



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

DENIS CARLOS DOS SANTOS

**EFEITO DO BLOQUEIO FARMACOLÓGICO DO SISTEMA RENINA –  
ANGIOTENSINA NO DESEMPENHO FÍSICO DE RATOS  
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

**DENIS CARLOS DOS SANTOS**

**EFEITO DO BLOQUEIO FARMACOLÓGICO DO SISTEMA RENINA -  
ANGIOTENSINA NO DESEMPENHO FÍSICO DE RATOS  
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

DENIS CARLOS DOS SANTOS

**EFEITO DO BLOQUEIO FARMACOLÓGICO DO SISTEMA RENINA –  
ANGIOTENSINA NO DESEMPENHO FÍSICO DE RATOS  
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Universidade Estadual de Londrina–PR, como requisito para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Gislaine Garcia Pelosi  
Gomes

Co-orientadora: Profa. Dra. Lisete Compagno  
Michelini

Londrina  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Santos, Denis Carlos dos.

Efeito do bloqueio farmacológico do sistema renina angiotensina no desempenho físico de ratos espontaneamente hipertensos / Denis Carlos dos Santos. - Londrina, 2018. 81 f. : il.

Orientador: Gislaine Garcia Pelosi Gomes.

Coorientador: Lisete Compagno Michelini.

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Sistema Renina Angiotensina - Tese. 2. Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina, Antagonistas dos Receptores da Angiotensina - Tese. 3. Desempenho Físico - Tese. 4. Músculo Esquelético - Tese. I. Garcia Pelosi Gomes, Gislaine. II. Compagno Michelini, Lisete. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. IV. Título.

DENIS CARLOS DOS SANTOS

**EFEITO DO BLOQUEIO FARMACOLÓGICO DO SISTEMA RENINA –  
ANGIOTENSINA NO DESEMPENHO FÍSICO DE RATOS ESPONTANEAMENTE  
HIPERTENSOS**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Universidade Estadual de Londrina–PR, como requisito para a obtenção do título de Doutor.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Gislaine Garcia Pelosi  
Gomes  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Marli Cardoso Martins Pinge  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof Dr Waldiceu Aparecido Verri Junior  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof Dr Carlos Cesar Crestani  
Universidade Estadual Paulista – UNESP

---

Profa. Dra. Karen Barros Parron Fernandes  
Universidade Norte do Paraná – UNOPAR

Londrina, 03 de maio 2018.

Aos meus pais *José Francisco (in memoriam)* e *Izabel Cristina* pela vida, pelo amor incondicional e por toda a dedicação.

Ao meu querido irmão *Danilo Carlos (in memoriam)*, que mesmo partindo cedo, permanecerá eternamente dentro do meu coração.

Cada semente que eu plantar, por onde caminhar, há de brotar o melhor de vocês, que faz parte de mim.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida.

Agradeço aos meus pais, pelo amor incondicional.

À querida mestre Profa. Dra. Gislaine Garcia Pelosi Gomes: Vivemos uma escassez de pessoas honestas, sensatas e humildes. Alie-se a isso, a falta de pessoas inteligentes e competentes, determinadas e ousadas, persistentes e discretas, acadêmicas e pesquisadoras, carinhosas e respeitadoras... Você, minha querida mestre e amiga, consegue conciliar todas estas qualidades em uma só pessoa. Como orientado, agradeço pela forma como conseguiu ampliar minha visão em relação à ciência e pesquisa e pela brilhante orientação. Como amigo, só posso dizer que hoje me sinto ainda mais privilegiado em poder fazer parte da sua vida. Serei eternamente grato pela forma que estendeu vossas mãos, quando precisei, não apenas em relação a conclusão do nosso trabalho, mas em todos os aspectos da minha vida. Meu muito obrigado, de coração.

À Profa. Dra. Lisete Compagno Michelini, minha co-orientadora, que desde o início do nosso projeto forneceu-nos subsídios necessários para o desenvolver do presente estudo.

À Profa. Dra. Karen Barros Parron Fernandes, que com maturidade e clareza do seu fazer científico, conduziu e estimulou-me desde o mestrado, a aventurar-se pelas ciências básicas, dando continuidade em nossos estudos. Com toda certeza, não chegaríamos a tal desfecho sem seu apoio. Serei grato por todo sempre.

Ao Prof. Dr. Marcus Vinicius de Matos Gomes (*in memoriam*), que compartilhou de seus conhecimentos e atividades relacionados à epigenética, deixando nosso trabalho mais sólido e consistente. Tenha certeza que os frutos de tal pesquisa, só foram possíveis mediante seu auxílio. Onde quer que esteja, tenha a certeza que sempre reconhecerei seu trabalho.

Aos amigos de laboratório, que sempre estiveram prontos a auxiliar-me em quaisquer atividades durante esses 4 anos de convivência, partilhando de alegrias, tristezas, tensões e satisfações. Amizade surgida no doutorado, persistindo para sempre.

A minha namorada Viviane Moraes, pela força transmitida, pela paciência e pelo amor demonstrado em todo o caminho que percorremos juntos. Agradecer-te não é um gesto que se põe em papel, mas algo que pretendo partilhar contigo ao longo da nossa convivência.

A todos os meus amigos, que embora geograficamente distantes, sempre estiveram presentes de alguma forma.

As irmãs Lilian, Sheila e sobrinhos pelo companheirismo, compreensão e amor, compreendendo minhas ausências e faltas de dedicação.

Aos demais professores, colegas e colaboradores, que me auxiliaram no decorrer do curso.

*"Não sei o que possa parecer aos olhos do mundo, mas aos meus pareço apenas ter sido como um menino brincando à beira-mar, divertindo-me com o fato de encontrar de vez em quando um seixo mais liso ou uma concha mais bonita que o normal, enquanto o grande oceano da verdade permanece completamente por descobrir à minha frente."*

Isaac Newton

SANTOS, Denis Carlos dos. **Efeito de drogas com ação no sistema renina-angiotensina no desempenho físico de ratos hipertensos**. 2018. 81 f. Tese (Doutorado Multicêntrico em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## RESUMO

Estudos têm demonstrado que o principal mediador do sistema renina angiotensina (SRA), a angiotensina II (Ang II) é um peptídeo chave na regulação da função muscular, estando relacionado com efeitos benéficos ou deletérios nessas células. Assim, abordagens farmacológicas capazes de modular o SRA podem representar potenciais benefícios na estrutura e função muscular. O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos do tratamento farmacológico com o inibidor da enzima conversora de angiotensina enalapril (ENA) ou com o antagonista do receptor da angiotensina losartan (LOS) em parâmetros físicos, cardiovasculares, moleculares e epigenéticos em ratos espontaneamente hipertensos (SHR), submetidos ao teste de esforço progressivo em esteira. Foram utilizados ratos espontaneamente hipertensos (SHR) adultos, divididos em três grupos: controle (CTL, água, n=11), enalapril (ENA: 10mg/kg/dia/vo, n=13), losartan (LOS: 10mg/kg/dia/vo, n=15), sendo tal administração realizada por 28 dias consecutivos. Avaliou-se a pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e a distância percorrida (metros) desses animais em teste progressivo em esteira, a cada 7 dias durante o período de administração das drogas. Após 28 dias de tratamento, parte da amostra (CTL: 5, ENA: 5, LOS:7) permaneceu por 7 dias sem receber tratamento, no intuito de avaliar o efeito tardio ao tratamento. Os animais foram submetidos a eutanásia, sendo coletados o músculo gastrocnêmio, sóleo e o plasma, estes utilizados para realizar análises da capacidade oxidante e antioxidante total e a metilação global do DNA. A ingestão de enalapril modula o peso corporal dos animais, impedindo o ganho de peso ao longo do tratamento, sendo mais evidente após o 14º dia de tratamento ( $p=0,0222$ ) e reduzindo os níveis de gordura retroperitoneal ( $p=0,0272$ ). Redução da PAM estatisticamente significativa foi observada após a 4ª semana de tratamento no grupo ENA comparado ao grupo CTL ( $p<0,05$ ). Entretanto, ao observar a área sob a curva, a PAM do grupo ENA manteve-se reduzida a partir da 1ª semana de tratamento ( $p=0,0215$ ). O tratamento com enalapril evitou o declínio da distância percorrida dos animais durante o tratamento quando comparada com os outros grupos ( $p=0,1163$ ), bem como quando avaliado o efeito tardio ao tratamento, quando comparados ao grupo CTL ( $p=0,0461$ ). A administração de enalapril ou losartan não alteraram a capacidade oxidante e antioxidante total dos músculos gastrocnêmio, sóleo e do plasma, avaliadas através do ensaio FRAP (gastrocnêmio  $p=0,4702$ ; sóleo  $p=0,0843$ ; plasma;  $p=0,3510$ ), ABTS (gastrocnêmio  $p=0,4212$ ; sóleo:  $p=0,1488$ ; plasma:  $p=0,5280$ ), NBT (gastrocnêmio  $p=0,8812$ ; sóleo  $p=0,5300$ ; plasma  $p=0,0653$ ) e MDA (gastrocnêmio  $p=0,8354$ ; sóleo  $p=0,9972$ ; plasma  $p=0,4096$ ), dos animais submetidos ao teste de esforço máximo em esteira. A administração de enalapril – mas não de losartan, aumentou a metilação global do DNA de células musculares esqueléticas do músculo gastrocnêmio ( $p=0,0239$ ) dos animais submetidos ao teste de esforço progressivo em esteira. Tais achados confirmam o efeito protetor do enalapril sobre o sistema musculoesquelético e seu efeito sobre a modulação do peso corporal, bem como demonstra pela primeira vez que a intervenção farmacológica com foco na modulação do SRA utilizando o IECA enalapril é capaz de promover alterações epigenéticas no músculo esquelético submetido ao teste de esforço máximo.

**Palavras-chave:** Enalapril. Losartan. Sistema renina angiotensina. Desempenho físico. Músculo esquelético.

SANTOS, Denis Carlos dos. **Effect of drugs with action on the renin-angiotensin system on the physical performance of hypertensive rats.** 2018. 81 p. Thesis (Multicentric Doctorate in Physiological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

### ABSTRACT

Studies have shown that main mediator of the renin angiotensin system (RAS), angiotensin II (Ang II) is a key peptide in regulation of muscle function and it is related to beneficial or deleterious effects in these cells. Thus, pharmacological modulation of RAS can represent potential benefits in muscle structure and function. The aim this study was to evaluate the effects of pharmacological treatment with the angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril (ENA) or the angiotensin receptor antagonist losartan (LOS) on physical, cardiovascular, molecular and epigenetic parameters of spontaneously hypertensive rats (SHR) submitted to the treadmill progressive stress test. Male adult spontaneously hypertensive rats (SHR) were divided into three groups: control (CTL, water, n = 11), enalapril (ENA: 10mg/kg/day, n = 13), losartan (LOS: 10mg/kg/day, n=15), such administration was performed for 28 consecutive days by gavage. Mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR) and distance traveled (meters) of these animals were evaluated by treadmill progressive test, every 7 days during drug administration period. After 28 days of treatment, part of the sample (CTL: 5, ENA: 5, LOS: 6) remained for 7 days without receiving any treatment to evaluate the late effect treatment. After euthanasia, gastrocnemius muscle, soleus and plasma were collected for posterior analyzes of the total oxidizing and antioxidant capacity and the overall DNA methylation. Enalapril intake avoided weight gain during treatment, mainly after 14th day of treatment ( $p = 0,0222$ ) and reduced retroperitoneal adipose tissue weight ( $p=0,0272$ ). Significant MAP reduction of animals treated with enalapril was observed after fourth week of treatment ( $p = 0,0146$ ). However, the area under curve analysis demonstrated reduction on MAP levels from first week treatment ( $p=0,0215$ ). Enalapril treatment prevented running distance decline by animals when compared to the other groups ( $p = 0,1163$ ), as well as when evaluated late effect treatment, when compared control group ( $p=0,0461$ ). Enalapril or losartan intake did not alter the total oxidative and antioxidant capacity of the plasma, gastrocnemius and soleus muscles, evaluated by the FRAP assay (gastrocnemius  $p=0,4702$ , soleus  $p=0,0843$ , plasma,  $p=0,3510$ ), ABTS (gastrocnemius  $p=0,4212$ , soleus:  $p=0,1488$ , plasma:  $p=0,5280$ ), NBT (gastrocnemius  $p=0,8812$ , soleus  $p=0,5300$ , plasma  $p=0,0653$ ) and MDA (gastrocnemius  $p=0,8354$ , soleus  $p=0,9972$ , plasma  $p= 0,4096$ ), of the animals submitted to the treadmill progressive test. Enalapril intake but not losartan increased the overall methylation of the skeletal muscle cell DNA of the gastrocnemius muscle ( $p=0,0239$ ) from animals to the treadmill progressive test. These findings confirm the protective effect of enalapril on the musculoskeletal system and its effect on body weight modulation, as well as demonstrate for the first time that the pharmacological intervention focused on the modulation of RAS using ACE inhibitors enalapril can promote epigenetics changes in the muscle skeletal muscle submitted to the treadmill progressive test.

**Key-words:** Enalapril. Losartan. Renin angiotensin system. Physical performance. Skeletal muscle.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b>	Apresentação dos componentes do Sistema Renina Angiotensina .....	18
<b>Figura 2.</b>	Principais vias de sinalização intracelular reguladas pela ativação do receptor AT1 .....	19
<b>Figura 3.</b>	Principais vias de sinalização celular reguladas pela ativação do receptor AT2 .....	20
<b>Figura 4.</b>	Evolução da pressão arterial média em ratos Wistar (WKY) normotensos e espontaneamente hipertensos (SHR) .....	22
<b>Figura 5.</b>	Múltiplos locais de produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) nas células musculares esqueléticas .....	26
<b>Figura 6.</b>	Representação ilustrativa dos Mecanismos Epigenéticos de Controle da Expressão Gênica .....	33
<b>Figura 7.</b>	Fluxograma do Protocolo Experimental .....	39
<b>Figura 8.</b>	Análise do peso corporal dos animais durante o tratamento com veículo, enalapril e losartan .....	43
<b>Figura 9.</b>	Análise da quantidade (em gramas) da gordura retroperitoneal (A) e perigonadal (B) dos animais submetidos ao tratamento com veículo, enalapril e losartan .....	43
<b>Figura 10.</b>	Pressão arterial média (PAM) (A) e área sob a curva da PAM (B) dos animais .....	44
<b>Figura 11.</b>	Frequência cardíaca média dos animais .....	44
<b>Figura 12.</b>	Análise indireta do desempenho físico através da distância percorrida (m) pelos animais SHR em teste de esforço máximo ao longo de 28 dias .....	45
<b>Figura 13.</b>	Análise indireta do desempenho físico através da distância percorrida pelos animais SHR em teste de esforço máximo – Efeito Tardio ao Tratamento .....	46
<b>Figura 14.</b>	Determinação dos níveis de FRAP e ABTS no músculo gastrocnêmio, sôleo e no plasma .....	47

<b>Figura 15.</b>	Quantificação da produção do ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) no músculo gastrocnêmio, sóleo e no plasma .....	48
<b>Figura 16.</b>	Determinação da peroxidação lipídica através do ensaio do ensaio TBARS (quantificação do MDA) no músculo gastrocnêmio, sóleo e no plasma .....	49
<b>Figura 17.</b>	Efeitos do tratamento com enalapril ou losartan na metilação global do DNA em células do músculo gastrocnêmio de ratos espontaneamente hipertensos.....	50
<b>Figura 18.</b>	Efeitos do tratamento com enalapril ou losartan na metilação global do DNA em células do músculo sóleo de ratos espontaneamente hipertensos .....	50

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Distância percorrida pelos animais nos diferentes grupos .....	46
------------------	----------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPK	Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato
Ang 1-7	Angiotensina 1-7
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
Ang III	Angiotensina III
Ang IV	Angiotensina IV
ARA	Antagonista do receptor da angiotensina
AT1	Receptor da angiotensina II tipo 1
AT2	Receptor da angiotensina II tipo 2
AVP	Arginina Vasopressina
BK	Bradicinina
C1Q	Complemento C1Q
D	Deleção
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNMT	DNA metiltransferases
ECA	Enzima Conversora da Angiotensina
EO	Estresse Oxidativo
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ET	Endotelinas
FRAP	Proteína associada a rapamicina
GPX	Glutathione Peroxidase
HA	Hipertensão Arterial
Hdac1	Regulador epigenético histona desacetilase 1
I	Inserção
IECA	Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina
IGF-1	Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzida
Mct3	Transportador de monocarboxilato 3
mTOR	proteína alvo da rapamicina em mamíferos

N terminal	Amino terminal
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NF-kB	Fator nuclear Kappa B
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superóxido
ON	Óxido Nítrico
PA	Pressão Arterial
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAM	Pressão Arterial Média
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PCR	Proteína C reativa
PGE2	Prostaglandina 2
PGI2	Prostaciclina
PPAR- β/δ	Receptores nucleares beta/delta ativados por proliferadores de peroxissoma beta/delta
PPAR- γ	Receptores nucleares gama ativados por proliferadores de peroxissoma gama
RAFT1	Proteína alvo da rapamicina
SHR	Ratos Espontaneamente Hipertensos
SNC	Sistema Nervoso Central
SNS	Sistema Nervoso Simpático
SRA	Sistema Renina Angiotensina
SRAA	Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
tPA	Ativador do plasminogênio tecidual
VO <sub>2</sub> max	Volume de oxigênio máximo
WNT	Wingless
β-catenina	Beta catenina

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1	PRESSÃO ARTERIAL .....	15
1.2	MECANISMOS REGULATÓRIOS DA PRESSÃO ARTERIAL .....	15
1.3	HIPERTENSÃO ARTERIAL .....	20
1.4	SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA E SUA RELAÇÃO COM A HIPERTENSÃO ARTERIAL.....	21
1.5	MODELOS ANIMAIS PARA ESTUDO DA HIPERTENSÃO.....	21
1.6	ANGIOTENSINA II E SUA RELAÇÃO COM O MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	23
1.7	DESEMPENHO FÍSICO E TESTE DE ESFORÇO PROGRESSIVO EM ESTEIRA .....	24
1.8	ANGIOTENSINA II E ESTRESSE OXIDATIVO .....	25
1.9	BLOQUEIO DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA E O MÚSCULO ESQUELÉTICO .....	27
1.10	INFLUÊNCIAS GENÉTICAS NO DESEMPENHO FÍSICO.....	31
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	36
2.1	OBJETIVO GERAL .....	36
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
<b>3.</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	37
3.1	PROCEDIMENTOS ÉTICOS.....	37
3.2	ANIMAIS .....	37
3.3	GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	37
3.4	PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	37
3.4.1	Modalidade de Exercício.....	37
3.4.2	Adaptação a Esteira .....	38
3.4.3	Caracterização do Teste De Esforço Máximo .....	38
3.5	ANÁLISE DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES.....	39
3.6	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO CORPORAL.....	40
3.7	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS OXIDANTES E ANTIOXIDANTES .....	40
3.7.1	Avaliação da Capacidade Antioxidante Total .....	40
3.7.2	Avaliação da Produção De Ânions Superóxido .....	41
3.7.3	Avaliação da Peroxidação Lipídica .....	41
3.8	EXTRAÇÃO DE DNA E ANÁLISE DO PADRÃO DE METILAÇÃO GLOBAL DO DNA.....	41
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	42

<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	43
4.1	ANÁLISE DO PESO CORPORAL.....	43
4.2	ANÁLISE DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES .....	44
4.3	DISTÂNCIA PERCORRIDA – EFEITO DO TRATAMENTO.....	45
4.4	DISTÂNCIA PERCORRIDA – EFEITO TARDIO.....	46
4.5	ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO.....	47
4.5.1	Avaliação do Status De Defesa Antioxidante (FRAP E ABTS) .....	47
4.5.2	Avaliação da Produção De Ânion Superóxido (NBT).....	48
4.5.3	Avaliação da Peroxidação Lipídica (MDA).....	49
4.6	ANÁLISE EPIGENÉTICA: EFEITO DOS TRATAMENTOS NA METILAÇÃO GLOBAL DO DNA.....	50
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	51
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	61
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	622
	<b>ANEXOS</b> .....	79
	ANEXO A – Ofício de aprovação do projeto de tese pelo CEUA .....	80
	ANEXO B – Certificado de saúde dos animais .....	81
	ANEXO C – Guia de trânsito dos animais .....	82
	ANEXO D – Certificado de Análise de Qualidade – Enalapril.....	83
	ANEXO E – Certificado de Análise de Qualidade – Losartan.....	84

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 PRESSÃO ARTERIAL

A pressão arterial (PA) pode ser definida como a pressão exercida pelo sangue nas paredes internas das artérias, sendo dependente de fatores físicos, como o volume sanguíneo e a capacitância da circulação (GUHA, 2016), resultante da combinação instantânea entre débito cardíaco (DC), resistência vascular periférica (RVP) e capacitância venosa (MONGEAU, 1987). Também considerada como a forma motriz da circulação, a PA é a responsável direta pela manutenção da perfusão tecidual em níveis adequados e razoavelmente constantes para suprir as necessidades individuais e momentâneas de cada tecido, em diferentes situações comportamentais e nas mais diversas situações fisiológicas (MICHELINI; CAMPAGNOLE-SANTOS, 2013). Para tanto, utiliza-se de mecanismos de controle bastante eficazes e complexos (ACKERMANN, 2004; IRIGOYEN *et al.*, 2005; MICHELINI; CAMPAGNOLE-SANTOS, 2013).

### 1.2 MECANISMOS REGULATÓRIOS DA PRESSÃO ARTERIAL

Diversos mecanismos estão envolvidos na regulação da PA. Dentre estes, citam-se os mecanismos locais de regulação (miogênicos, metabólicos, parácrinos/autócrinos, fatores endoteliais, temperatura) e as respostas neuro-hormonais comandadas pelos mecanorreceptores arteriais, pelos quimiorreceptores arteriais, pelos receptores cardiopulmonares e por outros receptores, que desencadeiam uma resposta rápida de regulação – também denominada regulação a curto e médio prazo da PA, e mecanismos de ação mais prolongada e duradoura – conhecida como regulação no longo prazo da PA, que envolvem o balanço entre ingestão/excreção de água e sais e a neoformação/rarefação de vasos (MICHELINI; CAMPAGNOLE-SANTOS, 2013).

O controle neural é exercido por meio de eferências do sistema nervoso autônomo para o coração e os vasos. No coração, modulam o DC por meio do enchimento dos ventrículos e da atividade inotrópica e cronotrópica; nos vasos, atuam sobre a resistência periférica (ACKERMANN, 2004). Os principais mecanismos reflexos que atuam na regulação da PA são o barorreflexo, os reflexos cardiopulmonares, o quimiorreflexo e o reflexo renorrenal (CAMPAGNOLE-SANTOS; HAIBARA, 2001; MICHELINI; CAMPAGNOLE-SANTOS, 2013). O sistema nervoso central (SNC) tem fundamental importância no controle da pressão arterial, sendo que centros bulbares, tais como o núcleo do trato solitário (NTS), núcleo ambíguo, núcleo dorsal do vago e os núcleos rostroventrolateral (RVLM) e caudoventrolateral (CVLM) são responsáveis pela manutenção do tônus

pressórico geral e pelo controle instantâneo da PA e FC (CHALMERS; PILOWSKY, 1991; GOLDSTEIN, 1991).

Já o mecanismo hormonal relacionado ao controle da PA envolve, principalmente, o sistema renina-angiotensina (SRA) (SIMÕES E SILVA; FLYNN, 2012), sendo os rins os principais órgãos envolvidos no controle da PA à longo prazo, regulando o volume do fluido extracelular, atuando no controle da excreção de sódio e água (REGULSKI *et al.*, 2015). Classicamente, o SRA é reconhecido por seu papel fundamental no controle da PA, do balanço eletrolítico, bem como na função cardiovascular, renal e adrenal (LORENZ, 2010; PAUL *et al.*, 2006; SIMON *et al.*, 2015). Considerado um sistema com funções parácrina e autócrina, responsável pela produção de diversos peptídeos biologicamente ativos, o SRA também exerce importante papel em diversas situações patológicas, tais como no diabetes e na HA (MENG *et al.*, 2014). Hoje se sabe que tal sistema apresenta tanto disposição e atividade circulante (sistêmica) como é encontrado em tecidos e células, trazendo a ideia de SRA locais (NGUYEN DINH CAT; TOUYZ, 2011).

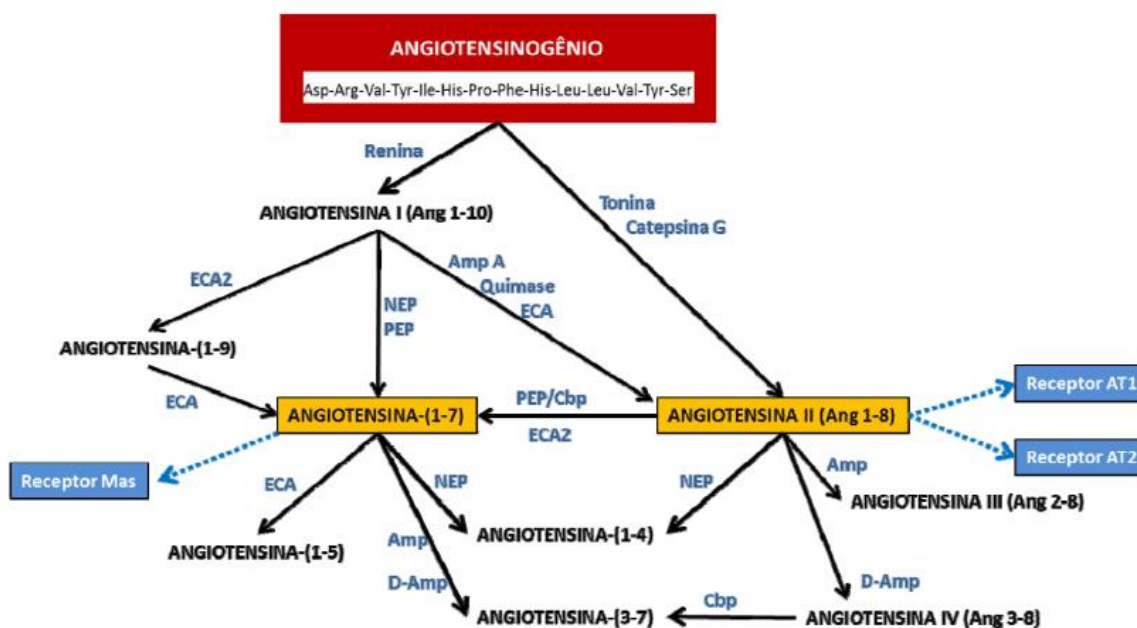
Variadas interações enzimáticas ocorrem durante a cascata de ativação do SRA, cada qual com sua particularidade, resultando na produção de inúmeros peptídeos biologicamente ativos, sendo que a angiotensina II (Ang II) é considerada um dos principais mediadores do SRA. Sua formação ocorre a partir da ação sequencial de duas enzimas: renina e enzima conversora de angiotensina (ECA), atuando sobre o precursor angiotensinogênio (FYHRQUIST; SAIJONMAA, 2008). O angiotensinogênio é uma alfa-globulina composta por 452 aminoácidos, abundantemente encontrada no plasma. Sua síntese ocorre basicamente no fígado, sendo estimulada por variados hormônios, incluindo glicocorticóides, hormônio tireoidiano e pela própria Ang II (BEN-ARI; GARRISON, 1988). O angiotensinogênio circulante é convertido no decapeptídeo Angiotensina I (Ang I) pela ação da renina (SIRAGY, 2009). A renina, primeira enzima do SRA clássico, é uma aspartil protease produzida nas células justaglomerulares da arteríola aferente renal, sintetizada e armazenada sob a forma inativa chamada pró-renina. A pró-renina é processada no retículo endoplasmático e armazenada em grânulos secretores pelo aparelho de Golgi, onde uma parte parece ser convertida em renina ativa. Tanto a pró-renina quanto a renina são principalmente liberadas após a estimulação das células justaglomerulares renais (GRIENDLING; MURPHY; ALEXANDER, 1993; SIMÕES E SILVA; FLYNN, 2012). Uma vez que a renina circulante interage com o angiotensinogênio proveniente do fígado, ocorre a clivagem deste, resultando na formação da Ang I, um peptídeo de 10 aminoácidos desprovido de propriedades vasoconstritoras capazes de produzir em alterações funcionais significativas na função circulatória. A Ang I serve como substrato para vias enzimáticas formadoras de Ang II, que se utilizam da ECA para esta reação (PAUL *et al.*, 2006). A ECA humana, uma metaloprotease de ligação de membrana, contém 1.278 resíduos de aminoácidos e possui 2 domínios homólogos: um local catalítico e uma região de ligação do zinco (BERNSTEINS *et*

*al.*, 1989). É encontrada em abundância no endotélio dos vasos pulmonares (RYAN *et al.*, 1976), no plasma e em diversos tecidos orgânicos como: cérebro, placenta, intestino e nos túbulos renais (SCHULZ *et al.*, 1988). Esta enzima é inespecífica, clivando unidades de dipeptídeo de substratos com diferentes sequências de aminoácidos, mas seu principal papel na cascata de sinalizações do SRA é a hidrólise da Ang I no componente chave do SRA, a Ang II (COATES, 2003). Entretanto, além do seu efeito sobre a gênese de Ang II, a ECA também atua na degradação da bradicinina (BK). A BK pertence ao grupo das cininas, que são polipeptídeos sintetizados no plasma e/ou líquido intersticial, a partir de proteínas de elevado peso molecular, envolvidos em diversos eventos biológicos, incluindo aumento da permeabilidade vascular, relaxamento da musculatura lisa e vasodilatação (RAMALHO; PROMETHEU, 2000). Assim, pode influenciar na regulação da PA por reduzir a RVP e regular a excreção de sódio nos rins (SHARMA, 2009).

A Ang II é um octapeptídeo vasoativo, sintetizado a partir da ECA, sendo encontrada em diversos tecidos como cérebro, hipófise, vasos sanguíneos, coração, rins e glândulas adrenais, pois há evidências de que tais tecidos contêm todos os componentes SRA, sendo assim capazes de produzir Ang II local, entretanto, a contribuição desses sistemas locais para os níveis circulantes de angiotensinas ou reninas ainda é controverso (BREGAGNOLLO; OKOSHI, 2005). Uma vez que a Ang II é rapidamente eliminada da corrente sanguínea, alguns efeitos locais não podem ser explicados pela conversão a nível plasmático da Ang I em Ang II, entretanto, tais efeitos podem estar relacionados à existência do SRA local, encontrado em vários tecidos (CABELLO-VERRUGIO *et al.*, 2015). Apesar da principal via de produção da Ang II depender da atividade da ECA, estudos prévios confirmaram a existência de vias alternativas capazes de produzir Ang II, independente da ECA, sendo identificadas várias serinaproteínases, como quimase, calicreína e catepsina G (Vogt 2015; Uehara *et al.* 2013). A quimase, em particular, tem sido relatada como uma importante enzima envolvida na produção de Ang II no coração humano (Urata *et al.* 1994). A quimase é armazenada em um complexo com heparina proteoglicana nos grânulos secretados pelos mastócitos, devendo ser liberada para se tornar metabolicamente ativa, como ocorre em casos de dano vascular. Portanto, a quimase é enzimaticamente inativa no tecido vascular normal e pode produzir Ang II apenas em paredes arteriais danificadas ou ateroscleróticas (Fyhrquist & Saijonmaa 2008).

A Ang II é considerada o principal mediador do SRA que modula a RVP através da ligação aos receptores endoteliais causando vasoconstrição e aumento da PA, regulando o equilíbrio hidroeletrólítico por efeito indireto sobre a aldosterona que, por sua vez, estimula a retenção de sal e água, mecanismos que contribuem para o aumento da PA (SIMÕES E SILVA; FLYNN, 2012). Apesar dos principais efeitos da Ang II estarem relacionados aos processos hemodinâmicos, esta pode ativar vias de sinalização intracelular, indutoras da produção de mediadores pró-inflamatórios (TADDEI *et al.*, 2002). Além disso, atualmente foram reconhecidas diferentes vias de produção de Ang II, que

ocorrem no endotélio, na musculatura lisa e nos tecidos cerebrais, adrenais, renais e ovarianos assim como no plasma, sendo tais processos independentes da ação da ECA (SKRBIC; IGIC, 2009). A Ang II também é substrato gerador de outros peptídeos bioativos como: angiotensina III (Ang III), Angiotensina IV (Ang IV) e Angiotensina (1-7) (Ang (1-7)). A Ang (1-7) possui funções frequentemente opostas às funções atribuídas à Ang II, e sua origem pode se dar além da formação a partir da Ang II ou diretamente da Ang I, a partir de outras vias enzimáticas têm sido descritas, e que envolve um novo homólogo da ECA, a ECA-2 (Figura 1) (NGUYEN DINH CAT; TOUYZ, 2011).

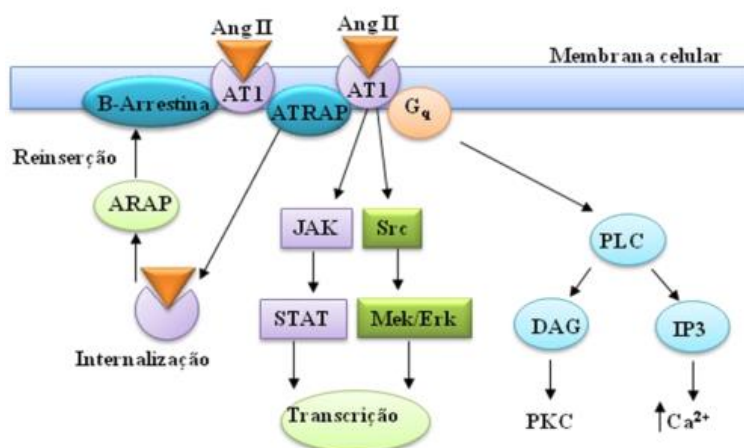


**Figura 1 - Apresentação dos componentes do Sistema Renina Angiotensina.** O angiotensinogênio é clivado na angiotensina I pela enzima renina. A angiotensina I é convertida em angiotensina II pela enzima conversora da angiotensina (ECA) ou pela enzima quimase. A angiotensina II também pode ser formada diretamente do Angiotensinogênio pela clivagem de Tonina e catepsina G. A angiotensina II pode ser metabolizada por algumas outras peptidases, como aminopeptidases (Amp e d-Amp), prolilendopeptidases (PEP), carboxipeptidases (Cbp). A angiotensina (1-7) pode ser originada pela clivagem da Angiotensina I via endopeptidases neutras (NEP), PEP ou pela enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2). Os outros peptídeos do sistema, como Angiotensina III, Angiotensina IV, Angiotensina-(1-9), Angiotensina-(1-4), Angiotensina-(3-7) e Angiotensina-(1-5) são normalmente originados via ECA, Amp, D-Amp, Cbp e NEP.

**Fonte:** (OLIVEIRA; ORIENTADORA; CO-ORIENTADOR, 2015).

Considerada também o principal agente efetor na homeostasia e função cardiovascular, a Ang II atua em vários tecidos através dos receptores do tipo 1 (AT1) e do tipo 2 (AT2), ambos pertencentes à família de receptores acoplados à proteína G (MIURA; SAKU, 2014). Os receptores AT1 estão presentes em maior volume nos vasos sanguíneos, córtex-adrenal, rins, fígado e cérebro enquanto que os receptores AT2 são encontrados principalmente em tecido mesenquimal, medula adrenal, útero e folículos ovarianos e, em menor quantidade, no cérebro (THOMAS; MENDELSON, 2003). Sob condições fisiológicas, o AT1 está relacionado a manutenção do volume do fluido

extracelular e da pressão arterial, estes considerados efeitos clássicos e bem elucidados da Ang II (ALLEN; ZHUO; MENDELSON, 1999). Entretanto, existindo um considerável aumento na concentração de Ang II, bem como uma maior expressão do receptor AT1 nos tecidos, pode resultar em vasoconstrição, liberação de aldosterona pelas glândulas adrenais, retenção de sódio pelos segmentos do néfron, estimulação do sistema nervoso simpático (via receptores cerebrais), liberação de endotelina 1 e aumento de estresse oxidativo via espécies reativas de oxigênio (BADER; GANTEN, 2008). A interação da Ang II com o receptor AT1 (Figura 2) ativa vias de sinalização intracelular moduladas pela proteína Gq12/13 e a fosfolipase C (PLC), aumentando as concentrações de cálcio no citosol e consequentemente, ativação da proteína kinase C (PKC) e calmodulina (DE GASPARO *et al.*, 2000). O AT1 pode também ativar vias independentes de proteína G, como a da proteína associada ao receptor AT1 (ATRAP1) e a da  $\beta$ -arrestina (ambas envolvidas na internalização do AT1); da Janus cinase (JAK) e Src, que ativam respectivamente, as proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição (STAT), além das cinases reguladas por sinal extracelular (Erk) (LEFKOWITZ; SHENOY, 2005).

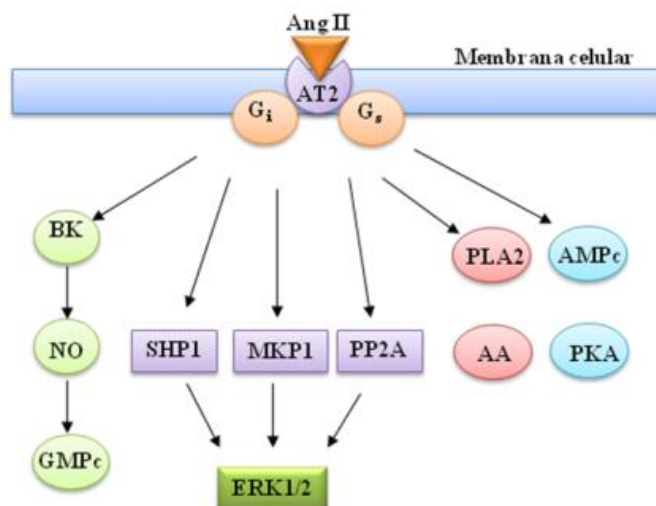


**Figura 2 - As principais vias de sinalização intracelular reguladas pela ativação do receptor AT1.** A Ang II via receptor AT1 regula vias dependentes e independentes de proteína G. A ativação do AT1 pode resultar no aumento do cálcio citosólico e/ou ativação da proteína cinase C (PKC). O AT1 também pode interagir com a  $\beta$ -arrestina ou com a proteína associada a receptores AT1 (ATRAP), proteínas associadas à internalização do receptor e ativação de outras vias de sinalização. O AT1 também se associa as proteínas reguladoras dos processos de transcrição (JAK e Src) para estimular as vias STAT e Merk/Erk.

**Fonte:** (CASARE, 2015).

Já o receptor AT2 é primariamente expresso durante o desenvolvimento embrionário, reduzindo após o nascimento, mas perdura em outros órgãos como o coração, rins e rede vascular, mediando importantes efeitos fisiológicos da Ang II (CAREY; SIRAGY, 2003). Parece também estar relacionado a mecanismos de remodelamento tecidual, uma vez que sua expressão pode aumentar em casos de injúria cardíaca ou vascular e na cicatrização do tecido renal (NGUYEN DINH CAT; TOUYZ, 2011) ou ainda induzir a vasodilatação, opondo-se as funções dos receptores AT1 (LEITE *et al.*, 2013). As vias de sinalização celular decorrentes da ativação de AT2 (Figura 3) parecem depender

de mecanismos associados ou não à proteína G sendo descritas a interação do receptor AT2 com a proteína  $G_{i2}$  e  $G_{i3}$ , bem como as vias de sinalização dependentes da geração de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) e óxido nítrico, ativação da peptidil-peptidase 2 A (PPA2) e estimulação da fosfolipase A2 (JOHREN; DENDORFER; DOMINIAK, 2004) .



**Figura 3 - As principais vias de sinalização celular reguladas pela ativação do receptor AT2.** A ativação de AT2 resulta no aumento de bradicinina (BK) e ativação das vias de síntese de óxido nítrico (NO), o que resulta na síntese de monofosfato de guanina cíclico (GMPc) e consequentemente em vasodilatação e natriurese. Ocorre, ainda, a ativação de fosfatases, como a Scr-2 (SHP-1), peptidil-peptidase 2 A (PPA2), proteína cinase ativa por mitogen-1 (MPK-1) que inibem a atividade da regulada por sinal extracelular (Erk1/2). O AT2 também estimula a via de ativação da fosfolipase A2 (PLA2) para a síntese de ácido aracônico (AA), bem como a adenilil ciclase (AC) para a síntese de AMPc e consequentemente a ativação da proteína cinase dependente de AMPc (PKA).  
**Fonte:** (CASARE, 2015).

O desequilíbrio desses mecanismos regulatórios da PA juntamente com fatores ambientais e genéticos pode desencadear um inadequado controle da PA, ocasionando um aumento sustentado da PA, denominado hipertensão arterial sistêmica (HAS) (OPARIL; SCHMIEDER, 2015).

### 1.3 HIPERTENSÃO ARTERIAL

O termo HA refere-se a uma síndrome envolvendo diversos fatores, apresentando alta prevalência em todos os países, sendo caracterizada por níveis elevados e sustentados da pressão arterial, associada às alterações funcionais e/ou estruturais de órgãos-alvo como coração, cérebro, rins e vasos sanguíneos, além das alterações metabólicas combinadas aos eventos cardiovasculares e cerebrais, consideradas as principais causas de óbitos (MALACHIAS *et al.*, 2016). Em quadros de HA, está bem documentado que as alterações nos mecanismos regulatórios da PA em destaque são: o aumento da atividade do sistema nervoso simpático (SNS) e a ativação de sistemas e fatores humorais, representado pelo sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), arginina

vasopressina (AVP), fatores endoteliais como as endotelinas (ET), óxido nítrico (ON) e espécies reativas de oxigênio (ERO) (GOMEZ-SANCHEZ *et al.*, 2010; RAUTUREAU; SCHIFFRIN, 2012).

#### 1.4 SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA E SUA RELAÇÃO COM A HIPERTENSÃO ARTERIAL

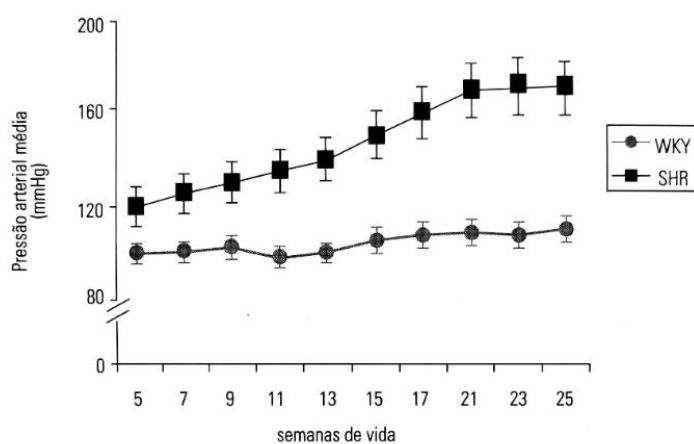
O SRA está criticamente envolvido na regulação fisiológica da homeostase da PA, volume sanguíneo, na patogênese de variadas doenças cardiovasculares, inclusive da HA (NGUYEN DINH CAT; TOUYZ, 2011; SIMON *et al.*, 2015), sendo sua ativação com subsequente geração de Ang II (MEHTA; GRIENGLING, 2007). Tanto em modelos experimentais quanto e em pacientes hipertensos, a ativação do SRA consiste em uma das principais características fisiopatológicas da HA, relacionando-se com adaptações periféricas, como a vasoconstrição sistêmica e o aumento da hiperatividade simpática (PEART, 1991). Estudos utilizando o modelo de HA por coarctação subdiafragmática da aorta demonstraram que a elevação da PA foi acompanhada de ativação da Ang II plasmática e tecidual, com intensa depressão do controle reflexo da FC (MICHELINI; DE OLIVEIRA; DOS SANTOS, 1992). Tal depressão foi acompanhada por déficit do controle reflexo do simpático periférico, causado por prejuízo da sinalização aferente pelos barorreceptores, aumento da variabilidade, redução do ganho do nervo depressor aórtico (DOS SANTOS, C. M. *et al.*, 1998) e prejuízo da integração central ao nível do NTS, causando diminuição da sensibilidade barorreflexa (MICHELINI; BONAGAMBA, 1990). Em conjunto, estes efeitos determinavam intensa hipertonia simpática à periferia e predomínio simpático sobre a atividade vagal do coração. Além disso, estudo demonstrou que todos estes efeitos observados em portadores de HA eram mediados pela maior disponibilidade de Ang II plasmática e tecidual (e não pela elevação da PA em si) porque foram completamente revertidos quando a HA por coarctação se desenvolveu em presença de bloqueio crônico dos receptores AT1 com o losartan (BEZERRA *et al.*, 2001).

#### 1.5 MODELOS ANIMAIS PARA ESTUDO DA HIPERTENSÃO

Considerando a multifatoriedade da origem da HA, diversos modelos experimentais de HA têm sido propostos, cada qual desenvolvendo um ou mais mecanismos, contribuindo para melhor representatividade da HA no homem. Dois principais aspectos são levados em consideração para a criação dos modelos experimentais: o primeiro relaciona-se com o aumento da PA propriamente dito e o segundo ao aumento da PA em decorrência da alteração de algum outro fator. Neste contexto, os principais modelos experimentais de HA, basicamente, compreendem as diferentes etiologias conhecidas para a HA humana (DA SILVA; RODRIGUES; LACCHINI, 2013). O SRA é crucial na regulação da PA, sendo que sua ativação está relacionada ao desenvolvimento e

sustentação da HA (SIMON *et al.*, 2015) e tal relação está presente tanto em humanos quanto em animais, uma vez que ratos espontaneamente hipertensos (SHR) são modelos estabelecidos como semelhantes a hipertensão humana e a PA em SHR é dependente do SRA (RECKELHOFF; ZHANG; SRIVASTAVA, 2000).

Os SHR são amplamente utilizados em pesquisa experimental de HA não dependente de intervenção farmacológica, fisiológica ou cirúrgica. Foi desenvolvido por Okamoto e Aoki, no final da década de 50, a partir da seleção dos ratos Wistar Kyoto que apresentavam pressão arterial superior a 150mmHg. Quase 20 anos depois estes ratos deram origem à linhagem de ratos SHR que desenvolve hipertensão espontaneamente, com idade entre 7-15 semanas de vida (figura 4) (SARIKONDA *et al.*, 2009).



**Figura 4. Evolução da pressão arterial média em ratos Wistar (WKY) normotensos e espontaneamente hipertensos (SHR).**

**Fonte:** Silva et al. Modelos de hipertensão experimental. In: Krieger, E. M., et al. Hipertensão Arterial: Bases fisiopatológicas e prática clínica. 1ª Ed. São Paulo: Atheneu, 2013. p. 21.

Desde então, o SHR é reconhecido como um excelente modelo de HA experimental e pode servir como modelo de estudos clínicos da HA essencial humana, uma vez que a semelhança entre a HA humana e a observada no SHR, inclui: a) a predisposição genética para HA sem etiologia específica, b) o aumento da resistência periférica total sem expansão de volume, c) aumento do DC e da hipertrofia ventricular esquerda e, d) igual resposta a tratamentos com drogas (TRIPPODO; FROHLICH, 1981). Além disso, a hiperatividade do SRA vascular nos animais SHR é evidente, (NGUYEN DINH CAT; TOUYZ, 2011), tornando-o assim, o modelo de escolha que mais se aproxima da HA essencial humana.

## 1.6 ANGIOTENSINA II E SUA RELAÇÃO COM O MÚSCULO ESQUELÉTICO

O SRA sistêmico também é encontrado em tecidos específicos (ABADIR; WALSTON; CAREY, 2012), como coração, SNC, sistema gastrointestinal (BADER; GANTEN, 2008), bem como no músculo esquelético. Evidências recentes têm focado a atenção no papel fisiológico do SRA no músculo esquelético, um órgão alvo amplamente ignorado em relação aos efeitos da Ang II (SPIRA *et al.*, 2016). Ao mesmo tempo, variados estudos demonstraram um papel prejudicial da Ang II no músculo esquelético, independente ou combinado com a ativação sistêmica do SRA (BACURAU *et al.*, 2016; JOHNSTON *et al.*, 2011).

Estudos têm demonstrado que a Ang II é um peptídeo chave na regulação da função músculo esquelética através da modulação da atividade contrátil e da estrutura do tecido muscular, uma vez que o aumento da concentração de Ang II induziu a prejuízo da função mitocondrial, diminuição da porcentagem de fibras do tipo I, atrofia e apoptose do músculo esquelético, (CISTERNAS *et al.*, 2015; KADOGUCHI *et al.*, 2015). No mesmo sentido, a administração de Ang II (50 ng/kg/min) prejudicou a função mitocondrial do músculo esquelético, resultando em capacidade de exercício diminuída (INOUE *et al.*, 2012), enquanto que doses de 500 ng/kg/min induziram a atrofia do músculo esquelético via apoptose e degradação proteica pela via ubiquina – proteosoma (SONG *et al.*, 2005). Um dos principais mecanismos envolvidos neste desfecho é o aumento na desagregação proteica, juntamente com um componente inibitório sobre a síntese de proteínas essenciais (RUSSELL; SANDERS; TISDALE, 2006). Neste contexto, o SRA está envolvido na modulação de processos inflamatórios, estresse oxidativo e apoptose no músculo esquelético (CABELLO-VERRUGIO; RIVERA; GARCIA, 2017) e estes, por sua vez, implicam na deterioração do desempenho físico com o envelhecimento (CARTER, C S *et al.*, 2005).

O tecido muscular esquelético tem papel crítico para a regulação e manutenção da função física. Por exemplo, o SRA muscular pode participar da formação muscular, uma vez que a inibição de Ang II tem sido associada à diminuição da formação de capilares e mioblastos (BELLAMY *et al.*, 2010). Outra evidência aponta que o SRA muscular influencia diferencialmente o músculo esquelético baseado no tipo de fibra (Johnston *et al.*, 2010). Também foi observado que a atenuação de Ang II inibiu a resposta de células satélites à sobrecarga do sóleo, mas não no músculo plantar, de ratos Sprague Dawley, sugerindo uma especificidade para as fibras musculares de contração lenta versus contração rápida (WESTERKAMP *et al.*, 2005). Estudos experimentais apresentam efeitos suplementares induzidos pela Ang II e infra regulação dos receptores, relacionados ao trofismo tissular e à capacidade regenerativa. De fato, em modelos animais, o aumento dos níveis de Ang II provou induzir a perda de fibras esqueléticas através da degradação da proteína, da apoptose e da síntese proteica diminuída (SHEN *et al.*, 2017; YOSHIDA *et al.*, 2013). Juntas, estas evidências

concordam em identificar SRA e a infra regulação dos receptores como eixo regulador importante na fisiologia do músculo esquelético (BAND *et al.*, 2018). Ainda assim, apesar destes achados, a extensão total do impacto fisiológico do SRA local na função muscular permanece indeterminada. Do mesmo modo, existe pouca evidência para determinar os efeitos relacionados com o passar do tempo ao SRA localizado especificamente no tecido músculo esquelético. Investigações futuras são justificadas para determinar como a idade avançada influencia a atividade do músculo esquelético e outros SRA locais. Estudos também são necessários para determinar como esses sistemas locais interagem com o SRA sistêmico e podem contribuir para mudanças na função física em idade avançada (SIMON *et al.*, 2015; SPIRA *et al.*, 2016).

Neste contexto, estudos de que as vias de sinalização clássicas do SRA estão envolvidas na resistência à insulina, atrofia muscular e fibrose muscular, abriram novas possibilidades para o efeito de fármacos como os inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) e os antagonistas dos receptores da Angiotensina II (ARA) no sistema músculo esquelético (DODDS; SAYER, 2014) e seu uso benéfico nessas patologias (CABELLO-VERUGIO *et al.*, 2015). Dados recentes do nosso grupo vai de encontro com tais hipóteses, uma vez que estudo observacional demonstrou que idosos fisicamente independentes, usuários de IECA ou de ARA apresentavam maior força muscular relacionada a força de prensão palmar e melhor capacidade funcional (COELHO *et al.*, 2016), melhor força muscular respiratória e função pulmonar avaliada por espirometria (Santos *et al.*, dados não publicados), quando comparado com não usuários dessas drogas. Entretanto, por se tratar de pesquisa clínica observacional envolvendo humanos, não fomos capazes de identificar os possíveis mecanismos relacionados a esse achado.

## 1.7 DESEMPENHO FÍSICO E TESTE DE ESFORÇO PROGRESSIVO EM ESTEIRA

Atividade física é definida como qualquer movimento corporal produzido pelos músculos esqueléticos que requer gasto de energia (WHO, 2010), envolvendo todas as formas de atividade, incluindo caminhada, exercícios e até esportes competitivos. Já função física é definida como a capacidade de realizar atividades que requerem ações físicas, desde o autocuidado (atividades da vida diária) até atividades mais complexas que exigem uma combinação de habilidades, muitas vezes com um componente social ou dentro de um contexto social (VAN LUMMEL *et al.*, 2015). É um conceito multidimensional, com quatro subdomínios relacionados: mobilidade (função dos membros inferiores), destreza (função dos membros superiores), capacidade axial (função pescoço e costas) e capacidade de realizar atividades instrumentais da vida diária, geralmente medida objetivamente com testes de desempenho físico (SALARIAN *et al.*, 2010). O

desempenho físico é o resultado de muitos fatores que afetam o a força e a massa muscular ao longo da vida (DHALIWAL *et al.*, 2018). Além disso, medidas de desempenho físico são preditores independentes de uso, mudança no estado de saúde e declínio da função em um determinado ambiente clínico (STUDENSKI, STEPHANIE *et al.*, 2003).

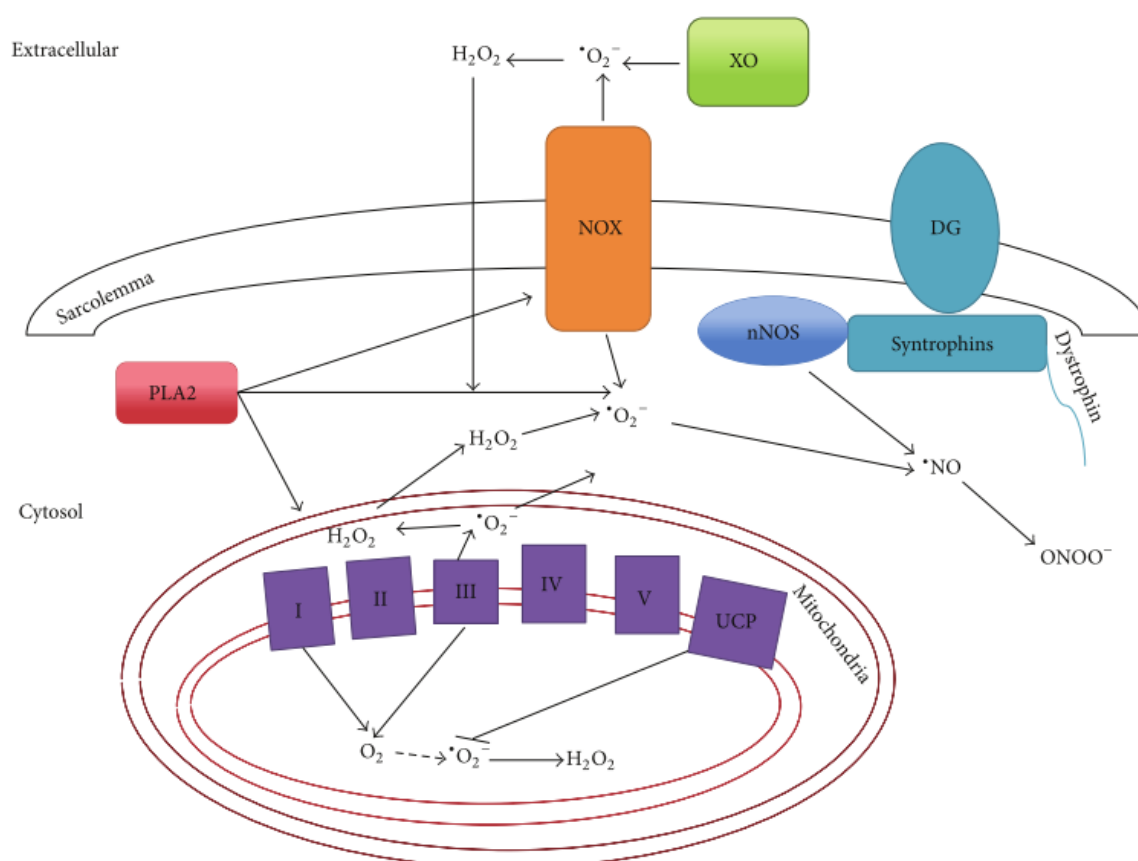
Nos últimos anos, variados testes de desempenho físico foram desenvolvidos para avaliar a função física, utilizando para tal medidas de resultados típicos, como o tempo para executar uma tarefa supervisionada e padronizada, a intensidade, a frequência e a duração da atividade física. Além disso, estudos têm utilizados a mensuração da mobilidade como teste de desempenho físico (VAN LUMMEL *et al.*, 2015). Neste contexto, a atividade física e o desempenho físico são frequentemente usados como variáveis de resultados de estudos clínicos, sobre os efeitos de intervenções curativas e/ou preventivas destinadas a melhorar a função física (STUDENSKI, STEPHANIE *et al.*, 2003).

Esteiras rolantes tem sido amplamente utilizadas ao longo das últimas décadas para estudar parâmetros fisiológicos, metabólicos, bioquímicos e suas respostas tanto ao exercício agudo quanto ao exercício crônico em variadas espécies, incluindo ratos (JONES, J. H., 2007). A corrida em esteira apresenta vantagens em relação a outras modalidades de exercício, uma vez que a quantidade de trabalho externo feita pelo rato pode ser facilmente calculada, ao mesmo tempo que é possível controlar a intensidade e duração do exercício, permitindo condições experimentais bem definidas (MANCHADO-GOBATTO *et al.*, 2010). O teste progressivo em esteira é caracterizado por aumento da intensidade do exercício determinada por uma combinação de velocidade e tempo, amplamente utilizado em estudos experimentais e modificados de acordo com a necessidade da pesquisa (AMARAL *et al.*, 2001; MELO; MARTINHO; MICHELINI, 2003; NEGRAO *et al.*, 1987).

## 1.8 ANGIOTENSINA II E ESTRESSE OXIDATIVO

Considera-se estresse oxidativo (EO) uma condição biológica na qual ocorre um desequilíbrio na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), onde o excesso dessa produção não pode ser neutralizado por defesas celulares antioxidantes (MACHADO *et al.*, 2009). As EROs são produzidas como intermediárias no processo redox (redução-oxidação) e têm um importante papel fisiológico como moléculas de sinalização intracelular que regulam respostas biológicas como a expressão de genes, ciclo e sobrevivência celular, crescimento e diferenciação celular, regulação da produção e degradação da matriz extracelular, inativação do ON e estimulação de diversas quinases pró-inflamatórias como as interleucinas 1 (IL-1) e 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (APEL; HIRT, 2004). Outra importante fonte geradora de radicais livres são as enzimas Fosfato de

dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) oxidases, que são proteínas de membrana que tem a função de transferir elétrons através das membranas celulares (BARBOSA *et al.*, 2010). Sua produção também está elevada nas lesões teciduais causadas por traumas, infecções, parasitas, radiações, hipóxia, toxinas e exercícios extremos, devido a um conjunto de processos como o aumento de enzimas envolvidas na formação de radicais livres, a ativação da fagocitose, liberação de ferro e cobre ou uma interrupção da cadeia transportadora de elétrons (ROCK; JACOB; BOWEN, 1996). Os principais EROs incluem o oxigênio singleto, superóxidos, peróxidos, radicais hidroxílicos e ácido hipocloroso e podem ser produzidos por quase todos tipos de células, incluindo células musculares esqueléticas (SEMPRUN-PRIETO *et al.*, 2011). Variados estudos têm demonstrado que as EROs são geradas em múltiplos locais internamente no músculo esquelético, como no compartimento extracelular, no citosol e nos compartimentos mitocondriais, (figura 5) ao mesmo tempo que têm sido associadas tanto a fisiologia quanto a patologias do músculo esquelético (CHOI *et al.*, 2016).



**Figura 5. Múltiplos locais de produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) nas células musculares esqueléticas.**

A ilustração mostra a rede de diferentes proteínas que conduz à produção de ERO/ERN nos compartimentos extracelular, citosol e mitocondrial da célula do músculo esquelético. XO: xantina oxidase; NOX: NADPH oxidase; DG: glicoproteína de distrofina; nNOS: óxido nítrico sintase neuronal; PLA2: fosfolipase A2; I-V: complexos de transporte de elétrons/fosforilação oxidativa; UCP: proteína de desacoplamento;  $O_2$ : oxigênio;  $O_2^{\bullet -}$ : superóxido;  $H_2O_2$ : peróxido de hidrogênio; NO: óxido nítrico; ONOO<sup>-</sup>: peroxinitrito.

**Fonte:** (CHOI *et al.*, 2016).

Fisiologicamente, as EROs desempenham múltiplas funções no músculo esquelético, podendo ser benéficas relacionadas a adaptação ao exercício, incluindo biogênese mitocondrial e hipertrofia muscular (GOMEZ-CABRERA *et al.*, 2008); ou prejudiciais, contribuindo para o desenvolvimento da sarcopenia e até mesmo a caquexia do câncer (SEMPRUN-PRIETO *et al.*, 2011). A magnitude, duração e origem celular das EROs são fatores determinantes para perturbações metabólicas no músculo esquelético (MASON; WADLEY, 2014). Estudos demonstraram que a Ang II leva a aumento na produção de superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), a principal ERO, via ativação da NADPH oxidase no músculo esquelético de ratos (INOUE *et al.*, 2012). Além disso, Ang II induz a efeitos catabólicos no músculo esquelético, envolvendo a NADPH oxidase (Semprun-Prieto *et al.* 2011). Os autores ainda sugerem que a formação de superóxido está intimamente relacionada as vias de sinalização que levam a atrofia do músculo esquelético em diferentes condições e que o desenvolvimento de novas drogas visando reverter tal situação deve levar em consideração esse aspecto. Ainda, em cultura de células musculares lisas, a Ang II aumentou a expressão gênica de variadas subunidades da NADPH oxidase (TOUYZ *et al.*, 2002). Mais recentemente, foi observado que a ativação dos receptores AT1 no próprio miócito pela Ang II antagoniza a absorção de glicose dependente de insulina (HENRIKSEN; PRASANNARONG, 2013), resultante da dessensibilização da insulina nos tecidos metabólicos (OLIVARES-REYES; ARELLANO-PLANCARTE; CASTILLO-HERNANDEZ, 2009), através do estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (MACCONI *et al.*, 2015).

Considerando que a capacidade de exercício está reduzida em condições de aumento do ânion superóxido, sugere-se que a redução da capacidade de exercício envolve a produção de  $O_2^{\cdot-}$  em variados tipos de células, incluindo o endotélio vascular, células musculares lisas e células miocárdicas ao mesmo tempo que inibindo a ação da Ang II no músculo esquelético pode ser efetivo para melhorar a capacidade de exercício nesse estado (KINUGAWA *et al.*, 2005).

## 1.9 BLOQUEIO DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA E O MÚSCULO ESQUELÉTICO

Pesquisas experimentais e clínicas têm demonstrado interessantes considerações sobre o papel do SRA no músculo esquelético, sugerindo um benefício potencial de IECA e ARA em condições que culminem na diminuição da força e massa muscular com o envelhecimento, também conhecida como sarcopenia, bem como em condições patológicas que reduzam os mesmos parâmetros (BAND *et al.*, 2018; CABELLO-VERRUGIO *et al.*, 2015; DODDS; SAYER, 2014; KIZILIRMAK, 2016; SARTIANI *et al.*, 2015). Além disso, tais fármacos são considerados agentes farmacológicos relevantes clinicamente em relação a sua capacidade de bloquear o SRA.

Os inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA), foram desenvolvidos na década de 60 (FERGUSON *et al.*, 1977). Essa classe compõe um extenso grupo de fármacos anti-hipertensivos, apresentando como principais representantes o captopril, ramipril, enalapril, fosinopril, lisinopril e quinapril (HERAN *et al.*, 2008), mundialmente utilizados no tratamento de doenças cardiovasculares e renais, produzindo benefícios terapêuticos consideráveis, reduzindo a mortalidade e taxas de hospitalização (GARG; YUSUF, 1995). Podem ser classificados em três grupos: (1) grupo formado pelo radical sulfidril, composto basicamente pelo captopril; (2) grupo formado pelo radical carboxil, composto pela maioria das substâncias: como o enalapril, lisinopril, benazepril, quinapril, ramipril, entre outros; (3) grupo formado pelo radical fosforil, composto pelo fosinopril (NASUTION, 2006). Seus benefícios primários estão relacionados aos seguintes efeitos: diminuição da formação e dos níveis plasmáticos e nos tecidos de Ang II e aldosterona, diminuição na degradação da BK, estimulação do ativador do plasminogênio tecidual (tPA), PGE2 e PGI2, liberação de ON, vasodilatação, excreção de sal, diminuição da síntese do inibidor do ativador do plasminogênio (efeito dependente de Ang II) e aumento da secreção do ativador do plasminogênio tecidual (efeito dependente da BK) (REGULSKI *et al.*, 2015). Considerando que além do efeito sobre a gênese de Ang II, a ECA também atua na degradação da BK, o tratamento com IECA leva a redução na formação da Ang II e aumento nos níveis circulantes de BK, com posterior liberação de prostaglandinas, prostaciclina e ON, causando natriurese e redução da PA, oferecendo assim, efeito adicional cardioprotetor (BURNIER, M; WAEBER; BRUNNER, 1994). Neste contexto, os efeitos cardiovasculares benéficos produzidos pelos IECA não se devem apenas à redução na síntese de Ang II, mas também à potenciação dos efeitos biológicos da BK, devido sua menor degradação endógena (RAMALHO; PROMETHEU, 2000).

Os efeitos benéficos no músculo esquelético com o uso de IECA têm sido observados tanto em análises transversais quanto em estudos longitudinais, mas os resultados têm sido conflitantes (ANTON *et al.*, 2015), com estudos demonstrando que a terapia com IECA podem melhorar (HUTCHEON *et al.*, 2002a) ou não (CESARI *et al.*, 2010; ZI; CARMICHAEL; LYE, 2003) o desempenho físico. Em ratos idosos, foram observadas melhorias na força muscular e no desempenho físico após o tratamento com enalapril, acompanhados por redução da sinalização inflamatória e apoptótica do músculo esquelético (CARTER, CHRISTY S. *et al.*, 2011). A capacidade física também aumentou significativamente em animais SHR tratados com perindopril, quando comparados com o grupo controle (MINAMI *et al.*, 2007). Melhorias na performance de ratos também foram observadas após o tratamento com IECA, entretanto, apenas quando em combinação com exercício e não na intervenção farmacológica sozinha (HABOUZIT *et al.*, 2009). Ainda existem casos onde foi observado que a baixa atividade da ECA não está associada a quaisquer grandes

diferenças no desempenho físico e nas propriedades metabólicas intrínsecas de músculo rápido ou lento (BAHI *et al.*, 2004). Em humanos, estudos demonstraram que os IECA melhoram a capacidade funcional em pacientes com insuficiência cardíaca (SUMUKADAS *et al.*, 2014) e a capacidade de exercício em pacientes idosos com a mobilidade reduzida, equivalentemente a um programa de treinamento de 6 meses (SUMUKADAS *et al.*, 2007). A massa muscular e a força foram preservadas nos usuários de IECA em grandes coortes longitudinais, incluindo o Estudo de Saúde da Mulher e Envelhecimento (ONDER *et al.*, 2002). Estudo recente realizado pelo nosso grupo de pesquisa demonstrou que idosos fisicamente independentes, usuários de IECA ou de ARA apresentavam maior força muscular relacionada a força de preensão palmar e melhor capacidade funcional (COELHO *et al.*, 2016), melhor força muscular respiratória e função pulmonar (Santos *et al.*, dados não publicados), quando comparado com não usuários dessas drogas.

Por outro lado, estudo duplo cego, randomizado e controlado por placebo que investigou o efeito dos IECA sobre a função do quadríceps e a capacidade de exercício, não encontrou qualquer melhora nos índices avaliados após 3 meses de tratamento em pacientes portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica (SHRIKRISHNA *et al.*, 2014). Outro estudo prospectivo avaliando o uso de IECA no desempenho físico e força muscular de mulheres não encontrou associação entre o uso da droga com menor declínio dessas variáveis através da administração dessas medicações (GRAY *et al.*, 2012). Assim, os IECA demonstram ser uma classe de drogas com potencial benéfico na função do músculo esquelético e estão relacionadas a melhorarias na função endotelial e angiogênese, na função mitocondrial, nos níveis de absorção de glicose no músculo esquelético, além de aumento nos níveis do fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF-1) e depressão nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, reduzindo a inflamação (BAND *et al.*, 2018). Apesar desses resultados, alguns estudos e ensaios clínicos ainda apresentam dados conflitantes quando ao impacto dos IECA no declínio funcional (CESARI *et al.*, 2010; HUTCHEON *et al.*, 2002b; SUMUKADAS *et al.*, 2007; ZI; CARMICHAEL; LYE, 2003). Neste contexto, torna-se necessário mais estudos para esclarecer se o uso de IECA melhora o desempenho físico, tanto em humano quando em roedores.

Em meados da década de 70, a saralasin foi a primeira substância utilizada como ARA, entretanto, por ser um peptídeo, apresentava a desvantagem de ser administrada apenas por via intravenosa (CASE *et al.*, 1976). Ao longo dos anos, variados fármacos utilizando-se do mesmo princípio foram desenvolvidos, entre eles losartan, o valsartan, o irbesartan, o candesartan e o eprosartam (WEBER *et al.*, 1995). O losartan potássico foi o primeiro bloqueador não peptídico da Ang II, agindo diretamente no receptor AT1, demonstrando efeitos clínicos anti-hipertensivos eficientes por 24 horas pós administração (WEBER *et al.*, 1995). Seu mecanismo de ação está

relacionado com o bloqueio específico da Ang II ao nível do receptor AT1, independente da via pela qual a Ang II foi formada (BURNIER, MICHEL, 2001). Como o IECA, os ARA mostraram efeitos benéficos para condições diferentes da hipertensão que são pertinentes aos adultos mais velhos, incluindo insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral, proteção da retina e diabetes (CERNES; MASHAVI; ZIMLICHMAN, 2011; REGULSKI *et al.*, 2015). Com relação a possíveis efeitos no músculo esquelético através da terapia com ARA, foi observado melhora de 20% na capacidade de exercício de ratos Sprague-Dawley tratados com losartan e submetidos a infarto do miocárdio (KEMI *et al.*, 2013). De forma similar, Takada e colaboradores descreveram tal efeito em ratos com diabetes tipo 2 induzida, melhorando a função mitocondrial e redução o estresse oxidativo no músculo esquelético (3mg/kg/dia – 8 semanas), independentes da PA, do peso corporal ou do metabolismo da glicose (TAKADA *et al.*, 2013). Outro estudo demonstrou que a administração de telmisartan (5 mg/kg – 24 semanas) em ratos deficientes de receptores nucleares gama ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR-  $\gamma$ ) foi suficiente para melhorar a função muscular desses animais, uma vez que apresentaram maior resistência, quando submetidos à corrida (FENG, X. *et al.*, 2011). Em pacientes hipertensos, o tratamento com o ARA candesartan por 3 semanas (32 mg/dia) também melhorou a capacidade de exercício por aumentar o volume de oxigênio máximo ( $VO_2$  máximo), acompanhado de redução na PA (DE ROSA; CHIARIELLO, 2009). Estudo semelhante demonstrou que duas semanas de tratamento com losartan melhorara a tolerância ao exercício e reduzem a pressão sistólica máxima, sem afetar a FC em pacientes com resposta hipertensiva ao exercício (WARNER *et al.*, 1999). Além disso, o tratamento crônico com losartan em portadores de insuficiência cardíaca levou a uma melhoria na capacidade física e uma mudança nas características das fibras musculares esqueléticas, tornando-as mais resistentes à fadiga (VESCOVO *et al.*, 1998). No entanto, outros estudos realçam efeitos negativos específicos dos tecidos dos ARA sobre o desempenho do exercício. Em indivíduos portadores de hipertrofia ventricular esquerda (GERDTS *et al.*, 2006) ou disfunção do ventrículo direito (DORE *et al.*, 2005), a capacidade de exercício não foi melhorada no tratamento com ARA. Outros estudiosos também não conseguiram observar melhora na atividade de enzimas associadas ao metabolismo oxidativo no músculo esquelético de indivíduos com sobrepeso após 8 semanas de tratamento com olmesartan, um BRA (BOUTAGY *et al.*, 2015).

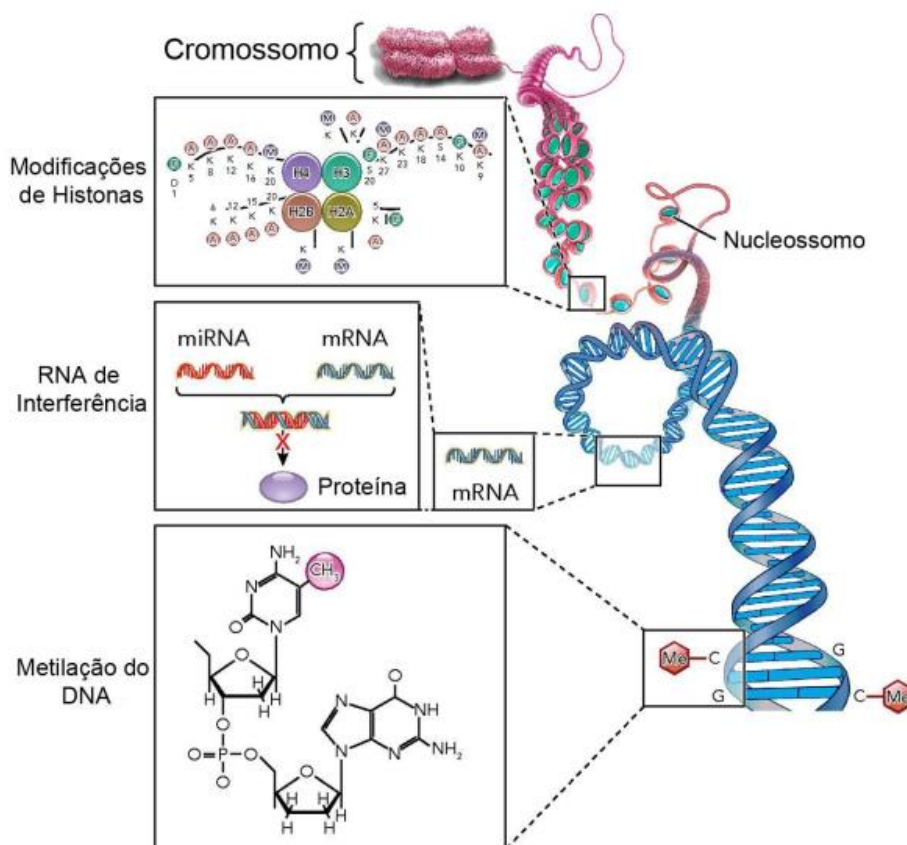
Apesar de não completamente compreendido, estudos apontam que a melhora da função física associada ao tratamento com ARA está relacionada a diminuição na produção de radicais livres e de IL-6 (OGAWA *et al.*, 2006; TAKAGI *et al.*, 2013), melhora na cicatrização muscular retardando o desenvolvimento de atrofia por desuso em ratos envelhecidos (BURKS *et al.*, 2011) e pode aumentar o nível de enzimas antioxidantes como a catalase e a glutathiona peroxidase (GPX) (LIN *et al.*, 2014). Além disso, o uso de ARA diminui a sinalização do fator de crescimento TGF-  $\beta$ , este quando em alta atividade pode estar relacionado a uma variedade de distúrbios musculares e do

tecido conjuntivo (COHN *et al.*, 2007). Além disso, o uso de losartan em ratos idosos imobilizados aumentou a atividade da via da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR; FRAP; RAFT1), que estimula o crescimento muscular. Em animais, a administração prolongada de ARA melhora a capacidade de exercício aeróbio através de um mecanismo dependente da via receptores nucleares beta/delta ativados por proliferadores de peroxissoma / proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (PPAR-  $\beta/\delta$  / AMPK) (FENG, X. *et al.*, 2011) e, mais recentemente, Yabumoto e colaboradores observaram que o bloqueio do receptor AT1 prolonga a vida útil do músculo esquelético, melhorando a reparação e regeneração muscular através da modulação do microambiente inflamatório, incluindo a polarização de macrófagos m2 e a regulação negativa da via de sinalização complemento C1q (C1q) / Wingless (Wnt) / Beta catenina ( $\beta$ -catenina) que promove o envelhecimento (YABUMOTO *et al.*, 2015). Dessa forma, há fortes indícios que o uso de losartan pode melhorar ou manter o desempenho muscular ao prevenir a atrofia por inatividade ou desuso (OSHEROVICH; WRITER, 2011). Apesar dos estudos relacionados à terapia com IECA ou ARA na modulação do SRA acarretando em melhorias no sistema músculo esquelético, ainda observamos inconsistências nos achados, resultados controversos e mecanismo não completamente elucidado. Além disso, as publicações têm examinado o efeito de IECA ou ARA sobre a função física sem contabilizar a influência da genética e não houve até o momento um estudo sistemático para avaliar todas as variáveis em um único experimento (SIMON *et al.*, 2015).

#### 1.10 INFLUÊNCIAS GENÉTICAS NO DESEMPENHO FÍSICO

Há cerca de 2 décadas houve a primeira descrição de impacto relacionando um elemento genético e o desempenho físico humano: o polimorfismo do gene ECA (MONTGOMERY *et al.*, 1998). Exatamente uma década depois, o gene da ECA foi proposto como “gene humano para o desempenho físico”, tornando-o foco de variados estudos que examinaram os efeitos do genótipo ECA no desempenho físico, na capacidade aeróbica, na função muscular, na capacidade de treinamento e no status atlético (WANG; FEDORUK; RUPERT, 2008). O polimorfismo é baseado na presença/inserção (I) ou ausência/deleção (D) de uma sequência de repetição de 287 pares de bases dentro de uma região do íntron 16 do gene da ECA (BRUGTS; SIMOONS, 2012). Em pouco tempo, o gene da ECA se tornou o gene mais investigado do desempenho físico humano, onde diferentes grupos de pesquisadores relataram a associação entre variantes no gene da ECA e a redução dos níveis circulantes da enzima e, conseqüentemente, aumento no desempenho e na resistência em atletas de elite (JONES, A.; MONTGOMERY; WOODS, 2002; LUCIA *et al.*, 2005; WANG; FEDORUK; RUPERT, 2008).

Os fenótipos humanos resultam da interação da variação genética com os estímulos ambientais, sendo o polimorfismo da ECA apenas uma dessas variações (PUTHUCHEARY *et al.*, 2011). No polimorfismo identificado como I, está relacionado com melhorias no esporte de resistência, maior utilização de oxigênio durante atividades físicas e melhor resposta anabólica ao treinamento (WILLIAMS *et al.*, 2000), enquanto que o polimorfismo identificado como D está relacionado com potência, ganho de força e massa muscular em resposta ao treinamento (PUTHUCHEARY *et al.*, 2011). Outros ensaios demonstraram que o alelo I do gene da ECA está associado ao aumento na porcentagem de fibras musculares do tipo I (contração lenta), tratando-se de fibras aeróbicas e resistentes à fadiga, que são mais eficientes quando as contrações realizadas de forma isométrica ou em velocidade relativamente baixas (ZHANG, B. *et al.*, 2003). Por outro lado, o alelo D do gene da ECA está associado a expressão das fibras musculares do tipo IIa e IIb (contração rápida), que são menos resistentes à fadiga e mais eficientes na geração de potência do que as fibras musculares do tipo I (ONDERA; VEDOVA; PAHORC, 2006). Estes e outros achados na literatura indicam uma importante interação do SRA e o desempenho físico (BUFORD *et al.*, 2012; GIACCAGLIA *et al.*, 2008; KRITCHEVSKY *et al.*, 2005). Além do polimorfismo do gene da ECA, estudos sugerem a influência de mecanismos epigenéticos no desenvolvimento do músculo esquelético, os quais parecem regular os estados quiescentes e de proliferação de células satélites musculares, bem como progênese (BIGOT *et al.*, 2015), a miogênese pré e pós-natal e a diferenciação muscular (BARREIRO; TAJBAKHS, 2017). Pesquisadores têm considerado como "epigenética" as mudanças mitoticamente hereditárias que controlam a expressão gênica sem alterar a sequência original de DNA (GOMES; PELOSI, 2013). Em nível molecular, os mecanismos epigenéticos são geralmente divididos em dois tipos: (1) modificações covalentes nas caudas do N-terminal das proteínas das histonas e (2) metilação do carbono 5 da citosina, geralmente seguido por guanina (nucleotídeos CpG), nas moléculas de DNA (Figura 6) (GOMES; PELOSI, 2013; HAGOOD, 2014; PORTELA; ESTELLER, 2010).



**Figura 6. Representação ilustrativa dos Mecanismos Epigenéticos de Controle da Expressão Gênica.**  
**Fonte:** Hagood et al., 2014.

A modificação genética mais intensamente estudada é a metilação do DNA. Dinâmica, com potencial de mudança durante o desenvolvimento, a metilação do DNA exerce um papel fundamental no estabelecimento e controle de processos biológicos importantes, como a diferenciação celular no desenvolvimento embrionário, a inativação do cromossomo X nas fêmeas, a impressão genômica, a supressão de retrovírus endógenos e a estabilidade cromossômica (GOMES; PELOSI, 2013; THOMPSON *et al.*, 2010). No processo de metilação do DNA, a introdução do radical metil é catalisada e mantida por enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs), as quais obtêm e transferem o radical metil a partir do composto Sadenosyl-L-metionina, que é o doador de metil, para o carbono 5 da citosina. 22 Variadas formas da enzima DNA metiltransferases são encontradas (DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L), cada qual com sua particularidade no processo de metilação (TUORTO *et al.*, 2012). A função primária da metilação do DNA é ativamente silenciar genes e regiões de DNA em que a transcrição não é desejada. Os elevados níveis de metilação do DNA são encontrados em telômeros, centrômeros e cromossomos X inativos. Dessa forma, a hipermetilação gene-específica pode levar ao silenciamento de muitos genes responsáveis pelo controle do ciclo celular/apoptose, enquanto que a hipometilação genômica desencadeia uma

instabilidade cromossômica, afetando assim os locais de ligação para proteínas específicas de radicais metil, permitindo a ocorrência de mutações mais facilmente e a superexpressão de proto-oncogenes (BURZYNSKI, 2005). Dessa forma, pesquisadores têm voltado sua atenção aos padrões epigenéticos e sua vulnerabilidade frente a exposições ambientais, o que pode culminar em inúmeras implicações à saúde (GOMES; PELOSI, 2013). Curiosamente, o controle epigenético da expressão gênica emergiu recentemente como um mecanismo relevante envolvido na regulação de muitos processos biológicos diferentes, incluindo o da massa muscular, função e fenótipo na saúde e doença (BARREIRO; TAJBAKHS, 2017; PUIG-VILANOVA *et al.*, 2015).

No tocante ao músculo esquelético, o tipo de fibra muscular também pode estar relacionado com o controle epigenético. A primeira sugestão de controle epigenético do tipo de fibra muscular foi dada pela descoberta em 1983 de que as células isoladas de um músculo lento de galinha eram funcionalmente diferentes das células isoladas de um músculo rápido de galinha (MATSUDA; SPECTOR; STROHMAN, 1983). Embora a descoberta de que apenas um músculo lento produz células que expressam isoformas lentas pode não ser surpreendente, isso só ocorre como resultado da epigenética. Portanto, esses dados sugerem fortemente que as células precursoras dos músculos adultos e, possivelmente, os núcleos musculares, são impressas com etiquetas epigenéticas que os predizem como rápidos ou lentos (BAAR, 2010). O processo de atrofia muscular em resposta ao desuso também é acompanhada por modificações epigenéticas dinâmicas associadas a alterações na expressão gênica e que essas modificações epigenéticas e os perfis de expressão gênica são reversíveis após a evolução da atividade (FISHER *et al.*, 2017). Tais informações sugerem que a atrofia e recuperação do músculo esquelético após o desuso é associada a modificações epigenéticas dinâmicas e transitórias que correspondem à alteração da expressão gênica. Há mudanças no padrão de metilação no músculo esquelético durante o envelhecimento. Estudo realizado em todo o genoma que compara os padrões de metilação do DNA no músculo esquelético pós-mitótico retirado de jovens saudáveis (18-27 anos) e idade (68-89 anos) mostrou um padrão predominante de hipermetilação no DNA do envelhecimento do músculo esquelético (ZYKOVICH *et al.*, 2014). A maioria das mudanças de metilação ocorreu intragenicamente, sendo sub-representada nas regiões promotoras. Na verdade, um dos principais contribuintes na sarcopenia é a perda ou a desnervação da unidade motora (KADHIRESAN; HASSETT; FAULKNER, 1996) e esses resultados apontam que o processo pode ser afetado pela metilação do DNA. Considerando tais achados, há reconhecimento da metilação do DNA como contribuinte significativo para a fisiologia muscular normal e suas alterações nos processos patológicos, bem como no envelhecimento (CARRIÓ; SUELVE, 2015). Além disso, estudos mais recentes sugerem que existem dúvidas em relação até que ponto a genética moderaria as associações entre as medicações anti-hipertensivas (IECA ou ARA) e a capacidade de resposta ao exercício (SIMON *et al.*, 2015).

A despeito das evidências dos possíveis efeitos da terapia com IECA ou ARA sobre a programação epigenética do músculo esquelético, muito pouco se sabe a respeito da vulnerabilidade dos mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA nas células do músculo estriado esquelético. Um único estudo foi encontrado na literatura, que investigou alterações na metilação do DNA no córtex renal, após tratamento de curto prazo com perindopril, um IECA. Para tanto, os pesquisadores trataram animais SHR (n=6) com perindopril por 48 horas, não especificando a dose empregada. Os autores observaram que a metilação global do DNA foi reduzida nos cortices renais de animais tratados com IECA ( $P < 0,05$ ), ao mesmo tempo que o tratamento agudo com perindopril não alterou significativamente a expressão renal de Hdac1, Dnmt1 e Mct3 ( $P > 0,05$ ) (DE VRIES *et al.*, 2016).

Diante do exposto e da escassez de informações a despeito do tema, objetivamos no presente estudo avaliar se o tratamento com fármacos que interferem com o SRA poderia favorecer o desempenho físico de ratos SHR. Acreditamos que os conhecimentos adicionais gerados nesse trabalho possam contribuir para o entendimento do mecanismo molecular associado aos efeitos somáticos da terapia com drogas que interfiram no SRA, direcionando pesquisas futuras relacionadas ao desenvolvimento de fármacos que poderão ser incluídos no tratamento de doenças relacionadas a músculos ou mesmo em relação a diminuição da eficiência muscular relacionada ao envelhecimento.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do tratamento farmacológico com o inibidor da enzima conversora de angiotensina (IECA) enalapril ou com o antagonista do receptor da Ang II (ARA) losartan em parâmetros físicos, cardiovasculares, moleculares e epigenéticos em ratos espontaneamente hipertensos, submetidos ao teste de esforço progressivo em esteira.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o desempenho físico (velocidade, tempo e distância percorrida) dos animais submetidos a administração de veículo (CTL), enalapril (ENA) e losartan (LOS), através de teste progressivo em esteira;
- Avaliar a pressão arterial e frequência cardíaca média dos animais através da análise não invasiva (registro de pressão por volume – CODA®);
- Identificar possíveis alterações nos parâmetros oxidantes e antioxidantes do músculo gastrocnêmio, sóleo e no plasma através dos seguintes testes: capacidade antioxidante total (FRAP e ABTS), produção de ânions superóxido (NBT) e peroxidação lipídica (MDA);
- Identificar possíveis alterações no padrão de metilação global do DNA a partir da dosagem de 5-metil-citosina no músculo gastrocnêmio, sóleo e plasma dos animais.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS

Os protocolos utilizados neste estudo foram realizados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética de Uso Animal da UEL (CEUA 30987.2014.73).

#### 3.2 ANIMAIS

Foram utilizados ratos adultos SHR, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Aos 60 dias de idade, os animais foram transferidos para o biotério setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina onde permaneceram sob temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , ciclo 12h claro / 12h escuro e com ração e água ad libitum. Ao término da transferência, os mesmos permaneceram por 7 dias consecutivos no mesmo biotério sem qualquer intervenção, visando minimizar quaisquer efeitos adversos oriundos da viagem e adaptação ao novo ambiente.

#### 3.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos em 3 grupos principais: Grupo Controle (CTL), no qual receberam somente água de torneira; Grupo de animais submetidos ao tratamento com o IECA enalapril (10mg/Kg/dia; ENA; (DALPIAZ *et al.*, 2013); Attivos Magistrais, Anápolis, GO); Grupo de animais submetidos ao tratamento com o ARA losartan (10mg/Kg/dia; LOS; (ABDULLA *et al.*, 2009); Fragon, São Paulo, SP). Os tratamentos ocorreram via gavagem durante 28 dias consecutivos, tendo seu início 24 horas após o primeiro teste de esforço máximo.

#### 3.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

##### 3.4.1 Modalidade de Exercício

Os animais foram submetidos a um teste de esforço máximo, utilizando para tal uma esteira adaptada para roedores (Inbramed, Millenium, adaptada para ratos), uma vez que este modelo possibilita a quantificação do trabalho externo realizado pelo rato, bem como o controle da intensidade e duração do exercício. A elaboração do protocolo utilizado seguiu os parâmetros

descritos no Resource Book for the Design of Animal Exercise Protocols (JONES, J. H., 2007). Anteriormente a análise do desempenho físico, os animais passaram por um período de adaptação à esteira.

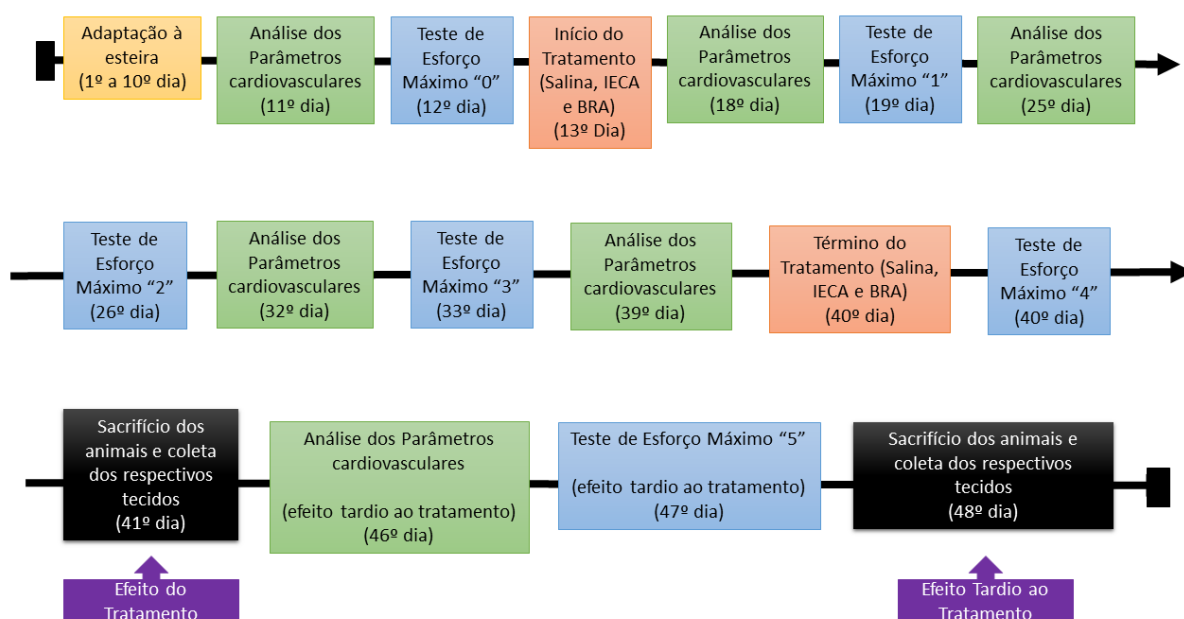
### 3.4.2 Adaptação a Esteira

Previamente ao teste máximo de esforço per si, os animais foram familiarizados com o exercício na esteira (Inbramed, Millenium, adaptada para ratos), no intuito de serem selecionados pela sua capacidade de andar sobre a plataforma. Esta adaptação ocorreu por 10 dias consecutivos, uma vez ao dia (8:00-14:00 horas). Para tanto, os animais foram submetidos a corrida na esteira por 10 minutos, a uma velocidade de 0.3 Km/h, sem inclinação da plataforma. Este período fora utilizado para a observação comportamental dos animais onde realizou-se pré-exclusões dos animais não aptos a andar na esteira. Após esse período adaptativo, os animais foram aleatoriamente designados para grupos os experimentais anteriormente descritos. Não foi realizada qualquer tipo de estimulação (elétrica, manual ou dolorosa) para induzir a corrida nos animais (MELO; MARTINHO; MICHELINI, 2003).

### 3.4.3 Caracterização do Teste de Esforço Progressivo

O desempenho físico dos animais foi avaliado através da aplicação de teste progressivo em esteira, também denominado “teste de esforço máximo”, anteriormente descrito (MELO; MARTINHO; MICHELINI, 2003) e utilizado para avaliação da capacidade aeróbica máxima dos animais. A intensidade do esforço físico foi avaliada indiretamente (distância máxima percorrida) através desse teste, durante exercício escalonado em esteira ergométrica (Inbramed, Millenium, adaptada para ratos). O teste foi iniciado com a velocidade de 0.3 Km/h, com incrementos de 0.3 Km/h a cada 3 minutos, sem inclinação da plataforma. O término do teste se deu quando os animais não foram mais capazes de continuar a corrida devido à exaustão. O tempo (minutos) de corrida foi registrado, bem como velocidade (km/h). A partir dessas informações, utilizamos fórmula específica para identificar a distância percorrida (metros) pelos animais. O teste de esforço máximo (Teste “0” ou “basal”), foi realizado 48 horas após a última sessão de adaptação do animal à esteira, bem como repetido semanalmente, durante 4 semanas consecutivas (teste 1, teste 2, teste 3 e teste 4). Para a realização dos testes de esforço 0, 1, 2, 3 e 4 os animais permaneceram por 1h na sala de experimentação para adaptação às condições ambientais previamente ao experimento. No dia seguinte ao “teste 0” de esforço máximo, os animais iniciaram os tratamentos com água de torneira,

IECA ou ARA, de acordo com o grupo. O tratamento foi realizado sempre no mesmo horário, sendo que o animal também recebia a dose no dia do teste de esforço. 2 horas antes do teste, período para enalapril e losartan atingirem seu pico plasmático, tanto para o enalapril (EDEKI *et al.*, 1994), quanto para losartan (MUNAFO *et al.*, 1992). Após a realização do “teste de esforço máximo 4”, fora realizado o sacrifício dos animais (GRUPO CTL: 11; CIECA: 13; LOS: 15) e coleta dos respectivos tecidos. Parte dos animais submetidos ao experimento (GRUPO CTL: 5; ENA: 5; LOS: 7) permaneceram vivos por mais 7 dias consecutivos sem receber medicação após o teste de esforço 4, no intuito de avaliarmos algum possível efeito tardio ao tratamento. Para tanto, estes animais foram submetidos a novo teste de esforço máximo (teste 5) (Figura 7).



**Figura 7. Fluxograma do Protocolo Experimental.**

### 3.5 ANÁLISE DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES

Os parâmetros cardiovasculares avaliados foram: pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC). A análise dos parâmetros cardiovasculares foi realizada de forma não invasiva, utilizando um método de registro de pressão por volume, onde a pressão foi obtida através de um “cuff” acoplado a cauda do rato e as informações enviadas para um sistema de aquisição de dados denominado CODA (Kent Scientific, Torrington, CT). O Registro de pressão por volume foi clinicamente validado por fornecer uma correlação próxima de 100% com as medidas de telemetria e pressão arterial direta para a PAS e PAD (FENG, M. *et al.*, 2008).

### 3.6 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO CORPORAL

O peso corporal de todos os animais foi avaliado desde o primeiro dia quando chegaram ao Biotério Setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, até o último dia do protocolo experimental. O peso corporal foi avaliado antes dos tratamentos farmacológicos e a cada 3 ou 4 dias no decorrer do experimento. Foi utilizada uma balança digital AUY220 (Shimadzu, Filipinas), onde os valores obtidos foram anotados em uma planilha de dados para análise da curva de crescimento e ganho de peso. Vinte e quatro horas após a última dose de tratamento, os animais foram sacrificados utilizando-se de guilhotina (Insight, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil) para coleta dos seguintes tecidos: gordura retroperitoneal e perigonadal; músculo sóleo, músculo gastrocnêmio e do plasma. O peso absoluto dos tecidos (Shimadzu, Filipinas) foi avaliado em balança digital (descrita anteriormente) imediatamente após a coleta. Os tecidos foram armazenados em freezer -80°C.

### 3.7 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS OXIDANTES E ANTIOXIDANTES

#### 3.7.1 Avaliação da Capacidade Antioxidante Total

As amostras do músculo gastrocnêmio e sóleo foram homogeneizadas em KCl (1,15%). Os homogenatos e o plasma foram centrifugados (200 g, 10 min, 4°C) e o sobrenadante foi utilizado para os ensaios a seguir. A habilidade da amostrar em resistir ao estresse oxidativo foi quantificado pelas capacidades em reduzir o íon férrico utilizando e sequestrar radicais livres utilizando os ensaios de FRAP e ABTS, respectivamente, como previamente descrito (HOHMANN *et al.*, 2013). Brevemente, para o ensaio de FRAP, o sobrenadante foi incubado incubada à 37°C por 30 min com reagente de FRAP, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, Thermoscientific, Vantaa, Finlândia). Para o ensaio do ABTS, as amostras do sobrenadante foram incubadas com uma solução de ABTS em tampão fosfato salina (pH 7,4), apresentando absorvância de 0,80 a 730nm. Após 6 min, a absorvância foi mensurada a 730 nm. Os resultados serão foram quantificados em relação a uma curva padrão de Trolox em ambos os ensaios. Os resultados foram expressos como equivalente de Trolox por miligrama de tecido para ambos.

### 3.7.2 Avaliação da Produção de Ânions Superóxido

A produção de ânion superóxido foi determinada pela redução do corante azul nitro-tetrazólio (NBT) (HOHMANN *et al.*, 2013). Amostras do músculo gastrocnêmio e sóleo foram homogeneizadas em KCl (1,15%). Os homogenatos e o plasma foram incubados com 100 µL de solução de NBT (1mg/mL) (NBT, Sigma) e mantidos em banho maria (37 °C, 5 minutos). O sobrenadante foi removido, e o formazan precipitado foi solubilizado pela adição de 120 µL de KOH (2 M) e 120 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). A densidade ótica foi mensurada em espectrofotômetro de microplaca (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, ThermoScientific, Vantaa, Finlândia) a 600 nm. Os valores de OD à 600 nm foram obtidos pela concentração de proteínas totais nas amostras, e os resultados estão apresentados como Redução do NBT (OD/mg de proteína).

### 3.7.3 Avaliação da Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica do músculo gastrocnêmio, sóleo e do plasma foi quantificada pela determinação dos níveis do malondialdeído (MDA) – um intermediário da peroxidação lipídica – pela diferença obtida entre as absorvâncias a 535 nm e 572 nm por espectrofotômetro de microplaca (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, ThermoScientific, Vantaa, Finlândia), conforme previamente descrito (HOHMANN *et al.*, 2013). Os resultados foram expressos como nmol de MDA por miligrama de proteína.

## 3.8 EXTRAÇÃO DE DNA E ANÁLISE DO PADRÃO DE METILAÇÃO GLOBAL DO DNA

Amostras de células do músculo gastrocnêmio, sóleo e do plasma dos animais foram obtidas 24 horas após o último dia de tratamento com auxílio de bisturi. A extração do DNA genômico foi realizada pelo método de fenol clorofórmio (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). A avaliação da pureza e concentração de DNA foi realizada pela análise de absorvância em um espectrofotômetro (NanoDrop ND-2000 – Thermo Scientific) a 260nm e 280nm.

O perfil de metilação global de DNA foi avaliado pela dosagem de 5-metil-citosina pelo kit *Imprint® Methylated DNA Quantification kit* (Sigma-Aldrich®), de acordo com as recomendações do fabricante como previamente descrito (TOFFOLI *et al.*, 2014). De forma simplificada, a porcentagem de metilação de cada amostra foi calculada pela quantidade de citosinas metiladas na amostra (5mC) em relação a citidina global (5mC + dC)

em um controle positivo previamente metilado (100% metilado) e um controle negativo (0% metilado). As leituras das absorbâncias foram realizadas a 450 nm em leitor de microplaca e a porcentagem da metilação do DNA foi obtida seguindo a fórmula:  $A_{450\text{sample}} - A_{450\text{NTC}} / (A_{450\text{met}} - A_{450\text{NTC}}) \times 100$ . Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

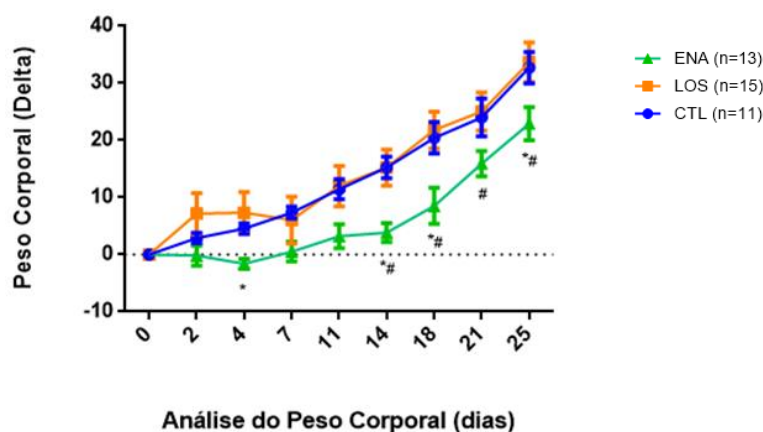
### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os softwares GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, Inc., CA, USA) e SPSS versão 22.0 (IBM SPSS®, Armonk, NY, USA). Uma vez que os dados apresentaram distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk), bem como fora respeitada a homogeneidade das variâncias (teste de Levene), foi utilizado as análises com testes paramétricos e os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão das médias. Utilizou-se da análise de variância a dois critérios (two-way Anova) seguida do post-hoc Bonferroni para avaliar a influência dos diferentes tratamentos (CTL, ENA e LOS) sobre a distância percorrida e o tempo de tratamento. O mesmo teste foi determinado para a análise do peso corporal, da PAM e da FC dos ratos hipertensos ao longo do tratamento, sendo avaliado a variação no peso corporal (Peso Inicial – Peso Final, delta), peso da gordura retroperitoneal e perigonadal (gramas). A análise de variância a um critério (one-way Anova), seguida do post-hoc Bonferroni foi elegida para avaliar os parâmetros oxidantes e antioxidantes das amostras. Por fim, foi realizado Análise de Covariância (Ancova), para a comparação entre os grupos, a fim de reduzir a variância do erro e ajustar as médias da covariável “distância percorrida no teste basal” para todos os sujeitos em um valor fixo. Para análise dos efeitos da administração de IECA enalapril e do ARA losartan na metilação global de DNA em ratos SHR, submetidos ao teste de esforço máximo em esteira, utilizamos o teste estatístico de Kruskal-Wallis, seguido do pós teste de Dunn, sendo tais resultados expressos em mediana e intervalo interquartilício (1º Q – 3º Q). Foi estabelecido um intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5% ( $P < 0,05$ ) para todos os testes aplicados.

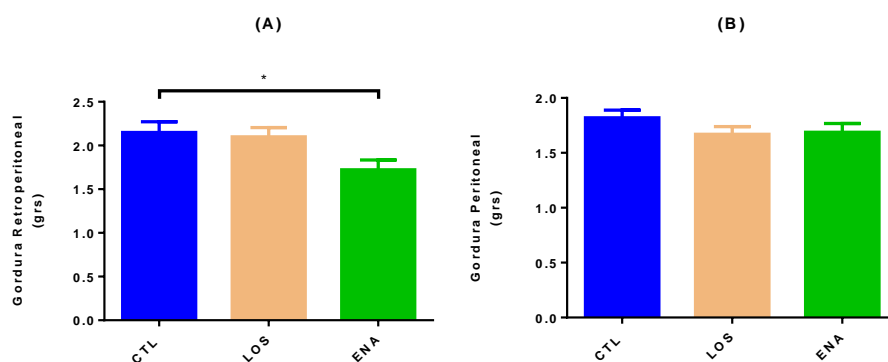
## 4. RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISE DO PESO CORPORAL

Foi observado menor ganho de peso corporal ao longo de 28 dias de tratamento no grupo ENA, comparado com os outros grupos. Tal redução no ganho de peso, foi evidente a partir do 14º dia de tratamento ( $p=0,0072$  - Figura 8). Além disso observou-se um menor acúmulo de gordura retroperitoneal no grupo ENA ( $p=0,0272$  - Figura 9A), não sendo observadas diferenças na gordura perigonadal entre os grupos ( $p=0,3978$  - Figura 9B).



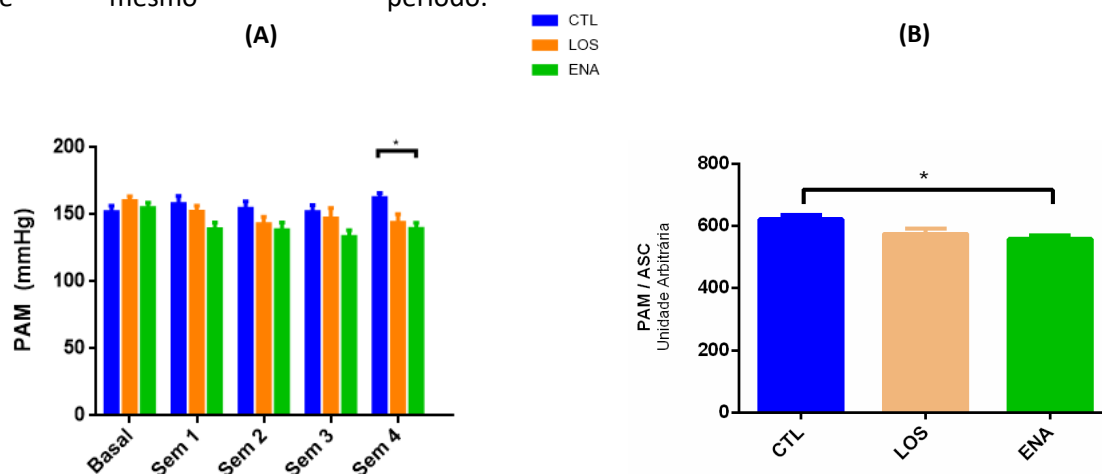
**Figura 8. Análise do peso corporal dos animais durante o tratamento com veículo, enalapril e losartan.** Linhas demonstram a variação do peso corporal ao longo do tratamento nos animais que receberam tratamento e valores foram expressos convertidos em delta. Two-way Anova (Pós-teste: Bonferroni). (Interação:  $p=0,0072$ ,  $F(16, 288)=2.139$ ; Tempo:  $P<0,0001$ ,  $F(8288)=114,6$ ; Tratamento:  $P=0,0222$ ,  $F(2, 36)=4.239$ ; Sujeitos (matching):  $P<0,0001$ ,  $F(36, 288)=17.73$ ; Residual:  $DF=288$ ,  $MS:32.81$ ;  $n=$  grupo CTL:11; LOS:15; ENA:13). \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; #  $p<0,05$ . \* LOS x ENA; # CTL x ENA.



**Figura 9. Análise da quantidade (em gramas) da gordura retroperitoneal (A) e perigonadal (B) dos animais submetidos ao tratamento com veículo, enalapril e losartan.** Two-way Anova (Pós-teste: Bonferroni). (Tratamento:  $p=0,0272$ ,  $F(2, 21)=4,301$ ; Residual:  $DF=21$ ,  $MS=0.1040$ ;  $n=$  grupo CTL:6; LOS:9; ENA:9). \*  $p=0,0272$ . Barras mostram média±EPM.

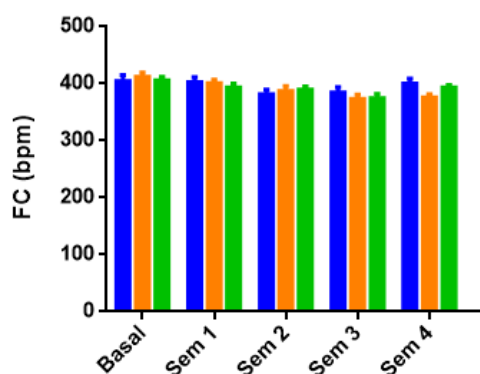
## 4.2 ANÁLISE DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES

Uma diminuição da PAM estatisticamente significativa foi observada após a 4 semana de tratamento no grupo ENA, quando comparado com o grupo CTL (figura 10A,  $p < 0,05$ ). Além disso, a análise da área sob a curva da PAM referente a cada semana de tratamento mostrou redução desse parâmetro no grupo ENA quando comparado com o CTL (figura 10B,  $p = 0,0215$ ). Não foram observadas diferenças entre o grupo CTL e LOS ou entre ENA e LOS durante esse mesmo período.



**Figura 10. Análise da pressão arterial média (PAM).** (A) Pressão arterial média dos animais submetidos aos testes máximos de esforço semanais. Barras mostram média $\pm$ SEM (mmHg). Two-way Anova (Pós-teste: Bonferroni). (Interação:  $p = 0,773$ ,  $F(8, 144) = 1.823$ ; Tempo:  $P = 0.0146$ ,  $F(4, 144) = 3.214$ ; Tratamento:  $P = 0,0332$ ,  $F(2, 36) = 3750$ ; Sujeitos (matching):  $P < 0,0001$ ,  $F(36, 144) = 3.556$ ; Residual:  $DF = 144$ ,  $MS = 245,3$ ;  $n =$  CTL:11; LOS:15; ENA:13). \*  $p < 0,05$ . (B) Área sob a curva (ASC) da pressão arterial média (PAM) dos animais submetidos aos testes máximos de esforço semanais. Barras mostram média $\pm$ SEM. One-way Anova (Pós-teste: Bonferroni). (Tratamento:  $p = 0,0215$ ,  $F(2, 36) = 4280$ ; Residual:  $DF = 36$ ,  $MS = 2954$ ;  $n =$  CTL:11; LOS:15; ENA:13). \*  $p = 0,0215$ .

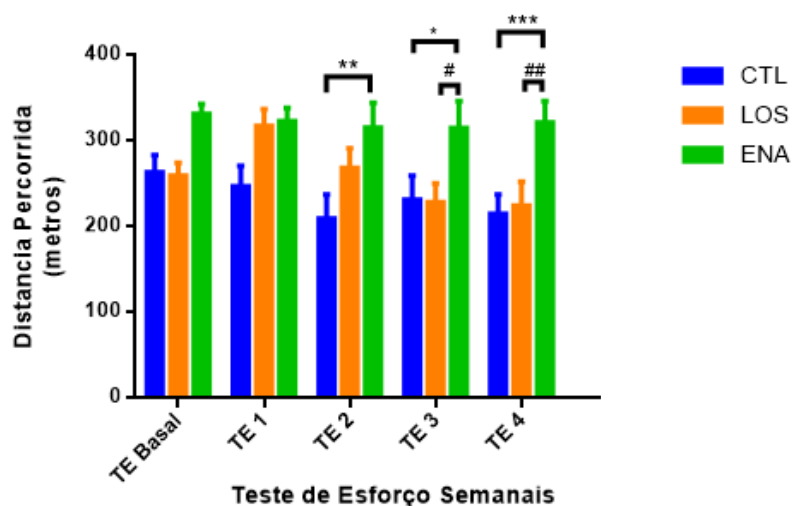
Em relação A FC, não foram observadas quaisquer alterações nos animais durante o decorrer do experimento (Figura 11).



**Figura 11. Frequência cardíaca média dos animais submetidos aos testes máximos de esforço semanais.** Barras mostram média $\pm$ EPM (bpm). Two-way Anova (Pós-teste: Bonferroni). (Interação:  $p = 0,1109$ ,  $F(8, 144) = 1.169$ ; Tempo:  $P < 0,0001$ ,  $F(4, 144) = 12.07$ ; Tratamento:  $P = 0,8164$ ,  $F(2, 36) = 2039$ ; Sujeitos (matching):  $P < 0,0001$ ,  $F(36, 144) = 4.478$ ; Residual:  $DF = 144$ ,  $MS = 425.7$ ;  $n =$  grupo CTL:11; LOS:15; ENA:13).

#### 4.3 DISTÂNCIA PERCORRIDA – EFEITO DO TRATAMENTO

Após 14 dias de tratamento (ou teste de esforço máximo 2), foi observado declínio da distância percorrida no grupo CTL, comparado a distância percorrida pelo ENA, mas não foram observadas diferenças entre GRUPO CTL e LOS ou diferenças entre LOS e ENA. Ao longo de 21 dias de tratamento (ou teste de esforço máximo 3), o declínio da distância percorrida no grupo CTL manteve-se quando comparado com o ENA, mas não foram observadas diferenças entre o grupo CTL e LOS. Neste ponto, porém, também se observou diferença na distância percorrida entre o LOS e ENA. Ao término dos 28 dias de tratamento (ou teste de esforço máximo 4), observou-se tanto declínio da distância percorrida no grupo CTL quanto no LOS, quando comparados com ENA. Não foram observadas diferenças entre o grupo CTL e LOS. Estes dados sugerem que o tratamento que IECA foi capaz de evitar o declínio do desempenho físico ao longo do período de 28 dias, quando comparado ao tratamento com o grupo CTL ou com o LOS (Figura 12). Dessa forma, os resultados do Two-Way Anova apontam tanto efeito do tratamento ( $p=0,0040$ ), quanto efeito do tempo de tratamento sobre a distância percorrida ( $p=0,0173$ ). Entretanto, não se observou interação entre os fatores ( $p=0,1163$ ) (tabela 1). Em seguida, a Análise de Covariância (Ancova) demonstrou que a variância do erro da covariável “distância percorrida no tempo basal”, não interferiu no resultado final ao tratamento (tabela 1).



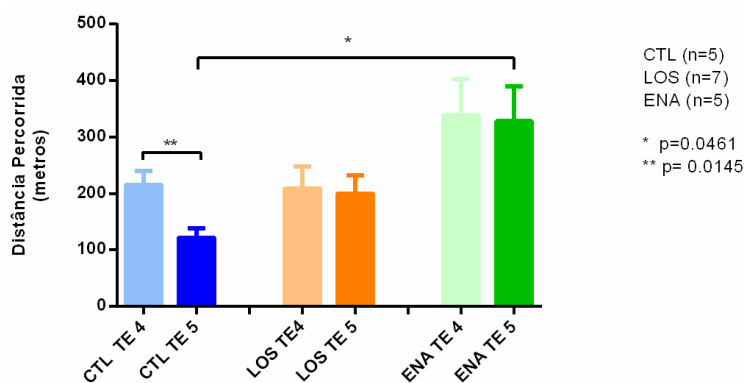
**Figura 12. Análise indireta do desempenho físico através da distância percorrida (m) pelos animais SHR em teste de esforço máximo ao longo de 28 dias.** Barras mostram média±EPM da distância percorrida (em metros). Two-way Anova (Pós-teste: Bonferroni). (Tempo:  $P=0,0173$ ,  $F(4, 144)=3,109$ ; Tratamento:  $P=0,0040$ ,  $F(2, 6)=6,453$ ; Interação:  $P=0,1163$ ,  $F(8, 144)=1,648$ ;  $n=$ GRUPO CTL:11; LOS:15; ENA:13).(\*\*  $p=0,0075$ ; \*  $p=0,0050$ ; #  $p=0,0229$ ; \*\*\*  $p=0,0074$ ; ##  $p=0,0083$ ).

	Distância Percorrida (metros)		
	Controle	Losartan	Enalapril
<b>Teste de Esforço Basal</b>	263,90±25,44 <sup>a</sup>	259,39±21,79 <sup>a</sup>	331,48±23,40 <sup>a</sup>
<b>Teste de Esforço 1</b>	247,05±25,44 <sup>a</sup>	317,97±21,79 <sup>a</sup>	323,00±23,40 <sup>a</sup>
<b>Teste de Esforço 2</b>	209,57±25,44 <sup>b#</sup>	268,92±21,79 <sup>b</sup>	315,52±23,40 <sup>b#</sup>
<b>Teste de Esforço 3</b>	231,57±25,44 <sup>b#</sup>	228,82±21,79 <sup>b‡</sup>	315,12±23,40 <sup>b#‡</sup>
<b>Teste de Esforço 4</b>	215,33±25,44 <sup>b#</sup>	224,50±21,79 <sup>b‡</sup>	321,48±23,40 <sup>b#‡</sup>
<b>Resultados</b>	<b>Tempo de Tratamento</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Interação Tempo x Tratamento</b>
<b>Valores de p – Anova Two Way</b>	0,017	0,004	0,116
<b>Valores de p - Ancova</b>	0,019	0,002	0,425

**Tabela 1. Distância percorrida pelos animais nos diferentes grupos.** Two-way anova (Pós-teste: Bonferroni). Distância percorrida expressa em média ± EPM. Letras diferentes, bem como os símbolos # e ‡, indicam diferença entre grupos.

#### 4.4 DISTÂNCIA PERCORRIDA – EFEITO TARDIO

Conforme descrito anteriormente, parte dos animais (CTL=5; LOS=7; ENA=5), após os 28 dias de tratamento (após o teste de esforço 4) permaneceram por mais 7 dias consecutivos no biotério, no intuito de avaliarmos o efeito tardio do tratamento. Para tanto, estes animais foram submetidos a mais um teste de esforço máximo (ou teste de esforço máximo 5). Sete dias após o término do tratamento, percebeu-se um menor declínio da distância percorrida no grupo ENA quando comparado com o grupo CTL ( $p=0,0461$ ), ao mesmo tempo em que a distância percorrida pelo grupo CTL diminuiu ( $p=0,0145$ ) (Figura 13). Assim, observamos que o efeito do tratamento com ENA na manutenção do desempenho físico dos animais permaneceu mesmo uma semana após o término do tratamento.

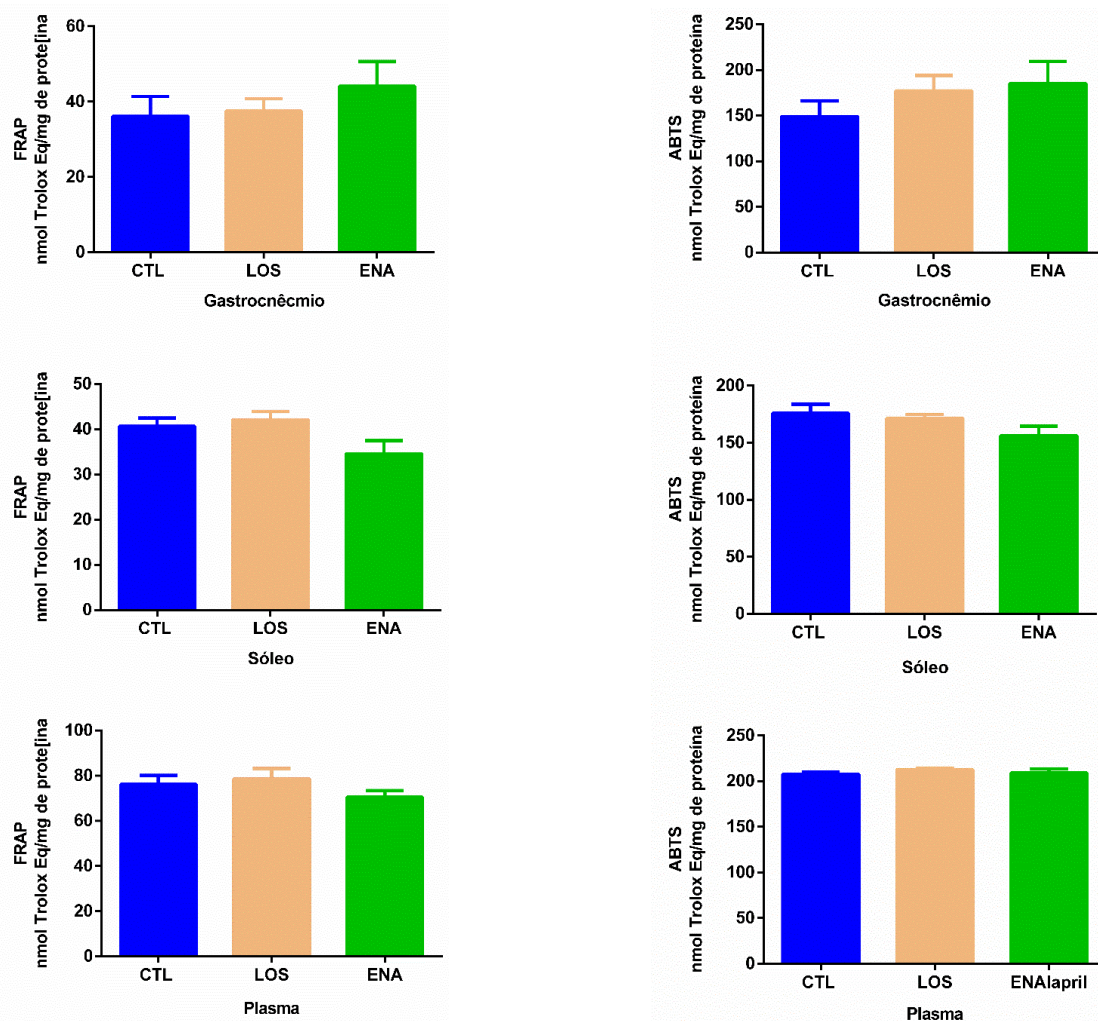


**Figura 13. Análise indireta do desempenho físico através da distância percorrida pelos animais SHR em teste de esforço máximo – Efeito Tardio ao Tratamento** (1 semana após término do tratamento). Barras mostram média±EPM da distância percorrida (em metros). \* One-way anova (Pós-teste: Bonferroni). (Tratamento:  $p=0,0145$ ,  $F(5, 28)=3.469$ ; Residual: 10156;  $n=CTL:5$ ;  $LOS:7$ ;  $ENA:5$ ). \*\* Teste t não pareado ( $t=3.109$ ,  $df=8$ ;  $n=5$ ).

## 4.5 ANÁLISE DO ESTRESSE OXIDATIVO

### 4.5.1 Avaliação do Status de Defesa Antioxidante (FRAP E ABTS)

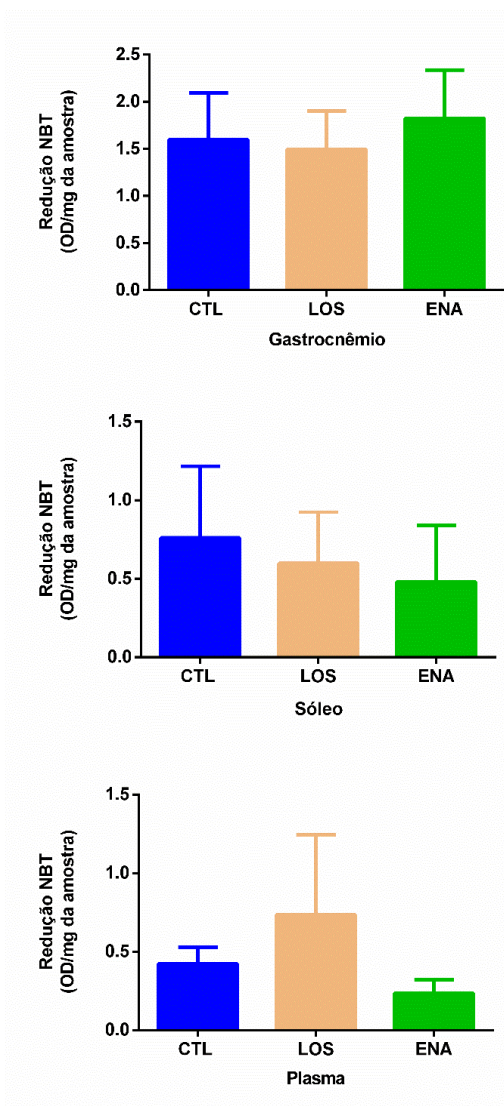
A capacidade das amostras em resistir ao dano oxidativo foi determinada com o potencial da capacidade de redução férrica (FRAP) e sua habilidade em eliminar radicais livres (ABTS). A administração de enalapril ou losartan não induziram mudanças nesses marcadores ((FRAP gastrocnêmio CTL:  $36,13 \pm 5,29$ ; LOS:  $37,46 \pm 3,35$ ; ENA:  $44,11 \pm 6,54$ ;  $p=0,4702$ ), (FRAP sóleo CTL:  $40,65 \pm 1,83$ ; LOS:  $42,11 \pm 1,89$ ; ENA:  $34,60 \pm 2,94$ ;  $p=0,0843$ ), (FRAP plasma CTL:  $76,23 \pm 3,91$ ; LOS:  $78,55 \pm 4,64$ ; ENA:  $70,45 \pm 2,97$ ;  $p=0,3510$ ); (ABTS gastrocnêmio: CTL:  $149,10 \pm 17,11$ ; LOS:  $177,20 \pm 16,80$ ; ENA:  $185,20 \pm 24,17$ ;  $p=0,4212$ ), (ABTS sóleo: CTL:  $175,9 \pm 7,94$ ; LOS:  $171,40 \pm 3,57$ ; ENA:  $156,20 \pm 8,16$ ;  $p=0,1488$ ), (ABTS plasma: CTL:  $207,5 \pm 2,66$ ; LOS:  $212,50,2 \pm 1,59$ ; ENA:  $209,0 \pm 4,50$ ;  $p=0,5280$ )) (Figura 14).



**Figura 14. Determinação dos níveis de FRAP e ABTS no músculo gastrocnêmio, sóleo e no plasma.** (Resultados foram expressos em média±EPM, n=5 por grupo por experimento, dois experimentos independentes. Teste ANOVA One Way, seguido por teste post Hoc Bonferroni).

#### 4.5.2 Avaliação da Produção de Ânion Superóxido (NBT)

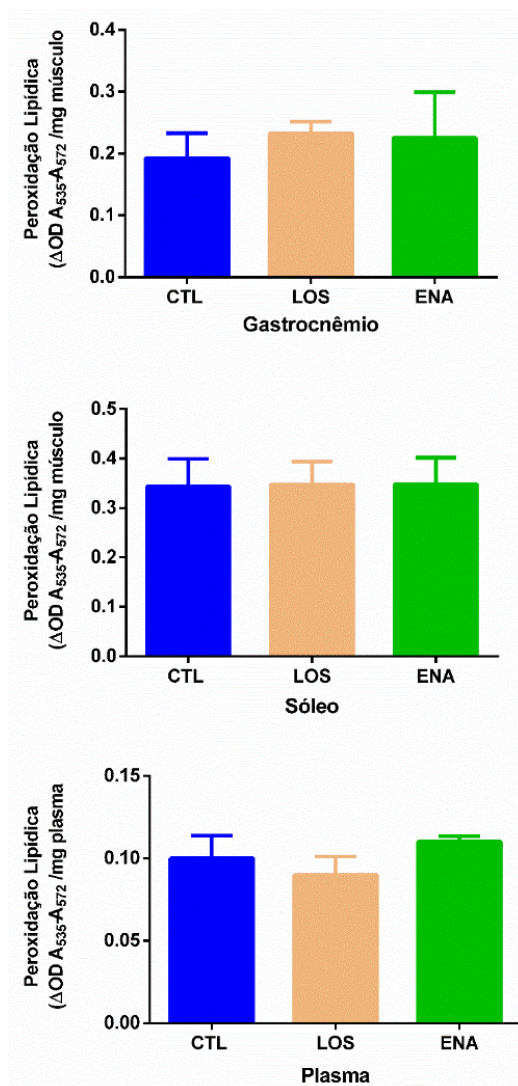
A quantificação da produção do ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) em homogeneizado de tecido foi realizada através do ensaio NBT. A administração de enalapril ou losartan não induziram mudanças nesses marcadores (gastrocnêmio CTL:  $1,60 \pm 0,49$ ; LOS:  $1,50 \pm 0,41$ ; ENA:  $1,83 \pm 0,51$ ;  $p=0,8812$ ); (sóleo CTL:  $0,76 \pm 0,20$ ; LOS:  $0,60 \pm 0,14$ ; ENA:  $0,48 \pm 0,16$ ;  $p=0,5300$ ); (plasma CTL:  $0,42 \pm 0,05$ ; LOS:  $0,74 \pm 0,23$ ; ENA:  $0,24 \pm 0,04$ ;  $p=0,0653$ ) (figura 15).



**Figura 15. Quantificação da produção do ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) no músculo gastrocnêmio, sóleo e no plasma.** (Resultados foram expressos em média $\pm$ EPM; plasma: CTL n=5; LOS n=5; ENA n=5). Teste ANOVA One Way, seguido por teste post Hoc Bonferroni).

#### 4.5.3 Avaliação da Peroxidação Lipídica (MDA)

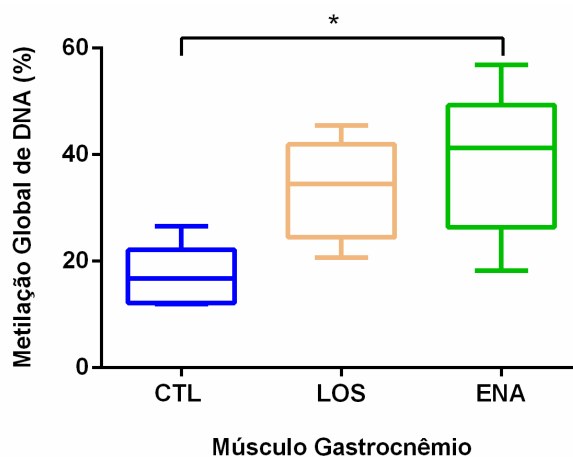
A peroxidação lipídica dos músculos gastrocnêmio, sóleo e do plasma foi avaliada a partir da determinação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA) (TBARS), principalmente o malondialdeído (MDA). A administração de enalapril ou losartan não induziram mudanças nesses marcadores (gastrocnêmio CTL:  $0,19 \pm 0,04$ ; LOS:  $0,23 \pm 0,02$ ; ENA:  $0,22 \pm 0,07$ ;  $p=0,8354$ ); (sóleo CTL:  $0,34 \pm 0,05$ ; LOS:  $0,35 \pm 0,05$ ; ENA:  $0,35 \pm 0,05$ ;  $p=0,9972$ ); (plasma CTL:  $0,10 \pm 0,01$ ; LOS:  $0,11 \pm 0,01$ ; ENA:  $0,09 \pm 0,01$ ;  $p=0,4096$ ) (Figura 16).



**Figura 16. Determinação da peroxidação lipídica através do ensaio do ensaio TBARS (quantificação do MDA) no músculo gastrocnêmio, sóleo e no plasma.** (Resultados foram expressos em média $\pm$ EPM, n=5 por grupo por experimento, dois experimentos independentes. Teste ANOVA One Way, seguido por teste post hoc Bonferroni).

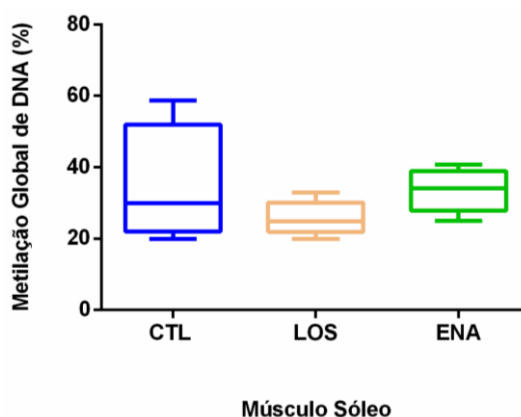
#### 4.6 ANÁLISE EPIGENÉTICA: EFEITO DOS TRATAMENTOS NA METILAÇÃO GLOBAL DO DNA

Observou-se um aumento estatisticamente significativo na metilação global de células musculares esqueléticas do gastrocnêmio ( $p=0,0239$ ) do grupo ENA quando comparado com o grupo CTL. Não houve diferença estatisticamente significativa na porcentagem de metilação global do DNA quando comparados os grupos CTL e LOS ( $p=0,0775$ ) ou LOS e ENA ( $p>0,9999$ ) (figura 17).



**Figura 17.** Efeitos do tratamento com enalapril ou losartan na metilação global do DNA em células do músculo gastrocnêmio de ratos espontaneamente hipertensos. Resultados foram expressos em mediana, intervalo interquartil (IQ: percentil 25 – percentil 75),  $n=5$  por grupo;  $p=0,0239$  - Teste de Kruskal-Wallis, seguido por teste post hoc de Dunn. Barra representa valores mínimo e máximo das medidas.

Com relação as análises de metilação global do DNA do músculo sóleo, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes quando comparado os grupos CTL e ENA ( $p>0,9999$ ), CTL e LOS ( $p=0,7726$ ) ou LOS e ENA ( $p=0,2490$ ) (figura 18).



**Figura 18.** Efeitos do tratamento com enalapril ou losartan na metilação global do DNA em células do músculo sóleo de ratos espontaneamente hipertensos. Resultados foram expressos em mediana, intervalo interquartil (IQ: percentil 25 – percentil 75),  $n=5$  por grupo;  $p=0,2215$  - Teste de Kruskal-Wallis, seguido por teste post hoc de Dunn. Barra representa valores mínimo e máximo das medidas.

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a relação entre o uso de enalapril ou losartan com possíveis melhorias no desempenho físico de animais SHR, avaliado de forma indireta através da distância máxima percorrida pelos animais em esteira adaptada. Os efeitos foram, resumidamente: 1) A ingestão de enalapril modula o peso corporal dos animais, impedindo o ganho de peso e diminuindo o acúmulo de gordura retroperitoneal ao longo do tratamento; 2) Redução significativa na PAM dos animais tratados com enalapril foi observada em comparação aos outros grupos; 3) O uso de enalapril não melhorou a distância percorrida pelos animais, mas evitou o declínio da mesma quando comparada com os outros grupos; 4) O tratamento com enalapril foi capaz de prevenir o declínio da distância percorrida dos animais, mesmo 1 semana após o término do tratamento ; 5) A administração de enalapril ou losartan não alteraram a capacidade oxidante e antioxidante total dos músculos gastrocnêmio, sóleo e do plasma dos submetidos ao teste de esforço máximo em esteira; 7) A administração de enalapril – mas não de losartan, alterou a metilação global do DNA de células musculares esqueléticas do músculo gastrocnêmio de animais ao teste de esforço máximo em esteira.

Os animais tratados com enalapril apresentaram redução do peso corporal e menor acúmulo de gordura retroperitoneal, sendo este mais evidente após o 14º dia de tratamento e tal redução não foi observada nos outros grupos. Vários estudos corroboram com este achado e sugerem que o SRA é envolvido em processos fisiológicos e fisiopatológicos ligados à síndrome metabólica, onde o tratamento com enalapril reduziu a adiposidade relacionada ao envelhecimento de animais F344, na ausência de alterações na atividade física, na temperatura corporal ou na ingestão de alimentos (CARTER, CHRISTY S. *et al.*, 2011). Ratos wistar alimentados com dieta hiperlipídica e tratados com enalapril apresentaram redução do peso corporal, nos níveis de leptina, da atividade da ECA no tecido adiposo e aumento nos níveis de PPAR- $\gamma$  e adiponectina (SANTOS, EDSON LUCAS *et al.*, 2009). Animais SHR tiveram níveis reduzidos de ET-1, da insulina de jejum, melhora da sensibilidade à insulina e níveis de adiponectina com a administração de enalapril (POTENZA *et al.*, 2006). O provável mecanismo que modula a perda de gordura na administração de enalapril está relacionada com aumentos da oxidação de ácidos graxos, nos níveis de adiponectina e melhor sinalização de receptores ativados por proliferadores periféricos (PPAR- $\gamma$ ) e de insulina (CARTER, CHRISTY S. *et al.*, 2011; FONTANA *et al.*, 2014; SANTOS, EDSON LUCAS *et al.*, 2009). Estes dados sugerem um papel importante do enalapril na modulação do RAS também em relação a regulação do peso corporal (SANTOS, EDSON L. *et al.*, 2008).

Reduções estatisticamente significativa na PAM dos animais tratados com enalapril foram observadas a partir da 4ª semana de tratamento. Além disso, a análise da área sob a curva

demonstrou uma redução da PAM ao longo das semanas de tratamento. Esse dado corrobora com o descrito na literatura, onde há relatos que doses de 10 mg/kg/dia de enalapril é suficiente para desencadear diminuições consideráveis na PA em animais SHR (AMANO et al., 1995). Ao mesmo tempo, não foram observadas reduções significativas na PAM nos animais tratados com losartan 10 mg/kg/dia. Dados da literatura apresentam resultados divergentes em relação a diminuição da PAM em animais SHR utilizando a mesma dose, demonstrando eficácia (CODY et al., 1995) ou não (STIER et al., 1993) na redução da PAM. Apesar de descrito na literatura que os ARA são eficientes anti-hipertensivos (MAIDA et al., 2016), uma vez que reduzem o efeito trófico da Ang II sobre o componente autônomo simpático e diminuem a secreção de catecolaminas, reduzindo indiretamente a atividade simpática (RIBEIRO, 2007; SAAVEDRA, 2005), o estresse causado pela restrição dos animais durante o protocolo de análise indireta da PA pode ter interferido no controle da PAM dos animais. Há relatos de tal situação, onde animais SHR podem ter aumentos na PA mesmo com um pequeno nível de estresse, como o causado pela restrição ou imobilização forçada nas mensurações através de métodos indiretos e a compressão prolongada da cauda do animal durante a mensuração indireta da PA pode produzir leituras que não estimam a PA intravascular com precisão (CHIUEH; KOPIN, 1978; FRITZ; RINALDI, 2008). Além disso, esses animais são considerados simpatotônicos, pois apresentam maior atividade simpática e/ou redução da influência vagal, reduzida sensibilidade do barorreflexo e os níveis plasmáticos de Ang II nessa espécie de animal, interferindo no controle da PA (OPARIL; SCHMIEDER, 2015).

Não observamos alterações na FC dos animais SHR tratados com 10 mg/kg de losartan ou enalapril. Este resultado corrobora com a literatura e justifica-se pelo fato que losartan exibe efeitos simpatoinibitórios no nível vascular, mas não no nível cardíaco (MOREAU *et al.*, 1993; WEBER *et al.*, 1995).

A atenuação do declínio da força muscular após tratamento com IECA é bem relatada na literatura, mas apresenta resultados conflitantes. O menor declínio da força muscular foi observado ao avaliar o desempenho físico e qualidade muscular em ratos idosos (F344), submetidos a tratamento com enalapril e losartan (30mg/kg/dia para losartan e 40mg/kg/dia para enalapril) (CARTER, CHRISTY S. *et al.*, 2011). O tratamento com enalapril (5mg/kg/dia) promoveu maior resistência ao enfraquecimento muscular em ratos MDX e melhorou a capacidade de exercício em animais SHR tratados com perindopril (3mg/kg/dia) (COZZOLI *et al.*, 2011; MINAMI *et al.*, 2007). Há relatos de benefícios em humanos. Idosos usuários de IECA apresentam maior resposta funcional ao exercício, idosos com deficiência funcional obtiveram melhorias no teste de caminhada de 6 minutos equivalente a 6 meses de treinamento e o uso de IECA foi associado a taxas reduzidas em até 3 anos no declínio da força muscular e velocidade de caminhada (BUFORD *et al.*, 2012; CARTER, CHRISTY S *et al.*, 2002; SUMUKADAS *et al.*, 2007). Entretanto, estudo recente avaliou diferentes parâmetros de

desempenho muscular e físico em 838 idosos, não encontrando relação positiva entre a ingestão de IECA e a qualidade ou função muscular (SPIRA *et al.*, 2016). Não foi observada melhorias na resposta ao exercício em idosos após 20 semanas de administração de IECA nem na resistência ou capacidade oxidativa máxima do músculo esquelético de ratos wistar tratados com perindopril (2 mg/kg/dia) por 10 a 12 semanas (BAHI *et al.*, 2004; SUMUKADAS *et al.*, 2014).

Com relação ao tempo de tratamento, o presente estudo evidenciou que os animais expostos ao uso de enalapril apresentam menor declínio da distância percorrida ao longo dos 28 dias de tratamento, quando comparado com os outros grupos. Este achado corrobora com estudo associando o tempo de exposição a tratamento com IECA com tendência a maior quantidade de massa muscular e mais recentemente mulheres usuárias de IECA apresentaram tendência a maiores índices de massa muscular esquelética, bem como maior massa magra apendicular (DI BARI *et al.*, 2004; SPIRA *et al.*, 2016). Postulamos que tais diferenças poderiam ser evidenciadas em outras formas de avaliação do desempenho, maior dosagem da droga ou até mesmo em períodos maiores de intervenção.

Diversos fatores influenciam a capacidade do IECA em modular a função física. Os IECA melhoram a função endotelial, o fluxo sanguíneo e o transporte de glicose, estes interligados com a melhora da função muscular, melhoram ainda a sensibilidade à insulina, independentemente de reduções na PA e podem ser secundárias a melhorias na sinalização do NO (DE CAVANAGH, E. M. V; INSERRA; FERDER, 2011; GIOVANNINI *et al.*, 2010; HENRIKSEN; PRASANNARONG, 2013), decorrente do aumento dos níveis circulantes de BK após tratamento com IECA, com posterior liberação de prostaglandinas, prostaciclina e NO (BURNIER, M; WAEBER; BRUNNER, 1994). A atividade da BK mantém a produção de NO, inibindo a citocromo-c oxidase e limitando o consumo de oxigênio mitocondrial (WANG; FEDORUK; RUPERT, 2008), ao mesmo tempo que uma maior atividade no receptor  $\beta_2$  de cininas estaria associada à eficiência metabólica e ao maior desempenho de resistência (PUTHUCHEARY *et al.*, 2011). Dessa forma, os efeitos benéficos produzidos pelo tratamento com IECA não se deve apenas à redução na síntese de Ang II, mas também à potenciação dos efeitos biológicos da bradicinina, devido sua menor degradação endógena (COELHO *et al.*, 2016; WANG; FEDORUK; RUPERT, 2008). Diferentes isoformas do NO também podem influenciar a eficiência do músculo esquelético, uma vez que a expressão de iNOS tende a diminuir ao mesmo tempo que a expressão de nNOS tende a aumentar no músculo esquelético após tratamento com enalapril, mas somente a expressão de eNOS aumenta de forma estatisticamente significativa (MARZETTI *et al.*, 2013). Cada uma delas pode produzir efeitos específicos sobre a sensibilidade à insulina, estresse oxidativo, apoptose e processos inflamatórios, funções protetoras e patológicas, dependendo da quantidade, bem como da sua disposição espacial (LEITNER *et al.*, 2017). Ratos tratados com enalapril apresentaram resistência ao enfraquecimento muscular e redução de

espécies reativas de oxigênio (ROS), melhorando a função dos músculos, reduzindo a ativação do fator nuclear kappa B (NF-κB) (COZZOLI *et al.*, 2011). O estresse oxidativo elevado poderia ser causador da indução de vias de sinalização que levam à degeneração muscular, enquanto que a atividade aumentada de NF-κB resulta na produção aumentada do fator de necrose tumoral alta (TNF- α) e diminuição da sensibilidade à insulina (CHOI *et al.*, 2016; WEI *et al.*, 2008) (Wei *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2016). Por sua vez, o TNF-α prejudica a sinalização da insulina, promove a degradação das proteínas musculares e a apoptose dos miócitos, desempenhando um papel central na perda de massa muscular (GIOVANNINI *et al.*, 2010). Estes achados ligam a inflamação, o estresse oxidativo e a expressão das isoformas do NO com a morte celular e as vias de sobrevivência celular. Assim, enalapril produz ação sobre a sinalização do NO ao mesmo tempo que modula a ação da Ang II, com consequente benefícios ao músculo esquelético (MARZETTI *et al.*, 2013).

No presente trabalho, o tratamento com losartan não causou melhorias na distância percorrida pelos animais SHR e tal desempenho foi reduzido após a 3ª e 4ª semana de tratamento. Uma possível explicação é que a dose administrada (10 mg/kg/dia), apesar de possuir relação com efeitos benéficos, é menor que a usada em outros estudos que evidenciaram efeitos no músculo esquelético de ratos (40mg/kg/dia) (CARTER, CHRISTY S. *et al.*, 2011). Além disso, diferentemente do encontrado com o tratamento do enalapril, a administração de losartan não altera os níveis circulantes de BK, pois este interagindo diretamente no receptor AT<sub>1</sub>, não exerce qualquer bloqueio na atividade da ECA e consequentemente menor degradação da BK (SHARMA, 2009). Tal achado leva a hipótese de que a maior liberação de NO causada pela menor degradação da BK seria uma das possíveis vias responsáveis pelos benefícios dos IECA no menor declínio da função muscular ao longo do tratamento, observada no presente estudo. Estudos futuros são necessários para elucidar tal mecanismo.

Em humanos, estudos também não observaram melhorias na capacidade de exercício com a administração de losartan (50mg/dia – 4 semanas), em pacientes adultos com disfunção do ventrículo direito ou do ventrículo esquerdo (DORE *et al.*, 2005; GERDTS *et al.*, 2006). Entretanto, o benefício com a administração de ARA também é visto na função física em idosos, em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva e em pacientes com doença arterial periférica (CARTER, CHRISTY S. *et al.*, 2011; HAMROFF *et al.*, 1999; ZANKL *et al.*, 2010). Em roedores, melhorou a capacidade de exercício, acelerou a cicatrização muscular, retardou a atrofia por desuso e atenuou o declínio da força de preensão (CARTER, CHRISTY S. *et al.*, 2011; FENG, X. *et al.*, 2011).

Os mecanismos pelos quais os ARA melhoram a função física ainda são obscuros, mas relacionam-se com a redução da inflamação e da produção de radicais livres, redução sérica nos índices da citocina inflamatória IL-6 e aumentos nos índices de catalase e de glutathiona peroxidase

(GPX) (DAI *et al.*, 2007; LIN *et al.*, 2014). Os benefícios ainda estão interligados a mecanismo dependente da via PPAR- $\delta$ /AMPK, independente do bloqueio do receptor AT1 e uma maior ativação da cascata de sinalização TGF- $\beta$  e IGF-1/Akt/mTOR, uma vez que estudo demonstrou que o bloqueio do receptor AT1 protegeu a atrofia muscular por desuso (BURKS; COHN, 2011; FENG, X. *et al.*, 2011). Estudo demonstrando que o bloqueio do receptor AT1 com losartan, aumentou os níveis circulantes de Ang-(1-7) (SCHINDLER *et al.*, 2007) bem como a atividade da ECA2 (ZHANG, Y. H. *et al.*, 2015), juntamente com o fato que a ativação dessa via não clássica do SRA resultaria em efeitos benéficos como anti-fibrótico, anti-inflamatório e antitrófico no músculo esquelético através da ativação do receptor Mas (CABELLO-VERRUGIO; RIVERA; GARCIA, 2017), explicariam tal possibilidade. Assim, estudos adicionais são necessários para esclarecer a ação dos ARA no desempenho físico.

Recente mecanismo de ação tem descrito células satélites musculares como alvo principal da ativação ou bloqueio do SRA, onde o bloqueio culminou na proteção dessas células responsáveis pela regeneração e melhora da função muscular (SARTIANI *et al.*, 2015). Outro mecanismo descreve que durante a administração de IECA, parte da Ang II presente é degradada pela ECA2 e, conseqüentemente, ativa o eixo Ang(1-7)/Receptor Mas, agindo contrariamente as ações desencadeadas pela ativação do receptor AT1 (SHI *et al.*, 2015). Até o momento não é conhecido se tal mecanismo ocorre em humanos.

Considerando tais achados, podemos afirmar que o menor declínio do desempenho físico através da intervenção com enalapril pode trazer importantes implicações clínicas, tanto para indivíduos em processo de envelhecimento (BUNOUT *et al.*, 2009; CARTER, C S *et al.*, 2005; SUMUKADAS *et al.*, 2007; ZHOU *et al.*, 2015; ZI; CARMICHAEL; LYE, 2003), bem como para indivíduos interessados em melhor performance física (WANG; FEDORUK; RUPERT, 2008). Primeiro, porque a função física, que envolve a massa muscular, força, potência e desempenho físico é determinante crítico para a realização das atividades independentes na vida adulta, sendo considerado um princípio central da qualidade de vida (TROMBETTI *et al.*, 2016) e a disfunção do sistema músculo esquelético é uma condição debilitante que predispõe a maior risco de quedas, hospitalizações e mortalidade, principalmente em indivíduos em processo de envelhecimento (CHATTERJI *et al.*, 2015; SAYER *et al.*, 2013; STUDENSKI, S *et al.*, 2011). Segundo, até o momento, nenhum tratamento farmacológico demonstrou ser eficaz na atenuação do declínio do desempenho físico relacionado ao envelhecimento e uma intervenção farmacológica eficaz poderia ter um impacto clínico significativo, uma vez que tal intervenção exige tipicamente mínimo esforço por parte dos pacientes - um ponto importante dado que o esforço inicial para iniciar um programa de exercícios é uma barreira primária aos tratamentos baseados em estilo de vida (Simon *et al.*, 2015). Além disso, uma intervenção farmacológica capaz de melhorar índices de desempenho muscular, chamaria a atenção de atletas e esportistas profissionais, dado que estudo já levantou a hipótese que – considerando a possibilidade

de melhorar resposta ao exercício associado à diminuição da atividade da ECA plasmática, o uso de IECA ou ARA poderiam ser considerados agentes de doping (WANG; FEDORUK; RUPERT, 2008). Investigações futuras são necessárias para elucidar os mecanismos atuantes nesse processo.

No presente trabalho, nem a administração de enalapril, bem como de losartan, foram capazes de alterar a capacidade dos músculos gastrocnêmio, sóleo e do plasma em resistir ao estresse oxidativo - reduzindo o íon férrico (avaliado pelo FRAP), na sua habilidade em sequestrar radicais livres (avaliado pelo ABTS), na produção de ânions superóxido (avaliado pelo NBT) e na produção peroxidação lipídica (avaliada pelos níveis de malondialdeído – MDA) em ratos espontaneamente hipertensos submetidos a teste de esforço máximo em esteira. Tal achado corrobora com o encontrado na literatura, uma vez que a administração do IECA perindopril não melhorou a capacidade oxidativa dos músculos esqueléticos e nem melhorou a performance de ratos sedentários submetidos a teste de exaustão em esteira (BAHI *et al.*, 2004) e não foi capaz de melhorar a capacidade oxidativa do músculo gastrocnêmio em ratos diabéticos, também submetidos a teste de tolerância ao exercício (ROUYER *et al.*, 2007). Resultados similares foram observados em outros tecidos, como (GUL *et al.*, 2006) demonstraram que o nível de MDA no tecido cardíaco não foi afetado pelo exercício exaustivo agudo em ratos não treinados.

Entretanto, outros estudos disponíveis na literatura indicam que os inibidores da ECA modulam variados processos biológicos, como função metabólica geral, sensibilidade à insulina, inflamação e resistência oxidativa (HENRIKSEN; JACOB, 2003), atenua o estresse oxidativo em ratos diabéticos (DE CAVANAGH, E. M. V. *et al.*, 2001) e tal benefício não é isolado ao músculo esquelético, pois diversos estudos demonstraram que o tratamento com o IECA enalapril atenua a disfunção em outros sistemas orgânicos, incluindo rins e coração, que parecem ser mediados por reduções no estresse oxidativo, inflamação e sinalização da insulina (BASSO *et al.*, 2007; CHANDRAN *et al.*, 2014; DE CAVANAGH, E. M. V. *et al.*, 2001), indicando inclusive preservação da função muscular, uma vez que o tratamento com enalapril atenuou a apoptose mediada por mitocôndrias (CARTER, CHRISTY S. *et al.*, 2011).

Por sua vez, a administração do antagonista do receptor da Ang II - olmesartan, por 8 semanas, não melhorou a atividade das enzimas associadas com o metabolismo oxidativo no músculo esquelético de indivíduos obesos, uma vez que não houve alteração na concentração de CO<sub>2</sub>, produzido pela oxidação do palmitato após o tratamento (BOUTAGY *et al.*, 2015). Ainda, estudo realizado por Moors e colaboradores (MOORS *et al.*, 2013) não observaram mudanças na expressão de mRNA do músculo esquelético de genes alvos associados com o metabolismo oxidativo após tratamento com o ARA valsartan por 26 semanas em humanos com metabolismo de glicose diminuído. Entretanto, estudos demonstram que a administração de losartan tem potencial efeito

antioxidante em outros sistemas orgânicos, uma vez que aumentou a atividade de enzima antioxidantes (Cu, Zn-superóxido dismutase, catalase e GSH peroxidase) em ratos com infarto do miocárdio (KHAPER; SINGAL, 2001) e portadores de nefropatia diabética (OGAWA *et al.*, 2006), reduziu níveis de citocinas inflamatórias (DAI *et al.*, 2007; TAKAGI *et al.*, 2013), inclusive sua administração foi capaz de reduzir a fibrose e melhorar a regeneração muscular, em doses abaixo das necessárias para qualquer efeito anti-hipertensivo (BEDAIR *et al.*, 2008).

Com relação a capacidade do teste de esforço agudo produzir danos oxidativos capazes de serem avaliados, (LIU *et al.*, 2000), avaliaram diversos biomarcadores de estresse oxidativo, oxidação de proteínas e antioxidantes endógenos (peroxidação lipídica [MDA], oxidação de proteínas, danos no DNA, e os antioxidantes endógenos incluíram ácido ascórbico, alfa-tocoferol, GSH e GSSG, ubiquinona, ubiquinol, cisteína e cistina) em ratos submetidos a exercício agudo, sendo este a corrida em esteira até exaustão. Os animais foram condicionados à esteira por um período de 2 semanas, 10 minutos a 0,8 km/h / 3 vezes por semana antes do teste de exaustão. Os níveis de MDA nos músculos das patas traseiras (vasto lateral, dividido em grupos musculares rápidos e lentos) não foram alterados pelo exercício agudo, somente no exercício crônico. Tal achado corrobora com nosso estudo, uma vez que não observamos alterações nos níveis de MDA, tanto no grupo tratado com enalapril, bem como no grupo tratado com losartan.

Nestas circunstâncias, é possível que no presente trabalho o simples teste de esforço máximo não foi suficiente para causar dano oxidativo exacerbado nos músculos avaliados e no plasma, ao mesmo tempo que o estresse oxidativo possa ter ocorrido logo após a realização do último teste de esforço, sendo reduzido e/ou controlado ao longo das 24 horas decorrentes até a realização da eutanásia dos animais. Essa é uma hipótese a ser considerada uma vez que há relatos na literatura que uma única sessão de exercício agudo pode na verdade não causar estresse oxidativo significativo ao tecido muscular por causa das ações de tamponamento de sistemas antioxidantes, mas a imposição diária de longas sessões de exercícios parece deixar vestígios de estresse oxidativo acumulado (LIU *et al.*, 2000). Além disso, optamos por não utilizar nenhuma forma agressiva de estímulo à corrida dos animais como o choque elétrico, uma vez que tal estímulo poderia ser o gatilho do estresse oxidativo (SUN *et al.*, 2016).

Atualmente está claro que tanto o exercício agudo aeróbio (ASHTON *et al.*, 1998) como o anaeróbio (BAILEY *et al.*, 2007) têm o potencial de resultar em aumento da produção de radicais livres, o que pode ou não causar estresse oxidativo agudo. Entretanto, para que o estresse oxidativo ocorra, as EROs produzidas durante o exercício devem exceder o sistema de defesa antioxidante presente, resultando em dano oxidativo às biomoléculas específicas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984). Diferentes protocolos de exercícios podem induzir níveis variados de produção de EROs, já que o

dano oxidativo tem mostrado ser tanto dependente da intensidade e duração do exercício, idade, status de treinamento e ingestão dietética dos indivíduos quanto a detecção desse estresse in vivo (biomarcador escolhido, amostra de tecido, tempo de amostragem). Durante protocolos de baixa intensidade e duração, as defesas antioxidantes parecem suficientes para atender a produção de EROs, mas à medida que a intensidade e / ou duração do exercício aumenta, essas defesas não são mais adequadas, resultando potencialmente em dano oxidativo aos tecidos circunvizinhos (FISHER-WELLMAN; BLOOMER, 2009). Tais variáveis podem explicar parcialmente os presentes achados. Além disso, uma limitação do nosso estudo em relação aos marcadores de estresse oxidativo é o fato de não contarmos com um grupo onde fora induzido uma situação de estresse oxidativo adicional, verificando assim a real capacidade dos IECA ou dos ARA em melhorar tal capacidade, como é descrito na literatura (CHOI *et al.*, 2016; COZZOLI *et al.*, 2011; MARZETTI *et al.*, 2013; WEI *et al.*, 2008).

Ainda no presente estudo evidenciamos a associação entre a administração do IECA enalapril e um aumento nos níveis globais de metilação do DNA, em células do músculo gastrocnêmio de ratos espontaneamente hipertensos, submetidos a teste de esforço máximo em esteira. Este é o primeiro registro na literatura demonstrando alterações epigenéticas oriundas da administração do enalapril.

Alterações epigenéticas ocorrem dentro das células musculares durante o desenvolvimento, maturação e regeneração (BAAR, 2010). Tais alterações podem envolver dois principais mecanismos: (1) modificações covalentes nas caudas do terminal N das proteínas histonas e (2) metilação do carbono 5 da citosina, geralmente seguido por guanina (nucleotídeos CpG), em moléculas de DNA (GOMES; PELOSI, 2013).

Considerando os resultados do presente estudo, relacionados a hipermetilação do DNA do músculo gastrocnêmio dos animais submetidos ao tratamento com enalapril, juntamente com o fato desse músculo apresentar maior porcentagem de fibras musculares de contração rápida ou do tipo IIa (ARMSTRONG; PHELPS, 1984; MORITANI; ODDSSON; THORSTENSSON, 1991; SANCHEZ *et al.*, 2014; WIBERG *et al.*, 2015), nós postulamos a existência da redução na expressão de possíveis genes presentes nas fibras, sendo eles: ATPase, transportador de  $Ca^{2+}$ , músculo cardíaco, contração lenta – tipo II - SERCA2 – ATP2A2; troponina tipo I (lenta) – TNNI1; Cadeia pesada de miosina 7B, músculo cardíaco, beta - MYH7B; Cadeia leve de miosina 2, cardíaca, lenta - MYL2; Troponina T tipo 1 (esquelética, lenta) - TNNT1; Cadeia pesada de miosina 7, músculo cardíaco, beta - MYH7; Lactato desidrogenase B (LDH-H) - LDHB e Tropomiosina 3 ( $\alpha$ -tropomiosina lenta) - TPM3. Recente e pioneiro estudo relacionou a metilação específica do tipo de fibra muscular, identificando os genes acima

descritos como hipermetilados e apresentando baixo nível de expressão nesse tipo de fibra muscular predominante (BEGUE *et al.*, 2017).

Assim, a hipermetilação dos genes da miosina lenta em fibras musculares rápidas poderia ser parcialmente responsável por sua baixa expressão no tipo de fibras musculares rápidas (SCHIAFFINO *et al.*, 2015), deixando claro que os níveis de metilação podem influenciar as propriedades metabólicas do músculo, baseado no tipo de fibra predominante. Postulamos ainda que a redução da expressão desses genes pode ser ainda mais significativa com a administração de enalapril. Estudos futuros são necessários para comprovar tal hipótese. Além disso, hipotetizamos que a administração do enalapril seria capaz de induzir à diferentes modulações na metilação global do DNA e na expressão de mRNA de genes codificadores dos receptores para adiponectina e BK, hormônios que estão envolvidos na regulação do metabolismo do músculo esquelético (TAGUCHI *et al.*, 2000), uma vez que estudo identificou mudanças na metilação do DNA e na expressão de mRNA de vários genes em humanos, incluindo ADIPOR1, ADIPOR2 e BDKRB2 em resposta a uma intervenção de exercício de longo prazo. Tais efeitos poderiam causar melhorias no metabolismo, reduzindo a circunferência abdominal, peso e IMC de indivíduos com predisposição ao desenvolvimento de diabetes tipo 2 (NITERT *et al.*, 2012). Tais hipóteses sustentariam nossos achados relacionados a redução do peso corporal, induzida pela administração de enalapril. Pesquisas futuras são necessárias para investigar essa possibilidade.

O músculo esquelético é um tecido multicelular composto por vários tipos de fibras musculares, cada um com perfis funcional e metabólico diferentes (CICILIOT *et al.*, 2013). Fibras musculares de contração lenta - composta por cadeia pesada de miosina I, possuem uma alta capacidade oxidativa sendo menos fatigáveis que as fibras musculares de contração rápida – estas compostas por cadeia pesada de miosina IIa, mais anaeróbicas na natureza e pode gerar substancialmente mais potência (até 20 vezes) do que fibras musculares de contração lenta (TRAPPE *et al.*, 2015). Considerando as diferenças metabólicas, estruturais e funcionais entre as fibras musculares de contração lenta e rápida (LUDEN *et al.*, 2008; MURACH *et al.*, 2014; TRAPPE *et al.*, 2015), as análises de metilação do DNA específicas do tipo de fibra podem fornecer novas informações sobre a saúde, desempenho e doença do músculo esquelético, na sarcopenia (BIOLO; CEDERHOLM; MUSCARITOLI, 2014), em distrofias musculares (RODRIGUEZ-CRUZ *et al.*, 2015), bem como na gravidade dessa, controlando a capacidade de resistir a danos musculares (BAJANCA; VANDEL, 2018). Entretanto, a interpretação das diferenças nos perfis de metilação do DNA para tecidos é complicada pelo fato de que o perfil epigenético pode diferir substancialmente entre vários tipos de células dentro de um tecido (VARLEY *et al.*, 2013). No futuro, a relação entre o nível de metilação e a expressão gênica deve ser estendida ainda a outros genes que mostram um perfil de

metilação do DNA diferente entre os tipos de fibras musculares em relação aos diferentes estímulos (BEGUE *et al.*, 2017).

Diante desses achados, podemos considerar que a literatura busca compreender como os mecanismos epigenéticos podem controlar o desenvolvimento muscular, seu metabolismo, suas adaptações e diferenciações, bem como sua regeneração em processos patológicos e distrofias. Grandes debates relacionados a modulação epigenética sobre o gene da ECA e sua influência sobre o desempenho e resistência ao exercício têm sido crivados por especialistas, chegando a ser especulado que tal regulação seria relevante para a capacidade de resistência ao exercício uma vez que a hipermetilação do gene da ECA poderia influenciar nessa capacidade de resistência (RALEIGH, 2012).

O presente achado fornece novas bases para a compreensão das modulações epigenéticas induzidas mediante a administração de enalapril, abrindo possibilidades para desenvolvimento de novas drogas terapêuticas para distúrbios do sistema músculoesquelético relacionados às deficiências metabólicas, do desempenho, da qualidade muscular, do envelhecimento e outras malignidades.

## **6. CONCLUSÃO**

Os dados do presente trabalho confirmam o efeito protetor do enalapril sobre o sistema musculoesquelético e sobre a modulação do peso corporal, bem como demonstra pela primeira vez que a intervenção farmacológica com foco na modulação do SRA utilizando o IECA enalapril é capaz de promover alterações epigenéticas no músculo esquelético de ratos submetidos ao teste de esforço máximo.

## REFERÊNCIAS

- ABADIR, P. M.; WALSTON, J. D.; CAREY, R. M. Subcellular characteristics of functional intracellular renin-angiotensin systems. *Peptides*, v. 38, n. 2, p. 437–445, dez. 2012.
- ABDULLA, M. H. *et al.* Chronic treatment with losartan and carvedilol differentially modulates renal vascular responses to sympathomimetics compared to treatment with individual agents in normal Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 612, n. 1–3, p. 69–74, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.03.064>>.
- ACKERMANN, U. Regulation of arterial blood pressure. *Surgery (Oxford)*, v. 22, n. 5, p. 120a–120f, 2004.
- ALLEN, A. M.; ZHUO, J.; MENDELSON, F. A. Localization of angiotensin AT1 and AT2 receptors. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, v. 10 Suppl 1, p. S23-9, jan. 1999.
- AMANO, H. *et al.* Antihypertensive effect of chronic KT3-671, a structurally new nonpeptide angiotensin AT1-receptor antagonist, in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Jpn J Pharmacol*, v. 69, n. 3, p. 215–222, 1995. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8699629](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8699629)>.
- AMARAL, S. L. *et al.* Exercise training causes skeletal muscle venular growth and alters hemodynamic responses in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension*, v. 19, n. 5, p. 931–940, 2001.
- ANTON, S. D. *et al.* Successful aging: Advancing the science of physical independence in older adults. *Ageing Research Reviews*, v. 24, p. 304–327, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2015.09.005>>.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual review of plant biology*, v. 55, p. 373–399, 2004.
- ARMSTRONG, R. B.; PHELPS, R. O. Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *American Journal of Anatomy*, v. 171, n. 3, p. 259–272, 1984.
- ASHTON, T. *et al.* Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-centred radicals in human serum following exhaustive exercise. *European journal of applied physiology and occupational physiology*, v. 77, n. 6, p. 498–502, maio 1998.
- BAAR, K. Epigenetic control of skeletal muscle fibre type. *Acta Physiologica*, v. 199, n. 4, p. 477–487, 2010.
- BACURAU, A. V. *et al.* Aerobic exercise and pharmacological therapies for skeletal myopathy in heart failure: Similarities and differences. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2016, 2016.
- BADER, M.; GANTEN, D. Update on tissue renin – angiotensin systems. p. 615–621, 2008.
- BAHI, L. *et al.* Does ACE inhibition enhance endurance performance and muscle energy metabolism in rats? *J Appl Physiol.*, n. 96, p. 59–64., 2004.
- BAILEY, D. M. *et al.* Electron paramagnetic spectroscopic evidence of exercise-induced free radical accumulation in human skeletal muscle. *Free radical research*, v. 41, n. 2, p. 182–190, fev. 2007.

- BAJANCA, F.; VANDEL, L. PLOS Currents Muscular Epigenetic Regulators Modulate Muscle Damage in Duchenne Muscular Sci-Hub. p. 1–10, 2018.
- BAND, M. M. *et al.* Leucine and ACE inhibitors as therapies for sarcopenia (LACE trial): study protocol for a randomised controlled trial. *Trials*, v. 19, n. 1, p. 6, 2018. Disponível em: <<https://trialsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13063-017-2390-9>>.
- BARBOSA, K. B. F. *et al.* Estresse oxidativo : conceito , implicações e fatores modulatórios Oxidative stress : concept , implications. *Rev Nutr*, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.
- BARREIRO, E.; TAJBAKSH, S. Epigenetic regulation of muscle development. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, v. 38, n. 1, p. 31–35, 2017.
- BASSO, N. *et al.* Protective effect of long-term angiotensin II inhibition. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, v. 293, n. 3, p. H1351–H1358, 2007. Disponível em: <<http://ajpheart.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpheart.00393.2007>>.
- BEDAIR, H. S. *et al.* Angiotensin II receptor blockade administered after injury improves muscle regeneration and decreases fibrosis in normal skeletal muscle. *American Journal of Sports Medicine*, v. 36, n. 8, p. 1548–54, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18550776>>.
- BEGUE, G. *et al.* DNA methylation assessment from human slow- and fast-twitch skeletal muscle fibers. *Journal of Applied Physiology*, v. 122, n. 4, p. 952–967, 2017. Disponível em: <<http://jap.physiology.org/lookup/doi/10.1152/japophysiol.00867.2016>>.
- BELLAMY, L. M. *et al.* Skeletal muscle-endothelial cell cross talk through angiotensin II. *Am J Physiol Cell Physiol*, v. 299, p. 1402–1408, 2010.
- BEN-ARI, E. T.; GARRISON, J. C. Regulation of angiotensinogen mRNA accumulation in rat hepatocytes. *The American journal of physiology*, v. 255, n. 1 Pt 1, p. E70-9, jul. 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2839039>>.
- BERNSTEINS, K. E. *et al.* Mouse Angiotensin-converting Enzyme Is a Protein Composed of Two Homologous Domains \*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 264, n. 15, p. 11945–11951, 1989. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/264/20/11945.long>>.
- BEZERRA, S. M. M. S. *et al.* Chronic AT<sub>1</sub> Receptor Blockade Alters Autonomic Balance and Sympathetic Responses in Hypertension. *Hypertension*, v. 38, n. 3, p. 569–575, 2001. Disponível em: <<http://hyper.ahajournals.org/lookup/doi/10.1161/hy09t1.095393>>.
- BIGOT, A. *et al.* Age-Associated Methylation Suppresses SPRY1, Leading to a Failure of Re- quiescence and Loss of the Reserve Stem Cell Pool in Elderly Muscle. *Cell reports*, v. 13, n. 6, p. 1172–1182, nov. 2015.
- BIOLO, G.; CEDERHOLM, T.; MUSCARITOLI, M. Muscle contractile and metabolic dysfunction is a common feature of sarcopenia of aging and chronic diseases: from sarcopenic obesity to cachexia. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, v. 33, n. 5, p. 737–748, out. 2014.
- BOUTAGY, N. E. *et al.* Angiotensin II receptor blockade and skeletal muscle metabolism in overweight and obese adults with elevated blood pressure. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*, v. 9, n. 2, p. 45–50, 2015. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1753944714566426>>.

BREGAGNOLLO, E.; OKOSHI, K. Efeitos da inibição prolongada da enzima de conversão da angiotensina sobre as características morfológicas e funcionais da hipertrofia ventricular esquerda. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 84, n. 3, p. 225–232, 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/%5Cr/abc/v84n3/a06v84n3.pdf>>.

BRUGTS, J. J.; SIMOONS, M. L. Genetic influences of angiotensin-converting enzyme inhibitor response: an opportunity for personalizing therapy? *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, v. 10, n. 8, p. 1001–1009, 10 ago. 2012. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/erc.12.83>>.

BUFORD, T. W. *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibitor use by older adults is associated with greater functional responses to exercise. *Journal of the American Geriatrics Society*, v. 60, n. 7, p. 1244–52, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3625953&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

BUNOUT, D. *et al.* Effects of enalapril or nifedipine on muscle strength or functional capacity in elderly subjects. A double blind trial. *JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, v. 10, n. 4, p. 587–590, 2009. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-67650486295&partnerID=40&md5=a584f312a0aee05b7a994a5584f99849>>.

BURKS, T. N. *et al.* Losartan Restores Skeletal Muscle Remodeling and Protects Against Disuse Atrophy in Sarcopenia. v. 3, n. 82, p. 82ra37, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21562229>>.

BURKS, T. N.; COHN, R. D. One size may not fit all: Anti-aging therapies and sarcopenia. *Aging*, v. 3, n. 12, p. 1142–1153, 2011.

BURNIER, M. Cardiovascular Drugs. *Critical Heart Disease in Infants and Children*, p. 904–912, 2001. Disponível em: <<http://circ.ahajournals.org/content/103/6/904.long>>.

BURNIER, M.; WAEBER, B.; BRUNNER, H. R. The advantages of angiotensin II antagonism. *Journal of hypertension. Supplement: official journal of the International Society of Hypertension*, v. 12, n. 2, p. S7-15, jul. 1994.

BURZYNSKI, S. R. Aging: Gene silencing or gene activation? *Medical Hypotheses*, v. 64, n. 1, p. 201–208, 2005.

CABELLO-VERRUGIO, C. *et al.* Renin-Angiotensin System: An Old Player with Novel Functions in Skeletal Muscle. *Medicinal Research Reviews*, v. 35, n. 3, p. 437–463, maio 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/med.21343>>.

CABELLO-VERRUGIO, C.; RIVERA, J. C.; GARCIA, D. Skeletal muscle wasting: New role of nonclassical renin-angiotensin system. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, v. 20, n. 3, p. 158–163, 2017.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; HAIBARA, A. S. Reflexos cardiovasculares e hipertensão arterial. *Rev Bras Hipertens*, v. 8, n. 1, p. 30–40, 2001.

CAREY, R. M.; SIRAGY, H. M. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocrine reviews*, v. 24, n. 3, p. 261–271, jun. 2003.

CARRIÓ, E.; SUELVES, M. DNA methylation dynamics in muscle development and disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, v. 7, n. MAR, p. 1–12, 2015.

CARTER, C. S. *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibition intervention in elderly persons: effects on body composition and physical performance. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, v. 60, n. 11, p. 1437–1446, 2005. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16339331](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16339331)>.

CARTER, C. S. *et al.* Differential effects of enalapril and losartan on body composition and indices of muscle quality in aged male Fischer 344 x Brown Norway rats. *Age*, v. 33, n. 2, p. 167–183, 2011.

CARTER, C. S. *et al.* Physical performance and longevity in aged rats. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, v. 57, n. 5, p. B193–B197, 2002.

CASARE, F. A. M. *Efeito da interação de angiotensina II e o receptor AT1 ou endotelina 3 e os receptores ETA e ETB na função e na morfologia renal de ratos*. 2015. 1-37 f. Universidade de São Paulo, 2015.

CASE, D. B. *et al.* Usefulness and limitations of saralasin, a weak competitive agonist of angiotensin II, for evaluating the renin and sodium factors in hypertensive patients. *The American Journal of Medicine*, v. 60, n. 6, p. A20, 18 maio 1976. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/0002-9343\(76\)90902-5](http://dx.doi.org/10.1016/0002-9343(76)90902-5)>.

CERNES, R.; MASHAVI, M.; ZIMLICHMAN, R. Differential clinical profile of candesartan compared to other angiotensin receptor blockers. *Vascular health and risk management*, v. 7, p. 749–759, 2011.

CESARI, M. *et al.* ACE-inhibition and physical function: results from the Trial of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition and Novel Cardiovascular Risk Factors (TRAIN) study. *Journal of the American Medical Directors Association*, v. 11, n. 1, p. 26–32, jan. 2010.

CHANDRAN, G. *et al.* Effect of the Antihypertensive Drug Enalapril on Oxidative Stress Markers and Antioxidant Enzymes in Kidney of Spontaneously Hypertensive Rat. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2014, p. 1–10, 2014. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/omcl/2014/608512/>>.

CHATTERJI, S. *et al.* Health, functioning, and disability in older adults - Present status and future implications. *The Lancet*, v. 385, n. 9967, p. 563–575, 2015. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61462-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61462-8)>.

CHIUEH, C. C.; KOPIN, I. J. Hyperresponsivity of spontaneously hypertensive rat to indirect measurement of blood pressure. *Am J Physiol.*, v. 234, n. 6, p. H690-5, 1978. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/665782>>.

CHOI, M. H. *et al.* Oxidative Stress-Mediated Skeletal Muscle Degeneration: Molecules, Mechanisms, and Therapies. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2016, 2016.

CICILIOT, S. *et al.* Muscle type and fiber type specificity in muscle wasting. *The international journal of biochemistry & cell biology*, v. 45, n. 10, p. 2191–2199, out. 2013.

CISTERNAS, F. *et al.* Angiotensin-(1-7) decreases skeletal muscle atrophy induced by angiotensin II through a Mas receptor-dependent mechanism. *Clinical science (London, England : 1979)*, v. 128, n. 5, p. 307–19, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25222828>>.

COATES, D. The angiotensin converting enzyme (ACE). *Int. J Biochem Cell Biol*, v. 35, n. 6, p. 769–773, 2003.

- CODY, R. J. *et al.* Acute myocardial and vascular responses to specific angiotensin II antagonism in the spontaneously hypertensive rat. *American Journal of Hypertension*, v. 8, n. 5, p. 500–508, 1995.
- COELHO, V. A. *et al.* Angiotensin-ii blockage, muscle strength, and exercise capacity in physically independent older adults. *Journal of Physical Therapy Science*, v. 28, n. 2, p. 547–552, 2016.
- COHN, R. D. *et al.* Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF- $\beta$ -induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states. *Nature Medicine*, v. 13, n. 2, p. 204–210, 2007.
- COZZOLI, A. *et al.* Enalapril treatment discloses an early role of angiotensin II in inflammation- and oxidative stress-related muscle damage in dystrophic mdx mice. *Pharmacological Research*, v. 64, n. 5, p. 482–492, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2011.06.002>>.
- DA SILVA, I. C. M.; RODRIGUES, B.; LACCHINI, S. Modelos de Hipertensão Experimental. In: KRIEGER, E. M. (Org.). *Hipertensão Arterial: Bases fisiopatológicas e prática clínica*. 1ª ed. São Paulo: Atheneu, 2013. p. 19–56.
- DAI, Q. *et al.* Angiotensin AT1 receptor antagonists exert anti-inflammatory effects in spontaneously hypertensive rats. *British journal of pharmacology*, v. 152, n. April, p. 1042–1048, 2007.
- DALPIAZ, P. *et al.* The chronic blockade of angiotensin I-converting enzyme eliminates the sex differences of serum cytokine levels of spontaneously hypertensive rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 46, n. 2, p. 171–177, 2013.
- DE CAVANAGH, E. M. V. *et al.* Enalapril Attenuates Oxidative Stress in Diabetic Rats. *Hypertension*, v. 38, n. 5, p. 1130–1136, 2001. Disponível em: <<http://hyper.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/hy1101.092845>>.
- DE CAVANAGH, E. M. V.; INSERRA, F.; FERDER, L. Angiotensin II blockade: A strategy to slow ageing by protecting mitochondria? *Cardiovascular Research*, v. 89, n. 1, p. 31–40, 2011.
- DE GASPARO, M. *et al.* International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacological reviews*, v. 52, n. 3, p. 415–472, set. 2000.
- DE ROSA, M. L.; CHIARIELLO, M. Candesartan improves maximal exercise capacity in hypertensives: results of a randomized placebo-controlled crossover trial. *Journal of clinical hypertension (Greenwich, Conn.)*, v. 11, n. 4, p. 192–200, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19614803>>.
- DE VRIES, N. *et al.* YIA 03-04 EPIGENETIC CHANGES AFTER ACUTE TREATMENT WITH ACUTE ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME INHIBITORS (ACEi). *Journal of Hypertension*, v. 34, p. e204–e205, set. 2016. Disponível em: <<http://insights.ovid.com/crossref?an=00004872-201609001-00571>>.
- DHALIWAL, R. *et al.* The relationship of Physical performance and Osteoporosis prevention with vitamin D in older African Americans (PODA). *Contemporary Clinical Trials*, v. 65, n. June 2017, p. 39–45, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cct.2017.11.015>>.
- DI BARI, M. *et al.* Antihypertensive medications and differences in muscle mass in older persons: The Health, Aging and Body Composition Study. *Journal of the American Geriatrics Society*, v. 52, n. 6, p. 961–966, 2004.
- DODDS, R.; SAYER, A. A. Sarcopenia. *Arquivos Brasileiros de endocrinologia e metabologia*, v. 58, n. 5, p. 464–469, 2014.

- DORE, A. *et al.* Angiotensin receptor blockade and exercise capacity in adults with systemic right ventricles: A multicenter, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Circulation*, v. 112, n. 16, p. 2411–2416, 2005.
- DOS SANTOS, C. M. *et al.* Chronic AT1 receptor blockade alters aortic nerve activity in hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, v. 31, n. 4, p. 973–977, abr. 1998.
- EDEKI, T. *et al.* Enalapril pharmacokinetics and ACE inhibition, following single and chronic oral dosing. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*, v. 32, n. 3, p. 142–146, mar. 1994.
- FENG, M. *et al.* Validation of Volume – Pressure Recording Tail-Cuff Blood Pressure Measurements. *Am J Hypertension*, v. 21, n. 12, p. 1288–1291, 2008.
- FENG, X. *et al.* Angiotensin II receptor blocker telmisartan enhances running endurance of skeletal muscle through activation of the PPAR- $\alpha$ /AMPK pathway. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 15, n. 7, p. 1572–1581, 2011.
- FERGUSON, R. K. *et al.* A specific orally active inhibitor of angiotensin-converting enzyme in man. *Lancet (London, England)*, v. 1, n. 8015, p. 775–778, abr. 1977.
- FISHER-WELLMAN, K.; BLOOMER, R. J. Acute exercise and oxidative stress: A 30 year history. *Dynamic Medicine*, v. 8, n. 1, p. 1–25, 2009.
- FISHER, A. G. *et al.* Transcriptomic and epigenetic regulation of disuse atrophy and the return to activity in skeletal muscle. *FASEB Journal*, v. 31, n. 12, p. 5268–5282, 2017.
- FONTANA, V. *et al.* Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on leptin and adiponectin levels in essential hypertension. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, v. 114, n. 6, p. 472–5, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24428812>>.
- FRITZ, M.; RINALDI, G. Blood pressure measurement with the tail-cuff method in Wistar and spontaneously hypertensive rats: Influence of adrenergic- and nitric oxide-mediated vasomotion. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 58, n. 3, p. 215–221, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vascn.2008.08.002>>.
- FYHRQUIST, F.; SAIJONMAA, O. Renin-angiotensin system revisited. *Journal of Internal Medicine*, v. 264, n. 3, p. 224–236, 2008.
- GARG, R.; YUSUF, S. Overview of randomized trials of angiotensin-converting enzyme inhibitors on mortality and morbidity in patients with heart failure. Collaborative Group on ACE Inhibitor Trials. *JAMA*, v. 273, n. 18, p. 1450–1456, maio 1995.
- GERDTS, E. *et al.* Exercise performance during losartan- or atenolol-based treatment in hypertensive patients with electrocardiographic left ventricular hypertrophy (a LIFE substudy). *Blood pressure*, v. 15, n. July, p. 220–226, 2006.
- GIACCAGLIA, V. *et al.* Interaction between angiotensin converting enzyme insertion/deletion genotype and exercise training on knee extensor strength in older individuals. *International journal of sports medicine*, v. 29, n. 1, p. 40–44, jan. 2008.
- GIOVANNINI, S. *et al.* Effects of ace-inhibition on IGF-1 and IGFBP-3 concentrations in older adults with high cardiovascular risk profile. *J Nutr Health Aging*, v. 106, n. 2, p. 457–460, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4311891/pdf/nihms-657198.pdf>>.

- GOMES, M. V. DE M.; PELOSI, G. G. Epigenetic vulnerability and the environmental influence on health. *Experimental Biology and Medicine*, v. 238, n. 8, p. 859–865, 2013.
- GOMEZ-CABRERA, M.-C. *et al.* Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. *The American journal of clinical nutrition*, v. 87, n. 1, p. 142–149, jan. 2008.
- GOMEZ-SANCHEZ, E. P. *et al.* Aldosterone synthesis in the brain contributes to Dahl salt-sensitive rat hypertension. *Experimental Physiology*, v. 95, n. 1, p. 120–130, 1 jan. 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1113/expphysiol.2009.048900>>.
- GRAY, S. L. *et al.* Statins, angiotensin-converting enzyme inhibitors, and physical performance in older women. *Journal of the American Geriatrics Society*, v. 60, n. 12, p. 2206–2214, 2012.
- GRIENGLING, K.; MURPHY, T. J.; ALEXANDER, R. W. Molecular Biology of the Renin-Angiotensin System. *Research advances series*, p. 1816–1829, 1993.
- GUHA, M. Collins English Dictionary (Reference edition)RR 2016/116 Collins English Dictionary (Reference edition) Collins Glasgow 2015 xiv + 1097 pp.ISBN 978 0 00 815048 8 £19.99. *Reference Reviews*, v. 30, n. 4, p. 20–28, maio 2016.
- GUL, M. *et al.* Effects of endurance training and acute exhaustive exercise on antioxidant defense mechanisms in rat heart. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, v. 143, n. 2, p. 239–245, 2006.
- HABOUZIT, E. *et al.* Decreased muscle ACE activity enhances functional response to endurance training in rats, without change in muscle oxidative capacity or contractile phenotype. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, v. 107, n. 1, p. 346–353, 2009.
- HAGOOD, J. S. Beyond the genome: epigenetic mechanisms in lung remodeling. *Physiology (Bethesda, Md.)*, v. 29, n. 3, p. 177–185, maio 2014.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet (London, England)*, v. 1, n. 8391, p. 1396–1397, jun. 1984.
- HAMROFF, G. *et al.* Addition of angiotensin II receptor blockade to maximal angiotensin-converting enzyme inhibition improves exercise capacity in patients with severe congestive heart failure. *Circulation*, v. 99, n. 8, p. 990–992, 1999. Disponível em: <<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=emed4&AN=1999081542%5Cnhttp://sfx.scholarsportal.info/uhn?sid=OVID:embase&id=pmid:&id=doi:&issn=0009-7322&isbn=&volume=99&issue=8&spage=990&pages=990-992&date=1999&title=Circulation&atit>>.
- HENRIKSEN, E. J.; JACOB, S. Modulation of metabolic control by angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition. *Journal of Cellular Physiology*, v. 196, n. 1, p. 171–179, 2003.
- HENRIKSEN, E. J.; PRASANNARONG, M. The role of the renin-angiotensin system in the development of insulin resistance in skeletal muscle. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 378, n. 1–2, p. 15–22, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2012.04.011>>.
- HERAN, B. S. *et al.* Blood pressure lowering efficacy of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors for primary hypertension. *The Cochrane database of systematic reviews*, n. 4, p. CD003823, out. 2008.
- HOHMANN, M. S. N. *et al.* 5-Lipoxygenase Deficiency Reduces Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity and Lethality. *BioMed Research International*, v. 2013, p. 627046, 31 out. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3832964/>>.

HUTCHEON, S. *et al.* Perindopril improves six minute walking distance in older patients with left ventricular systolic dysfunction: a randomised double blind placebo controlled trial. *Heart*, v. 88, p. 373–377, 2002a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1136/heart.88.4.373>>.

HUTCHEON, S. *et al.* Perindopril improves six minute walking distance in older patients with left ventricular systolic dysfunction: a randomised double blind placebo controlled trial. *Heart*, v. 88, p. 373–377, 2002b.

INOUE, N. *et al.* Angiotensin II-induced reduction in exercise capacity is associated with increased oxidative stress in skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, v. 302, n. 5, p. H1202–H1210, 2012. Disponível em: <<http://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpheart.00534.2011>>.

IRIGOYEN, M. C. *et al.* Sympathetic Nervous System and arterial hypertension: cardiocirculatory reflex. *Revista Brasileira de Hipertensao*, v. 12, n. 4, p. 245–250, 2005.

JOHNSTON, A. P. W. *et al.* Captopril treatment induces hyperplasia but inhibits myonuclear accretion following severe myotrauma in murine skeletal muscle. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, v. 301, n. 2, p. R363–R369, 2011.

JOHREN, O.; DENDORFER, A.; DOMINIAK, P. Cardiovascular and renal function of angiotensin II type-2 receptors. *Cardiovascular research*, v. 62, n. 3, p. 460–467, jun. 2004.

JONES, A.; MONTGOMERY, H. E.; WOODS, D. R. Human performance: a role for the ACE genotype? *Exercise and sport sciences reviews*, v. 30, n. 4, p. 184–190, out. 2002.

JONES, J. H. Resource Book for the Design of Animal Exercise Protocols. *American Journal of Veterinary Research*, v. 68, n. 6, p. 583–583, jun. 2007. Disponível em: <<http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/ajvr.68.6.583>>.

KADHIRESAN, V. A.; HASSETT, C. A.; FAULKNER, J. A. Properties of single motor units in medial gastrocnemius muscles of adult and old rats. *The Journal of Physiology*, v. 493, n. Pt 2, p. 543–552, 1 jun. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1158936/>>.

KADOGUCHI, T. *et al.* Angiotensin II can directly induce mitochondrial dysfunction, decrease oxidative fibre number and induce atrophy in mouse hindlimb skeletal muscle. *Experimental Physiology*, v. 100, n. 3, p. 312–322, mar. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22053789>>.

KEMI, O. J. *et al.* Exercise training and losartan improve endothelial function in heart failure rats by different mechanisms. *Scandinavian cardiovascular journal : SCJ*, v. 47, n. 3, p. 160–7, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23205578>>.

KHAPER, N.; SINGAL, P. K. Modulation of oxidative stress by a selective inhibition of angiotensin II type 1 receptors in MI rats. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 37, n. 5, p. 1461–1466, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097\(01\)01126-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097(01)01126-3)>.

KINUGAWA, S. *et al.* Limited exercise capacity in heterozygous manganese superoxide dismutase gene-knockout mice: Roles of superoxide anion and nitric oxide. *Circulation*, v. 111, n. 12, p. 1480–1486, 2005.

KIZILIRMAK, P. Renin-angiotensin-aldosterone system blockers and cardiovascular outcomes: A meta-analysis of randomized clinical trials. *Turk Kardiyoloji Dernegi Arsivi-Archives of the Turkish Society of Cardiology*, v. 45, n. 1, p. 49–66, 2016. Disponível em: <<http://archivestsc.com/jvi.aspx?un=TKDA-78006>>.

- KRITCHEVSKY, S. B. *et al.* Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion genotype, exercise, and physical decline. *JAMA*, v. 294, n. 6, p. 691–698, ago. 2005.
- LEFKOWITZ, R. J.; SHENOY, S. K. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science (New York, N.Y.)*, v. 308, n. 5721, p. 512–517, abr. 2005.
- LEITE, L. H. *et al.* Implications of Angiotensin II in Central Nervous System on Exercise Performance. *Curr. Protein Pept. Sci.*, n. 1875–5550 (Electronic), p. 711–720, 2013.
- LEITNER, L. M. *et al.* Reactive Oxygen Species/Nitric Oxide Mediated Inter-Organ Communication in Skeletal Muscle Wasting Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 7, p. ars.2016.6942, 2017. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/ars.2016.6942>>.
- LIN, C.-L. *et al.* Losartan Improves Measures of Activity, Inflammation, and Oxidative Stress in Older Mice. *Exp Gerontol*, v. 58, p. 174–178, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0531556514002319>>.
- LIU, J. *et al.* Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of oxidative stress and endogenous antioxidants. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, v. 89, n. 1, p. 21–28, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10904031>%5C<http://jap.physiology.org/content/89/1/21.short>>.
- LORENZ, J. N. Chymase: the other ACE? *American journal of physiology. Renal physiology*, v. 298, n. 1, p. F35–F36, 2010.
- LUCIA, A. *et al.* Is there an association between ACE and CKMM polymorphisms and cycling performance status during 3-week races? *International journal of sports medicine*, v. 26, n. 6, p. 442–447, 2005.
- LUDEN, N. *et al.* Human vastus lateralis and soleus muscles display divergent cellular contractile properties. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 295, n. 5, p. R1593–R1598, 24 nov. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2584861/>>.
- MACCONI, D. *et al.* Sirtuin3 dysfunction is the key determinant of skeletal muscle insulin resistance by angiotensin II. *PLoS ONE*, v. 10, n. 5, p. 1–17, 2015.
- MACHADO, L. P. *et al.* Lesão oxidativa eritrocitária e mecanismos antioxidantes de interesse na. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, v. 8, n. 1, p. 84–94, 2009.
- MAIDA, K. D. *et al.* Physical training associated with Enalapril but not to Losartan, results in better cardiovascular autonomic effects. *Autonomic Neuroscience*, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1566070216302740>>.
- MALACHIAS, M. V. B. *et al.* 7ª Diretriz Brasileira De Hipertensão Arterial. v. 107, p. 1–103, 2016. Disponível em: <[http://publicacoes.cardiol.br/2014/diretrizes/2016/05\\_HIPERTENSAO\\_ARTERIAL.pdf](http://publicacoes.cardiol.br/2014/diretrizes/2016/05_HIPERTENSAO_ARTERIAL.pdf)[http://publicacoes.cardiol.br/2014/diretrizes/2016/05\\_HIPERTENSAO\\_ARTERIAL.pdf](http://publicacoes.cardiol.br/2014/diretrizes/2016/05_HIPERTENSAO_ARTERIAL.pdf)>.
- MANCHADO-GOBATTO, F. D. B. *et al.* Limiar anaeróbio em corrida e natação para ratos: determinação utilizando dois métodos matemáticos. *Revista da Educação Física/UEM*, v. 21, n. 2, p. 245–253, 2010.

- MARZETTI, E. *et al.* Late-life Enalapril administration induces nitric oxide-dependent and independent metabolic adaptations in the rat skeletal muscle. *Age*, v. 35, n. 4, p. 1061–1075, 2013.
- MASON, S.; WADLEY, G. D. Skeletal muscle reactive oxygen species: a target of good cop/bad cop for exercise and disease. *Redox report : communications in free radical research*, v. 19, n. 3, p. 97–106, maio 2014.
- MATSUDA, R.; SPECTOR, D. H.; STROHMAN, R. C. Regenerating adult chicken skeletal muscle and satellite cell cultures express embryonic patterns of myosin and tropomyosin isoforms. *Developmental biology*, v. 100, n. 2, p. 478–488, dez. 1983.
- MEHTA, P. K.; GRIENGLING, K. K. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *American journal of physiology. Cell physiology*, v. 292, n. 1, p. C82-97, jan. 2007.
- 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.
- MENG, W. *et al.* Autocrine and paracrine function of angiotensin 1-7 in tissue repair during hypertension. *American Journal of Hypertension*, v. 27, n. 6, p. 775–782, 2014.
- MICHELINI, L. C.; BONAGAMBA, L. G. Angiotensin II as a modulator of baroreceptor reflexes in the brainstem of conscious rats. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, v. 15, n. 2 Suppl, p. I45-50, fev. 1990.
- MICHELINI, L. C.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. Controle Central da Pressão Arterial: Barorreflexo. In: KRIEGER, E. M. (Org.). *Hipertensão Arterial: Bases fisiopatológicas e prática clínica*. 1ª ed. São Paulo: Atheneu, 2013. p. 89–113.
- MICHELINI, L. C.; DE OLIVEIRA, M.; DOS SANTOS, M. Baroreceptor reflex control of heart rate during development of coarctation hypertension. *Hypertension*, v. 19 Suppl., p. II159-II163, 1992.
- MINAMI, N. *et al.* Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor and exercise training on exercise capacity and skeletal muscle. *Journal of Hypertension*, v. 25, n. 6, p. 1241–1248, jun. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20374181>>.
- MIURA, S.; SAKU, K. Recent progress in the treatment of cardiovascular disease using olmesartan. *Clinical and Experimental Hypertension*, v. 36, n. 7, p. 441–446, 1 nov. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.3109/10641963.2013.846363>>.
- MONGEAU, J. G. Heredity and blood pressure in humans: an overview. *Pediatric Nephrology*, v. 1, n. 1, p. 69–75, 1987.
- MONTGOMERY, H. E. *et al.* Human gene for physical performance. *Nature*. England: [s.n.], maio 1998
- MOORS, C. C. M. *et al.* The effects of long-term valsartan treatment on skeletal muscle fatty acid handling in humans with impaired glucose metabolism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 98, n. 5, p. 891–896, 2013.
- MOREAU, N. *et al.* [Interaction between SR 47436, a new angiotensin II antagonist and sympathetic nervous system in pithed SHR rats]. *Arch Mal Coeur Vaiss*, v. 86, n. 8, p. 1269–1274, 1993. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8129542>>.

MORITANI, T.; ODDSSON, L.; THORSTENSSON, A. Activation patterns of the soleus and gastrocnemius muscles during different motor tasks. *Journal of Electromyography and Kinesiology*, v. 1, n. 2, p. 81–88, 1991.

MUNAFO, A *et al.* Drug concentration response relationships in normal volunteers after oral administration of losartan, an angiotensin II receptor antagonist. *Clinical pharmacology and therapeutics*, v. 51, n. 5, p. 513–521, 1992.

MURACH, K. *et al.* Single muscle fiber gene expression with run taper. *PloS one*, v. 9, n. 9, p. e108547, 2014.

NASUTION, S. A. The use of ACE inhibitor in cardiovascular disease. *Acta medica Indonesiana*, v. 38, n. 1, p. 60–64, 2006.

NEGRAO, C. E. *et al.* Carnitine supplementation and depletion: tissue carnitines and enzymes in fatty acid oxidation. *J. Appl. Physiol.*, v. 631852, p. 315–321, 1987.

NGUYEN DINH CAT, A.; TOUYZ, R. M. A new look at the renin-angiotensin system - Focusing on the vascular system. *Peptides*, v. 32, n. 10, p. 2141–2150, 2011.

NITERT, M. D. *et al.* Impact of an exercise intervention on DNA methylation in skeletal muscle from first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Diabetes*, v. 61, n. 12, p. 3322–3332, 2012.

OGAWA, S. *et al.* Angiotensin II type 1 receptor blockers reduce urinary oxidative stress markers in hypertensive diabetic nephropathy. *Hypertension*, v. 47, n. 4, p. 699–705, 2006.

OLIVARES-REYES, J. A.; ARELLANO-PLANCARTE, A.; CASTILLO-HERNANDEZ, J. R. Angiotensin II and the development of insulin resistance: implications for diabetes. *Molecular and cellular endocrinology*, v. 302, n. 2, p. 128–139, abr. 2009.

OLIVEIRA, C. S. D. E.; ORIENTADORA, M.; CO-ORIENTADOR, S. L. Efeito da exposição intermitente à angiotensina II em doses não pressoras sobre a liberação cardíaca de TGF  $\beta$  e IL-6 em camundongos. 2015.

ONDER, G. *et al.* Relation between use of angiotensin-converting enzyme inhibitors and muscle strength and physical function in older women: An observational study. *Lancet*, v. 359, n. 9310, p. 926–930, 2002.

ONDERA, G.; VEDOVA, C.; PAHORC, M. Effects of ACE Inhibitors on Skeletal Muscle. *Current Pharmaceutical Design*, v. 12, n. 16, p. 2057–2064, 2006. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33744721759&partnerID=tZOtx3y1>>.

OPARIL, S.; SCHMIEDER, R. E. New Approaches in the Treatment of Hypertension. *Circulation Research*, v. 116, n. 6, p. 1074–1095, 2015.

ORGANIZATION, W. H. Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health. *World Health Organization*, v. 2002, n. May, 2010. Disponível em: <<http://www.everywomaneverychild.org/global-strategy-2>>.

OSHEROVICH, B. L.; WRITER, S. New muscle for {ARB} strategy. *{SciBX:} {Science-Business} {eXchange}*, v. 4, n. 21, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/scibx.2011.587>>.

PAUL, M. *et al.* Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev.*, v. 86, n. 3, p. 747–803, 2006.

PEART, W. S. Evolution of renin. *Hypertension*, v. 18, n. 5 Suppl, p. III100, 1 nov. 1991. Disponível em: <[http://hyper.ahajournals.org/content/18/5\\_Suppl/III100.abstract](http://hyper.ahajournals.org/content/18/5_Suppl/III100.abstract)>.

PORTELA, A.; ESTELLER, M. Epigenetic modifications and human disease. *Nature biotechnology*, v. 28, n. 10, p. 1057–1068, out. 2010.

POTENZA, M. A. *et al.* Treatment of spontaneously hypertensive rats with rosiglitazone and/or enalapril restores balance between vasodilator and vasoconstrictor actions of insulin with simultaneous improvement in hypertension and insulin resistance. *Diabetes*, v. 55, n. 12, p. 3594–3603, 2006.

PUIG-VILANOVA, E. *et al.* Quadriceps muscle weakness and atrophy are associated with a differential epigenetic profile in advanced COPD. *Clinical science (London, England : 1979)*, v. 128, n. 12, p. 905–921, jun. 2015.

PUTHUCHEARY, Z. *et al.* The ACE gene and human performance: 12 years on. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, v. 41, n. 6, p. 433–448, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21615186>>.

RALEIGH, S. M. Epigenetic regulation of the ACE gene might be more relevant to endurance physiology than the I/D polymorphism. *Journal of Applied Physiology*, v. 112, n. 6, p. 1082–1083, 2012. Disponível em: <<http://jap.physiology.org/cgi/doi/10.1152/jappphysiol.00828.2011>>.

RAMALHO, F. S.; PROMETHEU, D. A regeneração hepática e os inibidores da enzima conversora de angiotensina. *Acta Cirurgica Brasileira*, v. 15, 2000.

RAUTUREAU, Y.; SCHIFFRIN, E. L. Endothelin in hypertension: An update. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, v. 21, n. 2, p. 128–136, 2012.

RECKELHOFF, J. F.; ZHANG, H.; SRIVASTAVA, K. Gender Differences in Development of Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats Role of the Renin-Angiotensin System. *Hypertension*, v. 35, n. part 2, p. 480–483, 2000.

REGULSKI, M. *et al.* Chemistry and pharmacology of Angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Current pharmaceutical design*, v. 21, n. 13, p. 1764–75, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25388457>>.

RIBEIRO, A. B. Efeito dos bloqueadores dos receptores AT 1 da angiotensina II ( BRAs ) decorrente das suas estruturas moleculares : relevância clínica no tratamento da hipertensão arterial ? *Revista Brasileira de Hipertensão*, v. 14, n. 3, p. 182–184, 2007.

ROCK, C. L.; JACOB, R. A.; BOWEN, P. E. Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. *Journal of the American Dietetic Association*, v. 96, n. 7, p. 693–694, jul. 1996.

RODRIGUEZ-CRUZ, M. *et al.* Evidence of Insulin Resistance and Other Metabolic Alterations in Boys with Duchenne or Becker Muscular Dystrophy. *International journal of endocrinology*, v. 2015, p. 867273, 2015.

ROUYER, O. *et al.* Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on skeletal muscle oxidative function and exercise capacity in streptozotocin-induced diabetic rats. *The Physiological Society*, v. 92, n. 6, p. 1047–1056, 2007.

RUSSELL, S. T.; SANDERS, P. M.; TISDALE, M. J. Angiotensin II directly inhibits protein synthesis in murine myotubes. v. 231, p. 290–294, 2006.

- RYAN, U. N. A. S. *et al.* LOCALIZATION OF ANGIOTENSIN CONVERTING AND IMMUNOFLOUORESCENCE. *Tissue & Cell*, v. 8, n. 1, p. 125–145, 1976.
- SAAVEDRA, J. M. Brain angiotensin II: New developments, unanswered questions and therapeutic opportunities. *Cellular and Molecular Neurobiology*, v. 25, n. 3–4, p. 485–512, 2005.
- SALARIAN, A. *et al.* ITUG, a sensitive and reliable measure of mobility. *IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering*, v. 18, n. 3, p. 303–310, 2010.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SANCHEZ, B. *et al.* Differentiation of the intracellular structure of slow- versus fast-twitch muscle fibers through evaluation of the dielectric properties of tissue. *Physics in Medicine and Biology*, v. 59, n. 10, p. 2369–2380, 21 maio 2014. Disponível em: <<http://stacks.iop.org/0031-9155/59/i=10/a=2369?key=crossref.80b5c66d00f22c73fc9eaeae62523615>>.
- SANTOS, D. C. DOS. *Análise da Função Respiratória de idosos fisicamente independentes usuários de inibidores da enzima conversora de angiotensina*. 2012. 84 f. Northen Parana University, 2012.
- SANTOS, E. L. *et al.* Effect of angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril on body weight and composition in young rats. *International Immunopharmacology*, v. 8, n. 2, p. 247–253, 2008.
- SANTOS, E. L. *et al.* Long term treatment with ACE inhibitor enalapril decreases body weight gain and increases life span in rats. *Biochemical Pharmacology*, v. 78, n. 8, p. 951–958, 2009.
- SARIKONDA, K. V *et al.* Experimental animal models of hypertension. *Journal of the American Society of Hypertension*, v. 3, n. 3, p. 158–165, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jash.2009.02.003>>.
- SARTIANI, L. *et al.* Pharmacological perspectives in sarcopenia: A potential role for renin-angiotensin system blockers? *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, v. 12, n. 2, p. 135–138, 2015.
- SAYER, A. A. *et al.* New horizons in the pathogenesis, diagnosis and management of sarcopenia. *Age and ageing*, v. 42, n. 2, p. 145–150, 2013.
- SCHIAFFINO, S. *et al.* Developmental myosins: expression patterns and functional significance. *Skeletal Muscle*, v. 5, n. 1, p. 22, jul. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13395-015-0046-6>>.
- SCHINDLER, C. *et al.* Role of the vasodilator peptide angiotensin-(1-7) in cardiovascular drug therapy. *Vascular health and risk management*, v. 3, n. 1, p. 125–37, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17583183>>.
- SCHULZ, W. W. *et al.* Ultrastructural localization of angiotensin I-converting enzyme (EC 3.4.15.1) and neutral metalloendopeptidase (EC 3.4.24.11) in the proximal tubule of the human kidney. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, v. 59, n. 6, p. 789–797, dez. 1988.
- SEMPRUN-PRIETO, L. C. *et al.* Angiotensin II induced catabolic effect and muscle atrophy are redox dependent. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 409, n. 2, p. 217–221, 3 jun. 2011. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/1351000213Y.0000000077>>.

SHARMA, J. N. Hypertension and the bradykinin system. *Current Hypertension Reports*, v. 11, n. 3, p. 178–181, 2009.

SHEN, C. *et al.* Angiotensin-II-induced Muscle Wasting is Mediated by 25-Hydroxycholesterol via GSK3 $\beta$  Signaling Pathway. *EBioMedicine*, v. 16, p. 238–250, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.01.040>>.

SHI, Y. *et al.* Angiotensin-(1–7) prevents systemic hypertension, attenuates oxidative stress and tubulointerstitial fibrosis, and normalizes renal angiotensin-converting enzyme 2 and Mas receptor expression in diabetic mice. *Clinical Science*, v. 128, p. 649–663, 2015.

SHRIKRISHNA, D. *et al.* A randomized controlled trial of angiotensin-converting enzyme inhibition for skeletal muscle dysfunction in COPD. *Chest*, v. 146, n. 4, p. 932–940, 2014.

SIMÕES E SILVA, A. C.; FLYNN, J. T. The renin-angiotensin-aldosterone system in 2011: Role in hypertension and chronic kidney disease. *Pediatric Nephrology*, v. 27, n. 10, p. 1835–1845, 2012.

SIMON, C. B. *et al.* The renin-angiotensin system and prevention of age-related functional decline: where are we now? *Age (Dordrecht, Netherlands)*, v. 37, n. 1, p. 9753, 2015.

SIRAGY, H. M. The potential role of the angiotensin subtype 2 receptor in cardiovascular protection. *Current Hypertension Reports*, v. 11, n. 4, p. 260–262, 2009.

SKRBIC, R.; IGIC, R. Peptides Seven decades of angiotensin ( 1939 – 2009 ). *Peptides*, v. 30, p. 1945–1950, 2009.

SONG, Y. *et al.* Muscle-specific expression of IGF-1 blocks angiotensin II – induced skeletal muscle wasting Find the latest version : Muscle-specific expression of IGF-1 blocks angiotensin II – induced skeletal muscle wasting. v. 115, n. 2, p. 451–458, 2005.

SPIRA, D. *et al.* Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors and Parameters of Sarcopenia: Relation to Muscle Mass, Strength and Function: Data from the Berlin Aging Study-II (BASE-II). *Drugs & Aging*, v. 33, n. 11, p. 829–837, 24 nov. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s40266-016-0396-8>>. Acesso em: 25 nov. 2016.

STIER, C. T. J. *et al.* Stroke prevention by losartan in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens Suppl*, v. 11, n. 3, p. S37-42, 1993. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8315518>>.

STUDENSKI, S. *et al.* Gait speed and survival in older adults. *JAMA*, 10.1001/jama.2010.1923, v. 305, n. 1, p. 50–58, 5 jan. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1001/jama.2010.1923>>.

STUDENSKI, S. *et al.* Physical performance measures in the clinical setting. *Journal of the American Geriatrics Society*, v. 51, n. 3, p. 314–322, 2003.

SUMUKADAS, D. *et al.* Do ACE inhibitors improve the response to exercise training in functionally impaired older adults? A randomized controlled trial. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, v. 69, n. 6, p. 736–43, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4022094&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

SUMUKADAS, D. *et al.* Effect of perindopril on physical function in elderly people with functional impairment: a randomized controlled trial. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*, v. 177, n. 8, p. 867–74, 2007. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-35349021592&partnerID=tZ0tx3y1>>.

- SUN, Y. *et al.* Attenuated oxidative stress following acute exhaustive swimming exercise was accompanied with modified gene expression profiles of apoptosis in the skeletal muscle of mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2016, 2016.
- TADDEI, S. *et al.* Effects of antihypertensive drugs on endothelial dysfunction: clinical implications. *Drugs*, v. 62, n. 2, p. 265–284, 2002.
- TAGUCHI, T. *et al.* Involvement of bradykinin in acute exercise-induced increase of glucose uptake and GLUT-4 translocation in skeletal muscle: Studies in normal and diabetic humans and rats. *Metabolism: Clinical and Experimental*, v. 49, n. 7, p. 920–930, 2000.
- TAKADA, S. *et al.* Angiotensin II receptor blocker improves the lowered exercise capacity and impaired mitochondrial function of the skeletal muscle in type 2 diabetic mice. *Journal of Applied Physiology*, v. 114, n. 7, p. 844–857, abr. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25561011>>.
- TAKAGI, H. *et al.* Effects of telmisartan therapy on interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha levels: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Hypertension Research*, v. 36, n. 4, p. 368–373, 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/hr.2012.196>>.
- THOMAS, W. G.; MENDELSON, F. A. O. Molecules in focus Angiotensin receptors : form and function and distribution &. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 35, p. 774–779, 2003.
- THOMPSON, R. F. *et al.* Tissue-specific dysregulation of DNA methylation in aging. *Aging cell*, v. 9, n. 4, p. 506–518, ago. 2010.
- TOFFOLI, L. V *et al.* Maternal exposure to fluoxetine during gestation and lactation affects the DNA methylation programming of rat's offspring: Modulation by folic acid supplementation. *Behavioural Brain Research*, v. 265, p. 142–147, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166432814001065>>.
- TOUYZ, R. M. *et al.* Expression of a functionally active gp91phox-containing neutrophil-type NAD(P)H oxidase in smooth muscle cells from human resistance arteries: regulation by angiotensin II. *Circulation research*, v. 90, n. 11, p. 1205–1213, jun. 2002.
- TRAPPE, S. *et al.* Skeletal muscle signature of a champion sprint runner. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, v. 118, n. 12, p. 1460–1466, jun. 2015.
- TRIPPODO, N. C.; FROHLICH, E. D. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension. Man and rat. *Circulation research*, v. 48, n. 3, p. 309–319, mar. 1981.
- TROMBETTI, A. *et al.* Age-associated declines in muscle mass, strength, power, and physical performance: impact on fear of falling and quality of life. *Osteoporos Int.*, v. 27, n. 2, p. 463–471, 2016.
- TUORTO, F. *et al.* RNA cytosine methylation by Dnmt2 and NSun2 promotes tRNA stability and protein synthesis. *Nature structural & molecular biology*, v. 19, n. 9, p. 900–905, set. 2012.
- VAN LUMMEL, R. C. *et al.* Physical Performance and Physical Activity in Older Adults: Associated but Separate Domains of Physical Function in Old Age. *Plos One*, v. 10, n. 12, p. e0144048, 2015. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0144048>>.
- VARLEY, K. E. *et al.* Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues. *Genome research*, v. 23, n. 3, p. 555–567, mar. 2013.

- VESCOVO, G. *et al.* Improved exercise tolerance after losartan and enalapril in heart failure: Correlation with changes in skeletal muscle myosin heavy chain composition. *Circulation*, v. 98, n. 17, p. 1742–1749, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9788828>>.
- WANG, P.; FEDORUK, M. N.; RUPERT, J. L. Keeping pace with ACE: are ACE inhibitors and angiotensin II type 1 receptor antagonists potential doping agents? *Sports Medicine*, v. 38, n. 12, p. 1065–1079, 2008.
- WARNER, J. G. *et al.* Losartan improves exercise tolerance in patients with diastolic dysfunction and a hypertensive response to exercise. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 33, n. 6, p. 1567–1572, 1999. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097\(99\)00048-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0735-1097(99)00048-0)>.
- WEBER, M. A. *et al.* Blood pressure effects of the angiotensin II receptor blocker, Losartan. *JAMA*, v. 155, n. 4, p. 405–411, 1995. Disponível em: <<http://jamanetwork.com/journals/jamainternalmedicine/article-abstract/620095>>.
- WEI, Y. *et al.* Angiotensin II-induced skeletal muscle insulin resistance mediated by NF- $\kappa$ B activation via NADPH oxidase. *Culture*, v. 85724, p. 345–351, 2008.
- WESTERKAMP, C. M. *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates myonuclear addition in overloaded slow-twitch skeletal muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 289, p. 1223–1231, 2005.
- WIBERG, R. *et al.* Investigation of the expression of myogenic transcription factors, microRNAs and muscle-specific E3 ubiquitin ligases in the medial gastrocnemius and soleus muscles following peripheral nerve injury. *PLoS ONE*, v. 10, n. 12, p. 1–20, 2015.
- WILLIAMS, A. G. *et al.* The ACE gene and muscle performance. *Nature*, v. 403, n. 6770, p. 614, fev. 2000.
- YABUMOTO, C. *et al.* Angiotensin II receptor blockade promotes repair of skeletal muscle through down-regulation of aging-promoting C1q expression. *Scientific Reports*, v. 5, n. June, p. 1–15, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep14453>>.
- YOSHIDA, T. *et al.* Molecular mechanisms and signaling pathways of angiotensin II-induced muscle wasting: Potential therapeutic targets for cardiac cachexia. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 45, n. 10, p. 2322–2332, out. 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272513001799>>.
- ZANKL, A. R. *et al.* Telmisartan improves absolute walking distance and endothelial function in patients with peripheral artery disease. *Clinical Research in Cardiology*, v. 99, n. 12, p. 787–794, 2010.
- ZHANG, B. *et al.* The I allele of the angiotensin-converting enzyme gene is associated with an increased percentage of slow-twitch type I fibers in human skeletal muscle. *Clinical genetics*, v. 63, n. 2, p. 139–144, fev. 2003.
- ZHANG, Y. H. *et al.* ACE2 activity was increased in atherosclerotic plaque by losartan: Possible relation to anti-atherosclerosis. *JRAAS - Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, v. 16, n. 2, p. 292–300, 2015.
- ZHOU, L. *et al.* Effect of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors on Physical Function in Elderly Subjects: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Drugs & aging*, v. 32, n. 9, p. 727–35, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26286094>>.

ZI, M.; CARMICHAEL, N.; LYE, M. The effect of quinapril on functional status of elderly patients with diastolic heart failure. *Cardiovascular drugs and therapy*, v. 17, n. 2, p. 133–139, mar. 2003.

ZYKOVICH, A. *et al.* Genome-wide DNA methylation changes with age in disease-free human skeletal muscle. *Aging cell*, v. 13, n. 2, p. 360–366, abr. 2014.

**ANEXOS**

## ANEXO A

## Ofício de aprovação do projeto de tese pelo CEUA



Universidade  
Estadual de Londrina

## COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 107/2015

Londrina, 19 de Junho de 2015.

Prezada Pesquisadora,

A CEUA/UEL reunida em 10 de Março de 2015 avaliou o projeto de pesquisa intitulado “**Efeito de drogas com ação no sistema renina-angiotensina no desempenho físico de ratos hipertensos**”, registrado sob o processo CEUA nº 30987.2014.73, pesquisa do Centro de Ciências Biológicas, desenvolvido sob sua responsabilidade. Esclarecidos os aspectos metodológicos solicitados, o projeto está **aprovado** para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 90 ratos SHR machos, com 60 dias de idade e provenientes do Biotério Central de ratos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. O projeto tem como objetivo avaliar os efeitos agudos ou crônicos do tratamento farmacológico com IECA ou BRA em parâmetros físicos e autonômicos de ratos hipertensos. Para tanto, os animais serão divididos em 3 grupos experimentais: Grupo Controle (GC), o qual receberá somente água de torneira; Grupo de animais submetidos ao tratamento com o IECA enalapril (10mg/kg/dia); Grupo de animais submetidos ao tratamento com o bloqueador do receptor AT1 losartan (10mg/kg/dia). Os tratamentos ocorrerão via gavagem durante 28 dias consecutivos, tendo seu início 24 horas após o primeiro teste de esforço máximo. Os animais serão submetidos ao exercício físico na esteira para ratos roedores precedido de atividade de adaptação à esteira para quantificação do trabalho externo realizado pelo rato e o controle da intensidade e duração do exercício para posteriormente serem submetidos ao teste de esforço para avaliação do desempenho físico e da capacidade aeróbica máxima dos animais e serão analisados parâmetros cardiovasculares e analisado a composição corporal. Os protocolos experimentais estão aprovados com previsão para execução em 36 meses.

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,

Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verrri Junior  
Coordenador da CEUA/UEL

Ilma. Sra.

Prof. Dra. Gislaine Garcia Pelosi Gomes

Coordenadora do Projeto

Departamento de Ciências Fisiológicas

Centro de Ciências Biológicas

Com cópia para Sra. Edilamar dos Anjos (Chefe da DCA/PROPPG), Chefe do Departamento de Ciências Fisiológicas e Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas.

## ANEXO B

## Certificado de saúde dos animais



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Instituto de Ciências Biomédicas**  
**Departamento de Fisiologia e Biofísica**  
**Laboratório de Fisiologia Cardiovascular**  
Av: Prof. Lineu Prestes, 1524 – sala 103, SP – Cep: 05508-000  
Fone: (11) 3091-7244 / Fax: (11) 3091-7213

---

São Paulo, 21 de outubro de 2014

**CERTIFICADO DE SAÚDE**

---

Eu, Alexandre Ceroni, Médico Veterinário registrado no Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de São Paulo, Brasil sob o número 10.592, atesto que os animais que acompanham este certificado 40 *Rattus norvegicus* (sendo da linhagem SHR), animais criados e mantidos no Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Não se originaram de estabelecimentos onde fossem realizados trabalhos com agentes exóticos de doenças que afetam animais domésticos ou aves domésticas. São animais livres de patógenos, não portadores de nenhuma doença infecto-contagiosa e não foram inoculados com quaisquer agentes biológicos e/ou químicos. Não oferecem, portanto, nenhum risco àqueles que os manipulem e/ou transportem.

---

**Alexandre Ceroni, PhD**  
Nefrologia EPM - UNIFESP  
Médico Veterinário  
CRMV-SP 10592

---

Alexandre Ceroni, Ph D  
Médico Veterinário  
Tel: (11) 3091.7244  
ceroni@icb.usp.br



## ANEXO D

## Certificado de Análise de Qualidade – Enalapril



## CERTIFICADO DE ANÁLISE MAGISTTRAL

Produto: Enalapril Maleato	Nº de Análise: 0442/2012
Sinonímia em inglês: Enalapril Maleate	Procedência: Nacionalizado
Lote: AEN03121F2	Lote Fabricante: 904/44/344004
Data Fab: 04/10/2011	Data Val: 04/09/2015
DCB nº: 03370	CAS nº: 76095-16-4

Fórmula Molecular:  $C_{20}H_{28}N_2O_5 \cdot C_4H_6O_4$  Peso Molecular: 492,52  
 Densidade aparente (Informativo): 0,542g/mL


Testes	Método	Unidade	Min.	Max.	Resultados
*Aspecto (características)	FB 5ª ed.	N/A	Pó cristalino branco ou quase branco.		Pó cristalino quase branco.
Identificação *A) IR B) HPLC	TPQL IHS	N/A	Positivo Positivo		Positivo Positivo
*Solubilidade em água	FB 5ª ed.	N/A	Ligeiramente solúvel		Ligeiramente solúvel
*Solubilidade em metanol	FB 5ª ed.	N/A	Facilmente solúvel		Facilmente solúvel
*Solubilidade em soluções diluídas de hidróxidos alcalinos	FB 5ª ed.	N/A	Solúvel		Solúvel
Solubilidade em diclorometano	IHS	N/A	Praticamente insolúvel		Praticamente insolúvel
*Faixa de fusão	FB 5ª ed.	°C	143,00	145,00	144,00
*Poder rotatório	TPQL	°	-41,00	-43,50	-41,65
*pH (solução 1%)	FB 5ª ed.	N/A	2,40	2,90	2,88
Substâncias relacionadas A) Impureza (RRT= 1,10) B) Outra impureza C) Total de impurezas	IHS	%	-	1,00 0,30 2,00	N/D 0,15 0,30
Metais pesados	IHS	%	-	0,001	<0,001
*Perda por dessecação	FB 5ª ed.	%	-	1,00	0,27
*Cinzas sulfatadas	FB 5ª ed.	%	-	0,20	0,06
*Teor (base anidra)	TPQL	%	98,00	102,00	98,55

N/A = Não Aplicável IHS = In House Specification TPQL = Third Part Quality Laboratory  
 Legenda de Referência: FB (Farmacopéia Brasileira) / USP (United States Pharmacopéia) / EP (European Pharmacopéia) / BP (British Pharmacopéia) / JP (Japanese Pharmacopéia) / MG (Método Geral Farmacopéico) / Fabricante (Especificação e Metodologia conforme o fabricante do insumo) / Informativo (Resultado fornecido como informativo pelo LCQ)

**Armazenamento:** Armazenar em recipiente hermeticamente fechado à temperatura ambiente. Proteger da luz, calor e umidade.

**Conclusão:** O material foi confirmado de acordo com procedimentos de análises atuais e os resultados estão dentro das especificações. O material está de acordo com a qualidade requerida.

(\*) Os ensaios assinalados foram confirmados no Laboratório de Controle de Qualidade ATTIVOS MAGISTTRAIS.

  
 Resultado: ( X ) Aprovado  
 Luciene Rodrigues Silveira  
 Farmacêutica Responsável  
 CRF-GO 7625

( ) Reprovado  
  
 Lenise Ferreira de Magalhães  
 Coordenadora do Controle de Qualidade

Anápolis, 23 de Abril de 2012.

## ANEXO E

## Certificado de Análise de Qualidade – Losartan



## CERTIFICADO DE ANÁLISES DO CONTROLE DE QUALIDADE

Autorização de Funcionamento M.S.: 1.01284-7  
Aut. Especial de Funcionamento M.S.: 1.20182-2

Página 14/22  
Impressão 30/05/14 11:36  
NF. 002.437 de 30/06/2014

Insumo: **LOSARTAN POTÁSSICO**

Lote : 14031689A Origem : Índia Fabric : 31/12/2013  
Lote Fab: LTP/1312011 Procedência : Índia Validade : 01/11/2017  
Formula : C22 H22 Cl K N6 O PM : 461,00 Frac : 310014 24/04/2014  
DCB : 05432 DCI : 6913 CAS : 124750-99-8

Categoria Terapêutica : **ANTIHIPERTENSIVO**


Ensaio	Especificação	Resultado	Referencia
* DESCRIÇÃO	PÓ BRANCO A QUASE BRANCO	PÓ QUASE BRANCO	USP - 36
* IDENTIFICAÇÃO	IV - O ESPECTRO DA AMOSRA ESTÁ DE ACORDO COM O PADRÃO	POSITIVO	USP - 36
* IDENTIFICAÇÃO	UV - O ESPECTRO DA AMOSTRA DA AMOSTRA É SIMILAR AO DO PADRÃO	POSITIVO	USP - 36
* IDENTIFICAÇÃO	POSITIVO PARA POTASSIO	POSITIVO	USP - 36
* SOLUBILIDADE	FACILMENTE SOLÚVEL EM ÁGUA	CONFORME	USP - 36
* SOLUBILIDADE	LIGEIRAMENTE SOLÚVEL EM ALCOOL ISOPROPÍLICO	CONFORME	USP - 36
* SOLUBILIDADE	POUCO SOLÚVEL EM ACETONITRILA	CONFORME	USP - 36
* UMIDADE	MÁXIMO: 0,5%	0,39%	USP - 36
* METAIS PESADOS	MÁXIMO: 10 ppm	< 10 ppm	USP - 36
* PUREZA CROMATOGRÁFICA	IMPUREZA INDIVIDUAL MÁXIMO 0,2%	0,170%	USP - 36
* PUREZA CROMATOGRÁFICA	TOTAL DE IMPUREZAS MÁXIMO 0,5%	0,170%	USP - 36
* DOSEAMENTO	98,5 - 101,0% (BASE ANIDRA E LIVRE DE SOLVENTES)	98,91%	USP - 36
* SOLVENTES RESIDUAIS	ACETATO DE ETILA: MÁXIMO 1000 ppm	278,68 ppm	USP - 36
* SOLVENTES RESIDUAIS	METANOL: MÁXIMO 500 ppm	NÃO DETECTADO	USP - 36
* SOLVENTES RESIDUAIS	TOLUENO: MÁXIMO 100 ppm	85,88 ppm	USP - 36
* SOLVENTES RESIDUAIS	TRÍETILAMINA: MÁXIMO 100 ppm	NÃO DETECTADO	USP - 36
* SOLVENTES RESIDUAIS	METIL ISOBUTIL CETONA: MÁXIMO 500 ppm	NÃO DETECTADO	USP - 36
* SOLVENTES RESIDUAIS	ISOPROPANOL: MÁXIMO 5000 ppm	NÃO DETECTADO	USP - 36
* SOLVENTES RESIDUAIS	CLOROFORMIO: MÁXIMO 60 ppm	NÃO DETECTADO	USP - 36
* DENSIDADE	APARENTE: INFORMATIVO (SEM COMPACTAÇÃO)	0,46 g/mL	MÉT. GERAL FB V

NOMENCLATURA : LOSARTAN POTÁSSICO

## Ficha de Segurança

SEGURANÇA : ACONDICIONAR EM RECIPIENTES HERMÉTICOS, AO ABRIGO DO CALOR E UMIDADE

ORS (\*) Os ensaios assinalados foram realizados no Laboratório de Controle de Qualidade SM Empreendimentos Farmacêuticos LTDA CNPJ: 44.015.477/0006-20 e os demais ensaios foram transcritos conforme o Certificado de Análise do Fabricante.

  
Dra. Shirlei Conti Teruya de Sales  
Farmacêutica Responsável Técnica  
CRF-SP 65.711

SM EMPREENDIMENTOS FARMACEUTICOS LTDA

Rua Jurupari, 775/779/803  
Cep 04348-070

Jd. Oriental  
São Paulo - SP

Fone 11 5033-3700  
www.fagron.com.br