NATAN DANIEL DA SILVA JUNIOR

Expressão diferencial de microRNAs envolvidos na angiogênese
no coração de ratos submetidos a diferentes volumes de
treinamento de natação

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia
Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Edilamar
Menezes de Oliveira

SÃO PAULO
2012

NATAN DANIEL DA SILVA JUNIOR

Expressão diferencial de microRNAs envolvidos na angiogênese
no coração de ratos submetidos a diferentes volumes de
treinamento de natação

Dissertação apresentada à Faculdade
de Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia
Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Edilamar
Menezes de Oliveira

SÃO PAULO
2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva Junior, Natan Daniel da

Expressão diferencial de microRNAs envolvidos na angiogênese no coração de ratos submetidos a diferentes volumes de treinamento de natação / Natan Daniel da Silva Junior. -- São Paulo, 2012.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientador: Edilamar Menezes de Oliveira.

Descritores: 1.Exercício 2.Neovascularização fisiológica 3.Coração 4.MicroRNAs

USP/FM/DBD-081/12

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por tudo que tem feito na minha vida, e ter me ajudado em mais essa vitória.

A minha orientadora Profa. Edilamar Menezes de Oliveira, por ter me proporcionado essa oportunidade de crescimento pessoal e profissional. E por todo apoio que me ofereceu em todo esse percurso, sua dedicação, amizade. Agradeço por ter confiado em mim desde o início, mesmo quando eu precisei realizar atividades extra laboratório.

Aos meus pais Natan e Eleci, pelo carinho, amor e educação que me proporcionaram durante toda a vida.

A minha esposa Leticia, por todo apoio que me deu nessa jornada.

Aos meus amigos e técnicos do Laboratório, que sempre estavam de braços abertos para me ajudar.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES	x
RESUMO	xii
SUMMARY	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
2 JUSTIFICATIVA	3
3 OBJETIVO	4
3.1 Objetivo Geral	4
3.2 Objetivo Específico	4
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
4.1 Princípios e adaptações cardiovasculares do treinamento físico aeróbico	5
4.2 Angiogênese	9
4.3 Treinamento físico aeróbico e angiogênese	12
4.4 MicroRNAs: conceitos, biogêneses e função	15
4.5 MicroRNAs e exercício físico	20
5 MATERIAIS E MÉTODOS	24
5.1 Animais experimentais	24
5.2 Grupos experimentais	24
5.3 Protocolo de treinamento de natação	24
5.4 Avaliação das respostas hemodinâmicas: Pressão arterial sistólica e frequência cardíaca de repouso	25
5.5 Avaliação do consumo de oxigênio pico	26
5.6 Coleta das amostras de tecido	27
5.7 Quantificação do número de capilares e de fibras musculares	27
5.8 Avaliação da expressão gênica	28
5.9 Avaliação da expressão proteica	30
5.10 Análise estatística	33
6 RESULTADOS	34

6.1	Peso corporal	35
6.2	Medidas hemodinâmicas	36
6.2.1	Frequência cardíaca de repouso	36
6.2.2	Pressão arterial sistólica de repouso	37
6.3	Consumo de oxigênio pico	38
6.4	Hipertrofia cardíaca	38
6.5	Razão capilar/fibra cardíaca	40
6.6	VEGF e seus receptores	42
6.7	MicroRNAs	43
6.8	Alvos do miRNA-126	49
6.8.1	PI3KR2	49
6.8.2	Spred-1	50
6.9	Via de sinalização da PI3K	51
6.10	Via de sinalização das MAPKs	54
7	DISCUSSÃO	57
7.1	Peso corporal	57
7.2	Respostas hemodinâmicas e do consumo de oxigênio pico	57
7.3	Hipertrofia cardíaca	59
7.4	Angiogênese cardíaca	60
7.5	MicroRNAs	62
7.6	Vias de sinalizações angiogênicas reguladas pelo miRNA-126	67
8	CONCLUSÃO	69
9	ANEXO	70
9.1	ANEXO A – Artigo Publicado	70
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 - microRNAs angiogênicos que possuem alvos validados	19
TABELA 2 - Relação de proteínas, anticorpos primários e secundários utilizados para análise por Western Blotting	32

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Representação esquemática das vias de sinalizações angiogênicas	11
FIGURA 2 - Representação esquemática do processo de biogênese e função dos miRNAs	16
FIGURA 3 - Sistema aquecido de natação para ratos	25
FIGURA 4 - Peso corporal no período pré e pós-treinamento (g)	35
FIGURA 5 - Frequência cardíaca de repouso no período pré e pós-treinamento (bpm)	36
FIGURA 6 - Pressão arterial sistólica de repouso no período pré e pós-treinamento (mmHg)	37
FIGURA 7 - Efeito do treinamento no consumo de oxigênio pico (VO_2 pico) no período pós-experimental ($\text{ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	38
FIGURA 8 - Efeito do treinamento na hipertrofia cardíaca (mg/g).]	39
FIGURA 9 - Percentual Hipertrofia cardíaca entre os grupos (%) comparados ao grupo SC	39
FIGURA 10 - Efeito do treinamento na razão capilar / fibra cardíaca (A), foto representativa das lâminas histológicas dos grupos SC, P1 e P2 (B)	41
FIGURA 11 - Efeito do treinamento na expressão proteica do VEGF, por Western blotting (A). Blots representativos de VEGF e β -actina (B)	42
FIGURA 12 - Efeito do treinamento na expressão proteica do Flt-1 (A) e Flk-1 (B), por Western blotting. Blots representativos de Flt-1, Flk-1 β -actina (C)	43
FIGURA 13 - microRNAs envolvidos com angiogênese que foram diferentemente expressos com o treinamento aeróbico a partir da técnica de microarray de microRNA	44
FIGURA 14 - Efeito do treinamento na expressão gênica do miR-126 por microarray de microRNA (A) e por PCR em tempo real (B)	

	45
FIGURA 15 - Correlação entre a expressão gênica do miR-126 e razão capilar fibra no coração	46
FIGURA 16 - Efeito do treinamento na expressão gênica do miR-let-7f por microRNA microarray (A) e por PCR em tempo real (B)	47
FIGURA 17 - Efeito do treinamento na expressão gênica do miR-221 por PCR em tempo real	48
FIGURA 18 - Efeito do treinamento na expressão gênica do miR-222 por PCR em tempo real	48
FIGURA 19 - Expressão gênica do PI3KR2, alvo do miR-126, por-PCR em tempo real	49
FIGURA 20 - Expressão proteica do Spred-1, alvo do miR-126, por Western Blotting (A). Blots representativos de Spred-1 e β -actina (B)	51
FIGURA 21 - Efeito do treinamento na expressão proteica da PI3K, por Western blotting (A). Blots representativos de PI3K e β -actina (B)	52
FIGURA 22 - Efeito do treinamento na expressão proteica da Akt1 (A) e p-Akt _{Ser473} (B), por Western Blotting. Blots representativos de Akt1, p-Akt _{Ser473} e β -actina (C)	53
FIGURA 23 - Efeito do treinamento na expressão proteica da eNOS (A) e p-eNOS _{Ser1177} (B), por Western blotting. Blots representativos de eNOS, p-eNOS _{Ser1177} e β -actina (C)	54
FIGURA 24 - Efeito do treinamento na expressão proteica Raf-1, por Western Blotting (A). Blots representativos de Raf-1 e β -actina (B)	55
FIGURA 25 - Efeito do treinamento na expressão proteica da ERK 1/2 (A) e p-ERK 1/2 _{Thr202/Tyr204} (B), por Western Blotting. Blots representativos de ERK 1/2 (A), p-ERK 1/2 _{Thr202/Tyr204} e β -actina (C)	56
FIGURA 26 - Representação esquemática da ação do miR-126 em vias angiogênicas mediadas por VEGF	66

FIGURA 27 - Representação esquemática dos principais resultados encontrados para o miR-126 como efeito do treinamento aeróbico

68

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

Akt	proteína quinase B
Ang-1	angiopoietina 1
Ang-2	angiopoietina 2
ANOVA	análise de variância
cDNA	DNA complementar
c-miRNAs	miRNAs na circulação
RISC	complexo de silenciamento induzido de RNA
DC	débito cardíaco
ECs	células endoteliais
eNOS	óxido nítrico sintase endotelial
ERK 1/2	quinases de regulação de sinal extracelular
FC	frequência cardíaca
FeO ₂	fração expirada de oxigênio
FiO ₂	fração inspirada de oxigênio
FGF-2	fator de crescimento básico de fibroblasto 2
Flk-1	receptor 2 de VEGF
Flt-1	receptor 1 de VEGF
Flt-4	receptor 3 de VEGF
HC	hipertrofia cardíaca
HUVECS	células endoteliais de veia umbilical humana
MAPKs	via de sinalização das MAP quinases
MEK 1/2	quinase com dupla especificidade
miRNAs	microRNAs
PA	pressão arterial
PAS	pressão arterial sistólica
PI3K	fosfatidilinositol 3,4,5-tifosfato
PI3KR2	subunidade regulatória 2 da PI3K
PGC-1 α	proteína alfa PPARGC1
P1	Grupo treinado protocolo 1
P2	Grupo treinado protocolo 2
Raf-1	proteína treonina quinase

RAS	vírus do sarcoma de rato, derivado do inglês (Rat Sarcoma virus)
RNA	ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
SC	Grupo Sedentário
SCF	fator de células tronco
Spred-1	proteína relacionada a brotamento
TSP-1	trombospondina-1
VE	ventrículo esquerdo
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular
VO ₂	consumo de oxigênio
VO ₂ máximo	consumo máximo de oxigênio
VO ₂ Pico	consumo de oxigênio pico
VS	volume sistólico

RESUMO

Silva Junior ND. Expressão diferencial de microRNAs envolvidos na angiogênese cardíaca de ratos submetidos a diferentes volumes de treinamento de natação. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2012.

INTRODUÇÃO: As adaptações cardiovasculares decorrentes do treinamento físico aeróbio de natação são bem descritas na literatura, entre elas temos a angiogênese. O treinamento físico aeróbio é um dos estímulos que promove angiogênese. Os microRNAs (miRNAs) são uma classe de RNA não codificadora de proteínas de diferentes células em diversos tecidos e estão envolvidos em processos angiogênicos, mas o papel dos miRNAs na angiogênese cardíaca decorrente ao treinamento aeróbico ainda não foi esclarecido. **OBJETIVO:** Analisar os efeitos de diferentes volumes de treinamento físico de natação sobre a expressão de microRNAs envolvidos na angiogênese cardíaca de ratos. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Ratas Wistar (n=21) foram divididas em grupos Sedentário (SC), Treinado 1 (P1): natação 60min/dia, 5x/sem/10sem, com 5% de sobrecarga, Treinado 2 (P2): mesmo protocolo P1 até a 8ªsem, 9ªsem 2x/dia, e na 10ªsem 3x/dia. Após o período de treinamento, os corações foram retirados e o RNA total foi isolado para a análise da expressão de miRNAs no coração por microarray de miRNA e os miR-126, -let-7f, -221 e -222 foram confirmados por RT-PCR em tempo real. Analisamos ainda os alvos do miR-126, Spred-1 e PI3KR2, e a expressão de proteínas que compõem as vias de sinalização em que esses alvos interferem por Western Blotting. Avaliamos também: Frequência cardíaca (FC) e pressão arterial (PA) por pletismografia caudal, VO₂ pico, hipertrofia cardíaca (HC) pelo peso do Ventrículo esquerdo/Peso corporal (mg/g), razão capilar/fibra (C/F) por histologia, expressão proteica de VEGF e seus receptores. **RESULTADOS:** O treinamento aeróbico diminuiu a FC sem alterar a PA, VO₂ pico aumentou 11% e 15% em P1 e P2, a HC foi de 17% e 30% em P1 e P2, a razão C/F aumentou 57% e 100% em P1 e P2, acompanhada de um aumento da expressão de VEGF (P1 =42%, P2 =109%). A expressão do miR-let-7f foi aumentada em P2 (140%) comparado aos outros dois grupos (SC = 100%; P1 = 113%), o miR-221 teve sua expressão diminuída em ambos os grupos treinados comparados

ao grupo SC (SC = 100%; P1 = 71%; P2 = 74%), o miR-222 não apresentou diferença na sua expressão entre os grupos (SC = 100%; P1 = 76%; P2 = 81%) e a expressão do miR-126 foi aumentada em P1 (126%) e P2 (142%) comparados ao grupo SC, a expressão de ambos os alvos desse miRNA foi diminuída nos grupos treinados (Spred-1 SC = $100 \pm 12,4$; P1 = $60 \pm 5,6$; P2 = $61 \pm 8,4$; PI3KR2 SC = $100 \pm 12,3$; P1 = $61 \pm 12,3$; P2 = $21 \pm 7,1$). Essa diminuição da expressão dos alvos desse miRNA favoreceu um aumento da expressão de proteínas pertencentes as vias de sinalização da PIK3 e MAPKs.

CONCLUSÃO: O treinamento aeróbico foi eficaz em promover um aumento da angiogênese cardíaca comprovada por uma maior razão capilar/fibra no coração dos animais treinados e por maior expressão proteica de VEGF, sendo ainda mais evidente nos animais que realizaram um maior volume de treinamento. Os miRNAs relacionados à angiogênese parecem estar envolvidos na regulação desse processo. Além disso, o miR-126 parece ser um dos principais miRNAs envolvidos nesse processo.

Descritores: Exercício; Neovascularização Fisiológica; Coração; microRNAs.

SUMMARY

Silva Junior ND. Differential expression of microRNAs involved in angiogenesis in the heart of rats submitted to different volumes of swimming training. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2012.

INTRODUCTION: The cardiovascular adaptations resulting from aerobic physical swimming training are well described in the literature, between these adaptations we have the angiogenesis. The aerobic physical training is one of the stimulus that promotes angiogenesis. The micro RNAs are a class of non coding protein RNAs of different cells in different tissues and are involved in angiogenic processes, but the role of micro RNAs in cardiac angiogenesis due to aerobic training is not clear. **OBJECTIVE:** To analyze the effects of different volumes of swimming physical training on the expression of micro RNAs involved in angiogenesis in heart of rats. **MATERIALS AND METHODS:** Wistar female rats (n=21) were divided into groups Sedentary (SC), Trained 1 (P1): 60min/day swimming, 5x/week/10weeks with 5% overload, Trained 2 (P2): same protocol of P1 until the 8th week, 9th week 2x/day, and at 10th week 3x/day. After the training period, the hearts were removed and the total RNA was isolated to analyze the miRNAs expression in the heart by microarray of miRNA and the miRs-126, -let-7f, -221 and -222 were confirmed by real time RT-PCR. We also analyzed the targets miR-126, Spred-1 and PI3KR2, and the protein expression that form the signaling pathways that affect those targets by Western Blotting. We evaluated: heart rate (HR) and blood pressure (BP) by tail plethysmography, peak VO₂, cardiac hypertrophy (CH) by weight left ventricle/ corporal weight (mg/g), capillary/fiber (C/P) ratio for histology, VEGF protein expression and its receptors. **RESULTS:** The aerobic training decreased the HR without change the BP, peak VO₂ increased 11% and 15% in P1 and P2, the HR was 17% and 30% in P1 and P2, the ratio C/F increased 57% and 100% in P1 and P2, followed by an increase of VEGF expression (P1=42%, P2=109%). The miR-let-7f had its expression increased in P2 (140%) compared to the other two groups (SC = 100%; P1 = 113%), o miR-221 had its expression decreased in both trained groups compared to SC group (SC = 100%; P1 = 71%; P2 = 74%), the miR-222 showed no difference on its expression between the groups (SC = 100%; P1 = 76%; P2 = 81%) and the miR-126 expression

was higher in P1 (126%) and P2 (142%) compared to SC group, the expression of both targets of this miRNA was decreased on trained groups (Spred-1 SC = $100 \pm 12,4$; P1 = $60 \pm 5,6$; P2 = $61 \pm 8,4$; PI3KR2 SC = $100 \pm 12,3$; P1 = $61 \pm 12,3$; P2 = $21 \pm 7,1$). This decrease of expression of this miRNA targets favor an increase of protein expression belonging to the PIK3 and MAPKs signaling pathways. CONCLUSIONS: The aerobic training was effective on promoting an increased of cardiac angiogenesis comproved by a higher ratio capillary/ fiber on the heart of trained animals and by a higher VEGF protein expression, being even more evident in animals that realized a higher volume training. The miRNAs related to angiogenesis seem to be involved in the regulation of this process. Besides that, the miR-126 seems to be one of the principal miRNA involved on this process.

Descriptors: Exercise; Neovascularization; Physiologic; Heart; microRNAs.

1. INTRODUÇÃO

O treinamento físico induz adaptações fisiológicas específicas que variam de acordo com o tipo de treinamento. Enquanto o treinamento resistido promove melhora da força e hipertrofia muscular esquelética, o treinamento aeróbico melhora a aptidão aeróbica em atividades de longa duração (MCARDLE; KATCH; KATCH, 2003).

Diversas adaptações cardiovasculares ocorrem em resposta ao treinamento aeróbico, entre elas, bradicardia de repouso (UUSITALO et al, 2002; MEDEIROS et al, 2004; EVANGELISTA; BRUM; KRIEGER, 2005), hipertrofia cardíaca fisiológica (OLIVEIRA et al, 2009; BERNADO et al, 2010; FERNANDES et al, 2011a; FERNANDES; SOCI; OLIVEIRA, 2011b; FERNANDES et al, 2011c), aumento no consumo máximo de oxigênio e angiogênese (KRAUS et al, 2004; BLOOR, 2005).

A angiogênese microvascular refere-se ao processo de formação de novos capilares a partir de capilares pré-existentes (PRIOR; YANG; TERJUNG, 2004), que pode ocorrer tanto por reabertura funcional de capilares pré-existentes, como pela formação de novos capilares a partir dos mesmos, encontrado tanto em células musculares esqueléticas quanto cardíacas (KRAUS et al, 2004; PRIOR; YANG; TERJUNG, 2004). Essa adaptação pode estar associada a vários processos patológicos, como câncer, retinopatias, trombose, aterosclerose, isquemias (SUÁREZ □ SESSA, 2009), e a alguns processos fisiológicos, como ciclo ovariano, desenvolvimento placentário e exercício (PRIOR; YANG; TERJUNG, 2004), sendo regulada por interações de fatores angiogênicos e anti-angiogênicos.

O aumento no número de capilares permite uma melhora na permuta de gases, calor e substratos energéticos entre o sangue e o tecido, levando a um maior aporte energético e de oxigênio para o tecido alvo. Portanto, quando ocorre no músculo esquelético ocasiona uma melhora da capacidade aeróbia do indivíduo (WAGNER, 2000).

O treinamento aeróbico é eficiente em promover angiogênese em vasos que irrigam o músculo cardíaco pelo aumento na densidade capilar e a relação capilar/fibra no coração (BLORR □ LEON, 1970; TOMANEK, 1970; BROWN, 2003). Esse aumento é ocasionado pelo aumento no fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que é a principal base molecular envolvida na angiogênese induzida por esse tipo de exercício (VEIKKOLA et al, 2000; PRIOR; YANG; TERJUNG, 2004; KRAUS et al, 2004; BORNES et al, 2004).

Um dos mecanismos que podem estar envolvidos nesse processo são os microRNAs (miRNAs), que é uma classe de ácido ribonucleico (RNA) não codificantes de proteínas, esses são responsáveis pela regulação pós-transcricional da expressão gênica de plantas e animais (KIM, 2005). Embora sejam altamente expressos no coração, o papel que essas moléculas desempenham em processos fisiológicos e patológicos ainda não está bem elucidado (CHENG et al, 2007). Os mecanismos de atuação dos miRNAs mostram papéis reguladores em diversos processos, como, proliferação, apoptose, diferenciação celular, hematopoiese, secreção de insulina e funcionamento muscular cardíaco e esquelético (ESAU et al, 2004; CHEN □ LODISH, 2005; THUM; CATALUCCI; BAUERSACHS, 2008). Além disso, alguns microRNAs já foram relacionados com a regulação da angiogênese (YANG et al, 2005; POLISENO et al, 2006; DEWS et al, 2006; KUEHBACHER et al, 2007; WANG et al, 2008; SUÁREZ, 2008; CHEN □ GORSKI, 2008; BONAUEER et al, 2009).

Apesar disso, não existem dados sobre os miRNAs expressos no coração relacionados com a angiogênese miocárdica induzida pelo treinamento aeróbico. Estudos a respeito dessa classe de moléculas responsáveis pela regulação angiogênica, podem trazer uma maior compreensão sobre as interações genotípicas e fenotípicas provocadas pelo treinamento físico aeróbio, além de esclarecer questões referentes à regulação desta adaptação em processos fisiológicos e patológicos no músculo cardíaco.

Devido a isso, a hipótese do presente estudo é que o treinamento aeróbico será um estímulo que provocará alterações na expressão gênica de miRNAs relacionados a angiogênese, e que esses estão envolvidos nessa adaptação cardíaca decorrente deste tipo de treinamento.

2. JUSTIFICATIVA

A identificação de miRNAs envolvidos na angiogênese em animais experimentais e suas alterações decorrentes do treinamento físico aeróbico propicia perspectivas para a identificação de novos mecanismos de controle da expressão gênica, sendo que estes, podem ser possíveis moduladores dos efeitos adaptativos do treinamento físico.

Estudos que elucidem sobre este conhecimento incipiente trazem novas perspectivas para futuras abordagens terapêuticas, através da manipulação de miRNAs, os quais podem ser eficientes para reverter ou atenuar quadros patológicos cardiovasculares.

3. OBJETIVOS

3.1 - Geral

Analisar os efeitos de diferentes volumes de treinamento físico de natação sobre a expressão de microRNAs envolvidos na angiogênese cardíaca de ratos.

3.1 - Específicos

Avaliar os efeitos do treinamento físico de natação em diferentes volumes sobre:

A angiogênese induzida pelo treinamento através da técnica histológica de quantificação da razão capilar / fibra cardíaca;

O comportamento da pressão arterial e da frequência cardíaca no repouso, nos períodos antes e após treinamento físico, pela medida indireta de plestimografia de cauda;

A expressão proteica do VEGF no coração;

A alteração de expressão gênica de microRNAs relacionados à angiogênese através do treinamento aeróbico, por *microarray* e *RT-PCR em tempo real de microRNA*.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1 - Princípios e adaptações cardiovasculares do treinamento físico aeróbico

O treinamento físico possui como principal objetivo a estimulação das adaptações estruturais e funcionais que aprimoram o desempenho em tarefas específicas. Para conseguir essas adaptações tornam-se necessárias a adesão aos programas de treinamento físico que devem ser prescritos respeitando sempre os princípios do treinamento físico como apontados por Tubino (1984) e Dantas (1995), os quais serão explicitados resumidamente a seguir, são eles:

- *Princípio da Individualidade Biológica:* Chama-se *individualidade biológica* o fenômeno que explica a variabilidade entre elementos da mesma espécie, o que faz com que não existam pessoas iguais entre si, ou seja, cada indivíduo possui uma estrutura e formação física e psíquica própria, sendo indicado um treinamento sempre individual.
- *Princípio da Adaptação:* Este princípio está ligado às alterações dos órgãos e sistemas funcionais, que aparecem em decorrência do exercício físico. Portanto, torna-se importante a utilização correta desse princípio, no qual deve haver cuidado na aplicação das cargas de treinamento para que não se aplique uma sobrecarga excessiva em um indivíduo não adaptado a essa sobrecarga.
- *Princípio de Sobrecarga:* A aplicação regular de uma sobrecarga na forma de um exercício específico aprimora a função fisiológica a fim de induzir uma nova resposta ao treinamento. Para se conseguir uma sobrecarga considerada ideal é necessário manipular combinações de frequência, intensidade e duração do treinamento.
- *Princípio da Continuidade:* Este princípio está intimamente ligado ao da adaptação, pois a continuidade ao longo do tempo é primordial para o organismo, progressivamente, se adaptar, ou seja, esse princípio é uma diretriz que não permite interrupções durante o período de treinamento.
- *Princípio da Interdependência Volume-Intensidade:* Este princípio está intimamente ligado ao da sobrecarga, pois o aumento das cargas de trabalho é um dos fatores que melhora o desempenho físico. Este aumento ocorrerá por conta do volume e devido à intensidade.

- *Princípio de Especificidade*: A especificidade do treinamento refere-se às adaptações nas funções metabólicas e fisiológicas que dependem do tipo de sobrecarga imposta, ou seja, se o treinamento for anaeróbico, como por exemplo, treinamento de força, este irá induzir adaptações específicas no sistema anaeróbico.

Há basicamente dois grandes tipos de treinamento físico, o treinamento aeróbico e o treinamento anaeróbico. O treinamento anaeróbico exige um alto nível de metabolismo anaeróbico e produz alterações específicas nos sistemas de energia imediato e em curto prazo, sem aumentos concomitantes nas funções aeróbicas (MCARDLE; KATCH; KATCH, 2003), produzindo algumas alterações no sistema cardiovascular como a hipertrofia cardíaca (GROSSMAN; JONES; MCLAURIN, 1975).

O treinamento aeróbico (corrida, natação) induz uma série de adaptações significativas relacionadas aos sistemas muscular, cardiovascular entre outras adaptações (MCARDLE; KATCH; KATCH, 2003).

Entretanto, qualquer tipo de treinamento que seja realizado deve ser prescrito por profissional da área, para que possa ter atenção no planejamento do mesmo, sempre dando a devida atenção na frequência, intensidade, volume e duração de cada sessão de exercício. O exercício realizado com esses cuidados provoca adaptações fisiológicas no organismo ocasionando um desequilíbrio da homeostase, promovendo uma adaptação do organismo através de alterações do estado funcional (WEINECK, 1991; BARBANTI, 1994).

No presente trabalho utilizamos como intervenção o treinamento físico aeróbico de natação em dois diferentes volumes de treinamento em diferentes grupos (Grupo P1 e Grupo P2), para observarmos com maior clareza as adaptações cardiovasculares e moleculares provocadas por esse tipo de treinamento. Os benefícios desse tipo de treinamento já estão bem descritos na literatura, tanto em humanos (BLOMQVIST □ SALTIN, 1983; HOLLOS□Y □ COYLE, 1984; BRANDÃO et al, 1993), como em animais (SCHAIBLE □ SCHEUER, 1979, EVANGELISTA et al, 2003, MEDEIROS et al, 2004, OLIVEIRA et al, 2009). A seguir serão discutidas as principais adaptações cardiovasculares provocadas por esse tipo de treinamento.

Ao se iniciar um exercício físico aeróbico um dos efeitos mais precoces é o aumento da frequência cardíaca (FC), esse aumento ocorre linear e proporcionalmente ao aumento da intensidade do exercício e tende a se estabilizar em exercícios com carga estável. Esse aumento da FC durante o esforço ocorre

principalmente pela interação de dois mecanismos, os quais são a diminuição do tônus vagal e aumento do tônus simpático sobre o coração, sendo que inicialmente observa-se queda do tônus vagal que provoca aumento da FC e posteriormente uma ativação simpática que é proporcional a intensidade do exercício, acentuando ainda mais o aumento da FC (NEGRÃO et al, 1992).

Um dos principais efeitos do treinamento físico é a diminuição da FC de repouso, fenômeno chamado bradicardia de repouso (UUSITALO et al, 2002; MEDEIROS et al, 2004; EVANGELISTA et al, 2005). Essa adaptação ao treinamento é explicada geralmente por um dos três mecanismos, aumento do tônus vagal no coração (KENNEY, 1985), diminuição do tônus simpático no coração (GAVA et al, 1995) e diminuição da FC intrínseca de marcapasso (NEGRÃO et al, 1992).

Outro parâmetro cardiovascular influenciado pelo exercício é o volume sistólico (VS), que associado à FC garantirá um aumento necessário do débito cardíaco para a continuação do exercício. O VS refere-se à quantidade de sangue bombeado pelo ventrículo a cada batimento cardíaco.

Durante o exercício aeróbico ocorre um aumento do VS proporcional à intensidade do exercício, mas esse aumento é observado apenas até aproximadamente cinquenta por cento (50%) do consumo máximo de oxigênio (VO_2 Max) do indivíduo, pois após essa intensidade tem sido relatado um platô dessa variável cardiovascular (CRAWFORD; PETRU; RABINOWITZ, 1985). Os mecanismos envolvidos nesse processo parecem depender da fase que se encontra o exercício, pois no início do exercício o aumento do retorno venoso irá promover um aumento do volume diastólico final que determinará o aumento do VS. Entretanto, quando o exercício se torna mais intenso o volume diastólico final diminui retornando para valores basais, e assim os níveis de VS passam a depender exclusivamente do aumento da contratilidade cardíaca, que ocasionará uma queda gradativa do volume sistólico final e conseqüentemente uma estabilização ou ligeira queda do VS (HIGGINBOTHAM et al, 1986). Após um período de treinamento aeróbico há um aumento do VS em repouso, que é determinado por um maior volume diastólico final em repouso ou até mesmo por um aumento da volemia do indivíduo (CONVERTINO; MACK; NADEL, 1991).

Como conseqüência do aumento da FC e do VS, o débito cardíaco (DC) aumenta proporcionalmente com a intensidade durante o exercício (ROWELL, 1986), essa adaptação é decorrente de uma necessidade de aumento na demanda

de oxigênio para a musculatura ativa. O DC em repouso não é modificado com o treinamento aeróbico, pois como esse aumento é dependente da FC e do VS e como visto anteriormente, o treinamento promove uma bradicardia de repouso e um aumento do VS, essa associação faz com que o DC em repouso se mantenha praticamente inalterado após um período de treinamento aeróbico. Contudo, em exercício máximo observa-se que o DC do indivíduo treinado atinge valores maiores que um indivíduo sedentário, podendo chegar a valores de até 40 litros/minuto.

Simultaneamente a essas adaptações ao exercício observa-se um rápido aumento dos níveis de pressão arterial sistólica (PAS) no início do exercício, e após esse período espera-se que ocorra um aumento gradativo de acordo com o aumento da intensidade. Porém, a pressão arterial diastólica freqüentemente permanece inalterada durante todo o exercício, mas pode apresentar um leve aumento em alguns indivíduos. Esse comportamento da pressão arterial (PA) frente ao exercício está relacionado com o aumento da modulação simpática e redução da modulação parassimpática decorrente do exercício aeróbico. Mitchell e colaboradores (1983) sugerem que as adaptações que ocorrem inicialmente sejam devidas a uma ação direta do comando central no sistema cardiovascular e, posteriormente devido ativação de ergorreceptores mecânicos ou metabólicos na musculatura esquelética.

Em relação ao efeito do treinamento aeróbico em geral sobre a PA, em indivíduos hipertensos de grau leve a moderado algumas metanálises demonstraram que o treinamento aeróbico é eficaz em diminuir a pressão arterial (WHELTON et al, 2002), enquanto que em indivíduos normotensos essa resposta ainda é controversa.

Outra adaptação cardiovascular decorrente do treinamento físico aeróbico é a hipertrofia cardíaca (HC), que ocorre frente a algumas alterações hemodinâmicas que modificam as condições de sobrecarga cardíaca durante as sessões de treinamento (BARBIER et al, 2006). A HC induzida pelo treinamento físico é considerada fisiológica e desenvolvida de forma simétrica e dependente do tipo, freqüência, duração e intensidade do exercício.

O treinamento físico aeróbico promove uma hipertrofia classificada como excêntrica, sendo decorrente da sobrecarga de volume, que gera um elevado pico de tensão diastólica, ocasionando adição de novos sarcômeros em série, e consequentemente aumentando seu comprimento pelo aumento no número das miofibrilas. Conforme revisado recentemente por nosso grupo, nesse tipo de hipertrofia há um aumento da cavidade acompanhada do aumento da espessura da

parede do ventrículo esquerdo (OLIVEIRA et al, 2010; FERNANDES; SOCI; OLIVEIRA, 2011b;).

A angiogênese também é uma importante adaptação decorrente do treinamento aeróbico (KRAUS et al, 2004; BLOOR, 2005), essa ocorre tanto na musculatura esquelética quanto no coração e será apresentada mais adiante nesta revisão.

Essas adaptações cardiovasculares benéficas decorrentes do treinamento aeróbico levaram a utilização deste tipo de exercício como terapia não farmacológica em diversas doenças degenerativas (VÉRAS-SILVA et al, 1997; HASKELL et al, 2007).

4.2 - Angiogênese

Angiogênese refere-se ao fenômeno de formação de novos capilares a partir de capilares pré-existentes, sendo um processo que pode estar associado tanto a fatores fisiológicos como a fatores patológicos (SUÁREZ e SESSA, 2009), e pode ocorrer basicamente por dois mecanismos, intussuscepção e brotamento (PRIOR; YANG; TERJUNG, 2004).

A intussuscepção é o processo pelo qual um único capilar se divide em dois capilares, através da formação de uma estrutura que o divide longitudinalmente; enquanto que o brotamento é o processo em que as células endoteliais ativadas partem de um capilar pré-existente, se estendendo através da matriz que o circunda para formar uma estrutura em forma de cordão (PRIOR; YANG; TERJUNG, 2004; BROWN e HUDLICKA, 2003; CARMELIET, 2003).

Durante o desenvolvimento embrionário a angiogênese é um processo fisiológico sofrendo atenuação em indivíduos adultos saudáveis. Quando ocorre esse processo em indivíduos adultos, o mesmo é quase que exclusivamente associado a patologias como, câncer, retinopatia diabética, trombose (SUÁREZ e SESSA, 2009) e doenças cardiovasculares (TIRIU e SIMONS, 2005). Adicionalmente, uma angiogênese prejudicada, também é característica de algumas doenças, como por exemplo, doença isquêmica do coração, doença vascular periférica e pré-eclâmpsia (CARMELIET, 2003).

Assim, a angiogênese é regulada por fatores angiogênicos e anti-angiogênicos. Nos indivíduos adultos, o crescimento vascular está sob rigoroso

controle, havendo uma predominância dos fatores anti-angiogênicos sobre os angiogênicos.

Alguns mecanismos são envolvidos para desencadear uma resposta angiogênica, tais como hipóxia, aumento do fluxo sanguíneo, óxido nítrico, sistema renina/angiotensina e o VEGF, entre outros fatores de crescimento (PRIOR; YANG; TERJUNG, 2004; CONWAY; COLLEN; CARMELIET, 2001; MAISONPIERRE et al, 1997). O VEGF é considerado o mais potente fator angiogênico conhecido (FERRARA & DAVIS-SMITH, 1997), esse é uma glicoproteína do tamanho de 45 KD, derivada de células endoteliais das artérias, veias e vasos linfáticos (KRAUS et al., 2004).

O VEGF possui três receptores específicos de ligação, o receptor 1 de VEGF (Flt-1), receptor 2 de VEGF (Flk-1) e o receptor 3 de VEGF (Flt-4), mas cada receptor quando ativado produz efeitos distintos (GUSTAFSSON & KRAUS, 2001). Estudos já demonstraram que a ativação do Flk-1 pelo VEGF produz uma resposta angiogênica completa (CONWAY; COLLEN; CARMELIET, 2001) por vias de sinalização angiogênicas, entre elas, temos a via da MAPK (MAP quinases) e a via da PI3K (fosfatidilinositol 3,4,5-tifosfato). A via da MAPK inicia com a auto fosforilação do Flk-1 que desencadeará a ativação da RAS (derivado do inglês Rat Sarcoma Virus), Raf-1 (proteína treonina quinases), MEK 1/2 (quinase com dupla especificidade) e ERK 1/2 (quinases de regulação de sinal extracelular) (MARSHALL, 1995). A via da PI3K também depende da ativação do Flk-1 com posterior ativação da PI3K, Akt (proteína quinase B) e eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) (FULTON et al, 1999; DAHER et al, 2010) (FIGURA 1).

FIGURA 1 – Representação esquemática das vias de sinalização angiogênicas.
 Fonte: <http://www.SABlosciences.com>.

Além do VEGF, outros fatores de crescimento podem contribuir para a angiogênese, como por exemplo, o fator de crescimento básico de fibroblasto 2 (FGF-2) que é um potente mitógeno para células endoteliais podendo também aumentar a expressão de VEGF (STAVRI et al, 1995). As angiopoietinas (Ang 1 e Ang 2) que são importantes citocinas não miogênicas de células endoteliais vasculares e que ajudam no desenvolvimento e remodelamento dessas células (GALE □ YANCOPOULOS, 1999). A Ang 1 está associada com uma vasculatura estável, enquanto a Ang 2 está associada com atividade angiogênica, ambas competem pelo receptor Tie2 que é expresso em sítios de remodelamento vascular (PRIOR; YANG; TERJUNG, 2004).

Esses fatores de crescimento têm sua expressão aumentada, em decorrência das sessões de treinamento, nos tecidos contráteis como músculo esquelético e coração, devido à necessidade de um maior aporte de oxigênio e substratos durante o exercício, disponibilizados pela circulação para executar suas funções (DUNCKER

□ BACHE, 2008; GUSTAFSSON et al, 2007). Para manter o metabolismo de repouso, o coração utiliza um consumo de oxigênio de aproximadamente 10-20% do consumo de oxigênio total (BLINKS □ ENDOR, 1986; YAKU et al, 1993), o qual está relacionado à freqüência cardíaca (BLOOR; WHITE; SANDERS, 1984), tensão da parede ventricular (GRAHAM et al, 1968), encurtamento muscular (GRAHAM et al, 1968) e contratilidade (MURRAY □ VATNER, 1979). Durante o exercício, o consumo de oxigênio é aumentado pelo coração o que pode ocasionar um aumento da densidade capilar e relação capilar/miócito (BLORR □ LEON, 1970; TOMANEK, 1970).

Patologias em que ocorre limitação de vasos e prejuízos cardíaco, a indução de angiogênese poderia ser utilizada como uma abordagem terapêutica inovadora, por exemplo, para cardiopatia isquêmica, onde o crescimento de novos vasos sanguíneos limitaria esta isquemia (NESSA et al, 2009; WYKR□YKOWSKA; BIANCHI; SELLKE, 2009; TIR□IU □ SIMONS, 2005; FREEDMAN □ ISNER, 2001). Em um estudo muito elegante foi mostrado que o VEGF e o FGF são os principais fatores de crescimento requeridos para geração de novos vasos sanguíneos após o infarto cardíaco (MISHRA et al, 2009). Assim novos estudos envolvendo estímulos para angiogênese cardíaca são de suma importância quando se pensa em terapia gênica.

4.3 - Treinamento físico aeróbico e angiogênese

Como dito anteriormente, a angiogênese é uma importante adaptação provocada pelo treinamento físico aeróbico, pois diversos estudos mostraram o desenvolvimento de angiogênese decorrente desse tipo de treinamento físico na musculatura esquelética (LAUFS et al, 2004; KRAUS et al, 2004).

De fato, apenas uma sessão de exercício aeróbico é suficiente para induzir um aumento de expressão de RNA mensageiro (RNAm) de múltiplos fatores angiogênicos e seus respectivos receptores na musculatura esquelética (BREEN et al, 1996; GUSTAFSSON et al, 1999). Esse desenvolvimento está relacionado a adaptações agudas desencadeadas durante o exercício como o aumento da FC, aumento da ventilação pulmonar, que tem como consequência um maior aporte de oxigênio para a musculatura esquelética. Porém, é importante ressaltar que a formação de novos vasos é dependente do tipo e intensidade do exercício, sendo encontrado na musculatura esquelética principalmente em estudos em que o

treinamento foi realizado em uma intensidade entre 70-80% do consumo máximo de oxigênio (VO_2 máximo) (JENSEN; BANGSBO; HELLSTEN, 2004).

Esse aumento na síntese de VEGF durante o exercício é mediada por alguns mecanismos, entre eles temos: no início do exercício há uma maior demanda metabólica para a musculatura ativa, o que pode ocasionar um estado inicial de hipóxia que irá desencadear a síntese de VEGF (PRIOR; YANG; TERJUNG, 2004), além de fatores envolvidos na indução desse processo, como o aumento da pressão transmural do vaso (*shear stress*), que poderá aumentar a produção de óxido nítrico e, conseqüentemente, o fluxo sanguíneo vascular, levando também ao aumento da produção de VEGF (HUDLICKA, 1991; PRIOR; YANG; TERJUNG, 2004). Esse mecanismo de vasodilatação, mediada pela ação endotelial, tem sido apontada como uma das principais adaptações vasculares promovidas pelo treinamento físico (FRANCO □ MATOS, 2010). Temos ainda a participação do sistema renina-angiotensina, mais especificamente a angiotensina II, na angiogênese decorrente do treinamento aeróbico (AMARAL; PAPANEEK; GREENE, 2001).

No tecido cardíaco o aumento na densidade capilar pode variar de acordo com o modelo experimental estudado e ao tipo de exercício aeróbico realizado, além de ser mais comumente encontrado quando são usados animais jovens, do que quando adultos e idosos (HUDLICKA; BROWN; EGGINTON, 1992; UNGE et al, 1979; TOMANEK, 1970; HAKKILA, 1955). Assim, alguns autores demonstraram que o treinamento é eficiente em promover crescimento capilar cardíaco (LEOSCO et al, 2008; MARINI et al, 2008; EFTHIMIADOU et al, 2004; ADES □ COELHO, 2000; LAUGHLIN □ TOMANEK, 1987; BLORR □ LEON, 1970), enquanto outros não conseguiram demonstrar essa adaptação microvascular no coração com o treinamento aeróbico (HUDLICKA; BROWN; EGGINTON, 1992; HAKKILA, 1955).

Na tentativa de elucidar esse processo, White e colaboradores (1998) mostraram que o volume de treinamento pode influenciar na resposta de neocapilarização cardíaca. Os autores mostraram que quanto maior é o volume de treinamento (semanas) mais difícil encontrar um aumento nessa resposta. Esse estudo é interessante, pois os autores encontraram algumas divergências, uma vez que foi demonstrado haver alterações capilares e arteriolas após vários volumes de treinamento aeróbico em porcos, sendo que nos animais que realizaram um menor volume de treinamento foi encontrado um aumento no número de capilares e, nos animais que realizaram um maior volume de treinamento se tornou difícil

encontrar essa adaptação vascular. A justificativa dos autores para tal acontecimento é que, os capilares se diferenciaram para pequenas arteríolas, pois somente os animais que realizaram um maior volume de treinamento tiveram um aumento de arteríolas, mostrando assim que o treinamento aeróbico é capaz de promover um remodelamento vascular no coração. Outra hipótese colocada pelos autores é que somente os animais que realizaram maiores volumes de treinamento obtiveram uma HC significativa, o que pode ter proporcionado uma pequena redistribuição dos vasos, o que limita a análise da densidade capilar cardíaca.

Ainda nessa perspectiva, outro estudo mostrou que o treinamento aeróbico realizado por períodos de aproximadamente 30 dias, em animais, aumenta a capilarização, os níveis de VEGF e de seus receptores bem como de outros fatores de crescimento, como por exemplo, as angiopoietinas. O aumento dos fatores angiogênicos se dá gradativamente até um pico máximo em aproximadamente sete dias de treinamento e se mantém ou começa a declinar levemente até trinta dias de treinamento (LAUFS et al., 2004).

Por outro lado, em determinadas patologias cardíacas o treinamento aeróbico é utilizado com terapêutica não farmacológica, mas o mecanismo pelo qual ocorrem os benefícios da angiogênese decorrentes do treinamento aeróbico em doenças isquêmicas cardíacas ainda não está totalmente elucidado. Assim, Wu e colaboradores (2009) tentando esclarecer esse mecanismo, mostraram que esse tipo de treinamento aumentou a expressão do VEGF e dos seus receptores Flt-1 e Flk-1, concluindo que a ativação do VEGF e de seus receptores devido ao treinamento aeróbico diminuiu o tamanho da área infartada e aumentou a angiogênese local. Ressaltando assim a importância do treinamento aeróbico como terapêutica não farmacológica na atenuação de doenças cardíacas associadas à angiogênese anormal.

Apesar de todos esses estudos, os mecanismos moleculares responsáveis por essa adaptação cardíaca decorrente do exercício aeróbico ainda não estão totalmente elucidados, sendo que uma nova classe de RNAs parece estar envolvida na regulação angiogênica cardíaca.

4.4 - MicroRNAs: conceitos, biogêneses e função

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA de fita simples com aproximadamente 22 nucleotídeos, não codificantes de proteínas, que agem como potentes reguladores pós-transcricionais da expressão gênica em plantas e animais (KIM, 2005).

O primeiro miRNA descoberto foi o Lin4 (do inglês *lineage-deficient-4*) em 1993, este miRNA apresentava complementaridade parcial com a região 3'-UTR do RNAm da proteína lin-14, sendo associado à regulação do desenvolvimento larval em *Caenorhabditis elegans* (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993; WIGHTMAN; HÁ; RUKUN, 1993). Depois desses primeiros estudos, somente anos depois ocorreu a descoberta do segundo miRNA, denominado let-7, onde verificou-se que esse miRNA atuava com uma complementaridade parcial com a região 3'-UTR do RNAm da proteína lin-41 (REINHART et al, 2000).

Recentemente, estudos com miRNAs vêm delineando um amplo campo de grande ascensão. Em 2005, havia 465 miRNAs descobertos em humanos (BEREIKOV et al, 2005), sendo que em 2008 esse número chegou a 533. Estudo recente revela que mais de 1400 sequências de miRNAs humanos já foram identificadas, e mais de 15000 miRNAs foram descritos em mais de 100 tipos de organismos diferentes, constituindo uma das maiores classes de reguladores gênicos (KONAMARA e GRIFFITHS-JONES, 2011).

Esses RNAs são codificados por genes localizados tanto nas regiões intergênicas, como em éxons e íntrons (BARTEL, 2004). O seu processo de biogênese é iniciado com a transcrição destes no núcleo celular, sendo que na sua grande maioria é transcrito pela RNA polimerase II (BARTEL, 2004).

Primeiramente são formados os pri-miRNA, que contém centenas de nucleotídeos que serão processados dentro do núcleo por uma ribonuclease III chamada Drosha (LEE et al, 2003), juntamente com uma proteína de ligação DGCR8/Pasha (HAN et al, 2004). O produto dessa clivagem gera uma molécula menor chamada pre-miRNA, que é transportada para o citoplasma via mecanismo dependente de Exportina-5 e Ran-GTP (LUND et al, 2004).

Em seguida os pré-miRNAs são clivados por outra RNase III chamada Dicer, para formar o miRNA maduro, fita dupla (miRNA:miRNA), o qual uma das suas fitas será incorporada em um complexo de ribonucleoproteína, complexo de

silenciamento induzido de RNA (RISC), o qual contém a proteína argonauta como uma das principais componentes. Na sequência, uma fita do miRNA será transformada em miRNA maduro e a outra degradada (GREGORY et al, 2005), e como parte do complexo RISC os miRNAs irão interagir com seus RNAm alvos (Yi et al, 2003).

Esses reguladores pós-transcricionais exercem seus efeitos a partir da interação com RNAm alvos, essa interação ocorre entre a região 5 não traduzida (UTR) do miRNA com a região 3 UTR de RNAm alvos. Esse mecanismo de ligação depende do grau de complementaridade com o RNAm-alvo, se for um pareamento imperfeito pode gerar inibição traducional, e se for um pareamento perfeito geralmente ocasiona a degradação do RNAm (BARTEL, 2004; KIM, 2005; FILIPOWICZ; BHATTACHARYYA; SONENBERG, 2008). A FIGURA 2 representa o processo de biogênese e função dos miRNAs.

FIGURA 2 – Representação esquemática do processo de biogênese e função dos miRNAs. Fonte: <http://biologiaecologia1globalwarming.wordpress.com/tag/microrna/>

Há ainda outros mecanismos possíveis de ação dos miRNAs como, deadenilação, degradação e captura dos RNAm nos *P-bodies* (focos citoplasmáticos) (FAUPEL & NERVI, 2008). O mecanismo de ação via *P-bodies* ocorre da seguinte forma: um miRNA ligado a uma proteína argonauta reconhece seus RNAm alvos por pareamento de bases; a proteína argonauta, localizada no *P-bodies*, vai interagir com o GW182, depois o complexo RNAm-miRNA-Argonauta é encaminhado aos *P-bodies*. No *P-body*, o RNAm alvo é deadenilado pelas enzimas deadenilases presentes, então degradado ou até mesmo removido da maquinaria traducional (PILLAI et al, 2005; VALENCIA-SANCHEZ et al, 2006).

Dessa forma, vários mecanismos estão envolvidos na regulação através dessa classe de RNAs, necessitando de novos estudos para que os mecanismos pelos quais os miRNAs realizam sua função seja melhor esclarecidos, além das possibilidades de atuação simultânea e com mais de um tipo de mecanismo.

Ainda nessa perspectiva, em mamíferos, o pareamento imperfeito das bases que acarretam a inibição traducional do alvo parece ser a principal forma de atuação, e como essa classe de RNAs possui sequências pequenas, um único miRNA pode regular diversos RNAm-alvo (BARTEL, 2004). Além disso, vários miRNAs podem atuar num mesmo RNAm-alvo (BRENNECKE et al, 2005; VALENCIA-SANCHES et al, 2006). Estima-se a partir de predição por programas de bioinformática, que essa classe de RNAs pode ter como alvo 30% do genoma humano (LEWIS; BURGE; BARTEL, 2005). Outras estimativas afirmam que mais de 50% dos genes humanos que codificam proteínas podem ser regulados por esses RNAs (WU et al, 2007). Desta forma, os miRNAs constituem uma enorme e complexa rede regulatória da sinalização celular.

As estimativas são criadas através de vários algoritmos de predição de alvos de miRNA, entre eles temos: miRBase (<http://www.micro-RNA.sanger.ac.uk/targets/v2/>), Miranda (<http://www.micro-RNA.org//miranda.htm>), TargetScan(<http://www.genes.mit.edu/targetscan>), PicTar (<http://www.pictar.bio.nyu.edu>) (CHAUDHURI & CHATTERJEE, 2007). Para cada miRNA há uma infinidade de alvos preditos, sendo que a maioria não se confirmam experimentalmente, entre os métodos de confirmação temos, construção de vetor repórter (LEWIS; BURGE; BARTEL, 2005), estudos genéticos clássicos (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993), entre outras. Existe um software chamado Tarbase

(<http://www.diana.pcbi.upenn.edu/tarbase.html>), que disponibiliza para consulta uma relação de miRNAs e seus alvos previamente validados experimentalmente.

Esses algoritmos fazem a análise do alinhamento das sequências de miRNA com as sequências das regiões 3'-UTR de RNAm a partir de fatores como: energia livre do híbrido formado e/ou requisitos do pareamento de bases na extremidade 5 (região *seed* - corresponde 7 - 8 nucleotídeos a partir da primeira base da extremidade 5) do miRNA e/ou a conservação filogenética dos sítios de ligação nas sequências 3'-UTRs (LAI, 2004).

A partir dessas análises de predição, os miRNAs já foram associados à regulação de RNAs envolvidos no processo de proliferação, apoptose, diferenciação celular, hematopoiese, secreção de insulina e funcionamento muscular cardíaco e esquelético (THUM; CATALUCCI; BAUERSACHS, 2008; CHEN □ LODISH, 2005; ESAU et al, 2004). Além disso, análises por meio de bioinformática, de dados de *microarray de microRNA*, têm identificado miRNAs que são altamente expressos em tecidos específicos, como, fígado, cérebro, hipófise, pâncreas, testículos e músculo estriado esquelético (SOOD et al, 2006) e cardíaco (vanROOIJ; MARSHALL; OLSON, 2008). Adicionalmente, os miRNAs são expressos em certos tecidos e ausentes em outros (RENHART et al, 2000; LEE; FEINBAUM; AMBROS, et al, 1993).

Algumas questões têm sido levantadas a respeito da participação dos miRNAs no processo de angiogênese. Uma das primeiras evidências que estes RNAs regulam a angiogênese foi com o estudo de Yang e colaboradores (2005), que verificaram o papel da enzima Dicer no desenvolvimento da angiogênese durante o desenvolvimento embrionário de camundongos, e mostraram que a presença da enzima Dicer é essencial para a formação de vasos no período embrionário. Além disso, outros estudos (SUÁREZ, 2008; KUEHBACHER et al, 2007) mostraram que a expressão diminuída dessa enzima em células endoteliais ocasionou um aumento significativo da expressão de trombospondina-1 (TSP-1), que é identificado como um inibidor endógeno de angiogênese (DIPIETRO, 1997).

A primeira grande análise de expressão gênica de miRNAs em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECS) identificou quinze miRNAs altamente expressos. Além disso, análises de predição mostraram os receptores de fatores angiogênicos (Flt-1, Nrp-2, Fgf-R, c-Met, c-kit) como sendo os seus alvos (POLISENO et al, 2006).

Apesar do pequeno número de estudos, atualmente alguns miRNAs já são associados à regulação da angiogênese (SCALBERT □ BRIL, 2008), como os membros da família let-7, o miR-21, miR-126, miR-221 e miR-222 que são altamente expressos em células endoteliais (ECs) (KUEHBACHER et al, 2007).

Outros miRNAs também envolvidos na regulação da angiogênese, como o *cluster* miR-17-92, possui como alvos genes de fatores anti-angiogênicos e estão aumentados em tumores induzidos por c-Myc (DEWS et al, 2006), o miR-130a que modula a expressão dos genes GAX e HOXA5 envolvidos na regulação de angiogênese (CHEN □ GORSKI, 2008), o miR-210 que estimula a migração celular devido VEGF e a formação de estruturas ligadas aos capilares (FASANARO et al, 2008). Além dos miR-15b, miR-16, miR-20, miR-92a, miR-320, miR-378, miR- 296 e miR-328, que também estão envolvidos na regulação angiogênica (WU; YANG; LI, 2009; BONAUER et al, 2009; WANG et al, 2009).

Um dos principais miRNAs envolvidos na regulação angiogênica no coração é o miR-126, devido aumentar a expressão de VEGF e FGF a partir da inibição dos seus alvos, proteína relacionada a brotamento (Spred-1) e a subunidade regulatória dois da PI3K (PI3KR2, também conhecido como p85- β) (FISH et al, 2008). Adicionalmente, o aumento da expressão deste miRNA favorece o aumento da angiogênese após o infarto cardíaco (WANG et al, 2008).

Entretanto, somente alguns miRNAs envolvidos com angiogênese já possuem alvos validados experimentalmente (TABELA 1) (CAPORALI □ EMANUELI, 2011).

miRNAs	Alvos validados
miR-126	PI3KR2 / Spred-1
miR-221/222	c-kit
miR-17-92	Tsp-1
miR-92a	ITGB5
miR-20a	VEGF
miR-17-5p	TIMP-1
miR-23-27	Sprouty2/Sema6A

TABELA 1 – microRNAs angiogênicos que possuem alvos validados.

Apesar de ser um campo de estudo promissor, poucos estudos foram publicados sobre o papel dos miRNAs na angiogênese cardíaca (BONAUER et al, 2009; MISHRA et al, 2009; WANG et al, 2009; WANG et al, 2008).

4.5 - MicroRNAs e exercício físico

Atualmente os estudos com miRNAs e exercício físico têm se voltado para a análise de expressão desses RNAs na musculatura esquelética. Um dos primeiros trabalhos analisando os miRNAs na musculatura esquelética com exercício físico teve como objetivo verificar quais eram as mudanças de expressão dos miRNAs após estímulo de síntese proteica em diferentes idades. Para isso, os autores utilizaram seis indivíduos jovens (29 ± 2 anos) e seis idosos (70 ± 2 anos). Os voluntários realizaram exercício resistido de extensão de pernas, e com o intuito de aumentar a síntese protéica dos voluntários, esses eram levados a ingerirem 20g de uma solução rica no aminoácido leucina. Como principais resultados desse estudo, temos que os indivíduos idosos possuem uma maior expressão de miRNAs na musculatura esquelética do que os jovens em situação de repouso, mas após o estímulo de exercício resistido e ingestão de solução rica em aminoácido resultou em alterações na expressão de pri-miRNAs e miRNAs maduros principalmente em indivíduos jovens (pri-miR-1-2, pri-miR-133a-1, miR-1) e os miR-133a e miR-206 tiveram suas expressões inalteradas. Esses dados são os primeiros a demonstrar que esses RNAs são responsivos a mudanças fisiológicas em músculo esquelético humano e que essas moléculas podem ter um papel na regulação da resposta aguda da síntese protéica no músculo esquelético humano (DRUMMOND et al, 2008).

Após trabalhos iniciais, alguns pesquisadores começaram a unir seus esforços para entender a participação dessa classe de RNAs na musculatura esquelética, chegando até nomear alguns desses RNAs como myomir por representarem quase que 25% de toda a expressão de miRNAs na musculatura esquelética, são eles, miR-1, miR-133a miR-133b e miR-206 (MCCARTHY et al, 2009).

Em outro estudo, Davidsen e colaboradores (2011) observaram o efeito do treinamento resistido intenso, de doze semanas, na expressão dessa classe de RNAs na musculatura esquelética de indivíduos de meia-idade (18-30 anos), os quais foram divididos em dois grupos de acordo com a responsividade ao treinamento, sendo um grupo com alta responsividade e outro com baixa responsividade. Primeiramente encontraram 21 miRNAs altamente expressos no período pré-treinamento, mas somente 6 destes tiveram expressão alterada após o período de treinamento. O principal resultado encontrado é que o miR-378 foi

altamente correlacionado com o ganho de massa magra ($R = 0,71$ - $P = 0,001$), sugerindo assim que a manutenção da expressão desse RNA poderia ser um determinante importante para o ganho de massa magra em humanos. Outro resultado encontrado é que a expressão do gene do IGF-1 aumentou após o treinamento no grupo de alta responsividade, uma vez que o IGF-1 produzido no músculo esquelético pode ocasionar uma hipertrofia muscular através da via de sinalização da Akt-mTOR. Como conclusões, os autores discutem que o treinamento resistido em humanos está associado com mudanças no perfil de expressão dos miRNAs e que esses podem desempenhar um papel importante nas mudanças fenotípicas de indivíduos com diferente responsividade a esse tipo de treinamento.

Posteriormente, o exercício aeróbico também começou a ser estudado, Safdar e colaboradores (2009) analisaram o perfil de expressão dos miRNAs na musculatura esquelética após apenas uma sessão de exercício aeróbico de noventa minutos em camundongos, e encontraram que após três horas do término da sessão de exercício a expressão de alguns miRNAs estavam alteradas (miR-1, miR-181, miR-107), tendo como principal resultado a redução da expressão do miR-23 associada com um aumento da expressão de um alvo direto desse miRNA, a proteína alfa PPARGC1 (PGC-1 α), que é conhecido como um importante modulador metabólico do músculo esquelético.

Ainda em estudo com animais experimentais, Aoi e colaboradores (2010) verificaram a expressão de miRNAs no músculo esquelético após quatro semanas de treinamento aeróbico em camundongos, e observaram que o treinamento resultou em aumento da expressão do miR-21 e queda da expressão dos miR-696, -709 e -720, e que essa queda do miR-696 apresentou correlação negativa com os níveis da proteína PGC-1 α que é um alvo conhecido desse RNA ($R = 0,64$; $P \leq 0,01$), pois tanto os níveis da proteína quanto os níveis da expressão gênica da PGC-1 α estavam aumentados após o período de treinamento.

Outro trabalho verificou a resposta dos myomirs ao treinamento aeróbico em cicloergômetro durante doze semanas, na musculatura esquelética de humanos e com a utilização da técnica de Clamp hiperinsulinêmico euglicêmico. Como resultado, mostrou que após o período de treinamento a administração de insulina não alterou a expressão desses miRNAs. Entretanto, dois dos quatro myomirs (miR-1 e miR-133a) tiveram a expressão alterada após um estímulo agudo de exercício aeróbico, e após o período de treinamento aeróbico os quatro miRNAs (miR-1, miR-

133a, miR-133b, miR-206) tiveram suas expressões diminuídas em relação ao período pré-treino. Além disso, após um período de quatorze dias de destreinamento a expressão desses miRNAs retornaram à valores similares aos do período pré-treino (NIELSEN et al, 2010). Esses resultados mostram que as alterações das expressões dos miRNAs podem acompanhar as adaptações fisiológicas promovidas pelo treinamento aeróbico. Adicionalmente, é a primeira vez que demonstram que as alterações das expressões dos miRNAs podem ser reversíveis após um curto período de destreinamento.

O primeiro trabalho que avaliou a expressão de miRNAs relacionados com angiogênese (miR-221, 222, 328, 219, 20a) após a realização de exercício aeróbico utilizou homens com idade acima de dezoito anos praticantes de um programa de remo que foram avaliados em sessões agudas antes e após um período de treinamento, sendo que os miRNAs foram avaliados na circulação, denominados como c-miRNAs. Os autores concluíram que os c-miRNAs respondem de forma individualizada e possuem um valor potencial como biomarcadores do exercício, e ainda podem possuir possíveis papéis como mediadores fisiológicos de adaptação cardiovascular induzida pelo exercício (BAGGISH et al, 2011).

Um estudo do nosso grupo avaliou a expressão de miRNAs relacionados com angiogênese após a realização de treinamento aeróbico (FERNANDES et al, 2012). Nesse estudo foi demonstrado que o treinamento aeróbico preveniu a rarefação microvascular na hipertensão devido a participação de miRNAs (miR-16, miR-21 e miR-126) nesse processo. A expressão gênica desses miRNAs foram alteradas com o treinamento, o que ocasionou em alteração na expressão de seus alvos, que são fatores angiogênicos e apoptóticos.

Contudo, pouco se sabe sobre a resposta da expressão dos miRNAs no coração em resposta ao treinamento físico. Os primeiros trabalhos foram do nosso grupo de pesquisa, que primeiramente buscou entender o envolvimento do miR-29 na melhora da complacência ventricular promovida pelo treinamento aeróbico em ratos. Como resultado principal, tivemos um aumento da expressão desse miRNA associado à uma queda da expressão do gene do colágeno, alvo direto desse miRNA, bem como na concentração da OH-prolina. Portanto, resultando em melhora da função ventricular decorrente do treinamento aeróbico (SOCl et al, 2011).

Outro estudo do nosso grupo analisou a participação dos miRNAs (miR-27a, 27b, 143), que possuem como alvos preditos os genes do sistema renina-

angiotensina, no processo de hipertrofia cardíaca decorrente do treinamento aeróbico. Neste estudo foi utilizado o mesmo protocolo de treinamento do presente estudo e os resultados mostraram que tanto o miR-27a como o miR-27b tiveram suas expressões aumentadas nos grupos treinados em relação ao grupo sedentário, enquanto que o alvo para esses miRNAs, a enzima conversora de angiotensina I teve sua expressão gênica diminuída nesses grupos. Adicionalmente, o miR-143 teve sua expressão diminuída no grupo que treinou com maior volume (P2) em relação ao grupo sedentário e treinado com menor volume de treino (P1), enquanto que seu alvo, a enzima conversora de angiotensina II, teve a expressão aumentada nesse mesmo grupo de treinamento (P2). Assim, esses resultados mostram que o treinamento aeróbico exerce um efeito sobre a expressão de miRNAs e, podem regular seus genes-alvo específicos (FERNANDES et al, 2011a).

Apesar destes estudos terem mostrado o envolvimento de miRNAs nas adaptações cardíacas decorrentes do treinamento aeróbico, a relação entre esse tipo de treinamento e a expressão dos miRNAs relacionados a angiogênese no coração é uma área a ser investigada.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 - Animais experimentais

Foram utilizadas ratas Wistar com 10 semanas de vida, as quais ficaram mantidas em gaiolas em grupos de 3 a 4 animais por caixa, em local com temperatura ambiente entre 22-24°C e com luz controlada em ciclo invertido de 12 horas (claro-escuro) e alimentados com ração e água à vontade.

A escolha de ratas para o estudo é devido o treinamento aeróbico promover uma maior HC nas fêmeas em relação aos machos, HC essa desenvolvida devido às fêmeas possuírem um metabolismo cardíaco mais oxidativo, enquanto que os machos possuem um metabolismo mais glicolítico (FORYST-LUDWIG et al, 2011).

O estudo foi realizado no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Exercício da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, e conta com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo (Protocolo 2009/47), e com aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (1054/09).

5.2 - Grupos experimentais

Os animais foram aleatoriamente divididos nos seguintes grupos experimentais: Grupo Sedentário (SC), Grupo Treinado Protocolo 1 (P1) e Grupo Treinado Protocolo 2 (P2), com 7 animais em cada grupo.

5.3 - Protocolos de treinamento de natação

O treinamento foi realizado com um sistema de natação para ratos, conforme mostrado na Figura 2, com água aquecida a 30-32°C durante 10 semanas.

O treinamento ocorreu com dois protocolos conforme publicamos recentemente (OLIVEIRA et al, 2009; SOCI et al 2011; FERNANDES et al, 2011a), os quais estão descritos abaixo:

- **Protocolo 1 (P1):** os animais deste grupo foram treinados durante 10 semanas, sessões de 60 min, 1 vez por dia, 5 vezes/semana, com aumento gradual da sobrecarga de trabalho (peso adaptado na cauda em porcentagem do peso corporal) até atingir 5% do peso corporal.

- **Protocolo 2 (P2):** neste protocolo os animais deste grupo treinaram até a 8ª semana com o mesmo protocolo P1, se diferenciando somente na 9ª e 10ª semanas conforme descrito abaixo:

Na 9ª semana o treinamento foi realizado 2 vezes ao dia, sessões de 60 min com intervalo de 4 horas entre as sessões. Na 10ª semana o treinamento foi realizado 3 vezes ao dia, sessões de 60 min com intervalo de 4 horas entre as sessões. O objetivo de aumentar o volume de treinamento é de promover uma maior HC fisiológica (HASHIMOTO et al, 2011; OLIVEIRA et al, 2009).

Ambos os protocolos têm sido demonstrados como moderado, numa faixa de intensidade entre 50% e 65% do VO_2 máximo (BACKER □ HORVETH, 1964).

O grupo SC foi colocado na água por alguns minutos a cada 15 dias durante todo o período experimental.

Os ratos foram pesados semanalmente, para a correção da sobrecarga em função do aumento do peso corporal.

FIGURA 3 – Sistema aquecido de natação para ratos.

5.4 - Avaliação das respostas hemodinâmicas: pressão arterial sistólica e frequência cardíaca de repouso

A avaliação da PA foi acompanhada semanalmente por pletismografia de cauda (sistema da KENT SCIENTIFIC RTBP1001 *rat tail blood pressure* system para ratos e camundongos, Litchfield, USA) nos 3 grupos experimentais. Os animais estavam acordados, em repouso e mantidos sob restrição de movimentos para que as medidas fossem realizadas.

O equipamento de registro da PA de cauda consiste em um manguito de borracha que é adaptado à região proximal da cauda, que está conectado ao pletismógrafo para insuflar e desinflar gradualmente o manguito de 1 a 250/300 mmHg. Numa região mais distal da cauda é acoplado um transdutor de pulso pneumático para detecção dos sinais de passagem da onda de pulso de PA na artéria caudal e registrado no sistema de aquisição de sinais (MP100 WSW, Biopac Systems, Santa Bárbara, CA, USA) com uma frequência de amostragem de 100 Hz.

Este método de medida indireta da pressão arterial permite quantificar a PAS e FC ao longo de todo o período do protocolo.

5.5 - Avaliação do consumo de oxigênio pico

Após o final do período experimental os animais foram submetidos a um teste progressivo de esforço máximo em esteira rolante adaptado de Brooks & White (1978), com incremento de carga de 3m/min a cada 3 min, até a exaustão.

Para isso, primeiramente os animais foram adaptados à caixa metabólica, e somente após essa adaptação eram submetidos ao teste progressivo de esforço para obtenção do consumo de oxigênio pico (VO_2 Pico). O VO_2 Pico é o VO_2 no ponto máximo de esforço, sendo definido como a capacidade do organismo de absorver oxigênio.

O VO_2 Pico foi mensurado por determinação da fração expirada de oxigênio (FeO_2) durante o teste de exercício progressivo até a exaustão.

Neste protocolo os animais foram colocados em uma 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 (1000 ml/min) para ser analisada a FeO_2 em um analisador de gases. A outra via do tubo T é utilizada para aspiração do ar em fluxo contínuo (2500 ml/min), regulável por bomba aspiradora. A parte da frente da caixa metabólica possui uma abertura de 2mm da superfície, que permite a entrada de ar ambiente unidirecional sugado pela bomba aspiradora. O fluxo de ar na caixa metabólica é de 3500 ml/min.

O animal foi colocado dentro da caixa metabólica por um período de repouso de 30 minutos para o registro do estado basal e, após esse período, o teste foi iniciado com velocidade de 3 m/min. Durante cada estágio (3 min) de exercício, foram analisadas as FeO_2 dos gases contidos no ar da caixa metabólica. Foram

consideradas as frações expiradas dos últimos trinta segundos de cada estágio para a determinação do VO_2 de cada estágio.

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

O consumo de oxigênio (VO_2) foi calculado a partir da seguinte fórmula matemática:

$$\text{VO}_2 = \text{fluxo de ar} \times (\text{FiO}_2 - \text{FeO}_2) / \text{peso corporal}$$

Onde:

$$\text{VO}_2 = \text{ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$$

$$\text{Fluxo de ar} = 1000 \text{ ml/min (analisador)} + 2500 \text{ ml/min (bomba de aspiração)} = 3500 \text{ ml/min}$$

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 de VO_2 .

5.6 - Coleta das amostras de tecido

Ao final do protocolo experimental (48 horas após a última sessão de treinamento), os animais foram decapitados e o coração foi removido da cavidade torácica e dissecado para separarmos o ventrículo esquerdo (VE) (parede livre do ventrículo esquerdo e septo), ventrículo direito e átrios (átrio direito e esquerdo).

Após a separação do VE das outras estruturas cardíacas foi avaliada a hipertrofia cardíaca dos animais. Para isso, realizamos um cálculo de razão entre o peso úmido do ventrículo esquerdo e o peso corporal do animal (mg/g), e a hipertrofia cardíaca dos grupos treinados foi calculada em relação ao valor da razão (VE/PC) do grupo SC.

5.7 - Quantificação do número de capilares e de fibras musculares

O ventrículo esquerdo foi fixado em formaldeído 6% e após a inclusão em parafina foram realizados cortes histológicos de 5 μm de espessura, na posição da base do músculo papilar e submetido à reação pelo Ácido Periódico de Schiff (PAS) para visualização das glicoproteínas de membrana, facilitando a visualização dos capilares.

Três cortes de VE para cada animal foram selecionados para visualização utilizando microscópio óptico.

Na análise, a lâmina foi observada inicialmente em aumentos menores, para a escolha de um local em que não houvesse ranhuras ou bolhas e que tivesse o maior número de fibras transversais. Após a escolha do local, a imagem foi ampliada para realizar as medidas. Para análise do número de capilares, cinco áreas foram igualmente delimitadas, sendo utilizado o auxílio do cursor para mensurar o diâmetro de cada vaso. Segundo critérios estabelecidos, o diâmetro foi o principal parâmetro para identificação dos capilares, sendo considerados capilares os vasos com diâmetro igual ou menor que 12 μ m.

Após a análise do número de capilares, também foi realizada a análise do número de fibras musculares nessa mesma área, para quantificarmos a razão entre o número de capilares/ número de fibras por campo. E foi considerado como resultado a média dos resultados dos cinco campos analisados por cada animal.

5.8 - Avaliação da expressão gênica

Foi realizada a expressão gênica dos genes PI3KR2 e dos miRNAs let-7f, 126, 221 e 222 no ventrículo esquerdo dos animais, conforme descrito abaixo.

A expressão do gene PI3KR2 foi realizada pela técnica de Transcriptase Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (real time RT-PCR). A expressão gênica dos miRNAs foram realizadas pela técnica de *microarray de microRNA* e confirmadas pela técnica de Transcriptase Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RT-PCR em tempo real).

- Extração de RNA

O RNA total do coração foi isolado em 1 ml de Trizol (Invitrogen) conforme indicação do fabricante.

As amostras de RNAs foram diluídas na proporção de 1:100 em água, e analisadas por espectrofotometria em 260 a 280 nm (Nano-Drop Technologies, USA) e verificada a integridade das amostras por eletroforese utilizando gel de agarose-EtBr.

- *Microarray de microRNA*

O *microarray de microRNA* foi realizado pela companhia LC Science baseado no sistema *Sanger miRBase Release 13.0*. Esse método permite a análise simultânea de 349 miRNAs, possibilitando a determinação de um perfil de expressão gênica nos diferentes grupos experimentais.

Para essa análise, foi enviado para a empresa o RNA extraído do VE de um pool de três animais de cada grupo experimental, sendo escolhido os três animais que mais caracterizavam os grupos experimentais. Todos os RNA foram analisados nove vezes, e o resultado de expressão gênica de cada grupo foi obtido através da média dessas nove análises.

Selecionamos para o estudo os miRNAs relacionados com angiogênese, que tiveram a maior magnitude de alteração de expressão com o treinamento aeróbico.

- *Síntese do cDNA do RNAm da PI3KR2*

Para conversão de RNA em DNA complementar (cDNA) foi utilizado 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de RNA total, 1 μL de dNTP mix 10nM, 1 μL de random hexamers (50 ng. μL^{-1}) e 8 μL de H₂O DEPC, de acordo com o fabricante (Invitrogen, Brasil).

- *Síntese do cDNA dos RNAs dos miRNAs*

O cDNA para a análise dos miRNAs foram sintetizados a partir do RNA total utilizando *primers* gene-específicos de acordo com o protocolo de ensaio MicroRNA TaqMan (Applied Biosystems, CA, EUA). Os 15 μL de reação obtidos do protocolo de transcrição reversa MicroRNA TaqMan (Applied Biosystems, CA, EUA) foram incubados em um termociclador por 30 minutos a 16 °C, 30 minutos a 42 °C, 5 minutos a 85 °C e, em seguida foi mantido a 4 °C até a sua utilização na montagem da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR tempo real).

- *Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR em tempo real)*

O ensaio da análise da expressão gênica do PI3KR2 foi feito de acordo com o protocolo descrito por 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 Master mix (Applied Biosystems) e *primers* específicos para o gene desejado (900nM). Os *primers* foram desenhados utilizando o software Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3www.cgi>).

As sequências dos *primers* utilizados foram:

PI3KR2 (sense: 5 - TGT CTG TCT TCT AAT CCC TTC CCC TGG TG -3 , antisense: 5 - GTA GTA CCA AAG CAG GCT CCC CCA GG -3), e ciclofilina (sense: 5 -AAT GCT GGA CCA AAC ACA AA -3 , antisense: 5 -CCT TCT TTC ACC TTC CCA AA -3).

Foi utilizado como controle normalizador o gene da ciclofilina como relatado acima.

A fim de confirmar as alterações de expressão gênica dos miRNAs encontrados na técnica de *microarray de microRNA*, foram realizados ensaios da análise da expressão gênica dos miRNAs por *RT-PCR em tempo real* de acordo com o protocolo de ensaio descrito por Taqman MicroRNA (Applied Biosystems, CA, EUA). Dos 20 μ l de PCR inclui 1.33 μ l produto do RT, 10 μ l de TaqMan Universal PCR master mix II (2 $\times$), 7.67 μ l de água livre de nuclease e 1 μ l de primers e sonda mix do protocolo de ensaio MicroRNA TaqMan para os miRNAs let-7f (INV 382), 126 (INV 2228), 221 (INV 524) e 222 (INV2276). Foi utilizado como controle normalizador o gene U6, gene que já é utilizado como normalizador em outros estudos do nosso laboratório (SOCl et al, 2011; FERNANDES et al, 2011).

Os passos da reação em cadeia da polimerase em tempo real foram os seguintes: 1) desnaturação 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 7500 (Applied Biosystems).

Cada amostra de ventrículo esquerdo foi avaliada em duplicata. As quantidades relativas de expressão dos genes-alvo dos animais foram comparadas entre os grupos após a normalização dos valores do gene referência (CT). As mudanças nos RNAm dos miRNAs (em fold) foram calculadas usando as diferenças de valores (CT) entre as duas amostras (CT) e a equação 2^{-CT} . Os resultados foram expressos em % comparado ao grupo SC.

5.9 - Avaliação de expressão proteica por Western blotting

Inicialmente o coração foi homogeneizado em tampão de lise hipotônico contendo tampão fosfato de potássio 50mM (pH 7,0), sacarose 0,3 M, DTT 0,5 mM, EDTA 1 mM (pH 8,0), PMSF 0,3 mM, NaF 10 mM e coquetel de inibidor de protease e fosfatase (1:100). O homogenato foi centrifugado por 10 minutos à 4°C com 12000

rpm. O sobrenadante foi transferido para tubos de 1,5 ml e a concentração de proteína das amostras foi quantificada pelo método de BRADFORD (1976). As amostras foram armazenadas em freezers - 80°C até o momento da utilização.

Alíquotas do homogeneizado, 50 µg de proteína, foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl 240 mM em pH 6,8; SDS 0,8%; β-mercaptoetanol 200 mM; glicerol 40% e azul de bromofenol 0,02%). A análise dos níveis proteicos foi realizada pela técnica de *Western blotting*. Para isso, foi utilizada a técnica de Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE, 6-12% dependendo do peso molecular da proteína), que consiste na migração de moléculas com carga, em uma solução, decorrente da aplicação de um campo elétrico no aparelho para minigel (Mini Protean, BioRad, EUA). Após essa etapa, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences, NJ, EUA), do mesmo modo que foram separadas no SDS-PAGE. As membranas foram coradas com *Ponceau S*, para a confirmação das bandas proteicas obtidas pela eletroforese.

A fim de bloquear ligações inespecíficas, a membrana foi incubada em solução contendo caseína, proteína que compete com os sítios de ligação e reduz a absorção inespecífica de conjugados da peroxidase.

Em seguida, a membrana de nitrocelulose foi incubada com o anticorpo primário específico que se liga à proteína que se pretende detectar, formando um complexo anticorpo-proteína. Os anticorpos utilizados seguem na tabela abaixo:

Proteínas	Anticorpos Primários	Diluição	Empresa/ Anticorpo primário	Anticorpos secundários
VEGF	Rabbit polyclonal	1:1000	Abcam	anti-rabbit/Amersham Biosciences
Flk-1	Rabbit polyclonal	1:1000	Santa Cruz	anti-rabbit/Amersham Biosciences
Flt-1	Rabbit polyclonal	1:1000	Santa Cruz	anti-rabbit/Amersham Biosciences
PI3KR2				
Spred-1	Mouse monoclonal	1:1000	Abcam	anti-mouse/Amersham Biosciences
Raf-1 (c-Raf)	Rabbit polyclonal	1:1000	Cell Signaling	anti-rabbit/Amersham Biosciences
ERK 1/2	Rabbit polyclonal	1:1000	Cell Signaling	anti-rabbit/Amersham Biosciences
p-ERK 1/2^{Thr202/Tyr204}	Rabbit monoclonal	1:1000	Cell Signaling	anti-rabbit/Amersham Biosciences
PI3K	Rabbit polyclonal	1:1000	Cell Signaling	anti-rabbit/Amersham Biosciences
Akt1	Rabbit monoclonal	1:1000	Cell Signaling	IgG anti-rabbit/Amersham Biosciences
p-Akt^{Ser473}	Rabbit polyclonal	1:1000	Cell Signaling	anti-rabbit/Amersham Biosciences
eNOS	Rabbit polyclonal	1:1000	Cell Signaling	anti-rabbit/Amersham Biosciences
p-eNOS^{Ser1177}	Rabbit polyclonal	1:1000	Cell Signaling	anti-rabbit/Amersham Biosciences
β-actina	Goat polyclonal	1:1000	Santa Cruz	anti-goat/Amersham Biosciences

TABELA 2 – Relação de proteínas, anticorpos primários e secundários utilizados para análise por *Western blotting*.

Após essa etapa as mesmas foram lavadas 3 vezes de 10 minutos com TBS-T, incubadas por 2 horas com os respectivos anticorpos secundários conjugados à peroxidase.

Posteriormente, o complexo foi detectado mediante reação de quimiluminescência (ECL) e os *blots* foram visualizados e quantificados (números de pixels) pelo sistema *Scion Image*, fornecido gratuitamente pela NIH (EUA) via internet.

5.10 - Análise estatística

Para comparações entre variáveis medidas nos períodos pré e pós-treinamento (PAS e FC) foram analisados utilizando a análise de variância (ANOVA) de duas vias (grupos e período experimental). Para comparações entre variáveis medidas somente após treinamento foi utilizado ANOVA de uma via, quando encontrado diferenças significativas foi utilizado o teste *post-hoc* de Duncan (Statistica software, StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

A Correlação do Coeficiente de Pearson foi utilizada para analisar a correlação entre a expressão gênica cardíaca do miR-126 com a razão capilar / fibra no mesmo tecido. Foi adotado para todos os experimentos um $p \leq 0,05$ de significância. Todos os resultados serão apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão.

6. RESULTADOS

No presente estudo foram obtidos os resultados referentes à PAS de repouso, FC de repouso e peso corporal pré e pós-período experimental, HC calculada pelo peso do VE corrigido pelo peso corporal (VE/PC), razão capilar/fibra cardíaca, expressão proteica do VEGF e dos seus receptores Flt-1 e Flk-1.

Em relação à análise dos miRNAs, foi realizada a análise da expressão gênica de 349 miRNAs pela técnica de *microRNA microarray* e a confirmação, por RT-PCR em tempo real, da expressão gênica dos miRNAs relacionados com angiogênese que tiveram sua expressão alterada pelo treinamento aeróbico. Foi realizado ainda a expressão gênica de um dos alvos do miR-126, o PI3KR2, e a expressão protéica pela técnica de *Western blotting* do outro alvo desse miRNA, o Spred-1, e também de algumas proteínas que compõe as duas vias de sinalização angiogênica em que esse miRNA atua, a via da PI3K e a via das MAPKs.

6.1 - Peso corporal

O peso corporal nos períodos pré e pós-experimentais está demonstrada na FIGURA 4. Estes resultados mostram que o peso corporal dos animais de todos os grupos foi significativamente superior no período pós-experimental (SC = 213 ± 8 g; P1 = 210 ± 8 g; P2 = 206 ± 3 g) quando comparado com o período pré-experimental (SC = 176 ± 5 g; P1 = 178 ± 4 g; P2 = 178 ± 3 g), entretanto, o peso corporal dos animais não foi diferente entre os grupos em nenhum dos momentos.

FIGURA 4 – Peso corporal nos períodos pré e pós experimental (g). Grupo Sedentário (SC, n=6), Grupo Treinado Protocolo 1 (P1, n=6), Grupo Treinado Protocolo 2 (P2, n=7). Resultados apresentados em média $\pm$ erro padrão. (#) diferença significativa em relação ao período pré-treinamento, $p \leq 0,05$.

6.2 - MEDIDAS HEMODINÂMICAS

6.2.1 – Frequência cardíaca de repouso

Os dados de FC de repouso nos períodos pré e pós-experimental estão evidenciados na FIGURA 5. Podemos observar que o treinamento aeróbico promoveu bradicardia de repouso nos animais dos dois grupos treinados (PRE: SC = 437 ± 10 bpm; P1 = 436 ± 12 bpm; P2 = 445 ± 4 bpm; POS: SC = 431 ± 2 bpm; P1 = 393 ± 12 bpm; P2 = 382 ± 6 bpm), e ambos os grupos treinados apresentaram FC inferior ao grupo SC no período pós-treinamento.

FIGURA 5 – Frequência cardíaca (bpm) de repouso pré e pós período experimental. Grupo Sedentário (SC, n=6), Grupo Treinado Protocolo 1 (P1, n=6), Grupo Treinado Protocolo 2 (P2, n=7). Resultados apresentados em média $\pm$ erro padrão. (□) diferença significativa em relação ao período pré-treinamento; (■) diferença significativa em relação ao grupo SC, $p \leq 0,05$.

6.2.2 - Pressão arterial sistólica de repouso

A PAS de repouso nos períodos pré e pós-experimental está apresentada na FIGURA 6. Como esperado, não houve alterações na PAS em nenhum dos grupos durante o período experimental (PRE: SC = 117 ± 3 ; P1 = 115 ± 3 ; P2 = 114 ± 2 ; POS: SC = 119 ± 3 ; P1 = 119 ± 3 ; P2 = 117 ± 3).

FIGURA 6 – Pressão arterial sistólica (mmHg) de repouso pré e pós-período experimental. Grupo Sedentário (SC, n=6), Grupo Treinado Protocolo 1 (P1, n=6), Grupo Treinado Protocolo 2 (P2, n=7). Resultados apresentados em média $\pm$ erro padrão.

6.3 - Consumo de oxigênio pico

O VO_2 Pico é um marcador de condição cardiorrespiratória do animal, ou seja, é um indicador de eficácia do treinamento aeróbico. A FIGURA 7 mostra que o treinamento aeróbico promoveu um maior VO_2 Pico em ambos os grupos treinados ($\text{P1} = 75,63 \pm 1,92 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$; $\text{P2} = 80,05 \pm 2,22 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) em relação ao grupo SC ($\text{SC} = 67,60 \pm 2,04 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$), mostrando assim uma eficácia dos dois protocolos de treinamento.

FIGURA 7 – Efeito do treinamento no consumo de oxigênio pico ($\text{VO}_2 \text{ pico}$) ($\text{ml.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) no período pós-experimental. Grupo Sedentário (SC, $n=7$), Grupo Treinado Protocolo 1 (P1, $n=7$), Grupo Treinado Protocolo 2 (P2, $n=7$). Resultados apresentados em média $\pm$ erro padrão. (*) diferença significativa em relação ao grupo SC, $p \leq 0,05$.

6.4 - Hipertrofia cardíaca

A FIGURA 8 apresenta os resultados referentes à HC calculada pela razão entre o peso do ventrículo esquerdo e o peso corporal final do animal (VE/Peso Corporal) e na FIGURA 9 mostra o percentual de HC (%) de cada grupo treinado em relação ao grupo SC ($\text{SC} = 2,37 \pm 0,04 \text{ mg.g}^{-1}$). Como pode ser observado, o grupo P1 apresentou um grau de hipertrofia de 17% ($2,78 \pm 0,09 \text{ mg.g}^{-1}$) comparado ao grupo SC, enquanto que essa HC foi ainda mais acentuada no grupo que teve um

maior volume de treinamento (P2) 30% ($3,08 \pm 0,08 \text{ mg.g}^{-1}$) comparado aos outros dois grupos experimentais (SC e P1).

FIGURA 8 – Efeito do treinamento na hipertrofia cardíaca (mg/g). Grupo Sedentário (SC, n=6), Grupo Treinado Protocolo 1 (P1, n=7), Grupo Treinado Protocolo 2 (P2, n=8). Resultados apresentados em média $\pm$ erro padrão. (□) diferença significativa em relação ao grupo SC, $p \leq 0,05$; (†) diferença significativa em relação aos grupos e P1, $p \leq 0,05$.

FIGURA 9 – Percentual de hipertrofia cardíaca entre os grupos (%) comparados ao grupo SC. Grupo Treinado Protocolo 1 (P1), Grupo Treinado Protocolo 2 (P2).

6.5 - Razão capilar / fibra cardíaca

A FIGURA 10 mostra os resultados referentes à razão entre o número de capilares e o número de fibras (razão capilar/fibra) no músculo cardíaco. Com esses resultados podemos observar que o treinamento aeróbico foi eficaz em promover um aumento do número de capilares por fibra muscular no músculo cardíaco, pois os grupos treinados ($P1 = 1,34 \pm 0,07$ n° capilares / fibra; $P2 = 1,71 \pm 0,05$ n° capilares / fibra) tiveram uma razão superior em relação ao grupo SC ($SC = 0,85 \pm 0,04$ n° capilares / fibra). Além disso, o grupo P2 teve um aumento quando comparado ao grupo P1 ($P \leq 0,05$). Esses resultados sugerem que o treinamento proporcionou um aumento de angiogênese nesses animais, sendo mais significante nos animais que realizaram um maior volume treinamento.

FIGURA 10 – Efeito do treinamento na razão capilar / fibra cardíaca (A), Foto representativa das lâminas histológicas dos grupos SC, P1 e P2 (B). Grupo Sedentário (SC, n=5), Grupo Treinado Protocolo 1 (P1, n=5), Grupo Treinado Protocolo 2 (P2, n=6). Resultados apresentados em média $\pm$ erro padrão. (□) diferença significativa em relação ao grupo SC, $p \leq 0,05$; (†) diferença significativa em relação ao grupo P1, $p \leq 0,05$.

6.6 – VEGF e seus Receptores Flt-1 e Flk-1

A seguir serão apresentados os resultados da expressão proteica em expressão relativa em relação ao grupo SC (%) por *Western blotting* do VEGF e dos seus receptores Flt-1 e Flk-1 no coração, resultados esses que são mais um indicativo de aumento de angiogênese nesse tecido.

A FIGURA 11 mostra os resultados da expressão proteica do VEGF, esses demonstram que ambos os grupos treinados tiveram a expressão dessa proteína aumentada em relação ao grupo SC (SC = 100 ± 10 ; P1 = 142 ± 18 ; P2 = 209 ± 16), sendo esse aumento ainda maior no grupo P2 quando comparado ao grupo P1.

FIGURA 11 – Efeito do treinamento na expressão proteica do VEGF, por Western blotting (A). Blots representativos de VEGF e β-actina (B). Grupo Sedentário (SC, n=7), Grupo Treinado Protocolo 1 (P1, n=7), Grupo Treinado Protocolo 2 (P2, n=7). Resultados apresentados em média ± erro padrão. (□) diferença significativa em relação ao grupo SC, $p \leq 0,05$; () diferença significativa em relação ao grupo P1, $p \leq 0,05$.

Em relação aos resultados dos receptores de VEGF (Flt-1 e Flk-1), observamos que a expressão proteica do receptor Flt-1 se encontra similar em todos os grupos (SC = 100 ± 11 ; P1 = 99 ± 9 ; P2 = 106 ± 5). O mesmo foi encontrado quando analisado os resultados do receptor Flk-1, uma vez que encontramos resultados semelhantes em todos os grupos (SC = 100 ± 5 ; P1 = 92 ± 12 ; P2 = 92 ± 3) (FIGURA 12).

FIGURA 12 – Efeito do treinamento na expressão proteica do Flt-1 (A) e Flk-1 (B), por Western blotting. Blots representativos de Flt-1, Flk-1 e β-actina (C). Grupo Sedentário (SC, n=7), Grupo Treinado Protocolo 1 (P1, n=7), Grupo Treinado Protocolo 2 (P2, n=7). Resultados apresentados em média ± erro padrão.

6.7 - MicroRNAs

Para avaliar a expressão gênica de miRNAs no coração dos animais nos diferentes grupos, realizamos primeiramente a expressão gênica de 349 miRNAs pela técnica de *microarray de microRNA* (dados não mostrados).

Desse primeiro resultado, foram selecionados os miRNAs que tiveram sua expressão alterada com o treinamento aeróbico, assim obtivemos um total de 87 miRNAs que foram diferentemente expressos com o treinamento aeróbico quando comparado ao grupo SC.

Após essa análise, selecionamos os miRNAs com expressão alterada devido efeito do treinamento aeróbico, os quais já haviam sido descritos como angiogênicos. Desta forma, encontramos 6 miRNAs, os quais são: miR-214, miR-378, miR-27b, miR-let-7b, miR-let-7f e miR-126. Observamos ainda que dois miRNAs considerados anti-angiogênicos (miR-221, miR-222) não tiveram a expressão alterada com o treinamento aeróbico (FIGURA 13). Além disso, não

encontramos nenhum miRNA que tivesse algum RNAm-alvo relacionado com angiogênese que ainda não tivesse sido reportado na literatura, essa busca foi realizada em softwares de bioinformática (TargetScan, Miranda, miRBase).

FIGURA 13 – MicroRNAs envolvidos com angiogênese que foram diferentemente expressos com o treinamento aeróbico a partir da técnica de *microarray de microRNA*.

Dos miRNAs envolvidos com angiogênese, nós confirmamos a expressão gênica pela técnica de *PCR em tempo real* dos miR-126 e miR-let-7f por serem os dois que apresentaram expressão mais alteradas como efeito do treinamento aeróbico.

Assim, será mostrado a seguir os resultados da expressão gênica por *microarray de microRNA* e a confirmação dessa expressão por *PCR em tempo real* dos miRNAs miR-126 e miR-let-7f, em expressão relativa em relação ao grupo SC (%).

A FIGURA 14 apresenta a expressão gênica do miR-126 por *microarray de microRNA* e a confirmação dessa expressão por *RT-PCR em tempo real*. Podemos observar nos resultados do *microarray de microRNA*, que o treinamento aeróbico promoveu um aumento na expressão gênica em ambos os grupos treinados (P1 = 165 ± 2 ; P2 = 179 ± 1) em relação ao grupo SC (100 ± 2), sendo esse aumento de expressão ainda maior no grupo P2 quando comparado ao grupo P1. Resultados esses que quando confirmados por *PCR em tempo real* mostrou também que a expressão gênica desse miRNA se encontra aumentada nos grupos treinados (P1 = $126 \pm 11,3$; P2 = 142 ± 8) em relação ao grupo SC ($100 \pm 8,5$).

FIGURA 14 – Efeito do treinamento na expressão gênica do miR-126 por *microarray de microRNA* (A) e por *PCR em tempo real* (B). Grupo Sedentário (SC, *microarray* n= pool de 3 animais; *PCR* n=7), Grupo Treinado Protocolo 1 (P1, *microarray* n= pool de 3 animais; *PCR* n=7), Grupo Treinado Protocolo 2 (P2, *microarray* n= pool de 3 animais; *PCR* n=7). Resultados apresentados em média $\pm$ erro padrão. (□) diferença significativa em relação ao grupo SC, $p \leq 0,05$; (▒) diferença significativa em relação ao grupo SC, $p \leq 0,01$; (■) diferença significativa em relação ao grupo SC, $p \leq 0,001$; () diferença significativa em relação ao grupo P1, $p \leq 0,001$.

Uma vez que o miR-126 é o principal miRNA angiogênico, analisamos se havia uma correlação positiva entre o aumento da expressão desse miRNA pela técnica *PCR em tempo real* com o aumento de angiogênese cardíaca, quantificada

pelo método histológico da razão capilar / fibra. Os resultados mostram uma correlação positiva entre estas duas variáveis ($R=0,63$; $P \leq 0,05$) (FIGURA 15).

FIGURA 15 – Correlação entre a expressão gênica do miR-126 por PCR e razão capilar fibra no coração. Grupo Sedentário (SC), Grupo Treinado Protocolo 1 (P1), Grupo Treinado Protocolo 2 (P2). Resultados apresentados em média $\pm$ erro padrão. Diferença significativa $p \leq 0,05$.

O miR-let-7f apresentou resultados semelhantes em ambos os métodos de análise de expressão gênica, como observado na FIGURA 16. Essa figura apresenta os resultados do *microarray de microRNA*, em que temos que somente o grupo P2 apresentou um aumento da expressão gênica quando comparado aos outros dois grupos experimentais ($SC = 100 \pm 3$; $P1 = 89 \pm 2$; $P2 = 144 \pm 1$). E nos mostra também os resultados da confirmação da expressão por *PCR em tempo real*, onde podemos observar que somente o grupo P2 apresentou um aumento da expressão gênica quando comparado aos outros dois grupos experimentais ($SC = 100 \pm 13,8$; $P1 = 113 \pm 9,1$; $P2 = 140 \pm 8,7$).

FIGURA 16 – Efeito do treinamento na expressão gênica do miR-let-7f por *microRNA* microarray (A) e por *PCR em tempo real* (B). Grupo Sedentário (SC, *microarray* n= pool de 3 animais; *PCR* n=7), Grupo Treinado Protocolo 1 (P1, *microarray* n= pool de 3 animais; *PCR* n=7), Grupo Treinado Protocolo 2 (P2, *microarray* n= pool de 3 animais; *PCR* n=7). Resultados apresentados em média $\pm$ erro padrão. (□) diferença significativa em relação ao grupo SC, $p \leq 0,05$; (▤▤▤) diferença significativa em relação ao grupo SC, $p \leq 0,001$; () diferença significativa em relação ao grupo P1, $p \leq 0,05$; (▤) diferença significativa em relação ao grupo P1, $p \leq 0,001$.

Além da análise desses dois miRNAs, verificamos também a expressão dos miRNAs -221 e -222 por *PCR em tempo real*, mesmo que esses miRNAs não tenham sido selecionados no *microarray de microRNA* devido não apresentarem alteração de expressão com o treinamento. Realizamos a expressão gênica desses dois miRNAs por serem considerados dois miRNAs anti-angiogênicos importantes. Os resultados serão apresentados em expressão relativa em relação ao grupo SC (%).

O miR-221, apresentou sua expressão gênica diminuída em ambos os grupos treinados (P1 = $71 \pm 7,1$; P2 = $74 \pm 6,2$) em relação ao grupo SC (SC = $100 \pm 9,9$), resultado observado na FIGURA 17.

FIGURA 17 – Efeito do treinamento na expressão gênica do miR-221 por PCR em tempo real. Grupo Sedentário (SC, n=7), Grupo Treinado Protocolo 1 (P1, n=7), Grupo Treinado Protocolo 2 (P2, n=7). Resultados apresentados em média $\pm$ erro padrão. (*) diferença significativa em relação ao grupo SC, $p \leq 0,05$.

Por outro lado, o miR-222, que também é anti-angiogênico, não foi responsivo ao treinamento aeróbico, uma vez que a expressão gênica desse miRNA foi semelhante em todos os grupos após o período experimental (SC = $100 \pm 8,2$; P1 = $76 \pm 8,1$; P2 = $81 \pm 6,6$) (FIGURA 18).

FIGURA 18 – Efeito do treinamento na expressão gênica do miR-222 por PCR em tempo real. Grupo Sedentário (SC, n=7), Grupo Treinado Protocolo 1 (P1, n=7), Grupo Treinado Protocolo 2 (P2, n=7). Resultados apresentados em média $\pm$ erro padrão.

6.8 – Alvos do miRNA-126

6.8.1 – PI3KR2

A FIGURA 19 mostra os resultados da expressão gênica do PI3KR2 relativo ao grupo SC (%) pela técnica de PCR em tempo real no coração. Podemos observar que a expressão gênica desse alvo do miR-126 está diminuída em ambos os grupos treinados (P1 = $61 \pm 12,3$; P2 = $21 \pm 7,1$) em relação ao grupo SC ($100 \pm 12,3$). Além disso, essa diminuição é ainda mais acentuada no grupo P2 em relação ao grupo P1, o que sugere a atuação do miR-126 no seu alvo em ambos os grupos treinados.

FIGURA 19 - Expressão gênica do PI3KR2, alvo do miR-126, por PCR em tempo real. Grupo Sedentário (SC, n=7), Grupo Treinado Protocolo 1 (P1, n=7), Grupo Treinado Protocolo 2 (P2, n=7). Resultados apresentados em média $\pm$ erro padrão. (□) diferença significativa em relação ao grupo SC, $p \leq 0,05$; (▒) diferença significativa em relação ao grupo SC, $p \leq 0,001$; (■) diferença significativa em relação ao grupo P1, $p \leq 0,05$.

6.8.2 – Spred-1

Os dados do outro alvo do miR-126, a proteína Spred-1, analisados pela técnica de *Western blotting*, também serão apresentados em expressão relativa em relação ao grupo SC (%) (FIGURA 20). Podemos observar que a expressão proteica da Spred-1 diminuiu no coração, em ambos os grupos treinados quando comparados ao grupo SC (SC = $100 \pm 12,4$; P1 = $60 \pm 5,6$; P2 = $61 \pm 8,4$), o que nos sugere o efeito do miR-126 sobre esse alvo em ambos grupos treinados.

FIGURA 20 - Expressão proteica da Spred-1, alvo do miR-126, *por Western blotting* (A). *Blots* representativos de Spred-1 e β-actina (B). Grupo Sedentário (SC, n=7), Grupo Treinado Protocolo 1 (P1, n=7), Grupo Treinado Protocolo 2 (P2, n=7). Resultados apresentados em média ± erro padrão. (*) diferença significativa em relação ao grupo SC, $p \leq 0,05$.

6.9 – Via de sinalização da PI3K

Uma vez que a expressão gênica da PI3KR2, alvo do miR-126, diminuiu nos grupos treinados, e por esse alvo quando expresso atuar inibindo a PI3K, realizamos a expressão proteica por *Western blotting* de algumas das proteínas da via de sinalização da PI3K (PI3K, Akt e eNOS) no intuito de tentar evidenciar a ação do miRNA-126 sobre a via angiogênica da PI3K, no coração. Os resultados serão apresentados em expressão relativa em relação ao grupo SC (%).

Na FIGURA 21 podemos observar que ambos os grupos treinados apresentaram a expressão proteica da PI3K aumentada em relação ao grupo SC (SC = $100 \pm 19,6$; P1 = 215 ± 22 ; P2 = 310 ± 26).

FIGURA 21 – Efeito do treinamento na expressão proteica da PI3K, *por Western blotting* (A). *Blots* representativos de PI3K e β -actina (B). Grupo Sedentário (SC, n=7), Grupo Treinado Protocolo 1 (P1, n=7), Grupo Treinado Protocolo 2 (P2, n=7). Resultados apresentados em média $\pm$ erro padrão. (□) diferença significativa em relação ao grupo SC, $p \leq 0,05$; (■) diferença significativa em relação ao grupo SC, $p \leq 0,01$.

A proteína subsequente à PI3K na via de sinalização é a proteína Akt, na qual obtivemos como resultado que a Akt1 teve sua expressão similar em todos os grupos experimentais (SC = $100 \pm 15,8$; P1 = $106 \pm 16,2$; P2 = 108 ± 16), enquanto que a Akt fosforilada, a p-Akt_{Ser473}, teve sua expressão aumentada em ambos os grupos treinados quando comparado ao grupo SC (SC = $100 \pm 18,2$; P1 = $278 \pm 41,8$; P2 = 389 ± 51) (FIGURA 22).

FIGURA 22 – Efeito do treinamento na expressão proteica da Akt1 (A) e p-Akt_{Ser473} (B), por Western blotting. Blots representativos de Akt1, p-Akt_{Ser473} e β-actina (C). Grupo Sedentário (SC, n=7), Grupo Treinado Protocolo 1 (P1, n=7), Grupo Treinado Protocolo 2 (P2, n=7). Resultados apresentados em média ± erro padrão. (□□) diferença significativa em relação ao grupo SC, $p \leq 0,01$; (□□□) diferença significativa em relação ao grupo SC, $p \leq 0,001$.

E por último, em relação aos resultados da expressão proteica da eNOS, a FIGURA 23 mostra que somente o grupo P2 apresentou valores superiores de expressão da eNOS em relação aos outros grupos experimentais (SC = $100 \pm 9,2$; P1 = $114 \pm 6,9$; P2 = $143 \pm 5,6$), enquanto que quando analisado os resultados de uma das suas fosforilações, p-eNOS_{Ser1177}, encontramos que ambos os grupos treinados apresentaram valores superiores de expressão quando comparados ao valor encontrado no grupo SC (SC = 100 ± 10 ; P1 = 163 ± 17 ; P2 = 194 ± 17).

FIGURA 23 – Efeito do treinamento na expressão proteica da eNOS (A) e p-eNOS_{Ser1177} (B), por Western blotting. Blots representativos de eNOS, p-eNOS_{Ser1177} e β-actina (C). Grupo Sedentário (SC, n=7), Grupo Treinado Protocolo 1 (P1, n=7), Grupo Treinado Protocolo 2 (P2, n=7). Resultados apresentados em média ± erro padrão. (■) diferença significativa em relação ao grupo SC, $p \leq 0,01$; (□) diferença significativa em relação ao grupo P1, $p \leq 0,05$.

Com os resultados da expressão das proteínas dessa via de sinalização, podemos sugerir que o miRNA-126 foi eficaz em realizar sua ação sobre esse alvo, uma vez que a redução da expressão desse alvo proporcionou um aumento da expressão de todas as proteínas analisadas da via de sinalização da PI3K nos grupos treinados em relação ao grupo SC.

6.10 – Via de sinalização das MAPKs

Como o outro alvo do miRNA-126, a Spred-1, apresentou expressão proteica diminuída nos grupos treinados e por esse atuar sobre a via de sinalização das MAPKs verificamos a expressão proteica por Western blotting de algumas proteínas dessa via de sinalização, como, Raf-1, ERK 1/2, para que possamos verificar a atuação do miRNA-126 sobre essa outra via de sinalização angiogênica no coração.

Os resultados serão apresentados em expressão relativa em relação ao grupo SC (%).

A FIGURA 24 representa a expressão proteica da Raf-1. Observa-se que ambos os grupos treinados tiveram uma maior expressão dessa proteína em relação ao grupo SC (SC = 100 ± 7 ; P1 = 142 ± 12 ; P2 = 187 ± 16), sendo esse aumento ainda mais acentuado no grupo P2 comparado ao grupo P1.

FIGURA 24 – Efeito do treinamento na expressão proteica Raf-1, *por Western blotting* (A). *Blots* representativos de Raf-1 e β-actina (B). Grupo Sedentário (SC, n=7), Grupo Treinado Protocolo 1 (P1, n=7), Grupo Treinado Protocolo 2 (P2, n=7). Resultados apresentados em média $\pm$ erro padrão. (□) diferença significativa em relação ao grupo SC, $p \leq 0,05$; (▒) diferença significativa em relação ao grupo SC, $p \leq 0,001$; (■) diferença significativa em relação ao grupo P1, $p \leq 0,05$.

A FIGURA 25 mostra o resultado referente à expressão da proteína ERK 1/2 e da ERK 1/2 fosforilada, p-ERK 1/2_{Thr202/Tyr204}. Não houve diferença na expressão da proteína ERK 1/2 entre os grupos (SC = 100 ± 8 / 100 ± 11 ; P1 = 112 ± 9 / 120 ± 17 ; P2 = 123 ± 8 / 115 ± 8). Entretanto, a expressão da p-ERK 1/2_{Thr202/Tyr204}, foi aumentada no grupo P2 comparado aos outros dois grupos (SC = 100 ± 2 / 100 ± 6 ; P1 = 91 ± 1 / 94 ± 10 ; P2 = 126 ± 9 / 134 ± 5). Assim, estes resultados mostram uma ativação dessa proteína no grupo que realizou um maior volume de treinamento.

FIGURA 25 – Efeito do treinamento na expressão proteica da ERK 1/2 (A) e p-ERK 1/2_{Thr202/Tyr204} (B), por Western blotting. Blots representativos de ERK 1/2 (A), p-ERK 1/2_{Thr202/Tyr204} e β-actina (C). Grupo Sedentário (SC, n=7), Grupo Treinado Protocolo 1 (P1, n=7), Grupo Treinado Protocolo 2 (P2, n=7). Resultados apresentados em média ± erro padrão. (□) diferença significativa em relação ao grupo SC, $p \leq 0,05$; (▨) diferença significativa em relação ao grupo P1, $p \leq 0,05$; (■) diferença significativa em relação ao grupo P1, $p \leq 0,01$.

Com os resultados dessa via de sinalização, podemos sugerir que o miR-126 também foi eficaz em realizar sua ação nessa via angiogênica, uma vez que a redução da expressão do seu alvo relacionado com a via de sinalização das MAPKs (Spred-1), proporcionou um aumento da expressão de todas as proteínas analisadas dessa via, nos grupos treinados em relação ao grupo SC.

7. DISCUSSÃO

Os principais achados do presente estudo demonstram que o treinamento aeróbico de natação é capaz de alterar a expressão gênica dos miRNAs relacionados com angiogênese no tecido cardíaco, sendo essas alterações com um maior impacto no grupo que realizou um maior volume de treinamento. O treinamento aeróbico induziu HC, a qual foi dependente do volume de treinamento físico. A HC foi acompanhada de uma angiogênese aumentada, observada tanto pela maior razão capilar/fibra, quanto pela maior expressão proteica de VEGF nos grupos treinados, sendo essas alterações maiores no grupo P2 comparado ao grupo P1. O treinamento promoveu alterações de expressão nos miRNAs relacionados com angiogênese, entre eles o miR-126, o principal miRNA angiogênico. Ainda foi observada uma correlação positiva entre o aumento da expressão gênica do miR-126 e a razão capilar/fibra cardíaca. E verificamos também uma redução da expressão dos dois alvos do miR-126, PI3KR2 e Spred-1, o que ocasionou uma maior expressão de proteínas envolvidas nas vias de sinalizações da PI3K e MAPKs, respectivamente.

7.1 - Peso corporal

O peso corporal não foi diferente entre os grupos estudados tanto no início como no final do protocolo experimental, mas todos os grupos tiveram aumento significativo de PC no final do protocolo em relação ao início desse período o que pode ser observado na FIGURA 1. Assim, este resultado mostra que o treinamento físico não alterou o ganho de peso corporal, pois esse ocorreu de forma semelhante em todos os grupos estudados, sendo decorrente provavelmente do desenvolvimento do animal, uma vez que se tratava de animais jovens. Esse resultado corrobora com outros estudos do nosso grupo que realizaram o mesmo protocolo de treinamento (OLIVEIRA et al , 2009; SOCI et al, 2011; FERNANDES et al, 2011a).

7.2 - Respostas hemodinâmicas e do consumo de oxigênio pico

Na literatura atual já é sabido que o treinamento aeróbico usando grandes grupos musculares e com uma considerável duração e intensidade é capaz de

promover alterações benéficas no sistema cardiorrespiratório (EVANGELISTA et al, 2005).

Uma das principais adaptações é a bradicardia de repouso (UUSITALO et al, 2002; MEDEIROS et al, 2004; EVANGELISTA et al, 2005; OLIVEIRA et al, 2009), que já foi demonstrada em animais treinados tanto em natação, sendo explicada principalmente por um aumento vagal pós-treinamento (MEDEIROS et al, 2004), quanto em esteira, explicada por alterações nas células de marcapasso reduzindo a FC intrínseca (NEGRÃO et al, 1992).

Neste estudo, o protocolo de treinamento utilizado foi eficaz em promover uma redução significativa da FC de repouso em ambos os grupos treinados, não mostrando diferença entre os grupos treinados. De fato, em outros trabalhos do nosso grupo já havíamos encontrado respostas similares ao presente estudo para FC tanto em animais saudáveis (OLIVEIRA et al, 2009; SOCI et al, 2011) como em animais hipertensos (FERNANDES et al, 2011a; FERNANDES et al, 2011c), o que demonstra reprodutibilidade do protocolo de treinamento.

Outra variável hemodinâmica importante é a PAS, uma vez que a falta de adaptação na resposta da PAS ao treinamento aeróbico em animais normotensos é bastante documentada em estudos anteriores (FENNING et al, 2003; MEDEIROS et al, 2004; OLIVEIRA et al, 2009), o que vêm ao encontro com os nossos resultados, pois nenhuma diferença foi encontrada em nenhum dos grupos treinados, uma vez que a adaptação da PA parece depender da presença ou não da hipertensão arterial. A redução da PA é dependente do nível inicial de PA, pois populações hipertensas são as mais beneficiadas com o treinamento aeróbico com respeito a queda de PA (RONDON et al, 2010).

Como dito anteriormente, o VO_2 pico é o VO_2 no ponto máximo de esforço, sendo definido como a capacidade do organismo de absorver oxigênio. Já é bem estabelecido na literatura que o treinamento aeróbico promove um aumento do VO_2 pico em animais (EVANGELISTA et al, 2005; SOCI et al, 2011, FERNANDES et al, 2011a), adicionalmente, essa é uma das principais variáveis a ser observada após treinamento para comprovar eficácia do treinamento aeróbico realizado. O estudo de SOCI e colaboradores (2011), que utilizou o mesmo protocolo que utilizamos no presente estudo encontraram resultados similares ao nosso, ou seja, ambos os grupos treinados obtiveram um maior VO_2 pico após o período de treinamento quando comparado com o grupo SC.

Tanto o resultado de FC, quanto o resultado de VO_2 pico, demonstram uma eficácia do treinamento aeróbico utilizado, devido ambos serem considerados marcadores desse tipo de treinamento.

7.3 - Hipertrofia cardíaca

Uma das adaptações cardiovasculares decorrente do treinamento físico é a HC, que ocorre frente a alterações hemodinâmicas que modificam as condições de sobrecarga cardíaca durante as sessões de treinamento (BARBIER et al, 2006). A HC induzida pelo treinamento físico é considerada fisiológica e desenvolvida de forma simétrica e dependente do tipo, frequência, duração e intensidade do exercício.

A HC decorrente do treinamento físico pode ser classificada como, hipertrofia excêntrica decorrente a uma sobrecarga de volume que gera um elevado pico de tensão diastólica, ocorrendo adição em série de novos sarcômeros, e consequentemente aumento em seu comprimento e dos cardiomiócitos. Nesse tipo de hipertrofia há um aumento da cavidade acompanhada do aumento da espessura da parede do VE e é encontrada em atletas que realizam treinamento aeróbico. Por outro lado, a HC também pode ser classificada como hipertrofia concêntrica, quando é ocasionada por uma sobrecarga de pressão que gera um elevado pico de tensão sistólica acarretando em adição em paralelo de novos sarcômeros e consequentemente um aumento no diâmetro dos cardiomiócitos, o que proporciona um aumento na espessura da parede, não acompanhada pelo aumento da cavidade do VE. Esse tipo de HC é encontrada em atletas que realizam treinamento de força ou isométrica (OLIVEIRA et al, 2010; FERNANDES et al, 2011b).

A razão entre o peso do coração e o peso corporal é um índice muito utilizado para calcular a HC. Os resultados demonstrados neste estudo apontam para o desenvolvimento HC como resposta ao treinamento aeróbico, pois mostram um aumento significativo nos grupos treinados em relação ao grupo SC ($P1=17\%$ e $P2=30\%$), sendo ainda maior no grupo que realizou um maior volume de treinamento ($P2$) comparado ao grupo $P1$. Diversos resultados na literatura já demonstraram um aumento no peso do coração, após um protocolo de treinamento aeróbico (EVANGELISTA; BRUM; KRIEGER, 2003; ROCHA et al, 2007).

Outros trabalhos do nosso laboratório (OLIVEIRA et al, 2009; SOCI et al, 2011; FERNANDES et al, 2011a), os quais realizaram o mesmo protocolo de

treinamento encontraram resultados semelhantes aos nossos, onde obtiveram aproximadamente 20% e 30% de HC em P1 e P2 respectivamente, quando comparados aos valores do grupo sedentário. Mostramos ainda no estudo de SOCI e colaboradores (2011) um aumento do diâmetro de cardiomiócito nos grupos treinados. E recentemente (HASHIMOTO et al, 2011) encontramos que esse padrão de hipertrofia cardíaca nos grupos P1 e P2 se deve à uma maior relação proteica Akt1 / p-Akt_{Ser473} e da relação da expressão gênica de α/β miosina de cadeia pesada no tecido cardíaco nesses grupos.

7.4 – Angiogênese cardíaca

Neste estudo foi avaliada a razão/capilar fibra no tecido cardíaco pela técnica histológica e a expressão proteica de VEGF e seus dois receptores, Flt- e Flk-1, para analisar uma possível angiogênese local. Uma vez que o treinamento físico induz HC é de extrema importância que esta seja acompanhada de um aumento no número de vasos que irrigam o miocárdio.

Na literatura ainda existem controvérsias a respeito de angiogênese cardíaca decorrente do treinamento físico, mas essa adaptação parece depender da fase da vida desses animais, da espécie, do tipo e da duração do protocolo de treinamento utilizado (HAKKILA, 1955; TOMANEK, 1970; UNGE et al, 1979; HUDLICKA; BRWON; EGGINTON, 1992; PRIOR; YANG; TERJUNG, 2004).

Alguns estudos encontraram um aumento da densidade capilar decorrente do treinamento físico em animais jovens (BLORR □ LEON, 1970; BROWN, 2003; TOMANEK, 1970). Enquanto que estudos realizados com animais adultos encontraram pouco ou nenhum efeito do treinamento sobre a densidade capilar.

No estudo realizado por White e colaboradores (1998), foram examinadas detalhadamente as adaptações da microvasculatura coronária de porcos adultos induzida pelo treinamento aeróbico em esteira, os animais foram examinados com 1, 3, 8 e 16 semanas de protocolo experimental. Os resultados observados mostraram um aumento da densidade capilar somente na terceira semana do treinamento, não encontrando alterações nas demais semanas. Como justificativa para tal resultado, os autores colocam que com o aumento de HC encontrado nos grupos que treinaram um maior volume (8 e 16 semanas) pode ter dificultado o encontro de um aumento de densidade capilar nesses grupos, devido o aumento do diâmetro do cardiomiócito poder ocasionar uma pequena redistribuição dos vasos. Além disso,

os autores colocam que os capilares podem ter passado por uma rápida transformação se tornando arteríolas, como já foi demonstrado em músculo esquelético (SKALAK; PRICE; MELLER, 1998).

Outros autores (EFTHIMIADOU et al, 2004) demonstram que o exercício aeróbico sozinho é capaz de promover uma angiogênese cardíaca em ratos, e quando associado administração de VEGF, esses níveis de angiogênese se elevam ainda mais.

No nosso estudo os animais eram jovens (10 semanas de idade) e os resultados corroboram com os achados em animais com a mesma faixa etária, pois encontramos um aumento da razão capilar/fibra nos grupos treinados em relação ao grupo SC, sendo essa ainda mais evidente no grupo P2 em relação ao grupo P1, mostrando assim que o volume treinamento parece também influenciar na resposta da neovascularização cardíaca.

Diferente do estudo do White e colaboradores (1998), que trabalhou com diferentes volumes de treinamento ao longo do tempo (semanas), nosso estudo realizou um maior volume de treino (Grupo P2) dentro do mesmo período experimental (10 semanas) que os demais grupos experimentais, o que pode ter propiciado essa resposta diferente nas adaptações estruturais cardíacas, além do fato dos animais serem jovens, enquanto eles usaram adultos e de outra espécie. Adicionalmente, no nosso estudo, os animais realizaram treinamento de natação, enquanto que a maioria dos estudos, nessa perspectiva, utilizou treinamento em esteira. Além disso, como exposto anteriormente, nosso grupo já demonstrou em estudos anteriores que o treinamento de natação propicia uma HC fisiológica nos animais (OLIVEIRA et al, 2009; SOCI et al, 2011), e provavelmente essa HC é acompanhada por um aumento no número de vasos que irrigam esse tecido.

Na tentativa de elucidar essa resposta angiogênica cardíaca com o treinamento aeróbico analisamos também a expressão proteica de VEGF e dos seus receptores (Flt-1, Flk-1) nesse tecido, pois como dito anteriormente, essa proteína é considerada o mais potente fator angiogênico conhecido (FERRARA & DAVIS-SMITH, 1997). Encontramos um maior valor de VEGF em ambos os grupos treinados em relação ao grupo SC, sendo ainda maior no grupo P2 em relação ao P1, o que corrobora em mostrar que ambos os treinamentos propiciaram um aumento de angiogênese cardíaca.

E até o presente momento, pelo nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo que demonstra que o treinamento aeróbico é capaz de aumentar a expressão proteica de VEGF no coração em animais saudáveis. Há apenas um estudo que demonstrou aumento de expressão gênica de VEGF em animais saudáveis que realizaram um treinamento de corrida em esteira por cinco semanas (MARINI et al, 2008), corroborando assim com nossos achados. Adicionalmente, há estudos que demonstram aumento de VEGF cardíaco em animais doentes, como em hipertensos (HUSAIN, 2007) e infartados (WU et al, 2009), mostrando assim a importância do VEGF para o desenvolvimento angiogênico cardíaco.

Em relação à expressão proteica cardíaca dos dois receptores de VEGF, não encontramos nenhuma alteração na expressão com o treinamento. Diferente desses resultados, Marini e colaboradores (2008) encontraram um aumento na expressão gênica do Flk-1. Uma possível justificativa para tal divergência, pode ser pelo fato que os RNAm dos genes dos receptores estejam sendo regulados por algum mecanismo de regulação pós-transcricional, como por exemplo, por alguns miRNAs.

7.5 – MicroRNAs

No presente estudo encontramos que o treinamento aeróbico foi eficaz em alterar a expressão gênica de alguns miRNAs envolvidos no processo angiogênico, sugerindo assim que o treinamento aeróbico foi um estímulo para aumentar a expressão gênica dos miRNAs considerados angiogênicos (miR-126 e let-7f), e em relação aos miRNAs considerados anti-angiogênicos (miR-221 e 222), a expressão do miR-221 foi diminuída nos grupos treinados, enquanto que a do miR-222 foi inalterada entre os grupos experimentais.

Todos os estudos que avaliaram o efeito do treinamento físico sobre a resposta da expressão gênica dos miRNAs têm encontrado que essa classe de RNAs é responsiva a esse tipo de estímulo. A maioria dos estudos nessa perspectiva avaliam a expressão dos miRNAs no músculo esquelético (DRUMMOND et al, 2008; MCCARTHY et al, 2009; SAFDAR et al., 2009; AOI et al., 2010; NIELSEN et al., 2010; DAVIDSEN et al., 2011; FERNANDES et al, 2012), entretanto, somente dois estudos verificaram os efeitos dessa classe de RNAs no coração (SOCl et al., 2011; FERNANDES et al., 2011a).

Além disso, apenas um estudo avaliou a expressão gênica dos miRNAs relacionados a angiogênese (miR-221, 222, 328, 219, 20a) após a realização de

exercício aeróbico, sendo que os miRNAs foram avaliados na circulação (c-miRNA) de indivíduos praticantes de um programa de remo. Esses indivíduos foram avaliados em sessões agudas antes e após um período de treinamento. Neste estudo foram encontrados alguns padrões de resposta desses c-miRNAs ao exercício, o miR-222 apresentou expressão aumentada após a realização do exercício agudo antes e após o período de treinamento, a expressão gênica do miR-221 aumentou somente após a realização do exercício agudo antes do período de treinamento, enquanto que os outros miRNAs relacionados à angiogênese não foram alterados. Portanto, mostrando assim, que os miRNAs relacionados à angiogênese respondem de forma individual ao estímulo do exercício aeróbico. Além dos miRNAs relacionados com angiogênese, os autores também avaliaram miRNAs relacionados a inflamação e adaptação a isquemia (BAGGISH et al, 2011).

Apesar deste único estudo, o nosso trabalho é o primeiro a demonstrar a expressão gênica de miRNAs considerados angiogênicos no coração após uma intervenção de treinamento aeróbico em diferentes volumes, com o intuito de tentar elucidar o envolvimento desses no processo angiogênico cardíaco fisiológico decorrente desse tipo de treinamento, além de tentar verificar também o papel do volume de treinamento nesse processo.

A primeira evidência que comprovou o miR-let-7f como angiogênico foi o estudo de Kuehbach e colaboradores (2007), que a partir de manipulações (super expressão e inibição) com os genes da Drosha e Dicer em ECs encontraram que alguns membros da família let-7, incluindo o let-7f, apresentavam expressão aumentada nesse tipo celular, e que a inibição do miR-let-7f diminuiu a formação de vasos nessas células. Ainda nesse estudo, os autores realizaram uma análise *in silico* e encontraram um possível alvo para a família let-7, a proteína TSP-1, que é conhecida por ser um inibidor de angiogênese (DIPIETRO, 1997).

Entretanto, ainda não há mais estudos que demonstram a participação dessa família de miRNAs em processos angiogênicos fisiológicos, como por exemplo angiogênese cardíaca decorrente do treinamento aeróbico. Nosso estudo é o primeiro a demonstrar que o treinamento aeróbico realizado em grande volume é um estímulo capaz de aumentar a expressão gênica cardíaca do miR-let-7f e que esse miRNA pode estar envolvido no processo angiogênico decorrente do treinamento aeróbico.

Outra família de miRNAs estudados foram os miR-221 e 222, cujo seus genes ficam localizados próximo ao cromossomo X na posição p11.3 (LEWIS; BURGE; BARTEL, 2005). Estes foram demonstrados na literatura como miRNAs anti-angiogênicos devido ao fato de modularem a atividade angiogênica do fator de células troncos (SCF), por possuírem como alvo seu receptor, o c-kit. Nessa perspectiva, Polisen e colaboradores (2006) demonstraram que a expressão protéica do c-kit se encontrou diminuída, quando os miRNAs 221 e 222 foram super expressos em HUVECS, o mesmo não acontecendo com seu RNAm, sugerindo assim que os miRNAs exercem uma regulação pós-transcricional sobre o gene do c-kit.

Além disso, outro estudo demonstrou que a transfecção de mimics (RNA dupla fita quimicamente sintetizado que simula um miRNA maduro) para os miRNAs 221 e 222 reduziu a expressão da eNOS, que se encontrava aumentada em células HUVECS com silenciamento do gene da Dicer. Apesar desse resultado, quando os autores fizeram uma análise de bioinformática de complementaridade entre esses miRNAs e a enzima eNOS observaram que essa enzima não é um alvo para esses miRNAs, sugerindo assim que a eNOS é um alvo indireto dessa família de reguladores pós-transcricionais (SUÁREZ et al, 2007).

Esses miRNAs anti-angiogênicos tiveram respostas diferentes no presente estudo, pois enquanto que a expressão do miR-221 foi diminuída nos grupos treinados em relação ao grupo SC, a expressão do miR-222 foi inalterada com o treinamento aeróbico. Esses resultados se diferem do único estudo que analisou esses dois miRNAs após a realização de uma sessão aguda de exercício aeróbico, antes e após um período de treinamento de remo (BAGGISH et al, 2011). Neste estudo os autores analisaram c-miRNAs e mostraram que a expressão do miR-222 foi aumentada após a realização do exercício agudo, antes e após o período de treinamento, enquanto que a expressão do miR-221 aumentou somente após realização do exercício agudo, antes do período de treinamento.

O miR-221 parece não participar da regulação angiogênica desencadeada por uma sessão de exercício aeróbico, pois de acordo com o estudo de Baggish e colaboradores (2011) a expressão deste miRNA encontra-se aumentada na corrente sanguínea, após a realização de uma sessão aguda desse tipo de treinamento. Uma vez que, já foi comprovado que apenas uma sessão desse tipo de exercício é capaz de provocar aumento nos níveis de VEGF na circulação em indivíduos sedentários e

atletas (KRAUS et al, 2004), outra hipótese é que esse miRNA possui função tecido-específico. Hipótese essa que vai ao encontro com os nossos achados, pois após um período de treinamento aeróbico a expressão desse miRNA diminuiu no coração em nosso estudo, o que sugere a participação desse miRNA no processo de angiogênese cardíaco.

O miR-222 não teve sua expressão alterada com o treinamento aeróbico no nosso estudo, enquanto que no estudo de Baggish e colaboradores (2011) esse miRNA teve sua expressão aumentada tanto após a realização de uma sessão aguda de exercício aeróbico antes de um período de treinamento, quanto após o período de treinamento. Nossos resultados sugerem que esse miRNA não participa da regulação do processo angiogênico cardíaco decorrente do treinamento aeróbico, sendo possivelmente responsável por uma resposta regulatória ao aumento da expressão de VEGF encontrado na circulação após uma sessão de exercício agudo.

O miR-126 é considerado como principal miRNA angiogênico, pois estudos mostraram que esse é o miRNA com maior expressão gênica nas ECs (FISH et al, 2008; WANG et al, 2008). Além disso, ele modula o fenótipo endotelial *in vitro* e regula a integridade dos vasos sanguíneos *in vivo* (FISH et al, 2008).

Esse miRNA possui três alvos identificados nas ECs, o Spred-1, PI3KR2 e a molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM1), desses alvos dois são anti-angiogênicos, o Spred-1 e o PI3KR2, pois esses regulam duas importantes vias de sinalização angiogênicas mediada por VEGF (FISH et al, 2008; WANG et al, 2008). Assim, o miR-126 atua reprimindo dois reguladores negativos da via de sinalização do VEGF (FIGURA 27).

O Spred-1 atua limitando a via da MAPKs, enquanto que o PI3KR2 atua regulando negativamente a via de sinalização da PI3K. Para confirmar a interação do miRNA com as vias angiogênicas, Fish e colaboradores (2008) mostraram que a fosforilação induzida por VEGF da ERK 1/2 e da Akt foram atenuadas em células *knockdown* (redução da expressão gênica) para o miR-126. A FIGURA 27, a qual foi adaptada do trabalho desse elegante estudo representa a atuação do miR-126 sobre as duas vias angiogênicas.

Adicionalmente, um elegante estudo concluiu que esse miRNA participa da integração da resposta hemodinâmica (aumento do fluxo sanguíneo) e da sinalização de VEGF durante angiogênese, pois o fluxo sanguíneo induziu o

aumento da expressão do miR-126 resultando na ativação da sinalização de VEGF no endotélio (NICOLI et al, 2010).

FIGURA 27 – Representação esquemática da ação do miR-126 em vias angiogênicas mediadas por VEGF.

O treinamento aeróbico de natação foi um estímulo eficaz para aumentar a expressão gênica do miR-126 no coração quando comparado ao grupo sedentário, o que ocasionou uma maior ação desse miRNA nos seus dois alvos relacionados as vias de sinalizações angiogênicas (Spred-1 e PI3KR2).

Além disso, a correlação positiva entre o aumento da expressão gênica do miR-126 e o aumento da razão capilar/fibra no coração demonstra uma relação entre a angiogênese induzida pelo exercício e o padrão de expressão do miR-126, padrão esse que já foi demonstrado em outros tipos de angiogênese (FISH et al, 2008; WANG et al, 2008). Esses dados sugerem que esse miRNA também possui um papel importante na angiogênese cardíaca proveniente do treinamento aeróbico.

Em relação às alterações de expressão dos quatro miRNAs relacionados com angiogênese, os quais foram analisados neste estudo, podemos observar que eles responderam de forma individual ao estímulo do treinamento aeróbico e ao volume de treinamento, corroborando assim com o único estudo que avaliou a resposta de miRNAs relacionados a angiogênese na circulação (c-miRNAs) após estímulo de exercício aeróbico (BAGGISH et al, 2011).

7.6 – Vias de sinalizações angiogênicas reguladas pelo miR-126

Como dito no tópico anterior, por se tratar do principal miRNA relacionado com angiogênese, e devido ao treinamento aeróbico ter promovido um aumento da sua expressão, verificamos a expressão gênica dos dois alvos do miR-126 relacionados à vias angiogênicas, e encontramos uma redução da expressão dos mesmos.

Esses dois alvos, Spred-1 e PI3KR2, atuam sobre as vias da MAPKs e PI3K, respectivamente. Ou seja, a ação do miR-126 sobre o alvo Spred-1 promoveu uma maior ativação da via das MAPKs, enquanto que a ação desse miRNA sobre o alvo PI3KR2 promoveu uma maior ativação da via da PI3K. A ativação dessas vias de sinalização pelo VEGF foram avaliadas pela quantificação da expressão proteica e pelo estado de fosforilação de algumas proteínas como, Raf-1, ERK 1/2, PI3K, Akt e eNOS, que são componentes essenciais dessas vias em questão.

A ação inibitória da proteína Spred-1 ocasiona uma interferência na fosforilação e na ativação da Raf-1, uma proteína da via das MAPKs (WAKIOKA et al, 2001). Nesse sentido, Wang e colaboradores (2008) demonstraram que a super expressão do miR-126 diminui a influência repressiva da Spred-1 em vias de sinalização ativadas por VEGF e FGF, favorecendo assim a angiogênese. Além disso, mostraram ainda que a super expressão da Spred-1 em ECs prejudica a angiogênese e a migração celular, simulando assim um fenótipo de perda de função do miR-126, enquanto que a inibição da expressão da Spred-1 aumenta a angiogênese e restaura o fenótipo de perda de função do miR-126 em cultura de células endoteliais.

Por outro lado, o outro alvo do miR-126, a PI3KR2, atua regulando negativamente a atividade da proteína PI3K (UEKI et al, 2003), uma proteína da via de sinalização da PI3K/Akt/eNOS. Mas o papel da PI3KR2 na regulação da sinalização proveniente do VEGF não é totalmente elucidado. Nesse sentido, Fish e colaboradores (2008) mostraram que células *knockdown* para o gene da PI3KR2 e com redução da expressão do miR-126 foram capazes de resgatar o defeito da fosforilação da Akt dependente de VEGF, indicando assim que PI3KR2 é um alvo para esse miRNA. Além disso, os autores demonstraram que o nível de expressão da PI3KR2 foi amplamente regulado quando o miR-126 foi super expresso.

A FIGURA 28 sumariza nossos principais achados relacionados ao miR-126, que demonstram que o aumento da expressão desse miRNA nos grupos treinados

proporcionou uma maior atuação desse sobre seus alvos, Spred-1 e PI3KR2, o que ocasionou uma maior ativação das proteínas de vias angiogênicas dependentes de VEGF, a via das MAPKs (Raf-1 e p-ERK 1/2_{Thr202/Tyr204}) e da via da PI3K (PI3K, p-Akt_{Ser473}, eNOS, p-eNOS_{Ser1177}), sugerindo assim uma importante participação desse miRNA no processo angiogênico decorrente do treinamento aeróbico. É importante ressaltar ainda que, esses resultados foram mais expressivos no grupo que realizou um maior volume de treinamento, sugerindo maiores benefícios na realização de um treinamento aeróbico de maior volume. Nossos resultados corroboram os resultados encontrados por Wang et al (2008) e por Fish et al (2008), que demonstraram esse miRNA como um dos principais miRNAs envolvidos em processos angiogênicos.

FIGURA 28 – Representação esquemática dos principais resultados encontrados para o miR-126 como efeito do treinamento aeróbico.

8. CONCLUSÃO

O presente estudo revela um novo mecanismo molecular do treinamento aeróbico sobre o processo angiogênico cardíaco. Esse mecanismo é a participação de uma nova classe de RNAs denominados microRNAs nesse processo, uma vez que o treinamento proporcionou alteração na expressão de alguns miRNAs no tecido cardíaco, acompanhado do aumento da expressão proteica do VEGF. Além disso, o miR-126 parece ser um dos principais miRNAs envolvidos nesse processo, pois o aumento da sua expressão ocasionou alteração na expressão de dois dos seus alvos, o que proporcionou uma maior ativação das vias angiogênicas reguladas por esses alvos. Toda essa alteração cardíaca benéfica é ainda mais evidente quando realizado um treinamento aeróbico de maior volume. Sendo assim, podemos concluir que o treinamento aeróbico promoveu um aumento da angiogênese cardíaca, e que os miRNAs parecem estar envolvidos na regulação desse processo.

Estes resultados aumentam nossa compreensão dos mecanismos de angiogênese e treinamento físico, e sugerem que os miRNAs podem ser um potencial alvo terapêutico para condições patológicas envolvendo rarefação capilar.

9. ANEXO

9.1 Anexo A – Artigo publicado na Revista Medicine & Science in Sports & Exercise.

Swimming training increases cardiac microRNA-126 expression volume dependent in rats: relationship to angiogenesis.

Natan D. da Silva Junior, M.D.¹, Tiago Fernandes, M.D.¹, Ursula P. R. Soci, M.D.¹, Alex Willian A. Monteiro, M.D.¹, M. Ian Phillips, Ph.D², Edilamar M. Oliveira, Ph.D^{1,2}.

¹**Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology of the Exercise, School of Physical Education and Sport, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil.**

²**Laboratory of Stem Cells, Keck Graduate Institute, Claremont, CA, USA.**

Address for correspondence:

Edilamar Menezes de Oliveira, Ph.D

School of Physical Education and Sport, University of Sao Paulo.

Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology of the Exercise.

Av. Professor Mello Moraes, 65- Butantã- São Paulo- SP 05508-900-Brazil

Phone: (5511) 3091-2118, Fax: (5511) 3813-5921

E-mail: edilamar@usp.br

Short title: Aerobic training on microRNA and angiogenesis

Disclose funding: FAPESP, NIH.

Conflict of interest: None declared for each author.

ABSTRACT

Purpose: MiRNA-126 is angiogenic and has two validated targets Spred-1 and PI3KR2, negative regulators of angiogenesis by VEGF pathway inhibition. We investigated the role of swimming training on cardiac miRNA-126 expression related to angiogenesis.

Methods: Female Wistar rats were assigned into 3 groups: sedentary (S), Training 1 (T1, moderate volume) and Training 2 (T2, high volume). T1 consisted of 60min/day swimming, 5x/week/10week with 5% body overload. T2 the same protocol of T1 until 8th week, in the 9th week trained 2x/day and 10th week trained 3x/day. MiRNA and PI3KR2 gene expression analysis were performed by real-time PCR in heart muscle. We assessed: markers of training, the cardiac capillary/fiber ratio, cardiac protein expression of VEGF, Spred-1, Raf-1 / ERK1/2, PI3K/Akt/eNOS.

Results: The cardiac capillary/fiber ratio increased in T1 (58%) and T2 (101%) compared with S. VEGF protein expression was increased 42% in T1 and 108 % in T2. Cardiac miRNA-126 expression increased 26% (T1) and 42% (T2) compared with S, correlated with angiogenesis. The miRNA-126 target Spred-1 protein level decreased 41% (T1) and 39% (T2), which consequently favored an increase in angiogenic signaling pathway Raf-1 / ERK1/2. On the other hand, the gene expression of PI3KR2, the other miRNA-126 target, was reduced 39% (T1) and 78% (T2) and there were an increase in protein expression of components of PI3K/Akt/eNOS signaling pathway in the trained groups.

Conclusion: This study showed that aerobic training promotes an increase in the expression of miRNA-126 and that this may be related of exercise-induced cardiac angiogenesis, by indirect regulation of the VEGF pathway and direct regulation of its targets that converged an increase in angiogenic pathways, such as MAPK and PI3K/Akt/eNOS.

Keywords: Swimming, heart, capillaries, microRNA, VEGF.

INTRODUCTION

Paragraph Number 1 MicroRNAs (miRNAs) are non-coding short RNA molecules (~22-nt) that blocking mRNA of specific target genes, influencing protein abundance. The mechanism of inhibition by miRNA of the expression of target gene mRNA involves coupling the miRNA in the 3' untranslated regions (3' UTR) of the mRNA expressed by the target gene (17,20).

Paragraph Number 2 The first studies establishing the key significance of miRNAs in angiogenesis came from experimental studies involved in arresting miRNA biogenesis to deplete the miRNA of vascular tissues, whereas Dicer was shown to play the role of a critical enzyme in blood vessel formation (19).

Paragraph Number 3 Among miRNAs involved in the maintenance and formation of new capillaries, the miRNA-126 has the best known role in control of angiogenesis and vascular integrity. MiRNA-126 is considered an endothelial-specific miRNA (36). MiRNA-126 functions by directly repressing two negative regulators of the VEGF pathway (12). These are the validated gene targets that are involved in angiogenic signaling: Sprouty-related protein 1 (Sprd-1) an intracellular suppressor of the Ras/MAPK pathway (36), and phosphoinositol-3 kinase regulatory subunit 2 (PIK3R2, also known as p85- β) that negatively regulates the activity of PIK3/Akt/eNOS pathways (12).

Paragraph Number 4 It is well known that aerobic training induces functional and structural changes in the cardiovascular system that result in an improved phenotype (23,25,27,28,29). Evidence indicates that both an increase in maximum coronary blood flow and cardiac angiogenesis contribute to the enhanced capacity and reserve to deliver oxygen to the myocardium during exercise (21,22). The exercise training-induced improved capillary blood flow distribution appears to be the result of structural changes in the coronary tree and alterations in vasoreactivity of coronary resistance arteries (15,21,22). There are several other determinants also involved in triggering the angiogenic response, such as hypoxia, nitric oxide (NO), renin-angiotensin system and VEGF, among other growth factors (7,23,25,28). VEGF is considered the most potent angiogenic factor, and interacts with two specific receptors: Flt-1 (VEGFR1) and Flk-1 (VEGFR2), of which the latter is the more important receptor mediating the aerobic training-induced angiogenic signaling for VEGF (28). Interestingly, White et al. (37) demonstrate that angiogenic response mediated by treadmill training seems to depend on the volume of training conducted. However, cardiac capillary growth induced by swimming training is currently unknown.

Paragraph Number 5 There is only two recent studies that report the involvement of miRNAs in cardiovascular adaptive responses related to exercise training. The first study conducted showed the role of miRNA-29 in the decrease in collagen expression involved in the improvement of ventricular compliance (29). Our latest study showed that decreased miRNA-143 could upregulate cardioprotective genes such as ACE2, while an increase in miRNA-27 inhibits ACE expression in the heart induced by aerobic training, promoting the additional aerobic capacity required by the exercised heart (10).

Paragraph Number 6 Although it has long been recognized that exercise training enhances angiogenesis, there are no studies at present reporting the effects of aerobic training on miRNAs involved in angiogenesis. Thus, the aim of the present study was to investigate, for the first time, the role of a high and a low volume of aerobic training on miRNA-126 levels and its validated targets related to cardiac angiogenesis. The elucidation of these processes regulated by miRNAs and the identification of novel miRNAs targets mediated by exercise training is a highly valuable strategy that may led to the development of the novel treatment approaches for vascular disease.

MATERIALS and METHODS

Animal care

Paragraph Number 7 All of the protocols and surgical procedures used were in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, ACSM animal care standards and were approved by the Ethics Committee of the University of Sao Paulo School of Physical Education and Sport. Female Wistar rats (190 to 220 g, n=21) were used. The animals were weighed weekly and housed 3-5 per cage at a controlled room temperature (22°C) with a 12-h dark-light cycle and fed standard rat chow *ad libitum*. The rats were randomly assigned into 3 experimental groups: sedentary control (S, n=7), swimming trained following protocol 1 (T1, n=7) and swimming trained following protocol 2 (T2, n=7), as described below.

Exercise training protocols

Paragraph Number 8 Protocol 1 (T1) consisted of swimming sessions of 60 min duration, 5 days a week, for 10 weeks with 5% caudal body weight workload. Protocol 2 (T2): animals performed the same swimming training protocol as T1 until the end of the 8th week. In the 9th week rats trained twice a day and in the 10th week rats trained three times a day. These protocols have been used previously in our laboratory and are effective for promoting cardiovascular adaptations (10,27,29).

Cardiovascular measurements

Paragraph Number 9 Resting systolic blood pressure (SBP) and heart rate (HR) were measured in conscious rats, with the use of a computerized tail-cuff system (BP2000, Visitech system). Rats were acclimatized to the apparatus during daily sessions held over 4 days, one week before starting the experimental period. SBP and HR were determined before and after the ET protocol.

Samples preparation

Paragraph Number 10 At the end of the experimental period the rats were killed by decapitation, without prior anesthesia, and tissue samples (heart and soleus muscle) were harvested, weighed, frozen, stored at -80°C and used within 1 month for enzymes assay, miRNA, mRNA and protein preparation.

Physiological markers of aerobic training

Oxygen Uptake Measurements

Paragraph Number 11 Oxygen uptake (VO_2) was measured by means of expired gas analysis during the graded treadmill exercise described above. Gas analysis was performed using an oxygen and carbon oxide analyzer (Sable Systems SS3, FC-10a O_2/CO_2 analyzer, NV, USA). VO_2 was calculated using the measured flow through the metabolic chamber, the expired fraction of effluent oxygen and the fraction of oxygen in room air.

Skeletal Muscle Oxidative Enzyme Activity

Paragraph Number 12 Citrate synthase activity, used as index of physical training, was determined spectrophotometrically in mixed soleus muscle (30). The enzyme activity was measured in whole muscle homogenates, and the amount of the complex resulting from acetyl-CoA and oxaloacetate was determined at 412 nm and 25°C at an interval of 10 min. The solubilized protein extracts from the homogenates were quantified in duplicate by the Bradford method using bovine albumin standards. The citrate synthase activity was then normalized for the total protein content and reported in nanomoles per milligram of protein per minute.

Cardiac hypertrophy measurements

Paragraph Number 13 Cardiac hypertrophy was assessed by measuring the ratio of left ventricle (LV) in milligrams to animal body weight (BW) in grams (LV/BW in mg/g) and by cardiomyocyte diameter (μm). The LV was fixed in 6% formaldehyde and embedded in paraffin, cut in $5\ \mu\text{m}$ sections, from the level of papillary muscle and subsequently stained with hematoxylin and eosin (HE) to enable visualization of the cellular structures. Two randomly selected sections from each animal were visualized by light microscopy using an oil

immersion objective with a calibrated magnification (400x). Cardiomyocytes with visible nuclei and intact cellular membranes were chosen for diameter determination. The width of individually isolated cardiomyocytes was displayed on a viewing screen. The width was then manually traced across the middle of the nucleus, using a digitizing pad, and determined by a computer assisted image analysis system (Quantimet 520; Cambridge Instruments). For each animal, approximately 20 visual fields were analyzed. Results are expressed as % of control group.

Capillary-to-Fiber ratio measurements

Paragraph Number 14 The LV was fixed in 6% formaldehyde and embedded in paraffin, cut in 5 μm sections, from the level of papillary muscle and subsequently stained with *Periodic Acid Schiff* (PAS) to enable visualization of the capillary structure. Cardiac capillary-to-fiber ratio was quantified by a 10×10 grid optically superimposed on each of 5 non-overlapping fields at $200\times$ magnification, randomly distributed, using a computer-assisted morphometric system (Quantimet 500; Leica, Cambridge, UK). To calculate the capillary-to-fiber ratio, the total number of capillaries was divided by the total number of fibers counted in the same field. Only vessels with a diameter $<10 \mu\text{m}$ were counted, which would largely comprise capillaries but might also include terminal arterioles or venules. All analyses were conducted by a single observer blinded to rat identity.

Cardiac mRNA and miRNA analysis

RNA extraction

Paragraph Number 15 Frozen LV samples (100 mg) were homogenized in Trizol and RNA was isolated, according to the manufacturer's instructions (Invitrogen Life Technologies, CA, USA). After extraction, the total RNA concentration was quantified using NanoDrop Spectrophotometer (Nano-Drop Technologies, USA) and checked for integrity by EtBr-agarose gel electrophoresis.

cDNA synthesis for PI3KR2 mRNA

Paragraph Number 16 RNA were primed with $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ oligo dT (12–18 bp) (Invitrogen Life Technologies, CA, USA) to generate first strand DNA. Reverse transcription (RT) was performed using SuperScriptTM II Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies, CA, USA).

cDNA synthesis for miRNA-126

Paragraph Number 17 cDNA for miRNA analysis was synthesized from total RNA using gene-specific primers according to the TaqMan MicroRNA Assay protocol (Applied Biosystems, CA, USA). The $15 \mu\text{l}$ reactions obtained by TaqMan MicroRNA Reverse

Transcription Kit protocol (Applied Biosystems, CA, USA) were incubated in a Thermal Cycler for 30 min at 16°C, 30 min at 42°C, 5 min at 85°C and then held at 4°C.

Real-time PCR:

Paragraph Number 18 Real-time quantification of the PI3KR2 mRNA was performed with a *SYBR Green PCR Master Mix*, (Applied Biosystem, CA, USA) using ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystem, CA, USA). The expression of cyclophilin was measured as an internal control for sample variation in RT reaction. An aliquot of the RT reaction was used for 50 cycle PCR amplification in the presence of SYBR green fluorescent dye according to a protocol provided by the manufacturer (Applied Biosystems, CA, USA). Prior to analyzing samples, a standard curve for each amplicon was obtained using serial dilutions of cDNA to determine amplification primer efficiency and the amount of material for each reaction. Primers were designed using Primer 3 software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). The DNA sequence was obtained from GenBank and primers were made in separate exons to distinguish PCR products derived from cDNA by size, from those derived from genomic DNA contaminants. The mRNA expression was assessed by oligonucleotide primers as follows: PI3KR2 (sense: 5'- TGT CTG TCT TCT AAT CCC TTC CCC TGG TG -3', antisense: 5'- GTA GTA CCA AAG CAG GCT CCC CCA GG -3'), and cyclophilin (sense: 5'-AAT GCT GGA CCA AAC ACA AA -3', antisense: 5'-CCT TCT TTC ACC TTC CCA AA -3').

Paragraph Number 19 In order to accurately detect mature miRNAs the real-time PCR quantification method was performed using TaqMan MicroRNA Assay protocol (Applied Biosystems, CA, USA). The 20 µl PCR included 1.33 µl RT product, 10 µl TaqMan Universal PCR master mix II (2×), 7.67 µl nuclease-free water and 1 µl of primers and probe mix of the TaqMan MicroRNA Assay protocol for miRNA-126 (INV 2228). The reactions were incubated in a 96-well optical plate at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15s and 60° for 1 min. Samples were normalized by evaluating U6 expression.

Paragraph Number 20 Each heart sample was analyzed in triplicate. Relative quantities of target gene expressions of sedentary rats vs. trained rats were compared after normalization to the values of reference gene (ΔCT). Fold changes in mRNA and miRNA expression were calculated using the differences in ΔCT values between the two samples ($\Delta\Delta CT$) and equation $2^{-\Delta\Delta CT}$. Results are expressed as % of control.

Protein expression by Western Blot

Paragraph Number 21 The protein levels of VEGF, Flt-1, Flk-1, Spred-1, Raf-1, ERK 1/2, phospho^{Thr202/Tyr204}-ERK 1/2, PI3K, Akt1, phospho^{Ser473}-Akt, eNOS and phospho^{Ser1177}-eNOS

in the heart were analyzed by Western Blot. The frozen hearts (100 mg) were homogenized in cell lyses buffer containing 100 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 1% Triton X-100 and protease and phosphatase inhibitor cocktail (1:100; Sigma-Aldrich, MO, USA). Insoluble heart tissues were removed by centrifugation at $3.000 \times g$, 4° C, 10 min. Samples were loaded and subjected to SDS-PAGE in polyacrylamide gels (6-15%) depending on the protein molecular weight. After electrophoresis, proteins were electro-transferred to the nitrocellulose membrane (BioRad Biosciences, NJ, USA). Equal loading of samples (50 µg) and even transfer efficiency were monitored with the use of 0.5% Ponceau S staining of the blot membrane. The blot membrane was then incubated in a blocking buffer (5% non-fat dry milk, 10mM Tris-HCl (pH 7.6), 150 mM NaCl, and 0.1% Tween 20) for 2h at room temperature and then incubated overnight at 4°C with goat anti-β-actin polyclonal antibody, rabbit anti-Flt-1 polyclonal antibody, rabbit anti-Flk-1 polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Rabbit anti-Raf-1 polyclonal antibody, rabbit anti-PI3K polyclonal antibody, rabbit anti-Akt1 monoclonal antibody, rabbit anti-p-Aktser473 polyclonal antibody, rabbit anti-eNOS polyclonal antibody, rabbit anti-p-eNOSser1177 polyclonal antibody, rabbit anti-ERK polyclonal antibody and rabbit anti- phosphoThr202/Tyr204-ERK monoclonal antibody (Cell Signaling Tech., MA, USA). Mouse anti-Spred-1 monoclonal antibody and rabbit anti-VEGF polyclonal antibody (Abcam, Cambridge, UK). Binding of the primary antibody was detected with the use of peroxidase-conjugated secondary antibodies, and enhanced chemiluminescence reagents (Amersham Biosciences, NJ, USA) were used to visualize the autoradiogram, which was later exposed to photographic film. The film was developed and the bands were analyzed using Scion Image software (Scion Corporation based on NIH image). Cardiac β-actin expression levels were used to normalize the results and they were expressed as % of control.

Statistical Analysis

Paragraph Number 22 Results are represented as mean ± SEM. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA. P values <0.05 were accepted as statistically significant. Duncan's post hoc test (Statistica software; StatSoft, Tulsa, OK) was used for individual comparisons between means when a significant change was observed with ANOVA. Pearson's Coefficient of Correlation was used to analyze the correlation between parametrical data.

RESULTS

Aerobic training markers

Paragraph Number 23 There was no difference in SBP among groups ($S=119\pm3$ mmHg; $T1=119\pm3$; $T2=117\pm3$). HR decreased significantly after the swimming training protocol in T1 (395 ± 30 beats/min $P<0.05$) and T2 (382 ± 17 beats/min $P<0.05$) compared with Group S (431 ± 4 beats/min). VO_2 increased 13% (77.45 ± 4.5 ml.kg⁻¹.min⁻¹) in T1 and 19% (81.04 ± 5.8 ml.kg⁻¹.min⁻¹) in T2 compared with Group S (65.4 ± 4.8 ml.kg⁻¹.min⁻¹) (T1: $p<0.05$ vs. S and T2: $p<0.01$ vs. S). Citrate synthase activity in the soleus muscle of rats was significantly higher in both T1 (259.0 ± 55.6 μ mol.ml⁻¹.mg⁻¹, $P<0.05$) and T2 (363.2 ± 47.4 μ mol.ml⁻¹.mg⁻¹, $P<0.05$) than in Group S (180.4 ± 67.0 μ mol.ml⁻¹.mg⁻¹). Resting bradycardia, increase in VO_2 and citrate synthase activity confirm the effectiveness of training protocols adopted, as they are markers of aerobic work capacity.

Cardiac hypertrophy and angiogenesis

Paragraph Number 24 BW before and after swimming training was similar among groups (data not shown). LV/BW ratio and cardiomyocyte diameters were used as indices of cardiac hypertrophy. Figure 1A shows significant differences between the three groups in LV/BW ratio, T1 and T2 had an increase of 17% (2.78 ± 0.25 mg/g, $P<0.01$) and 30% (3.08 ± 0.24 mg/g, $P<0.001$), respectively, compared with Group S (2.37 ± 0.10 mg/g). These increases in LV/BW ratio observed with swimming training were further confirmed by the increase in LV cardiomyocyte diameters in T1 (15.2 ± 1.3 μ m – 21%, $P<0.05$) and T2 group (18.4 ± 1.3 μ m – 32%, $P<0.05$) compared with Group S (10.1 ± 1.1 μ m) (Figure 1B).

Paragraph Number 25 Figure 1C shows significant differences in cardiac capillary/fiber ratio among the three groups: in T1 (1.34 ± 0.17 , $P<0.001$) and T2 (1.71 ± 0.15 , $P<0.0001$) when compared with Group S (0.85 ± 0.10). These data show that both trained groups had significantly higher angiogenesis than Group S, and that this response was more exacerbated in Group T2 compared with Group T1 ($P<0.01$). Figure 1D shows a high positive correlation of LV capillary / fiber ratio with VO_2 results ($r=0.77$; $P<0.01$).

Aerobic training increases cardiac angiogenic factor VEGF

Paragraph Number 26 Representative blots of VEGF, Flt-1, Flk-1 and β -actin protein levels were shown in all groups studied (Figure 2A). Interestingly, the protein expression of cardiac VEGF increased 37% in T1 ($P<0.05$) and 108% in T2 ($P<0.001$) compared with Group S, and it was even higher in Group T2 compared with T1 ($P<0.01$) (Figure 2B). In contrast, VEGF receptors, Flt-1 and Flk-1, were not significantly different among the three groups (Figure 2C-D, respectively).

Effect of aerobic training on miRNA-126 and its relationship with angiogenesis

Paragraph Number 27 Cardiac miRNA-126 expression was analyzed by real-time PCR for the three groups. Figure 3A shows increased miRNA-126 expression by real-time PCR in groups T1 (26%, $P<0.05$) and T2 (42%, $P<0.001$) compared with Group S. In addition, the increase in LV capillary/fiber ratio was positively correlated with the increase in the cardiac miRNA-126 expression ($r=0.63$, $P<0.05$), indicating their relationship in angiogenesis (Figure 3B).

Effect of aerobic training on Spred-1 and MAPK signaling pathway

Paragraph Number 28 The target of miRNA-126, Spred-1 protein levels, was reduced in the trained groups (T1: 60% - $P<0.05$, T2: 61% - $P<0.05$) compared with Group S (Figure 4A). On the other hand, Raf-1 protein levels increased in the trained groups (T1: 41% - $P<0.05$, T2: 87% - $P<0.001$) compared with Group S, being more evident in Group T2 compared with Group T1 ($P < 0.05$) (Figure 4B). The protein level of ERK1/2 was similar in all groups (Figure 4C), however the higher volume of training (T2) induced an increase in protein levels of phospho^{Thr202/Tyr204}-ERK 1/2 (25 % and 34%) compared with Group S ($P<0.05$) and T1 ($P<0.05$), respectively (Figure 4D). Representative blots of Spred-1, Raf-1, ERK 1/2 and phospho^{Thr202/Tyr204}-ERK 1/2 protein levels in the heart were shown in all groups studied (Figure 4E).

Effect of aerobic training on PI3KR2 and PI3K/AKT/eNOS signaling pathway

Paragraph Number 29 The target of miRNA-126, cardiac PI3KR2 gene expression, was reduced in the trained groups (T1: 39% - $P<0.05$; T2: 78% - $P<0.001$) compared with Group S (Figure 5A), being more evident in Group T2 compared with Group T1 ($P<0.05$). On the other hand, PI3K protein levels increased in the trained groups (T1: 115% - $P < 0.05$, T2: 209% - $P<0.01$) compared with Group S (Figure 5B). The protein level of Akt1 was similar in all groups (Figure 5C), however phospho^{ser473}-Akt protein levels increased in both trained groups (T1: 177% - $P < 0.01$, T2: 288% - $P<0.001$) compared with Group S (Figure 5D). eNOS protein levels increased in Group T2 compared with the other groups (42% vs. S - $P<0.01$ and 28% vs. T1 - $P<0.05$) and, phospho^{ser1177}-eNOS proteins levels increased in the trained groups compared with Group S (T1: 62% - $P<0.05$, T2: 94% - $P<0.01$) (5E-F, respectively). Representative blots of PI3K, Akt1, phospho^{ser473}-Akt, eNOS, phospho^{ser1177}-eNOS protein levels in the heart were shown in all groups studied (Figure 5G).

DISCUSSION

Paragraph Number 30 The miRNA-126 is considered endothelial-specific miRNA and its involvement in angiogenesis has been demonstrated (12,26,36). Findings using knockdown of miRNA-126 in animals presented loss of vascular integrity and hemorrhage during embryonic development (12). In addition, the vascular abnormalities of miRNA-126 mutant mice resemble the consequences of diminished signaling by angiogenic growth factors, e.g. VEGF and fibroblast growth factor (36) and also miRNA-126 mediated integration of hemodynamics and VEGF signaling during angiogenesis (26). This shows the importance of this miRNA in the angiogenic process. In our findings the aerobic training induced an increase in miRNA-126 expression in the heart, and the positive correlation between the increase in miRNA-126 expression and the increase in capillary/fiber ratio in the heart presents a relationship between exercise-induced angiogenesis and the pattern of expression of miRNA-126, which has been previously been demonstrated in other types of angiogenesis (12,36).

Paragraph Number 31 The miRNA-126 has two validated targets: Spred-1 and PI3KR2 (12,36), which function as negative regulators of VEGF signaling pathways MAPK and PI3K respectively (12,26,32,34,36). Activation of the MAPK and PI3K pathways by growth factor stimulation can be assessed by measuring the phosphorylation status of ERK 1/2, Akt and eNOS three essential downstream components of the angiogenic pathways that induce vasodilatation, proliferation, survival and capillary formation. Fish et al. (12) found that the VEGF- induced phosphorylation of ERK 1/2 and Akt was attenuated in miRNA-126 knockdown cells, and deficiency in VEGF-dependent Akt phosphorylation that was rescued by siRNA-mediated knockdown of PI3KR2, while inhibition of Spred-1 rescued the deficiency in ERK 1/2 phosphorylation in cells with reduced levels of miRNA-126.

Paragraph Number 32 Furthermore, the overexpression of Spred-1 in endothelial cells impairs angiogenesis and cell migration, mimicking the miRNA-126 loss-of-function phenotype, whereas knockdown of Spred-1 expression enhances angiogenesis and rescues the miRNA-126 loss-of-function phenotype in cultured endothelial cells (36), confirming that these are targets for miRNA-126 and their relationship with angiogenesis.

Paragraph Number 33 The increased expression of miRNA-126 was induced by aerobic training is associated with a reduction in the expression of its two targets, facilitating angiogenic signaling pathways. The decreased protein expression of Spred-1 that favored the signaling pathway of MAPK, was associated by the increased protein expression of Raf-1 and ERK 1/2 phosphorylation. On the other hand, we find PI3KR2 mRNA expression in heart was

decreased in the trained groups and it was associated with an increased protein expression of PI3K, phosphorylated Akt, eNOS and phosphorylated eNOS.

Paragraph Number 34 Both trained groups presented cardiac hypertrophy compared with S group, and this hypertrophy was more pronounced in Group T2. We have previously shown that this exercise-induced increase in the size of cardiomyocytes is a physiological adaptation (10,29) which, in this study, was also accompanied by a higher capillary/fiber ratio in the heart. Studies have shown that aerobic training promotes angiogenesis in the heart, both in healthy (2,14,25) and in pathological conditions (23,31,38), which suggest that exercise training may be used as a non-pharmacological therapy to improve cardiac perfusion. In present study, the T2 group, that performed a higher volume of training, showed greater angiogenesis than T1 group. This response was coupled with an increased cardiac protein expression of VEGF, the most important growth factor, that has key role in the proliferation of capillaries and vascular integrity, as showed by studies with knockout mice (4,5,13). The capillary/fiber ratio consist a phenotypic result that reinforces the molecular assessment of VEGF, and was positively correlated with VO₂ max which shows that exercise-induced angiogenesis is associated with improved aerobic performance.

Paragraph Number 35 The biological actions of VEGF are mainly mediated by two structurally related receptor tyrosine kinases: fms-like tyrosine kinase (Flt-1) and fetal liver kinase (Flk-1) (11). In addition, its protein expression in skeletal muscle is potently induced by exercise (1). Although animal models in studies of ischemic hearts have shown an increase in protein expression of VEGF induced by aerobic training (16,27), there is a lack of research about the involvement of mechanisms of VEGF in healthy hearts angiogenesis induced by exercise. There is a single study that showed increased cardiac gene expression of VEGF induced by a running protocol (25). The present study, for the first time, shows increased protein expression of VEGF induced by aerobic training, and that this increase was dependent on the volume of training; whereas there was no increase in its receptors Flt-1 and Flk-1.

Paragraph Number 36 Interestingly, several stimuli, such as shear stress, growth factors and hormones are able to promote an increase in eNOS expression, and consequently in the NO production (24). This increase is important to vasodilatation, angiogenesis, inhibition of platelet aggregation, smooth muscle growth, and finally, to the adhesion of monocytes and leukocytes to the endothelium. Thus, NO is fundamentally involved in maintaining the function, structure and integrity of the vessels (6,8,18). Furthermore, some studies have shown that NO stimulates the expression of growth factors, such as VEGF (9), which shows that a synergistic action between the two factors is required for proper vascular growth. These

findings agree with our findings, since increased VEGF, eNOS and phosphorylated eNOS were observed with aerobic training.

Paragraph Number 37 In conclusion, this study showed that aerobic training promotes an increase in the expression of miRNA-126 and that this may be related to cardiac angiogenesis induced by this type of training, by indirect regulation of the VEGF pathway and by direct regulation of its target genes (Spred-1 and PI3KR2), which was associated with increasing the activity of the VEGF pathway and hence, the angiogenic pathways MAPK and PI3K/Akt/eNOS (Figure 6). These findings increase our understanding of the mechanisms of angiogenesis in exercise, and suggest that miRNA-126 is a potential therapeutic target for pathological conditions involving capillary rarefaction.

ACKNOWLEDGMENTS:

Disclose funding: The present investigation was supported by Grants from “Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo” (FAPESP, No. 2010/50048-1 and No. 2009/18370-3). M.I.P. was supported by National Institute of Health grant 1 R01 HL 077602. T. Fernandes was the recipient of a Doctor’s fellowship from “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico” (CNPq No. 159827/2011-6) and U. P. R. Soci was the recipient of a Doctor’s fellowship from “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES). E. M. Oliveira was awarded scholarships from CNPq (No. 307591/2009-3), Brazil.

Conflict of interest: None declared for each author.

The results of the present study do not constitute endorsement by ACSM.

REFERENCES

- 1- Amaral SL, Papanek P, Greene AS. Angiotensin II and VEGF are involved in angiogenesis induced by short-term exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001; 281: H1163-1169.
- 2- Bloor CM, Leon AS. Interaction of age and exercise on the heart and its blood supply. *Lab Invest*. 1970; 22: 160-165.
- 3- Bonauer A, Carmona G, Iwasaki M, Mione M, Koyanagi M, Fischer A, Burchfield J, Fox H, Doebele C, Ohtani K, Chavakis E, Potente M, Tjwa M, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. *Science*. 2009; 324(5935): 1710-1713.
- 4- Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*. 2000; 6: 389-395.
- 5- Carmeliet P, Ferreira V, Breir G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Eberhardt C, Delclercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. 1996; 380: 435-439.
- 6- Cohen RA, Shepherd JT, Vanhoutte PM. Inhibitory role of the endothelium in the response of isolated coronary arteries to platelets. *Science*. 1983; 221: 273-274.
- 7- Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res*. 2001; 49: 507-521.
- 8- Dubey RK, Overbeck HW. Culture of rat mesenteric arteriolar smooth muscle cells: effects of platelet-derived growth factor, angiotensin, and nitric oxide on growth. *Cell Tissue Res*. 1994; 275: 133-141.
- 9- Dulak J, Jozkowicz A, Dembinska-Kiec A, Guevara I, Zdzienick A, Zmudzinska-Grochot D, Florek I, Wojtowicz A, Szuba A, Cooke JP. Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20: 659-666.
- 10- Fernandes T, Hashimoto NY, Magalhães FC, Fernandes FB, Casarini DE, Carmona AK, Krieger JE, Phillips MI, Oliveira EM. 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*. 2011; 58:182-189.

- 11-Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 2003; 9: 669-676.
- 12-Fish JE, Santoro MM, Morton SU, Yu S, Yeh RF, Wythe JD, Bruneau BG, Stainier DYR, Srivastava D. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev Cell*. 2008; 15(2): 272-284.
- 13-Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*. 1995; 376: 66-70.
- 14-Hakkila J. Studies on the myocardial capillary concentration in cardiac hypertrophy due to training. *Ann Med Exp Biol Fenn*. 1955; 33(S.10): 1-82.
- 15-Hildick-Smith DJ, Johnson PJ, Wisbey CR, Winter EM & Shapiro LM. Coronary flow reserve is supranormal in endurance athletes: an adenosine transthoracic echocardiographic study. *Heart*. 2000; 84: 383–390.
- 16-Husain K. Physical conditioning modulates rat cardiac vascular endothelial growth factor gene expression in nitric oxide-deficient hypertension. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007; 320: 1169-1174.
- 17-Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005; 6(5): 376-385.
- 18-Kubis N, Richer C, Domergue V, Giudicelli JF, Lévy BI. Role of microvascular rarefaction in the increased arterial pressure in mice lacking for the endothelial nitric oxide synthase gene (eNOS3^{-/-}). *J Hypertens*. 2002; 20: 1581-1587.
- 19-Kuehbacher A, Urbich C, Zeiher AM, Dimmeler S. Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ Res*. 2007; 101(1): 59-68.
- 20-Latronico MV, Condorelli G. MicroRNAs and cardiac pathology. *Nat Rev Cardiol*. 2009; 6: 419-29.
- 21-Laughlin MH. Effects of exercise training on coronary transport capacity. *J Appl Physiol*. 1985; 58: 468–476.
- 22-Laughlin MH, Bowles DK, Duncker DJ. The coronary circulation in exercise training. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011. [Epub ahead of print].
- 23-Leosco D, Rengo G, Laccarino G, Golino L, Marchese M, Fortunato F, Zincarelli C, Sanzari E, Ciccarelli M, Galasso G, Aaltobelli GG, Conti V, Matrone G, Cimini V, Ferrara N, Filipelli A, Koch WT, Rengo F. Exercise promotes angiogenesis and improves β -adrenergic receptor signaling in the post-ischaemic failing rat heart. *Cardiovasc Res*. 2008; 78: 385-394.

- 24-Li H, Wallerath T, Forstermann U. Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide*. 2002; 7: 132-147.
- 25- Marini M, Falcieri E, Margonato V, Treré D, Lapalmbella R, Di Tullio S, Marchionni C, Burattini S, Samaja M, Esposito F, Veicsteinas A. Partial persistence of exercise-induced myocardial angiogenesis following 4-week detraining in the rat. *Histochem Cell Biol*. 2008; 129(4): 479-487.
- 26-Nicole S, Standley C, Walker P, Hurlstone A, Fogarty KE, Lawson ND. microRNA-mediated integration of haemodynamics and Vegf signaling during angiogenesis. *Nature*. 2010; 464: 1196-1200.
- 27-Oliveira EM, Sasaki MS, Cerêncio M, Baraúna VG, Krieger JE. Local renin-angiotensin system regulates left ventricular hypertrophy induced by swimming training independent of circulating renin: a pharmacological study. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2009; 10: 15-23.
- 28-Prior BM, Yang HT, Terjung RL. What makes vessels grow in exercise training? *J Appl Physiol*. 2004; 97: 1119-1128.
- 29-Soci UPR, Fernandes T, Hashimoto NY, Mota GF, Amadeu M, Rosa KT, Irigoyen MCC, Phillips MI, Oliveira EM. MicroRNAs 29 are involved in the improvement of ventricular compliance promoted by aerobic exercise training in rats. *Physiol Genomics*. 2011; 43: 665-673.
- 30-Srere PA. Studies on purified citrate-enzymes: metabolic interpretations. *Biochem Soc Symp*. 1968; 27: 11-21.
- 31-Tomanek RJ. Effects of age and exercise on the extent of the myocardial capillary bed. *Anat Rec*. 1970; 167: 55-62.
- 32-Ueki K, Fruman DA, Yballe CM, Fasshauer M, Klein J, Asano T, Cantley LC, Kahn CR. Positive and negative roles of p85 alpha and p85 beta regulatory subunits of phosphoinositide 3-kinase in insulin signaling. *J Biol Chem*. 2003; 278: 48453-48466.
- 33-Urbich C, Kehbacher A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res*. 2008; 79: 581-588.
- 34-Wakioka T, Sasaki A, Kato R, Shouda T, Matsumoto A, Miyoshi K, Tsuneoka M, Komiya S, Baron R, Yoshimura A. Sprd is a sprouty-related suppressor of Ras signaling. *Nature*. 2001; 412: 647-651.
- 35-Wang CH, Lee DY, Deng Z, Jeyapalan Z, Lee SC, Kahai S, Lu WY, Zhang T, Yang BB. MicroRNA miR-328 regulates zonation morphogenesis by targeting CD44 expression. *PLoS One*. 2008; 3(6): e2420.

- 36- Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, McAnally J, Hill JA, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN. The Endothelial-Specific MicroRNA miR-126 Governs Vascular Integrity and Angiogenesis. *Dev Cell*. 2008; 15: 261-271.
- 37- White FC, Bloor CM, Mckirnan MD, Carroll SM. Exercise training in swine promotes growth of arteriolar bed and capillary angiogenesis in heart. *J Appl Physiol*. 1998; 85(3): 1160–1168.
- 38- Wu G, Rana JS, Wykrzykowska J, Du Z, Ke Q, Kang P, Li J, Laham RJ. Exercise-induced expression of VEGF and salvation of myocardium in the early stage of myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009; 296(2): H389-95.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Effects of aerobic training on cardiac hypertrophy and angiogenesis. Left ventricular (LV) weight / body weight (BW) ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) (A), cardiomyocyte diameter (μm) (B), LV capillary/fiber ratio (C) and, correlation between VO_2 and capillary / fiber ratio in the heart (D). Groups: S indicates sedentary; T1, swimming training protocol 1; and T2, swimming training protocol 2. Data are reported as means $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ vs. S, ** $P < 0.01$ vs. S, *** $P < 0.001$ vs. S, $^{\dagger}P < 0.05$ vs. T1, $^{\dagger\dagger}P < 0.01$ vs. T1.

Figure 2. Effects of aerobic training on cardiac angiogenic factors. Representative blots of cardiac VEGF, Flt-1 and Flk-1 (A), LV VEGF protein levels (B), LV Flt-1 protein levels (C) and, LV Flk-1 protein levels (D) analyzed by Western Blot. Targeted bands were normalized to cardiac β -actin. Groups: S indicates sedentary; T1, swimming training protocol 1; and T2, swimming training protocol 2. Data are reported as means $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ vs. S, *** $P < 0.001$ vs. S, $^{\dagger\dagger}P < 0.01$ vs. T1. LV: left ventricle.

Figure 3. Cardiac miRNA-126 expression and its relationship with angiogenesis induced by aerobic training. Cardiac expression of miR-126 by real-time PCR (A) and positive correlation between miRNA-126 levels and capillary/fiber ratio in the heart (B). Groups: S indicates sedentary; T1, swimming training protocol 1; and T2, swimming training protocol 2. Groups: S indicates sedentary; T1, swimming training protocol 1; and T2, swimming training protocol 2. Data are reported as means $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ vs. S, ** $P < 0.01$ vs. S, *** $P < 0.001$ vs. S, $^{\dagger\dagger}P < 0.01$ vs. T1.

Figure 4. Effects of aerobic training on Spred-1 and MAPK signaling pathway in the heart. Spred-1 protein levels (A), Raf-1 protein levels (B), ERK 1/2 protein levels (C), phospho^{thr202/204}-ERK 1/2 protein levels (D) analyzed by Western Blot. Representative blots of cardiac Spred-1, Raf-1, ERK 1/2, phospho^{thr202/204}-ERK 1/2 and β actin (E). Targeted bands were normalized to cardiac β -actin. Groups: S indicates sedentary; T1, swimming training protocol 1; and T2, swimming training protocol 2. Data are reported as means $\pm$ SEM. *P < 0.05 vs. S, ***P < 0.001 vs. S, [†]P < 0.05 vs. T1, ^{††}P < 0.01 vs. T1.

Figure 5. Effects of aerobic training on PI3KR2 and PI3K/Akt/eNOS signaling pathways in the heart. Differential expression of PI3KR2 by real-time PCR (A), PI3K protein levels (B), Akt1 protein levels (C), phospho^{Ser473}- Akt protein levels (D), eNOS protein levels (E), phospho^{Ser1177}- eNOS protein levels (F) analyzed by Western Blot. Representative blots of cardiac PI3K, Akt1, phospho^{Ser473}- Akt, eNOS, phospho^{Ser1177}- eNOS and β -actin (G). Targeted bands were normalized to cardiac β -actin. Groups: S indicates sedentary; T1, swimming training protocol 1; and T2, swimming training protocol 2. Data are reported as means $\pm$ SEM. *P < 0.05 vs. S, ** P < 0.01 vs. S, ***P < 0.001 vs. S, [†]P < 0.01 vs. T1.

Figure 6. Schematic presentation of the effects of swimming training on cardiac angiogenesis by involvement of miRNA-126. Aerobic training is a powerful stimulus modulating the miRNA-126 that regulates their target mRNAs (PI3KR2 and Spred-1), thereby contributing to the phenotype of cardiac angiogenesis through different signaling pathways of VEGF (MAPK and PI3K/Akt/eNOS).

FIGURE 1

FIGURE 2

FIGURE 3

FIGURE 4

FIGURE 5

FIGURE 6

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADES, P.A. □ COELHO, C.E. Effects of exercise and cardiac rehabilitation on cardiovascular outcomes. Med Clin North Am. 84:251-265, 2000.
- AMARAL, S.L.; PAPANEEK, P.E.; GREENE, A.S. Angiotensin II and VEGF are involved in angiogenesis induced by short-term exercise training. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 281(3):H1163-9, 2001.
- AOI, W.; NAITO, Y.; MIYASHIMA, K.; TAKANAMI, Y.; KAWAI, Y.; ICHIKAWA, H.; YOSHIKAWA, T. The microRNA miR-696 regulates PCG-1 α in mouse skeletal muscle in response to physical activity. Am J Physiol Endocrinol Metab. 298(4): E799-806, 2010.
- BACKER, M.A. □ HORVETH, S.M. Influence of water temperature on oxygen uptake by swimming rats. J Appl Physiol. 19:1215-1218, 1964.
- BAGGISH, A.L., HALE, A.; WEINER, R.B.; LEWIS, G.D.; SYSTROM, D; WANG, F; WANG, T.J.; CHAN, S.Y. Dynamic regulation of circulating microRNAs during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training. J Physiol (epub ahead of print), 2011.
- BARBANTI, V.J. Dicionário de Educação Física e do Esporte. Editora Manole, 1ª edição, 1994.
- BARBIER, J.; LEBILLER, E.; VILLE, N.; RANNOU-BEKONO, F.; CARRE, F. Relationships between sports-specific characteristics of athlete s heart and maximal oxygen uptake. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil. 13(1): 115-121, 2006.
- BARTEL, D.P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 116:281-297, 2004.
- BEREIKOV, E.; GURYEV, V.; VAN DE BELTT, J.; WIENHOLDS, E.; PLASTERK, RH.; CUPPEN, E. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes. Cell. 120(1):21-4, 2005.
- BERNADO, B.C.; WEEKS, K.L.; PRETORIUS, L.; McMULLER, J.R. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. Pharmacol Ther. 128(1):191-227.

BONAUER, A.; CARMONA, G.; IWASAKI, M.; MIONE, M.; KOYANAGI, M.; FISCHER, A.; BURCHFIELD, J.; FOX, H.; DOEBELE, C.; OHTANI, K.; CHAVAKIS, E.; POTENTE, M.; TJWA, M.; URBICH, C.; EIDER, M.; DIMMELER, S. MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in mice. Science. 324:1710-1713, 2009.

BORNES, S.; BOULARD, M.; HIEBLT, C.; ANIBELLATO, C.; IACOVONI, J.S.; PRATS, H.; TOURIOL, C. Control of the vascular endothelial growth factor internal ribosome entry site (IRES) activity and translation initiation by alternatively spliced coding sequences. J Biol Chem. 279(18):18717-18726. 2004.

BLOMQVIST, C.G.; SALTIN, B. Cardiovascular adaptations to physical training. Annual Reviews in Physiology. 45:169-89, 1983.

BLINKS, J.R.; ENDOH, M. Modification of myofibrillar responsiveness Ca^{2+} as an inotropic mechanism. Circulation. 73:III85–98, 1986.

BLOOR, C.M. Angiogenesis during exercise and training. Angiogenesis. 8(3):263-71, 2005.

BLOOR, C.M.; WHITE, F.C.; SANDERS, T.M. Effects of exercise on collateral development in myocardial ischemia in pigs. J Appl Physiol. 56:656–665, 1984.

BLOOR, C.M. LEON A.S. Interaction of age and exercise on the heart and its blood supply. Lab Invest. 22:160-165, 1970.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochem. 72: 248,254, 1976.

BRANDÃO, M.U.P.; WANJNGARTEN, M.; RONDON, E.; GIOGI, M.C.P.; HIRONAKA, F.; NEGRÃO, C.E. Left ventricular function during dynamic exercise in untrained and moderately trained subjects. J Appl Physiol. 75(5):1989-1995, 1993.

BREEN, E.; JOHNSON, E.; WAGNER, H.; TSENG, H.; SUNG, L.; WAGNER, P. Angiogenic growth factor mRNA responses in muscle to a single bout of exercise. J Appl Physiol. 81:355–361, 1996.

BRENNECKE, J.; STARK, A.; RUSSELL, R.B.; COHEN, S.M. Principles of microRNA-target recognition. PLoS Biol. 3(3):e85, 2005.

- BROOKS, G.A.; WHITE, T.P. Determination of metabolic and rate response of rats to treadmill exercise. Am J Physiol. 45:1009-1014, 1978.
- BROWN, M.D. Exercise and coronary vascular remodelling in the healthy heart. Exp physiol. 88(5): 645-658, 2003.
- BROWN, M.D.; HUDLICKA, O. Modulation of physiological angiogenesis in skeletal muscle by mechanical forces: involvement of VEGF and metalloproteinases. Angiogenesis. 6(1):1-14. Review. 2003.
- CAPORALI, A.; EMANUELI, C. microRNA regulation in angiogenesis. Vasc Pharmacol. 55(4): 79-86, 2011.
- CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. Nat Med. 9(6):653-660, 2003.
- CHAUDHURI, K. □ CHATTERJEE, R. MicroRNA detection and target prediction: integration of computational and experimental approaches. DNA Cell Biol. 26(5):321-337, 2007.
- CHEN, C.□; LODISH, H.F. microRNAs as regulators of mammalian hematopoiesis. Semin Immunol. 17:155-165,2005.
- CHEN, Y.; GORSKI, D.H. Regulation of angiogenesis through a microRNA (miR-130a) that downregulates antiangiogenic homeobox genes GAX and HOXA5. Blood. 111:1217-1226, 2008.
- CHENG, Y.; JI, R.; YUE, J.; YANG, J.; LIU, X.; CHEN, H.; DEAN, DB.; □HANG, C. MicroRNAs Are Aberrantly Expressed in Hypertrophy Heart: Do They Play a Role in Cardiac Hypertrophy. Am J Pathol.170(6):1831-1840, 2007.
- CONVERTINO, V.A.; MACKM, G.W.; NADEL, E.R. Elevated central venous pressure: a consequence of exercise training-induced hypervolemia□ Am J Physiol. 260:R272-77, 1991.
- CONWAY, E.M.; COLLEN, D.; CARMELIET, P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. Cardiovasc Res 49:507-521, 2001.
- CRAWFORD, M.H.; PETRU, M.A.; RABINOWIT□, C. Effect of isotonic exercise on left ventricular volume during upright exercise. Circulation. 72:1237-1243, 1985.
- DAHER, □; BOULAY, P.L.; DESJARDINS, F.; GRATTON, J.P.; CLAING, A. Vascular endothelial growth factor receptor-2 activates ADP-ribosylation factor 1 to

promote endothelial nitric-oxide synthase activation and nitric oxide release from endothelial cells. J Biol Chem. 285:24591-24599, 2010.

DANTAS, EH.M. A Prática da Preparação Física. 3ª edição. Rio de Janeiro: Shape, 1995.

DAVIEDSEN, P.K.; GALLAGHER, I.J.; HARTMAN, J.W.; TARNOPOLSKY, M.A.; DELAm F.; HELGEm J.W.; TIMMONSm J.A.; PHILLIPS, S.M. High responders to resistance exercise training demonstrate differential regulation of skeletal muscle microRNAs expression. J Appl Physiol. 110:309–317, 2011.

DEWS, M.; HOMAYOUNI, A.; YU D.; MURPHY, D.; SEVIGNANI, C.; WENT□EL, E.; FURTH E.; LEE W.M.; ENDERS, G.H; MENDELL J.T.; THOMAS-TIKHONENKO, A. Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. Nat Genet. 38:1060-1065, 2006.

DIPIETRO, L.A. Thrombospondin as a regulator of angiogenesis. EXS. 79:295–314, 1997.

DRUMMOND, M.J.; MCCARTHY, J.J.; FRY, C.S.; ESSER, K.A.; RASMUSSEN, B.B. Aging differentially affects human skeletal muscle microRNA expression at rest and after an anabolic stimulus of resistance exercise and essential amino acids. Am J Physiol Endocrinol Metab. 295:E1333-E1340, 2008.

DUNCKER, D.J.; BACHE, R.J. Regulation of coronary blood flow during exercise. Physiol Rev. 88(3):1009-86, 2008

ESAU, C.; KANG, X.; PERALTA, E.; HANSON, E.; MARCUSSEN, E.G.; RAVICHANDRAN, L.V.; SUN, Y.; KOO, S.; PERERA, R.J.; JAIN, R.; DEAN, N.M.; FREIER, S.M.; BENNETT, C.F.; LOLLO, B.; GRIFFEY, R. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. J Biol Chem. 279(50):52361-52365, 2004.

EFTHIMIADOU, A.; ASIMAKOPOULOS, B.; NIKOLETTOS, N.; GIATROMANOLAKI, A.; SIVRIDIS, E.; LIALIARIS, T.S.; PAPACHRISTOU, D.N.; KONTOLEON, E. The Angiogenetic effect of intramuscular administration of VEGF on muscle. The influence of exercise on angiogenesis. In Vivo. 18(6):825-829, 2004.

EVANGELISTA, F.S.; BRUM, P.C.; KRIEGER, J.E. Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. Braz J Med Biol Res. 36:1751-1759, 2003.

EVANGELISTA, F.S.; MARTUCHI, S.E.; NEGRÃO, C.E.; BRUM, P.C. Loss of resting bradycardia with detraining is associated with intrinsic heart rate changes. Braz J Med Biol Res. 38(7):1141-1146, 2005.

FASANARO, P.; DALESSANDRA, Y.; DI STEFANO, V.; MELCHIONNA, R.; ROMANI, S.; POMPILIO, G.; CAPOGROSSI, M.C.; MARTELLI, F. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand ephrin-A3. J Biol Chem. 283:15878-15883, 2008.

FAUPEL, F.; NERVI, C. MicroRNA: basic mechanisms and transcriptional regulatory networks for cell fate determination. Cardiovasc Res. 79(4):553-561, 2008.

FENNING, A.; HARRISON, G.; DWYER, D.; MEYER, R.R.; BROWN, L. Cardiac adaptation to endurance exercise in rats. Mol Cell Biochem. 251(1-2): 51-59, 2003.

FERNANDES, T.; MAGALHÃES, F.C.; ROQUE, F.R.; PHILLIPS, M.I.; OLIVEIRA E.M. Exercise training prevents the microvascular rarefaction in hypertension balancing angiogenic and apoptotic factors: Role of microRNAs -16, -21, and -126. Hypertension. 59(2): 513-20, 2012.

FERNANDES, T.; HASHIMOTO, N.Y.; MAGALHÃES, F.C.; FERNANDES, F.B.; CASARINI, D.E.; CARMONA, A.K.; KRIEGER, J.E.; PHILLIPS, M.I.; OLIVEIRA, E.M. 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. 58:182-189, 2011a.

FERNANDES, T.; SOCI, U.P.; OLIVEIRA, E.M. Eccentric and concentric cardiac hypertrophy induced by exercise training: microRNAs and molecular determinants. Braz J Med Biol Res. 44(9): 836-47, 2011b.

FERNANDES, T. Efeito do treinamento físico aeróbico sobre as células progenitoras endoteliais derivadas da medula óssea em ratos espontaneamente hipertensos, 2011c. Dissertação de mestrado (Biodinâmica do movimento humano) – Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, São Paulo.

FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T. The biology of vascular endothelial growth factor. Endocr Rev. 18(1): 4-25, 1997.

FILIPOWICZ, W.; BHATTACHARYYA, S.N.; SONENBERG, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? Nat Rev Genet. 9:102–114, 2008.

FISH, J.E.; SANTORO, M.M.; MORTON, S.U.; YU, S.; YEH, R.; WYTHER, J.D.; BRUNEAU, B.G.; STAINIER, D.Y.R.; SRIVASTAVA, D. MiR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. Dev Cell. 15(2):272-284, 2008.

FORYST-LUDWIG, A.; KREISSL, M.C.; SPRANG, C.; THALKE, B.; BOHM, C.; BEN, V.; GURGEN, D.; DRAGUN, D.; SCHUBERT, C.; MAI, K.; STAWOWY, O.; SPRANGER, J.; REGITZ-AGROSEK, V.; UNGER, T.; KINTSCHER, U. Sex differences in physiological cardiac hypertrophy are associated with exercise-mediated changes in energy substrate availability. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 301: H115-H122, 2011.

FRANCO, F.G.M.; MATOS, L.D.N.J. Perfusão miocárdica e exercício físico. In: NEGRÃO, C.E.; BARRETO, A.C.P. Cardiologia do exercício: do atleta ao patológico. 3ª edição, São Paulo, Manole, cap.7, p.166-76, 2010.

FREEDMAN, S.B.; ISNER, J.M. Therapeutic angiogenesis for ischemic cardiovascular disease. J Mol Cell Cardiol. 33(3):379-93, 2001.

FULTON, D.; GRATTON, J.P.; MCCABE, T.J.; FONTANA, J.; FUJIO, Y.; WALSH, K.; FRANKE, T.F.; PAPAPETROPOULOS, A.; SESSA, W.C. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. Nature. 399:597-601, 1999.

GALE, N.W.; YANCOPOULOS, G.D. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development. Genes Dev. 13:1055-1066, 1999.

GAVA, N.S.; VÉRAS-SILVA, A.S.; NEGRÃO, C.E.; KRIEGER, E.M. Low-intensity exercise training attenuates cardiac beta-adrenergic tone during exercise in spontaneously hypertensive rats. Hypertension. 26:1129-1133, 1995.

GUSTAFSSON, T.; RUNDQVIST, H.; NORRBOM, J.; RULLMAN, E.; JANSSON, E.; SUNDBERG, C.L. The influence of physical training on the angiopoietin and VEGF-A systems in human skeletal muscle. J Appl Physiol. 103(3):1012-1020, 2007.

GUSTAFSSON, T.; KRAUS, W.E. Exercise-induced angiogenesis-related growth and transcription factors in skeletal muscle, and their modification in muscle pathology. Front Biosci. 6:67-89, 2001.

GUSTAFSSON, T.; PUNTSCHART, A.; KAIJSER, L.; JANSSON, E.; SUNDBERG, C.J. Exercise-induced expression of angiogenesis-related transcription and growth factors in human skeletal muscle. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 276:H679–H685, 1999.

GRAHAM JR, T.P.; COVELL, J.W.; SONNENBLICK, E.H.; ROSS JR, J.; BRAUNWALD, E. Control of myocardial oxygen consumption: relative influence of contractile state and tension development. J Clin Invest. 47:375–385, 1968.

GREGORY, R.I.; CHENDRIMADA, .TP.; COOCH, N.; SHIEKHATTAR, R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. Cell. 123:631–640, 2005.

GROSSMAN, W.; JONES, D.; MCLAURIN, L.P. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. J Clin Invest. 56(1):56-64, 1975.

HAN, J.; LEE, Y.; YEOM, K.H.; KIM, Y.K.; JIN, H.; KIM, V.N. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. Genes Dev. 18:3016–3027, 2004.

HAKKILA, J. Studies on the myocardial capillary concentration in cardiac hypertrophy due to training. Ann Med Exp Biol Fenn. 33(S10):1-82, 1955.

HASKELL, W.L.; LEE, IM.; PATE, R.R.; POWELL, K.E.; BLAIR, S.N.; FRANKLIN, B.A.; MACERA, C.A.; HEATH, G.W.; THOMPSON, P.D.; BAUMAN, A. Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. Med Sci Sports Exerc. 39(8): 1423-1434. 2007.

HASHIMOTO, N.Y.; FERNANDES, T.; SOCI, U.P.R.; OLIVEIRA, E.M. Determinantes moleculares da hipertrofia cardíaca induzidas por diferentes volumes de treinamento aeróbico. Rev Bras Cardiol. 24(3): 153-162, 2011.

HIGGINBOTHAM, M.B.; MORRIS, K.G.; WILLIAMS, R.S.; MCHALE, P.A.; COLEMAN, R.E.; COBB, F.R. Regulation of stroke volume during submaximal and maximal upright exercise in normal man. Circ Res. 58:281-91, 1986.

- HOLLOSZY, J.O.; COYLE, E.F. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. J Appl Physiol. 56:831-838, 1984.
- HUDLICKA, O.; BROWN, M.; EGGINTON, S. Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle. Physiol Rev. 72(2):369-417, 1992.
- HUDLICKA, O. What makes blood vessels grow? J Physiol. 44:1-24, 1991.
- HUSAIN, K. Physical conditioning modulates rat cardiac vascular endothelial growth factor gene expression in nitric oxide-deficient hypertension. Biochem Biophys Res Commun. 320: 1169-1174, 2007.
- HUTVAGNER, G.; MCLACHLAN, J.; PASQUINELLI, A.E.; BALINT, E.; TUSCHL, T.; AMORE, P.D. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. Science. 293:834–838, 2001.
- JENSEN, L.; BANGSBO, J.; HELLSTEN, Y. Effect of high intensity training on capillarization and presence of angiogenic factors in human skeletal muscle. J Physiol. 557:571–582, 2004.
- KENNEY, W.L. Parasympathetic control of resting heart rate: relationship to aerobic power. Med Sci Sports Exer. 17: 451-5, 1985.
- KIM, V.N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. Nat Rev Mol Cell Biol. 6(5): 376-385, 2005.
- KOAMARA, A.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. Nucleic Acids Res. 39:D152-7, 2011.
- KRAUS, R.M.; STALLINGS, H.W.^{3rd}; YEAGER, R.C.; GAVIN, T.P. Circulating plasma VEGF response to exercise in sedentary and endurance-trained men. J Appl Physiol. 96:1445-1450, 2004.
- KUEHBACHER, A.; URBICH, C.; EIHER, A.M.; DIMMELER, S. Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. Cir Res. 101:59-68, 2007.
- LAI, E.C. Predicting and validating microRNAs targets. Genome Biol. 5:115, 2004.
- LAUFS, U.; WERNER, N.; LINK, A.; ENDRES, M.; WASSMANN, S.; JUGENS, K.; MICHE, E.; BOHM, M.; NICKENIG, G. Physical training increases endothelial

progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. Circulation. 109:220-226, 2004.

LAUGHLIN, M.H.; TOMANEK, R.J. Myocardial capillarity and maximal capillary diffusion capacity in exercise-trained dogs. J Appl Physiol. 63: 1481-1486, 1987.

LEE, R.C.; FEINBAUM, R.L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. Cell. 75(5):843-854, 1993.

LEE, Y.; AHN, C.; HAN, J.; CHOI, H.; KIM, J.; YIM, J.; LEE, J.; PROVOST, P.; RADMARK, O.; KIM, S.; KIM, V.N. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. Nature. 425:415–419, 2003.

LEWIS, B.P.; BURGE, C.B.; BARTEL, D.P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. Cell. 120:15–20, 2005.

LEOSCO, D.; RENGO, G.; LACCARINO, G.; GOLINO, L.; MARCHESE, M.; FORTUNATO, F.; INCARELLI, C.; SANIARI, E.; CICCARELLI, M.; GALASSO, G.; ALTOBELLI, G.G.; CONTI, V.; MATRONE, G.; CIMINI, V.; FERRARA, N.; FILIPELLI, A.; KOCH, W.T.; RENGO, F. Exercise promotes angiogenesis and improves β -adrenergic receptor signaling in the post-ischaemic failing rat heart. Cardiovasc Res. 78: 385-394, 2008.

LUND, E.; GUTTINGER, S.; CALADO, A.; DAHLBERG, J.E.; KUTAY, U. Nuclear export of microRNA precursors. Science. 303:95–98, 2004.

MAISONPIERRE, P.C.; SURI, C.; JONES, P.F.; BARTUNKOVA, S.; WIEGAND, S.J.; RADWIEJEWSKI, C.; COMPTON, D.; MCCLAIN, J.; ALDRICH, T.H.; PAPADOPOULOS, N.; DALY, T.J.; DAVIS, S.; SATO, T.N.; YANCOPOULOS, G.D. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. Science. 277(5322):55-60, 1997.

MARINI, M.; FALCIERI, E.; MARGONATO, V.; TRERÉ, D.; LAPALMBELLA, R.; DI TULLIO, S.; MARCHIONNI, C.; BURATTINI, S.; SAMAJA, M.; ESPOSITO, F.; VEICSTEINAS, A. Partial persistence of exercise-induced myocardial angiogenesis following 4-week detraining in the rat. Histochem Cell Biol. 129(4):479-87, 2008.

- MARSHALL, C.J. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. Cell. 80(2):179-185, 1995.
- MCARDLE, W.D.; KATCH FI □ KATCH, V.L. Fisiologia do Exercício: Energia, Nutrição e Desempenho Humano, 5 ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan S.A. cap.18, p. 368-393, 2003.
- MCCARTHY, J.J.; ESSER, K.A.; PETERSON, C.A; □ DUPONT-VERSTEEGDEN, E.E. Evidence of MyomiR network regulation of β -myosin heavy chain gene expression during skeletal muscle atrophy. Physiol Genomics. 39:219–226, 2009.
- MEDEIROS, A.; OLIVEIRA, E.M.; GIANOLLA, R.; CASARINI, D.E.; NEGRÃO, C.E.; BRUM, P.C. Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. Braz J Med Biol Res. 37:1909-1917, 2004.
- MISHRA, P.K.; TYAGI, N.; KUMAR, M.; TYAGI, S.C. MicroRNAs as a therapeutic target for cardiovascular diseases. J Cell Mol Med. 13(4):778-789, 2009.
- MITCHELL, J.H.; KAUFMAN, M.P.; IWAMOTO, G.A. The exercise pressor reflex: Its cardiovascular effects, afferent mechanisms, and central pathways. Ann Rev Physiol. 45:229-42, 1983.
- MURRAY, P.A.; VATNER, S.F. alpha-Adrenoceptor attenuation of the coronary vascular response to severe exercise in the conscious dog. Circ Res. 45:654–660, 1979.
- NEGRÃO, C.E.; MOREIRA, E.D.; SANTOS, V.M.A.; FARAH, M.C.L.M.; KRIEGER, E.M. Vagal function impairment after exercise training. J Appl Physiol. 72(5):1749-53, 1992.
- NEGRÃO, C.E.; MOREIRA, E.D.; BRUM, P.C.; DENADAI, M.L.; KRIEGER, E.M. Vagal and sympathetic control of heart rate during exercise by sedentary and exercise-trained rats. Braz J Med Biol Res. 25:1045-52, 1992.
- NESSA, A.; LATIF, S.A.; SIDDIQUI, N.I.; HUSSAIN, M.A.; BHUIYAN, M.R.; HOSSAIN, M.A.; AKTHER, A.; RAHMAN, M. Angiogenesis-a novel therapeutic approach for ischemic heart disease. Mymensingh Med J. 18(2):264-272, 2009.
- NICOLI, S.; STANDLEY, C.; WALKER, P.; HURLSTONE, A.; FOGARTY, K.E.; LAWSON, N.D. MicroRNA-mediated integration of haemodynamics and Vegf signaling during angiogenesis. Nature. 464:1196-1200, 2010.

NIELSEN, S.; SCHEELE, C.; YFANTI, C.; AKERSTROM, T.; NIELSEN, A.R.; PEDERSEN, B.K.; LAYE, M. Muscle specific microRNAs are regulated by endurance exercise in human skeletal muscle. J physiol. 588(20): 4029-4037, 2010.

OLIVEIRA, E.M.; ALVES, G.B.; BRUM, P.C.; KRIEGER, J.E. Aspectos moleculares da hipertrofia dos músculos cardíaco e esquelético após treinamento físico In: NEGRÃO, C.E.; BARRETO, A.C.P. Cardiologia do exercício: do atleta ao cardiopata. 3ª edição, Editora Monole, p.214-248, 2010.

OLIVEIRA, E.M.; SASAKI, M.S.; CERENCIO, M.; BARAUNA, V.G.; KRIGER, J.E. Local renin-angiotensin system regulates LV hypertrophy induced by swimming training independent of circulating renin: a pharmacological study. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 10(1):15-23, 2009.

PILLAI, R.S.; BHATTACHARYYA, S.N.; ARTUS, C.G.; COLLIER, T.N; COUGOT, N.; BASYUK, E.; BERTRAND, E.; FILIPOWICZ, W. Inhibition of translational initiation by let-7 microRNA in human cells. Science. 309(5740):1573-1576, 2005.

POLISENO, L.; TUCCOLI, A.; MARIANI, L.; EVANGELISTA, M.; CITTI, L.; WOODS, K.; MERCATANTI, A.; HAMMOND, S.; RAINALDI, G. MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECS. Blood. 108:3068-3071, 2006.

PRIOR, B.M.; YANG, H.T.; TERJUNG, R.L. What makes vessels grow exercise training? J Appl Physiol. 97:1119-1128, 2004.

REINHART, B.J.; SLACK, F.J.; BASSON, M.; PASQUINELLI, A.E.; BETTINGER, J.C; ROUGVIE, A.E; HORVITZ, H.R.; RUVKUN, G. The-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. Nature. 403(6772):901-906, 2000.

ROCHA, F.L.; CARMO, E.C.; ROQUE, F.R.; HASHIMOTO, N.Y.; ROSSONI, L.V.; FRIMM, C.; ANÉAS, I.; NEGRÃO, C.E.; KRIEGER, J.E.; OLIVEIRA, E.M. Anabolic steroids induce cardiac renin-angiotensin system and impair the beneficial effects of aerobic training in rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 293(6):H3575-83, 2007.

RONDON, M.U.P.B.; LATERA, M.C.; ROTH, F.S.; BRUM, P.C.; KRIEGER, E.M. Hipertensão arterial e exercício físico. In: NEGRÃO CE, BARRETO ACP. Cardiologia do exercício: do atleta ao cardiopata. 3ª edição, Editora Monole, p.450-469, 2010.

- ROWELL, L.B. Human Circulation. Nova York, Oxford University Press. p.213-88, 1986.
- SAFDAR, A.; ABADI, A.; AKHTAR, M.; HETTINGA, B.P.; TARNOPOLSKY, M.A. miRNA in the regulation of skeletal muscle adaptation to acute endurance exercise in C57NI/6J male mice. PLoS One. 4(5): e5610, 2009.
- SCALBERT, E.; BRIL, A. Implication of microRNAs in the cardiovascular system. Curr Opin Pharmacol. 8:181-188, 2008.
- SCHAIBLE, T.F.; SCHEUER, J. Effects of physical training by running or swimming on ventricular performance of rat hearts. J Appl Physiol. 46(4):854-60, 1979.
- SKALAK, T.C.; PRICE, R.J.; ELLER, P.J. Where do new arterioles come from? Mechanical and microvessel adaptation. Microcirculation. 5(2-3):91-100, 1998.
- SOCI, U.P.; FERNANDES, T.; HASHIMOTO, N.Y.; MOTA, G.F.; AMADEU, M.A.; ROSA, K.T.; IRIGOYEN, M.C.; PHILLIPS, M.I.; OLIVEIRA, E.M. MicroRNAs 29 are involved in the improvement of ventricular compliance promoted by aerobic exercise training in rats. Physiol Genomics. 43(11):665-73, 2011.
- SOOD, P.; KREK, A.; AVOLAN, M.; MACINO, G.; RAJEWSKY, N. Cell-type-specific signatures of microRNAs expression. Proc Natl Acad Sci USA. 103:2746-2751, 2006.
- STAVRI, G.T.; ACHARY, I.C.; BASKERVILLE, P.A.; MARTIN, J.F.; ERUSALIMSKY, J.D. Basic fibroblast growth factor upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells: synergistic interaction with hypoxia. Circulation. 92:11-14, 1995.
- SUÁREZ, Y. Dicer-dependent endothelial microRNAs are necessary for postnatal angiogenesis. Proc Natl Acad Sci. 105:471-477, 2008.
- SUÁREZ, Y.; FERNÁNDEZ-HERNANDO, C.; POBER, J.S.; SESSA, W.C. Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells. Circ Res. 100(8):1164-73, 2007
- SUÁREZ, Y.; SESSA, W.C. MicroRNAs as novel regulators of angiogenesis. Circ Res. 104:442-454, 2009.
- TUBINO, M.J.G. Metodologia científica do treinamento desportivo. 3ª edição. São Paulo: Ibrasa, 1984.

THUM, T.; CATALUCCI, D.; BAUERSACHS, J. MicroRNAs: novel regulators in cardiac development and disease. Cardiovas Res. 79(4): 562-570, 2008.

TIRIU, D.; SIMONS, M. Angiogenesis in the human heart: gene and cell therapy. Angiogenesis. 8: 241-251, 2005.

TOMANEK, R.J. Effects of age and exercise on the extent of the myocardial capillary bed. Anat Rec. 167:55-62, 1970.

UEKI, K.; FRUMAN, D.A.; YBALLE, C.M.; FASSHAUER, M.; KLEIN, J.; ASANO, T.; CANTLEY, L.C.; KAHN, C.R. Positive and negative roles of p85 alpha and p85 beta regulatory subunits of phosphoinositide 3-kinase in insulin signaling. J Biol Chem 278: 48453-48466, 2003.

UNGE, G.; CARLSSON, S.; LJUNGQVIST, A.; TORNLING, G.; ADOLFSSON, J. The proliferative activity of myocardial capillary wall cells in variously aged swimming exercised rats. Acta Pathol Microbiol Scand. 87(1):15-7, 1979.

UUSITALO, A.L.; LAITINEN, T.; VAISANEN, S.B.; LANSIMIES, E.; RAURAMAA, R. Effects of endurance training on heart rate and blood pressure variability. Clin Physiol and functional imaging. 22(3): 173-179, 2002.

VALENCIA-SANCHES, M.A.; LIU, J.; HANNON, G.J.; PARKER, R. Control of translation and mRNA degradation by miRNA and siRNAs. Genes Dev. 20(5):515-24, 2006.

VAN ROOIJ, E.; MARSHALL, W.S.; OLSON, E.N. Toward microRNA-based therapeutics for heart disease: the sense in antisense. Circ Res. 103(9):919-28, 2008.

VEIKKOLA, T.; KARKKAINEN, M.; CLAESSEON-WELSH, L.; ALITALO, K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. Cancer Res. 60:203-212, 2000.

VÉRAS-SILVA, A.S.; MATTOS, K.C.; GAVA, N.S.; BRUM, P.C.; NEGRÃO, C.E.; KRIEGER, E.M. Low-intensity exercise training decreases cardiac output and hypertension in spontaneously hypertensive rats. Am J Physiol. 273: H2627-2631. 1997.

WAGNER, P.D. Diffusive resistance to O₂ transport in muscle. Acta Physiol Scand. 168:609-614, 2000.

WAKIOKA, T.; SASAKI, A.; KATO, R.; SHOUDA, T.; MATSUMOTO, A.; MIYOSHI, K.; TSUNEOKA, M.; KOMIYA, S.; BARON, R.; YOSHIMURA, A. Spry is a sprouty-related suppressor of Ras signaling. Nature. 412: 647-651, 2001.

WANG, X.H.; QIAN, R.; HANG, W.; CHEN, S.F.; JIN, H.M.; HU R.M. MicroRNA-320 expression in myocardial microvascular endothelial cells and its relationship with insulin-like growth factor-1 in type 2 diabetic rats. Clin Exp Pharmacol Physiol. 36(2):181-188, 2009.

WANG, S.; AURORA, A.B.; JOHNSON, B.A.; QI, X.; MCANALLY, J.; HILL, J.A.; RICHARDSON, J.A.; BASSEL-DUBY, R.; OLSON, E.N. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. Dev Cell. 15:261-271, 2008.

WEINECK, J. Biologia do Esporte. São Paulo: Manole, 1991.

WHELTON, S.P.; CHIN, A.; XIN, X.; HE, J. Effect of aerobic exercise on blood pressure: A meta-analysis of randomized, controlled trials. Ann Intern Med. 136: 493-503, 2002.

WHITE, F.C.; BLOOR, C.M.; MCKIRNAN, M.D.; CARROLL, S.M. Exercise training in swine promotes growth of arteriolar bed and capillary angiogenesis in heart. J Appl Physiol. 85(3): 1160–1168, 1998.

WIGHTMAN, B.; HA, I.; RUKUN, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. Cell. 75(5): 855-62, 1993.

WU, F.; YANG, Q.; LI, G. Role of specific microRNAs for endothelial function and angiogenesis. Biochem Biophys Res Comm. 386: 549-553, 2009.

WU, G.; RANA, J.S.; WYKRYKOWSKA, J.; DU, Q.; KE, Q.; KANG, P.; LI, J.; LAHAM, R.J. Exercise-induced expression of VEGF and salvation of myocardium in the early stage of myocardial infarction. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 296(2): H389-95, 2009.

WU, W.; SUN, M.; QIU, G.M.; CHEN, J. MicroRNA and cancer: current status and prospective. Int J Cancer. 120: 953–960, 2007.

WYKRYKOWSKA, J.J.; BIANCHI, C.; SELLKE, F.W. Impact of aging on the angiogenic potential of the myocardium: implications for angiogenic therapies with

emphasis on sirtuin agonists. Recent Pat Cardiovasc Drug Discov. 4(2): 119-132, 2009.

YAKU, H.; SLINKER, B.K.; MOCHIYUKI, T.; LORELL, B.H.; LEWINTER, M.M. Use of 2,3-butanedione monoxime to estimate nonmechanical VO₂ in rabbit hearts. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 265: H834–H842, 1993.

YANG, W.J.; YANG, S.N.; SANDUSKY, G.E.; YANG, Q.; HAO, G. Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development. J Biol Chem. 280: 9330-9335, 2005.

YI, R.; QIN, Y.; MACARA, I.G.; CULLEN, B.R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. Genes Dev. 17: 3011–3016, 2003.