudos (I^2) foi $>50\%$, foram aplicados efeitos randômicos, e quando foi $<40\%$, foram aplicados efeitos fixos.

ETAPA 2

Amostra: Foram selecionadas 65 mulheres hipertensas na pós menopausa (CAEE 2.479.380), que foram randomizadas em grupo treinamento aeróbio contínuo (TAC, n=51, 57.7 ± 6.4 anos) (50min em cicloergômetro, 3x/semana a 60-70% FCreserva) e grupo controle (CON, n=14) (ausência de treinamento físico). Após o período inicial de intervenção (Etapa 1), o grupo TAC foi classificado em respondedores e não respondedores da PAS baseado no erro típico de medida (6 mmHg).

Expressão de microRNAs: Na análise dos microRNAs alvos, selecionamos a partir da revisão da literatura, o miR-126, esta análise em execução utilizará RT-qPCR (Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction), para quantificar os microRNAs (PEREIRA, 2015; SILVA et al., 2018; WEI et al., 2020; HENNING et al., 2020). Nas etapas de preparação para análise do hsa-miR-126-3p, utilizaremos 200µl de plasma sanguíneo. A extração do RNA total, incluindo microRNAs, será realizada pelo método de colunas, utilizando o miRNeasy Mini Kit da Qiagen, seguindo rigorosamente as recomendações do fabricante. Após a extração, a quantidade e a qualidade do RNA serão avaliadas utilizando um espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) observando a relação entre as absorvâncias em 260 nm e 280 nm na faixa de 1,8-2,0. Para a síntese de cDNA, será utilizado o TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit, Thermo Fischer Scientific). A reação de transcrição reversa será realizada com RNA total, e utilização de primers específicos para hsa-miR-126-3p (Thermo Fisher Scientific) (MESTDAGH et al., 2014, CHEN et al., 2005). O equipamento ser utilizado será ABI 7500 FAST e os dados obtidos serão analisados usando o Sistema de Detecção de Sequência (Applied Biosystems versão 1.7). A expressão do miR-126-3p será normalizada utilizando o cel-mir-39 Spike in como controle endógeno.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

ETAPA 1

Foram inclusos 6 artigos no total (Figura 1) e a análise escolhida foi por separação de microRNAs. Todos os grupos eram compostos por ratos hipertensos, e as amostras de tipo de tecido foram heterogêneas, dentre elas músculo, tecido cardíaco, artéria mesentérica e exossomos. Os estudos avaliados foram transversais, portanto, realizou-se a comparação entre os grupos treinado e controle para cada microRNA (Tabela 1).

Os principais resultados encontrados acerca dos microRNAs relacionados à HA foram o aumento ou diminuição de sua expressão dentre os grupos treinados e controle não treinado. Foi observado uma redução no miR-126 nos indivíduos hipertensos, no entanto, aumento deste mesmo microRNA nos indivíduos treinados. O miR-27a também apresentou maiores níveis nos grupos treinados em comparação com o grupo controle dos respectivos artigos (Figura 2).

A literatura recente vem mostrando relações entre o papel do miR-27a e seu papel como um potencial biomarcador para a detecção e prevenção da HA, mostrando níveis mais baixos em indivíduos hipertensos (SUZUKI, et al.,2022) Esse achado pode corroborar com os dados nos artigos analisados na meta análise, os quais demonstram que o miR-27a aumentou com a intervenção do exercício. Esse microRNA possui importância na angiogênese, estimulando o brotamento vascular, fato relevante para a perfusão sanguínea e impacto positivo sobre a HA (SILVA et. Al 2018).

Em relação ao miR-126, este apresenta grande abundância no coração, e, recentemente, vem sendo um grande aliado na possível predição de doenças cardiovasculares (WEI et al., 2015). Em indivíduos hipertensos e com outras doenças cardiovasculares, a literatura mostra uma redução deste microRNA, também apresentando relação com a angiogênese na formação de novos vasos sanguíneos, fato este que colabora com os achados desta meta análise, onde os ratos hipertensos apresentam os níveis de miR-126 reduzidos. No entanto, foi observado um aumento neste microRNA após as semanas dos protocolos de exercícios (WEI et al, 2015; WANG et al., 2008; KONTARAKI et al., 2014).

ETAPA 2

Nesta etapa finalizaremos a extração do RNA no plasma sanguíneo das voluntárias hipertensas e em seguida a RT-qPCR para quantificação do microRNA selecionado, o miR-126. A partir deste resultado, será possível inferir as concentrações do mesmo nos períodos pré e pós programa de treinamento aeróbio desenvolvido em comparação ao grupo controle (não exercitado). Os dados serão inseridos no relatório final deste estudo e apresentados no Congresso de IC 2024, em decorrência de atrasos na nas compras e fornecimento dos insumos necessários para as análises.

Tabela 1. Comparação dos Valores Médios de miRNA em ratos submetidos a protocolos de Treinamento Aeróbio. **Legenda.** (média ± dp¹) = % control of sedentary HA rats (100%); (média ± dp²) = % control of normotensive rats (100%); (média ± dp³) = fold of normotensive Wistar-Kyoto rats - 1; (média ± dp⁴) = U6 - miRNA normalizer; (média ± dp⁵) = fold of sedentary HA rats - 1.

Subgrupo	miRNA	Tecido	Espécie	Característica Intervenção - Treinamento aeróbio	Valor Intervenção (média ± dp)	Valor Controle (média ± dp)	Efeito (valor de P)
HA sem DEX	16	músculo	ratos	60% da intensidade do teste Tmax realizado; 1h/dia; 5x/semana; 8 semanas	100 ± 0,01 ¹	100±0,01 ¹	if
HA com DEX	16	músculo	ratos	60% da intensidade do teste Tmax realizado; 1h/dia; 5x/semana; 8 semanas	101,80 ± 4,40 ¹	100,40±2,20 ¹	if
-	16	músculo	ratos	Natação; 4% do peso corporal caudal; 1h/dia; 5x/semana; 10 semanas	67,90 ± 17,40 ²	130,30±28 ²	↓- INT
HA sem DEX	21	músculo	ratos	60% da intensidade do teste Tmax realizado; 1h/dia; 5x/semana; 8 semanas	101,10 ± 2,70 ¹	100,90±3,11 ¹	if
HA com DEX	21	músculo	ratos	60% da intensidade do teste Tmax realizado; 1h/dia; 5x/semana; 8 semanas	103,30 ± 4,90 ¹	101,30±5,35 ¹	if
-	21	músculo	ratos	Natação; 4% do peso corporal caudal; 1h/dia; 5x/semana; 10 semanas	86 ± 17,70 ²	136,80±28,80 ²	↓- INT
HA sem DEX	126	músculo	ratos	60% da intensidade do teste Tmax realizado; 1h/dia; 5x/semana; 8 semanas	113,20 ± 5,70 ¹	100,20±2,90 ¹	↑- INT
HA com DEX	126	músculo	ratos	60% da intensidade do teste Tmax realizado; 1h/dia; 5x/semana; 8 semanas	115,70 ± 14,70 ¹	100,20±2,90 ¹	↑- INT
-	126	músculo	ratos	Natação; 4% do peso corporal caudal; 1h/dia; 5x/semana; 10 semanas	95 ± 15 ²	70,90±15 ²	↑- INT
HA sem DEX	155	músculo	ratos	60% da intensidade do teste Tmax realizado; 1h/dia; 5x/semana; 8 semanas	100,50 ± 1,50 ¹	100,90±1,70 ¹	if
HA com DEX	155	músculo	ratos	60% da intensidade do teste Tmax realizado; 1h/dia; 5x/semana; 8 semanas	100,80 ± 2,70 ¹	100,90±1,17 ¹	if
-	155	Tissue	ratos	Esteira com velocidade de 8-20m/min; 0,5-1h/dia; 7x/semana; 12 semanas	0,88 ± 0,10 ³	0,30±0,05 ³	↑ - INT
HA sem DEX	221	músculo	ratos	60% da intensidade do teste Tmax realizado; 1h/dia; 5x/semana; 8 semanas	102 ± 6,60 ¹	100,10±1,09 ¹	if
HA com DEX	221	músculo	ratos	60% da intensidade do teste Tmax realizado; 1h/dia; 5x/semana; 8 semanas	101 ± 5,80 ¹	101±1,53 ¹	if
HA sem DEX	222	músculo	ratos	60% da intensidade do teste Tmax realizado; 1h/dia; 5x/semana; 8 semanas	100 ± 3 ¹	100±3,11 ¹	if
HA com DEX	222	músculo	ratos	60% da intensidade do teste Tmax realizado; 1h/dia; 5x/semana; 8 semanas	106 ± 17 ¹	99,55±3,55 ¹	if
-	27a	Tecido	ratos	Esteira com velocidade de 8-20m/min; 0,5-1h/dia; 7x/semana; 12 semanas	1,25 ± 0,15 ⁴	0,49±0,07 ⁴	↑- INT
-	27a	Exossomo	ratos	Esteira com velocidade de 10 m/min; 1h/dia; 5x/semana; 8 semanas	2,80 ± 0,31 ⁵	1±0,12 ⁵	↑ - INT
-	143	Tecido	ratos	Esteira com velocidade de 8-20m/min; 0,5-1h/dia; 7x/semana; 12 semanas	1,15 ± 0,20 ⁴	2,24±0,26 ⁴	↓- INT
-	145	Tecido	ratos	Esteira com velocidade de 28m/min; 1h/dia; 5x/semana; 8 semanas	2,71 ± 0,63 ⁴	1,69±0,45 ⁴	↑- INT
-	214	Tecido	ratos	Esteira em 60-70% da velocidade máxima de corrida; 1h/dia; 5x/semana; 8 semanas	419,80± 211,40 ¹	130,8±96 ¹	↑- INT

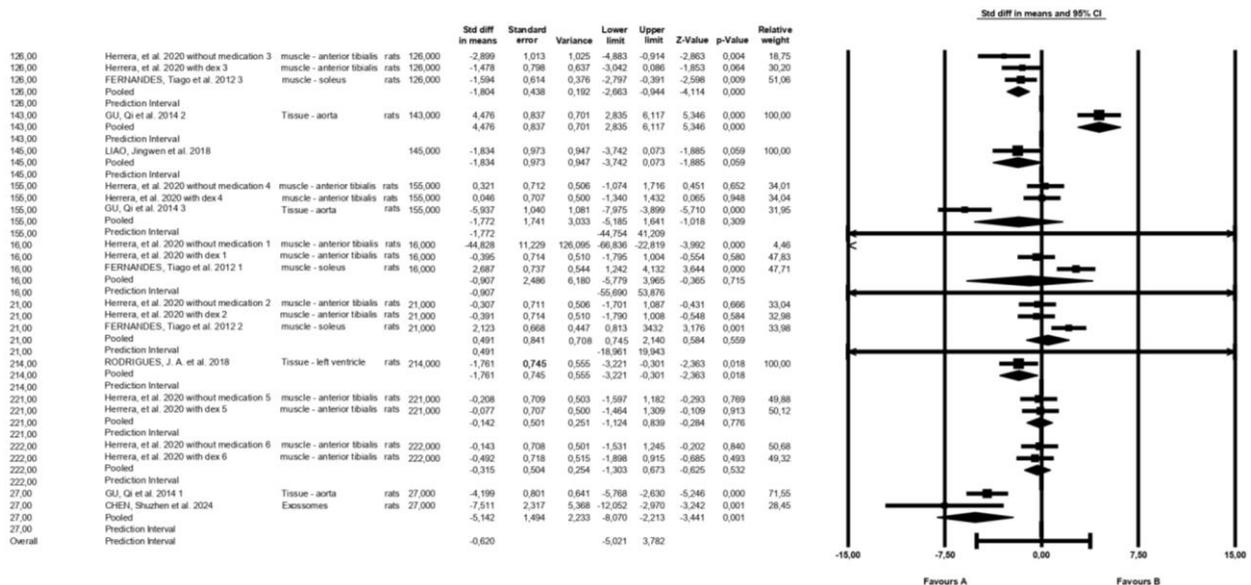


Figura 2. Forest plot da análise por miRNA

CONCLUSÕES:

ETAPA 1. Pode-se concluir que os microRNAs 27a e 126 possuíram maiores variações entre os grupos treinados e não treinados, corroborando com os achados da literatura até o momento. Entretanto, a heterogeneidade nos estudos em relação a unidades de medida, material biológico/tecido analisado, microRNAs e pouca variedade de espécie (a maior parte dos estudos são realizados em animais) mostra a necessidade de pesquisas adicionais para confirmar tais resultados.

ETAPA 2. Em fase de análise das amostras e resultados para conclusões.

REFERÊNCIAS:

- BARONE GIBBS, Bethany et al. Physical activity as a critical component of first-line treatment for elevated blood pressure or cholesterol: who, what, and how: a scientific statement from the American Heart Association. **Hypertension**, v. 78, n. 2, p. e26-e37, 2021.
- BARROSO, Weimar Kunz Sebba et al. Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial–2020. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 116, p. 516-658, 2021.
- BÁTKAI, Sándor; THUM, Thomas. MicroRNAs in hypertension: mechanisms and therapeutic targets. **Current hypertension reports**, v. 14, n. 1, p. 79-87, 2012.
- CAO, Liujiao et al. The effectiveness of aerobic exercise for hypertensive population: a systematic review and meta-analysis. **The Journal of Clinical Hypertension**, v. 21, n. 7, p. 868-876, 2019.
- CHEN, C., Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR, **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 20, p. e179–e179, 2005.
- FERNANDES, Tiago et al. Exercise training in hypertension: Role of microRNAs. **World journal of cardiology**, v. 6, n. 8, p. 713, 2014.
- FERNANDES, Tiago 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-H552, 2015.
- FERREIRA, Marina LV et al. Hemodynamic predictors of blood pressure responsiveness to continuous aerobic training in postmenopausal hypertensive women. **Metabolic syndrome and related disorders**, v. 21, n. 9, p. 517-525, 2023.
- FERREIRA, Marina Livia Venturini et al. Hypotensive effects of exercise training: are postmenopausal women with hypertension non-responders or responders? **Hypertension Research**, p. 1-11, 2024.
- GRILLO, Luciane Peter et al. Tendência da prevalência de Hipertensão Arterial Sistêmica segundo as regiões do Brasil antes, durante e após a pandemia de COVID-19. **CONTRIBUCIONES A LAS CIENCIAS SOCIALES**, v. 17, n. 4, p. e6239-e6239, 2024.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa nacional de saúde: 2019: percepção do estado de saúde, estilos de vida, doenças crônicas e saúde bucal: Brasil e grandes regiões**. IBGE, Coordenação de Trabalho e Rendimento. Rio de Janeiro: IBGE; 2020. 113p.
- KONTARAKI, Joanna E. et al. MicroRNA-9 and microRNA-126 expression levels in patients with essential hypertension: potential markers of target-organ damage. **Journal of the American Society of Hypertension**, v. 8, n. 6, p. 368-375, 2014.
- MEDINA, Fabio Leandro et al. Atividade física: impacto sobre a pressão arterial. **Rev Bras Hipertens**, v. 17, n. 2, p. 103-106, 2010.
- MESTDAGH, Pieter *et al*, Evaluation of quantitative miRNA expression platforms in the microRNA quality control (miRQC) study, **Nature Methods**, v. 11, n. 8, p. 809–815, 2014.
- NEVES, Josynaria Araújo; NEVES, Josyanne Araújo; OLIVEIRA, Rita de Cássia Meneses. Biomarcadores de função endotelial em doenças cardiovasculares: hipertensão. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 15, p. 224-233, 2016.
- PEREIRA, T.C. **Introdução ao mundo dos microRNAs**. (Organizador). – Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2015.
- SHAHEEN, Nour et al. MicroRNAs (miRNAs) role in hypertension: pathogenesis and promising therapeutics. **Annals of Medicine and Surgery**, v. 86, n. 1, p. 319-328, 2024.)
- SILVA, Debora Cristina Pereira da et al. Papel dos miRNAs na Fisiopatologia das Doenças Cardiovasculares. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 111, p. 738-746, 2018.
- SUZUKI, Koji et al. Circulating microRNA-27a and-133a are negatively associated with incident hypertension: a five-year longitudinal population-based study. **Biomarkers**, v. 27, n. 5, p. 496-502, 2022.
- WEI, Zhang et al. Expression of miRNAs in plasma exosomes derived from patients with atrial fibrillation. **Clinical Cardiology**, v. 43, n. 12, p. 1450-1459, 2020.
- HENNING, Robert J. Cardiovascular exosomes and microRNAs in cardiovascular physiology and pathophysiology. **Journal of cardiovascular translational research**, v. 14, p. 195-212, 2021.
- WANG, Shusheng et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. **Developmental cell**, v. 15, n. 2, p. 261-271, 2008.
- WEBER, Michael A. et al. Clinical practice guidelines for the management of hypertension in the community: a statement by the American Society of Hypertension and the International Society of Hypertension. **The journal of clinical hypertension**, v. 16, n. 1, p. 14, 2014.