UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA E ESPORTE

Stéphano Freitas Soares Melo

Seleção de microRNA e Proteína Alvo Envolvidos com a
Função Cardíaca de Ratos Infartados em Resposta ao
Treinamento Aeróbico

SÃO PAULO
2014

STÉPHANO FREITAS SOARES MELO

Seleção de microRNA e Proteína Alvo Envolvidos com a
Função Cardíaca de Ratos Infartados em Resposta ao
Treinamento Aeróbico

VERSÃO CORRIGIDA

(O original se encontra disponível na biblioteca da EEFÉ)

Tese Apresentada à Escola de
Educação Física e Esporte da
Universidade de São Paulo, como
requisito parcial para obtenção do
grau de Doutor em Educação Física.

Área de Concetração: Biodinâmica do
Movimento Humano.

Orientador: Professora Dra. Edilamar
Menezes de Oliveira

SÃO PAULO

2014

Melo, Stéphano Freitas Soares

Seleção de microRNA e proteína alvo envolvidos com função cardíaca de ratos infartados em resposta ao treinamento aeróbico / Stéphano Freitas Soares de Melo. – São Paulo : [s.n.], 2014. 111p.

Tese (Doutorado) - Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo.

Orientadora: Profa. Dra. Edilamar Menezes de Oliveira

1. Bioquímica 2. Treinamento físico I. Título.

AGRADECIMENTOS

Meu maior agradecimento é à Deus que me deu uma grande oportunidade de estar realizando o sonho de cursar o Doutorado na Universidade de São Paulo e poder estar vivendo com saúde. Com fé em Deus tudo tem se tornado muito mais fácil. MUITO OBRIGADO....

Agradeço aos meus pais Maria do céu e José e minha irmã Ludmila que estiveram do meu lado, durante todo este tempo e que mesmo longe sempre conseguiram dar apoio e AMOR.

Agradeço à Priscila Ferro Ferraz que preencheu minha vida de alegria e felicidade. Amo muito você....

Sou muito grato a professora Edilamar pela oportunidade que me deu de ser seu aluno de Doutorado. Obrigado pela paciência, ensinamentos, motivação e toda ajuda que sempre recebi. Obrigado por tudo.

Agradeço a professora Taís Tinucci com quem muito apreendi.

Agradeço a valiosa ajuda e apoio dos alunos do laboratório de bioquímica da atividade motora e biologia molecular do exercício Tiago Fernandes, Clara Nóbrega, Vander, Ursula Soci e Cléber René e Natan Silva que muito me ajudaram para realização de todas as etapas do Doutorado.

Agradeço aos funcionários Glória Fátima Motta, Katt Mattos, Marcele Coelho, Luciano Lopes, da EEFE que com o valioso trabalho tornaram tudo isso possível.

Aos professores e funcionários da Universidade Federal de Viçosa em especial ao professor Antonio José Natali com quem muito aprendi e que sempre tive bons exemplos.

Ao professor Paulo Roberto Santos Amorim meu primeiro orientador com quem dei meus primeiros passos e me fez despertar para a vida acadêmica, eternamente grato....

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À Escola de Educação Física e Esporte

À Universidade de São Paulo

Obrigado.....

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE SIGLAS, ABREVIações E SÍMBOLOS.....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 Infarto do Miocárdio.....	4
2.2 Modelo de Infarto do Miocárdio em Animais.....	5
2.3 Treinamento Físico e Adaptações Cardiovasculares.....	6
2.4 Treinamento Físico e Infarto do Miocárdio.....	12
2.5 microRNAs.....	15
2.6 Localização dos microRNAs.....	16
2.7 Biogênese dos microRNAs.....	17
2.8 Mecanismo de Ação dos microRNAs.....	18
2.9 microRNA e Coração.....	20
2.10 microRNA e Infarto do Miocárdio.....	22
2.11 microRNA no Coração de Animais Submetidos ao Exercício.....	25
2.12 Validação dos mRNA alvos de microRNA.....	26

2.13	Modulação da Ação de microRNA.....	27
2.14	Métodos de Entrega dos Vetores Virais.....	28
2.15	Injeção Direta no Miocárdio.....	28
2.16	Métodos de Entrega Intravascular.....	29
3	JUSTIFICATIVA.....	30
4	OBJETIVOS.....	31
4.1	Geral.....	31
4.2	Específicos.....	31
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
5.1	Animais Experimentais.....	34
5.2	Protocolo de Cirurgia Cardíaca para Indução do Infarto do Miocárdio.	35
5.3	Avaliação da Morfometria e Função Ventricular.....	35
5.4	Tamanho do Infarto do Miocárdio.....	37
5.5	Protocolo de Treinamento Físico Aeróbico.....	38
5.6	Avaliação do Consumo Máximo de Oxigênio.....	39
5.7	Índice Hipertrofia Cardíaca.....	40
5.8	Extração de RNA Total.....	40
5.9	Cleanup para Microarray.....	41
5.10	MicroRNA Microarrays.....	41
5.11	Microarrays.....	41
5.12	Real Time-PCR.....	42
5.13	Western blotting.....	43

5.14	Análise Quantitativa de Fibras de Colágeno no Miocárdio.....	43
5.15	Imagem Histológica do Tamanho do Infarto.....	44
5.16	Determinação da Hidroxiprolina.....	45
5.17	Medida da Atividade da Ca^{2+} -ATPase.....	46
5.29	Análise dos Dados.....	54
6	RESULTADOS.....	55
6.1	Massa Corporal.....	55
6.2	Hipertrofia Cardíaca.....	56
6.3	Medida do Consumo de Oxigênio.....	56
6.4	Medidas Ecocardiográficas.....	57
6.5	Expressão do MicroRNA-29a.....	60
6.6	Expressão do MicroRNA-29b.....	62
6.7	Expressão do MicroRNA-29c.....	64
6.8	Expressão do Colágeno IAI e IIIAI.....	66
6.9	Análise Quantitativa das Fibras de Colágeno.....	70
6.10	Análise Quantitativa de Hidroxiprolina.....	71
6.16	Expressão do MicroRNA-1 e do MicroRNA-214.....	79
6.17	Expressão Protéica do NCX e da Serca2.....	81
6.18	Medida da Atividade da Ca^{2+} -ATPase.....	82
6.19	Micrornas selecionados.....	84
6.20	Confirmação da Expressão do MicroRNA 122.....	86
6.21	Confirmação da Expressão do Microrna-206.....	87

6.22	Confirmação da Expressão do Microrna-18a.....	88
6.23	Confirmação da Expressão do Microrna-339-5p.....	89
6.24	Escolha do microRNA-339-5p e dos Alvos do microRNA-339-5p.....	90
6.25	Expressão Protéica da Myo1c e do PGC-1 β	91
7	DISCUSSÃO.....	93
7.1	Massa Corporal.....	93
7.2	Hipertrofia Cardíaca.....	94
7.3	Medida do Consumo de Oxigênio.....	95
7.4	Medidas Ecocardiográficas.....	96
7.5	Expressão dos MicroRNAs-29a/b/c, COLIA, COLIIIAI, (OH-prolina) e da FVC.....	98
8	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	108
9	ANEXO 1.....	109
9.1	Mudanças no Projeto Inicial.....	109
9.2	Aprendizagem da Técnica de Aplicação de Vetores Virais <i>in vivo</i>	
9.3	Tratamento <i>in vivo</i>	
9.4	Preparação do Vetor Viral para Transfecção.....	
9.5	Transformação de Bactérias Eletro Competentes.....	
9.6	Pré Inóculo e Inóculo.....	
9.7	Maxi Prep.....	
9.8	Produção do vetor lentiviral do microRNA-29c.....	
9.9	Plaqueamento.....	

9.10	Transfecção do Vetor Lentiviral.....	
9.11	Protocolo de Titulação dos Lentivírus.....	
9.12	Cirurgia e Transfecção <i>in vivo</i> do Vetor Lentiviral no Coração.....	
9.13	Titulação.....	73
9.14	Expressão de <i>Green Fluorescent Protein</i> em Fígado e Coração de Ratos SHR.....	73
9.15	Expressão do MicroRNA-29c por Real Time-PCR no Ventrículo Esquerdo.....	75
9.16	Expressão Gênica do Colágeno do tipo I no Ventrículo Esquerdo.....	77
9.17	Concentração de Hidroxiprolina Cardíaca.....	78
10	ANEXO 2.....	1
10.1	Artigo Publicado na Revista <i>Cellular Physiology and Biochemistry</i>	1

LISTA DE TABELAS

		Página
TABELA 1	Massa Corporal no Dia do Procedimento Cirúrgico, Pré e Pós o Protocolo de TF de Dez Semanas.....	55
TABELA 2	Morfometria e Índices de Função Sistólica e Diastólica Obtidos pelo Exame Ecocardiográfico.....	59
TABELA 3	19 MicroRNAs selecionados com base nos critérios: Expressão do grupo SED-IM >SED-SHAM, TR-SHAM < SED-SHAM e TR-INF < SED-INF. Exclusão dos microRNAs que apresentavam expressão menor do que 2 U.A. Diferença do grupo TR-SHAM para o grupo SED-SHAM menor do que 1 U.A.....	85
TABELA 4	13 MicroRNAs selecionados com base nos critérios: Expressão do grupo SED-IM <SED-SHAM, TR-SHAM > SED-SHAM e TR-INF > SED-INF. Exclusão dos microRNAs que apresentavam expressão menor do que 2 U.A. Diferença do grupo TR-SHAM para o grupo SED-SHAM menor do que 1 U.A.....	86

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1	Desenho experimental..... 34
FIGURA 2	Visualização do VE (corte transversal) realizado pelo modo M. 36
FIGURA 3	Pelo método bidimensional foi feita a avaliação do fluxo mitral através do Doppler..... 37
FIGURA 4	Visão esquemática do protocolo de TF de natação para ratos. 38
FIGURA 5	Aparato de TF de natação para ratos..... 38
FIGURA 6	Hipertrofia cardíaca dada pela relação do VE/MC (mg/g), pré e pós o protocolo de TF de dez semanas..... 56
FIGURA 7	O consumo máximo de oxigênio após o protocolo de TF de dez semanas..... 57
FIGURA 8	Expressão do microRNA-29a na região infartada (A), na borda da região infartada (B) e na região remanescente ao infarto (C) realizada por real-time PCR..... 61
FIGURA 9	Expressão de microRNA-29b na região infartada (A), na borda da região infartada (B) e na região remanescente ao infarto (C) realizada por real-time PCR. 63
FIGURA 10	Expressão do microRNA-29c na região infartada (A), na borda da região infartada (B) e na região remanescente ao infarto (C) realizada por real-time PCR..... 65
FIGURA 11	Expressão do colágeno (COLIAI) na região infartada (A), na borda da região infartada (B) e na região remanescente ao infarto (C) realizada por real-time PCR..... 67
FIGURA 12	Expressão do colágeno (COLIAIII) na região infartada (A), na borda da região infartada (B) e na região remanescente ao infarto (C) realizada por real-time PCR..... 69
FIGURA 13	Cortes histológicos representativos da região infartada do miocárdio (A). Os painéis mostram as fibras de colágeno na região infartada e na RM dos grupos SED-INF e TR-INF (n = 7, por grupo) (B). Análise quantitativa das fibras de colágeno 71

	no miocárdio (C).	
FIGURA 14	Quantificação de colágeno a partir da concentração(mg/g) de hidroxiprolina (OH-prolina) na região infartada (A), na borda da região infartada (B) e na região remanescente ao infarto (C) realizada por real-time PCR.	72
FIGURA 15	Expressão do microRNA-1 (A) e microRNA-214 (B) realizado por PCR em tempo real.....	80
FIGURA 16	Expressão protéica do NCX (A) e da SERCA2 (B) por <i>western blot</i>	81
FIGURA 17	A atividade da cálcio ATPase da membrana plasmática (PMCA) mais a atividade da cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA 2a).	83
FIGURA 18	A atividade da cálcio ATPase da membrana plasmática (PMCA)(A) e a atividade da cálcio ATPase do retículo endoplasmático (SERCA 2a) (B).....	84
FIGURA 19	Expressão do microRNA-122 realizado por PCR em tempo real.....	87
FIGURA 20	Expressão do microRNA 206 realizado por PCR em tempo real.....	88
FIGURA 21	Expressão do microRNA 18a realizado por PCR em tempo real.....	89
FIGURA 22	Expressão do microRNA 339-5p realizado por PCR em tempo real.....	90
FIGURA 23	Expressão protéica da Myo1c (A) e do PGC-1 β (B) por <i>western blot</i>	92
FIGURA 24	Desenho experimental.....	46
FIGURA 25	Histologia do VE após o procedimento de injeção com 200 μ L de azul de metileno. A. primeira técnica. B segunda técnica....	49
FIGURA 26	Curva padrão para a titulação de lentivírus.....	73
FIGURA 27	Expressão proteica de GFP em coração de SHR tratados com	74

pré-miR-29c por Western Blott em unidades arbitrárias (U.A.).

FIGURA 28	Expressão proteica de GFP em fígado de SHR por Western Blott em unidades arbitrárias (U.A.) em SHR tratados com o pré-miR-29c.	75
FIGURA 29	Expressão do microRNA-29c realizada por reação de PCR em tempo real.....	76
FIGURA 30	Expressão do microRNA-29c realizada por reação de PCR em tempo real.	76
FIGURA 31	Expressão relativa do colágeno COL1A1 (alvo do mir-29c), realizado por PCR em tempo real.....	77
FIGURA 32	Expressão gênica relativa do colágeno COL1A1 (alvo do miR-29c) realizado por PCR em tempo real.	78
FIGURA 33	Conteúdo total de colágeno em cardiomiócitos avaliado pela quantificação da concentração da Hidroxiprolina (OH-Pro - mg/g) em SHR tratados com pré-miR-29c.....	78

LISTA DE SIGLAS, ABREVIações E SÍMBOLOS

IM.....	Infarto do Miocárdio
TF.....	Treinamento Físico
VE.....	Ventrículo Esquerdo
VO _{2max}	Consumo Máximo de Oxigênio
SERCA-2A.....	ATPase do Retículo Sarcoplasmático
NCX.....	Trocador Na ⁺ / Ca ²⁺
GLUT 4.....	Transportador de Glicose 4
PGC-1.....	Peroxisoma Proliferador Activator Receptor Coactivator-1
COL I&III I&I	Colágeno I e III
PMCA.....	Cálcio ATPase da Membrana Plasmática
ATP	Adenosina Trifosfato
ADP.....	Adenosina Difosfato
AMP.....	Adenosina Monofosfato
PI(3)K.....	Fosfoinositideo 3 Quinase
Myo1c.....	Miosina 1C
Lin4	Linhagem Deficiente 4
DGCR8.....	<i>DiGeorge syndrome critical region gene 8</i>

MCP.....	Miosina de Cadeia Pesada
Akt.....	Proteína Quinase B
%FEAT.....	Fração de Encurtamento da Área Transversal
FVC.....	Fração Volumétrica de Colágeno
OH-prolina.....	Concentração de hidroxiprolina
MC.....	Massa Corporal
RM.....	Região Remanescente ao Infarto
BR.....	Borda do Infarto
RI.....	Região do Infarto

RESUMO

MELO, S. F. S. **Seleção de microRNA e proteína alvo envolvidos com a função cardíaca de ratos infartados em resposta ao treinamento aeróbico.** 2014.120 f. Tese (Doutorado) - Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O infarto do miocárdio (IM) é uma patologia causada pela obstrução parcial ou total das artérias coronárias responsáveis pela irrigação do miocárdio. Sabe-se que logo após o IM, o treinamento físico (TF) promove melhora e adaptações benéficas ao sistema cardiovascular. O objetivo do presente estudo foi traçar o perfil de microRNAs na área remanescente ao IM de ratos submetidos ou não ao TF através da técnica de microarray, selecionar e confirmar a expressão de um microRNA específico, por programas de bioinformática que tenha alvos que possam estar envolvidos com a melhora da função cardíaca com o TF. Também foi objetivo deste estudo, verificar a expressão do microRNA-1, do microRNA-29 e do microRNA-214 e dos respectivos alvos destes microRNAs, como o colágeno, NCX e SERCA2a. Para isso, ratos Wistar foram divididos em quatro grupos: SEDENTÁRIO SHAM (SED-SHAM), SEDENTÁRIO INFARTADO (SED-IM), TREINADO SHAM (TR-SHAM) e TREINADO INFARTADO (TR-IM). A função ventricular foi acompanhada com ecocardiografia antes e após oito semanas do protocolo de TF de natação. Os animais foram sacrificados, o RNA foi extraído e posteriormente foi traçado o perfil de microRNAs. Para seleção dos microRNAs foram estipulados dois padrões de expressão entre os grupos. De acordo com os critérios aplicados foram observados, apenas 6 microRNAs para o primeiro padrão de expressão e 3 microRNAs para o segundo padrão de expressão que satisfizeram todos os critérios. O microRNA-339-5p foi escolhido por apresentar expressão diferencial pronunciada como efeito do TF por ter dois genes (alvos selecionados por programas de bioinformática TargetScan, Miranda e PicTar), o Myo1c e o PGC-1 β , que estão envolvidos com a regulação da função cardíaca. Neste estudo, foi possível verificar que nos grupos TR-SHAM e TR-IM ocorreu aumento da expressão da Myo1c e redução da expressão do microRNA-339-5p. Nossos resultados também mostraram que o TF induziu aumento na expressão

dos microRNAs-29a/c, o que está relacionado com significativa diminuição na expressão gênica do COL1A1, COL1A2, diminuição na concentração de hidroxiprolina e fração volumétrica de colágeno de ratos com IM. Outro resultado deste estudo é que o TF induziu diminuição na expressão dos microRNAs-1 e 214, o que está relacionado com aumento na expressão protéica dos alvos SERCA-2a e NCX de ratos com IM. Esses efeitos estão associados com a melhora da função ventricular avaliada pela FEAT% (função sistólica) e pela relação E/A (função diastólica), realizado por avaliação ecocardiográfica após o período de TF.

Palavras-chave: microRNA, infarto do miocárdio, treinamento físico, contratilidade cardíaca.

ABSTRACT

MELO, S. F. S. **Selection of microRNA and target protein involved in cardiac function in infarcted rats in response to aerobic training.**

2014.120 f. Tese (Doutorado) - Escola de Educação Física e Esporte, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Myocardial infarction (MI) is a disease caused by partial or total blockage of the myocardial coronary arteries. It is known that after MI, physical training (PT) improves and promotes beneficial adaptations to the cardiovascular system. The aim of this study was to analyse the microRNAs profile in the remaining area to MI in rats submitted to PT by microarray and select a specific microRNA by bioinformatics software that has targets involved with the improvement of cardiac function by PT. Also, the aim of this study was to verify the expression of the microRNA-1, microRNA-29 and microRNA-214 and its targets, such as collagen, NCX and SERCA2a. For this, rats were divided into four groups: SEDENTARY SHAM (SHAM - SED), INFARCTED SEDENTARY (SED-MI), TRAINED SHAM (TR-SHAM) and INFARCTED TRAINED (TR-IM). Ventricular function was monitored with echocardiography before and after eight weeks of the PT. The animals were sacrificed, the RNA was extracted and traced the profile of microRNAs. For selection of microRNAs were stipulated two patterns of expression between the groups. The first standard, 6 microRNAs were selected and in the second standard, 3 microRNAs were selected to satisfy all criteria. The microRNA-339-5p was chosen because of pronounced differential expression with PT and have two target genes selected by bioinformatics programs (TargetScan, Miranda and PicTar) Myo1c and the PGC-1 β are involved in the regulation of cardiac function. In this study, we found that the SHAM group and the group with MI undergoing PT increased expression of Myo1c in contrast to a decreased expression of microRNA-339- 5p. Our results also showed that PT induced increased expression of microRNA-29a/c, which is associated with a significant decrease in gene expression of COL1A1, COL11A1, the hydroxyproline

concentration and collagen volume fraction of rats with MI. Another result of this study is that the PT induced decrease in the expression of microRNA-1 and microRNA-214, which is related to the increase in protein expression of the targets SERCA-2a and NCX of rats with MI. These effects are associated with improved ventricular function assessed by FEAT % (systolic function) and E/A ratio (diastolic function), performed by echocardiography after the period of PT.

Keywords: microRNA, myocardial infarction, physical training, cardiac contractility.

1. INTRODUÇÃO

O infarto do miocárdio (IM) é uma patologia causada pela obstrução parcial ou total das artérias responsáveis pela irrigação do miocárdio. Quando o fluxo nestas artérias é obstruído, uma parte do tecido cardíaco deixa de receber oxigênio e nutrientes. Este evento está relacionado à morte de parte do miocárdio, que leva a um quadro de remodelamento para restauração da função cardíaca. Posteriormente o remodelamento torna-se inadequado e, gradualmente, leva à descompensação progressiva, que está associada a mau prognóstico (WISLOFF et al., 2002; DAYAN et al., 2005).

Vários fatores estão associados ao IM, por exemplo: a dislipidemia, tabagismo, obesidade, hipertensão arterial, diabetes e inatividade física (BLAIR; OBERMAN, 1987; BLAIR; COOPER, 1997).

O IM persiste como importante causa de mortalidade, apesar dos avanços tanto no tratamento como na prevenção dessa condição, acarretando grandes custos aos sistemas de saúde. As doenças isquêmicas do coração representam 30% do total das mortes por doenças cardiovasculares nos países ocidentais (ROSAMOND et al., 2007). No Brasil, dados preliminares de 2010 apontam para 99.408 mil óbitos que tiveram como causa a doença isquêmica do coração (DATASUS, 2012). A morbidade por doenças isquêmicas do coração também acarreta um elevado custo para os cofres públicos. De 1993 a 1997, essas doenças foram responsáveis por 1% de todas as internações e 3,3% dos gastos do Sistema Único de Saúde (LAURENTI et al., 2000).

Sabe-se que o IM causa a perda, prejuízo da contratilidade e hipertrofia dos cardiomiócitos, além da diminuição da espessura da parede do ventrículo, modificação da matriz extracelular e alterações metabólicas. Essas alterações promovem um rearranjo compensatório no miocárdio ao atingir três regiões morfológicas e molecularmente distintas: região infartada, região da borda do IM e região remota do IM, (JACKSON et al., 2005). Diante disso, diferentes estratégias terapêuticas almejam modular vários processos cardíacos como contratilidade, metabolismo, apoptose, angiogênese, formação de fibrose e controle da hipertrofia, com o objetivo de reverter ou prevenir danos nas diferentes regiões do

coração infartado (DONAHUE, 2004; ANGHEL; POGWIZD, 2007; PALANIYANDI et al., 2011).

Nas últimas décadas houve um número de pesquisadores que se dedicaram a entender os efeitos metabólicos, autonômicos e estruturais do treinamento físico (TF), promovidos no sistema cardiovascular em diversas patologias, dentre elas o IM, levando os pesquisadores a sugerir o TF como conduta não farmacológica importante no tratamento (WISLOFF et al., 2002; BATISTA et al., 2007; ROLIM et al., 2007; MEDEIROS et al., 2008).

Os mecanismos centrais pelos quais o exercício melhora os sintomas clínicos em pacientes após o IM tem sido objeto de diversas investigações. Alguns estudos têm demonstrado que o TF promove melhora na função cardíaca (BLAIR; COOPER., 1970; BLOMQVIST; SALTIN.,1983; JORGE et al., 2010) e atenua a dilatação do ventrículo esquerdo (VE) em animais com grandes IM (ORENSTEIN et al., 1995). No entanto, muito dos mecanismos moleculares que são responsáveis pelos efeitos benéficos do exercício físico sobre a função e o remodelamento miocárdico após o IM permanecem a ser elucidados.

Dentre inúmeros trabalhos publicados para investigar os mecanismos celulares e bioquímicos responsáveis pelos benefícios do exercício físico, em situações patológicas e fisiológicas, promovidos no sistema cardiovascular, o grupo de pesquisadores orientados por Wisloff et al. (2002) demonstrou que ratos submetidos ao TF intervalado alternados entre 8 min a 85-90% do VO_{2max} (consumo máximo de oxigênio) e a 2 min em 50-60% do VO_{2max} , após quatro semanas da ligadura da artéria coronária esquerda apresentaram a hipertrofia miocárdica atenuada e melhora na função contrátil dos miócitos, com o aumento na expressão da ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA-2a) e na sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} . Os resultados encontrados por Song et al. (2004), também demonstram melhora da contratilidade do miócito de animais com IM submetidos ao TF intervalado após 2 semanas da ligadura da artéria coronariana, assim como o restabelecimento da expressão de proteínas cardíacas como a SERCA-2a e o aumento na expressão do trocador Na^+/Ca^{2+} (NCX), os quais regulam o transiente de cálcio.

Em resposta ao IM o VE também sofre mudanças metabólicas. A oxidação de ácidos graxos é diminuída e o metabolismo de glicose é aumentado (CZECH; CORVERA, 1999; SALTIEL; KAHN, 2001; DAVILA-ROMAN et al., 2002). Masamura et al, 2003 analisou a expressão do GLUT 4 em duas diferentes regiões do coração infartado. Os autores observaram que a expressão do GLUT 4, após 4 semanas estava aumentada na região da borda e diminuída na região remanescente ao infarto, demonstrando que o metabolismo é alterado, diferentemente nas regiões do coração após o infarto do miocárdio. Da mesma forma que o exercício tende a restabelecer a expressão de proteínas envolvidas com a contratilidade, o exercício promove uma reexpressão de proteína como a peroxissoma proliferador activator receptor coactivator-1 (PGC-1) responsável pela oxidação de ácidos graxos e também maior expressão e translocação do GLUT 4 o qual é importante no metabolismo glicolítico.

Para melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos com os benefícios do TF no sistema cardiovascular, novos aspectos têm sido alvos de investigação, como a influência da expressão de microRNAs no processo da regulação gênica (CHEN, 2008; VAN ROOIJ, 2010; VAN ROOIJ, 2011; MAGNY et al., 2013; NELSON et al., 2014). Nosso grupo publicou o primeiro trabalho na literatura com TF de natação em animais, demonstrando que a expressão do microRNA-29 é acompanhado por melhora na complacência ventricular e isto foi estreitamente relacionada com a diminuição da expressão gênica e proteica de colágeno I e III no coração (SOCl et al., 2011). O que é interessante, uma vez que pode ser um provável mecanismo para explicar a diminuição do colágeno no VE e a melhora da função cardíaca, após o IM de animais submetidos ao TF.

Recentemente, o trabalho publicado pela Van Rooij et al. (2008), foi o primeiro a investigar o perfil de expressão dos microRNAs no coração de ratos infartados. Posteriormente, ao trabalho desse grupo, vários trabalhos investigaram a expressão de microRNA em diferentes regiões do coração de animais submetidos ao infarto do miocárdio, comparando o perfil de expressão em diferentes estágios após a realização do IM (PORT et al., 2011; SHI et al., 2010 ; DONG et al., 2009).

Ainda não existem estudos relacionando os efeitos do TF sobre o perfil de microRNAs expressos no coração de animais infartados. Desta forma, a utilização das técnicas de biologia molecular associada à utilização de modelos experimentais podem permitir que aspectos fundamentais da regulação dos diversos mecanismos envolvidos na melhora da função contrátil com exercício físico possam ser bem compreendidos e utilizados para modular a expressão de genes com o intuito de melhorar a contratilidade cardíaca e interromper a progressão ou reverter o quadro do IM.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Infarto do Miocárdio

O infarto do miocárdio (IM) é uma patologia causada pela obstrução parcial ou total das artérias responsáveis pela irrigação do miocárdio. Quando o fluxo nestas artérias é obstruído, uma parte do tecido cardíaco deixa de receber oxigênio e nutrientes. Este evento está relacionado à morte de parte do miocárdio, que leva a um quadro de remodelamento para restauração da função cardíaca. Posteriormente o remodelamento torna-se inadequado e, gradualmente, leva à descompensação progressiva, que está associada a mau prognóstico (WISLOFF et al., 2002; DAYAN et al., 2005).

O IM persiste como importante causa de mortalidade, apesar dos avanços tanto no tratamento como na prevenção dessa condição, acarretando grandes custos aos sistemas de saúde. As doenças isquêmicas do coração representam 30% do total das mortes por doenças cardiovasculares nos países ocidentais (ROSAMOND et al., 2007). No Brasil, dados preliminares de 2010 apontam para 99.408 mil óbitos que tiveram como causa a doença isquêmica do coração (DATASUS, 2012). A morbidade por doenças isquêmicas do coração também acarreta um elevado custo para os cofres públicos. De 1993 a 1997, essas doenças foram responsáveis por 1% de todas as internações e 3,3% dos gastos do Sistema Único de Saúde (LAURENTI et al., 2000).

Sabe-se que o IM causa a perda, prejuízo da contratilidade e hipertrofia dos cardiomiócitos, além da diminuição da espessura da parede do ventrículo, modificação da matriz extracelular e alterações metabólicas. Essas alterações metabólicas promovem um rearranjo compensatório no miocárdio ao atingir três regiões morfológicas e molecularmente distintas: região infartada, região da borda do IM e região remota do IM, (JACKSON et al., 2005). Diante disso, diferentes estratégias terapêuticas almejam modular vários processos cardíacos como contratilidade, metabolismo, apoptose, angiogênese, formação de fibrose e controle da hipertrofia, com o objetivo de reverter ou prevenir danos nas diferentes regiões do coração infartado (DONAHUE, 2004; POGWIZD, 2007; PALANIYANDI et al., 2011).

Desta forma, estudos que visem aprofundar o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos nesta patologia, tanto em humanos como modelos experimentais podem contribuir significativamente para o desenvolvimento de novas terapias e tratamentos, que resultem em diminuição de recursos financeiros públicos para o tratamento destes pacientes.

2.2 Modelo de Infarto do Miocárdio em Animais

O emprego de modelo experimental do IM em animais foi descrito há décadas por Johns e Olson (1954). Entre as várias espécies estudadas, há preferência pela utilização de ratos devido à facilidade para realizar a cirurgia de oclusão da artéria coronária, além do baixo custo na aquisição e manutenção dos animais (JOHNS; OLSON, 1954; FISHBEIN *et al.*, 1978b). A caracterização e a sequência de eventos histológicos obtidos após a produção cirúrgica do IM em ratos já foram descritas (FISHBEIN *et al.*, 1978b; SPADARO *et al.*, 1980). O comportamento hemodinâmico na fase crônica do IM, tanto em condição basal, como em ratos submetidos à sobrecarga de pressão ou de volume foi relatado por Fishbein *et al.* (1978a).

A oclusão da artéria coronária interventricular anterior é a estratégia mais frequentemente aplicada para a produção do IM (JOHNS; OLSON, 1954; GAUDRON *et al.*, 1994; TUCCI, 2010). No entanto, apesar do processo fisiopatológico que se estabelece nos roedores após ligadura da coronária ser útil para analisar o remodelamento que ocorre no músculo cardíaco remanescente, ele não guarda analogia com as síndromes coronárias humanas. Faltam ao modelo as lesões arteriais que conferem perfil próprio a coronariopatia de humanos: arritmias, isquemias transitórias e reincidências de oclusão coronária, inexistentes no animal de experimentação (TUCCI, 2010).

A grande variabilidade no que se refere à mortalidade nas primeiras 24 horas após a oclusão da coronária chama atenção neste modelo. Os limites de mortalidade descritos na literatura na fase imediata à oclusão coronária variam do valor mais baixo de 13% até o máximo de 65%. Além disso, a variação no tamanho do IM resultante, também pode ou não evoluir com aumento da pressão

diastólica final do VE e insuficiência cardíaca congestiva, dependendo da extensão da lesão miocárdica secundária à oclusão coronariana (GAUDRON, et al., 1994; TUCCI, 2010).

O eletrocardiograma e o ecocardiograma são métodos não invasivos capazes de identificar a área de necrose ou cicatricial em coração de ratos submetidos a oclusão da artéria coronária. O ecocardiograma possibilita caracterizar a presença e o tamanho do IM com muito boa sensibilidade, mesmo em períodos precoces como dois dias após promover a necrose, além de informar sobre a função ventricular (SANTOS et al., 2009).

2.3 Treinamento Físico e Adaptações Cardiovasculares

O exercício físico dinâmico regular produz vários efeitos benéficos sobre o músculo esquelético e o músculo cardíaco, além dos efeitos sobre a circulação coronariana e periférica. Essas adaptações fisiológicas dependem da quantidade de TF, que é determinada pelo volume (tempo de TF), intensidade (grau de carga de TF) e frequência (número de sessões de treinamento em um determinado espaço de tempo) de TF (DICKHUTH, et al., 1983). A combinação adequada desses fatores somada as características da espécie são determinantes para o melhor desenvolvimento das adaptações fisiológicas. Essas adaptações já estão bem descritas na literatura com exercício físico aeróbico como corrida e natação, tanto em humanos (HOLLOSZY; BOOTH, 1976; BLOMQVIST; SALTIN, 1983) como em animais (SCHAIBLE; SCHEUER, 1979).

Diversos estudos mostram que o TF aeróbico diminui a frequência cardíaca (FC) tanto de repouso como em cargas submáximas (KEUL *et al.*, 1982; STRATTON, et al., 1994). Isso é um indicativo de que para uma mesma carga de trabalho, há menor gasto energético pelo coração, ocorrendo, portanto, uma melhora na eficiência deste órgão. Alterações estruturais e hemodinâmicas participam desse processo (KANAKIS; HICKSON, 1980).

Estruturalmente, o aumento da massa muscular do miocárdio, principalmente do VE, com aumento do volume diastólico final, caracteriza a hipertrofia excêntrica (FLECK, 1988; FORJAZ et al., 1998). Também ocorre

aumento do volume sistólico e da força de contração (SALTIN, 1985; STRATTON, et al., 1994). Como há maior enchimento ventricular, mantendo-se a fração de ejeção, o coração ejeta maior volume absoluto de sangue. Portanto, é necessário um menor número de batimentos por minuto para manter o débito cardíaco. Adaptações importantes como aumento do calibre das artérias coronarianas (JOCHER et al., 1972) e aumento do fluxo sanguíneo cardíaco e periférico (MONTROYE et al., 1972) acontecem também nos vasos. Essas alterações garantem melhor perfusão sanguínea para os músculos durante o exercício.

Além dos efeitos do condicionamento físico sobre o coração, o exercício físico também promove adaptações na musculatura periférica que influenciam, indiretamente, no desempenho cardíaco (Forjaz et al., 1998). Como exemplo, podemos citar redução plasmática de triglicérides, diminuição do LDL-colesterol e aumento da sensibilidade à insulina (BLAIR; COOPER, 1997; FRENCH; KRAMER, 2007). A mais relevante, porém, é o aumento do VO_{2max} , encontrado tanto em humanos (Holloszy; Booth, 1976) como em animais experimentais (SCHAIBLE; SCHEUER, 1979).

Nos últimos anos inúmeros estudos têm dado grande ênfase aos mecanismos bioquímicos e moleculares que estão envolvidos com os benefícios do exercício físico no sistema cardiovascular (WISLOFF et al., 2002; WISLOFF et al., 2007).

Contratilidade e Relaxamento

O cálcio está envolvido na regulação de três processos essenciais no cardiomiócito: a contratilidade, o relaxamento e na transdução de sinal. Nos miócitos cardíacos, o cálcio entra na célula através do canal de cálcio do tipo L e através dos receptores de rianodina ocorre a liberação de mais cálcio armazenado no retículo sarcoplasmático, que conduzem a um aumento sustentado do cálcio intracelular, desencadeando, finalmente a contração dos miócitos. O relaxamento do cardiomiócito ocorre, logo em seguida, pela remoção do cálcio a partir de três

grandes bombas de extrusão, a SERCA-2a, o NCX e a cálcio ATPase da membrana plasmática (PMCA) (BERS., 2000).

A mobilização de cálcio a partir de organelas intracelulares é altamente especializada no músculo cardíaco. A SERCA representa 90% das proteínas da membrana do retículo sarcoplasmático no músculo cardíaco e o controle da concentração de cálcio intracelular é em grande parte realizada por esta proteína (NELSON et al., 2014).

O TF promove um melhor controle dos mecanismos de entrada e saída de cálcio. Alguns estudos têm demonstrado que a expressão e função destas proteínas são alteradas com o treinamento e estão diretamente relacionadas com a melhora da função cardíaca. Assim, muitos pesquisadores têm buscado especificar a contribuição dos diferentes componentes celulares e moleculares que contribuem para essas adaptações (KRANIAS; HAJJAR., 2012).

Wisloff e colaboradores (2002) verificaram em ratos submetidos ao treinamento uma capacidade de encurtamento aumentada dos miócitos no grupo treinado e isso foi associado com um menor pico sistólico de cálcio intracelular. Alguns mecanismos possíveis como o aumento da expressão de SERCA-2a, do NCX e aumento da sensibilidade de miofilamentos, acompanhados das mudanças intracelulares de cálcio, são possíveis fatores para reduzir o cálcio sistólico, contribuindo para diminuição do pico sistólico de cálcio como observado, com TF, por estes autores. Acredita-se que o TF promove benefícios na contratilidade dos miócitos cardíacos através do aumento da expressão de proteínas reguladoras da homeostasia de cálcio, como SERCA-2a, NCX e fosfolambam, porém, sem alterar a expressão de rianodina.

Além das proteínas contrateis alteradas no miocárdio, com o TF, outras proteínas da matriz extracelular também são alteradas, com o TF, podendo levar a melhora da função contrátil do coração. Nosso laboratório, já demonstrou que ratos submetidos a dois protocolos de treinamento de natação com volumes de treinamento moderado e alto apresentaram melhora na função diastólica e complacência ventricular e isso estava intimamente relacionado com a diminuição da expressão gênica e proteína do colágeno IAI (SOCl et al., 2011).

Metabolismo cardíaco

No coração normal a oxidação de ácidos graxos é a principal via metabólica responsável para a geração de energia para a contração, sendo responsável por 60 a 70% da produção de ATP (VAN DE VUSSE et al. 1992). A glicólise e a gliconeogênese constituem aproximadamente 30% da síntese de ATP. O coração é capaz de alternar substratos energéticos dependendo da sobrecarga imposta sobre ele e da concentração relativa de moléculas de substratos circulantes. Este fenômeno é considerado como um mecanismo adaptativo que permite ao coração produzir um suprimento contínuo de ATP, sob várias condições fisiológicas, como por exemplo, no jejum e no exercício (BERNARDO et al, 2010).

Existem fatores limitantes da glicólise no músculo cardíaco. Por exemplo, a atividade aumentada da oxidação dos ácidos graxos faz com que ocorra uma inibição da fosfofrutoquinase enzima fundamental da via glicolítica, pelo aumento de citrato, além de outros mecanismos inibitórios desta via. Em contrapartida, podemos dizer que no miocárdio a via glicolítica é estimulada pelo fosfato inorgânico, 5'-AMP, ADP e frutose-1,6-difosfato, substâncias que estão acumuladas no miocárdio em situação isquêmicas, como no IM, enquanto o metabólico (citrato) presentes quando o coração está bem oxigenado direciona a via para a oxidação dos ácidos graxos. Em situações de aumento do consumo de oxigênio e ATP, como no exercício, se os níveis plasmáticos dos ácidos graxos estiverem diminuídos, aumenta a captação de lactato, bem como a sua oxidação. Na captação e metabolização da glicose estão envolvidas diferentes etapas, cada uma delas com os seus componentes inibidores e estimuladores específicos (JAMES et al., 1983; HENRIKSEN, 2002; LUCIANO et al., 2002).

O efeito metabólico da insulina é de extrema importância para a manutenção da homeostasia da glicose e metabolismo cardíaco (MONDON et al, 1980; CZECH CORVERA, 1999). A sinalização intracelular da insulina inicia-se com a ligação do hormônio a um receptor específico de membrana que ativa uma subunidade da PI(3)K e em seqüência leva a fosforilação da Akt que vai ativar a

translocação do GLUT4 para a membrana citoplasmática para que ocorra o transporte de glicose. Sabe-se também que a atividade contrátil do músculo pode estimular a translocação do GLUT4 na ausência de insulina (HAYASHI et al., 1997; GOODYEAR; KAHN, 1998). Embora ainda não muito bem entendido, existem inúmeras outras moléculas envolvidas nesse mecanismo de sinalização durante o exercício, como o aumento na concentração do íon cálcio no interior da célula, alteração da disponibilidade de proteína quinase ativada por AMP intracelular, a atividade da óxido nítrico sintase e a síntese por ela de óxido nítrico, o aumento na concentração de bradicinina ou até mesmo a hipóxia que podem estimular a captação de glicose através do aumento da translocação do GLUT-4 para a membrana durante a contração muscular (HAYASHI et al., 1997; GOODYEAR; KAHN, 1998).

Embora os mecanismos de sinalização que conduzem a translocação do GLUT4 tem sido extensivamente estudada ainda não é bem entendida a maquinaria intracelular de transporte do GLUT4. Alguns estudos com músculo esquelético sugerem que existem diferentes “pools” de GLUT4, que podem ser estimulados por insulina e outros sendo estimulados pelo exercício (DOUEN et al., 1990; CODERRE et al., 1995). Neste contexto, uma proteína que pode estar envolvida com os efeitos benéficos do treinamento no coração é a proteína miosina 1c (Myo1c) que é uma das nove isoformas de miosina, sendo amplamente expressa no coração (BOGUSLAVSKY et al, 2012). Como outras miosinas não convencionais, a Myo1c interage com a actina e está envolvida em vários processos celulares, incluindo endocitose, exocitose, como por exemplo, a translocação de GLUT-4 para a membrana celular (BRANDSTAETTER et al, 2012). Myo1c foi recentemente descoberta e verificou-se ser uma proteína necessária para a absorção de glicose no músculo esquelético com TF e com estimulação via insulina (TOYODA et al., 2011). No coração poucos são os estudos que relacionam a proteína Myo1c com TF no coração.

Experimentos realizados com animais *wild-type* que foram submetidos a exercício voluntário, durante quatro semanas, verificou-se aumento nos níveis de proteína Myo1c em relação ao grupo controle no músculo esquelético. Este

aumento da expressão da Myo1c, nos animais *wild-type* foi diretamente relacionado com a absorção de glicose estimulada tanto pela contração (*in situ*) quanto pela insulina, enquanto que os animais *knockout* para Myo1c diminuíram tanto a absorção de glicose pela contração quanto pela insulina (TOYODA et al., 2011).

Outra proteína que tem sido investigada é a peroxissoma proliferador activator receptor coactivator-1 β (PGC-1 β) e a peroxissoma proliferador activator receptor coactivator-1 α (PGC-1 α) que estão envolvidas com o controle da expressão de muitos dos genes que controlam a fosforilação oxidativa e a biogênese mitocondrial (MORTENSEN et al 2007). O exercício tem se mostrado eficiente para melhorar o funcionamento mitocondrial em coração de animais (EICHNER et al, 2010; ABDALLA et al, 2011). Riehle et al, 2011 demonstraram que animais *Knockout* para PGC-1 β reduzem a expressão de genes relacionados com via oxidativas e também teve uma redução significativa no tamanho da mitrocondria.

Embora tenhamos relativamente um bom entendimento de muitas funções da PGC-1 α em vários tecidos, o nosso conhecimento sobre a PGC-1 β , especialmente ainda é rudimentar. Um modelo animal que expressa PGC-1 β numa série de tecidos aumentou a capacidade oxidativa do músculo esquelético, aumentou o gasto energético total, apresentou menores níveis de insulina e resistência a obesidade (KAMEI et al., 2003). No entanto, as funções específicas da PGC-1 β precisam ser melhor compreendidas, principalmente em situações como em resposta ao TF no músculo cardíaco.

2.4 Treinamento Físico e Infarto do Miocárdio

Nas últimas décadas foi grande o número de pesquisadores que se dedicaram a entender os efeitos metabólicos, autonômicos e estruturais promovidos no sistema cardiovascular pelo TF em diversas patologias, dentre elas o IM. Os resultados desses trabalhos levaram os pesquisadores a sugerir o TF como conduta não farmacológica importante como parte do tratamento de

cardiopatias (WISLOFF et al., 2002; WISLOFF et al., 2007; MEDEIROS et al 2008; BARTHOLOMEU et al., 2008; RODRIGUES et al., 2010).

O TF tem revelado vários efeitos positivos na redução das disfunções cardíacas e periféricas em animais após o IM. Estudos mostraram que o TF após o IM tem efeitos favoráveis, que incluem o aumento no desempenho do exercício máximo, no VO_{2max} , no volume sistólico máximo, na máxima condutância para o trabalho muscular esquelético, no remodelamento, na capacidade funcional do VE, na fração de ejeção e no enchimento diastólico inicial do VE. Além disso, o exercício aumenta a atividade antioxidante no coração de animais após o IM (MUSCH et al., 1986; XU et al., 2008; RODRIGUES et al., 2010).

Além dos trabalhos do grupo dos pesquisadores orientados pelo Wisloff et al. (2002) já mencionados anteriormente, inúmeros trabalhos investigaram os mecanismos bioquímicos e fisiológicos responsáveis pelos benefícios do exercício físico no sistema cardiovascular, em situações patológicas e fisiológicas (NATALI, et al., 2000; KEMI; WISLOFF et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2009; LIN et al., 2010; BERNADO et al., 2010).

Contratilidade e Relaxamento

A função ventricular é altamente dependente do transiente de cálcio no coração. A disfunção do miocárdio observada após o IM deve-se em parte por alterações na expressão, atividade e nível de fosforilação das proteínas sarcôméricas (KEMI et al., 2008). Kim et al. (2008), verificaram que a redução da atividade e expressão do NCX, redução funcional da SERCA-2a e o aumento da liberação de cálcio durante o relaxamento pelos receptores de rianodina tem sido correlacionadas, positivamente como um conjunto de modificações moleculares responsáveis pela perda e prejuízo funcional do coração após o IM.

Wisloff (2002), demonstram melhora na contratilidade dos cardiomiócitos de animais com IM submetidos ao TF intervalado, após 2 semanas do IM, e isso foi acompanhado de um aumento do pico do transiente de cálcio intracelular e da

expressão de proteínas cardíacas como a SERCA-2a e o aumento na expressão do NCX, importantes reguladores do transiente de cálcio. Posteriormente, Dayan et al. (2005), em um estudo com animais, demonstraram que três semanas de TF de natação realizado, antes do IM, também foi significativamente suficiente para atenuar o prejuízo funcional do miocárdio, sendo o TF capaz de promover um efeito cardioprotetor importante contra os danos causados pelo remodelamento cardíaco.

Da mesma forma, trabalhos com camundongos *knockouts* para os receptores α_2A/α_2C ARKO adrenérgicos que apresentam hiperatividade simpática e desenvolvem insuficiência cardíaca, com decréscimo progressivo da função cardíaca a partir do quarto mês de idade e mortalidade de 50% aos 6 meses de idade (BRUM et al., 2002), observou-se benefícios sobre a tolerância ao esforço e a função sistólica nos camundongos α_2A/α_2C ARKO com o TF. Estes benefícios foram acompanhados pela melhora do transiente de Ca^{2+} intracelular e da expressão de proteínas cardíacas, como a SERCA-2a e fosfolamban, bem como pela redução na expressão do NCX (ROLIM et al., 2007).

Além das proteínas contráteis que são modificadas após o IM, células do miocárdio, começam a expressar, desproporcionalmente as proteínas da matriz extracelular o que induz a formação da fibrose, podendo levar a rigidez mecânica e a disfunção na contratilidade cardíaca (WEBER et al., 1994; PALOJOKI et al., 2001). Em contra partida estudos do nosso laboratório mostraram que o treinamento pode ter um efeito na redução do colágeno cardíaco e melhora da função cardíaca em situações patológicas que ocorrem aumento da formação da fibrose no coração (ROCHA et al., 2007).

Metabolismo Cardíaco

Em situações patológicas a oxidação de ácidos graxos é diminuída e o metabolismo de glicose é aumentado (VAN DE VUSSE et al. 1992; DAVILA-ROMAN et al., 2002; BERNARDO et al, 2010). Esta alternância na utilização de substratos energéticos pode ser um mecanismo protetor, permitindo ao coração produzir ATP de forma rápida mesmo em condições de hipoxia. Este mecanismo

bioquímico ocorre após o IM, quando o suprimento de oxigênio é limitado e o transporte de ácidos graxos e o metabolismo oxidativo é prejudicado devido a deficiência de enzimas envolvidas na oxidação de ácidos graxos, desta forma a glicose passa a ser o substrato primário usado pelo coração (OSTADAL et al., 1999; VAN BILSEN et al., 2009).

Em resposta ao IM o VE sofre mudanças metabólicas. A oxidação de ácidos graxos é diminuída e o metabolismo de glicose é aumentado (ALLARD et al., 1994; CHRISSTE; RODGERS, 1994; DAVILA-ROMAN et al., 2002). Masamura et al, (2003), analisou a expressão do GLUT 4 em duas diferentes regiões do coração infartado. Os autores observaram que a expressão do GLUT 4, após 4 semanas estava aumentada na região da borda e diminuída na região remanescente ao infarto, demonstrando que o metabolismo é alterado, diferentemente nas regiões do coração após o IM. Da mesma forma como o exercício tende a restabelecer a expressão de proteínas envolvidas com a contratilidade, o exercício promove uma reexpressão de proteína como a PGC-1, responsável pela oxidação de ácidos graxos e também maior expressão e translocação do GLUT 4 responsável pelo metabolismo glicolítico. No entanto, poucos são os estudos que relacionam a proteína Myo1c com IM e TF.

A PGC-1 α e PGC-1 β tem sido relacionada como reguladora mestra da disfunção mitocondrial e do metabolismo oxidativo. Assim, estas proteínas têm grande potencial na prevenção e no tratamento de doenças associadas com o prejuízo mitocondrial. A expressão da PGC-1 β é reduzida em certos modelos de doença cardíaca em animal, muitas vezes acompanhada por uma mudança da utilização do substrato energético ácidos graxos para glicose (Huss; Kelly, 2004; Huss; Kelly 2005). Nestes estudos, com modelo de sobrecarga cardíaca camundongos *knockout* para PGC-1 β apresentaram maior prejuízo da função cardíaca, tal como aumento do estresse oxidativo e uma menor taxa de utilização do metabolismo glicolítico em relação ao grupo controle.

Na busca dos mecanismos moleculares envolvidos no IM, recentes estudos têm identificado um perfil distinto de expressão de microRNAs nas diferentes regiões do músculo cardíaco com IM em humanos e em animais (VAN ROOIJ et

al., 2008; BOSTJANCICR et al., 2009; WANG *et al.*, 2012). Estes estudos têm revelado importantes papéis dos microRNAs em diferentes processos cardíacos, o que sugere que o TF, também exerce mecanismos regulatórios sobre a expressão de microRNAs em situações patológicas (CARE *et al.*, 2007; DONG et al., 2009; MONTGOMERY et al., 2011).

Por isso, os mecanismos bioquímicos e fisiológicos celulares responsáveis pelos efeitos benéficos do exercício físico sobre o remodelamento e função miocárdica após o IM estão sendo objeto de intensa exploração científica nos últimos anos.

2.6 MicroRNAs

Os microRNAs são um tipo de RNA que vem sendo estudados como reguladores gênicos de diversos tipos e processos celulares, inclusive nos cardiomiócitos. Os microRNAs são uma classe de RNA não codificante, responsáveis pela regulação pós-transcricional da expressão gênica de plantas e animais (KIM, 2005). Lin4 (do inglês *lineage-deficient-4*) foi descoberto em 1993 como o primeiro microRNA, sendo nesta época associado à regulação do desenvolvimento larval em *Caenorhabditis elegans* (LEE et al., 1993).

Até o momento, mais de 2578 sequências de microRNAs, de mais de 50 tipos de organismos diferentes foram catalogados no banco de dados miRBase, sendo que mais de 1800 microRNAs diferentes foram clonados e sequenciados em humanos (KAWASHIMA e SHIOI, 2011 ; KINGWELL, 2011; FIEDLER et al., 2012). Estudos de bioinformática estimam que este número pode ser bem maior, constituindo uma das maiores classes de reguladores gênicos (OLENA; PATTON, 2009).

2.7 Localização dos MicroRNAs

Os microRNAs podem estar presentes em regiões intergênicas do genoma, em íntrons e também em éxons, tanto de genes codificadores para proteína quanto de genes não codificadores (OLENA; PATTON, 2009).

Os microRNAs podem apresentar uma expressão constitutiva ou fase específica e estarem expressos em certos tecidos e ausentes em outros (Olena; Patton, 2009; Takada; Asahara, 2012). Os microRNAs intrônicos são coordenadamente expressos com o mRNA (RNA mensageiro) do gene no qual reside, formando um único transcrito primário (MONTGOMERY 2011; THUM, 2011). Existem também os transcritos primários codificadores para microRNAs, que possuem características semelhantes aos mRNA, como cap 5' m7G e cauda poli(A) na extremidade 3', sugerindo que estes também são transcritos pela RNA polimerase II. Alguns *loci* codificadores para microRNA encontram-se próximos do aparato de outros microRNAs, sugerindo que estes possuem suas próprias unidades de transcrição; outros encontram-se na forma de *cluster* e apresentam padrões de expressão semelhantes, implicando em sua transcrição em transcritos policistrônicos (KIM, 2005; DEE; GETTS, 2011 ; MONTGOMERY, 2011 ; OLENA E PATTON, 2009). É importante salientar que os precursores de microRNAs podem ser expressos em *clusters*, constituindo verdadeiros RNAs policistrônicos, o que ocorre com 37% dos microRNAs humanos (ALTUVIA et al., 2005; HE et al., 2005). A existência de *cluster* de 2 - 6 precursores de microRNAs sugere que a expressão de alguns tipos de microRNAs podem ocorrer de forma coordenada, provavelmente através de um único promotor (KIM, 2005; OLENA E PATTON, 2009; MAGNY et al., 2013).

2.8 Biogênese dos MicroRNAs

O processo de formação dos microRNAs tem início a partir do produto primário da transcrição do gene de microRNA que é denominado pri-microRNA, o qual apresenta uma estrutura de dupla hélice do tipo *hairpin* (~300 nucleotídeos) e é processado no núcleo por uma ribonuclease do tipo III denominada Drosha, e seu cofator DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*). A molécula resultante do processamento da Drosha é denominada de precursor do microRNA (pré-microRNA), o qual é exportado do núcleo para o citoplasma pela exportina 5, uma proteína de exportação nuclear dependente de Ran-GTP como cofator. No citoplasma, o pré-micro-RNA sofre a ação de outra ribonuclease do tipo III

denominada Dicer e dá origem a um pequeno e imperfeito duplex dsRNA que contém tanto a fita de microRNA maduro quanto sua fita anti-sense (KIM, 2005; OLENA; PATTON, 2009 ; THUM, 2011; KINGWELL, 2011). O produto da Dicer é incorporado por um complexo multimérico denominado RISC (*RNA-induced silence complex*), o qual contém proteínas da família argonauta como principais componentes. Apenas uma das fitas do duplex de microRNA permanece no complexo RISC para controlar a expressão pós-transcricional de genes alvos. A abundância do microRNA pode ser controlada na transcrição do pri-microRNA, durante qualquer passo da biogênese e no turnover do microRNA maduro (SCHWARZ *et al.*, 2008).

2.9 Mecanismo de Ação dos MicroRNAs

O microRNA maduro de fita simples, incorporado ao complexo protéico RISC, direciona o microRNA para a região de complementaridade na região 3'-UTR do mRNA alvo, podendo efetuar a regulação negativa da expressão de genes através de dois mecanismos principais (SCHWARZ *et al.*, 2008): clivagem do mRNA ou repressão traducional.

Uma vez incorporado no complexo RISC citoplasmático, o microRNA cliva o mRNA quando ocorrer complementaridade perfeita com o mRNA alvo ou reprime a tradução no caso de apresentar complementaridade parcial com o seu mRNA alvo (KIM, 2005; KREK *et al.*, 2005; FIEDLER *et al.*, 2010).

Em *C. elegans*, onde este processo foi descoberto, existe o pareamento de bases entre o microRNA do gene do *C. elegans* lin-4 e um dos alvos deste microRNA na região 3'-UTR do mRNA de um gene codificante da proteína lin-14, conforme figura abaixo. Por este pareamento de bases, o microRNA lin-4 reprime a tradução do mRNA da proteína lin-14 (LEE *et al.*, 1993).

Alguns estudos indicam que um único microRNA possa regular 200 RNAs apresentando funções totalmente diversas. Desta forma, os microRNAs constituem uma enorme e complexa rede regulatória da sinalização celular. Em plantas, a regulação dos microRNAs ocorre principalmente através de sua

interação perfeita com o mRNA, levando-o à degradação. No entanto, já se tem exemplos da ocorrência deste silenciamento gênico também em mamíferos (MONTGOMERY; VAN ROOIJ, 2011; NOZAWA et al 2012).

Em animais, a maioria dos microRNAs liga-se na região 3'-UTR do mRNA alvo com complementaridade imperfeita, e funciona como repressor traducional. Há numerosos exemplos em que a redução da produção da proteína regulada pelo microRNA não é acompanhada por mudanças correspondentes na abundância do mRNA (MALLORY et al., 2004).

Clancy et al. (2007) demonstraram que o cap na extremidade 5' e a cauda de poli (A) na extremidade 3' são necessários para a repressão completa da tradução. Entretanto, embora a maioria dos microRNAs animais reprimam tradução, estudos subsequentes mostram que os microRNAs podem exercer seus efeitos por uma variedade de mecanismos, como por exemplo, a clivagem do mRNA do Hoxb8 pelo microRNA-196 (BEILHARZ et al., 2009). A inibição da tradução continua sendo considerada como o mecanismo principal de regulação da expressão gênica por microRNAs em animais, porém, trabalhos recentes têm apontado outros mecanismos possíveis como deadenilação, degradação e captura dos mRNA nos *P-bodies* (NILSEN., 2007). Há também numerosos exemplos de microRNAs que desestabilizam e/ou degradam seus mRNA alvos (BAGGA et al., 2005).

2.10 MicroRNA e Coração

Os microRNAs podem regular, diretamente pelo menos 60% dos genes em uma célula. Por isso, não é surpreendente que microRNAs regulem programas genéticos na biologia cardiovascular e sejam críticos para o desenvolvimento cardíaco, função endotelial, metabolismo lipídico, hipertrofia ventricular e arritmias pós-IM (VAN ROOIJ; OLSON, 2007b; ZHANG, 2010; MONTGOMERY; VAN ROOIJ, 2011).

Estudos recentes relatam que o microRNA-1 é um dos mais abundantes microRNAs no coração e regula várias proteínas alvo que funcionam como fatores de transcrição, receptores, proteínas reguladoras da apoptose. Este microRNA

tem um papel crítico na determinação da hipertrofia de cardiomiócitos, regulando vários genes associados à função cardíaca, incluindo o NCX, a calmodulina, o MEF2A, o IGF1 e IGF1R. A superexpressão *in vitro* do microRNA-1 resultou na inibição da hipertrofia cardíaca. Por outro lado, com a inibição do microRNA-1 obteve-se a hipertrofia mais pronunciada do que após a estimulação com indutores convencionais de hipertrofia (HONGYAN; GUO-CHANG., 2012). Na inibição *in vivo* do microRNA-133 por uma única infusão do antagomir houve marcante e persistente hipertrofia cardíaca. Os resultados demonstram que os microRNA-133 e microRNA-1 são reguladores chave da hipertrofia cardíaca (CARE et al., 2007). Resultados do nosso laboratório mostram que a expressão gênica destes dois microRNAs também é diminuída na hipertrofia cardíaca fisiológica induzida pelo TF aeróbico (SOCl et al., 2011).

Em um estudo de revisão, Divakaran e Mann (2008) analisaram o perfil de expressão de 71 microRNAs cardíacos, de um total de 10 diferentes experimentos, dos quais 5 foram de tecidos humanos, 4 de ratos e 1 em estudo em miócito isolado. Foi verificado aumento na expressão de 25 microRNAs (7b, 7c, 10b, 15b, 21, 23a, 23b, 24, 27a, 27b, 29a, 103, 125B, 140*, 195, 199A, 199A*, 199B, 208, 210, 211, 214, 330, 341, 424), em uma ou mais amostras de miocárdio no coração de humanos e em modelos experimentais. Estes resultados sugerem que as mudanças nos padrões de expressão de microRNA em modelos experimentais podem fornecer uma visão para a nossa compreensão da regulação gênica, responsável pela função cardíaca em situações fisiopatológicas, não só em animais como em humanos (ANGHEL; POGWIZD, 2007; BARRINGHAUS; ZAMORE, 2009; KAWASHIMA; SHIOI, 2011).

2.11 MicroRNA e Infarto do Miocárdio

Ao longo dos últimos anos, vários estudos baseados em Microarray foram publicados, detalhando mudanças na expressão de microRNAs em coração normal *versus* coração infartado. Os resultados desses estudos, até o momento, demonstram que o número de microRNAs detectado por array (acima do limiar estatístico) é da ordem de aproximadamente 150-200 microRNAs. No entanto,

devemos lembrar que o perfil de expressão depende da região do coração analisada e que o tecido cardíaco representa uma mistura de tipos de células, incluindo cardiomiócitos, fibroblastos e células vasculares (BARRINGHAUS; ZAMORE, 2009).

Logo após o IM ocorre uma resposta de remodelamento patológico que inclui formação de fibrose, alterações metabólicas, crescimento cardíaco hipertrófico e disfunção ventricular. Os padrões de expressão de microRNAs após o período do IM são distintos, ao longo do tempo, e a análise da mudança da expressão gênica é um meio importante para definir as diferenças moleculares associadas às mudanças fenotípicas observadas em resposta ao IM. Recentes estudos publicados na literatura avaliaram a expressão de microRNAs em diferentes regiões do coração de animais submetidos ao IM, comparando o perfil de expressão aguda ou cronicamente, após a realização do IM (VAN ROOIJ et al., 2008; DONG et al., 2009; SHI et al., 2010; PORT et al., 2011).

A pesquisadora Eva van Rooij, a primeira a investigar o perfil de expressão dos microRNAs no coração de ratos infartados, verificou que entre os microRNAs alterados na borda do IM estava o microRNA-29 que possui como alvo diversos mRNAs que codificam proteínas envolvidas na fibrose, incluindo colágenos, fibrillinas e elastinas. De fato, a inibição do microRNA-29 com antagomir *in vitro* e *in vivo* induz a expressão de colágenos e a baixa expressão de microRNA-29 aumenta a expressão de colágeno em fibroblastos (van Rooij, Sutherland et al., 2008). Recentemente, estudo do nosso laboratório demonstrou que existe uma correlação entre o aumento da expressão do microRNA-29 e diminuição de colágeno cardíaco em ratos submetidos a um programa de TF aeróbico (SOCl et al. 2011). Com isso, observou que o microRNA-29 funciona, como um importante regulador da fibrose cardíaca, representando um potencial alvo terapêutico para o controle do tecido fibroso no coração.

Em outro estudo no coração de ratos infartados, verificou-se na fase inicial, após seis e vinte quatro horas do IM, o perfil de expressão de microRNA. Em comparação com o perfil de expressão nas áreas não infartadas, 38 microRNAs foram diferencialmente expressos em áreas infartadas e 33 microRNAs foram,

aberrantemente expressos na borda do IM. Notavelmente, a expressão do microRNA-21 foi, significativamente diminuída em áreas do IM, mas foi aumentada na borda do IM. Com a superexpressão do microRNA-21 por adenovírus (Ad-microRNA-21), verificou-se uma redução de 29% na dimensão do VE, após duas semanas da realização do IM (DONG et al., 2009).

Ainda com estudos no coração de ratos infartados, Shi et al. (2010), realizaram um microarray de microRNA em miocárdio de ratos com IM e verificaram que os níveis de expressão de dezessete microRNAs foram, significativamente alterados, sugerindo que os microRNAs, diferencialmente expressos podem servir como novos biomarcadores do IM. Isso poderia ser de grande interesse, uma vez que o IM é uma das doenças cardiovasculares mais graves e os microRNAs são importantes componentes celulares, estando sua disfunção associada a várias doenças (SHI et al., 2010).

Recentemente, Port et al., (2011) demonstrou por meio de bioinformática que vários genes e microRNAs em várias vias são regulados, temporalmente de maneira específica, sugerindo que microRNAs, diferencialmente regulados são alvos previstos para a expressão de diversos genes em diferentes processos biológicos envolvidos nas respostas ao IM. Desta forma, torna-se fundamental determinar os fatores envolvidos no prejuízo funcional provocado pela lesão do miocárdio que são associados ou promovidos pelos microRNAs.

Estudo realizado por Van Rooij e Olson (2007b) demonstram, por exemplo que ocorre aumento na expressão do microRNA-208 no IM, o qual é codificado no intron 27 do gene da alfa miosina de cadeia pesada (α -MCP), e verificou-se uma relação direta na expressão da α -MCP com o microRNA-208 e inversamente proporcional à beta miosina de cadeia pesada (β -MCP). Além disso, a deleção do gene do microRNA-208 em camundongos mostrou que este microRNA atua, diretamente no bloqueio pós-transcricional da β -MCP e foram resistentes ao desenvolvimento de fibrose, exercendo papel fundamental na manutenção da função cardíaca.

Kumarswamy et al. (2012), observaram que a terapia com superexpressão da SERCA2a foi acompanhada pela normalização da expressão do miR-1 e da

expressão do NCX cardíaco. Em animais com insuficiência cardíaca, os efeitos benéficos da terapia com superexpressão da SERCA2a foram, pelo menos em parte, mediado pela normalização do microRNA-1. Os autores evidenciaram que a via Akt-FOXO3a desempenhou papel importante na regulação dos níveis do microRNA-1, embora a ativação crônica no coração desta via tem sido mostrado ser prejudicial. Neste mesmo estudo os autores validaram em cardiomiócitos o NCX como alvo do miR-1.

Em outro estudo Aurora et al. (2012) também validaram o NCX como alvo do microRNA-214. Neste estudo os autores verificaram mudanças na expressão de microRNAs em coração normal *versus* coração com isquemia reperfusão. A isquemia reperfusão provoca um aumento da sobrecarga de cálcio nos cardiomiócitos, causando uma alteração para o modo reverso do NCX, resultando em mais sobrecarga de cálcio e maior comprometimento da função cardíaca. Aurora et al. (2012) demonstraram que camundongos deficientes para o microRNA-214 são sensíveis a lesão por isquemia reperfusão, evidenciada pelo aumento da apoptose cardíaca, fibrose e perda de função cardíaca. Neste elegante trabalho verificou-se que a inibição da expressão do NCX pelo miR-214 protege o miócito de danos, atenuando a ação do NCX, de aumentar o influxo de cálcio no citoplasma após a isquemia reperfusão.

Portanto, conhecer os microRNAs envolvidos nos processos celulares no coração, associados ao exercício físico, pode trazer respostas importantes para futuras intervenções como alvos terapêuticos no tratamento pós-IM (VAN ROOIJ; OLSON, 2007a; b; DIVAKARAN; MANN, 2008; VAN ROOIJ et al., 2008; WANG et al., 2012).

2.12 MicroRNA no Coração de Animais Submetidos ao Treinamento Físico

Nosso grupo foi o primeiro a verificar os efeitos do TF no perfil de microRNAs expressos no coração de animais. Foi realizado um estudo para investigar se a hipertrofia cardíaca fisiológica excêntrica induzida por dois protocolos de TF de natação, com intensidade moderada e alto-volume de treinamento, poderia induzir um perfil de expressão similar para os microRNAs.

Verificou-se que a expressão do microRNA-1, 133a e 133b (SOCl et al., 2011) foi semelhante a expressão observada na hipertrofia patológica (CARE et al., 2007). Além disso, os microRNA-1, 133a e 133b foram igualmente diminuídos com os dois protocolos de TF de natação, quando comparados aos animais sedentários. Portanto, esse resultados mostram um padrão de expressão similar, independente do tipo de hipertrofia cardíaca. No entanto, existem microRNAs, como o microRNA-29, que têm padrão de expressão induzida com o TF, que é antagônico ao observado em doenças como a hipertensão e insuficiência cardíaca. Desta forma, uma investigação mais aprofundada é necessária para delinear e diferenciar a expressão de microRNAs com treinamento antes ou após o IM.

A família do microRNA-29 tem alvos validado *in vitro* e *in vivo* para mRNAs de proteínas da matriz extracelular, tais como o colagénio IAI, IAI, IAIII, IIIAI, fibrilina e elastina no coração e vários tecidos e está envolvida na hipertrofia cardíaca patológica e em processos de insuficiência cardíaca (WANG et al., 2012a). A regulação do microRNA-29 *in vitro* e *in vivo*, usando um modelo de IM, aumentou a resposta fibrótica e a expressão de colágenos, enquanto a superexpressão de microRNA-29 em fibroblastos reduziu a expressão de colágeno (VAN ROOIJ et al., 2008). Conforme referido anteriormente, nosso grupo demonstrou que ratos submetidos a TF apresentaram expressão gênica aumentada do microRNA-29, que foram condizentes com o aumento do volume de TF. A regulação do microRNA-29 foi acompanhada de uma melhora na complacência ventricular e foi correlacionada com a diminuição da expressão gênica e proteica de colágeno I e III (SOCl et al., 2011). Estes dados sugerem que a expressão aumentada de microRNA-29 desempenha um papel importante no controle de proteção de colágeno cardíaco e hipertrofia induzida pelo TF aeróbico. No entanto, ainda não existem estudos relacionando os efeitos do TF no perfil de microRNAs expressos no coração de animais infartados.

2.13 Validação dos mRNA Alvos de microRNA

Sabe-se que cada microRNA pode regular até 200 transcritos, e mais de um microRNA pode regular, coordenadamente um único mRNA alvo (KREKN et

al., 2005). Isso nos leva a supor uma enorme possibilidade combinatória, sugerindo um modelo, altamente complexo de regulação da expressão gênica.

Existem vários algoritmos de predição de alvos de microRNA: miRanda (<http://www.micro-RNA.org//miranda.htm>), miRBase (<http://micro-RNA.sanger.ac.uk/targets/v2/>), PicTar (<http://pictar.bio.nyu.edu>) e TargetScan (<http://genes.mit.edu/targetscan>). Estes algoritmos têm como estratégia a análise do alinhamento das sequências de microRNA com as sequências das regiões 3'-UTR de mRNA através de fatores como: energia livre do híbrido formado e/ou requisitos do pareamento de bases na extremidade 5' (região *seed*) do microRNA e/ou a conservação filogenética dos sítios de ligação nas sequências 3'-UTRs (MAZIERE; ENRIGHT, 2007; DEE; GETTS, 2011).

A sequência *seed* é referida como região crítica para o reconhecimento do mRNA alvo pelo microRNA e corresponde aos primeiros 7-8 nucleotídeos a partir da primeira ou da segunda base da extremidade 5' do microRNA. Em particular, a extremidade 5' do microRNA é perfeitamente complementar à sequência correspondente do seu alvo, e é geralmente muito conservada entre microRNAs parálogos (MAZIERE; ENRIGHT, 2007).

Por mais rígidos que sejam os critérios avaliados pelos algoritmos de predição de alvos de microRNA, há uma infinidade e diversidade de alvos preditos para cada microRNA e uma grande parte desses pares microRNA-mRNA alvo não se confirma experimentalmente. O programa Tarbase (<http://www.diana.pcbi.upenn.edu/tarbase.html>) disponibiliza para consulta uma relação de pares microRNA-mRNA alvo previamente validados experimentalmente (KREK *et al.*, 2005; MAZIERE; ENRIGHT, 2007; NILSEN, 2007; MONTGOMERY *et al.*, 2011; MONTGOMERY; VAN ROOIJ, 2011).

A validação dos pares microRNA-mRNA *in vivo* ainda é um desafio, as metodologias atuais de validação biológica de alvos de microRNAs são trabalhosas e não permitem a validação dos alvos em larga escala. Os métodos utilizados para esta finalidade serão discutidos a seguir.

2.14 Modulação da Ação de MicroRNAs

O desenvolvimento de sistemas artificiais tem recorrido a várias abordagens para validação biológica de alvos de micro-RNAs das quais distinguiremos dois tipos principais: a primeira abordagem baseia-se na transcrição de um fragmento de DNA inserido num vetor de expressão na orientação inversa do DNA natural entre um promotor e um terminador de transcrição. O transcrito resultante é complementar do mRNA alvo natural e poderá interferir com a expressão do mensageiro *in vivo*. Esta estratégia conduz à inibição constitutiva de uma função alvo, porque neste sistema espera-se que a síntese do RNA anti-sense seja permanente.

A segunda estratégia, baseia-se na síntese de curtos fragmentos de DNA, ou de análogos ou derivados, complementares de uma porção da região alvo. Nesta abordagem, estas moléculas são exógenas e o seu efeito é transitório (CRAVADOR, 1998; DAVIS *et al.*, 2008).

Além destas duas abordagens existem outras formas de controle da expressão dos microRNAs como por exemplo os animais transgênicos, os quais podem ser manipulados para expressar ou reduzir a expressão de determinado microRNAs, no entanto, podem representar uma combinação de resultados primários e secundários (OKAMOTO *et al.*, 2004).

2.14.1 Métodos de Entrega por Vetores Virais

Métodos de entrega podem ser classificados em duas grandes categorias: a entrega direta ao miocárdio e administração sistêmica intravascular. Como tantos métodos específicos foram desenvolvidos para a entrega dos oligos dentro de cada categoria, a revisão a seguir vai destacar alguns princípios básicos de cada método de entrega (DAVIS *et al.*, 2008).

2.14.2 Injeção Direta no Miocárdio

A injeção direta de moléculas exógenas ou vetores de expressão no miocárdio talvez seja conceitualmente a abordagem mais óbvia. Este método envolve a introdução de uma seringa ou dispositivo similar, diretamente no

músculo cardíaco. Moléculas exógenas ou vetores de expressão tem acesso direto às células do miocárdio através do espaço intersticial. Este método tem sido utilizado em estudos que abordam uma grande variedade de modelos de doenças, incluindo doença cardíaca isquêmica, insuficiência cardíaca e distrofias musculares (SZATKOWSKI et al., 2011).

O método exato de injeção varia de acordo com o sistema experimental e objetivos do estudo. No geral, a injeção direta tem sido associada a excelentes índices de sobrevivência. As injeções podem ser administradas a cego, visando o coração através da parede torácica ou transdiafragma, através da cavidade abdominal. Este método parece bastante confiável e tem sido usado com eficácia por um número crescente de investigadores, especialmente em pequenos roedores (DAVIS et al., 2008).

A injeção também pode ser feita através da parede torácica, sob a orientação da tecnologia de ultrassom. A orientação com ultrassom aumenta a precisão da injeção direta, pois permite a visualização do coração. Apesar da simplicidade da técnica de injeção direta, é difícil a reprodutibilidade da mesma área do coração em magnitudes semelhantes entre animais num mesmo estudo, mesmo com a orientação do ultrassom. A injeção direta também pode ser feita com cirurgias com exposição do coração, permitindo a visualização direta para a entrega da droga ao tecido alvo (SZATKOWSKI et al., 2011).

2.14.3 Métodos de Entrega Intravascular

Através da circulação, moléculas exógenas ou vetores de expressão são aplicados em determinadas veias ou artérias e direcionados para toda a circulação e o coração. Usando a vasta rede capilar do coração as moléculas exógenas ou vetores de expressão têm acesso à maioria dos miócitos deste órgão. No entanto, uma série de obstáculos imposto complica esse cenário. O próprio sangue pode conter anticorpos neutralizantes para o vetor de escolha, especialmente quando eles estão com carga viral. O sangue também contém proteínas, como albumina e plaquetas, que podem absorver ou inativar o vetor. Há também barreiras físicas para a transdução, incluindo as células endocárdicas e do endotélio capilar. Uma

vez fora da luz vascular, o vetor deve também atravessar a matriz extracelular e preencher o espaço intersticial para transdução da célula alvo. O pulmão também tende a agir como uma esponja para vetores e quaisquer vetores inseridos no espaço venoso precisam passar pelo pulmão, antes de chegar ao coração para ejeção e circulação sistêmica. Finalmente, há a resposta do próprio hospedeiro. Moléculas exógenas sofrem a ação de RNAses, que degradam os oligonucleotídeos estranhos ao organismo. Além disso, grandes quantidades intravasculares de um material estranho pode levar à toxicidade de órgãos e/ou uma reação alérgica. Apesar das dificuldades iniciais, muitos grupos têm desenvolvido vários métodos de entrega vascular que podem resultar em alta eficiência tecidual específica (RAPER et al., 2003).

Desvantagens potenciais da injeção da veia da cauda de ratos incluem a exigência de alta dose de moléculas exógenas ou vetores de expressão e a possibilidade de expressão do vetor em tecidos não cardíacos, causando efeitos adicionais indesejáveis (RAPER et al., 2003).

3. JUSTIFICATIVA

Atualmente, não existem estudos publicados que observaram o efeito do TF aeróbico na expressão de microRNAs no músculo cardíaco com IM. Recentes estudos têm identificado um perfil distinto de expressão de microRNAs nas diferentes regiões do músculo cardíaco com IM em humanos e em animais (BOSTJANCIC *et al.*, 2009; VAN ROOIJ *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2012). Estes estudos têm revelado importantes papéis destes microRNAs em diferentes processos cardíacos, incluindo contratilidade cardíaca, controle da hipertrofia, apoptose, metabolismo, formação de fibrose e angiogênese, propiciando vislumbrar novos mecanismos regulatórios e potencial terapêutico para o tratamento do IM (CARE *et al.*, 2007; DONG *et al.*, 2009; MONTGOMERY *et al.*, 2011). Portanto, como TF promove melhora e adaptações benéficas ao sistema cardiovascular após o IM, a identificação de microRNAs específicos que modulem o processo de reparo do miócito pode servir de base para uso terapêutico. Assim sendo, este trabalho abre a perspectiva de uso desta informação para corrigir um processo patológico, pela superexpressão ou inibição *in vivo* de microRNA.

4. OBJETIVOS

4.1 Geral

O objetivo do presente estudo foi traçar o perfil de microRNAs na área remanescente ao IM de ratos Wistar submetidos ao TF de natação através da técnica de microarray e selecionar e confirmar a expressão de um microRNA específico por programas de bioinformática (TargetScan, Miranda e PicTar) que tenha alvos que possam estar envolvido com a melhora da função cardíaca com o TF. Também foi objetivo deste estudo, verificar a expressão do microRNA-29, do microRNA-1 e do microRNA-214 e dos respectivos alvos destes microRNAs, como o colágeno, NCX e SERCA2a.

4.2 Específicos

Primeira etapa:

- Avaliar o efeito do TF aeróbico através do teste máximo em esteira;
- Acompanhar a função ventricular com ecocardiografia antes e após o período de TF nos animais controles e infartados.
- Realizar o microRNA Array no tecido do VE, na área remanescente ao IM, nos ratos infartados e infartados treinados e, nessa mesma região do VE, nos ratos treinados e controle (sham).
- Selecionar um microRNA que apresente como alvo, genes de proteínas que regulam a função cardíaca e que apresente expressão alterada como efeito do TF na área remanescente ao IM
- Confirmar, por Real Time-PCR, do aumento ou diminuição da expressão do microRNA selecionado.
- Identificar os alvos dos microRNAs selecionados, através de programas de bioinformática (TargetScan, Miranda e PicTar).
- Verificar a expressão da proteína alvo do microRNA selecionado por Western blott.

- Verificar a expressão do microRNA-29, do microRNA-1 e do microRNA-214 e das respectivas proteínas, como o colágeno, NCX e a SERCA2a, alvos destes microRNAs.

Segunda etapa:

- Assim, o microRNA com expressão diferencial mais pronunciada, com maior ou menor expressão, que esteja envolvido com genes candidatos à regulação da função cardíaca e confirmado por Real Time-PCR será selecionado para ser inibido ou superexpresso e assim será utilizado para entender os mecanismos responsáveis pela melhora ou reversão da perda da função cardíaca do animal infartado.
- Na área remanescente ao IM as proteínas alvo consideradas importantes para melhorar ou reverter a perda da função cardíaca, as quais podem ser alvo do microRNA selecionado, terão sua expressão protéica confirmadas por técnica de Western blotting.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Para melhor entendimento do estudo realizado, optamos por separar em duas etapas e apresentar no início de cada uma delas, um desenho experimental.

Primeira etapa

5.1 Animais Experimentais:

Foram utilizados 28 ratos Wistar (peso corporal entre 250 e 300g). Todos os animais foram provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e receberam ração própria *ad libitum*. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura média de aproximadamente 25°C e submetidos a um regime de 12 horas claro/escuro (ciclo invertido), durante o período do experimento. Todos os protocolos utilizados neste estudo estavam de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (Processo nº 2010/07 aprovado em 25-03-2010).

Desenho experimental

FIGURA 1. Desenho experimental.

Os animais foram aleatoriamente distribuídos com n= 7 em cada grupo.

5.2 Protocolo de Cirurgia Cardíaca para Indução do Infarto do Miocárdio

Todos os ratos foram anestesiados com uma mistura de xilazina (0,67 mg/Kg) e Ketamina (0,33 mg/kg) intraperitoneal. Em seguida, os ratos foram entubados para ventilação mecânica e foi feita uma toracotomia esquerda sob condições assépticas através do terceiro espaço intercostal. O pericárdio foi aberto e, no grupo Infartado, a artéria coronária anterior descendente esquerda foi ligada distalmente a 2 mm de sua origem com fio de polipropileno não absorvível (5.0, ETHICON, Brasil), finalizando com o fechamento do tórax. O restante dos animais submetidos ao estresse cirúrgico, mas sem o IM, foram utilizados como controle (grupo SHAM). Após procedimento cirúrgico, os ratos passaram por um período de recuperação de 30 dias.

5.3 Avaliação da Morfometria e Função Ventricular

As medidas ecocardiográficas foram avaliadas conforme descrito anteriormente (Santos, Helber et al., 2009). O exame ecocardiográfico transtorácico foi realizado em todos os ratos, quatro e quatorze semanas após a cirurgia do IM, ou seja, pré e pós período de TF (descritos a seguir). Os exames foram realizados por um único observador e, em cada exame, foi coletado um total de três medidas para cada variável, sendo calculadas, posteriormente, as médias dessas medidas. O exame ecocardiográfico foi realizado com os animais anestesiados, por via intraperitoneal, com uma mistura de Xilazina (0,67 mg/Kg) e Ketamina (0,33 mg/kg).

O animal anestesiado foi colocado em decúbito lateral em uma mesa cirúrgica apropriada. Foi utilizado o equipamento Sonos 5500 (Philips, Andover, Mass) com transdutor de 5 a 12 MHz, que permite imagens com 2 ou 3 cm de profundidade. Para o registro das imagens foi utilizado o posicionamento de três eletrodos, permitindo a visualização do sinal eletrocardiográfico e o registro da frequência cardíaca. Foram obtidas vistas dos planos longitudinais e transversais do eixo para-esternal e vista apical das cavidades 2 e 4 do coração, para a avaliação do fluxo mitral através do Doppler. As imagens foram armazenadas em fitas de videocassete para análise posterior.

A partir da visualização do VE (corte transversal) no nível dos músculos papilares foram obtidas as medidas das seguintes variáveis pelo modo M: diâmetro diastólico (DDiVE) e sistólico (DSiVE) do VE, espessura da parede posterior (PPd) e anterior (PAd) do VE e massa do VE (MVe). Pelo método bidimensional foram obtidas a área diastólica (ADiVE) e sistólica (ASiVE) do VE.

A massa do VE (MVE) foi calculada segundo orientação da Sociedade Americana de Ecocardiografia, que estima a MVE através da utilização da seguinte fórmula matemática: $MVE = [(DDiVE + SIV + PPd)^3 - (DDiVE)^3] \times 1,047$, onde 1,047 (mg/mm³), que corresponde à densidade do miocárdio. As imagens foram armazenadas em fitas de videocassete para análise posterior.

A função sistólica foi avaliada pela fração de encurtamento da área transversal (%FEAT) que corresponde à diferença da área diastólica pela área sistólica, dividida pela área diastólica e multiplicada por 100, para representação em porcentagem de três regiões (basal, média e apical).

FIGURA 2- Visualização do VE (corte transversal) realizado pelo modo M. Foram obtidas as medidas das variáveis: diâmetro diastólico e sistólico do VE, espessura da parede posterior e anterior do VE, espessura relativa da parede ventricular, diâmetro do átrio esquerdo e massa do VE e pelo método bidimensional, a área diastólica e sistólica do VE. Figura A- animal sham. Figura B- animal infartado.

A função diastólica foi avaliada pelos valores derivados da curva de velocidade do enchimento na diástole pelo Doppler. A partir da curva de velocidade do fluxo diastólico mitral, a velocidade máxima das ondas E e A foi medida e a razão E / A, calculada.

FIGURA 3- Pelo método bidimensional foi feita a avaliação do fluxo mitral através do Doppler. A partir da curva de velocidade do fluxo diastólico mitral, a velocidade máxima das ondas E e A foi medida. Figura C- animal SHAM. Figura D- animal infartado.

5.4 Tamanho do Infarto do Miocárdio

O tamanho do IM foi medido pelo ecocardiograma bidimensional com base no plano basal, medial e apical transversal do VE. Três medidas do perímetro do endocárdio (PE) da cavidade do VE e o comprimento do segmento com IM (SI) de cada corte transversal foram obtidos durante a diástole. O tamanho do IM (TI) para cada segmento, expresso como a proporção do perímetro do VE de cada corte transversal, foi calculado pela equação: $TI (\%) = (SI / PE) \times 100$. O tamanho do IM total de cada animal foi calculado como a média dos TI (%) dos 3 segmentos. O IM avaliado por ecocardiograma foi definido como qualquer segmento com ecogenicidade aumentada e/ou mudança no espessamento do miocárdio ou movimento sistólico (hipocinesia, acinesia ou discinesia).

5.5 Protocolo de Treinamento Físico Aeróbico

O TF de natação foi realizado segundo protocolo de Hashimoto et al. (2004); Medeiros et al., (2004); Do Carmo et al. (2011); Fernandes et al. (2011); Fernandes et al. (2011); Soci et al. (2011). Os animais foram treinados durante 10 semanas, em sessões de 60 min, 1 vez ao dia, 5 vezes por semana, com aumento gradual da sobrecarga de trabalho (peso na cauda em porcentagem do peso corporal) até atingir 4 % do peso corporal (PC).

FIGURA 4 Visão esquemática do protocolo de TF de natação para ratos.

O protocolo utilizado foi caracterizado como TF de baixa a moderada intensidade e longa duração, sendo efetivo na promoção de adaptações cardiovasculares e no aumento da capacidade oxidativa muscular. Os ratos foram identificados e pesados semanalmente, para a correção da sobrecarga de TF em função do aumento do peso corporal. O TF foi realizado em um sistema de natação específico para ratos, com água aquecida a 30-32° C (FIGURA 10).

FIGURA 5- Aparato de TF de natação para ratos.

Quarenta e oito horas após a última sessão de TF, os animais foram submetidos a análises ecocardiográficas e, posteriormente, mortos por decaptação. As amostras necessárias foram coletadas e armazenadas adequadamente para análises histológicas, bioquímicas, celulares e moleculares.

5.6 Avaliação do Consumo Máximo de Oxigênio

Na última semana de TF os animais foram adaptados à corrida progressiva na esteira e submetidos a um teste progressivo de esforço máximo em esteira rolante adaptado de Brooks e White (1978), com incremento de carga de 3m/min a cada 3 min, até a exaustão, para a obtenção do VO_{2max} .

O consumo de oxigênio pico foi mensurado por determinação da fração expirada de oxigênio (FeO_2) durante o teste de exercício progressivo, até exaustão.

Neste protocolo os ratos foram colocados numa caixa metabólica sobre a esteira rolante, que serviu como câmara de mistura dos gases expirados. Esta câmara é conectada a um tubo na forma de “T”, para a retirada de amostras de ar (1.000 ml/min) para avaliação da FeO_2 em um analisador de gases. A outra via do tubo em “T” é utilizada para a aspiração do ar em fluxo contínuo (2.500 ml/min), regulável por bomba aspiradora. A parte da frente da caixa metabólica possui uma abertura de 2 mm da superfície, que permite a entrada de ar ambiente unidirecional sugado pela bomba aspiradora. O fluxo de ar na caixa metabólica é de 3.500 ml/min.

O rato foi colocado dentro da caixa metabólica por um período de repouso de 30 minutos para o registro do estado basal e, em seguida, o teste foi iniciado com velocidade de 3 m/min. Durante cada estágio (3min) de exercício realizado, foram analisadas as FeO_2 dos gases contidos no ar da caixa metabólica. Foram consideradas as frações expiradas dos trinta últimos segundos de cada estágio para a determinação do VO_{2max} de cada estágio.

Ao atingir a exaustão, o rato foi mantido na caixa metabólica por aproximadamente 3 min e as frações expiradas foram registradas para verificar a recuperação do animal e o funcionamento dos analisadores.

O consumo de oxigênio foi calculado através da seguinte fórmula matemática:

$$VO_2 = \text{fluxo de ar} \times (FiO_2 - FeO_2) / \text{peso corporal}$$

Onde:

$$VO_2 = \text{ml.Kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$$

Fluxo de ar = 1000 ml/min (analisador) + 2500 ml/min (bomba de aspiração) = 3500 ml/min.

FiO_2 = fração de oxigênio inspirada (ar ambiente).

FeO_2 = fração de oxigênio expirada (caixa de mistura).

Peso corporal = Kg.

Para a análise dos dados foi utilizado o maior valor do VO_2 .

5.7 Índice Hipertrofia Cardíaca

O coração foi dissecado, tendo sido separados o VE e o VD (ventrículo direito). A hipertrofia cardíaca (HC) foi avaliada pelo peso úmido do VE corrigido pelo PC do animal (mg/g).

5.8 Extração de RNA Total

O VE foi separado em três regiões: região do IM (parte com fibrose e com cor branca que delimita bem essa região do ventrículo), região da borda do IM (região de aproximadamente 2 mm próxima ao IM) e região remanescente ao IM (região restante do VE) nos ratos infartados, infartados treinados, treinados e controle (sham).

O RNA total do coração foi isolado na região remanescente ao IM, em 1 ml de Trizol (Invitrogen), conforme indicação do fabricante. As amostras de RNA foram diluídas na proporção de 1:100 em água, e analisadas por espectrofotometria em 260 a 280nm. Para conversão de RNA em DNA complementar (cDNA) foi utilizado 1 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ de RNA total, 1 μL de dNTP mix 10

mM, 1 μL de random hexamers ($50 \text{ ng. } \mu\text{L}^{-1}$) e 8 μL de H_2O DEPC, de acordo com o fabricante (Invitrogen, Brasil).

5.9 Cleanup para Microarray

Cleanup: é uma técnica que utiliza colunas para limpeza do RNA total. Para a utilização da plataforma de *microarray*, necessariamente deve ser utilizado um *cleanup* (kit da Ambion) nas amostras de tecido do ventrículo, uma vez que a extração do RNA total feita pelo método do *tryzol*. Utilizamos essa técnica, exatamente com o intuito de retirar das amostras de resíduos de fenóis.

5.10 MicroRNA Microarrays

A plataforma de microarray foi baseado no sistema Sanger miRBase Release 15.0, com CHIP 2.0 e realizado em parceria com o laboratório de biologia molecular do Instituto de Câncer de São Paulo pelo nosso laboratório, com os kits da companhia AFFYMETRIX, USA.

5.11 Microarray

A análise dos dados do *microarray* de microRNA foi realizada usando ferramentas específicas do software *Bioconductor/R*. Inicialmente, os dados foram importados e após análises de controle de qualidade das intensidades de sinal de cada experimento, foi realizado o pré-processamento pela metodologia de RMA (*robust multiarray average*). Em seguida, foi aplicado um filtro de desvio interquartilico de 0,5 para excluir da análise os microRNAs que apresentaram pouca variação entre os *microarrays* e não são informativos para a detecção de microRNAs diferencialmente expressos. Foi realizado o *microarray* com o $n=1$ para cada grupo, sendo que para cada grupo foi realizado um pool com a mesma quantidade de RNA total de três amostras por grupo.

Para a escolha do microRNA foi realizado um filtro com o seguinte critério:

- Os microRNAs foram selecionados e separados de acordo com dois padrões de expressão. No primeiro padrão de expressão o

microRNA selecionado do grupo SED-IM deveria apresentar expressão maior que o grupo SED-SHAM, o grupo TR-SHAM deveria apresentar expressão menor que o grupo SED-SHAM e o grupo TR-IM deveria apresentar expressão menor que o grupo SED-IM. No segundo padrão de expressão os microRNAs selecionados do grupo SED-IM deveria apresentar expressão menor que o grupo SED-SHAM, o grupo TR-SHAM deveria apresentar expressão maior que o grupo SED-SHAM e o grupo TR-IM deveria apresentar expressão maior que o grupo SED-IM.

- Em seguida, foram excluídos todos os microRNAs que apresentavam expressão menor do que 1 U.A.
- Por último, que a diferença do grupo TR-SHAM para o grupo SED-SHAM fosse maior do que 2 U.A.

Foi realizada a confirmação do aumento e/ou diminuição dos microRNAs pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real Time-PCR), e das proteínas alvo dos microRNAs no VE dos animais, por técnica de Western blotting.

5.12 Real Time-PCR

O ensaio da análise da expressão gênica foi feito de acordo com o protocolo descrito no Taqman Gold RT-PCR kit. Nesse ensaio, a primeira fita de cDNA (1-6 µl) foi amplificada em 25 µl de reação, contendo 12,5 µl de Taqman transcriptase reversa, 2x da mistura SYBR Green PCR Mastermix (Applied Biosystems) e *primers* específicos para cada microRNA analisado, comercializados pela Ambion ou Applied para o gene desejado (900nM). Foi utilizado como controle normalizador o gene U6 conforme descrito acima.

Os passos da reação em cadeia da polimerase em tempo real foram os seguintes: 1) denaturação a 95°C por 10 minutos para a ativação da enzima AmpliTaq Gold; 2) 45 ciclos a 95°C por 15 segundos (denaturação) e 60°C por 1

minuto (anelamento). As fluorescências foram lidas em detector ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems).

5.13 Western Blotting

As amostras coletadas foram imediatamente homogeneizadas por meio de homogenizador Polytron (PT-K Brinkman Instruments) em volume (9x seu peso) de tampão de lise hipotônico, contendo tampão de fosfato de potássio 50mM (pH 7), sacarose 0,3 M, DTT 0,5 mM, EDTA 1mM (pH 8), PMSF 0,3 mM, NaF 10mM e coquetel de inibidor de fosfatase (1:1000, Sigma Aldrich EUA) e colocadas em banho a 100°C por 10 min. As amostras foram mantidas no gelo e centrifugadas (3.000 rpm X 10 min) e depois armazenadas a -20 °C. Os homogenatos foram centrifugados por 15 minutos, a 12.000 rpm, a 4°C. O sobrenadante foi retirado, diluído em tampão Laemmli na proporção de 1:4 e aquecidos em água fervente por 5 min (LAEMMLI, 1970) para ser posteriormente submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 8%) no aparelho para minigel (*Mini-Protean*). A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de nitrocelulose, utilizando-se um aparelho da *Bio-Rad* por aproximadamente 2h sob 120 volts. As membranas foram bloqueadas pela incubação com 10 ml de solução bloqueadora (leite desnatado Molico 5%, Tris 10mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,02%) a 4°C, *overnight* ou por 2h na temperatura ambiente. Estas membranas foram posteriormente incubadas a 4°C com o anticorpo primário para as proteínas escolhidas para estudo. As bandas existentes nas membranas incubadas foram visualizadas através do uso do Kit para detecção por quimioluminescência (Amersham, ECLTM Western Blotting Detection). Após medir a intensidade das bandas (Molecular imager, ChimiDoc XRS, Bio-Rad), as bandas escaneadas foram analisadas utilizando o programa de análise de densitometria óptica *Scion Image*, fornecido gratuitamente pela NIH (USA) via Internet (<http://www.scioncorp.com/>).

5.14 Análise Quantitativa de Fibras de Colágeno no Miocárdio

O VE foi fixado em 6% de formaldeído e embebidos em parafina. Após isso, foram feitos cortes em secções de 5 mM, ao nível do músculo papilar. A fração volumétrica de colágeno (CVF) do miocárdio intersticial foi determinada usando a luz direta dos tecidos preparados com Picrosirius, conforme já descrito (ROCHA et al 2007). O colágeno intersticial foi determinado por um sistema de análise de imagem assistida por computador (Imagem-Pro Plus, Media Cybernetics, Silver Spring, MD) a partir de 20 campos seleccionados no microscópio com projeção (x200) na RI e na BR+RM do ventrículo esquerdo.

A FVC foi calculada como a soma de todas as áreas do tecido conjuntivo dividido pela soma de todas as áreas do músculo em todos os campos.

5.15 Imagem Histológica do Tamanho do Infarto

Foram feitos cortes, representativos, no criostato para retratar a área infartada e tecido adjacente ao infarto. A organização do tecido foi evidenciado por coloração com hematoxilina eosina (H/E).

5.16 Determinação da Hidroxiprolina

O colágeno do VE foi quantificada a partir da concentração de hidroxiprolina (OH-prolina), por um método modificado, como já descrito (BERGMAN; LOXLEY, 1970). Todas as amostras de tecido (100 mg) foram obtidas da mesma área da parede do VE. Os tecidos foram hidrolisados em 1 ml de HCl (8N) à 115 ° C, durante 18 h em tubos de vidros vedados. Foi realizado a filtragem do produto das amostras. Um oxidante (cloramina T, 0,5 ml) foi adicionado, agitado em vórtex e permaneceu em repouso durante 4 min. Em seguida, foi adicionado 1,0 ml de reagente de Ehrlich (3 ml de reagente de Ehrlich, mais 16 ml de isopropanol). Os tubos foram vortexado, durante 4 minutos e depois mantido à 60 °C, durante 21 min. A intensidade da coloração foi medida à 558 nm em temperatura ambiente após 1 hora. A concentração de OH-prolina foi determinada a partir do valor de 150 µl de amostra em cada duplicata, utilizando uma curva de concentração padrão

com 0,5-5µg de 1-OH-prolina. Os dados são expressos como miligramas por grama de OH-prolina.

5.17 Medida da Atividade da Ca^{2+} -ATPase

O [^{32}P]-fosfato inorgânico (^{32}Pi) foi obtido a partir do Instituto de Investigação Energético Nuclear de São Paulo. [γ - ^{32}P]-adenosina-trifosfato ([γ - ^{32}P] ATP), foi preparado como descrito por Maia et al., (1983).

A região remanescente do coração foi lavada com uma solução fria (4° C), contendo 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 11,9 mM de NaHCO_3 , 0,36 mM NaH_2PO_4 , 5,5 mM de glucose, 1,8 mM de CaCl_2 e 0,4 mM de MgCl_2 , equilibrada com uma mistura gasosa carbogênica (95% O_2 / 5% CO_2 , pH 7,4) e armazenado imediatamente a -80 ° C até à sua utilização. No dia da preparação, o tecido foi picado e homogeneizado utilizando um dispersor Ultraturrax (IKA Works, Inc.), 9500 rpm durante 10 segundos por três vezes, com um intervalo de 20s entre os passos, em uma solução fria contendo: 0,2 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonilo, 2 mM de ditiotritol, 0,4 mg / mL de aprotinina, 0,2 mM EDTA e 250 mM sacarose em 5 mM Tris-HCl (pH 7,4). A preparação foi ultracentrifugada a 110.000 g durante 35 min. O *pellet* foi ressuspensão no mesmo tampão, sem EDTA e ditiotritol e armazenadas a -80 ° C. A concentração de proteína foi determinada pelo ensaio de proteínas de Lowry, utilizando albumina de soro bovino como padrão (LOWRY et al., 1951).

As frações obtidas a partir do homogeneizado de tecido cardíaco remanescente (0,2 mg / ml , a concentração final de proteína) foram incubados durante 1h em meio (0,5 ml , 37 ° C), contendo 50 mM de MOPs -Tris (pH 7,4) , 5 mM de NaN_3 , 0,2 mM de EGTA , 1 mM de [γ - ^{32}P] ATP (sal dissódico ; atividade específica ~ $1,5 \times 10^{10}$ Bq / mmol), 4 mM de MgCl_2 e 100 mM de KCl , na presença ou na ausência de 3 µM tapsigargina . O CaCl_2 total necessário para a concentração de Ca^{2+} livre de 50 µM foram calculados de acordo com Sorenson et al. (1986). Tapsigargina sensível ao Ca^{2+} ATPase (relacionado com a SERCA) foi determinada pela diferença entre a Ca^{2+} -ATPase medido na ausência (total Ca^{2+} - ATPase) e presença de tapsigargina . A atividade Ca^{2+} - ATPase resistente a tapsigargina foi relacionada com a Ca^{2+} -ATPase da membrana

plasmática (PMCA). As reações foram interrompidas por adição de 1 ml 26% (w/v) de carvão em 0,1 N HCl . Os tubos foram centrifugados a 1500 x g durante, 15 min a 4 ° C, e 0,25 ml de sobrenadante contendo o ^{32}Pi liberado foi quantificado por cintilação líquida . Os resultados foram expressos como nmol de Pi libertado $\times \text{mg}^{-1}$ de proteína /h ou a percentagem do total da atividade Ca^{2+} ATPase.

5.29 Análise dos Dados

Os dados foram analisados utilizando a análise de variância ANOVA de duas vias para comparar os valores dos grupos, e o teste de Bonferroni foi usado para verificar a diferença significativa entre as médias (Sigma software, Stat). Foi adotado para todos os experimentos um $p < 0,05$ de significância. Todos os resultados foram apresentados na forma de média $\pm$ desvio-padrão.

6. RESULTADOS

A seguir serão descritos os resultados da massa corporal, hipertrofia cardíaca, medida do consumo de oxigênio e as medidas ecocardiográficas.

6.1 Massa Corporal

Apesar da massa corporal (MC) ter sido avaliada semanalmente, optamos por mostrar apenas os valores finais para deixar o resultado mais claro. A Tabela 1 mostra a massa corporal no dia do procedimento cirúrgico (sham ou IM) a que os animais foram submetidos. Além disso, mostra a massa corporal antes e após a realização do protocolo de TF. Os resultados apresentados na Tabela 1 demonstram que a massa corporal não apresentou diferença em cada grupo no dia do procedimento cirúrgico (SED-SHAM: $328 \pm 5,4$; TR-SHAM: $331 \pm 7,6$ SED-IM: $330 \pm 6,4$; TR-IM: $331 \pm 6,2$ g), pré (SED-SHAM: $353 \pm 9,1$; TR-SHAM: $354 \pm 13,3$ SED-IM: $348 \pm 12,4$; TR-IM: $346 \pm 13,6$ g) e pós (SED-SHAM: $338 \pm 14,0$; TR-SHAM: $387 \pm 2,6$ SED-IM: $382 \pm 14,6$; TR-IM: $387 \pm 12,3$ g) período de TF. Entretanto, todos os grupos apresentaram massa corporal aumentada no período pré-treinamento em relação ao dia do procedimento cirúrgico, e no período pós-treinamento em relação ao início do protocolo de TF ($p < 0,05$).

TABELA 1- Massa corporal no dia do procedimento cirúrgico, pré e pós- protocolo de TF de dez semanas. Os dados foram analisados pela análise de variância (ANOVA) e o teste de Bonferroni foi usado para verificar a diferença significativa entre as médias, $n = 7$, por grupo. Média $\pm$ Desvio-Padrão. * $p < 0,05$ pós vs. pré e # $p < 0,05$ pré vs. inicial.

Grupos	MC(g) (inicial)	MC (g) (pré treino)	MC (g) (pós treino)
SED-SHAM	$328 \pm 5,4$	$353 \pm 9,1^{\#}$	$388 \pm 14,0^*$
TR-SHAM	$331 \pm 7,6$	$354 \pm 13,3^{\#}$	$387 \pm 2,6^*$
SED-IM	$330 \pm 6,4$	$348 \pm 12,4^{\#}$	$382 \pm 14,6^*$
TR-IM	$331 \pm 6,2$	$346 \pm 13,6^{\#}$	$387 \pm 12,3^*$

6.2 Hipertrofia Cardíaca

A Figura 13 mostra a relação do peso do VE/MC (mg/g). A hipertrofia do VE foi 12,3% no grupo TR-SHAM ($2,43 \pm 0,1 \text{ mg/g}$; $p < 0,05$), 12,5% no grupo SED-IM ($2,44 \pm 0,2 \text{ mg/g}$; $p < 0,01$) e 15,3% no grupo TR-IM ($2,5 \pm 0,1 \text{ mg/g}$; $p < 0,05$) comparados ao grupo SED-SHAM ($2,17 \pm 0,2 \text{ mg/g}$).

FIGURA 6-Hipertrofia cardíaca dada pela relação do peso do VE/MC (mg/g) pós-protocolo de TF de dez semanas. Os dados foram analisados pela análise de variância (ANOVA) e o teste de Bonferroni foi usado para verificar a diferença significativa entre as médias, $n = 7$, por grupo. Média $\pm$ Desvio Padrão. * $p < 0,05$, vs SED-SHAM.

6.3 Medida do Consumo de Oxigênio

A Figura 14 mostra o $\text{VO}_{2\text{max}}$ dos animais pós-protocolo de TF. Observa-se a eficácia do TF com aumento 14% do $\text{VO}_{2\text{max}}$ para o grupo que TR-SHAM ($53,81 \pm 2,6 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) em relação ao grupo SED-SHAM ($39,09 \pm 1,9 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$), e um aumento de 12% para o grupo TR-IM ($48,96 \pm 2,8 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) em relação ao grupo SED-IM ($43,09 \pm 1,7 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$). Verificou-se também que o $\text{VO}_{2\text{max}}$ atingido pelo grupo TR-SHAM foi 9% ($46,08 \pm 2,2 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) maior em relação ao grupo TR-IM ($39,09 \pm 1,9 \text{ mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$).

FIGURA 7-O consumo máximo de oxigênio pós-protocolo de TF de dez semanas. Os dados foram analisados pela análise de variância (ANOVA) e o teste de Bonferroni foi usado para verificar a diferença significativa entre as médias, $n = 7$, por grupo. Média $\pm$ Desvio-Padrão. * $p < 0,05$, vs respectivos controles, # $p < 0,05$ vs TR-IM.

6.4 Medidas Ecocardiográficas

A Tabela 2 resume os resultados da avaliação da morfometria (porcentagem do IM, massa e espessura da parede anterior e posterior do VE), da função ventricular analisada pela %FEAT (função sistólica) e a relação E/A (função diastólica), realizados através de avaliação ecocardiográfica pré e pós-período de TF. Concomitante ao exame ecocardiográfico foi feito o registro de eletrocardiograma de maneira a garantir a mesma frequência cardíaca em todos os grupos experimentais. O resultado da frequência cardíaca, embora não apresentado na referida tabela, não foi diferente entre os grupos.

A porcentagem do tamanho do IM foi de 30% no grupo SED-IM e 29% no grupo TR-IM, antes do período de TF e esta porcentagem se manteve semelhante após o período de TF, sendo 29% no grupo SED-IM e 28% no grupo TR-IM.

A massa do VE analisada pelo ecocardiograma demonstrou um aumento de 24% no grupo TR-SHAM ($1,12 \pm 0,03$), quando comparado com o pré-TF

($0,85 \pm 0,02$), e de 16% quando comparado com o grupo SED-SHAM ($0,94 \pm 0,02$) após o período de TF.

A espessura da parede anterior, após o período de TF foi semelhante entre SED-IM ($1,28 \pm 0,003$) e TR-IM ($1,30 \pm 0,003$) e entre SED-SHAM ($1,76 \pm 0,002$) e TR-SHAM ($1,80 \pm 0,003$), porém, ambos os grupos SED-IM e TR-IM apresentaram tamanho 27% menor quando comparados com seus respectivos SED-SHAM e TR-SHAM. A espessura da parede posterior do grupo TR-SHAM ($1,72 \pm 0,003$), SED-IM ($1,74 \pm 0,02$) e TR-IM ($1,82 \pm 0,01$) foram 14,0%, 14,4% e 18,8%, respectivamente, maior que no grupo SED-SHAM ($1,47 \pm 0,01$) após o TF.

Não houve diferença entre os grupos SED-SHAM (70%) e TR-SHAM (71%) com relação a %FEAT, porém, o grupo TR-IM (42%) teve uma melhora da %FEAT em relação ao período pré-TF (35%) e ao grupo SED-IM (33%), enquanto o grupo SED-IM teve um prejuízo da %FEAT, após o período de TF (33%).

A relação das ondas E/A não apresentou diferença entre os grupos SED-SHAM ($1,40 \pm 0,1$) e TR-SHAM ($1,55 \pm 0,4$). No entanto, o grupo TR-IM ($1,74 \pm 0,1$) teve uma diminuição de 11% da relação E/A em comparação ao período anterior ao TF ($1,96 \pm 0,1$) e de 17% em relação ao grupo SED-IM ($2,05 \pm 0,1$), após o período de TF. O grupo SED-IM teve um aumento de 6% em relação ao período anterior ao protocolo de treinamento ($1,93 \pm 0,1$ vs. $2,05 \pm 0,1$).

TABELA 2-Morfometria e índices de função sistólica e diastólica obtidos pelo exame ecocardiográfico, pré e pós o protocolo de TF de dez semanas. Média $\pm$ Desvio Padrão. Os dados foram analisados pela análise de variância (ANOVA) e o teste de Bonferroni foi usado para verificar a diferença significativa entre as médias. # $p < 0,05$, pré ou pós vs respectivo pré ou pós do grupo SED-SHAM, & $p < 0,05$, pré ou pós vs respectivo pré ou pós do grupo TR-SHAM, \$ $p < 0,05$, pré ou pós vs respectivo pré ou pós do grupo SED-IM e * $p < 0,05$ pós vs pré do mesmo grupo.

A seguir serão descritos os resultados da expressão do microRNA-29a, microRNAs-29b e microRNAs-29c, a expressão dos colágenos IAI e IIIAI, a análise quantitativa das fibras de colágeno e hidroxiprolina na RM, na BR e RI do IM.

6.5 Expressão do MicroRNA-29a

A expressão do microRNA-29a foi reduzida em 49% na RI e 16% na BR no grupo SED-INF em comparação com o grupo SED-SHAM. No entanto, a expressão do microRNA-29a foi aumentada em 36% na RM no grupo SED-INF em comparação com o grupo SED-SHAM. A expressão do microRNA-29a foi aumentada em 15% na RI, 16% na BR e de 25% na RM, respectivamente, no grupo TR-SHAM comparado com o grupo SED-SAHM. No grupo TR-INF o microRNA-29a foi aumentado 32% na BR e 52% na RM em comparação com SED-INF (Figura 15, $p < 0,05$).

FIGURA 8-Expressão do microRNA-29a na região infartada (A), na borda da região infartada (B) e na região remanescente ao infarto (C) realizada por real-time PCR. Todos os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão e em porcentagem em relação ao grupo SED-SHAM, n = 7, por grupo. * Diferença significativa vs. SED-SHAM, # vs. SED-INF, & vs. TR-SHAM (P <0,05).

6.6 Expressão do MicroRNA-29b

A expressão do microRNA-29b foi diminuída em 33% na RI e ocorreu um aumento de 60% na RM no grupo SED-INF em comparação com o grupo SED-SHAM. A expressão do microRNA-29b não foi alterada com o treinamento. No entanto, a expressão do microRNA-29b foi aumentada em 27% na BR e 65% na RM no grupo TR-INF em comparação com o grupo TR-SHAM e na RI a expressão do microRNA-29b apresentou uma diminuição de 35% no grupo TR-INF comparado com o grupo TR-INF (Figura 16, p <0,05).

FIGURA 9-Expressão de microRNA-29b na região infartada (A), na borda da região infartada (B) e na região remanescente ao infarto (C) realizada por real-time PCR. Todos os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão e em porcentagem em relação ao grupo SED-SHAM, n = 7, por grupo). * Diferença significativa vs. SED-SHAM, # vs. SED-INF, & vs. TR-SHAM (P <0,05).

6.7 Expressão do MicroRNA-29c

A expressão do microRNA-29c foi reduzida em 28% na RI, em 31% na BR e 15% na RM no grupo SED-INF em comparação com o grupo SED-SHAM. A expressão do microRNA-29c foi aumentada em 38% na RI, em 34% na BR e 42% na RM no grupo TR-SHAM comparado com o grupo SED-SHAM. Da mesma forma, o microRNA-29c foi aumentado em 63% na BR e 55% na RM no grupo TR-INF em comparação com o grupo SED-INF, no entanto, a expressão do microRNA-29c não foi alterado com o treinamento na RI no grupo TR-INF (Figura 17, p <0,05).

FIGURA 10- Expressão do microRNA-29c na região infartada (A), na borda da região infartada (B) e na região remanescente ao infarto (C) realizada por real-time PCR. Todos os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão e em porcentagem em relação ao grupo SED-SHAM, n = 7, por grupo. * Diferença significativa vs. SED-SHAM, # vs. SED-INF, & vs. TR-SHAM (P <0,05).

6.8 Expressão do Colágeno IAI e IIIAI

A expressão do COLIAI e COLIIIAI foi diminuída em 56% e 51%, respectivamente, no grupo SED-INF comparado com o grupo de SED-SHAM na RI. Em contraste, a expressão do COLIIIAI COLIAI foi aumentada em 22% e 25%, respectivamente, no grupo SED-INF comparado com o grupo de SED-SHAM na BR e aumento em 35% e 19%, respectivamente, no grupo SED-INF comparado com o grupo SED-SHAM na RM. A expressão do COLIAI foi reduzida em 53% na RI, 55% na BR e 43% na RM no grupo TR-SHAM comparado com o grupo SED-SHAM. A expressão do COLIIIAI foi reduzida em 57% no RI, 56% na BR e de 43% na RM no grupo TR-SHAM comparado com o grupo SED-SHAM. A expressão do COLIAI e COLIIIAI não foi alterada com o treinamento na RI no grupo TR-INF, mas com o treinamento foi reduzida de 63% e 62%, respectivamente, no grupo TR-INF em comparação com o grupo SED-INF na RM, enquanto a expressão do COLIIIAI foi diminuída de 16% no grupo TR-INF em comparação com o grupo SED-INF na BR. No entanto, a expressão COLIAI foi aumenta em 17% no TR-INF comparado com o grupo SED-INF na BR (Figura 18, p <0,05).

FIGURA 11-Expressão do colágeno (COLIAI) na região infartada (A), na borda da região infartada (B) e na região remanescente ao infarto (C) realizada por real-time PCR. Todos os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão e em porcentagem em relação ao grupo SED-SHAM, n = 7, por grupo. * Diferença significativa vs. SED-SHAM, # vs. SED-INF, & vs. TR-SHAM (P <0,05).

A

B

C

FIGURA 12-Expressão do colágeno (COLIAIII) na região infartada (A), na borda da região infartada (B) e na região remanescente ao infarto (C) realizada por real-time PCR. Todos os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão e em porcentagem em relação ao grupo SED-SHAM, $n = 7$, por grupo. * Diferença significativa vs. SED-SHAM, # vs. SED-INF, & vs. TR-SHAM ($P < 0,05$).

6.9 Análise Quantitativa das Fibras de Colágeno

A Fração volumétrica de colágeno foi reduzida de 18,7% (borda do IM + região remanescente do IM) no grupo TR-INF comparado com o grupo SED-INF ($1,8 \pm 0,1$ vs $1,5 \pm 0,1 \mu\text{m} / \text{área}$) (Figura 20, $p < 0,05$).

FIGURA 13- Cortes histológicos representativos da região infartada do miocárdio (A). Os painéis mostram as fibras de colágeno na região infartada e na RM dos grupos SED-INF e TR-INF, n = 7, por grupo (B). Análise quantitativa das fibras de colágeno no miocárdio (C). Todos os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. * Diferença significativa vs TR-INF (BR +RM), # vs SED-INF e TR-INF (BR + RM) ($P < 0,05$).

6.10 Análise Quantitativa de Hidroxiprolina

A concentração (mg/g) de colágeno do VE quantificada a partir da concentração de hidroxiprolina (OH-prolina), foi reduzida em 38% na BR e 36% na RM do TR-SHAM em relação ao grupo SED-SHAM. No entanto, a concentração de OH-prolina foi aumentada em 19% na BR e 25% na RM no grupo SED-INF em relação ao grupo SED-SHAM, enquanto apenas na RM ocorreu redução de 35,2% no grupo TR-INF em relação ao grupo SED-INF (Figura 21, $p < 0,05$).

FIGURA 14-Quantificação de colágeno a partir da concentração(mg/g) de hidroxiprolina (OH-prolina) na região infartada (A), na borda da região infartada (B) e na região remanescente ao infarto (C) realizada por real-time PCR. Todos os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão e em porcentagem em relação ao grupo SED-SHAM, $n = 7$, por grupo. * Diferença significativa vs. SED-SHAM, # vs. SED-INF, & vs. TR-SHAM ($P < 0,05$).

A seguir serão descritos os resultados da expressão do microRNA-1 e do microRNA-214, a expressão protéica da Serca2 e do NCX e a medida da atividade da Ca^{2+} -ATPase. Os resultados são referentes à região RM ao IM.

6.11 Expressão do MicroRNA-1 e do MicroRNA-214

A expressão do microRNA-1 foi diminuída 52% no grupo SED-INF e 55% no grupo TR-SHAM, respectivamente em comparação com o grupo SED-SHAM. Enquanto, no grupo TR-INF a expressão do microRNA-1 foi 49% maior em comparação com o grupo SED-INF (Figura 30A, $p < 0,05$).

A expressão do microRNA-214 foi aumentada 54% no grupo SED-INF em comparação com o grupo SED-SHAM e diminuiu 51% no grupo TR-SHAM em comparação com o grupo SED-SHAM. No grupo TR-INF o microRNA-214 foi diminuído 29% em comparação com SED -INF (Figura 31B, $p < 0,05$).

A

B

FIGURA 15- Expressão do microRNA-1 (A) e microRNA-214 (B) realizado por PCR em tempo real. Percentual em relação ao grupo SED-SHAM, n = 7 cada grupo. Todos os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. * Diferença significativa vs. SED-SHAM, # vs SED-INF, e & vs TR-SHAM (P < 0,05).

6.12 Expressão Protéica do NCX e da Serca2

A expressão do NCX, alvo do microRNA-1 e do microRNA-214 tiveram aumento de 55% no SED-INF e 40% no grupo TR-SHAM em comparação com o grupo SED-SHAM, enquanto no grupo TR-INF a expressão do NCX foi diminuída 36% em comparação com SED-INF (Figura 31A, p <0,05).

Em contrapartida, a expressão da Serca2, alvo do microRNA-214, foi diminuída 37% no grupo SED-INF em comparação com o grupo SED-SHAM e aumentada 53% no grupo TR-SHAM em comparação com o grupo SED-SHAM. No grupo TR-INF a expressão da Serca2 foi 48% maior em comparação com SED-INF (Figura 31B, p <0,05).

A

B

FIGURA 16 Expressão protéica do NCX (A) e da SERCA2 (B) por *western blot*. Percentual em relação ao grupo SED-SHAM, n = 6 cada grupo. Todos os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. * Diferença significativa vs. SED-SHAM, # vs SED-INF, e & vs TR-SHAM (P < 0,05).

6.13 Medida da Atividade da Ca^{2+} -ATPase

A atividade da cálcio ATPase da região remanescente ao infarto que corresponde a soma da atividade da cálcio ATPase da membrana plasmática (PMCA) mais a atividade da cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA 2a) não foram alteradas com o treinamento.

FIGURA 17-A atividade da cálcio ATPase da membrana plasmática (PMCA) mais a atividade da cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA 2a). Percentual em relação ao grupo SED-SHAM, n = 7 cada grupo. Todos os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. * Diferença significativa vs. SED-SHAM, [#] vs SED-INF, e [&] vs TR-SHAM (P < 0,05).

A atividade da PMCA e a atividade SERCA 2a, medidas separadamente, não foram alteradas com o treinamento.

FIGURA 18-A atividade da cálcio ATPase da membrana plasmática (PMCA)(A) e a atividade da cálcio ATPase do retículo endoplasmático (SERCA 2a) (B). Percentual em relação ao grupo SED-SHAM, n = 7 cada grupo. Todos os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. * Diferença significativa vs. SED-SHAM, # vs SED-INF, e & vs TR-SHAM (P < 0,05).

A seguir serão apresentados duas tabelas com microRNAs selecionados com base nos critérios utilizados para filtragem dos dados obtidos pelo microarray. Na sequência são apresentados, as confirmações dos 4 primeiros microRNAs selecionados e a escolha das proteínas alvos do microRNA-339-5p. Os resultados são referentes à região RM ao IM.

6.14 MicroRNAs selecionados

Os microRNAs foram selecionados e separados de acordo com dois padrões de expressão. Para o primeiro padrão de expressão os microRNAs selecionados tem o grupo SED-IM, apresentando expressão maior que o grupo SED-SHAM, o grupo TR-SHAM, apresentando expressão menor que o grupo SED-SHAM e o grupo TR-IM, apresentando expressão menor que o grupo SED-IM, observou-se um total de 19 microRNAs (Tabela 3).

Enquanto para o segundo padrão de expressão os microRNAs selecionados tem o grupo SED-IM, apresentando expressão menor que o grupo SED-SHAM, o grupo TR-SHAM, apresentando expressão maior que o grupo SED-SHAM e o grupo TR-IM, apresentando expressão maior que o grupo SED-IM, observou-se um total de 13 microRNAs (Tabela 4).

No entanto, quando se utiliza o critério de exclusão dos microRNAs que apresentam expressão menor do que 2 U.A e diferença do grupo TR-SHAM para o grupo SED-SHAM menor do que 1 U.A observa-se, apenas 6 microRNAs no primeiro grupo e somente 3 microRNAs no segundo grupo que satisfizeram este critério.

	MicroRNA	SED-SHAM	SED-IM	TR-SHAM	TR-IM
1	rno-miR-122_st	7,93	9,55	2,75	7,36
2	rno-miR-206_st	4,52	5,62	2,92	3,08
3	rno-miR-18a_st	5,30	5,68	3,98	5,09
4	rno-miR-339-5p_st	5,99	7,26	4,30	5,08
5	rno-miR-322-star_st	5,34	5,54	4,25	5,25
6	rno-miR-362_st	4,56	4,71	2,82	3,60
7	rno-miR-532-3p_st	4,55	4,70	3,56	3,73
8	rno-miR-542-5p_st	4,76	4,80	3,78	2,90

9	rno-miR-500_st	5,54	6,48	5,48	5,82
10	rno-miR-146b_st	7,04	7,88	7,01	7,72
11	rno-miR-674-3p_st	4,62	5,16	3,98	4,08
12	rno-miR-199a-5p_st	7,20	7,94	7,04	7,87
13	rno-miR-139-3p_st	3,48	3,84	3,44	2,87
14	rno-miR-423_st	5,44	5,75	5,41	5,09
15	rno-miR-324-5p_st	6,25	6,59	6,17	6,43
16	rno-miR-24-1-star_st	5,02	5,29	4,20	5,00
17	rno-miR-221_st	8,22	8,62	8,15	8,46
18	rno-miR-139-5p_st	7,10	7,45	6,89	7,26
19	rno-miR-497_st	7,60	7,91	7,40	7,60

TABELA 3- MicroRNAs selecionados com base nos critérios: Expressão do grupo SED-IM > SED-SHAM, TR-SHAM < SED-SHAM e TR-INF < SED-INF. Exclusão dos microRNAs que apresentavam expressão menor do que 2 U.A. Diferença do grupo TR-SHAM para o grupo SED-SHAM menor do que 1 U.A.

	MicroRNA	SED-SHAM	SED-IM	TR-SHAM	TR-IM
1	rno-let-7f_st	3,102256	3,098525	4,676485	3,229919
2	rno-miR-666_st	3,257582	3,229735	4,547727	3,247308
3	rno-miR-219-1-3p_st	2,911466	2,889957	4,409831	3,383507
4	rno-miR-181d_st	9,38098	9,090545	10,18396	9,361909
5	rno-miR-760-5p_st	3,259715	3,175632	4,167668	3,520635
6	rno-miR-370_st	3,154998	3,047036	4,119389	3,061969
7	rno-miR-219-2-3p_st	2,820246	2,739523	3,773386	2,906274
8	rno-miR-876_st	2,804263	2,724271	3,511069	3,223558
9	rno-miR-22-star_st	7,176147	6,621816	7,283187	7,143952
10	rno-miR-196b_st	2,852125	2,71063	3,611466	2,892262
11	rno-miR-292-5p_st	2,936816	2,766369	3,293531	2,892262
12	rno-miR-129_st	2,906955	2,734503	3,106302	2,847904
13	rno-miR-337_st	3,117978	2,89426	3,261101	3,209977

TABELA 4- MicroRNAs selecionados com base nos critérios: Expressão do grupo SED-IM < SED-SHAM, TR-SHAM > SED-SHAM e TR-INF > SED-INF. Exclusão dos microRNAs que apresentavam expressão menor do que 2 U.A. Diferença do grupo TR-SHAM para o grupo SED-SHAM menor do que 1 U.A.

6.26 Confirmação da Expressão do MicroRNA 122

A expressão do microRNA-122 foi aumentada 51% no grupo SED-INF em comparação com o grupo SED-SHAM e diminuiu 43% no grupo TR-SHAM em comparação com o grupo SED-SHAM. No grupo TR-INF o microRNA-122 foi diminuído 51% em comparação com SED-INF (Figura 34, $p < 0,05$).

Figura 19-Expressão do microRNA-122 realizado por PCR em tempo real (Figura A). Percentual em relação ao grupo SED-SHAM, $n = 7$ cada grupo. Todos os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. * Diferença significativa vs. SED-SHAM, # vs SED-INF, e & vs TR-SHAM ($P < 0,05$).

6.15 Confirmação da Expressão do MicroRNA-206

A expressão do microRNA-206 foi aumentada 45% no grupo SED-INF em comparação com o grupo SED-SHAM e diminuiu 41% no grupo TR-SHAM em comparação com o grupo SED-SHAM. No grupo TR-INF o microRNA-122 foi diminuído 46% em comparação com SED-INF (Figura 35, $p < 0,05$).

FIGURA 20-Expressão do microRNA 206 realizado por PCR em tempo real (Figura A). Percentual em relação ao grupo SED-SHAM, n = 7 cada grupo. Todos os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. * Diferença significativa vs. SED-SHAM, # vs SED-INF, e & vs TR-SHAM (P < 0,05).

6.16 Confirmação da Expressão do Microrna-18a

A expressão do microRNA-18a foi aumentada 36% no grupo SED-INF em comparação com o grupo SED-SHAM e diminuiu 44% no grupo TR-SHAM em comparação com o grupo SED-SHAM. No grupo TR-INF o microRNA-18a foi diminuído 26% em comparação com SED-INF (Figura 36, p <0,05).

FIGURA 21-Expressão do microRNA 18a realizado por PCR em tempo real (Figura A). Percentual em relação ao grupo SED-SHAM, n = 7 cada grupo. Todos os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. * Diferença significativa vs. SED-SHAM, # vs SED-INF, e & vs TR-SHAM ($P < 0,05$).

6.17 Confirmação da Expressão do MicroRNA-339-5p

A expressão do microRNA-339-5p foi aumentada 53% no grupo SED-INF em comparação com o grupo SED-SHAM e diminuiu 40% no grupo TR-SHAM em comparação com o grupo SED-SHAM. No grupo TR-INF o microRNA-339-5p foi diminuído 37% em comparação com SED-INF (Figura 37, $p < 0,05$).

FIGURA 22-Expressão do microRNA 339-5p realizado por PCR em tempo real (Figura A). Percentual em relação ao grupo SED-SHAM, n = 7 cada grupo. Todos os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão. * Diferença significativa vs. SED-SHAM, # vs SED-INF, e & vs TR-SHAM (P < 0,05).

6.18 Escolha do microRNA-339-5p e dos Alvos do microRNA-339-5p

O microRNA-339-5p foi escolhido por apresentar expressão diferencial pronunciada com efeito do treinamento físico e está envolvido com genes candidatos a regulação da função cardíaca e ter sido confirmado por Real Time-PCR. Os dois genes alvos do microRNA-339-5p selecionados por programas de bioinformática (TargetScan, Miranda e PicTar) foram a Myo1c e PGC-1 β , os quais estão envolvidos com a função cardíaca.

No gene da MYO1C o miR-339-5p apresenta:

1 sequência conservada na posição 87-94 da MYO1C 3' UTR:

```

5' ...AGACUCAAGCUUCCAGACAGGGA...
      |||||
3' GCACUCGAGGACCUCCUGUCCCU
  
```

1 sequência não conservada na posição 982-988 da MYO1C 3' UTR:

5' ...ACCUGGGAGCAUGGGGACAGGGC...
 3' GCACU**CGA**GGACCUCCUGUCCCU

No gene do PGC-1 β miR-339-5p apresenta:

1 sequência conservada na posição 6398-6404 do PGC-1 β 3' UTR:

5' ...U**UCCCCUG**GCUCUACGACAGGGU...
 3' GC**ACUCGAGG**ACCUC----CUGUCCCU

2 sequências não conservada na posição 865-871 do PGC-1 β 3' UTR:

5' ...UGUUA**GAC**CCACUCUACAGGGAA...
 3' GCACUCGAGGACCUCCUGUCCCU

5' ...CUGAG**GAG**UACAUGAGACAGGGC...
 3' GCACU**CGA**GGACCUCCUGUCCCU

6.19 Expressão Protéica da Myo1c e do PGC-1 β

A expressão da Myo1c, alvo do microRNA-339-5p diminuiu de 36% no grupo SED-INF em comparação com o grupo SED-SHAM e aumentou de 63% no grupo TR-SHAM em comparação com o grupo SED-SHAM, enquanto no grupo TR-INF a expressão do Myo1c aumentou de 49% em comparação com SED-SHAM (Figura 38A, $p < 0,05$).

A expressão do PGC-1 β , também alvo do microRNA-339-5p, foi alterada somente no grupo TR-SHAM, com um aumento de 29% em comparação com o grupo SED-SHAM (Figura 38B, $p < 0,05$).

A

B

FIGURA 23-Expressão protéica da Myo1c (A) e do PGC-1 β (B) por *western blot*.
Percentual em relação ao grupo SED-SHAM, n = 7 cada grupo. Todos os resultados são apresentados como média ± desvio padrão. * Diferença significativa vs. SED-SHAM, # vs SED-INF, e & vs TR-SHAM (P < 0,05).

7. DISCUSSÃO

De acordo com os critérios aplicados foram observados, apenas 6 microRNAs para o primeiro padrão de expressão e 3 microRNAs para o segundo padrão de expressão que satisfizeram todos os critérios. O microRNA-339-5p foi escolhido por apresentar expressão diferencial pronunciada como efeito do TF por ter dois genes (alvos selecionados por programas de bioinformática TargetScan, Miranda e PicTar), o Myo1c e o PGC-1 β , que estão envolvidos com a regulação da função cardíaca. Neste estudo, foi possível verificar que nos grupos TR-SHAM e TR-IM ocorreu aumento da expressão da Myo1c e redução da expressão do microRNA-339-5p. Nossos resultados também mostraram que o TF induziu aumento na expressão dos microRNAs-29a/c, o que está relacionado com significativa diminuição na expressão gênica do COL1A1, COL1A2, diminuição na concentração de hidroxiprolina e fração volumétrica de colágeno de ratos com IM. Outro resultado deste estudo é que o TF induziu diminuição na expressão dos microRNA 214, o que está relacionado com aumento na expressão protéica SERCA-2a e aumento na expressão dos microRNA 1 o que está relacionado com diminuição na expressão protéica do NCX de ratos com IM. Esses efeitos estão associados com a melhora da função ventricular avaliada pela FEAT% (função sistólica) e pela relação E/A (função diastólica), realizado por avaliação ecocardiográfica após o período de TF.

7.1 Massa Corporal

Os dados encontrados na literatura com relação ao efeito do TF aeróbico de natação sobre a MC, de animais de experimentação são ainda controversos, devido aos diferentes protocolos de TF utilizados com modificações em frequência, intensidade, duração e tipo de exercício. Porém, apesar de alguns trabalhos demonstrarem que o TF é capaz de alterar a MC (ROCHA et al., 2007; FERNANDES, et al., 2011), os dados obtidos neste estudo são compatíveis com os resultados de estudos que utilizaram protocolo de TF semelhante ao utilizado

neste experimento. Esses dados demonstram que o TF não foi capaz de alterar a MC do grupo treinado em relação ao grupo sedentário no final do protocolo de TF (DO CARMO et al., 2011; ROQUE et al., 2011; SOCI et al., 2011).

Estudos que mostraram diminuição da MC ou menor ganho pós-TF aeróbico, atribuem esses resultados ao fato do exercício elevar o gasto calórico durante o metabolismo basal, promovendo um aumento do metabolismo oxidativo. Isso pode ser confirmado indiretamente, após o sacrifício com a remoção da gordura reto peritoneal dos animais treinados, a qual está diminuída em comparação aos animais sedentários, desta forma explicando em parte esse menor ganho da MC ao final do protocolo experimental. Por outro lado, os trabalhos que mostram que a MC se mantém semelhante para os grupos treinados e controle, justificam que isso ocorre em função de um possível aumento da ingestão calórica dos animais treinados (TOCH; POCHLMAN, 1996).

Como o TF de natação seguiu um protocolo baseado na porcentagem do peso corporal dos animais, foi importante verificar que após as 4 semanas do procedimento cirúrgico, os animais não apresentaram alteração da MC promovida pelo IM ou pela cirurgia fictícia (sham).

7.2 Hipertrofia Cardíaca

O aumento da massa cardíaca foi avaliado tanto pelo peso úmido do VE corrigido pelo peso corporal, quanto pelo ecocardiograma. No entanto, a medida da massa cardíaca pelo ecocardiograma para o coração infartado não é válida pelo modo M, portanto não será apresentada. Para fins de discussão, consideraremos somente o resultado obtido pela razão peso do VE/MC. Essa é uma medida direta e com menor possibilidade de erro do que a avaliada pelo ecocardiograma, que estima a massa do coração através de fórmulas matemáticas.

A HC encontrada no grupo TR-SHAM já era esperada e seu percentual em relação ao grupo SED-SHAM foi bastante próximo do encontrado pelo nosso grupo em publicações com esse modelo de TF (DO CARMO et al., 2011; FERNANDES et al., 2011; SOCI et al., 2011). Assim, comparando-se dados da

literatura com diferentes tipos de TF aeróbico, verifica-se que o percentual de ganho de massa do VE de animais treinados em relação aos controle é maior com o TF em natação do que com o TF em esteira (BLOMQVIST; SALTIN, 1983; GAUDRON et al., 1994; WISLOFF et al., 2002).

Nos grupos SED-IM e TR-IM a hipertrofia já era esperada, uma vez que os animais permaneceram durante quatro semanas de recuperação mais o período de TF de 10 semanas com IM. Resultados semelhantes foram encontrados por Wisloff, Loennechen et al., (2002) que realizaram um protocolo de TF intervalado em esteira, alternados entre 8 min a 85-90% do VO_{2max} e 2 min em 50-60% do VO_{2max} , com os mesmos intervalos de tempo de recuperação após o IM e período de TF utilizados neste estudo.

Bansal, et al. (2010) que utilizaram um protocolo de corrida em esteira, com os animais permanecendo durante quatro semanas de recuperação mais o período de TF de 8 semanas com IM, observaram a hipertrofia aumentada no grupo TR-IM em relação ao grupo SED-IM. WISLOFF et al. (2002), que utilizaram protocolo semelhante, observaram que a hipertrofia no grupo TR-IM foi menor que no grupo SED-IM. Nossos resultados não detectaram diferença entre estes dois grupos.

7.3 Medida do Consumo de Oxigênio

O VO_{2max} retrata a capacidade máxima do organismo de extrair oxigênio. Esta é a medida que melhor avalia a potência aeróbica, ou seja, a quantidade máxima de energia que pode ser transformada em trabalho aeróbico das fibras musculares, por unidade de tempo (DENDAI, 2004).

O percentual de aumento no VO_{2max} encontrado no grupo TR-SHAM em relação ao grupo SED-SHAM foi semelhante ao encontrado por nosso grupo em estudos anteriores que utilizaram o mesmo protocolo de natação deste trabalho (BATISTA et al., 2007; DO CARMO et al. 2011; FERNANDES et al. 2011; SOCI et al., 2011).

A tendência à redução do VO_{2max} no grupo SED-IM em relação ao grupo SED-SHAM observada neste estudo é semelhante aos resultados encontrados por

Wisloff et al. (2002) que realizaram um protocolo de TF intervalado em esteira alternados entre 8 min a 85-90% do $\text{VO}_{2\text{max}}$ e a 2 min em 50-60% do $\text{VO}_{2\text{max}}$, e aos resultados encontrados por Batista et al. (2007), que realizaram treino de corrida em esteira em 55-60% do $\text{VO}_{2\text{max}}$, sendo que ambos os trabalhos utilizaram os mesmos intervalos de tempo de recuperação após o IM e período de TF do presente estudo.

7.4 Medidas Ecocardiográficas

Neste estudo foi estabelecido como critério para inclusão uma faixa pequena do IM (se $\text{IM} < 35\%$); assim, animais que apresentaram IM grandes (se $\text{IM} > 35\%$) não foram incluídos neste estudo. Essa classificação do tamanho do IM é arbitrária, como sugerido por Dayan et al. (2005). Neste tipo de estudo, é importante não apresentar grandes variações nos dois grupos infartados antes e após o período de TF, uma vez que IM de diferentes tamanhos podem levar a respostas hemodinâmicas e moleculares distintas.

A porcentagem de hipertrofia no grupo TR-SHAM em relação ao grupo SED-SHAM, analisada pela relação do VE/PC (12%) e pela massa do VE medido pelo ecocardiograma (16%), não foram semelhantes. Isso ocorre, principalmente, pelo fato do cálculo da medida da massa do VE pelo ecocardiograma utilizar-se de fórmulas que partem do pressuposto de que o coração é uma forma geométrica elíptica, cuja largura equivale a 2/3 da altura e assumem que a HC estudada é simétrica e, portanto, qualquer região analisada reflete o coração como um todo. Além disso, como já mencionado acima, essa fórmula não é válida para cálculo em corações infartados. Assim, temos apenas o resultado da massa do VE pelo ecocardiograma nos dois grupos sham.

A espessura da parede anterior menor nos grupos Co IM e Tr IM quando comparado com os grupos SED-SHAM e TR-SHAM era um resultado esperado, uma vez que é nesta região do ventrículo que ocorre a necrose do tecido cardíaco, promovendo o afinamento da parede. Resultados semelhantes foram demonstrados por Bansal et al. (2010) e Wisloff et al. (2002), que realizaram

protocolo similar ao utilizado neste trabalho, no entanto, Bansal et al. (2010) verificaram um aumento na espessura da parede anterior do ventrículo no grupo TR-SHAM em relação ao grupo SED-SHAM, o que não foi observado no estudo do Wisloff et al. (2002) nem neste estudo .

O aumento na espessura da parede posterior no grupo TR-SHAM em relação aos grupos SED-SHAM, SED-IM e TR-IM já era um resultado esperado, uma vez que é nesta região do ventrículo que ocorre a hipertrofia do músculo cardíaco, promovendo o aumento da parede como foi observado; apesar disso, os estudos de Wisloff et al. (2002), e de Hashimoto et al. (2004), que realizaram protocolo similares ao utilizado neste trabalho, mas com corrida em esteira, não verificaram este aumento na espessura da parede posterior no grupo TR-SHAM em relação ao grupo SED-SHAM. Além disso, o trabalho do Hashimoto et al. (2004) não verificou-se a hipertrofia cardíaca do grupo TR-SHAM em relação ao grupo SED-SHAM com o protocolo que utilizaram.

Vários índices de função sistólica têm sido propostos e investigados, entretanto ainda não há uma medida perfeita. Conforme pode ser observado na TABELA 2, a função sistólica neste estudo foi avaliada pela %FEAT. A %FEAT é uma medida da função do coração como bomba, e corresponde ao percentual de diminuição da cavidade a partir do fim da diástole até o final da sístole (Santos, et al., 2009).

O TF avaliado não alterou a função sistólica avaliada pela %FEAT no grupo TR sham em comparação ao grupo SED-SHAM, o que corrobora com os dados da literatura (PLUIM, 2000; BARBIER, 2006). No grupo TR-SHAM, a função sistólica aumentou de 33% para 42% em relação ao grupo Co IM, o que era esperado como efeito do TF em animais infartados, como já demonstrado em trabalhos anteriores que utilizaram diferentes índices de função sistólica (BARBIER, 2006).

Para determinação da função diastólica utilizamos a relação entre os picos E/A, onde o pico E corresponde à fase de enchimento rápido do ventrículo, e o pico A corresponde à fase de enchimento lento, ou contração atrial (KATZ, 1996). Normalmente, o valor de pico da onda E é maior que o da onda A, e em situações

de disfunção diastólica esses valores invertem-se, ficando os valores de pico da onda A maiores ou iguais aos da onda E (BOON, 1998). O TF utilizado não alterou a função diastólica avaliada pela relação E/A no grupo TR-SHAM em comparação ao grupo SED-SHAM, o que corrobora com os dados de trabalho anteriormente publicado por nosso grupo (Soci et al. 2011). No grupo TR-SHAM a função diastólica melhorou em relação ao grupo SED-IM, o que era esperado como efeito do TF em animais infartados, indicando uma maior complacência ventricular em relação ao grupo SED-IM, como já demonstrado em trabalhos anteriores (JORGE et al. 2010).

7.5 Expressão dos MicroRNAs-29a/c, COLIA, COL3A1, (OH-prolina) e da FVC

Uma das conclusões deste estudo é que o treinamento aeróbico induziu aumento na expressão dos microRNAs-29a/b/c, o que está relacionado a uma diminuição significativa na expressão gênica do COL1A1 e COL3A1 de ratos com IM. Esses efeitos estão associados a melhora da função ventricular avaliada pela FEAT% (função sistólica) e a relação E/A (função diastólica), aferidas por avaliação ecocardiográfica após o período de TF.

No nosso laboratório, recentemente, Soci et al. (2011), mostraram que ratos submetidos a dois protocolos de treinamento de natação com volumes de treinamento moderado e alto apresentaram hipertrofia cardíaca fisiológica e expressão aumentada do microRNA-29, o que se correlacionou de forma linear com o aumento no volume de treinamento. O aumento da expressão do microRNA-29 está intimamente relacionado à diminuição da expressão gênica e proteína do colágeno I $\alpha 1(\text{I})$. A esta regulação foi associada uma melhora na função diastólica e aumento da complacência ventricular.

Vários estudos mostraram que a família do microRNA-29 está envolvida na regulação de fibrose em doenças tais como a nefropatia diabética, esclerose sistêmica, condropatia e IM (VAN ROOIJ et al, 2008; SHI et al, 2010). O perfil de expressão de microRNAs, na fase tardia do IM (3 e 14 dias após IM), foi recentemente identificado por um excelente estudo relatado por Van Rooij et al. (2011). Estes investigadores concluíram que a diminuição do microRNA-29a/b/c

foi mais pronunciada na borda do IM após 3 dias do infarto do miocárdio e não mudou na região remanescente do IM após 14 dias de IM. Os investigadores também mostraram que enquanto a regulação negativa do microRNA-29 aumentou a expressão do colágeno e a resposta fibrótica em modelo de rato com IM, a superexpressão do microRNA-29 em fibroblastos promoveu uma diminuição do colágeno, desempenhando um papel importante na redução da fibrose cardíaca durante o processo de reparo após IM. Nossos resultados demonstraram que o microRNA-29c diminuiu, significativamente, na região remanescente do IM, mas inesperadamente o microRNA-29 a e b foram aumentados. No entanto, o aumento do microRNA-29 (a e c) foi associado ao decréscimo de COL1A1 e COL3A1. Esta disparidade pode ser devido a um aumento da estabilidade do RNAm. Neste caso, os fatores de regulação que podem alterar a semi-vida citoplasmática do RNAm para colágenos COL1A1 e COL3A1 devem ser considerados, uma vez que estas alterações não foram correlacionadas com modificações semelhantes nas taxas de transcrição para os mRNAs (CHAPMAN et al., 1990).

Sabe-se que várias proteínas, como fibrilina-1 (scan Destino), COL1A2 (mirBase), COL15A2 (mirBase), COL5A3 (Miranda) e COL7A1 (Pic Tar) que estão presentes na matriz extracelular são alvos já validados da família do microRNA 29 (VAN ROOIJ et al, 2008; PRESNEAU et al, 2012). Por isso, seria ideal para este estudo, que o COL1A1 e COL3A1 que estão presentes em grandes proporções no sistema cardiovascular que desempenham um papel importante na formação da matriz extracelular e estão diretamente relacionados com a deterioração da função cardíaca após o infarto do miocárdio (PALOJOKI et al, 2001, SHI et al, 2010) fossem quantificados pela técnica de *western blot*. No entanto, realizou-se a medição de colágeno através de técnicas indiretas, como a técnica que quantifica a concentração de hidroxiprolina e a fração volumétrica de colágeno, para demonstrar a provável regulação do colágeno pelo microRNA 29 no coração de ratos infartados submetidos ao treinamento de natação.

Os dados parciais nos permitem concluir que o TF induz a regulação da expressão do microRNA-29, o qual está relacionado a uma diminuição significativa da expressão do gene do colágeno e à melhora da função ventricular.

7.6 Padronização do tratamento *in vivo*

Antes de finalizar os experimentos de *microarray*, determinamos que o microRNA-29c, que tem a expressão diminuída com o TF e que está associado com a fibrose e a perda da função cardíaca, fosse o escolhido para iniciar a padronização da metodologia de transfecção *in vivo* em nosso laboratório. A padronização ocorreu em parceria com outro projeto desenvolvido por nosso grupo de estudo. Esta padronização visou estabelecer os procedimentos cirúrgicos ideais, a concentração ideal de aplicação dos vetores virais nos animais e o tempo de duração da expressão do microRNA *in vivo*, além de todos os controles e procedimentos necessários para otimizar a técnica *in vivo*.

Assim, após a padronização com o microRNA-29c, seria dada continuidade neste projeto com a realização da transfecção do microRNA selecionado pelo *microarray*.

A idéia do projeto de induzir a expressão do microRNA-29c nos animais SHR partiu dos resultados de *microarray* do nosso laboratório, que revelaram em ratos hipertensos quais os microRNAs que estavam diferencialmente expressos em resposta ao TF aeróbico e à própria hipertensão. Uma vez que o TF aeróbico promove hipertrofia cardíaca fisiológica e a hipertensão promove hipertrofia cardíaca patológica os primeiros questionamentos realizados a respeito desses resultados foram sobre quais os microRNAs diferencialmente expressos na hipertensão apresentavam reversão em sua expressão com o TF (SOCI et al, 2011; FERNANDES et al, 2011).

Além disso, um estudo publicado em 2011 pelo nosso grupo mostra que o treinamento físico aeróbico induziu um aumento da expressão do microRNA-29c em ratos Wistar, mudança esta que foi linear com o aumento de frequência de treinamento, o que foi altamente correlacionado com a diminuição do colágeno

cardíaco e promoveu uma melhora da complacência ventricular e da função diastólica nos animais treinados (SOCl et al, 2011).

Selecionado o microRNA-29c, subsequentemente, foi realizado o experimento de transfecção para aumentar a expressão do microRNA-29c no coração em animais SHR por intermédio do vetor lentiviral. A transfecção *in vivo* feita em animais SHR mostrou que a superexpressão do microRNA-29c induziu uma diminuição na expressão gênica do colágeno do tipo I, sem no entanto alterar a expressão total de hidroxiprolina cardíaca.

Nossos resultados demonstraram que o GFP foi diferentemente expresso no coração e no fígado dos animais que receberam a mesma dose de vetor lentiviral. O maior aumento de GFP no fígado pode ser um fator limitante para a utilização desta técnica, uma vez que é preciso uma alta dose deste para ter efeitos pouco expressivos no coração, ainda que nossos resultados estejam baseados em um reduzido número de animais. Isso pode estar ocorrendo pela barreira existente para a penetração do vetor lentiviral no músculo cardíaco.

Ainda não foi totalmente estabelecido as concentrações ideais para inibição do microRNA-29c. Pretendemos iniciar um terceiro protocolo experimental para tentar padronizar a utilização *in vivo* do microRNA-29c

7.7 Expressão da SERCA-2a, do NCX e dos microRNAs 1 e 214

Outra conclusão deste estudo é que o treinamento aeróbico induziu diminuição na expressão do microRNAs-214, o que está relacionado com um aumento significativo na expressão proteica da SERCA-2a e aumento na expressão do microRNAs-214, o que está relacionado com uma diminuição significativa na expressão proteica do NCX de ratos com IM. Esses efeitos estão associados com melhora da função ventricular avaliada pela FEAT% (função sistólica) e a relação E/A (função diastólica), avaliadas por ecocardiografia após o período de TF.

Foi verificado neste estudo um aumento da expressão do NCX e da SERCA-2a com o treinamento. Alguns estudos têm demonstrado que a expressão e função destas proteínas são realmente alteradas com o treinamento e estão

diretamente relacionadas com a melhora da função cardíaca. No estudo de Wisloff e colaboradores (2002) os autores verificaram uma capacidade de encurtamento aumentada dos miócitos no grupo treinado e isso foi associado ao aumento da expressão da SERCA-2a, aumento da sensibilidade de miofilamentos e aumento dos níveis de NCX como fatores preponderantes para reduzir o cálcio sistólico, contribuindo assim para diminuição do pico sistólico de cálcio com o treinamento, embora, Rolim et al. (2007), não tenha verificado alteração da expressão da SERCA-2a e do NCX com o treinamento em camundongos *wide type*.

O que foi observado neste estudo é que a expressão da SERCA-2a foi aumentada nos animais infartados submetidos ao treinamento em relação ao grupo sedentário infartado. Resultados semelhantes já tinham sido encontrados por Wisloff e colaboradores (2002) que verificaram em ratos infartados submetidos ao treinamento, aumento da expressão da SERCA-2a. A expressão da SERCA-2a é correlacionada positivamente com um conjunto de modificações moleculares responsáveis pela liberação e recaptação de cálcio e, conseqüentemente, pela melhora funcional do coração após o infarto do miocárdio. Os resultados encontrados por Song et al. (2004) também demonstram melhora da contratilidade do cardiomiócito de animais submetidos ao TF intervalado após 2 semanas do IM que foi acompanhado por um aumento na expressão da SERCA-2a. Da mesma forma, Rolim et al. (2007) estudando camundongos *knockout* para os receptores α_2A/α_2C ARKO, que apresentam hiperatividade simpática e desenvolvem insuficiência cardíaca com decréscimo progressivo da função cardíaca (Brum et al., 2002) verificaram aumento da expressão da SERCA-2a nestes animais submetidos ao treinamento.

Diferentemente da expressão da SERCA-2a, a expressão do NCX foi aumentada nos animais infartados e também nos animais submetidos ao treinamento em relação ao grupo sedentário, tendo o grupo treinado infartado uma diminuição da expressão em relação ao grupo infartado. Resultados semelhantes foram encontrados em camundongos *knockout* para os receptores α_2A/α_2C ARKO adrenérgicos (Brum et al., 2002), no entanto, Wisloff e colaboradores (2002) e Song et al. (2004) verificaram diminuição da expressão do NCX em ratos

infartados e um aumento da expressão do NCX no grupo infartado submetido ao treinamento. Algumas variações no tamanho do infarto e o prejuízo funcional em cada um destes modelos e o tipo e intensidade de treinamento podem provocar variações intracelulares distintas de cálcio nos cardiomiócitos o que pode levar a alterações para o modo reverso do NCX, devido a diferentes padrões de expressão e função do NCX, perpetuando ainda mais a sobrecarga de cálcio.

Aurora et al. (2012), validaram o NCX como alvo do microRNA-1, estes autores verificaram mudanças na expressão dos microRNAs em coração normal *versus* coração com isquemia/reperfusão. Em outro estudo Kumarswamy et al. 2012, observaram que a terapia com superexpressão da SERCA2a foi acompanhada pela normalização da expressão do microRNA-1 e da expressão do NCX cardíaco, sendo que os efeitos benéficos desta terapia foram, pelo menos em parte, mediado pela normalização do microRNA-1 em animais com insuficiência cardíaca. Uma vez que estes estudos já validaram o NCX como alvo do microRNA-1, nossos resultados com o microRNA-1 nos animais do grupo sham e no grupo infartado podem estar relacionados com a normalização do NCX e consequentemente com a melhora da função cardíaca observada neste estudo com o treinamento.

Neste mesmo elegante trabalho realizado por Aurora et al. (2012), os autores também validaram o NCX como alvo do microRNA-214. Demonstrou-se que camundongos deficientes para o microRNA-214 são sensíveis a lesão por isquemia/reperfusão, condição essa evidenciada pelo aumento da apoptose cardíaca, fibrose e perda de função do coração. Além disso, verificou-se que a inibição da expressão do NCX pelo microRNA-214 protege o miócito de danos, atenuando a ação do NCX de aumentar o influxo de cálcio no citoplasma após a isquemia/reperfusão. Uma vez que já foi validado o NCX como alvo do microRNA-1, nossos resultados relacionando o microRNA-214 com o NCX é uma hipótese para explicar a regulação da expressão do NCX e, conseqüentemente, a melhora da função cardíaca observada neste estudo com o treinamento. No entanto, por algum motivo desconhecido, a mesma relação verificada no grupo infartado e infartado treinado não foi observada.

Outra interessante relação observada neste estudo foi do microRNA-214 com a SERCA-2a. Esta relação passa a ser de grande interesse, uma vez que nossos resultados mostraram que a regulação da SERCA-2a pelo microRNA-214 pode estar ocorrendo tanto nos animais do grupo sham quanto nos animais do grupo infartado. Esta regulação pode ser um dos principais fatores responsáveis pela normalização da SERCA-2a e conseqüentemente da melhora da função cardíaca observada neste estudo com o treinamento, pois a SERCA-2a representa 90% das proteínas da membrana no retículo sarcoplasmático no músculo cardíaco e o controle da concentração de cálcio intracelular é em grande parte realizada por esta proteína. Portanto, o microRNA-214 apresenta-se como um possível candidato à regulação da expressão da SERCA-2a, tanto em situações patológica como em situação fisiológica e com grande interesse para posteriores estudos visto que foi realizada somente a validação da SERCA-2a como alvo do microRNA-214 *in silico*.

A atividade de cálcio ATPase não ter sido alterada com o treinamento foi um dado esperado, uma vez que já esta bem estabelecido que o treinamento físico tem efeito mínimo sobre a função da SERCA-2a e da PMCA em condições fisiológicas normais, como observado por Tepmanas et al. (2009) em ratos submetidos a um programa de treinamento aeróbico de moderada intensidade durante 9 semanas. No entanto, atividade da cálcio ATPase não ter sido alterada em animais infartados submetidos ao treinamento foi um dado inesperado, tendo em vista, que em condições patológicas ocorre redução tanto da expressão quanto da função da SERCA-2a em miocárdio de ratos com insuficiência cardíaca, como observado por Dhalla et al. (2009). Sendo assim, o treinamento físico tem se apresentado como uma intervenção interessante como reparador da função da cálcio ATPase do coração em condições patológicas como o infarto. O fato dos dados referentes à análise da atividade da cálcio ATPase terem sido obtidos a partir de uma pequena amostra pode ter contribuído para não encontrar diferenças entre os grupos.

7.8 Escolha do microRNA 339-5p e expressão da Myo1c e do PGC-1 β

O microRNA-339-5p foi escolhido por apresentar expressão diferencial pronunciada como efeito do treinamento físico, estar envolvido com genes candidatos a regulação da função cardíaca e ter sido confirmado por Real Time-PCR. Cabe ressaltar que foram estabelecidos vários critérios para selecionar um microRNA. Estes critérios foram empregados com intuito de filtrar ao máximo o número de microRNA, embora outros microRNAs também importantes possam ter sido excluídos pela análise empregada.

Um dos dois genes alvos do microRNA-339-5p, selecionados por programas de bioinformática (TargetScan, Miranda e PicTar), foi o da Myo1c. Neste estudo, foi possível verificar que no grupo submetido ao treinamento ocorreu um aumento da expressão da Myo1c em contrapartida a uma redução da expressão do microRNA-339-5p. Em experimentos realizados com animais submetidos a exercício voluntário durante quatro semanas, foi observado aumento dos níveis da proteína Myo1c no músculo esquelético em relação ao grupo controle. Além disso, os animais que superexpressaram a Myo1c aumentaram significativamente a absorção de glicose estimulada tanto pela contração (*in situ*) quanto pela insulina, enquanto que os animais *knockout* para Myo1c diminuíram tanto a absorção de glicose pela contração quanto pela insulina. Estes dados suportam a idéia de que no coração a Myo1c também pode estar sendo alterada com o exercício e que o microRNA-339-5p pode ser responsável por regular a expressão desta proteína e, conseqüentemente, sinalizando para o transporte do GLUT4. No entanto, não sabemos os mecanismos de sinalização durante o exercício que podem estimular a captação de glicose via proteína Myo1c para aumentar a translocação do Glut-4 para a membrana durante a contração muscular (HAYASHI et al., 1997; GOODYEAR; KAHN, 1998; TOYODA, et al., 2011).

Outra relação interessante observada foi que no grupo infartado submetido ao treinamento ocorreu aumento da expressão da Myo1c em enquanto simultaneamente ocorria uma diminuição da expressão do microRNA-339-5p neste mesmo grupo. Masamura et al, (2003) analisaram a expressão do GLUT 4

em duas diferentes regiões do coração infartado. Os autores observaram que a expressão do GLUT 4, após 4 semanas, estava aumentada na região da borda e diminuída na região remanescente ao infarto, demonstrando que o metabolismo é alterado diferentemente nas regiões do coração após o IM. Estes resultados suportam a idéia de que ocorra também a translocação do GLUT 4 e que isto possa estar envolvido com o aumento da Myo1c no grupo treinado infartado, uma vez que o exercício tende a restabelecer o metabolismo com a reexpressão de proteínas como a PGC -1 e GLUT 4 em animais com IM.

No coração poucos são os estudos que relacionam o metabolismo glicolítico e oxidativo, em especial a proteína Myo1c, com a função cardíaca e o treinamento físico. Por isso, a validação da Myo1c como alvo do microRNA-339-5p passa a ser de grande interesse, uma vez que esta regulação pode estar diretamente relacionada ao transporte do GLU-4 e a melhora do metabolismo energético promovido pelo treinamento físico no coração de animais infartados.

O segundo gene alvo do microRNA-339-5p selecionado por programas de bioinformática (TargetScan, Miranda e PicTar) foi o PGC-1 β . Neste estudo, foi possível verificar que somente no grupo submetido ao treinamento ocorreu um aumento da expressão do PGC-1 β , no entanto a expressão do PGC-1 β não se alterou para o grupo dos animais infartados e infartados submetidos ao treinamento. A expressão de PGC-1 β é reduzida em certos modelos de doença cardíaca em animal (RIEHLE et al, 2011). Camundongos *knockout* para PGC-1 β submetidos a sobrecarga cardíaca e que apresentaram prejuízo da função cardíaca foi observado aumento do estresse oxidativo e uma menor taxa de utilização do metabolismo glicolítico em relação ao grupo *knockout* para PGC-1 β . Apesar destas proteínas estarem alteradas em determinadas doenças e serem associadas com prejuízo mitocondrial, neste estudo, não foi verificada alteração do PGC-1 β , tanto no grupo dos animais infartados quanto nos infartados submetidos ao treinamento.

Embora a validação do PGC-1 β possa ser de grande interesse, uma vez que esta regulação pode estar diretamente relacionada com a mudança da utilização do substrato, a melhora da eficiência do funcionamento mitocondrial do

coração e, conseqüentemente, a melhora do metabolismo energético promovido pelo treinamento físico no coração de animais infartados, não foi possível neste estudo justificar que o PGC-1 β tenha relação como alvo do microRNA-339-5p.

Uma das limitações para seleção dos microRNAs foi não ter realizado o microarray com um número de amostras maior para que se possa ter um valor mais confiável de expressão para cada grupo. Isso ocorreu pelo elevado custo dos *chipps* para realizar a técnica. No entanto, sabíamos de antemão que o *microarray* geraria um número grande de dados e teríamos que decidir entre vários microRNAs que são prováveis candidatos à regulação gênica de importantes alvos envolvidos com a função cardíaca.

Outra limitação foi estipularmos critérios que, apesar de serem interessantes para mostrar um padrão de expressão com microRNAs em valores absolutos, poderiam fazer com que deixássemos de observar microRNAs importantes a ser estudados. Como ficou evidente ao verificarmos que as expressões dos microRNAs 1, 29c e 214, confirmadas por real time PCR, não foram observadas na lista de microRNAs selecionados para estudo, pois, embora tenham apresentado padrão semelhante aos critérios, não apresentaram valores absolutos suficientes para que fossem incluídos nas tabelas dos microRNAs escolhidos. Por sua vez, os microRNAs 29a e b que não apresentaram padrão de expressão semelhante aos critérios determinados também não apareceram na lista de microRNAs escolhidos, como já era esperado.

8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Anghel, T. M; Pogwizd, S. M. Creating a cardiac pacemaker by gene therapy. Med Biol Eng Comput, v.45, n.2, Feb, p.145-55. 2007.

AbdAlla, S; Fu, X, *et al.* Up-Regulation of the Cardiac Lipid Metabolism at the Onset of Heart Failure. Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry, 9, 190-206. 2011.

Allard, M.F; Schonekess, B.O, *et al.* Contribution of oxidative metabolism and glycolysis to ATP production in hypertrophied hearts. Am J Physiol, 267(2 Pt 2): H742–H750, 1994.

Aurora, A.B, *et al.*, MicroRNA-214 protects the mouse heart from ischemic injury by controlling Ca^{2+} overload and cell death. J Clin Invest. 122(4): p. 1222-32. 2012.

Bagga, S, J; Bracht, *et al.* Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. Cell, v.122, n.4, Aug 26, p.553-63. 2005.

Bansal, A; Dai, Q. *et al.* Proteomic analysis reveals late exercise effects on cardiac remodeling following myocardial infarction. J Proteomics, v.73, n.10, Sep 10, p.2041-9. 2010.

Barringhaus, K. G; Zamore, P. D. MicroRNAs: regulating a change of heart. Circulation, v.119, n.16, Apr 28, p.2217-24. 2009.

Batista, M. L; Santos, R. V *et al.* Endurance training restores peritoneal macrophage function in post-MI congestive heart failure rats. J Appl Physiol, v.102, n.5, May, p.2033-9. 2007.

Beilharz, T. H; Humphreys D. T *et al.* microRNA-mediated messenger RNA deadenylation contributes to translational repression in mammalian cells. PLoS One, v.4, n.8, p.e6783. 2009.

Bers D.M. Calcium fluxes involved in control of cardiac myocyte contraction. Circ Res; 87:275–2, 2000.

Bergman, I; Loxley, R. New spectrophotometric method for the determination of proline in tissue hydrolyzates. Anal Chem 42: 702–706, 1970.

Bernardo, B. C; Weeks K. L. *et al.* Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. Pharmacol Ther, v.128, n.1, Oct, p.191-227.

Blair, S. N; Cooper, K. H. Dose of exercise and health benefits. Arch Intern Med, v.157, n.2, Jan 27, p.153-4. 1997.

Blair, S. N; Oberman A. Epidemiologic analysis of coronary heart disease and exercise. Cardiol Clin, v.5, n.2, May, p.271-83. 1987.

Blomqvist, C. G; Saltin B. Cardiovascular adaptations to physical training. Annu Rev Physiol, v.45, p.169-89. 1983.

Boon, J. A. Manual of Veterinary Echocardiography. Philadelphia: Williams & Wilkins. 1998.

Boguslavskya, S; Chiua, T, *et al.* Myo1c binding to submembrane actin mediates insulin-induced tethering of GLUT4 vesicles. Molecular Biology of the Cell. V.23, p. 465-77. 2012.

Bostjancic, E; Zidar N, *et al.* MicroRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-208 are dysregulated in human myocardial infarction. Cardiology, v.115, n.3, p.163-9. 2010.

Brandstaetter, H; Kendrick-Jones, J *et al.* Molecular roles of Myo1c function in lipid raft exocytosis. Communicative & Integrative Biology. V.5, p. 508-510. 2012.

Brooks, G. A, *et al.* White. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. J Appl Physiol, v.45, n.6, Dec, p.1009-15. 1978.

Brum, P. C; Kosek J. *et al.* Abnormal cardiac function associated with sympathetic nervous system hyperactivity in mice. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.283, n.5, Nov, p.H1838-45. 2002.

Care, A, Catalucci, D, *et al.* MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. Nat Med, v.13, n.5, May, p.613-8. 2007.

Clancy, J. L; Nusch M, *et al.* Methods to analyze microRNA-mediated control of mRNA translation. Methods Enzymol, v.431, p.83-111. 2007.

Chapman, D; Weber, K. T; M, Eghbali. Regulation of fibrillar collagen types I and III and basement membrane type IV collagen gene expression in pressure overloaded rat myocardium. Circ Res, 67(4):787-794. 1990.

Christe, M.E; Rodgers, R.L. Altered glucose and fatty acid oxidation in hearts of the spontaneously hypertensive rat. J Mol Cell Cardiol; 26(10):1371–1375, 1994.

Cravador, A. Os dna sintéticos anti-sentido. Química nova, v.21, n.4, p.441. 1998.

Coderre, L; Kandror, K. V *et al.* Identification and characterization of an exercise-sensitive pool of glucose transporters in skeletal muscle. TheJournal of Biological and Chemistry, v.270, n.46, p.27584-27588, 1995.

Czech, M. P; Corvera, S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. The Journal of Biological and Chemistry, v.274, n.4, p.1865-1868, 1999.

Davila-Roman, V. G; Vedala G, *et al.* Altered myocardial fatty acid and glucose metabolism in idiopathic dilated cardiomyopathy. J Am Coll Cardiol, 40(2): 271–277. 2002.

Davis, J; M. V. Westfall, *et al.* Designing heart performance by gene transfer. Physiol Rev, v.88, n.4, Oct, p.1567-651. 2008.

Dayan, A; Feinberg, M. S. *et al.* Swimming exercise training prior to acute myocardial infarction attenuates left ventricular remodeling and improves left ventricular function in rats. Ann Clin Lab Sci, v.35, n.1, Winter, p.73-8. 2005.

Dee, S; Getts, R. C. MicroRNA expression analysis using the Affymetrix Platform. Methods Mol Biol, v.822, p.117-29. 2011.

Dickhuth, H. H; Nause A. *et al.* Two-dimensional echocardiographic measurements of left ventricular volume and stroke volume of endurance-trained athletes and untrained subjects. Int J Sports Med, v.4, n.1, Feb, p.21-6. 1983.

Divakaran, V; Mann D. L. The emerging role of microRNAs in cardiac remodeling and heart failure. Circ Res, v.103, n.10, Nov 7, p.1072-83. 2008.

Do Carmo, E. C; Fernandes, T. *et al.* Anabolic steroid associated to physical training induces deleterious cardiac effects. Med Sci Sports Exerc, v.43, n.10, Oct, p.1836-48. 2011.

Donahue, J. K. Gene therapy for cardiac arrhythmias. Ann N Y Acad Sci, v.1015, May, p.332-7. 2004.

Elmen, J; Lindow, M. *et al.* LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. Nature, v.452, n.7189, Apr 17, p.896-9. 2008.

Lillian, J; Eichner, L, J; Perry, M. C. miR-378* Mediates Metabolic Shift in Breast Cancer Cells via the PGC-1b/ERRg Transcriptional Pathway. Cell Metabolism. 12, 352–361. 2010.

Donahue, J. K. Gene therapy for cardiac arrhythmias: a dream soon to come true? J Cardiovasc Electrophysiol, v.18, n.5, May, p.553-9. 2007.

Dong, S; Cheng Y. *et al.* MicroRNA expression signature and the role of microRNA-21 in the early phase of acute myocardial infarction. J Biol Chem, v.284, n.43, Oct 23, p.29514-25. 2009.

Douen, A. G; Ramlal, T, *et al.* . Exercise induces recruitment of the "insulin-responsive glucose transporter". Evidence for distinct intracellular insulin- and exercise-recruitable

transporter pools in skeletal muscle. The Journal of Biological and Chemistry, v.265, n.23, p.13427-13430, 1990.

Fernandes, T, *et al.* Efeito do treinamento físico aeróbio sobre as células progenitoras endoteliais derivadas da medula óssea em ratos espontaneamente hipertensos. Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo Dissertação de Mestrado. 2011.

Fernandes, T; Hashimoto N. Y, *et al.* Aerobic exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves regulatory MicroRNAs, decreased angiotensin-converting enzyme-angiotensin ii, and synergistic regulation of angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin (1-7). Hypertension, v.58, n.2, Aug, p.182-9. 2011.

Fernandes, T; Magalhaes F. C, *et al.* Exercise Training Prevents the Microvascular Rarefaction in Hypertension Balancing Angiogenic and Apoptotic Factors: Role of MicroRNAs-16, -21, and -126. Hypertension, v.59, n.2, Feb, p.513-20. 2011.

Fiedler, J; Gupta S. K, *et al.* MicroRNA-Based Therapeutic Approaches in the Cardiovascular System. Cardiovasc Ther, v.30, n.1, Feb, p.e9-e15. 2012.

Fishbein, M. C; Maclean D, *et al.* Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. Am J Pathol, v.90, n.1, Jan, p.57-70. 1978a.

Fleck, S. J. Cardiovascular adaptations to resistance training. Med Sci Sports Exerc, v.20, n.5 Suppl, Oct, p.S146-51. 1988.

Forjaz, C. L; Matsudaira Y, *et al.* Post-exercise changes in blood pressure, heart rate and rate pressure product at different exercise intensities in normotensive humans. Braz J Med Biol Res, v.31, n.10, Oct, p.1247-55. 1998.

French, B. A; Kramer, C. M. Mechanisms of Post-Infarct Left Ventricular Remodeling. Drug Discov Today Dis Mech, v.4, n.3, p.185-196. 2007.

Gaudron, P; K. Hu, *et al.* Effect of endurance training early or late after coronary artery occlusion on left ventricular remodeling, hemodynamics, and survival in rats with chronic transmural myocardial infarction. Circulation, v.89, n.1, Jan, p.402-12. 1994.

Goodyear, L. J; Kahn, B. B. Exercise, glucose transport, and insulin sensitivity. Annual Review of Medicine, v.49, p.235-261, 1998.

Hashimoto, T; Kambara N, *et al.* Expression of MHC-beta and MCT1 in cardiac muscle after exercise training in myocardial-infarcted rats. J Appl Physiol, v.97, n.3, Sep, p.843-51. 2004.

Hayashi, T, Wojtaszewski, J. F *et al.* Exercise regulation of glucose transport in skeletal muscle. American Journal of Physiology, v.273, n.6 Pt 1, p.E1039-1051, 1997.

Henriksen, E. J. Invited review: Effects of acute exercise and exercise training on insulin resistance. Journal Applied of Physiology, v.93, n.2, p.788-796, 2002.

Holloszy, J. O; F. W. Booth. Biochemical adaptations to endurance exercise in muscle. Annu Rev Physiol, v.38, p.273-91. 1976.

Hongyan, Z; Guo-Chang. F. Role of microRNAs in the reperfused myocardium towards post-infarct remodelling. Cardiovascular Research v. 94, 284–292. 2012.

Hullinger, T; G. R. L. Montgomery, *et al.* Inhibition of miR-15 Protects Against Cardiac Ischemic Injury. Circ Res, v.110, n.1, Jan 6, p.71-81. 2011.

Hutvagner, G; M. J. Simard, *et al.* Sequence-specific inhibition of small RNA function. PLoS Biol, v.2, n.4, Apr, p.E98. 2004.

Huss, J.M; Kelly D.P. Nuclear receptor signaling and cardiac energetics. Circ Res 95:568–578. 2004

Huss, J.M, Kelly D.P. Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance. J Clin Invest 115:547–555. 2005

Jackson, B. M; Parish L. M, *et al.* Borderzone geometry after acute myocardial infarction: a three-dimensional contrast enhanced echocardiographic study. Ann Thorac Surg, v.80, n.6, Dec, p.2250-5. 2005.

James, D. E; Burleigh, K. M. et al. Effect of acute exercise and prolonged training on insulin response to intravenous glucose in vivo in rat. Journal of Applied Physiology, v.55, n.6, p.1660-1664, 1983.

Jochem, W; Soto B, *et al.* Radiographic anatomy of the coronary collateral circulation. Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med, v.116, n.1, Sep, p.50-61. 1972.

Johns, T. N. e B. J. Olson. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. Ann Surg, v.140, n.5, Nov, p.675-82. 1954.

Jorge, L; Rodrigues B, *et al.* Cardiac and peripheral adjustments induced by early exercise training intervention were associated with autonomic improvement in infarcted rats: role in functional capacity and mortality. Eur Heart J, v.32, n.7, Apr, p.904-12. 2010.

Kanakis, C; Hickson, R. C. Left ventricular responses to a program of lower-limb strength training. Chest, v.78, n.4, Oct, p.618-21. 1980.

Kamei Y, Ohizumi H, *et al.* PPAR coactivator 1/ERR ligand 1 is an ERR protein ligand, whose expression induces a high-energy expenditure and antagonizes obesity. Proc Natl Acad Sci USA 100:12378–12383. 2003.

Katz, A. M. Fisiologia do Coração: Guanabara Koonagan. 355 p. 1996.

Kawashima, T; T. Shioi. MicroRNA, emerging role as a biomarker of heart failure. Circ J, v.75, n.2, p.268-9. 2011.

Keul, J; Dickhuth, H. H, *et al.* The athlete's heart--haemodynamics and structure. Int J Sports Med, v.3 Suppl 1, Feb, p.33-43. 1982.

Kemi, O. J; Wisloff. U. High-intensity aerobic exercise training improves the heart in health and disease. J Cardiopulm Rehabil Prev, v.30, n.1, Jan-Feb, p.2-11.

Kemi, O. J, *et al.* Myocardial sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase function is increased by aerobic interval training. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil, 2008. 15(2): p. 145-8. 2008.

Kim, V. N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. Nat Rev Mol Cell Biol, v.6, n.5, May, p.376-85. 2005.

Kim H.J; Kim K.W, *et al.* The effect of age on cyclooxygenase-2 gene expression: Nf-kappaB activation and IkappaBalpha degradation. Free radical biology & medicine. 2000;28:683-692.

Kingwell, K. Cardiovascular disease: microRNA protects the heart. Nat Rev Drug Discov, v.10, n.2, Feb, p.98. 2011.

Krek, A; Grun D, *et al.* Combinatorial microRNA target predictions. Nat Genet, v.37, n.5, May, p.495-500. 2005.

Kranias, E. G; Hajjar, R. J. Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulatome. Circ Res ;110:1646–1660. 2012.

Krutzfeldt, J; Rajewsky, N, *et al.* Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. Nature, v.438, n.7068, Dec 1, p.685-9. 2005.

Kumarswamy, R., *et al.*, SERCA2a gene therapy restores microRNA-1 expression in heart failure via an Akt/FoxO3A-dependent pathway. Eur Heart J. 33(9): p. 1067-75. 2012.

Lanford, R. E; Hildebrandt-Eriksen, E. S, *et al.* Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. Science, v.327, n.5962, Jan 8, p.198-201. 2010.

Laurenti, R; Buchalla C. M, *et al.* Ischemic heart disease. Hospitalization, length of stay and expenses in Brazil from 1993 to 1997. Arq Bras Cardiol, v.74, n.6, Jun, p.483-92. 2000.

Lee, R. C; Feinbaum R. L, *et al.* The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell, v.75, n.5, Dec 3, p.843-54. 1993.

Lin, R. C; K. L. Weeks, *et al.* PI3K(p110 alpha) protects against myocardial infarction-induced heart failure: identification of PI3K-regulated miRNA and mRNA. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.30, n.4, Apr, p.724-32.

Loennechen, J. P; Wisloff, U. *et al.* Effects of cariporide and losartan on hypertrophy, calcium transients, contractility, and gene expression in congestive heart failure. Circulation, v.105, n.11, Mar 19, p.1380-6. 2002.

Lowry, O.H, Rosebrough N.J, Farr A.L, *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265– 275. 1951.

Luciano, E; Carneiro, E. M *et al.* Endurance training improves responsiveness to insulin and modulates insulin signal transduction through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-1 pathway. European Journal of Endocrinology, v.147, n.1, p.149-157, 2002.

Maia J. C. C, Gomes S. L, Juliani M. H. Preparation of (gamma-³²P) and (alpha-³²P)-nucleoside triphosphates with high specific activity. In: CM Morel. Genes of parasites: a laboratory manual. Rio de Janeiro: Editora Fundação Oswaldo Cruz. pp. 146–167. 1983.

Mallory, A. C; Reinhart, B. J, *et al.* MicroRNA control of PHABULOSA in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region. EMBO J, v.23, n.16, Aug 18, p.3356-64. 2004.

Magny, E. G; Pueyo, J. I *et al.* Conserved Regulation of Cardiac Calcium Uptake by Peptides Encoded in Small Open Reading Frames. Science.V. 341 no. 6150 pp. 1116-1120.2013.

Masamura, K., *et al.* Myocardial metabolic regulation through peroxisome proliferator-activated receptor alpha after myocardial infarction. Exp Clin Cardiol, 2003. 8(2): p. 61-6. 2003.

Maziere, P; Enright A. J. Prediction of microRNA targets. Drug Discov Today, v.12, n.11-12, Jun, p.452-8. 2007.

Medeiros, A; Oliveira, E. M, *et al.* Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. Braz J Med Biol Res, v.37, n.12, Dec, p.1909-17. 2004.

Medeiros, A; Rolim N. P, *et al.* Exercise training delays cardiac dysfunction and prevents calcium handling abnormalities in sympathetic hyperactivity-induced heart failure mice. J Appl Physiol, v.104, n.1, Jan, p.103-9. 2008.

Montgomery, R. L; Hullinger, T. G, *et al.* Therapeutic inhibition of miR-208a improves cardiac function and survival during heart failure. Circulation, v.124, n.14, Oct 4, p.1537-47. 2011.

Montgomery, R. L; van Rooij, E. MicroRNA regulation as a therapeutic strategy for cardiovascular disease. Curr Drug Targets, v.11, n.8, Aug, p.936-42. 2010.

Montoye, H. J; Metzner H. L, *et al.* Habitual physical activity and blood pressure. Med Sci Sports, v.4, n.4, Winter, p.175-81. 1972.

Mondon, c; Dolkas, c. b; Reaven, G. M. Site of enhanced insulin sensitivity in exercise-trained rats at rest. American Journal of Physiology, v.239, n.3, p.E169-177, 1980.

Mortensen, O; Plomgaard, P, *et al.* PGC-1 is downregulated by training in human skeletal muscle: no effect of training twice every second day vs. once daily on expression of the PGC-1 family. J Appl Physiol 103: 1536–1542, 2007.

Musch, T. I; R. L. Moore, *et al.* Endurance training in rats with chronic heart failure induced by myocardial infarction. Circulation, v.74, n.2, Aug, p.431-41. 1986.

Natali, A. J; D. L. Turner, *et al.* Regional effects of voluntary exercise on cell size and contraction-frequency responses in rat cardiac myocytes. J Exp Biol, v.204, n.Pt 6, Mar, p.1191-9. 2001.

Nelson, B. R; Anderson, D. M, *et al.* Small Open Reading Frames Pack a Big Punch in Cardiac Calcium Regulation. Circulation Research.114:18-20, 2014.

Nilsen, T. W. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. Trends Genet, v.23, n.5, May, p.243-9. 2007.

Nozawa, M; S. Miura, *et al.* Origins and evolution of microRNA genes in plant species. Genome Biol Evol, Jan 4. 2012.

Obad, S; Dos Santos C. O, *et al.* Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny LNAs. Nat Genet, v.43, n.4, Apr, p.371-8. 2011.

Okamoto, H; J. Nakae, *et al.* Transgenic rescue of insulin receptor-deficient mice. J Clin Invest, v.114, n.2, Jul, p.214-23. 2004.

Olena, A. F; Patton J. G. Genomic organization of microRNAs. J Cell Physiol, v.222, n.3, Mar, p.540-5. 2009.

Oliveira, R. S; Ferreira J. C, *et al.* Cardiac anti-remodelling effect of aerobic training is associated with a reduction in the calcineurin/NFAT signalling pathway in heart failure mice. J Physiol, v.587, n.Pt 15, Aug 1, p.3899-910. 2009.

Orenstein, T. L; Parker T. G, *et al.* Favorable left ventricular remodeling following large myocardial infarction by exercise training. Effect on ventricular morphology and gene expression. J Clin Invest, v.96, n.2, Aug, p.858-66. 1995.

Ostadal B; Ostadalova I, *et al.* Development of cardiac sensitivity to oxygen deficiency:

comparative and ontogenetic aspects. Physiol Rev, 79(3): 635–659. 1999

Palaniyandi, S. S; Ferreira J. C, *et al.* PKC β II inhibition attenuates myocardial infarction induced heart failure and is associated with a reduction of fibrosis and pro-inflammatory responses. J Cell Mol Med, v.15, n.8, Aug, p.1769-77.

Port, J. D; Walker, L. A, *et al.* Temporal expression of miRNAs and mRNAs in a mouse model of myocardial infarction. Physiol Genomics, v.43, n.19, Oct 6, p.1087-95. 2011.

Palojoki, E., Saraste, A, Eriksson, A, *et al.* Cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 280(6):H2726-2731, 2001.

Presneau, N., Eskandarpour M, *et al.* MicroRNA profiling of peripheral nerve sheath tumours identifies miR-29c as a tumour suppressor gene involved in tumour progression. Br J Cancer 2012.

Raper, S. E., N. Chirmule, *et al.* Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. Mol Genet Metab, v.80, n.1-2, Sep-Oct, p.148-58. 2003.

Ricarte-Filho, J. C; Fuziwara, C. S, *et al.* Effects of let-7 microRNA on Cell Growth and Differentiation of Papillary Thyroid Cancer. Transl Oncol, v.2, n.4, Dec, p.236-41. 2009.

Riehle, C; Adam, R. Wende; A, R, *et al.* Hypertrophy Novelty and Significance Deficiency Accelerates the Transition to Heart Failure in Pressure Overload β PGC-1. Circ Res 109:783-793;. 2011.

Rocha, F. L; Carmo, E. C, *et al.* Anabolic steroids induce cardiac renin-angiotensin system and impair the beneficial effects of aerobic training in rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.293, n.6, Dec, p.H3575-83. 2007.

Roque, F. R; Soci, U. P, *et al.* Moderate exercise training promotes adaptations in coronary blood flow and adenosine production in normotensive rats. Clinics (Sao Paulo), v.66, n.12, p.2105-11. 2011.

Rosamond, T; Wetzel L. H, *et al.* IntraCamerall right coronary artery: detection by 64 slice coronary computed tomographic angiography and implications for radiofrequency ablation of atrial dysrhythmias. Pacing Clin Electrophysiol, v.30, n.12, Dec, p.1571-4. 2007.

Rolim, N. P; Medeiros, A, *et al.* Exercise training improves the net balance of cardiac Ca²⁺ handling protein expression in heart failure. Physiol Genomics, v.29, n.3, May 11, p.246-52. 2007.

Saltiel, A. R, Kahn, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature 414, 799–806. 2001.

Saltin, B. Hemodynamic adaptations to exercise. Am J Cardiol, v.55, n.10, Apr 26, p.42D-47D. 1985.

Santos, A. A; Helber I, *et al.* Doppler echocardiographic predictors of mortality in female rats after myocardial infarction. J Card Fail, v.15, n.2, Mar, p.163-8. 2009.

Schaible, T. F; Scheuer J. Effects of physical training by running or swimming on ventricular performance of rat hearts. J Appl Physiol, v.46, n.4, Apr, p.854-60. 1979.

Schwarz, S; Grande, A. V, *et al.* The microRNA regulated SBP-box genes SPL9 and SPL15 control shoot maturation in Arabidopsis. Plant Mol Biol, v.67, n.1-2, May, p.183-95. 2008.

Shi, B; Guo, Y, *et al.* Altered expression of microRNAs in the myocardium of rats with acute myocardial infarction. BMC Cardiovasc Disord, v.10, p.11. 2010.

Soci, U. P; Fernandes, T, *et al.* MicroRNAs 29 are involved in the improvement of ventricular compliance promoted by aerobic exercise training in rats. Physiol Genomics, v.43, n.11, Jun 15, p.665-73. 2011.

Song, J; Zhang, X. Q., *et al.* Sprint training improves contractility in postinfarction rat myocytes: role of Na⁺/Ca²⁺ exchange. J Appl Physiol, v.97, n.2, Aug, p.484-90. 2004.

Sorenson M. M, Coelho H. S, Reuben J. P. Caffeine inhibition of calcium accumulation by the sarcoplasmic reticulum in mammalian skinned fibers. J Membr Biol 90: 219–230. 1986.

Spadaro, J; Fishbein, M. C, *et al.* Characterization of myocardial infarcts in the rat. Arch Pathol Lab Med, v.104, n.4, Apr, p.179-83. 1980.

Stenvang, J, Petri, A, *et al.* Inhibition of microRNA function by antimiR oligonucleotides. Silence, v.3, n.1, Jan 9, p.1. 2012.

Stratton, J. R; Levy W. C, *et al.* Cardiovascular responses to exercise. Effects of aging and exercise training in healthy men. Circulation, v.89, n.4, Apr, p.1648-55. 1994.

Szatkowski, M. L, Westfall M. V, *et al.* In vivo acceleration of heart relaxation performance by parvalbumin gene delivery. J Clin Invest, v.107, n.2, Jan, p.191-8. 2001.

Takada, S; Asahara H. Current strategies for microRNA research. Mod Rheumatol, Jan 12. 2012.

Toyoda, T; Carol, D, A, *et al.* Myo1c Regulates Glucose Uptake in Mouse Skeletal Muscle. 286:4133-4140. J. Biol. Chem. 2011.

Thum, T. MicroRNA therapeutics in cardiovascular medicine. EMBO Mol Med, v.4, n.1, Jan, p.3-14. 2011.

- Tucci, P. J. F. Pathophysiological Characteristics of the Post-Myocardial Infarction Heart Failure Model in Rats. Sociedade Brasileira de Cardiologia, p.1-5. 2010.
- Van der Vusse; Glatz, G. J, *et al.* Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart. Physiol Rev, 72(4):881–940. 1992.
- Van Rooij, E. The art of microRNA research. Circ Res, v.108, n.2, Jan 21, p.219-34. 2011.
- Van Rooij, E; E. N. Olson. microRNAs put their signatures on the heart. Physiol Genomics, v.31, n.3, Nov 14, p.365-6. 2007a.
- Van Rooij, E; Sutherland, L. B, *et al.* Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. Proc Natl Acad Sci U S A, v.105, n.35, Sep 2, p.13027-32. 2008.
- Van Rooij, E; Olson, E. N.. MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. J Clin Invest, v.117, n.9, Sep, p.2369-76. 2007b.
- Van Rooij, E; Sutherland, L. B, *et al.* Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. Proc Natl Acad Sci U S A, v.105, n.35, Sep 2, p.13027-32. 2008.
- Wang, J; Huang, W, *et al.* MicroRNA-24 Regulates Cardiac Fibrosis after Myocardial Infarction. J Cell Mol Med, Jan 19. 2012.
- Wisloff, U; Loennechen J. P, *et al.* Aerobic exercise reduces cardiomyocyte hypertrophy and increases contractility, Ca^{2+} sensitivity and SERCA-2 in rat after myocardial infarction. Cardiovasc Res, v.54, n.1, Apr, p.162-74. 2002.
- Wisloff, U; Stoylen A, *et al.* Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patients: a randomized study. Circulation, v.115, n.24, Jun 19, p.3086-94. 2007.
- Wolff, J. A; Herweijer, H. Nonviral vectors for cardiovascular gene delivery. Ernst Schering Res Found Workshop, n.43, p.41-59. 2003.
- Xu, X; Wan, W, *et al.* Effects of exercise training on cardiac function and myocardial remodeling in post myocardial infarction rats. J Mol Cell Cardiol, v.44, n.1, Jan, p.114-22. 2008.
- Zhang, X. B; Chen, B. S. Perspective of microRNA in cardiovascular-associated diseases. Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi, v.36, n.7, Jul, p.661-3. 2008.
- Zhang, C., MicroRNAs in vascular biology and vascular disease. J Cardiovasc Transl Res. 3(3): p. 235-40. 2010.

TABELA 2-Morfometria e índices de função sistólica e diastólica obtidos pelo exame ecocardiográfico, pré e pós o protocolo de TF de dez semanas. Média $\pm$ Desvio Padrão. Os dados foram analisados pela análise de variância (ANOVA) e o teste de Bonferroni foi usado para verificar a diferença significativa entre as médias. # p < 0,05, pré ou pós vs respectivo pré ou pós do grupo Co sham, & p < 0,05, pré ou pós vs respectivo pré ou pós do grupo TR-SHAM, \$ p < 0,05, pré ou pós vs respectivo pré ou pós do grupo SED-IM e * p < 0,05 pós vs pré do mesmo grupo.

Medida	SED-SHAM		TR-SHAM		SED-IM		TR-IM	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
%Infarto					30%	29%	29%	28%
MVE (g)					0,84 $\pm$ 0,01	0,94 $\pm$ 0,02*	0,85 $\pm$ 0,02	1,12 $\pm$ 0,03#*
EPA(mm)	1,74 $\pm$ 0,003	1,76 $\pm$ 0,002	1,73 $\pm$ 0,004	1,80 $\pm$ 0,003	1,23 $\pm$ 0,002#&	1,28 $\pm$ 0,003#&	1,25 $\pm$ 0,002	1,30 $\pm$ 0,003#&
EPP(mm)	1,44 $\pm$ 0,003	1,47 $\pm$ 0,01	1,45 $\pm$ 0,001	1,72 $\pm$ 0,003*#	1,54 $\pm$ 0,003#&	1,74 $\pm$ 0,02*#	1,56 $\pm$ 0,002#&	1,82 $\pm$ 0,01*#&\$
FEAT%	72%	70%	70%	71%	36%#&	33%*#&	35%#&	42%*#&\$
E/A(m\ s)	1,42 $\pm$ 0,1	1,40 $\pm$ 0,1	1,40 $\pm$ 0,1	1,55 $\pm$ 0,4	1,93 $\pm$ 0,1#&	2,05 $\pm$ 0,1*#&	1,96 $\pm$ 0,1#&	1,74 $\pm$ 0,1*#&\$

ANEXO 1

9.1 Mudanças no Projeto Inicial

Inicialmente, a proposta do projeto enviado a comissão de pós graduação da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo apresentava como objetivo traçar o perfil de microRNAs expressos na área remanescente ao IM de ratos Wistar submetidos ao TF de natação e, em seguida, seria selecionado um microRNA específico para ser utilizado como terapia gênica em animais com IM.

No entanto, posteriormente, ao início do projeto, ocorreram imprevistos para realização da técnica do microarray. Principalmente, por atrasos na importação ocasionados por falta de ter um representante permanente credenciado da empresa Affimetrix do Brasil, que realizasse as importações dos *chips* e os reagentes necessários para realização dos experimentos de microarray.

Após os experimentos de microarray, os quais foram padronizados em nosso Laboratório, a partir deste e outro projeto que está sendo realizado, paralelamente por outro estudante, tivemos ainda que fazer as análises do microarray utilizando um programa com o qual não estávamos familiarizados, pois a Affimetrix acaba de se instalar no Brasil e nós fomos pioneiros nestas metodologias, segundo informações do representante da empresa em São Paulo.

Para darmos continuidade à segunda etapa deste projeto fizemos o orçamento dos custos para compra de oligonucleotídeos para serem usados como antisense em várias empresas. Depois de longo tempo e discussão de metodologias a serem utilizadas, concluímos que os custos para a compra destes antisense para uso em ratos ficaria muito elevado, uma vez que a droga é utilizada por grama de peso corporal. Desta forma, decidimos comprar a sequência subclonada de um microRNA em um vetor de expressão para microRNAs (plasmídio) viral e fazer o empacotamento deste vetor em um lentivírus.

Antes de finalizar os experimentos de microarray, determinamos que o microRNA-29c que tem a expressão diminuída com o TF e que está associado com a fibrose e a perda da função cardíaca, fosse o escolhido para iniciar a padronização da metodologia de transfecção *in vivo* em nosso laboratório. A padronização ocorreu em parceria com outro projeto desenvolvido no nosso laboratório. A decisão de padronizar a técnica de transfecção *in vivo* em conjunto com outro projeto foi para estabelecer os procedimentos cirúrgicos ideais, a concentração ideal de aplicação nos animais e o tempo de duração da

toracotomia esquerda sob condições assépticas através do terceiro espaço intercostal. O pericárdio foi aberto e um cateter G 22 contendo 200µL de corante (azul de metileno) foi avançado a partir do ápice do VE para o arco aórtico. A aorta e artérias pulmonares foram pinçadas distalmente ao local do cateter e da solução injetada. Um grampo sobre a aorta e a artéria pulmonar foi mantido por 10s, enquanto o coração bombeava contra o sistema fechado (isovolumétrico). Este procedimento permite à solução de azul de metileno (0,5 mM) circular nas artérias coronárias e perfundir o coração. Após 10s, o grampo sobre a aorta e a artéria pulmonar foi retirado. Logo em seguida, a artéria coronária anterior descendente esquerda foi ligada distalmente a 2 mm de sua origem com fio de polipropileno não absorvível (5.0, ETHICON, Brasil). Após a remoção de ar, o tórax foi fechado, e os animais foram extubados e transferidos de volta para suas gaiolas. Dos 10 animais utilizados neste teste, 3 morreram devido a erros de manipulação durante a cirurgia, 2 morreram após dois e três dias da cirurgia, e os outros 5 animais foram eutanasiados após 30 dias do procedimento cirúrgico.

Outro procedimento foi realizado para testar se haveria uma maior absorção, imediatamente após a aplicação do corante azul de metileno em duas diferentes técnicas (técnica A e técnica B). Para isso, foram selecionados 10 ratos Wistar com peso de 290 ± 10 g provenientes do ICB-USP.

A primeira técnica (A) foi realizada como descrito acima: um cateter G 22 contendo 200µL de corante (azul de metileno) foi avançado a partir do ápice do VE para o arco aórtico. A aorta e artérias pulmonares foram pinçadas distalmente ao local do cateter e da solução injetada. Um grampo sobre a aorta e a artéria pulmonar foi mantido por 10s, enquanto o coração bombeava contra o sistema fechado (isovolumétrico). A diferença em relação ao procedimento descrito acima, é que nesta técnica não foi realizado o IM. Imediatamente, após a injeção o animal foi eutanasiado.

A segunda técnica (B) foi feita com ratos anestesiados com uma mistura de ketamina/xilazina intraperitoneal. Em seguida, os ratos foram entubados para ventilação mecânica e foi inserida uma cânula (PE-50) na artéria carótida. A cânula foi guiada até o VE e a pressão do VE aferida. A cânula estava heparinizada e foi preenchida com 200µL de azul de metileno, sendo a extremidade externa ocluída. Após a cânula chegar ao VE, foi injetada a solução de azul de metileno por 10s e, logo em seguida, o animal foi eutanasiado.

Pelas figuras (2A e 2B) histológicas (técnica A e técnica B) podemos observar que imediatamente após a injeção do azul de metileno, sua penetração foi visivelmente maior na técnica B (figura 2B) que na técnica A (figura 2A).

Apesar dos testes com as técnicas A e B terem sido feitas com uma solução (azul de metileno) com propriedades diferentes dos vetores virais que foram usados no experimento, o que vai determinar o tempo de permanência da solução no tecido, podemos observar que a primeira técnica utilizada demonstrou ser realmente mais efetiva.

Estes testes apresentam outras limitações, como o número reduzido de animais utilizados e a não quantificação do azul de metileno nos cortes histológicos, no entanto, o intuito principal dos testes foi aprender técnicas diferentes e verificar se mesmo com uma solução com propriedades diferentes da que será utilizada, a técnica com injeção diretamente no miocárdio é mais efetiva.

FIGURA 25-Histologia do VE após o procedimento de injeção com 200µL de azul de metileno. A. primeira técnica. B segunda técnica

9.3 Tratamento *in vivo*

Foram realizados dois experimentos pilotos de transfecção *in vivo* para padronizar os métodos, para ajustar procedimentos, aperfeiçoar e homogeneizar resultados. Esses experimentos consistiram na infusão de um vetor lentiviral de expressão do microRNA-29c, também com objetivos de investigar o potencial terapêutico dessas moléculas. A seguir estão apresentados os métodos e alguns resultados do segundo estudo piloto:

9.4 Preparação do Vetor Viral para Transfecção

Compramos um plasmídio já com o miR-29c clonado no vetor lentiviral da empresa Biossettia Inc, San Diego, CA.

9.5 Transformação de Bactérias Eletro Competentes

Para observar os efeitos da superexpressão do miR-29c no coração de ratos SHR foram utilizados plasmídeos de superexpressão para o pré-miR-29c (Biossettia Inc, San Diego, CA) e plasmídeos acessórios (HGM, HSVG, REV e TAT- cedidos pelo Prof. Dr. Gustavo Mostoslavsky da Boston University) para a montagem do *delivery* lentiviral do plasmídeo do estudo.

Os plasmídeos acima citados foram amplificados, através de sua inserção individual em bactérias *E. Coli*, pelo processo de eletroporação (U=1700V; T=5ms) com a utilização do Multiporator (AG22331, Eppendorf, Hamburg, DE). As bactérias foram retiradas do freezer -80 e o eletroporador foi ajustado na voltagem e no tempo adequado. Foram adicionados 15 µL de plasmídeo no eppendorf contendo as bactérias aliquotadas a serem transformadas. O conteúdo do eppendorf (plasmídeos + bactérias eletrocompetentes) foi cuidadosamente transferido para uma cubeta de eletroporação de forma que ficasse bem distribuído no fundo da mesma e a cubeta foi inserida no eletroporador e o mesmo foi acionado. Foi esperado o tempo requerido para o processo físico de desestabilização da membrana e entrada do plasmídeo no citosol bacteriano pelo eletroporador. A cubeta foi retirada do eletroporador e foram adicionados 900 µL de meio LB (Peptona 1%, Extrato de levedura 0,5% e NaCl a 1%) na cubeta. O conteúdo eletroporado foi suavemente homogenizado com o meio LB adicionado dentro da cubeta e transferido para um novo eppendorf. Após isso, as bactérias eletroporadas foram recuperadas através de banho a 37° C por 1 hora e estavam prontas para serem amplificadas.

9.6 Pré Inóculo e Inóculo

Para serem amplificadas ou proliferarem, as bactérias transformadas foram pré-inoculadas em Shaker Thermo Scientific (MaxQ 4000, modelo 4331, Marietta OH - USA) *overnight* em tubo estéril a 37° C em 5 mL de meio LB com o antibiótico seletor Ampicilina (1:500). Em seguida, as bactérias proliferadas foram reincubadas no mesmo Shaker *overnight* em um Erlen Meyer contendo 500 mL de meio LB Ampicilina (1:500).

9.7 Maxi Prep

A extração do plasmídeo amplificado das bactérias foi realizada pelo experimento de Maxi Prep com o kit Tip 500 da Qiagen (#1216 – Hilden – DE). Foram realizadas sucessivas centrifugações de 30 minutos a 7500 RPM, para obter o *pellet* bacteriano de 500 mL de inóculo para cada um dos plasmídeos utilizados. O *pellet* bacteriano foi submetido a preparação para extração, à lise, e posteriormente a neutralização segundo as normas do fabricante do Kit. Após a neutralização foi realizada uma incubação em gelo normal por 20 minutos e o conteúdo neutralizado foi submetido a centrifugação por 30 minutos a 9500 RPM por 4°C. Após a incubação o conteúdo foi filtrado em gase estéril e incluído em colunas ativadas por 10mL tampão QBT (segundo instruções do fabricante). Após a passagem do conteúdo a ser extraído. A coluna foi lavada 2 vezes com tampão QC e colocada em um tubo falcon estéril, onde recebeu o tampão QF, para extração ou eluição do DNA da coluna. Após a eluição foram adicionados 10,5 mL de isopropanol ao DNA, que foi mantido no freezer -80°C *overnight*, para precipitação. No dia seguinte o DNA precipitado foi centrifugado a 15000 g por 30 minutos a 4°C, e foram obtidos os *pellet* de DNA, que foram lavados com 1,5 mL de álcool a 70% (analítico) e transferidos para eppendorfs. Os *pellets* foram centrifugados em microcentrífuga (Eppendorf modelo 5415R, Hamburgo, DE) a 15000 g durante 10 minutos a 4°C e ressuspensos em 200 µL de TE. A quantidade de DNA dos plasmídeos extraídos foi dosada, em equipamento Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA) e preparados para a montagem do vetor lentiviral.

9.8 Produção do vetor lentiviral do microRNA-29c

A produção do vetor lentiviral de expressão do microRNA-29c foi realizado em células HEK293T. A produção do vetor lentiviral consiste na infecção em células produtoras dos plasmídeos acessórios do lentivírus mais o plasmídeo de interesse. Para

o experimento foram produzidas 40 placas P100 (100mm de diâmetro) do vetor lentiviral de expressão do microRNA-29c para os animais tratados e também 20 placas do vetor lentiviral controle (CSI), que continha o vetor lentiviral adicionado do plasmídeo sem o inserto do pré-miR-29c, totalizando 60 placas.

9.9 Plaqueamento

Para o plaqueamento foram adicionados 10 mL de gelatina a 3% em cada placa, as quais foram mantidas por 45min na estufa a 37°C. Posteriormente, a gelatina foi aspirada e as placas mantidas no fluxo laminar por meia hora sob radiação ultra violeta, durante a preparação das células HEK293T. As células HEK293T foram tratadas com tripsina e centrifugadas por 5 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi aspirado e as células foram ressuspensas em 5 mL de meio DMEM + BCS 10% e contadas na câmara de Newbauer totalizando o número de $4,5 \times 10^6$ por placa, o que representa 80% de confluência. As células plaqueadas foram incubadas por 24 h a 37° C e 5% de CO₂. Após as 24 horas, o meio das células foi trocado para DMEM-H, sem soro e penicilina (*starving*).

9.10 Transfecção do Vetor Lentiviral

Em um tubo ependorf (1,5 mL) foram adicionados 655 µL de Opti-Mem (Dibco, Invitrogen, CA, USA) adicionado de 2,5 µL de cada plasmídeo acessório (TAT, VER, HSVG e HGM – 300 ng) e 1 mL de plasmídeo com o pré-miR-29c ou o CSI (ou 4 µg dos plasmídeos de interesse). Em um segundo tubo foram adicionados 655 µL de Opti-Mem adicionado de 275 µL lipofectamina 2000 (Invitrogen CA, USA), incubado em temperatura ambiente durante 5 minutos. O Segundo tubo foi suavemente pipetado ao primeiro e a solução foi incubada novamente em temperatura ambiente por 20 minutos. Após a incubação foi adicionado o volume total do tubo em cada placa com DMEM-H.

Aproximadamente 8 horas após, o meio foi trocado para o meio completo (DMEM-H, 10% Donor Bovine Serum com Ferro Fe e 1 % de penicilina). Após 72 horas, uma amostra de 1 mL de sobrenadante das células foi retirado para ser submetido à titulação. O restante do sobrenadante viral produzido pelas células HEK293T foi submetido à ultracentrifugação em ultracentrífuga com velocidade de 50.000 g durante 90 minutos (Sorvall – Ultra PRO- 80) e os *pellets* virais foram ressuspensos e concentrados 1000 x em meio DMEM.

9.11 Protocolo de Titulação dos Lentivírus

O sobrenadante das células foi retirado, e foram obtidos os títulos virais por intermédio do kit de titulação QuickTiter™Lentivirus Titer Kit (VPK-107, San Diego, CA), segundo o protocolo do fabricante. A titulação obtida foi de $2,0 \times 10^8$ partículas virais/mL de sobrenadante para os plasmídeos CSI e $2,25 \times 10^8$ partículas virais/mL para o plasmídeo contendo o inserto do pré-miR-29c.

9.12 Cirurgia e Transfecção *in vivo* do Vetor Lentiviral no Coração

Ratos SHR foram anestesiados com uma mistura de ketamina/xilazina intraperitoneal. Em seguida, os ratos foram entubados para ventilação mecânica e foi realizada uma injeção no VE, contendo 200µL, em diferentes concentrações do lentivírus (2 e 10 µL) nos animais tratados, enquanto os animais do grupo SHAM receberam soro.

SHR 7B: baixa concentração do lentivirus (2 µL) e sacrificados após 7 dias.

SHR 7A: alta concentração do lentivirus (10 µL) e sacrificados após 7 dias.

SHR 14B: baixa concentração do lentivirus (2 µL) e sacrificados após 14 dias.

SHR 14A: alta concentração do lentivirus (10 µL) e sacrificados após 14 dias.

COS: Controle tratado com soro (10 µL) e sacrificados após 14 dias.

CSI: Controle com plasmídeo sem inserto (10 µL) e sacrificados após 14 dias.

Os animais foram tratados com uma baixa concentração do lentivírus ($2 \mu\text{L} = 2 \times 2,25 \times 10^8$ partículas virais/µL) e com uma dose alta do lentivirus ($10 \mu\text{L} = 10 \times 2,25 \times 10^8$ partículas virais/µL). A seguir os animais foram extubados e transferidos de volta para suas gaiolas e sacrificados após 7 e 14 dias.

A seguir serão descritos os resultados da titulação, expressão de *Green Fluorescent Protein* (GFP) em fígado e coração de ratos SHR, expressão de microRNA-29c por real time-PCR no VE, expressão gênica de colágeno do tipo I no VE, concentração de hidroxiprolina cardíaca dos animais tratados com plasmídeo contendo o inserto do pré-microRNA-29c-gfp. Os resultados são referentes ao VE.

9.13 Titulação

Os títulos obtidos para as amostras dosadas foram satisfatórios e estavam dentro da amplitude esperada de partículas virais por mL de sobrenadante. A curva padrão de concentrações de P24 (Proteína 24) está apresentada na figura 11. A titulação obtida foi de $2,0 \times 10^8$ partículas virais/mL de sobrenadante para os plasmídeos CSI e $2,25 \times 10^8$ partículas virais/mL para o plasmídeo contendo o inserto do pré-miR-29c.

FIGURA 26: Curva padrão para a titulação de lentivírus

9.14 Expressão de *Green Fluorescent Protein* em Fígado e Coração de Ratos SHR

Conforme a Figura 23 a expressão de GFP no coração apresentou aumento do grupo SHR14A comparado aos grupos COS, SHR14B SHR7A, SHR7B. Já o grupo SHR14A não se alterou muito ao ser comparado ao grupo CSI.

Conforme a intensidade das bandas apresentadas na figura 24 pode-se observar que a expressão hepática de GFP foi mais alta que a cardíaca. Novamente, o grupo SHR14A apresentou expressão aumentada em relação aos grupos SHR7B e SHR14B e COS. Já a expressão do SHR14B foi muito semelhante a do grupo CSI.

No entanto, a expressão de GFP não se apresentou muito alta no coração, diferentemente do que ocorreu no fígado.

FIGURA 27-Expressão proteica de GFP em coração de SHR tratados com pré-miR-29c por Western Blott em unidades arbitrárias (U.A.). SHR7B – tratados com baixa dose após 7 dias (n=2); SHR7A – tratados com alta dose após 7 dias (n=3); SHR14B – tratados com baixa dose após 14 dias (n=3); SHR14A – tratados com alta dose após 14 dias (n=2); CSI – controle sem inserto, tratados com o plasmídeo sem o pré-miR-29c (n=2); COS – controle tratado com soro (n=2); GFP - células 293T sem expressão de GFP, GFP+ células 293T com alta expressão de GFP.

FIGURA 28-Expressão proteica de GFP em fígado de SHR por Western Blott em unidades arbitrárias (U.A.) em SHR tratados com o pré-miR-29c. SHR7B – tratados com baixa dose após 7 dias; SHR7A – tratados com alta dose após 7 dias(n=3); SHR14B – tratados com baixa dose após 14 dias (n=3); SHR14A – tratados com alta dose após 14 dias (n=3); CSI – controle sem inserto, tratados com o plasmídeo sem o pré miR-29 (n=2); COS – controle tratado com soro (n=2); GFP- células 293T sem expressão de GFP, GFP+ células 293T com alta expressão de GFP.

9.15 Expressão do MicroRNA-29c por Real Time-PCR no Ventrículo Esquerdo

Para avaliar a eficiência do tratamento com o vetor lentiviral foi realizado a análise da expressão do microRNA-29c nos animais experimentais.

Conforme as figuras 25 e 26 mostram, tanto os grupos tratados após 7 dias, quanto os grupos tratados após 14 dias apresentaram aumento de expressão em comparação aos seus controles. Os grupos SHR7B e SHR7A apresentaram

expressão aumentada quando comparado aos seus controles. A expressão dos grupos SHR14B e SHR14A também foi aumentada quando comparado ao controle.

FIGURA 29-Expressão do microRNA-29c realizada por reação de PCR em tempo real. SHR – ratos espontaneamente hipertensos; SHR7B – tratados com baixa dose após 7 dias (n=3); SHR7A – tratados com alta dose após 7 dias (n=3); COS – controle tratado com soro (n=2).

FIGURA 30-Expressão do microRNA-29c realizada por reação de PCR em tempo real. SHR14B – tratados com baixa dose após 14 dias (n=3); SHR14A – tratados com alta dose após 14 dias (n=3); COS – controle tratado com soro (n=2).

9.16 Expressão Gênica do Colágeno do tipo I no Ventrículo Esquerdo

A expressão gênica do colágeno tipo I (COLIAI), um dos alvos do microRNA-29c com alta expressão no coração de SHR, diminuiu também para todos os grupos tratados. Como ilustra a figura 27, os grupo SHR7B e o grupo SHR7A apresentaram diminuição comparado aos controles. A figura 28 também mostra uma diminuição do grupo SHR14B e do grupo SHR14A, quando comparado aos seus controles.

FIGURA 31-Expressão relativa do colágeno COLIAI (alvo do mir-29c), realizado por PCR em tempo real. SHR7B – tratados com baixa dose após 7 dias (n=3); SHR7A – tratados com alta dose após 7 dias (n=3); CSI – controle sem inserto, tratados com o plasmídeo sem o pré-miR-29c (n=2).

FIGURA 32-Expressão gênica relativa do colágeno COL1A1 (alvo do miR-29c) realizado por PCR em tempo real. SHR – ratos espontaneamente hipertensos; SHR14B – tratados com baixa dose após 14 dias (n=3); SHR14A – tratados com alta dose após 14 dias (n=3); CSI – controle sem inserto, tratados com o plasmídeo sem o pré-miR-29c (n=2).

9.17 Concentração de Hidroxiprolina Cardíaca

Um método indireto de mensuração do colágeno cardíaco é a mensuração da Hidroxiprolina (OH- prolina) cardíaca. Nessa medida, conforme a figura 29 os animais tratados por 7 dias apresentaram concentrações de OH prolina aumentados em relação aos controles e aos grupos SHR14B e SHR14A. Entretanto, para os grupos tratados por 14 dias esses valores se normalizaram e os animais hipertensos não apresentaram diferenças comparado ao grupo controle.

FIGURA 33-Conteúdo total de colágeno em cardiomiócitos avaliado pela quantificação da concentração da Hidroxiprolina (OH-Pro -mg/g) em SHR tratados com pré-miR-29c; SHR7B – tratados com baixa dose após 7 dias (n=3); SHR7A – tratados com alta dose após 7 dias (n=3); SHR14B – tratados com baixa dose após 14 dias (n=3); SHR14A – tratados com alta dose após 14 dias (n=3); COS – controle tratado com soro (n=2).

ANEXO 2

JANEIRO DE 2014

Cellular Physiology
and Biochemistry

Cell Physiol Biochem 2014;33:657-669

DOI: 10.1159/000358842

Published online: March 06, 2014

Accepted: January 20, 2014

© 2014 S. Karger AG, Basel

www.karger.com/cpb

1421-9778/14/0333-0657\$39.50/0

This is an Open Access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported license (CC BY-NC) (www.karger.com/CC-BY-NC), applicable to the online version of the article only. Distribution permitted for non-commercial purposes only.

Karger
Open access

657

Original Paper

Expression of MicroRNA-29 and Collagen in Cardiac Muscle after Swimming Training in Myocardial-Infarcted Rats

Stéphano F. S. Melo^a Tiago Fernandes^a Valério G. Baraúna^a Katt C. Matos^a
Alexandra A. S. Santos^b Paulo J. F. Tucci^b Edilamar M. Oliveira^a

^aLaboratory of Biochemistry and Molecular Biology of the Exercise, Department of Human Movement Biodynamic, School of Physical Education and Sport University of São Paulo, ^bLaboratory of Cardiac Physiology, Department of Physiology, School of Medicine, Federal University of São Paulo, São Paulo, ^cDepartment of Physiological Sciences, Federal University of Espírito Santo, Vitória, Brazil

Key Words

Myocardial infarction • Aerobic training • microRNA-29 • Collagen

Abstract

Background: Myocardial infarction (MI) is accompanied by cardiac growth, increased collagen deposition, cell death and new vascularization of the cardiac tissue, which results in reduced ventricular compliance. The MIRNA-29 family (29a, 29b, and 29c) targets mRNAs that encode collagens and other proteins involved in fibrosis. In this study we assessed the effects of swimming training (ST) on expression of the cardiac miRNA-29 family and on genes encoding collagen after MI in rats. **Methods:** ST consisted of 60 min/day/10 weeks and began four weeks after MI. MIRNA and collagen expression analysis were performed in the infarcted region (IR), border region (BR) of the infarcted region and in the remote myocardium (RM) of the left ventricle. **Results:** MIRNA-29a expression increased 32% in BR and 52% in RM in the TR-INF compared with SED-INF. MIRNA-29c increased by 63% in BR and 55% in RM in TR-INF compared with SED-INF group. COL IAI and COL IIIAI decreased by 63% and 62% in TR-INF, respectively, compared with SED-INF. COL IIIAI expression decreased by 16% in TR-INF compared with SED-INF. **Conclusion:** Altogether, our results showed that ST restores cardiac miRNA-29 (a and c) levels and prevents COL IAI and COL IIIAI expression in BR and RM, which may contribute to the improvement in ventricular function induced by swimming training, after MI.

Copyright © 2014 S. Karger AG, Basel

Edilamar M. Oliveira

Laboratory of Biochemistry, School of Physical Education and Sport, Av. Prof. Mello Moraes, 85, Butantã, Cidade Universitária, 05508-9000, São Paulo, SP (Brazil)
Tel. +55-11-3090-3136, Fax 55-11-3813-5921, E-Mail edilamar@usp.br

KARGER