

1. INTRODUÇÃO

A hipertrofia cardíaca constitui-se num dos principais mecanismos de adaptação do coração em face de uma sobrecarga de trabalho, de pressão ou de volume, imposta em determinadas condições, ocasionando um aumento da massa do miocárdio. Esse aumento ocorre em decorrência de alterações genéticas isoladas, como a cardiomiopatia hipertrófica, em resposta a condições fisiopatológicas, tais como a hipertensão arterial, infarto do miocárdio ou de hiperatividade simpática ou como resposta fisiológica devido à sobrecarga de trabalho imposta pelo treinamento físico dinâmico e resistido realizado de forma crônica por atletas.

Situações patológicas e fisiológicas promovem adaptações hipertróficas do miocárdio com características fenotípicas e funcionais diferentes entre si, podendo ser classificadas, de modo geral, como hipertrofia concêntrica e excêntrica, conforme revisado por nosso grupo e por outros (OLIVEIRA & KRIEGER, 2002; CARREÑO et al., 2006; BARAÚNA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009; LAUSCHKE & MAISCH, 2009; BERNARDO et al., 2010; FERNANDES; SOCI; OLIVEIRA, 2011).

A hipertrofia patológica decorrente de doenças como a hipertensão arterial resulta da adaptação do miocárdio frente à sobrecarga de pressão na tentativa de reduzir o estresse proporcionado nas paredes da câmara ventricular (BING et al., 1995). Sua importância se dá pela significativa associação desse processo adaptativo à mortalidade em pacientes hipertensos (LEVY, 1988), e ao maior risco de desenvolvimento de doenças coronarianas, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca e outras complicações cardiovasculares independentes dos níveis pressóricos (LEVY, et al., 1990).

Como adaptação ao exercício físico regular, também se observa um aumento do músculo cardíaco, esse aumento pode advir de uma sobrecarga de volume

ocasionando uma hipertrofia excêntrica, ou de pressão levando a uma hipertrofia concêntrica.

Diferenças no tipo de hipertrofia são observadas quando o coração é submetido a uma sobrecarga fisiológica ou patológica. Esse fato é explicado pela diferença na intensidade e no tipo de sobrecarga que é imposta ao músculo cardíaco. Ressaltamos o fato de que a sobrecarga induzida pelo exercício é intermitente, já a hipertrofia cardíaca patológica é desenvolvida por uma sobrecarga contínua, como ocorre no indivíduo hipertenso. A hipertrofia fisiológica vem acompanhada de melhora na função cardíaca enquanto a hipertrofia patológica está associada à maior índice de morbidade e mortalidade (OLIVEIRA & KRIEGER, 2002; BERNARDO et al., 2010; FERNANDES; SOCI; OLIVEIRA, 2011).

Apesar de estudos clínicos demonstrarem efeitos positivos do treinamento físico nas doenças cardiovasculares, questões importantes a respeito dos mecanismos envolvidos nesse processo têm sido feitas. Neste sentido, a utilização das técnicas de biologia molecular associada à utilização de modelos experimentais permite que aspectos fundamentais da regulação dos mecanismos de hipertrofia fisiológica e patológica sejam elucidados. Além disso, a possibilidade de interromper ou reverter uma hipertrofia patológica, interferindo no desenvolvimento da insuficiência cardíaca é um tópico de grande interesse clínico (CARREÑO et al, 2005).

Dentro dessa linha, alguns estudos têm observado a expressão de diferentes genes envolvidos no processo de hipertrofia cardíaca como: receptores de membrana, proteínas de sinalização e fatores de transcrição. Além disso, a re-expressão de genes fetal como a miosina de cadeia pesada do tipo beta (β -MHC) e o fator natriurético atrial (ANF) que são ausentes na hipertrofia fisiológica,

possibilitou utilização destes genes como marcador de hipertrofia patológica (MACMUULLEN & JENNINGS, 2007).

Um grupo de moléculas vem sendo estudado como reguladores da expressão gênica de diversas células, inclusive os cardiomiócitos. Os microRNAs (miRNAs) foram recentemente descobertos como uma classe de RNAs não codificante responsáveis pela regulação pós-transcricional da expressão gênica de plantas e animais (KIM, 2005). Embora, os miRNAs sejam altamente expressos no coração, o papel que essas moléculas desempenham nos processos fisio-patológicos não estão claros (CHENG et al., 2007), portanto conhecer como essas moléculas atuam na hipertrofia cardíaca pode trazer respostas importantes no entendimento da hipertrofia patológica e fisiológica.

Atualmente, poucos estudos foram publicados investigando o efeito do treinamento físico aeróbio na expressão cardíaca de miRNAs. Reportar o efeito do treinamento físico como modulador dessas moléculas em modelos de hipertrofia cardíaca patológica pode trazer novas respostas no que se referem aos mecanismos chave de diferenciação da hipertrofia cardíaca patológica e fisiológica e os mecanismos envolvidos no processo de reversão do quadro patológico. Desse modo, a identificação de miRNAs específicos abre perspectivas para trabalhos futuros, utilizando essas moléculas com agentes terapêuticos através da superexpressão ou inibição. Essas informações também são importantes para o melhor entendimento acerca do papel do treinamento físico na clínica cardiológica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Exercício Físico e Adaptações Cardiovasculares

O treinamento físico aeróbio produz vários efeitos benéficos sobre a musculatura esquelética, o metabolismo e o coração, além dos efeitos sobre a circulação coronariana e periférica. Essas adaptações fisiológicas dependem da quantidade de treinamento físico, a qual é determinada pelo volume (tempo de treinamento), intensidade (grau de carga de treinamento) e frequência (número de sessões de treinamento em um determinado espaço de tempo) de treinamento físico (MATHEWS & FOX, 1976; MELLEROWICS & MELLER, 1978; WEINECK, 1986; DICKHUTH et al., 1983; O'TOOLE et al., 1987). A combinação adequada desses fatores somada as características da espécie, é um fator fundamental para o melhor desenvolvimento das adaptações fisiológicas. Essas adaptações já estão bem descritas na literatura com exercício físico aeróbio como corrida e natação tanto em humanos (BLOMQUIST & SALTIN, 1983; HOLLOSZY & COYLE, 1984; BRANDÃO et al., 1993), como em animais (CHAIBLE & SCHEUER, 1979).

As adaptações cardiovasculares resultantes do treinamento físico já são bem conhecidas. Diversos estudos mostram diminuição na frequência cardíaca tanto de repouso como em cargas submáximas (LEWIS et al., 1980; KRAMSCH et al., 1981; BUTLER et al., 1982; KEUL et al., 1982; STONE et al., 1991; STRATTON et al., 1994). Isso é um indicativo de que, para uma mesma carga de trabalho, está havendo menor gasto energético pelo coração, portanto ocorrendo uma melhora na eficiência cardíaca (KANAKIS & HICKSON, 1980; RAAB, 1960). Alterações estruturais e hemodinâmicas participam desse processo. Estruturalmente, o aumento da massa muscular do miocárdio, principalmente do ventrículo esquerdo, com aumento do volume diastólico final, caracteriza a hipertrofia excêntrica

(ABRAMAN & DZHUGANYAN, 1969; FLECK, 1988; STONE et al., 1991; BRANDÃO et al., 1993; HUONKER et al., 1996; FORJAZ et al., 1998). Também ocorre aumento do volume sistólico e da força de contração (SALTIN, 1985; BRANDÃO et al., 1993; STRATTON et al., 1994). Como há maior enchimento ventricular, mantendo-se a fração de ejeção, o coração ejeta maior volume absoluto de sangue. Portanto, é necessário um menor número de batimentos por minuto para manter o débito cardíaco. Adaptações importantes acontecem, também, nos vasos, como aumento do calibre das artérias coronarianas (JOICHEM et al., 1972; KRAMSCH et al., 1981) e aumento do fluxo sanguíneo cardíaco e periférico (RAAB, 1960; BOYER & KASCH, 1970; MONTOYE et al., 1972). Essas alterações garantem melhor perfusão sangüínea para os músculos durante o exercício.

Também são relatadas adaptações bioquímicas no coração como aumento do metabolismo oxidativo do miocárdio, a partir de modificações metabólicas, tais como aumento na atividade de enzimas oxidativas e aumento no número e tamanho das mitocôndrias das células do miocárdio (HOLLOSZY, 1976). Além dos efeitos do condicionamento físico sobre o coração, o treinamento físico também promove adaptações na musculatura periférica que influenciam, indiretamente, no desempenho cardíaco (FORJAZ et al., 1998). Como exemplo, podemos citar redução plasmática de triglicérides, diminuição do LDL-colesterol (STONE et al., 1991; DEPRÉS & LAMARCHE, 1994), aumento da sensibilidade à insulina (LAMPMAN & SCHTEINGART, 1991). A mais relevante, porém, é o aumento do consumo máximo de oxigênio, encontrado tanto em humanos (BLOMQVIST & SALTIN, 1983; HOLLOSZY & COYLE, 1984) como em animais experimentais (SCHAIBLE & SCHEUER, 1979, HASHIMOTO et al., 2011).

Os benefícios cardiovasculares, metabólicos e autonômicos como efeito

agudo e crônico do exercício, estimularam investigadores a sugerir o treinamento físico aeróbio como conduta não farmacológica importante no tratamento de diversas patologias, dentre elas a hipertensão arterial e a insuficiência cardíaca (TIPTON, 1991, JENNINGS et al., 1986).

Adaptações positivas decorrentes do treinamento físico conduziram a sua utilização como parte importante no tratamento de diversas doenças crônico-degenerativas. Resultados relevantes alcançados em pacientes hipertensos mostraram que o exercício físico para a maioria dos pacientes, leva à diminuição da pressão arterial e, em alguns casos, até a suspensão de medicamentos, reduzindo, portanto, o ônus para os órgãos de saúde pública e os efeitos colaterais decorrentes do tratamento medicamentoso (FAGARD, 2005). Atualmente, a inatividade física em portadores de doenças cardiovasculares não é só desnecessária como também indesejável, sendo que no ambiente clínico, o exercício físico tornou-se uma ferramenta extremamente útil tanto para diagnóstico como também sendo uma das principais prescrições não farmacológicas na rotina terapêutica (SILVA et al., 2002; PITSAVOS et al., 2008).

2.2. Hipertrofia cardíaca

O termo hipertrofia cardíaca refere-se ao aumento da massa do miocárdio. É uma resposta adaptativa a uma sobrecarga fisiológica ou patológica. Essa adaptação ocorre como uma resposta do coração a uma sobrecarga de trabalho podendo ser classificada como concêntrica ou excêntrica.

Como efeito do treinamento físico, também se observa o aumento de massa cardíaca em resposta a sobrecarga de trabalho nas sessões de exercício (BARBIER et al., 2006; CARREÑO et al., 2006). Esta hipertrofia é um mecanismo fisiológico

compensatório, caracterizado principalmente pelo aumento do comprimento e diâmetro dos cardiomiócitos, desta forma sendo responsável pela manutenção da tensão na parede ventricular em níveis fisiológicos (COLAN, 1997; URHAUSEN & KINDERMANN, 1999).

Atletas de *endurance* desenvolvem hipertrofia cardíaca do tipo excêntrica, em decorrência da sobrecarga de volume, ou seja, aumento da pré-carga devido ao aumento do retorno venoso durante as sessões de exercício, o que gera um elevado pico de tensão diastólica, induzindo ao crescimento dos cardiomiócitos. Neste, ocorre adição em série dos novos sarcômeros, e conseqüente aumento em seu comprimento pelo aumento no número das miofibrilas, para normalizar o estresse na parede do miocárdio levando a um aumento da cavidade do ventrículo esquerdo (VE). A cavidade aumentada por sua vez, eleva a tensão sistólica, o que estimula o crescimento dos miócitos, pela adição de novos sarcômeros em paralelo, aumentando também a espessura da parede do VE de forma compensatória. Como conseqüência, a relação entre a parede ventricular e raio do VE permanece inalterada (COLAN, 1997).

Por outro lado, a hipertrofia cardíaca concêntrica desenvolvida por atletas que realizam treinamento resistido dinâmico ou isométrico é caracterizada por uma cavidade do VE de tamanho normal e por um espessamento da parede do VE e septo. Essa alteração é decorrente do aumento no diâmetro dos miócitos, pela adição de novos sarcômeros em paralelo como resposta a essa sobrecarga hemodinâmica (FLECK, 1988, COLAN, 1997; GROSSMAN et al., 1975; SHAPIRO, 1997). Tanto atletas como animais experimentais que realizam esse tipo de treinamento desenvolvem um aumento predominante da espessura da parede ventricular esquerda sem alteração no tamanho da cavidade. Esta hipertrofia é

caracterizada pelo aumento da razão entre a espessura da parede e do raio do VE (COLAN, 1997; PLUIM et al., 2000; BARAUNA et al., 2007).

A hipertrofia cardíaca patológica é um dos fatores de risco mais importantes para a morbimortalidade por doenças cardiovasculares e está associada a quadros caracterizados por sobrecarga de pressão ou de volume imposta ao coração (KRIEGER, 1995; CHRISTIAANS et al., 2009; LEVY et al., 1990), onde o aumento de sobrecarga de pressão pode ser decorrente de processos patológicos, como a hipertensão arterial. Geralmente, esse tipo de hipertrofia é do tipo concêntrica, pois há diminuição dos diâmetros da câmara ventricular, além do espessamento da parede ventricular. No infarto do miocárdio, por exemplo, a região do músculo cardíaco saudável assume maior trabalho, devido à morte celular na região infartada. A resposta inicialmente é adequada, mas, gradualmente, evolui para disfunção do órgão culminando na insuficiência cardíaca (RUBIN; FISHBEIN; SWAN, 1983).

Estudos longitudinais surgiram para melhor entender e avaliar os efeitos da hipertrofia ventricular esquerda sobre a incidência de eventos cardiovasculares e mortalidade.

A partir do estudo Framingham, Levy e colaboradores (1994) observaram que o aumento do risco de doenças cardiovasculares estava associado a alterações eletrocardiográficas de pacientes hipertensos. Kannel (1977) descreve que os indivíduos com hipertrofia cardíaca diagnosticada por alterações eletrocardiográficas possuíam seis vezes mais chances de mortalidade. Além disso, esses pacientes também apresentavam maiores riscos de angina, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca congestiva e morte súbita.

Desta forma, a hipertrofia pode aumentar em muitas vezes os riscos e os eventos cardiovasculares pelo aumento da demanda de oxigênio do tecido miocárdico hipertrofiado. Isto aumentaria a prevalência e a severidade de arritmias ventriculares, por fim levando a alterações na contratilidade miocárdica e conseqüente prejuízo da função cardíaca (MACMAHON et al., 1989). Também há confirmação da correlação entre o aumento da massa ventricular esquerda e o risco aumentado de morbidade cardiovascular e mortalidade a partir de vários estudos ecocardiográficos (CASALE et al., 1986; LEVY et al., 1990; KOREN et al., 1991; GHALI et al., 1992).

A utilização de modelos animais permitiu, nos últimos anos, um melhor entendimento da fisiopatologia de diferentes doenças cardiovasculares como a hipertensão arterial, hipertrofia insuficiência cardíaca. Isto porque possibilita o estudo da evolução de doenças desde seus estágios iniciais, a partir da investigação dos mecanismos envolvidos e dos efeitos de diferentes intervenções, incluindo drogas. No decorrer dos anos houve o desenvolvimento de vários modelos experimentais de hipertensão, a fim de encontrar o modelo mais similar à doença que ocorre em humanos, tanto no perfil agudo como crônico, nos quais fosse possível a medida de parâmetros hemodinâmicos, cardíacos e bioquímicos, e que também atendessem às necessidades econômicas e de bem estar do animal.

Os ratos espontaneamente hipertensos (SHR), modelo genético de hipertensão experimental espontânea, seguramente é o modelo que mais se assemelha à hipertensão primária no homem (TRIPPODO & FROHLICH, 1981 apud BING et al., 1995). Isto porque apresenta respostas hemodinâmicas e endócrinas semelhantes as do homem com hipertensão essencial (SEALS et al., 1994). Sharma e colaboradores (1985) afirmam que este modelo de hipertensão tem uma

vantagem sobre os outros, pois apresenta um aumento gradual da pressão arterial. A hipertrofia ventricular esquerda é descrita em grande parte dos trabalhos como uma compensação que ocorre em primeiro momento para manter a função do ventrículo esquerdo (FERRONE et al., 1979; PFEFFER et al., 1978 e 1979 apud SHARMA et al., 1985) e a mecânica miocárdica (SHARMA et al., 1985). Esse ajuste estrutural é responsável pela manutenção da função cardíaca, apesar da elevada pressão arterial sistêmica (ADAMS; BOBIK; KORNER, 1989; CICOGNA et al., 1997). Entretanto, o aumento crônico da pressão arterial está associado a um prejuízo da função cardíaca em longo prazo, culminando na insuficiência cardíaca que pode ser observada nesses animais em idades mais avançadas (KANDEL, 1977).

Estudos realizados em animais demonstram na hipertrofia cardíaca patológica, padrões de expressão gênica característicos, incluindo a re-expressão de genes do período fetal como alfa actina esquelética (α -actina-esquelética) no ventrículo, além de mudanças na composição das proteínas contráteis do ventrículo como aumento da fração de miosina de cadeia pesada de tipo beta (β -MCP) determinando alterações na capacidade contrátil do miocárdio, podendo levar à diminuição na velocidade de encurtamento dos sarcômeros, observada no miocárdio hipertrofiado. Além de alteração na expressão de proteínas contráteis, a hipertrofia cardíaca patológica é também caracterizada por alterações na expressão de genes de proteínas não contráteis, como fator natriurético atrial (ANP), genes relacionados com o metabolismo energético (subunidade M da lactato desidrogenase e subunidade β da creatina quinase) e da enzima conversora da angiotensina I (ECA) (BING et al., 2002; IEMITSU et al., 2003).

Por outro lado, todas essas alterações mencionadas acima, não são encontradas em situações de hipertrofia cardíaca fisiológica induzida pelo

treinamento físico aeróbio (OLIVEIRA & KRIEGER, 2002; HASHIMOTO et al., 2007; SOCI et al., 2011) ou mesmo de força (BARAÚNA et al., 2007).

Iemitsu e colaboradores (2003) compararam a hipertrofia cardíaca desenvolvida em animais SHR com animais normais treinados e demonstraram diferenças na expressão gênica de enzimas relacionadas ao metabolismo energético do miocárdio. Esses dados mostraram diferenças metabólicas entre a hipertrofia cardíaca patológica dos SHR e a fisiológica induzida pelo treinamento físico aeróbio podendo interferir na função cardíaca.

Embora um estudo tenha mostrado que o exercício excessivo pode agravar o quadro de remodelamento cardíaco patológico em ratos hipertensos (SCHULTZ, 2007), outros estudos realizados em animais SHR submetidos a treinamento físico demonstram diminuição na perda de cardiomiócitos, melhor vascularização e menor índice de fibrose (MARQUES, 2006). Garcarena e colaboradores (2009) demonstraram em ratos SHR que o treinamento físico de natação é capaz de converter a hipertrofia cardíaca patológica em fisiológica restabelecendo o desempenho cardíaco através da redução de fibrose e aumento da capilarização no coração, também demonstrou que esse fenômeno estava associado com a redução de vias de sinalização intracelular relacionadas com processos patológicos como a calcineurina e caspase-3 e aumento da expressão de proteínas responsáveis pela liberação e re-captção de cálcio intracelular. Essas evidências indicam que a associação do treinamento físico ao quadro patológico gerado pela hipertensão arterial pode nos trazer respostas importantes sobre os pontos chave que diferem a hipertrofia cardíaca fisiológica da patológica, além dos mecanismos de reversão desta última. Recentemente, uma nova classe de reguladores da expressão gênica, os microRNAs, vem sendo mostrados como importantes fatores na regulação gênica

da hipertrofia cardíaca fisiológica e patológica (VAN ROOIJ et al., 2006; VAN ROOIJ et al., 2007, VAN ROOIJ; MARSHALL; OLSON, 2008; VAN ROOIJ et al., 2008, SOCI et al., 2011; FERNANDES et al., 2011).

2.3. MicroRNAs

Os microRNAs (miRNAs) são moléculas de ácido ribonucléico (RNA) fita simples com um tamanho entre 19 e 25 nucleotídeos, não codificadores de proteínas e que atuam como potentes reguladores pós-transcricionais da expressão gênica tanto em plantas quanto em animais (KIM, 2005).

Lin-4 (do inglês *lineage-deficient-4*) foi descoberto em 1993 como o primeiro miRNA (Figura 1), sendo nesta época associado à regulação do desenvolvimento larval em *C. elegans* (LEE et al., 1993). A partir desse trabalho se construiu um novo paradigma no que tange os processos de regulação da expressão gênica (AMBROS, 2004; LAU et al., 2001; OLSEN & AMBROS, 1999). A descoberta do segundo miRNA denominado *let-7* ocorreu também em *C.elegans*, somente 7 anos após a descrição do *lin-4* (REINHART et al., 2000). Verificou-se que o *let-7* atuava em nível pós-transcricional e apresentava complementaridade parcial com a região 3' não traduzida (3'-UTR) do RNA mensageiro (RNAm) da proteína *lin-41* (REINHART et al., 2000; LEE & AMBROS, 2001).

Até o momento, mais de 17.000 seqüências de miRNAs de mais de 142 tipos de organismos diferentes foram catalogados no miRBase (<http://www.mirbase.org/>), sendo que 546 miRNAs diferentes foram verificados experimentalmente em humanos, e estudos bioinformáticos estimam que este número supere 1000 miRNAs, constituindo uma das maiores classes de reguladores gênicos (GRIFFITHS-JONES, 2008).

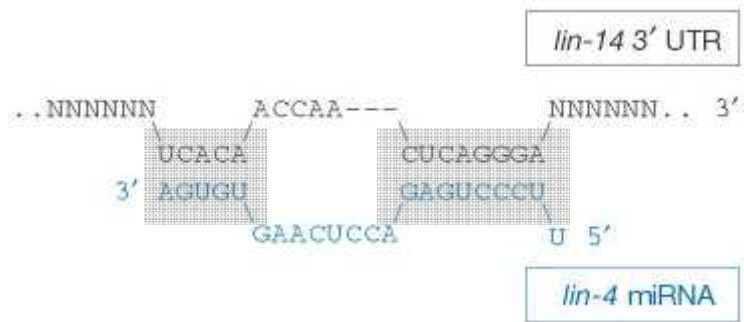


Figura 1 - Pareamento do *lin-4* com a região 3'-UTR do RNAm *lin-14* (AMBROS, 2004).

O interesse da comunidade científica pelos miRNAs ocorreu somente quando estas pequenas fitas de RNA não codificantes para proteínas foram descritas em insetos e mamíferos (LAGOS-QUINTANA et al., 2001; LIM et al., 2003) trazendo a crença de que esse mecanismo de regulação poderia ter um caráter universal e estar envolvido na regulação de importantes funções de células eucarióticas.

2.3.1. Biogênese de microRNAs

O miRNAs são filogeneticamente conservados e codificados por genes que podem estar localizados entre genes codificadores de proteínas (regiões intergênicas) ou ainda em íntrons ou exons desses genes, nesse caso ele passa a ser liberado após a transcrição desse gene em eventos de *splicing* alternativo (Figura 2). Os miRNAs podem ainda, se apresentar isolados ou agrupados em *clusters*, forma também conhecida como policistrônica (revisado por OLENA & PATTON, 2010).

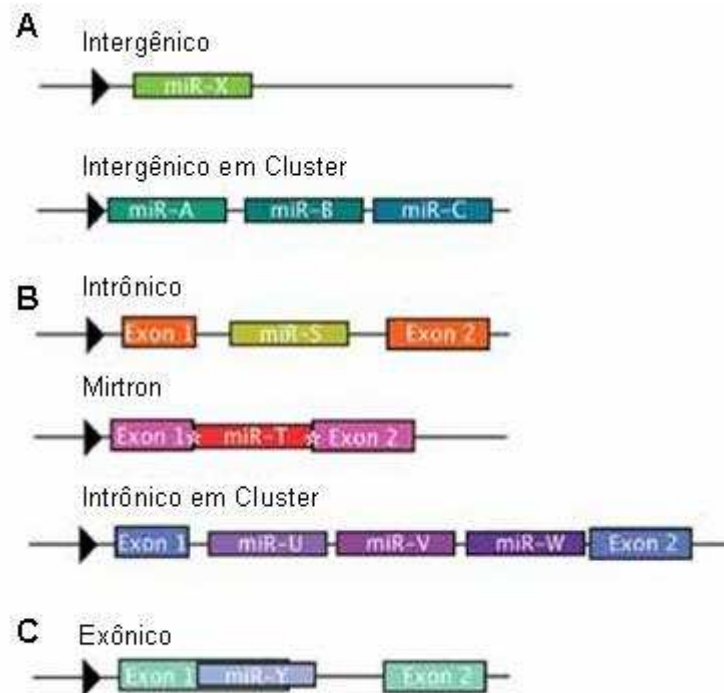


Figura 2 - Localização genômica de miRNAs (adaptado OLENA & PATTON, 2010).

Os miRNAs processados a partir dos íntrons de genes codificadores de proteínas de acolhimento são transcritos pela RNA polimerase do tipo 2. Existem evidências de que miRNAs intergênicos são transcritos da mesma forma, não excluindo a possibilidade de alguns serem transcritos por RNA polimerase do tipo 3 (OHLER et al., 2004). O pri-miRNA é o primeiro transcrito e pode ser bastante longo, com mais de um 1 kilobase (kb), apresentando como os genes codificadores de proteínas, cap 5" e cauda poli A. Após a transcrição do pri-miRNA, o primeiro passo do processo de maturação é a sua clivagem por uma enzima endonuclease do tipo 3 conhecida como Drosha. Essa enzima reconhece formações secundária da molécula em forma de grampo (*hairpins*) clivando próximo à base do mesmo. Após esse ponto o *hairpin* é liberado com aproximadamente 60-70 nucleotídeos denominado pré-miRNA. O pré-miRNA é então, transportado ativamente para o

citoplasma por um transportador dependente de GTP conhecido como Exportina-5 (revisado por BARTEL, 2004).

O corte feito inicialmente pela Drosha, no núcleo celular, define uma das extremidades do miRNA maduro, a outra extremidade é processada no citoplasma por uma outra endonuclease do tipo 3 conhecida como Dicer. A Dicer reconhece a extremidade do pré-miRNA clivado pela *Drosha* e a partir disso cliva a outra extremidade formando uma seqüência dupla fita (revisado por BARTEL, 2004). O produto da Dicer é incorporado a um complexo de proteínas denominado RISC (RNA-induced silence complex). Esse complexo contém uma proteína da família das Argonauta que é o componente responsável pela incorporação do miRNA. Apenas uma das fitas do duplex de miRNA permanece no complexo RISC (Figura 3). A partir desse ponto, o miRNA está funcionalmente ativo para atuar em seu RNAm alvo (SCHWARZ et al., 2003).

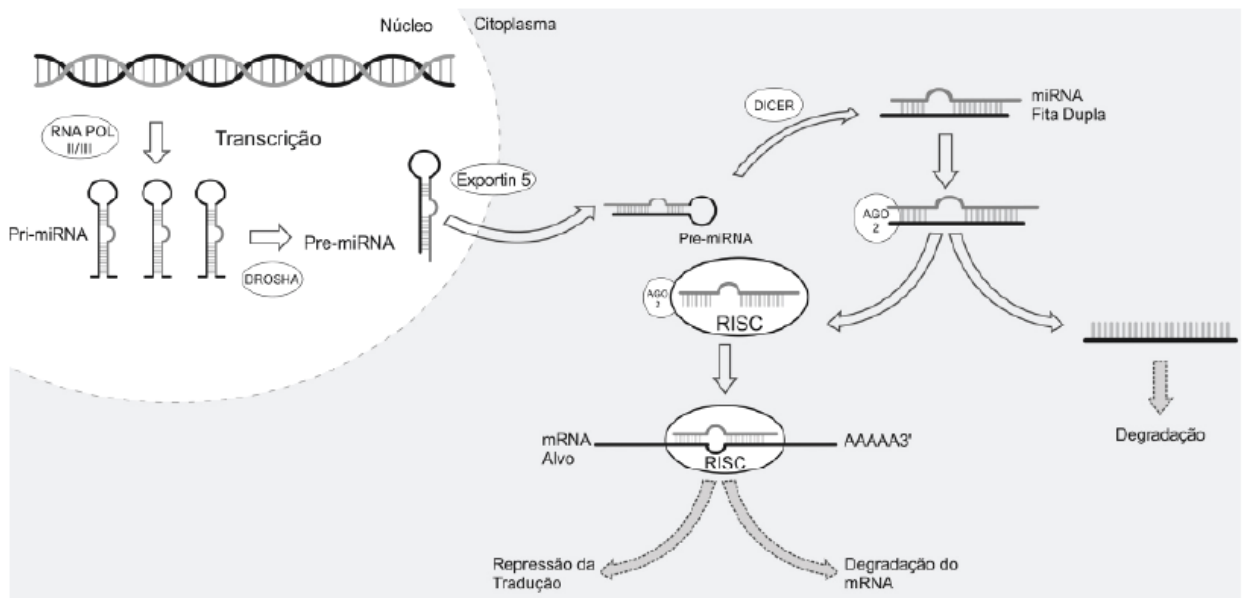


Figura 3 - Etapas do processamento de microRNAs (adaptado BARTEL, 2004).

2.3.2. Mecanismo de ação

Os miRNAs exercem seus efeitos regulatórios ligando-se à região 3'-UTR do RNAm-alvo. Este mecanismo de atuação permite a redução dos níveis protéicos de seus genes-alvo, raramente afetando o nível de expressão transcricional (KIM, 2005).

A regulação pós-transcricional exercida pelos miRNAs na região 3' não traduzida depende do grau de complementaridade com o RNAm-alvo, podendo ocorrer por inibição traducional ou degradação do RNAm. O pareamento de modo imperfeito com o RNAm acarreta a inibição traducional do alvo, sendo o mecanismo principal de atuação dos miRNAs em mamíferos. Em função de os miRNAs possuírem seqüências pequenas e agirem sem a necessidade de pareamento completo, um único miRNA pode regular muitos RNAm-alvo, além de cooperarem no controle de um único RNAm. Evidências indicam que um único miRNA possa regular até 200 RNAs apresentando funções totalmente diversas. Desta forma, os miRNAs constituem uma enorme e complexa rede regulatória da sinalização celular (BRENNECKE, 2005).

Em plantas, a regulação dos miRNAs ocorre principalmente através de sua interação perfeita com o RNAm, levando-o à degradação (mecanismo de iRNA). No entanto, já se têm exemplos da ocorrência deste silenciamento gênico também em mamíferos (VALENCIA-SANCHES, 2006; HAMMOND, 2005).

Apesar de não terem suas funções totalmente esclarecidas, a descoberta dos miRNAs atraiu a atenção da comunidade científica pelas evidências sugestivas de que estas moléculas apresentam papel fundamental em diversos processos biológicos. Em mamíferos, miRNAs foram associados à regulação da proliferação, apoptose, diferenciação celular, hematopoiese, secreção de insulina e outros

hormônios, além de atuar no desenvolvimento e funcionamento muscular esquelético e cardíaco (THUM, 2008, CHENG, 2005 ; ESAU, 2004). Esses estudos enfatizam a importância destas moléculas nos processos biológicos ao relatar alterações na expressão dos miRNAs em diferentes patologias humanas.

Algumas questões têm sido levantadas a respeito da participação dos miRNAs no processo de hipertrofia cardíaca patológica e fisiológica. Van Rooij e colaboradores (2006) mostraram evidências que alterações na expressão de miRNAs no coração está diretamente ligada ao remodelamento cardíaco. Os autores mostraram estas evidências em um modelo de hipertrofia cardíaca patológica através de constrição transversa da aorta onde mais de 180 miRNAs foram analisadas. Nesse estudo, observou-se uma grande alteração na expressão de um grupo específico de miRNAs. Análises *in vitro* mostraram que a miR-23a, miR-23b, miR-24, miR-195, miR-199a e miR-214 são suficientes para induzir a hipertrofia em cardiomiócitos. Em contraste, o miR-150 e miR-181b, que se mostraram diminuídos no modelo, quando eram aumentados artificialmente *in vitro* promoviam a diminuição do tamanho do cardiomiócito.

Outro fato importante foi observado com o miR-208, esse microRNA é codificado no intron 27 do gene da miosina de cadeia pesada do tipo alfa (α -MCP) (VAN ROOIJ & OLSON, 2007). Um estudo mostrou uma relação direta na expressão de α -MCP com o miR-208 e inversamente proporcional a β -MCP. A deleção do gene do miR-208 em camundongos mostrou que este microRNA atua diretamente no bloqueio pós-transcricional da β -MCP, exercendo papel fundamental na manutenção da função cardíaca (VAN ROOIJ & OLSON, 2007).

Apesar de promissores, poucos estudos foram publicados sobre o papel dos miRNAs na hipertrofia cardíaca patológica. Drummond e colaboradores (2008)

investigou a expressão de miRNAs em resposta ao exercício físico, porém se limitou à musculatura esquelética. Recentemente, nós demonstramos que o treinamento físico de natação em modelo experimental é capaz de modular positivamente miRNAs envolvidos em processos cardíacos patológicos (SOCl et al., 2011). No presente estudo, avaliamos pela primeira vez o efeito do treinamento físico aeróbio na modulação cardíaca de miRNAs em animais SHR com hipertensão arterial já estabelecida.

3. OBJETIVOS

3.1. Gerais

O objetivo do presente estudo é analisar os efeitos do treinamento físico aeróbico sobre a expressão de miRNAs no coração em ratos espontaneamente hipertensos, conduzindo a uma possível melhora do quadro patológico apresentado na hipertensão arterial.

3.2. Específicos

Avaliar o efeito do treinamento físico aeróbico de natação em SHR sobre:

- O comportamento da pressão arterial e da frequência cardíaca no repouso através de medida indireta (plestimografia de cauda);
- A capacidade aeróbica através do teste de capacidade máxima de realização de esforço;
- A expressão de miRNAs através da técnica de *Microarray* e aqueles que apresentarem alteração no SHR e reversão com treinamento físico serão confirmados por Real Time-PCR;
- A expressão dos miRNAs 1, 133a, 133b, 208 e 29c, os quais previamente sabemos que podem estar envolvidos no processo de hipertrofia cardíaca.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais experimentais

Foram utilizados ratos machos espontaneamente hipertensos (SHR) com 12 semanas de vida, em que o quadro de hipertensão arterial já está estabelecido e ratos machos Wistar Kyoto (WKY) como controles do SHR. Os ratos pesavam entre 220 e 250 g no início do protocolo. Eles foram mantidos em gaiolas com 3 a 4 ratos, em local com temperatura ambiente entre 22-24°C e luz controlada em ciclo invertido de 12 horas (claro-escuro), alimentados com ração e água à vontade. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da EEFÉ-USP sob o protocolo 2009/22.

4.2. Grupos experimentais

Os animais foram sub-divididos em 3 grupos:

- ratos Wistar Kyoto (WKY-S; n=7);
- ratos espontaneamente hipertensos (SHR-S; n=7);
- ratos espontaneamente hipertensos treinados (SHR-T; n=7).

4.3. Protocolo de treinamento físico aeróbico.

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

O protocolo utilizado é caracterizado como treinamento de intensidade moderada e longa duração, sendo efetivo na promoção de adaptações cardiovasculares e no aumento da capacidade oxidativa muscular. Os animais foram identificados e pesados semanalmente, para a correção da sobrecarga em função

do aumento do peso corporal. O treinamento foi realizado com um sistema de natação para ratos, com água aquecida a 30-32° C. Durante o período de treinamento os animais foram submetidos, semanalmente, a análises hemodinâmicas. No início e ao término do protocolo de treinamento, os animais foram submetidos ao teste máximo de esforço e, posteriormente, foram sacrificados por decapitação e as amostras necessárias coletadas e armazenadas adequadamente para análises.

4.4. Avaliação hemodinâmica: pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) de repouso

A PA foi acompanhada semanalmente por pletismografia de cauda (sistema da KENT SCIENTIFIC (RTBP1001 rat tail blood pressure system for rats and mices, Litchfield, USA) nos 3 grupos de animais. Os animais foram previamente adaptados ao sistema e no momento dos testes, estavam acordados, em repouso e eram mantidos sob restrição de movimentos para que as medidas fossem realizadas.

O equipamento de registro da PA consiste em um manguito de borracha que é adaptado na região proximal da cauda, que está ligado ao pletismógrafo para insuflar e desinsuflar 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 pressão arterial 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 1000 Hz.

Este método de medida indireta da pressão arterial permite quantificar a pressão arterial e frequência cardíaca no início e após o protocolo de treinamento.

4.5. Protocolo de avaliação de esforço físico máximo

Para realização do protocolo de avaliação do esforço físico máximo, os animais dos 3 grupos (WKY-S, SHR-S e SHR-T) foram colocados individualmente em uma caixa de acrílico hermeticamente fechada (exceto pela entrada e saída de ar, sendo este, totalmente direcionado para o equipamento de análise) com uma esteira rolante em seu interior.

Imediatamente após o posicionamento do animal e estabilização do ambiente, foi iniciado o teste de esforço, que constitui em um protocolo escalonado com incrementos de velocidade de 3m/min a cada 3 min, até que seja atingida a velocidade máxima suportada pelos animais. O critério para a determinação da exaustão do animal e interrupção do teste é o momento em que o rato não for mais capaz de correr dentro da caixa mediante o incremento de velocidade da esteira.

Esta avaliação foi feita antes e após o período de treinamento, para comparar a resposta de desempenho do animal entre os grupos. Por não ser a modalidade específica a qual os animais foram submetidos durante o treinamento, o teste em esteira permite que se avalie a capacidade aeróbia sem a influência da aprendizagem, já que os animais treinados tiveram o mesmo tempo de prática em esteira que os animais sedentários.

4.6. Coleta das amostras de tecido

Após 24 horas das medidas ecocardiográficas, de pressão arterial e da frequência cardíaca e 48 horas da última sessão de exercício, os animais foram decapitados e o coração coletado separado o ventrículo esquerdo e retirado uma amostra para análise histológica a partir de um corte transversal na altura do músculo papilar, esta foi fixada em fomalina tamponada (4%) para posterior

processamento histológico. O restante foi armazenado em tubos de polietileno, os quais foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e mantidos congelados no Freezer a -70°C até serem feitas as análises moleculares.

4.7. Análise histológica

Após 48 horas de fixação, o ventrículo esquerdo foi submetido ao processamento para análise histológica, com cortes de quatro microns e coloração por hematoxilina-eosina. A análise realizada que consistiu na determinação do diâmetro dos cardiomiócitos, para isso foi utilizado um sistema computadorizado (LEICA QUANTIMET 500) acoplado a um microscópio óptico com aumento de 400x. Foram selecionados dez campos onde os cardiomiócitos estavam em corte longitudinal. Foi feita a medida de dez a vinte cardiomiócitos por campo sendo utilizada a média total dos campos como medida por animal.

4.8. Expressão gênica

Para as análises de expressão gênica, o RNA total do ventrículo esquerdo foi isolado em 1 ml de Trizol (Invitrogen), conforme indicação do fabricante e armazenado a -70°C .

As amostras de RNA foram diluídas na proporção de 1:100 em água, e analisadas por espectrofotometria em 260 a 280nm.

4.8.1. MicroRNA *Microarray*

O *Microarray* foi baseado no sistema *Sanger miRBase Release 10.1* e realizado pela LC Science companhia. Esse método permite a análise simultânea de

349 miRNAs, possibilitando a determinação de perfil de expressão nos diferentes modelos.

4.8.2. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real Time-PCR)

O ensaio da análise da expressão gênica foi feito para confirmar os miRNAs identificados com expressão alterada pelo *Microarray*, além dos previamente estabelecidos como importantes para adaptações cardíacas: miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-208 e miR-29c. Para isto, foi utilizado o kit Taqman MicroRNA Assays (Applied Biosystems) seguindo as indicações do fabricante. Nesse ensaio, a quantificação da expressão gênica é feita em dois passos: o primeiro passo é a transcrição reversa, o DNA complementar específico (cDNA) é obtido através da transcrição reversamente da amostra de RNA total utilizando um *primer* específico para o miRNA analisado do tipo *stem-loop* e TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit. O segundo passo é a reação de Real Time-PCR, os produtos de PCR são amplificados da amostra de cDNA obtida anteriormente, utilizando TaqMan® MicroRNA Assay e TaqMan® Universal PCR Master Mix II. Foi utilizado como controle normalizador o U6 snRNA sendo este, feito na mesma placa de cada miRNA testado.

As análises foram feitas em equipamento ABI 7500 Real Time-PCR Systems (Applied Biosystems).

4.9. Análise Bioinformática

As análises de bioinformática foram feitas com a utilização do aplicativo mirPath (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/pathways/>), uma ferramenta computacional que utiliza base de dados como TargetScan 5.1 para avaliar a possibilidade de

atuação múltipla dos miRNAs selecionados em vias celulares, esse aplicativo é capaz de prever vias de sinalização celular potencialmente reguladas por miRNAs (PAPADOPOULOS et al., 2009).

4.10. Análise Estatística

Os dados foram analisados utilizando a análise de variância ANOVA de dois caminhos para medidas pré e pós e análise de variância ANOVA de um caminho para medidas pós. Utilizou-se teste de Duncan como *pos-hoc* (Statistica software, SigmaStat 3.5, Dundas Software LTDA., Alemanha).

Para todos os experimentos foi adotado um valor de significância $p < 0,05$ e todos os resultados foram apresentados na forma de média \pm erro padrão.

5. RESULTADOS

5.1. Evolução do Peso Corporal

A Figura 4 mostra a evolução do peso corporal (PC) dos grupos: WKY-S, WKY-T, SHR-T ao longo das 10 semanas de protocolo de treinamento físico aeróbio. Não houve diferença do peso corporal no início do protocolo entre os grupos, entretanto observou-se após a 6ª semana uma diminuição do peso corporal no grupo treinado (SHR-T) em comparação aos grupos sedentários (WKY-S e SHR-S), sendo esta diferença mais proeminente ao final do estudo.

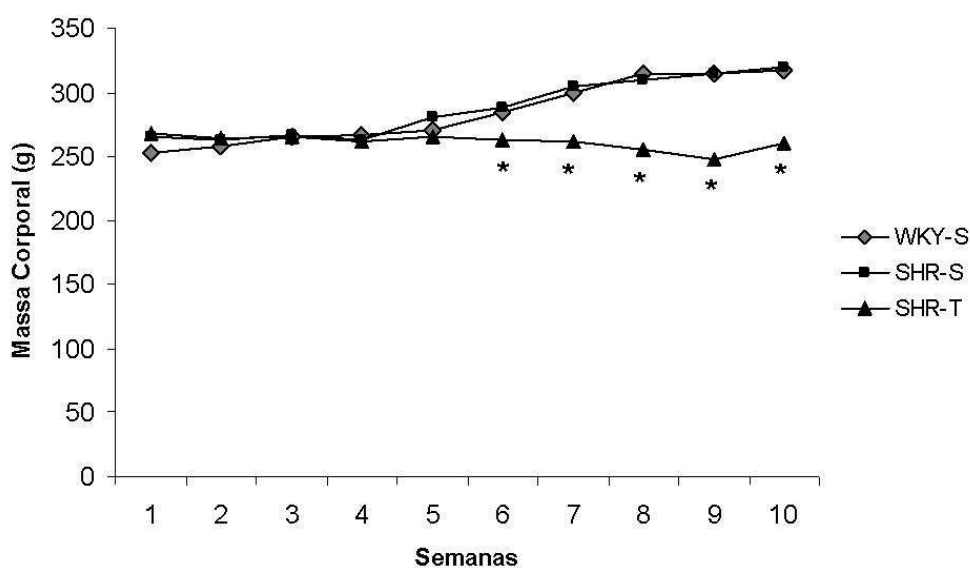
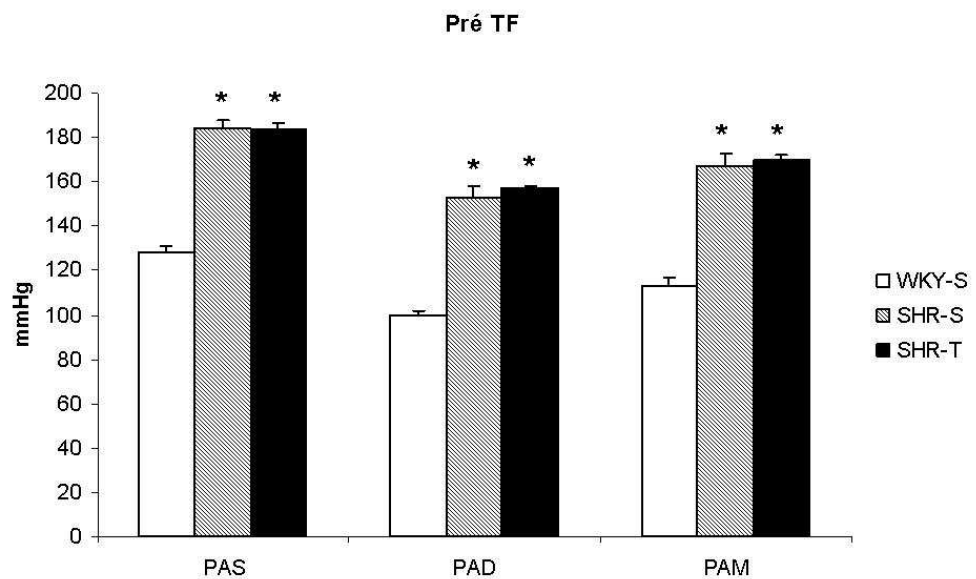


Figura 4 - Evolução temporal do peso corporal ao longo de dez semanas de treinamento de natação. Os dados foram analisados pela análise de variância de dois caminhos (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan: diferença significativa (*) comparado ao WKY-S e SHR-S no mesmo período.

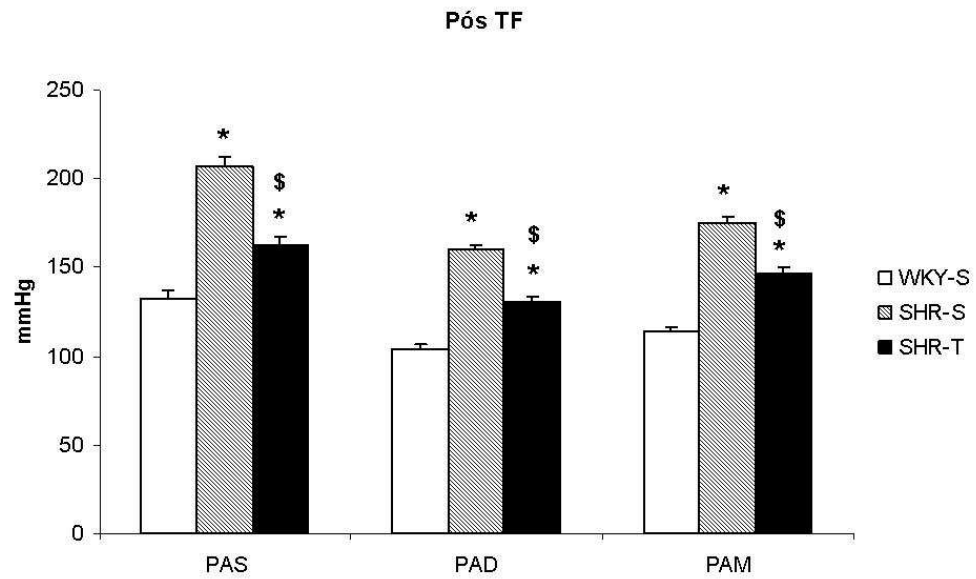
5.2. Pressão Arterial (PA) e Frequência Cardíaca (FC)

Os valores de pressão arterial e frequência cardíaca estão representados na Figura 5. No início do protocolo de treinamento físico observou-se o estabelecimento da hipertensão nos animais SHR (SHR-S: 184 ± 4 e SHR-T: 183 ± 3 mmHg) comparados ao grupo controle normotenso (WKY-S: 128 ± 3 mmHg), não havendo diferença da FC entre os três grupos (Figura 5A). Entretanto, ao término do protocolo, representado pela Figura 5B, observa-se que o TF de natação de baixa intensidade e longa duração foi eficaz em reduzir a pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) do grupo SHR-T (PAS: 162 ± 4 ; PAD: 131 ± 2 ; PAM: 147 ± 4 mmHg) comparado ao grupo SHR-S (PAS: 207 ± 5 ; PAD: 160 ± 3 ; PAM: 175 ± 4 mmHg). Também, observa-se na Figura 5C uma redução da FC de repouso no grupo SHR-T, em comparação aos sedentários (WKY-S: 393 ± 12 ; SHR-S: 407 ± 11 ; SHR-T: 339 ± 8 bpm).

A



B



C

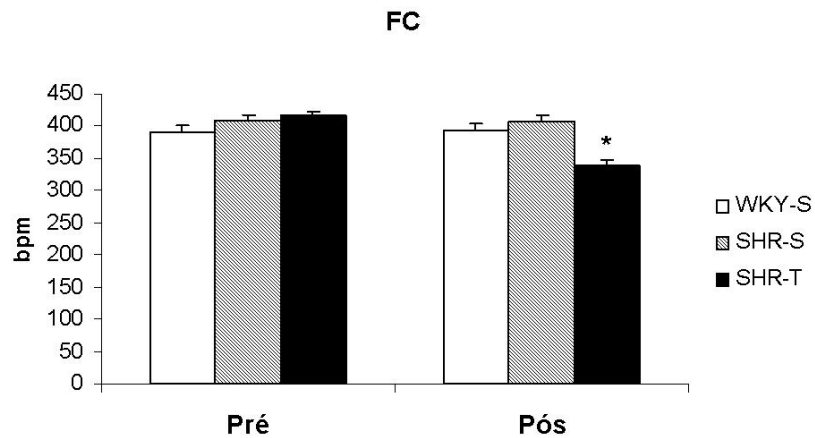
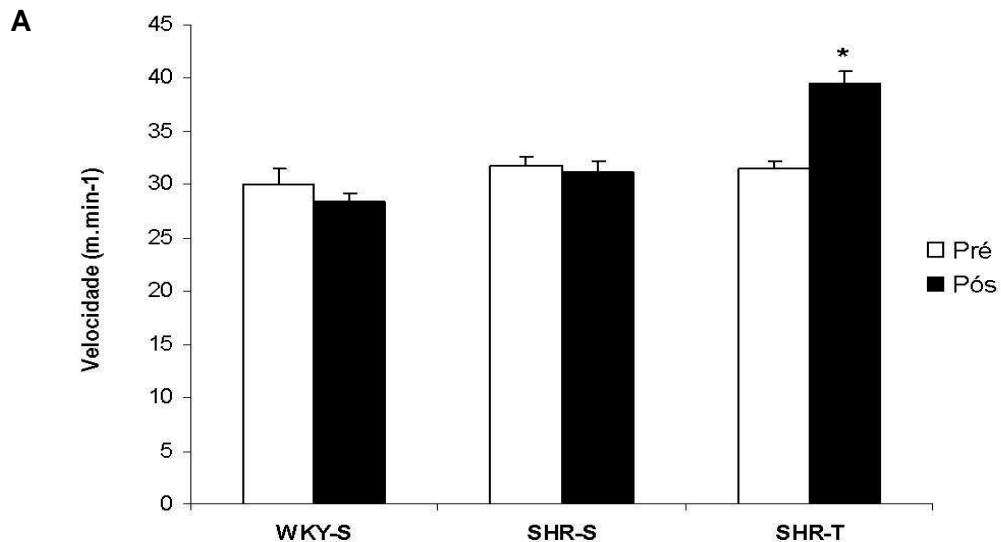


Figura 5 - Pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) representadas em milímetros de mercúrio (mmHg), Início do protocolo de treinamento, Pré TF (Figura A) e final do protocolo, Pós TF (Figura B). Frequência cardíaca (FC) de repouso Pré e Pós TF (Figura C). Grupos WKY-S, $n=7$, SHR-S, $n=7$ e SHR-T, $n=7$. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. Os dados foram analisados pela análise de variância de dois caminhos (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan: diferença significativa (*) comparado ao WKY-S e (\$) comparado com o SHR-S.

5.3. Teste de esforço físico máximo

O teste de tolerância máxima ao esforço foi utilizado para avaliar a eficácia do treinamento físico e foram avaliadas as variáveis: distância percorrida, tempo e velocidade.

As Figuras 6A, 6B e 6C mostram os valores de velocidade, tempo e distância percorrida, respectivamente. No início do protocolo de treinamento (Pré TF) todas as variáveis foram semelhantes entre os grupos. Entretanto, os animais treinados aumentaram significativamente a velocidade (WKY-S: $29 \pm 0,7$; SHR-S: $31 \pm 1,2$; SHR-T: $40 \pm 0,9$ m/min), tempo (WKY-S: $24 \pm 0,4$; SHR-S: $26 \pm 0,9$; SHR-T: $35 \pm 0,6$ min) e distância percorrida (WKY-S: 381 ± 15 ; SHR-S: 449 ± 32 ; SHR-T: 739 ± 37 m) no teste Pós TF.



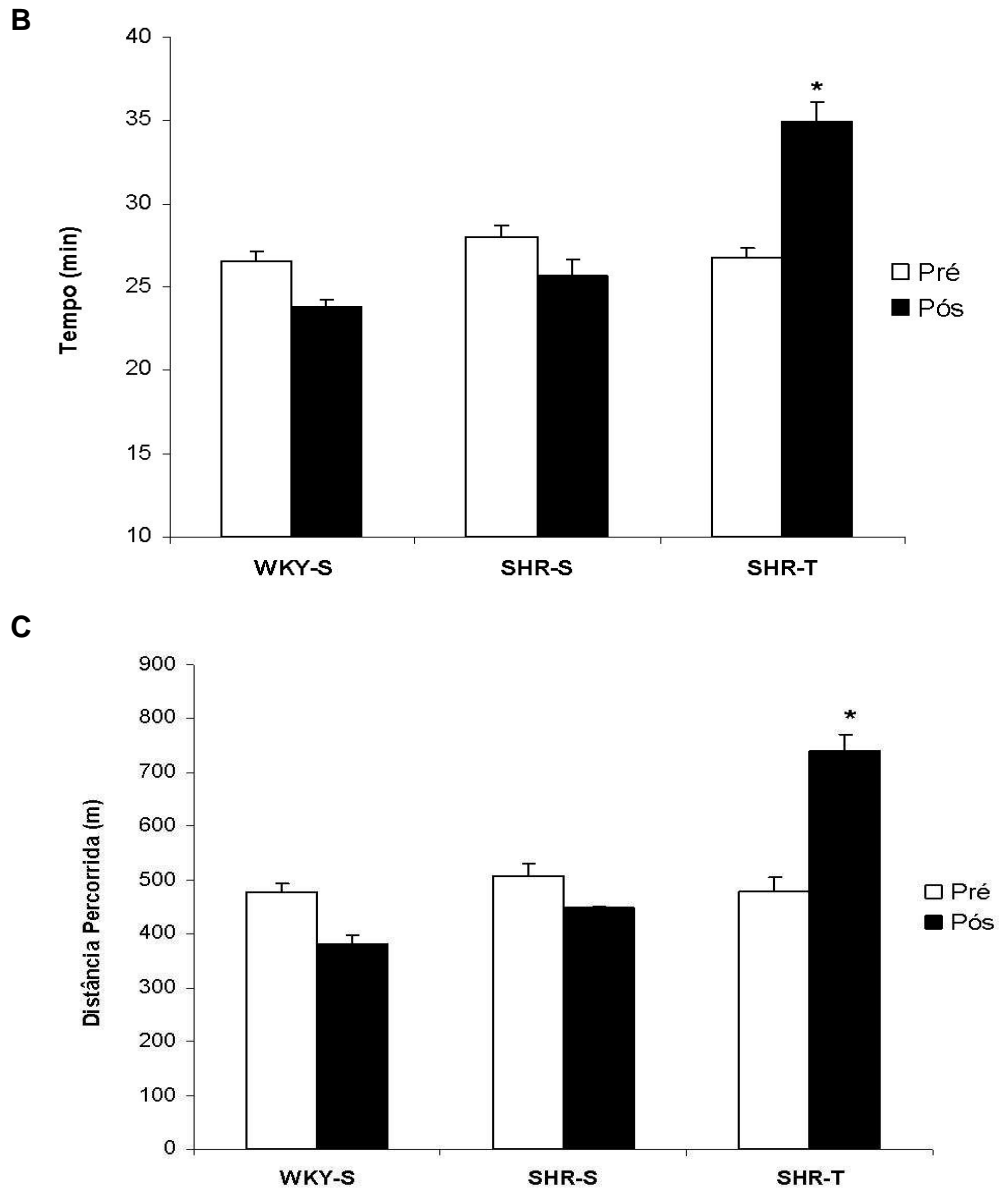


Figura 6 - Teste de máximo de tolerância ao esforço. Velocidade (Figura 6A), Tempo (Figura 6B) e Distância Percorrida (Figura 7C) Pré e Pós TF. Grupos WKY-S, $n=7$, SHR-S, $n=7$ e SHR-T, $n=7$. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. Os dados foram analisados pela análise de variância de dois caminhos (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan: diferença significativa (*) comparado com o WKY-S e SHR-S Pós TF.

5.4. Consumo de Oxigênio

O consumo máximo de oxigênio retrata a capacidade máxima do organismo de extrair oxigênio do ambiente e os valores são expressos em volume máximo de O₂ consumido por minuto por quilograma de peso corporal (VO₂ pico, ml/kg/min). A Figura 7 mostra o VO₂ pico dos animais antes e após o protocolo experimental. No período Pré TF observa-se que todos os grupos tinham o mesmo nível médio de VO₂ pico (WKY-S: 45±4; SHR-S: 44±2; SHR-T: 43±3 ml/kg/min), entretanto Pós TF observa-se a eficácia do treinamento em manter o consumo de oxigênio nos os animais que treinaram (WKY-S: 30±2; SHR-S: 28±1; SHR-T: 45±1 ml/kg/min), desta forma prevenindo a queda observada nos grupos sedentários (WKY-S e SHR-S).

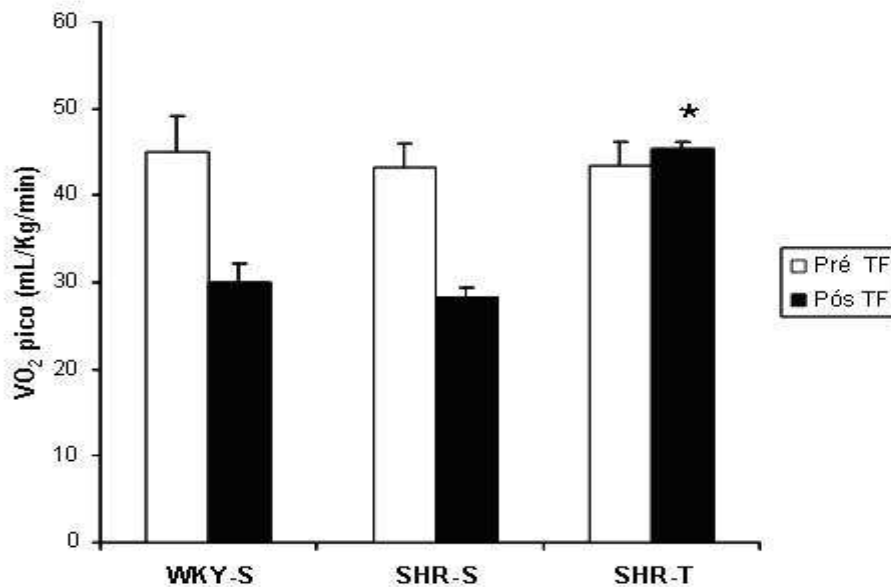


Figura 7 - Consumo de oxigênio pico (VO₂ pico, ml/kg/min) pré e pós treinamento físico. Grupos WKY-S, *n*=7, SHR-S, *n*=7 e SHR-T, *n*=7. Os resultados estão expressos como média ± EPM. Os dados foram analisados pela análise de variância de dois caminhos (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan: diferença significativa (*) comparado com o WKY-S e SHR-S Pós TF.

5.5. Parâmetros Ecocardiográficos

A Tabela 1 mostra os dados obtidos pela análise ecocardiográfica. Foram avaliados parâmetros de função sistólica, função diastólica e parâmetros morfológicos. Os parâmetros funcionais analisados foram: porcentagem de encurtamento do ventrículo esquerdo (PEVE), onda E, onda A e razão E/A e tempo de desaceleração do fluxo diastólico mitral (TDA). Não houve alteração na PEVE entre os grupos, observou-se um aumento da onda E no grupo SHR-T (110 ± 3 cm/s) comparado ao SHR-S (96 ± 6 cm/s) e um aumento da onda A no grupo SHR-S (55 ± 5 cm/s) comparado ao WKY-S (41 ± 3 cm/s) e SHR-T (38 ± 3). Conseqüentemente, a razão E/A estava diminuída no grupo SHR-S e foi normalizada com o treinamento físico.

Tabela 1 - Valores obtidos por análise ecocardiográfica.

Variável	WKY-S (n=06)	SHR-S (n=06)	SHR-T (n=09)
	Média±EP	Média±EP	Média±EP
Parâmetros Funcionais			
PEVE (%)	72±1,2	70±1,8	73±1
Onda E (cm/s)	109±4	96±6	110±3 (\$)
Onda A (cm/s)	41±3,1	55,1±5,4 (*#)	38±3
Razão E/A	3,0±0,3	1,9±0,2 (*)	2,9±0,2 (\$)
TDA(ms)	58±3	35±3 (*)	43±3 (*)
Parâmetros Morfológicos			
AE(cm)	0,65±0,02	0,62±0,04	0,66±0,01
Dd(cm)	0,80±0,011	0,77±0,023	0,77±0,001
Ds(cm)	0,47±0,04	0,49±0,07	0,45±0,02
Epa(cm)	0,15±0,003	0,17±0,006(*)	0,20±0,005(*)
Epp(cm)	0,15±0,005	0,19±0,006(*)	0,19±0,004(*)

PEVE (%), porcentagem de encurtamento do ventrículo esquerdo; TDA, tempo de desaceleração do fluxo diastólico mitral; AE, átrio esquerdo; Dd, diâmetro diastólico do VE; Ds, diâmetro sistólico do VE; Epa, espessura da parede anterior; Epp, espessura da parede posterior. Os dados foram analisados pela análise de variância de um caminho (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan: diferença significativa (*) comparado com o WKY-S e (\$) SHR-S.

Os parâmetros morfológicos avaliados estavam inalterados com relação ao diâmetro do átrio esquerdo e diâmetro diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo. Porém, observa-se um espessamento das paredes anterior e posterior do ventrículo esquerdo nos grupos com hipertensão arterial (SHR), tanto sedentário quanto treinado.

5.6. Massa Cardíaca

A massa cardíaca foi determinada pela medida direta do peso do coração corrigido pelo peso corporal ou pelo comprimento da tibia e também pela medida indireta através da análise ecocardiográfica. Além disso, foi medido o diâmetro dos cardiomiócitos por análise histológica.

As Figuras 8A e 8B apresentam as medidas de peso direto do coração corrigido pelo peso corporal e pelo comprimento da tibia, respectivamente. Observa-se que o grupo hipertenso apresenta aumento da massa cardíaca quando comparado ao grupo normotenso, tanto quando é corrigido pelo peso corporal (WKY-S: $2,23 \pm 0,02$; SHR-S: $2,88 \pm 0,08$; SHR-T: $3,27 \pm 0,2$ mg/g) quanto pelo comprimento da tibia (WKY-S: $81,4 \pm 1,7$; SHR-S: $96,6 \pm 4,4$; SHR-T: $112,2 \pm 2,4$ mg/mm). O mesmo padrão também foi observado nas medidas realizadas pelo exame ecocardiográfico (Figura 8C), embora não tenha sido encontrada diferença significativa no grupo SHR-S em comparação ao WKY-S (WKY-S: $2,87 \pm 0,09$; SHR-S: $3,28 \pm 0,16$; SHR-T: $4,04 \pm 0,11$ mg/g). A Figura 8D apresenta a medida do diâmetro dos cardiomiócitos, observando um efeito hipertrófico no grupo SHR-S em relação ao WKY-S (SHR-S: $19,1 \pm 0,6$ e WKY-S: $15,9 \pm 0,4$ μ m). Esse aumento não foi observado no grupo treinado (SHR-T: $14,2 \pm 0,3$ μ m).

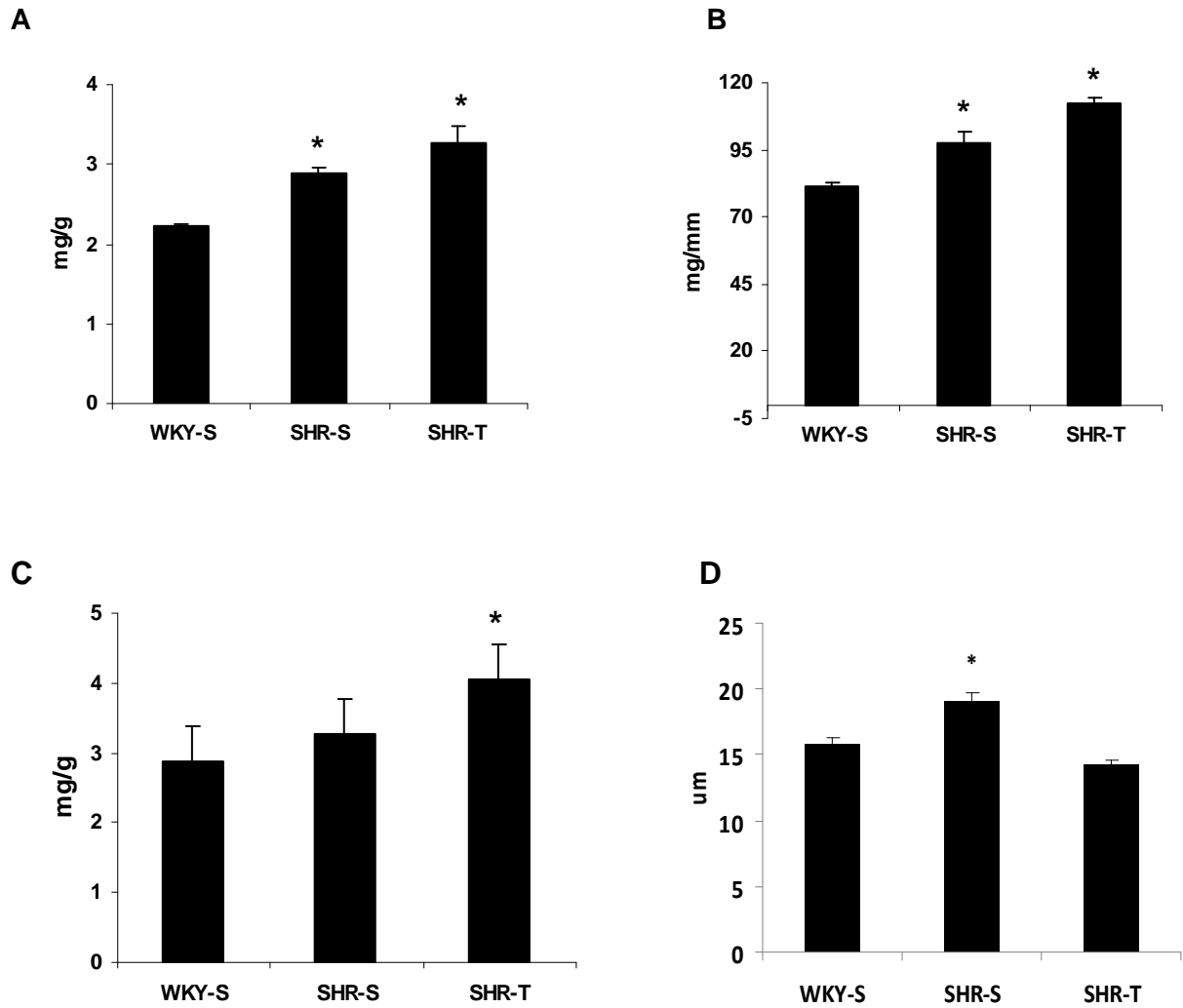


Figura 8 - Massa cardíaca obtida pela pesagem direta do coração corrigida pelo peso corporal (Figura 8A) e pelo comprimento da tíbia (Figura 8B); WKY-S, $n=7$, SHR-S, $n=7$ e SHR-T, $n=7$. Massa cardíaca obtida pela análise ecocardiográfica (Figura 8C) e diâmetro de cardiomiócitos (Figura 8D); WKY-S, $n=6$, SHR-S, $n=6$ e SHR-T, $n=9$. Os resultados expressos como média \pm EPM. Os dados foram analisados pela análise de variância de um caminho (ANOVA) com *post-hoc* de Duncan: diferença significativa (*) comparado com o WKY-S.

5.7. Expressão de MicroRNAs

5.7.1. MicroRNA *microarray*

Para avaliar o perfil de expressão gênica de miRNAs nos diferentes grupos, submetemos uma amostra de cada grupo à análise de *microarray*. Inicialmente, foram selecionados os microRNAs com maior expressão no ventrículo esquerdo. Para isto, foram selecionados aqueles com expressão superior 500 unidade arbitrária (u.a.) Vinte por cento do total dos miRNAs apresentou expressão superior a linha corte (68 microRNAs), os quais foram selecionados para análise (Figura 9).

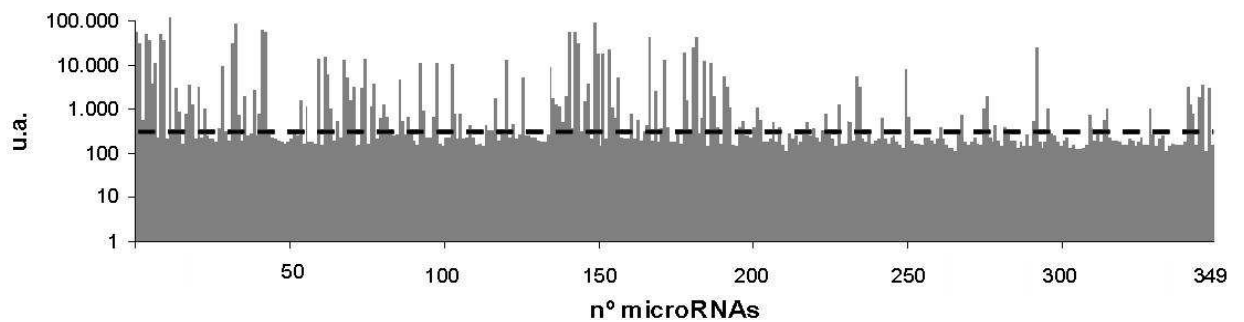


Figura 9 - Perfil de expressão de microRNAs no ventrículo esquerdo. Resultados apresentados em unidade arbitrária (u.a.). Linha tracejada correspondente a 500 u.a.

Os miRNAs que apresentaram expressão absoluta significativa foram analisados em relação aos seus respectivos controle (Figura 10). Para avaliar o efeito da hipertensão arterial na expressão de miRNAs confrontamos o perfil do SHR-S em relação ao WKY-S (SHR-S vs. WKY-S), onde 25 miRNAs apresentaram alteração, sendo 13 aumentados e 12 diminuídos. Já para analisar o efeito do treinamento físico associado à hipertensão arterial, analisamos o grupo SHR-T em relação ao SHR-S (SHR-T vs. SHR-S), destes 22 miRNAs apresentaram alteração, sendo 10 aumentados e 12 diminuídos. Como ponto de corte, para determinar

aqueles miRNAs com expressão alterada, foi utilizada uma diferença superior a 30% para mais ou para menos (expresso em Log_2).

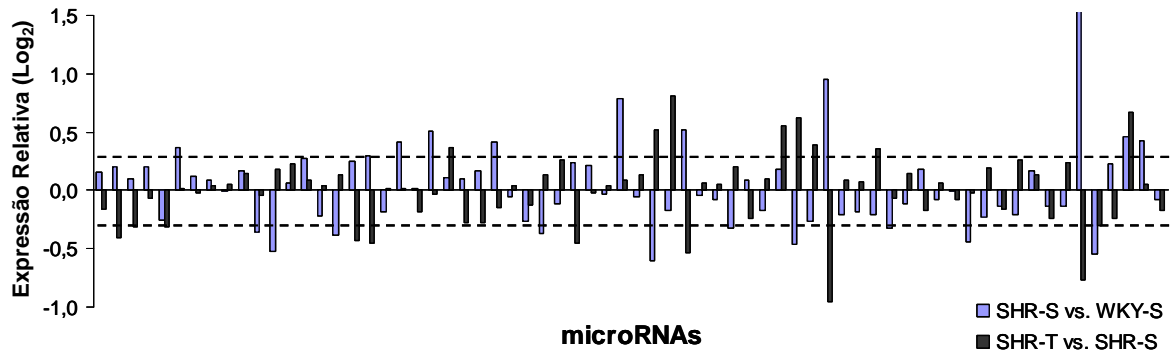


Figura 10 - Expressão diferencial de miRNAs. SHR-S relativo ao WKY-S e SHR-S relativo ao SHR-T. Valores de expressão relativa apresentados em Log_2 .

Diferentes perfis de expressão de miRNAs foram encontrados. Dos treze miRNAs aumentados no grupo SHR-S apenas o miR-98 ampliou sua expressão com treinamento físico (Figura 11A). Por outro lado, observa-se na Figura 11B que sete miRNAs apresentaram aumento no grupo SHR-S, mas não sofreram influência adicional com o treinamento físico (let-7e, miR-15b, miR-145, miR-99a, miR-146b, miR-21 e miR-125b-5p).

Dentre os doze miRNAs diminuídos no grupo SHR-S apenas o miR-499 amplificou sua diminuição com o treinamento físico (Figura 11C). Os miRNAs miR-107, miR-30e, miR-128, miR-185, miR-103, miR-24, miR-30a e miR-181a que estavam aumentados no grupo SHR-S não sofreram efeito do treinamento físico (Figura 7D).

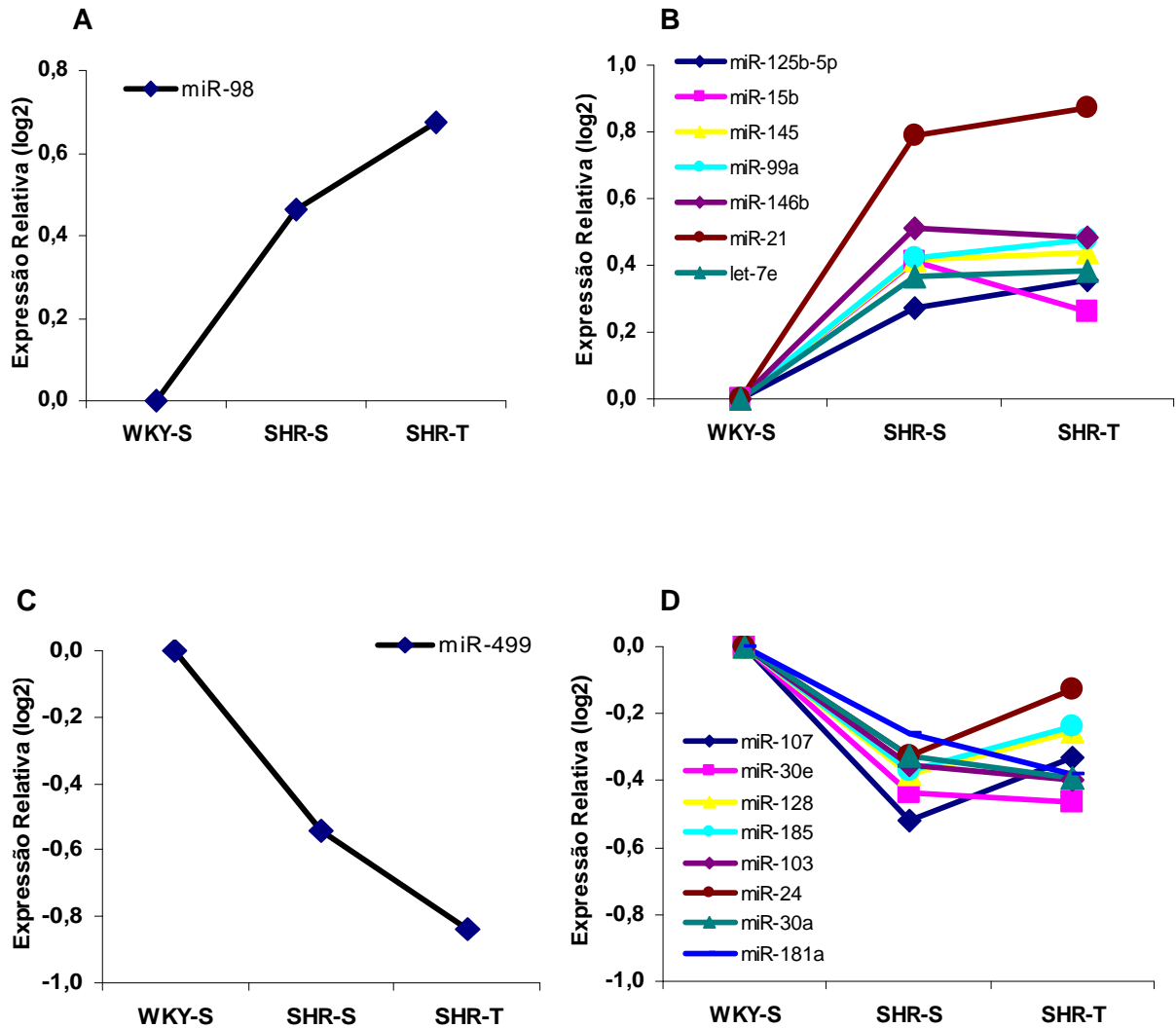


Figura 11 - Perfis de expressão de miRNAs obtidos através da análise de *microarray*. MiRNAs com padrão de expressão ascendente (Figura 11A). MiRNAs com padrão ascendente no grupo SHR-S com estabilização no grupo SHR-T (Figura 11B). MiRNA com padrão de expressão descendente (Figura 11C). MiRNAs com padrão de expressão descendente no grupo SHR-S com estabilização no grupo SHR-T (Figura 11D).

Além dos perfis mostrados anteriormente analisamos os miRNAs que estavam alterados na hipertensão arterial (SHR-S) em pelo menos 30% e que tiveram seu padrão de expressão gênica revertido pelo treinamento físico (SHR-T), esse padrão foi utilizado para selecionar os miRNAs a serem confirmados por Real Time-PCR (Figura 12A). Foram selecionados oito miRNAs, sendo que três deles

estavam aumentados na hipertensão arterial (SHR-S) e caíram com treinamento físico (SHR-T) e cinco estavam diminuídos e aumentaram com o treinamento físico (Figura 12B e 12C).

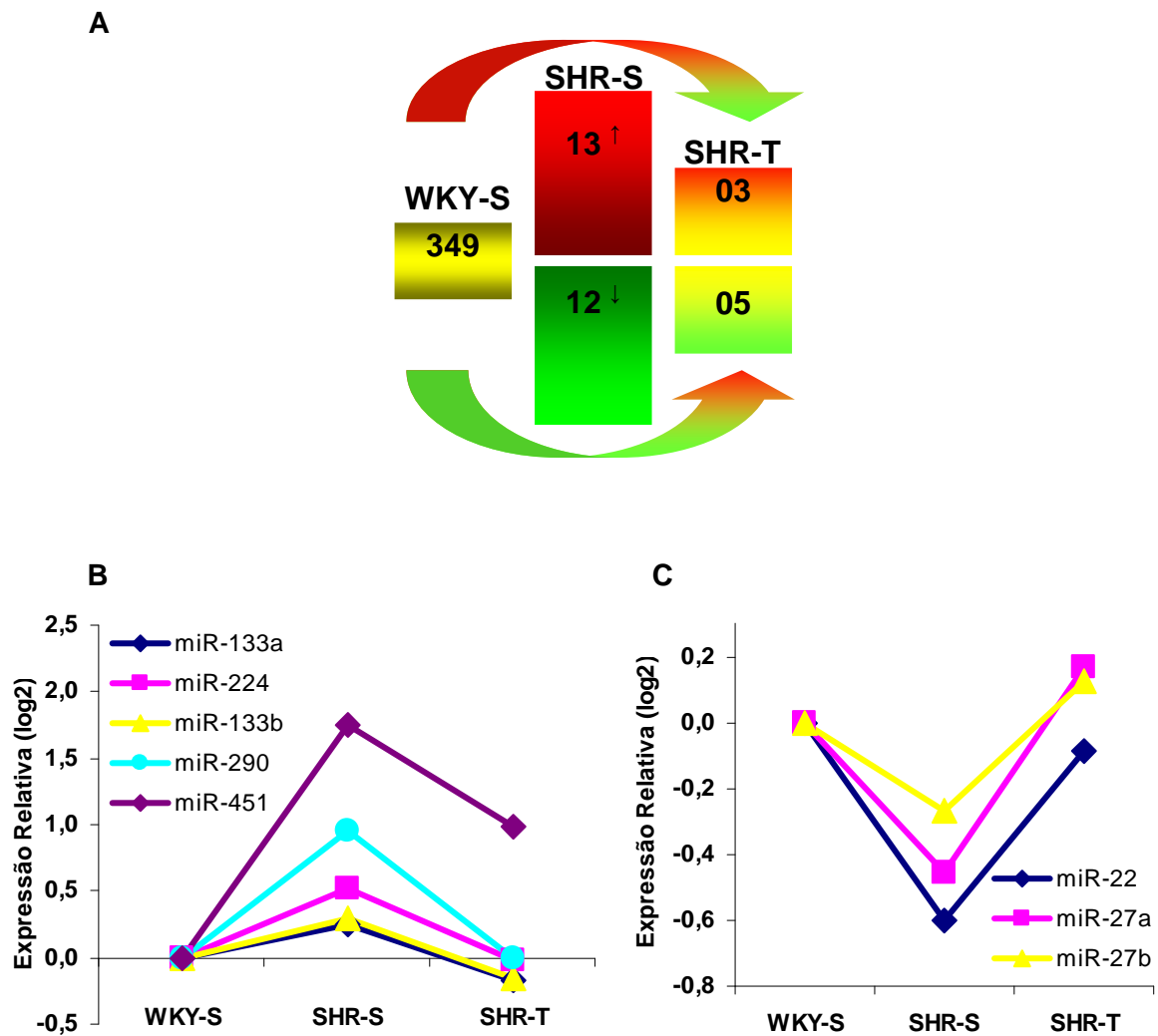


Figura 12- MicroRNAs diferencialmente expressos no grupo SHR-S e que têm sua expressão revertida pelo treinamento físico (Figura 12 A). Padrão ascendente/descendente (Figura 12B). Padrão descendente/ascendente (Figura 12C). Valores de expressão relativa apresentados em Log₂.

5.7.2. Real Time-PCR

Com objetivo de confirmar os miRNAs com perfil de expressão encontrado realizamos um ensaio de Real Time-PCR para sete miRNAs selecionados pela análise de *microarray* (miR-133a, miR-133b, miR-451, miR-22, miR-224, miR-27a e miR-27b). Além deste, também avaliamos miRNAs envolvidos no processo de remodelamento cardíaco (miR-1, miR-208 e miR-29c).

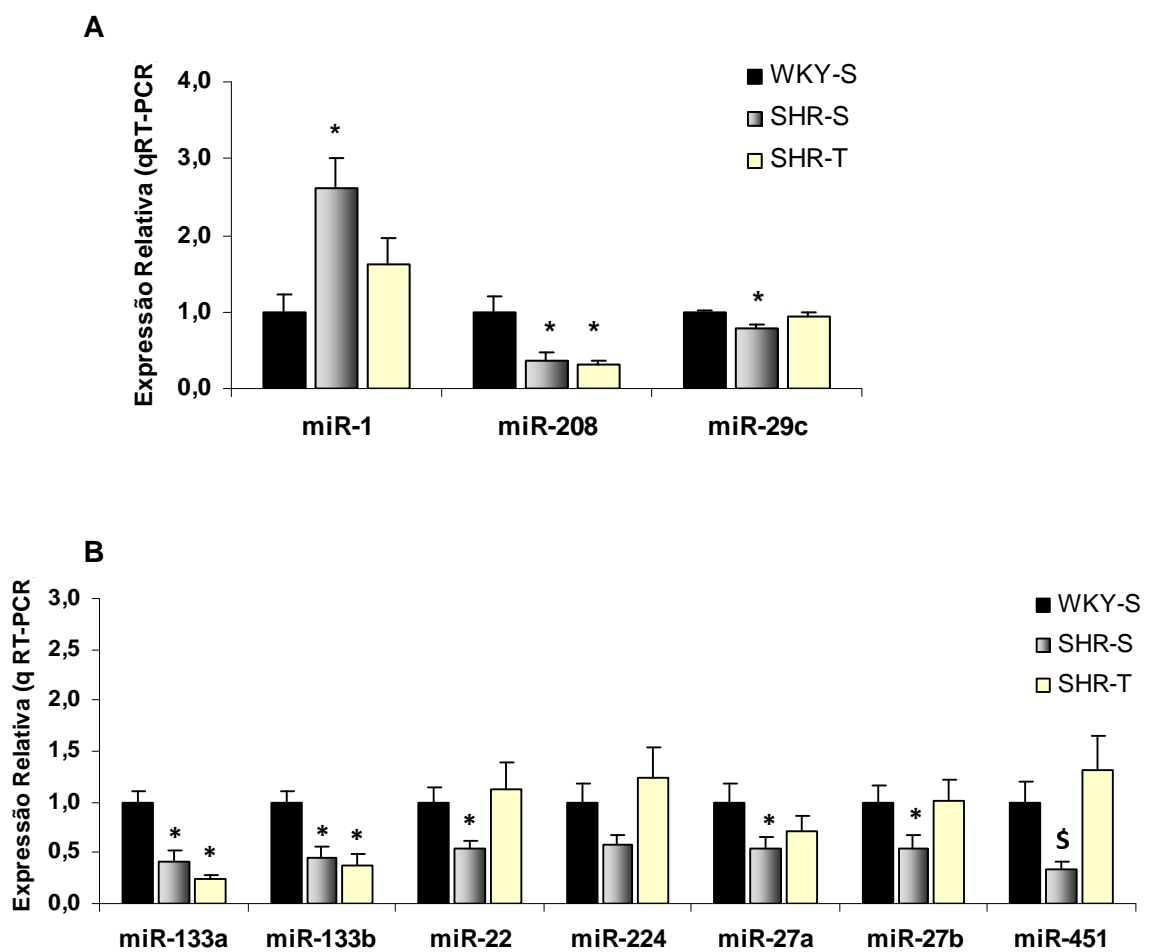


Figura 13 - Expressão relativa de miRNAs obtida por Real Time-PCR. MiRNAs envolvidos no processo de remodelamento cardíaco (Figura 13A). MiRNAs previamente selecionados por *microarray* (Figura 13B). Grupos WKY-S, $n=6$, SHR-S, $n=6$ e SHR-T, $n=6$. Diferença significativa (*) comparado com o WKY-S e (\$) comparado a SHR-T.

A Figura 13A mostra um aumento no miR-1 no grupo SHR-S ($2,63 \pm 0,84$), o qual é parcialmente revertido com treinamento físico (SHR-T, $1,62 \pm 0,34$), o miR-208 tem sua expressão diminuída em ambos os grupos hipertensos (SHR-S, $0,37 \pm 0,10$; SHR-T, $0,32 \pm 0,06$) e o miR-29c está reduzido no grupo SHR-S ($0,79 \pm 0,05$) e apresenta uma reversão no grupo SHR-T ($0,93 \pm 0,05$). Em relação aos miRNAs selecionados (Figura 13B) o miR-22, miR-27a, miR-27b confirmaram o padrão de expressão apresentado na análise de *microarray*. O miR-451 apresentou perfil oposto ao encontrado no *microarray* (SHR-S: $0,35 \pm 0,07$; SHR-T: $1,31 \pm 0,34$). Por outro lado, o miR-133a e b diminuíram sua expressão em ambos os grupos hipertensos não havendo influencia do treinamento físico.

5.8. Análise Funcional *in Silico*

Esta análise foi utilizada para determinar os mecanismos de envolvimento do perfil de expressão de miRNAs na fisiopatologia cardíaca depende da identificação de mRNAs regulados por estes e sua vias de ação. Atualmente diversos algoritmos vem sendo desenvolvidos possibilitando estudos *in silico*, da interação de miRNAs com genes alvos. Neste trabalho utilizamos o aplicativo que integra múltiplos microRNAs em vias de sinalização celular denominado DIANA mirPath (http://diana.cslab.ece.ntua.gr/pathways/index_multiple.php). Esta ferramenta se baseia nos dados de predição como o TargetScan para avaliar a interação dos miRNAs em vias com importante papel cardíaco.

Inicialmente analisou-se o número de genes preditos para cada miRNA, a união ou soma e a intersecção de todos miRNAs (Tabela 2).

Tabela 2 - Análise múltipla de predição de genes alvos para os miRNAs.

	Alvos preditos	Alvos em vias
<i>União</i>	2078	524
<i>miR-1</i>	536	133
<i>miR-22</i>	304	81
<i>miR-27a</i>	844	239
<i>miR-27b</i>	844	239
<i>miR-29c</i>	765	173
<i>miR-451</i>	13	5
<i>Intersecção</i>	-	-

Observa-se que a mudança decorrente da hipertensão arterial ocorrida no perfil de miRNAs e revertida pelo treinamento físico pode afetar milhares de genes alvos atuando em 130 vias de sinalização preditas, esse fato ocorre devido a possibilidade de atuação de cada miRNA em centenas de genes alvos.

Após uma análise geral, procurou-se identificar as diferentes vias onde os genes alvos se localizam. Algumas vias apresentaram altos índices de significação quanto a interação com os miRNAs analisados. A Figura 10 mostra a predição de diferentes vias de sinalização com potencial de interação.

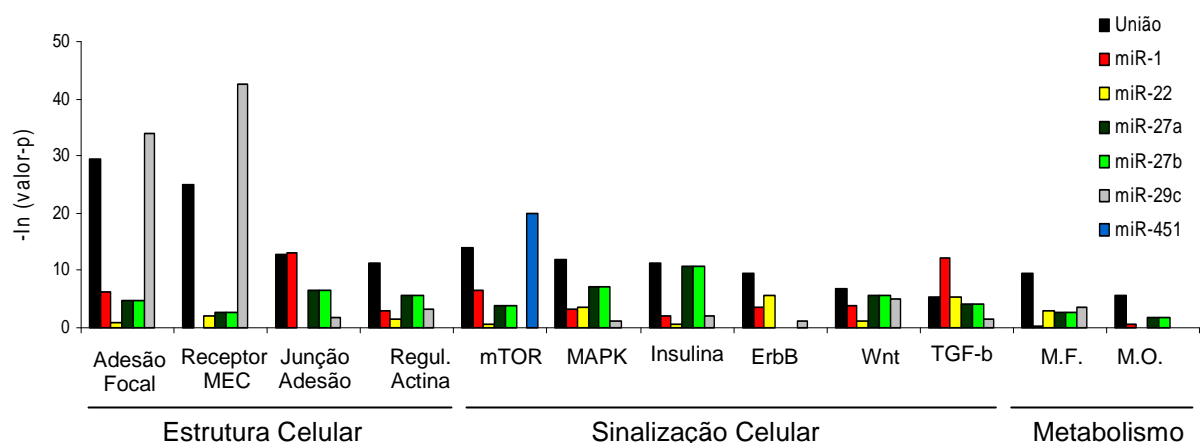


Figura 14 - Dados obtidos pela análise de predição múltipla para: União, somas dos genes alvo; miR-1, miR-22, miR-27a, miR-27b, miR-29c e miR-451. MEC, matrix extra celular; M.F., metabolismo de glicerofosfolípídeo; M.O., metabolismo oxidativo.

Vinte e cinco vias importantes na fisiopatologia cardíaca foram extraídas e mostradas na Tabela 3 e 4, as quais foram divididas de acordo com sua atuação sobre a estrutura, metabolismo e funções nucleares (Tabela 3) ou sinalização celular (Tabela 4).

Tabela 3 - Genes alvos preditos relacionados com vias de organização estrutural, metabolismo e função nuclear.

Vias (KEGG Pathway)	-ln(valor-p)	Genes Preditos
<i>Estruturais</i>		
Adesão Focal	29.81	COL6A3, VASP, COL4A6, ITGB1, PDGFRA, MET, RELN, VCL, COL5A1, CAV3, PDPK1, CAV2, PDGFB, COL1A1, LAMA2, ITGB8, LAMC2, COL3A1, VEGFC, ITGA2, ITGA6, PIK3R1, COL4A4, SOS1, VAV3, COL5A3, VEGFA, ITGA10, MAPK1, THBS1, ENSG00000204248, MAPK3, CDC42, GRB2, PAK6, VAV2, RAP1B, COL5A2, COL1A2, PPP1CC, RAP1A, ITGA11, CCND2, MYLK, COL2A1, LAMC1, IGF1, PDGFRB, SHC4, PIK3CD, PIK3R3, COL4A1, AKT3, PDGFC, CCND1, COL11A1, ITGA5, PDGFA
Interação receptor-matrix extracelular	25.2	COL6A3, FNDC5, COL4A6, ITGB1, RELN, COL5A1, COL1A1, LAMA2, ITGB8, LAMC2, COL3A1, ITGA2, ITGA6, SV2A, COL4A4, COL5A3, ITGA10, FNDC3A, THBS1, ENSG00000204248, HSPG2, COL5A2, COL1A2, ITGA11, COL2A1, LAMC1, AGRN, COL4A1, COL11A1, ITGA5, FNDC4
Junção de Adesão	12.79	PTPN1, TGFB1, MET, WASF1, VCL, SNAI1, YES1, SMAD2, BAIAP2, MAPK1, PTPRJ, INSR, MAPK3, CDC42, MLLT4, ACVR1B, SSX2IP, NLK, PVRL1, ACVR1C, EP300, SMAD4, SNAI2
Regulação de actina no citoesqueleto	11.46	ARPC5, TIAM1, ITGB1, LIMK1, PDGFRA, LIMK2, WASF1, MRAS, VCL, PDGFB, ITGB8, ARHGEF6, KRAS, PIP5K1B, ACTA2, PIP4K2B, ITGA2, ITGA6, PIK3R1, ABI2, SOS1, VAV3, BAIAP2, ITGA10, APC, MAPK1, FGF1, MAPK3, DIAPH2, CDC42, PAK6, VAV2, PPP1CC, ITGA11, GNA13, SLC9A1, MYLK, MYH10, GNG12, PDGFRB, PIK3CD, PIK3R3, PFN2, CHRM1, ITGA5, GIT1, PDGFA
Junções do tipo Gap	2.42	TUBB2B, PRKY, PDGFRA, GJA1, TUBB2A, PDGFB, KRAS, PRKG1, SOS1, PRKX, MAPK1, MAPK3, GRB2, PDGFRB, DRD1, PDGFC, PDGFA, ADCY6
<i>Metabolismo</i>		
Glicerofosfolípídeo	9.64	GPD2, PPAP2B, CDS1, GPAM, PCYT1B, SH3GLB1, MYST3, DGKG, DGKD, PISD, AGPAT3, CHKA, DGKI, ENSG00000204310, AGPAT4, LYPLA1, NAT5, MYST4, GPD1L, DGKH
Fosforilação Oxidativa	5.71	ATP6V1A, ATP6V1B2, NDUFS4, ATP5G3
Glicólise/Gliconeogênese	2.45	PGAM1, G6PC, ENO1
Ácidos Graxos	2.97	CPT2
<i>Funções Nucleares</i>		
Replicação de DNA	1.06	POLE3, POLA1
Reparo de bases	1.06	POLE3, TDG
RNA polimerase	0.87	POLR3G

Tabela 4 - Genes alvos preditos relacionados com vias de sinalização intracelular.

Vias (KEGG Pathway)	-ln(valor-p)	Genes Preditos
<i>Sinalização intracelular</i>		
MAPK	11.98	MAP4K3, TAOK3, MAP4K4, FOS, PRKY, TNFRSF1A, PDGFRA, EVI1, TGFB1, MRAS, MAP3K4, MAP3K1, MAPKAPK3, PDGFB, KRAS, CACNB2, MEF2C, BDNF, DUSP5, MAPT, CACNG4, DUSP2, TAOK1, MAP2K4, SOS1, PRKX, RPS6KA5, TP53, MAP2K6, MAPK1, FGF1, SRF, NFATC4, MAPK3, CDC42, GRB2, MAP2K7, CACNA2D4, RAP1B, ACVR1B, NLK, NF1, RAP1A, RASA1, MAPK14, ACVR1C, MAP3K12, MAX, MAP3K14, RPS6KA3, GNG12, PDGFRB, ARRB1, AKT3, PDGFA
mTOR	11.89	TSC1, PDPK1, VEGFC, PRKAA2, PIK3R1, VEGFA, MAPK1, MAPK3, DDIT4, RPS6KA3, IGF1, RPS6KB1, PIK3CD, PIK3R3, AKT3, EIF4E, EIF4E2
Insulina	11.5	PTPN1, PPP1R3B, PRKY, TSC1, SOCS4, PDPK1, KRAS, CBL, PRKAA2, ACACA, PIK3R1, SOS1, CALM1,CALM2,CALM3, PRKX, SOCS2, FOXO1, MAPK1, IRS1, INSR, MAPK3, PDE3B, GRB2, G6PC, CBLB, PPP1CC, PRKAB2, PDE3A, SHC4, RPS6KB1, PIK3CD, PIK3R3, PPP1R3D, AKT3, EIF4E, EIF4E2
ErbB	9.47	CAMK2D, NCK2, HBEGF, CDKN1A, ERBB3, KRAS, CBL, CAMK2G, PIK3R1, MAP2K4, SOS1, MAPK1, ABL2, MAPK3, GRB2, PAK6, MAP2K7, CBLB, ERBB4, SHC4, RPS6KB1, PIK3CD, PIK3R3, AKT3
Wnt	6.98	FZD7, CTNNBIP1, WNT3A, CAMK2D, DAAM2, PRKY, FZD5, LRP6, SFRP1, VANGL2, SMAD2, CAMK2G, PRKX, TP53, APC, DAAM1, VANGL1, PPP2R1B, NFATC4, FRAT2, DVL2, NLK, PPARC, CCND2, DKK2, FZD4, NFAT5, PRICKLE2, EP300, CTBP2, CCND1, SMAD4
TGF-beta	5.48	E2F5, TGFB1, ID3, ZFYVE9, SMAD2, SMAD5, ACVR2A, GDF6, MAPK1, THBS1, PPP2R1B, MAPK3, ACVR2B, ACVR1B, BMPR1B, SP1, ACVR1C, EP300, RPS6KB1, SMAD4, BMPR1A
PI3K	2.87	SYNJ1, CDS1, INPP5B, DGKG, DGKD, PIP5K1B, PIP4K2B, PIK3R1, CALM1,CALM2,CALM3, DGKI, PIK3C2A, INPP1, PIK3CD, PIK3R3, DGKH
VEGF	2.22	MAPKAPK3, KRAS, PIK3R1, SPHK2, VEGFA, MAPK1, NFATC4, MAPK3, CDC42, MAPK14, NFAT5, PIK3CD, PIK3R3, AKT3
Jak-STAT	1.23	IL13RA1, LEP, LIFR, SOCS4, CBL, PIK3R1, SOS1, SOCS2, SPRY4, IL10, GRB2, CBLB, LIF, PIAS3, CCND2, SPRY1, SPRED1, EP300, PIK3CD, PIK3R3, PIAS4, AKT3, CCND1, SPRY2
p53	1.75	CCNG1, ZMAT3, CDKN1A, CDK6, CYCS, TP53, THBS1, SESN2, APAF1, CCND2, IGF1, BBC3, CCND1
Cálcio/Calmodulina	0.65	ADRA1B, CAMK2D, GRIN2D, PRKY, SLC8A2, PDGFRA, ATP2B4, EDNRA, ERBB3, CAMK2G, SLC8A1, ADORA2B, PTGER3, SPHK2, ATP2B1, CALM1,CALM2,CALM3, PRKX, OXTR, MYLK, ERBB4, PDGFRB, TACR1, DRD1, CHRM1
Proteólise mediada por Ubiquitina	1.26	UBE2D1, CDC27, KLHL9, UBE2G1, UBE4A, PRPF19, UBE2NL, MAP3K1, CUL3, UBE2W, CBL, UBE2N, FBXW7, TRIM37, UBR5, CBLB, PIAS3, UBE2O, NEDD4, UBE2H, PIAS4

Dentre os miRNAs selecionados os miR-22, miR-27a, miR-27b e miR-29c apresentam diminuição no grupo SHR-S, sendo esta revertida pelo treinamento físico. Portanto, foi repetido o estudo de intersecção de miRNAs sem a presença do miR-1 e miR-451, já que o primeiro apresenta padrão inverso aos demais e o miR-451 não apresentou intersecção de alvos com os demais miRNAs. Nessa análise foram encontrados cinco genes alvos envolvidos em vias de sinalização intracelular (Tabela 5).

Tabela 5 - Genes alvos preditos e suas vias de sinalização.

Via de Sinalização	Gene Alvo
<i>VEGF</i>	NFAT5
<i>PI3K</i>	CALM1,CALM2,CALM3
<i>ErbB</i>	MAP2K4
<i>TGF-beta</i>	SP1
<i>Ubiquitina Proteassoma</i>	FBXW7
<i>Insulina</i>	CALM1,CALM2,CALM3
<i>Wnt</i>	NFAT5
<i>Calmodulina</i>	CALM1,CALM2,CALM3
<i>MAPK</i>	MAP2K4

6. DISCUSSÃO

Os principais resultados deste trabalho mostram que o treinamento físico aeróbio foi capaz de reduzir a pressão arterial sistólica e média e a frequência cardíaca de repouso, melhorar a capacidade de tolerância ao esforço e o VO₂ pico sem alteração da massa cardíaca. Além disso, observamos uma normalização da função diastólica, a qual apresentava prejuízo nos animais hipertensos. Em seguida, mostramos pela primeira vez diferentes perfis de expressão diferencial de miRNAs no coração de animais SHR sedentários e treinados. Por fim, selecionamos os miRNAs diferencialmente expressos nos ratos hipertensos e que apresentaram um padrão de normalização como efeito do treinamento físico aeróbio. Os miRs selecionados passaram por uma análise de bioinformática, que pode relacioná-los com diferentes vias de sinalização, gerando uma mapa por onde o treinamento físico aeróbio pode estar atuando na melhora do quadro patológico.

6.1. Eficácia do treinamento físico aeróbio e efeito sobre a massa corporal e parâmetros hemodinâmicos e funcionais cardíacos

A prática regular de exercício físico aeróbio tem sido efetiva como medida não farmacológica na prevenção e tratamento de diversos fatores de risco cardiovascular, como hipertensão arterial, obesidade, dislipidemia, resistência à insulina e estresse (VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO ARTERIAL, 2010). Sua efetividade vem sendo atribuída à efeitos neurohumorais, inflamatórios, metabólicos e hemodinâmicos, assim como melhora na função endotelial, muscular esquelética e cardiovascular promovendo melhora na capacidade funcional e qualidade de vida (CRIMI et al., 2009). Além disso, o exercício físico também promove efeitos diretos sobre o desempenho cardíaco. Dados experimentais

demonstram a eficácia do treinamento físico em restabelecer a função cardíaca através da melhora na contratilidade dos cardiomiócitos, restabelecimento do fluxo de cálcio intracelular (ROLIM, 2007; MEDEIROS, 2008), redução na formação de fibrose intersticial e melhora na vascularização do miocárdio, desta forma preservando a integridade dos cardiomiócitos e prevenindo apoptose e necrose celular (KWAK, 2006; MARQUES, 2006).

Embora o treinamento físico aeróbio promova importantes adaptações, sua eficácia na redução da pressão arterial e prevenção da hipertrofia cardíaca patológica depende da intensidade de exercício realizado nas sessões de treinamento (VÈRAS-SILVA et al.,1997). Neste estudo, o treinamento físico realizado em piscina é considerado de intensidade moderada (MEDEIROS et al., 2004), eficaz em atenuar a hipertensão arterial de ratos hipertensos e promover melhoras na função cardíaca (IEMITSU et al., 2003; SCHLÜTER et al., 2010, ZAMO et al., 2011).

Portanto, os diversos efeitos promovidos pelo exercício físico aeróbio no músculo cardíaco dirigiram o racional desse estudo na sua utilização como modelo de reversão do processo de remodelamento patológico induzido pela hipertensão arterial.

6.1.1. Peso Corporal

O peso corporal dos ratos foi controlado semanalmente durante a realização do protocolo experimental e os resultados mostram que a partir da sexta semana os animais treinados passaram a ganhar menos peso corporal comparado aos animais sedentários.

Dados encontrados na literatura com relação à alteração no peso corporal em resposta ao treinamento físico aeróbio, tanto em humanos quanto em animais de experimentação, mostram resultados diversos, que se deve aos diferentes protocolos de treinamento utilizados com modificações na frequência, intensidade, duração e tipo de exercício. Porém, estudos que utilizaram o mesmo modelo de animal genético, SHR e WKY, vão ao encontro com os dados obtidos neste estudo, em que os grupos treinados chegam ao final do protocolo com um peso corporal menor que os grupos sedentários (MELO et al., 2003; SILVA et al., 1997).

O acompanhamento da evolução do peso corporal é de grande importância, principalmente para normalização de algumas variáveis como a massa cardíaca. Dessa maneira somente à medida absoluta pode não refletir a real situação encontrada. Em várias espécies de mamíferos já foi mostrado que a massa do coração está diretamente relacionada com o peso corporal (DEVEREUX, 1984). Os estudos que mostram diminuição no peso corporal ou menor ganho deste em modelos submetidos ao treinamento físico aeróbio atribuem esses resultados ao fato do exercício físico ser capaz de aumentar o gasto calórico com uso predominante do metabolismo oxidativo. Esse aumento do gasto calórico somado ao longo de semanas ou meses pode explicar essa diferença em relação aos indivíduos sedentários, principalmente por uma redução do tecido adiposo (TOTH & POCHLMAN, 1996; ROCHA et al, 2007).

6.1.2. Parâmetros Hemodinâmicos

A atenuação da hipertensão arterial é uma outra adaptação induzida pelo treinamento físico aeróbio (RONDON & BRUM, 2003). Os primeiros estudos que constataram o potencial efeito preventivo no controle e tratamento da pressão

arterial foram da década de 60, surgindo às primeiras evidências de redução em indivíduos hipertensos que faziam exercício físico regular (HAMER et al, 1967; BOYER, 1970; HANSON & NEDDE, 1970). O mecanismo hemodinâmico envolvido nessa adaptação é a redução do débito cardíaco associado à bradicardia de repouso e redução do tônus simpático cardíaco (GAVA et al, 1995; NEGRÃO et al., 1992). Além disso, o treinamento físico aeróbio restaura a sensibilidade dos reflexos cardiopulmonares diminuídos pela hipertensão arterial e que são importantes para a regulação momento-a-momento da pressão arterial (SILVA, BRUM, NEGRÃO & KRIEGER, 1997). Em humanos, um estudo de meta-análise mostrou que o treinamento físico aeróbio reduz a pressão arterial através da diminuição da resistência vascular periférica (CORNELISSEN & FAGARD, 2005). No presente estudo, observamos que o treinamento físico aeróbio foi capaz de reduzir os níveis pressóricos nos ratos SHR. Outro resultado observado no grupo SHR-T foi uma redução da frequência cardíaca de repouso nos animais treinados, a qual é usada como um dos principais marcadores de treinamento físico aeróbio (VERAS-SILVA et al., 1997, SILVA et al., 1997, AMARAL et al., 2000, 2001, MELO et al., 2003, MEDEIROS et al., 2004, ZAMO et al, 2011).

6.1.3. Teste de Tolerância ao Esforço

Diversos parâmetros foram avaliados para comprovar a eficácia do protocolo de treinamento. O teste de tolerância ao esforço foi utilizado para avaliar o desempenho físico antes e após um período de treinamento físico aeróbio. Os animais foram submetidos ao teste em esteira rolante até a exaustão pré e pós o período de treinamento físico de natação. Foram avaliadas as variáveis: distância percorrida, tempo e velocidade. É importante ressaltar que o teste não corresponde

à modalidade específica ao tipo de treinamento realizado, isso permite que teste avalie parâmetros relacionados com a capacidade de realização de esforço físico aeróbio, tais como, melhora cardiopulmonar e do metabolismo oxidativo e elimina qualquer interferência que pudesse vir a ocorrer como efeito de aprendizagem já que, tanto o grupo treinado quanto os grupos sedentários têm o mesmo tempo de prática na esteira rolante.

Os resultados de velocidade, tempo e distância percorrida, foram semelhantes entre os grupos na fase inicial, entretanto, os animais treinados aumentaram significativamente a velocidade, tempo e distância percorrida no final do protocolo. Estudos vêm demonstrando uma relação direta entre o treinamento físico e uma melhora na capacidade de tolerância ao esforço através da mensuração das variáveis acima apontadas. Desta forma, o teste em esteira até a exaustão vem sendo bastante utilizado para a verificação da capacidade aeróbia em animais de experimentação (EVANGELISTA e KRIEGER, 2006; MELO et al., 2003; KOCH e BRITTON, 2001; ZAMO, et al 2011).

6.1.4. Consumo Máximo de Oxigênio

O consumo máximo de oxigênio retrata a capacidade máxima do organismo de extrair oxigênio. Esta é a medida que melhor avalia a potência aeróbia, ou seja, a quantidade máxima de energia que pode ser transformada em trabalho aeróbio das fibras musculares por unidade de tempo (DENADAI et al., 2004). No presente estudo, observamos que todos os grupos apresentavam o mesmo nível médio de VO_2 pico no início, entretanto no final do protocolo, enquanto os grupos sedentários diminuíram seus valores de VO_2 pico, o grupo treinado manteve seus valores estáveis. Estudos mostram que existe uma redução natural do consumo de oxigênio

máximo/pico com o avançar da idade (GOVINDASAMY et al., 1992), essa queda pode ser explicada pela diminuição na capacidade de perfusão tecidual de oxigênio (DELOREY; PATERSON; KOWALCHUK, 2007) ou ainda por uma redução da capacidade oxidativa mitocondrial (HEPPLE et al., 2003). Nesse trabalho, observamos que o treinamento físico aeróbio foi capaz de prevenir a diminuição do VO₂ pico ao longo do tempo, o que podemos entender como um efeito positivo para o sistema cardiovascular.

6.1.5. Função Cardíaca

A hipertrofia cardíaca é considerada um fator de risco independente para infarto agudo do miocárdio, arritmias e morte súbita (LEVY et al., 1990). Isso é particularmente verdadeiro, quando considerada em situações patológicas que normalmente estão associadas com disfunção sistólica ou diastólica. A hipertrofia cardíaca decorrente do treinamento físico aeróbio, por outro lado, é considerada como uma adaptação benigna por estar associada com melhora ou manutenção tanto da função sistólica quanto diastólica (MARON & PELLICCIA, 2006).

Uma recente meta-análise, de mais de mil trabalhos, observou que o TF aeróbio tem efeitos clínicos benéficos em pacientes pós-infarto. Os critérios utilizados para avaliar o efeito funcional foram o volume sistólico final e volume diastólico final como parâmetros de função sistólica e diastólica, respectivamente. Também foi observado que os benefícios dependem do quão cedo se inicia o treinamento físico, além disso, os programas com duração superior à 3 meses apresentam melhores resultados (HAYKOWSKY, 2011). Recentemente mostramos que o treinamento físico previne a hipertensão em SHR com 1 ou 3 meses de idade. Assim, mostramos que o treinamento físico não só previne a hipertensão se o

treinamento começar antes desta estar estabelecida ou reduz após hipertensão estabelecida (ZAMO et al., 2011). No presente estudo, avaliamos parâmetros relacionados à função sistólica e diastólica e parâmetros morfológicos.

Função Sistólica: Como parâmetro da função sistólica avaliou-se à porcentagem de encurtamento do ventrículo esquerdo (PEVE), essa medida permite a avaliação da função do coração como bomba. Conforme apresentado na TABELA 1, não observamos alteração da PEVE em nenhum dos grupos estudados, o que indica não haver prejuízo da função sistólica nos grupos estudados.

Função Diastólica: O comprometimento das propriedades diastólicas do ventrículo esquerdo é uma das primeiras conseqüências da hipertensão arterial. Para determinação da função diastólica, utilizamos três parâmetros também mostrados na Tabela 2 (pico de velocidade da onda E, pico de velocidade da onda A e relação E/A) o treinamento físico foi capaz de promover aumento da onda E no grupo hipertenso, também observamos que a hipertensão promove aumento da onda A e que essa é totalmente revertida com o treinamento físico. Conseqüentemente, a razão E/A estava diminuída no grupo SHR-S e foi normalizada com treinamento. Os resultados observados mostram que o grupo de animais hipertensos já apresenta prejuízo na função diastólica com aumento da onda A e da razão E/A. Por outro lado, o treinamento físico foi eficaz em normalizar a função diastólica principalmente através do aumento da onda E.

Entre os mecanismos implicados na gênese da disfunção diastólica destacam-se as alterações das propriedades elásticas, com implicações para a distensibilidade ventricular, e as alterações do relaxamento ativo das fibras musculares por distúrbios no manejo do cálcio intracelular. No primeiro caso são implicados o aumento da pós-carga, a hipertrofia miocárdica e a deposição de colágeno. No

segundo, assume importância a isquemia das fibras musculares cardíacas com interferência na recapitação do cálcio para dentro do retículo sarcoplasmático além da própria hipertrofia, causando menor densidade do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (JALIL et al., 1989; ZIERHUT et al., 1996).

6.1.6. Hipertrofia Cardíaca

A massa cardíaca foi avaliada tanto pelo peso direto do VE corrigido pelo peso corporal e pelo comprimento da tíbia, quanto pela avaliação ecocardiográfica. Também foram avaliados parâmetros morfológicos como diâmetro do átrio esquerdo e diâmetro sistólico e diastólico do ventrículo esquerdo, espessura da parede anterior e posterior e através de análise histológica foi avaliado o diâmetro dos cardiomiócitos.

No presente estudo, observa-se o aumento da massa cardíaca como efeito da hipertensão arterial, esse fenômeno vem acompanhado de um espessamento da parede anterior e posterior do ventrículo esquerdo e aumento de diâmetro dos cardiomiócitos. O treinamento físico aeróbio por sua vez, não ampliou ou regrediu a hipertrofia cardíaca apresentada nos animais hipertensos. Dados na literatura corroboram com esse fato, uma meta-análise mostrou que dentre os estudos que observaram o efeito do treinamento físico na hipertrofia cardíaca, somente aqueles onde o protocolo de treinamento se iniciava entre um e dois meses de idade, apresentaram redução da massa cardíaca nos animais treinados (SCHLÜTER et al., 2010). Resultados do nosso laboratório mostram que animais SHR que iniciaram o treinamento físico com 1 mês de idade, antes da hipertensão estar estabelecida (ZAMO, et al., 2010), não foi observada hipertrofia cardíaca com o mesmo protocolo de treinamento utilizado no presente estudo (ZAMO et al., 2011). Assim, os

resultados observados podem ser explicados pelo fato da hipertensão arterial ainda não estar estabelecida prevenindo a hipertrofia cardíaca. Em nosso trabalho iniciamos o protocolo de treinamento após o estabelecimento da hipertensão arterial e possivelmente esse fato foi responsável pela não regressão da massa cardíaca como um todo, no entanto, foi possível observar uma regressão do diâmetro das células cardíacas conduzindo a uma melhora funcional.

Alguns trabalhos estudaram o efeito do treinamento físico na hipertrofia cardíaca induzida pela hipertensão arterial, nesses trabalhos o treinamento físico foi eficaz em promover alterações estruturais como redução de colágeno e aumento da capilarização (GARCIARENA et al., 2009), redirecionamento do metabolismo energético para a via oxidativa (IEMITSU et al., 2003), além de reverter alterações na expressão gênica de genes relacionados com o remodelamento do miocárdio e apoptose celular (LEE et al., 2006). Esses resultados associados à melhora da contratilidade dos cardiomiócitos (CARNEIRO-JÚNIOR et al., 2010) reforçam o importante papel do treinamento físico na reversão da hipertrofia cardíaca patológica.

6.2. Efeito do treinamento físico aeróbio no perfil de expressão de miRNAs e caracterização funcional *in silico*

Os miRNAs têm sido identificados como reguladores chave na expressão de proteínas implicando no controle de importantes vias fisiológicas (JACKSON et al., 2007). O perfil de expressão de miRNAs nas diferentes doenças representa uma importante ferramenta para elucidar questões envolvendo seu papel nesse contexto. A diferença de expressão gênica dos miRNAs em animais SHR pode sugerir uma relação com a fisiopatologia da hipertensão arterial no coração. No presente estudo,

observamos pela primeira vez o perfil de expressão de miRNAs no coração de animais SHR, 25 miRNAs se mostraram diferencialmente expressos o que possibilitou o agrupamento dessas moléculas em seis padrões diferentes de acordo com sua resposta à hipertensão arterial e o efeito do treinamento físico aeróbio associado a esse quadro.

Alguns trabalhos mapearam a expressão diferencial de miRNAs em doenças cardiovasculares como hipertrofia cardíaca patológica, infarto agudo do miocárdio, fibrose cardíaca ou arritmia (revisado por ONO, 2010). No entanto, nenhum estudo mapeou a expressão de miRNAs em animais do tipo SHR, um dos principais modelos de hipertensão utilizado. Além disso, em nosso estudo obtivemos o perfil de expressão diferencial de ratos SHR em comparação com seu controle Wistar Kyoto e utilizamos o treinamento físico aeróbio como forma de reversão do quadro patológica com o objetivo de descobrir miRNAs que poderiam estar participando desse processo. A partir dessa filtragem chegamos inicialmente em oito miRNAs e posteriormente confirmamos seis deles (miR-1, 22, 27a, 27b, 29c e 451).

Grande parte dos trabalhos tem como enfoque somente a comparação da situação normal com a patológica. Apenas um estudo utilizou um modelo de reversão de hipertrofia cardíaca gerada por constrição da artéria aorta abdominal através da anastomose com a veia cava inferior, como forma de regressão da sobrecarga pressórica e do diâmetro dos cardiomiócitos (WANG et al., 2009). Nesse estudo, o autor observou cinco miRNAs com padrão de expressão de reversão (miR-23a, 29a, 212, 483 e 347). Em comparação ao nosso estudo, apenas o miR-29a apresentou padrão semelhante, sua diminuição está fortemente associada com o remodelamento cardíaco patológico pelo seu envolvimento como genes relacionados com proteínas da matrix-extracelular, incluindo múltiplos colágenos,

fibrilinas e elastina (VAN ROOIJ, 2008) e recentemente mostramos que o treinamento físico aeróbio é capaz de aumentar sua expressão diminuindo o colágeno cardíaco e melhorando a função diastólica em ratos normotensos (SOCl et al., 2011). Em relação aos demais miRNAs, acreditamos não haver semelhança em função do modelo experimental de reversão utilizado ser bastante diferente, o treinamento físico tem um impacto neuro-humoral importante podendo ativar outros fatores envolvidos no remodelamento cardíaco (revisado por CRIMI et al., 2009).

Dentre os miRNAs que encontramos, aqueles descritos na literatura relacionados com processos patológicos no coração, um dos primeiros a ser descrito foi o miR-1 e mais recentemente a família do miR-27. O miR-1 é o mais expresso no coração sendo um dos primeiros miRNAs a ser relacionado com processo hipertróficos (VAN ROOIJ et al, 2006). Recentemente, observou-se que o miR-27a pode estar envolvido no controle da β -MHC, a qual apresenta aumento em sua expressão em relação a miosina do tipo alfa (α -MHC) em situações patológicas de hipertrofia cardíaca (NICHI et al., 2010). Por outro lado, um estudo mostrou que o treinamento físico de natação é capaz de converter o padrão de β -MHC para α -MHC (SCHAIBLE et al., 1986). Já o miR-27b parece participar no desenvolvimento das câmaras cardíacas na fase embrionária regulando a expressão do fator de transcrição Mef2c (CHINCHILLA et al., 2010). Outro miRNA relacionado com hipertrofia de cardiomiócitos foi o miR-22, recentemente foi demonstrado que a inibição desse miRNA é capaz de atenuar a hipertrofia induzida por adrenalina ou angiotensina II. O miR-451, por sua vez, tem sido relacionado com processo de diferenciação de eritrócitos levando a anemia em animais com diminuição da expressão deste miR (MASAKI et al., 2007; CHELOUFI et al., 2010) e mais recentemente, um estudo mostrou que a expressão desse miRNA pode proteger os

cardiomiócitos em modelos de isquemia e reperfusão (ZHANG et al., 2010). Esses dados poderiam sugerir que parte da melhora da capacidade funcional do grupo SHR-T esteja relacionada com aumento na eritropoiese, no entanto, seria necessário avaliar a expressão do miR-451 em células progenitoras eritropoiéticas que são as responsáveis por esse processo.

Embora a literatura traga alguns dados interessantes a respeito do papel desses miRNAs no desenvolvimento e reversão de patologias cardíacas, os estudos ainda são muito escassos e tratados de forma isolada, isso impede uma compreensão do processo como um todo. Em nosso trabalho, os miRNAs descritos acima estão sendo apresentados como um grupo com padrão de expressão alterado na hipertensão e revertido com o treinamento físico aeróbio. Nesse sentido, optamos por realizar uma análise múltipla onde foi possível determinar as vias de sinalização influenciadas pelo grupo como um todo.

Nesse sentido, a utilização de aplicativos de bioinformática permitem uma avaliação mais ampla da atuação do grupo de miRNAs no controle biológico. Por isso, optamos pela utilização da ferramenta de bioinformática MirPath para a realização de análise *in silico*, o que possibilitou a associação de todos os miRNAs selecionados. Nessa análise identificamos diversas vias envolvidas em importantes processos no remodelamento cardíaco, essas vias foram organizadas em três grandes grupos tais como, vias de processos estruturais, vias de sinalização intracelular e vias de metabolismo (Tabela 3). A hipertensão arterial do SHR está associada com processos de hipertrofia e remodelamento patológico sendo que, vias de sinalização como MAPK, TGF-beta e Wnt já foram descritas como atuantes nesse processo (ESPOSITO et al., 2001; RUWHOF et al., 2000; MALEKAR et al., 2010). No presente estudo observamos que a modulação de miRNAs promovida

pelo treinamento físico aeróbio restabelece a expressão de miRNAs que tem como alvos preditos, genes envolvidos nessas vias de sinalização, dessa forma, possivelmente a reversão do padrão de expressão dos miRNAs envolvidos com o controle dessas vias pode resultar em reversão do quadro patológico. Nesse contexto, foi interessante observar que o treinamento físico ao restabelecer a expressão gênica de um pequeno grupo de miRNAs, pode estar através deles restaurando a atividade de centenas de proteínas em diversas vias promovendo assim, os benefícios funcionais observados. Essas observações também se estendem para as alterações estruturais e metabólicas.

Entendemos que embora nossa análise de bioinformática tenha indicado potenciais vias alvos para ação dos miRNAs alterados, fica difícil estimar a taxa de falsos positivos presentes nos resultados, o que é uma limitação para esse tipo de análises. Uma maior exatidão e significância dos dados observados poderia ser obtida através da validação dos resultados experimentalmente ou ainda, pela modulação do grupo de miRNAs produzindo uma relação de causa e efeito. Por outro lado, a utilização da análise bioinformática é bastante robusta, no que diz respeito a sua capacidade de trabalhar com grandes volumes de dados, o que permite uma análise global do fenômeno. Assim, este trabalho abre perspectivas futuras para validação destas vias pela modulação dos miRNAs selecionados neste estudo, com o objetivo de reversão do processo patológico cardíaco observado no SHR.

7. CONCLUSÃO

As principais conclusões desse estudo foram:

- O treinamento físico aeróbio se mostrou um excelente modelo de reversão de remodelamento patológico cardíaco melhorando a capacidade funcional dos animais SHR;
- Seis diferentes padrões de expressão de miRNAs foram observados nesse modelo;
- Seis miRNAs alterados pela hipertensão arterial tiveram sua expressão revertida pelo treinamento físico aeróbio (miR-1, 22, 27a, 27b, 29c e 451);
- Análise bioinformática de múltiplos miRNAs mostrou que esse grupo de miRNAs tem como alvo predito diversas vias de sinalização relacionados com o remodelamento cardíaco como MAPK, TGF-beta e Wnt, além de vias relacionadas com a estrutura do citoesqueleto e metabolismo.

Em resumo, nossos resultados sugerem que os miRNAs: 1, 22, 27a, 27b, 29c e 451 podem estar governando vias de sinalização celular envolvidas no processos de reversão do quadro patológico. Esse fato abre novas perspectivas a respeito da utilização dessas moléculas como forma de terapias.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMAN, K. A.; DZHUGANYAN, R. A. Athlete heart measurements. Theory and Practice of Physical Culture, 1969.

ADAMS, M. A.; BOBIK, A.; KORNER, P. I. Differential development of vascular and cardiac hypertrophy in genetic hypertension. Relation to sympathetic function. Hypertension **14**(2): 191-202, 1989.

AMARAL, S. L.; SILVEIRA, N. P.; ZORN, T. M.; MICHELINI, L. C. Exercise training causes skeletal muscle venular growth and alters hemodynamic responses in spontaneously hypertensive rats. J Hypertens **19**(5): 931-940, 2001.

AMARAL, S. L.; ZORN, T. M.; MICHELINI, L. C. Exercise training normalizes wall-to-lumen ratio of the gracilis muscle arterioles and reduces pressure in spontaneously hypertensive rats. J Hypertens **18**(11): 1563-1572, 2000.

AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. Nature **431**(7006): 350-355, 2004.

BARAUNA, V. G.; ROSA, K. T.; IRIGOYEN, M. C.; DE OLIVEIRA, E. M. Effects of resistance training on ventricular function and hypertrophy in a rat model. Clin Med Res **5**(2): 114-120, 2007.

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**(2): 281-297, 2004.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell **136**(2): 215-233, 2009.

BERNARDO, B. C.; WEEKS, K. L.; PRETORIUS, L.; MCMULLEN, J. R. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. Pharmacol Ther **128**(1): 191-227, 2010.

BING, O. H.; BROOKS, W. W.; ROBINSON, K. G.; SLAWSKY, M. T.; HAYES, J. A.; LITWIN, S. E.; SEN, S.; CONRAD, C. H. The spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from compensated left ventricular hypertrophy to failure. J Mol Cell Cardiol **27**(1): 383-396, 1995.

BING, O. H.; CONRAD, C. H.; BOLUYT, M. O.; ROBINSON, K. G.; BROOKS, W. W. Studies of prevention, treatment and mechanisms of heart failure in the aging spontaneously hypertensive rat. Heart Fail Rev **7**(1): 71-88, 2002.

BLOMQVIST, C. G.; SALTIN, B. Cardiovascular adaptations to physical training. Annu Rev Physiol **45**: 169-189, 1983.

- BOYER, J. L.; KASCH, F. W. Exercise therapy in hypertensive men. JAMA **211**(10): 1668-1671, 1970.
- BRANDAO, M. U.; WAJNGARTEN, M.; RONDON, E.; GIORGI, M. C.; HIRONAKA, F.; NEGRAO, C. E. Left ventricular function during dynamic exercise in untrained and moderately trained subjects. J Appl Physiol **75**(5): 1989-1995, 1993.
- BRENNECKE, J.; STARK, A.; RUSSELL, R. B.; COHEN, S. M. Principles of microRNA-target recognition. PLoS Biol **3**(3): e85, 2005.
- BUTLER, J.; O'BRIEN, M.; O'MALLEY, K.; KELLY, J. G. Relationship of beta-adrenoreceptor density to fitness in athletes. Nature **298**(5869): 60-62, 1982.
- CARDIOLOGIA, S. B. D.; HIPERTENSÃO, S. B. D.; NEFROLOGIA, S. B. D. VI DIRETRIZES BRASILEIRAS DE HIPERTENSÃO. Arquivos Brasileiros de Cardiologia **95**(1-supl.1): 1-68, 2010.
- CARNEIRO-JUNIOR, M. A.; PELUZIO, M. C.; SILVA, C. H.; AMORIM, P. R.; SILVA, K. A.; SOUZA, M. O.; CASTRO, C. A.; ROMAN-CAMPOS, D.; PRIMOLA-GOMES, T. N.; NATALI, A. J. Exercise training and detraining modify the morphological and mechanical properties of single cardiac myocytes obtained from spontaneously hypertensive rats. Braz J Med Biol Res **43**(11): 1042-1046, 2010.
- CARRENO, J. E.; APABLAZA, F.; OCARANZA, M. P.; JALIL, J. E. [Cardiac hypertrophy: molecular and cellular events]. Rev Esp Cardiol **59**(5): 473-486, 2006.
- CASALE, P. N.; DEVEREUX, R. B.; MILNER, M.; ZULLO, G.; HARSHFIELD, G. A.; PICKERING, T. G.; LARAGH, J. H. Value of echocardiographic measurement of left ventricular mass in predicting cardiovascular morbid events in hypertensive men. Ann Intern Med **105**(2): 173-178, 1986.
- CHELOUFI, S.; DOS SANTOS, C. O.; CHONG, M. M.; HANNON, G. J. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. Nature **465**(7298): 584-589, 2010.
- CHENG, C. Z.; LODISH, H. F. MicroRNAs as regulators of mammalian hematopoiesis. Seminars in Immunology. **17**(2): 155-165, 2005.
- CHENG, Y.; JI, R.; YUE, J.; YANG, J.; LIU, X.; CHEN, H.; DEAN, D. B.; ZHANG, C. MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: do they play a role in cardiac hypertrophy? Am J Pathol **170**(6): 1831-1840, 2007.
- CHINCHILLA, A.; LOZANO, E.; DAIMI, H.; ESTEBAN, F. J.; CRIST, C.; ARANEGA, A. E.; FRANCO, D. MicroRNA profiling during mouse ventricular maturation: a role for miR-27 modulating Mef2c expression. Cardiovasc Res **89**(1): 98-108, 2010.

CHRISTIAANS, I.; BIRNIE, E.; VAN LANGEN, I. M.; VAN SPAENDONCK-ZWARTS, K. Y.; VAN TINTELEN, J. P.; VAN DEN BERG, M. P.; AT SMA, D. E.; HELDERMAN-VAN DEN ENDEN, A. T.; PINTO, Y. M.; HERMANS-VAN AST, J. F.; BONSEL, G. J.; WILDE, A. A. The yield of risk stratification for sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy myosin-binding protein C gene mutation carriers: focus on predictive screening. Eur Heart J **31**(7): 842-848, 2009.

CHRISTIAANS, I.; VAN ENGELEN, K.; VAN LANGEN, I. M.; BIRNIE, E.; BONSEL, G. J.; ELLIOTT, P. M.; WILDE, A. A. Risk stratification for sudden cardiac death in hypertrophic cardiomyopathy: systematic review of clinical risk markers. Europace **12**(3): 313-321, 2010.

CICOGNA, A. C.; ROBINSON, K. G.; CONRAD, C. H.; SQUIRE, R.; OKOSHI, M. P.; BING, O. H. Participação do estado contrátil e do relaxamento miocárdico na disfunção ventricular durante a transição hipertrofia-falência cardíaca. Arquivos Brasileiros de Cardiologia **69**(6): 381-384, 1997.

COLAN, S. D. Mechanics of left ventricular systolic and diastolic function in physiologic hypertrophy of the athlete's heart. Cardiol Clin **15**(3): 355-372, 1997.

CRIMI, E.; IGNARRO, L. J.; CACCIATORE, F.; NAPOLI, C. Mechanisms by which exercise training benefits patients with heart failure. Nat Rev Cardiol **6**(4): 292-300, 2009.

DELOREY, D. S.; PATERSON, D. H.; KOWALCHUK, J. M. Effects of ageing on muscle O₂ utilization and muscle oxygenation during the transition to moderate-intensity exercise. Appl Physiol Nutr Metab **32**(6): 1251-1262, 2007.

DENADAI, B. S.; ORTIZ, M. J.; MELO, M. T. Índices fisiológicos associados com a performance aeróbica em corredores de endurance: efeitos da duração da prova. Revista Brasileira de Medicina do Esporte **10**(5): 401-404, 2004.

DESPRES, J. P.; LAMARCHE, B. Low-intensity endurance exercise training, plasma lipoproteins and the risk of coronary heart disease. J Intern Med **236**(1): 7-22, 1994.

DICKHUTH, H. H.; NAUSE, A.; STAIGER, J.; BONZEL, T.; KEUL, J. Two-dimensional echocardiographic measurements of left ventricular volume and stroke volume of endurance-trained athletes and untrained subjects. Int J Sports Med **4**(1): 21-26, 1983.

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**(6): E1333-1340, 2008.

ESAU, C.; KANG, X.; PERALTA, E.; HANSON, E.; MARCUSSON, 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.

ESPOSITO, G.; PRASAD, S. V.; RAPACCIUOLO, A.; MAO, L.; KOCH, W. J.; ROCKMAN, H. A. Cardiac overexpression of a G(q) inhibitor blocks induction of extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH(2)-terminal kinase activity in in vivo pressure overload. Circulation **103**(10): 1453-1458, 2001.

EVANGELISTA, F. S.; KRIEGER, J. E. Small gene effect and exercise training-induced cardiac hypertrophy in mice: an Ace gene dosage study. Physiol Genomics **27**(3): 231-236, 2006.

FAGARD, R. H. Physical activity, physical fitness and the incidence of hypertension. J Hypertens **23**(2): 265-267, 2005.

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): 836-847, 2011.

FLECK, S. J. Cardiovascular adaptations to resistance training. Med Sci Sports Exerc **20**(5 Suppl): S146-151, 1988.

FORJAZ, C. L. M.; BRUM, P. C.; BRANDAO, M. U. P.; TINUCCI, T.; NEGRAO, C. E. Exercício físico regular e seus benefícios para o coração. Âmbito Medicina Desportiva **4**(30-38) 1998.

GARCIARENA, C. D.; PINILLA, O. A.; NOLLY, M. B.; LAGUENS, R. P.; ESCUDERO, E. M.; CINGOLANI, H. E.; ENNIS, I. L. Endurance training in the spontaneously hypertensive rat: conversion of pathological into physiological cardiac hypertrophy. Hypertension **53**(4): 708-714, 2009.

GHALI, J. K.; LIAO, Y.; SIMMONS, B.; CASTANER, A.; CAO, G.; COOPER, R. S. The prognostic role of left ventricular hypertrophy in patients with or without coronary artery disease. Annals Internal Medicine **10**: 831-836, 1992.

GOVINDASAMY, D.; PATERSON, D. H.; POULIN, M. J.; CUNNINGHAM, D. A. Cardiorespiratory adaptation with short term training in older men. Eur J Appl Physiol Occup Physiol **65**(3): 203-208, 1992.

GRIFFITHS-JONES, S.; SAINI, H. K.; VAN DONGEN, S.; ENRIGHT, A. J. miRBase: tools for microRNA genomics. Nucleic Acids Res **36**(Database issue): D154-158, 2008.

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.

HAMER, J.; FLEMING, J.; SHINEBOURNE, E. Effect of walking on blood-pressure in systemic hypertension. Lancet **2**(7507): 114-118, 1967.

HAMMOND, S. M. Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. FEBS Lett **579**(26): 5822-5829, 2005.

HANSON, J. S.; NEDDE, W. H. Preliminary observations on physical training for hypertensive males. Circ Res **27**(1 Suppl 1): 49-53, 1970.

HASHIMOTO, N. Y.; FERNANDES, T.; SOCI, U. P.; OLIVEIRA, E. M. Determinantes Moleculares da Hipertrofia Cardíaca Induzida por Diferentes Volumes de Treinamento Aeróbio. Revista Brasileira de Cardiologia **24**(3) 2011.

HAYKOWSKY, M.; SCOTT, J.; ESCH, B.; SCHOPFLOCHER, D.; MYERS, J.; PATERSON, I.; WARBURTON, D.; JONES, L.; CLARK, A. M. A meta-analysis of the effects of exercise training on left ventricular remodeling following myocardial infarction: start early and go longer for greatest exercise benefits on remodeling. Trials **12**: 92, 2011.

HEPPLE, R. T.; HAGEN, J. L.; KRAUSE, D. J.; JACKSON, C. C. Aerobic power declines with aging in rat skeletal muscles perfused at matched convective O₂ delivery. J Appl Physiol **94**(2): 744-751, 2003.

HOLLOSZY, J. O. Adaptations of muscular tissue to training. Prog Cardiovasc Dis **18**(6): 445-458, 1976.

HOLLOSZY, J. O.; COYLE, E. F. Adaptations of skeletal muscle to endurance exercise and their metabolic consequences. J Appl Physiol **56**(4): 831-838, 1984.

HUONKER, M.; HALLE, M.; KEUL, J. Structural and functional adaptations of the cardiovascular system by training. Int J Sports Med **17 Suppl 3**: S164-172, 1996.

IEMITSU, M.; MIYAUCHI, T.; MAEDA, S.; SAKAI, S.; FUJII, N.; MIYAZAKI, H.; KAKINUMA, Y.; MATSUDA, M.; YAMAGUCHI, I. Cardiac hypertrophy by hypertension and exercise training exhibits different gene expression of enzymes in energy metabolism. Hypertens Res **26**(10): 829-837, 2003.

JACKSON, R. J.; STANDART, N. How do microRNAs regulate gene expression? Sci STKE **2007**(367): re1, 2007.

JALIL, J. E.; DOERING, C. W.; JANICKI, J. S.; PICK, R.; SHROFF, S. G.; WEBER, K. T. Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle. Circ Res **64**(6): 1041-1050, 1989.

JALIL, J. E.; JANICKI, J. S.; PICK, R.; ABRAHAMS, C.; WEBER, K. T. Fibrosis-induced reduction of endomyocardium in the rat after isoproterenol treatment. Circ Res **65**(2): 258-264, 1989.

JENNINGS, G.; NELSON, L.; DEWAR, E.; KORNER, P.; ESLER, M.; LAUFER, E. Antihypertensive and hemodynamic effects of one year's regular exercise. Journal of Hypertension **4**: S659-661, 1986.

JOCHEM, W.; SOTO, B.; KARP, R. B.; RUSSELL, R. O., JR.; HOLT, J. H.; BARCIA, A. Radiographic anatomy of the coronary collateral circulation. Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med **116**(1): 50-61, 1972.

- KANNEL, W. B. Epidemiological aspects of arterial hypertension. Arch Inst Cardiol Mex **47**(3): 320-328, 1977.
- KEUL, J.; DICKHUTH, H. H.; LEHMANN, M.; STAIGER, J. The athlete's heart-haemodynamics and structure. Int J Sports Med **3 Suppl 1**: 33-43, 1982.
- KIM, V. N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. Nat Rev Mol Cell Biol **6**(5): 376-385, 2005.
- KOCH, L. G.; BRITTON, S. L. Artificial selection for intrinsic aerobic endurance running capacity in rats. Physiol Genomics **5**(1): 45-52, 2001.
- KOREN, M. J.; DEVEREUX, R. B.; CASALE, P. N.; SAVAGE, D. D.; LARAGH, J. H. Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in uncomplicated essential hypertension. Ann Intern Med **114**(5): 345-352, 1991.
- KRAMSCH, D. M.; ASPEN, A. J.; ABRAMOWITZ, B. M.; KREIMENDAHL, T.; HOOD, W. B., JR. Reduction of coronary atherosclerosis by moderate conditioning exercise in monkeys on an atherogenic diet. N Engl J Med **305**(25): 1483-1489, 1981.
- KRIEGER, J. K. Hipertensão arterial e hipertrofia cardíaca. . Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo **5**(3) 1995.
- LAGOS-QUINTANA, M.; RAUHUT, R.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. Science **294**(5543): 853-858, 2001.
- LAMPMAN, R. M.; SCHTEINGART, D. E. Effects of exercise training on glucose control, lipid metabolism, and insulin sensitivity in hypertriglyceridemia and non-insulin dependent diabetes mellitus. Med Sci Sports Exerc **23**(6): 703-712, 1991.
- LAU, N. C.; LIM, L. P.; WEINSTEIN, E. G.; BARTEL, D. P. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. Science **294**(5543): 858-862, 2001.
- LAUSCHKE, J.; MAISCH, B. Athlete's heart or hypertrophic cardiomyopathy? Clin Res Cardiol **98**(2): 80-88, 2009.
- LEE, R. C.; AMBROS, V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. Science **294**(5543): 862-864, 2001.
- 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. I.; CHO, J. Y.; KIM, M. H.; KIM, K. B.; LEE, D. J.; LEE, K. S. Effects of exercise training on pathological cardiac hypertrophy related gene expression and apoptosis. Eur J Appl Physiol **97**(2): 216-224, 2006.

LEVY, D. Left ventricular hypertrophy. Epidemiological insights from the Framingham Heart Study. Drugs **35 Suppl 5**: 1-5, 1988.

LEVY, D.; GARRISON, R. J.; SAVAGE, D. D.; KANNEL, W. B.; CASTELLI, W. P. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. N Engl J Med **322**(22): 1561-1566, 1990.

LEVY, D.; SALOMON, M.; D'AGOSTINO, R. B.; BELANGER, A. J.; KANNEL, W. B. Prognostic implications of baseline electrocardiographic features and their serial changes in subjects with left ventricular hypertrophy. Circulation **90**(4): 1786-1793, 1994.

LEWIS, S. F.; THOMPSON, P.; ARESKOG, N. H.; MARCONYAK, M.; VODAK, P.; DE BUSK, R.; HASKELL, W. L. Endurance training and heart rate control studied by combined parasympathetic and B-adrenergic blockade. International Journal of Sports Medicine **1**: 42-49, 1980.

LIM, L. P.; GLASNER, M. E.; YEKTA, S.; BURGE, C. B.; BARTEL, D. P. Vertebrate microRNA genes. Science **299**(5612): 1540, 2003.

MACMAHON, S.; COLLINS, G.; RAUTAHARJU, P.; CUTLER, J.; NEATON, J.; PRINEAS, R.; CROW, R.; STAMLER, J. Electrocardiographic left ventricular hypertrophy and effects of antihypertensive drug therapy in hypertensive participants in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. Am J Cardiol **63**(3): 202-210, 1989.

MALEKAR, P.; HAGENMUELLER, M.; ANYANWU, A.; BUSS, S.; STREIT, M. R.; WEISS, C. S.; WOLF, D.; RIFFEL, J.; BAUER, A.; KATUS, H. A.; HARDT, S. E. Wnt signaling is critical for maladaptive cardiac hypertrophy and accelerates myocardial remodeling. Hypertension **55**(4): 939-945, 2010.

MARON, B. J.; PELLICCIA, A. The heart of trained athletes: cardiac remodeling and the risks of sports, including sudden death. Circulation **114**(15): 1633-1644, 2006.

MARQUES, C. M.; NASCIMENTO, F. A.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; AGUILA, M. B. Exercise training attenuates cardiovascular adverse remodeling in adult ovariectomized spontaneously hypertensive rats. Menopause **13**(1): 87-95, 2006.

MASAKI, S.; OHTSUKA, R.; ABE, Y.; MUTA, K.; UMEMURA, T. Expression patterns of microRNAs 155 and 451 during normal human erythropoiesis. Biochem Biophys Res Commun **364**(3): 509-514, 2007.

MATHEWS, D. K.; FOX, E. L. The physiological basis of physical education and athletics. London, 1976.

MCMULLEN, J. R.; JENNINGS, G. L. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. Clin Exp Pharmacol Physiol **34**(4): 255-262, 2007.

MEDEIROS, A.; OLIVEIRA, E. M.; GIANOLLA, R.; CASARINI, D. E.; NEGRAO, C. E.; BRUM, P. C. Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. Braz J Med Biol Res **37**(12): 1909-1917, 2004.

MEDEIROS, A.; ROLIM, N. P.; OLIVEIRA, R. S.; ROSA, K. T.; MATTOS, K. C.; CASARINI, D. E.; IRIGOYEN, M. C.; KRIEGER, E. M.; KRIEGER, J. E.; NEGRAO, C. E.; BRUM, P. C. Exercise training delays cardiac dysfunction and prevents calcium handling abnormalities in sympathetic hyperactivity-induced heart failure mice. J Appl Physiol **104**(1): 103-109, 2008.

MELO, R. M.; MARTINHO, E., JR.; MICHELINI, L. C. Training-induced, pressure-lowering effect in SHR: wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles. Hypertension **42**(4): 851-857, 2003.

NISHI, H.; ONO, K.; HORIE, T.; NAGAO, K.; KINOSHITA, M.; KUWABARA, Y.; WATANABE, S.; TAKAYA, T.; TAMAKI, Y.; TAKANABE-MORI, R.; WADA, H.; HASEGAWA, K.; IWANAGA, Y.; KAWAMURA, T.; KITA, T.; KIMURA, T. MicroRNA-27a regulates beta cardiac myosin heavy chain gene expression by targeting thyroid hormone receptor beta1 in neonatal rat ventricular myocytes. Mol Cell Biol **31**(4): 744-755, 2010.

O'TOOLE, M. L.; HILLER, W. D. B.; CROSBY, L. O.; DOUGLAS, P. S.; PISARELLO, J. B.; L., M. J. Cardiovascular responses to prolonged cycling and running. Annals Sports Medicine. **3**: 124-130, 1987.

OHLER, U.; YEKTA, S.; LIM, L. P.; BARTEL, D. P.; BURGE, C. B. Patterns of flanking sequence conservation and a characteristic upstream motif for microRNA gene identification. RNA **10**(9): 1309-1322, 2004.

OLENA, A. F.; PATTON, J. G. Genomic organization of microRNAs. J Cell Physiol **222**(3): 540-545, 2009.

OLIVEIRA, E. M.; KRIEGER, J. E. Hipertrofia cardíaca e treinamento físico: Aspectos moleculares. Hipertensão **5**: 73-78, 2002.

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

OLIVEIRA, E. M.; TANG, Y. L.; QIAN, K.; SHEN, L.; ONG, L.; PHILLIPS, I. M. Abstract 3822: Different microRNA In Mouse Heart, Cardiac Stem Cells And Cardiac Stem Cells With GATA4, Indicate Different Sets Of microRNA Involved In Stem Cell Differentiation By Gene Repression. Circulation **s. 491**: 118, 2008.

OLSEN, P. H.; AMBROS, V. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. Dev Biol **216**(2): 671-680, 1999.

ONO, K.; KUWABARA, Y.; HAN, J. MicroRNAs and cardiovascular diseases. FEBS J **278**(10): 1619-1633, 2011.

PAFFENBARGER, R. S., JR.; HYDE, R. T.; WING, A. L.; LEE, I. M.; JUNG, D. L.; KAMPERT, J. B. The association of changes in physical-activity level and other lifestyle characteristics with mortality among men. N Engl J Med **328**(8): 538-545, 1993.

PELLICCIA, A.; DI PAOLO, F. M.; CORRADO, D.; BUCCOLIERI, C.; QUATTRINI, F. M.; PISICCHIO, C.; SPATARO, A.; BIFFI, A.; GRANATA, M.; MARON, B. J. Evidence for efficacy of the Italian national pre-participation screening programme for identification of hypertrophic cardiomyopathy in competitive athletes. Eur Heart J **27**(18): 2196-2200, 2006.

PITSAVOS, C.; KAVOURAS, S. A.; PANAGIOTAKOS, D. B.; ARAPI, S.; ANASTASIOU, C. A.; ZOMBOLOS, S.; STRAVOPODIS, P.; MANTAS, Y.; KOGIAS, Y.; ANTONOULAS, A.; STEFANADIS, C. Physical activity status and acute coronary syndromes survival The GREECS (Greek Study of Acute Coronary Syndromes) study. J Am Coll Cardiol **51**(21): 2034-2039, 2008.

PLUIM, B. M.; ZWINDERMAN, A. H.; VAN DER LAARSE, A.; VAN DER WALL, E. E. The athlete's heart. A meta-analysis of cardiac structure and function. Circulation **101**(3): 336-344, 2000.

RAAB, W. Metabolic protection and reconditioning of the heart muscle through habitual physical exercise. Ann Intern Med **53**: 87-105, 1960.

REINHART, B. J.; SLACK, F. J.; BASSON, M.; PASQUINELLI, A. E.; BETTINGER, J. C.; ROUGVIE, A. E.; HORVITZ, H. R.; RUVKUN, G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. Nature **403**(6772): 901-906, 2000.

REINHART, B. J.; WEINSTEIN, E. G.; RHOADES, M. W.; BARTEL, B.; BARTEL, D. P. MicroRNAs in plants. Genes Dev **16**(13): 1616-1626, 2002.

ROCHA, F. L.; CARMO, E. C.; ROQUE, F. R.; HASHIMOTO, N. Y.; ROSSONI, L. V.; FRIMM, C.; ANEAS, I.; NEGRAO, 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): H3575-3583, 2007.

ROLIM, N. P.; MEDEIROS, A.; ROSA, K. T.; MATTOS, K. C.; IRIGOYEN, M. C.; KRIEGER, E. M.; KRIEGER, J. E.; NEGRAO, C. E.; BRUM, P. C. Exercise training improves the net balance of cardiac Ca²⁺ handling protein expression in heart failure. Physiol Genomics **29**(3): 246-252, 2007.

RUBIN, S. A.; FISHBEIN, M. C.; SWAN, H. J. Compensatory hypertrophy in the heart after myocardial infarction in the rat. J Am Coll Cardiol **1**(6): 1435-1441, 1983.

RUWHOF, C.; VAN DER LAARSE, A. Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. Cardiovasc Res **47**(1): 23-37, 2000.

SALTIN, B. Hemodynamic adaptations to exercise. Am J Cardiol **55**(10): 42D-47D, 1985.

SCHAIBLE, T. F.; MALHOTRA, A.; CIAMBRONE, G. J.; SCHEUER, J. Chronic swimming reverses cardiac dysfunction and myosin abnormalities in hypertensive rats. J Appl Physiol **60**(4): 1435-1441, 1986.

SCHAIBLE, T. F.; SCHEUER, J. Effects of physical training by running or swimming on ventricular performance of rat hearts. J Appl Physiol **46**(4): 854-860, 1979.

SCHLUTER, K. D.; SCHRECKENBERG, R.; DA COSTA REBELO, R. M. Interaction between exercise and hypertension in spontaneously hypertensive rats: a meta-analysis of experimental studies. Hypertens Res **33**(11): 1155-1161, 2010.

SCHULTZ, R. L.; SWALLOW, J. G.; WATERS, R. P.; KUZMAN, J. A.; REDETZKE, R. A.; SAID, S.; DE ESCOBAR, G. M.; GERDES, A. M. Effects of excessive long-term exercise on cardiac function and myocyte remodeling in hypertensive heart failure rats. Hypertension **50**(2): 410-416, 2007.

SCHWARZ, D. S.; HUTVAGNER, G.; DU, T.; XU, Z.; ARONIN, N.; ZAMORE, P. D. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. Cell **115**(2): 199-208, 2003.

SEALS, D. R.; HAGBERG, J. M.; SPINA, R. J.; ROGERS, M. A.; SCHECHTMAN, K. B.; EHSANI, A. A. Enhanced left ventricular performance in endurance trained older men. Circulation **89**(1): 198-205, 1994.

SHAPIRO, L. M. The morphologic consequences of systemic training. Cardiol Clin **15**(3): 373-379, 1997.

SHARMA, R. V.; TOMANEK, R. J.; BHALLA, R. C. Effect of swimming training on cardiac function and myosin ATPase activity in SHR. J Appl Physiol **59**(3): 758-765, 1985.

SILVA, G. J.; BRUM, P. C.; NEGRAO, C. E.; KRIEGER, E. M. Acute and chronic effects of exercise on baroreflexes in spontaneously hypertensive rats. Hypertension **30**(3 Pt 2): 714-719, 1997.

SILVA, M. S.; BOCCHI, E. A.; GUIMARÃES, G. V.; PADOVANI, C. R.; SILVA, M. H. G. G.; PEREIRA, S. F.; FONTES, R. D. Benefício do Treinamento Físico no Tratamento da insuficiência Cardíaca. Estudo com Grupo Controle. Arquivos Brasileiros de Cardiologia **79**(4): 351-356, 2002.

- 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): 665-673, 2011.
- STONE, M. H.; FLECK, S. J.; TRIPLETT, N. T.; KRAEMER, W. J. Health- and performance-related potential of resistance training. Sports Med **11**(4): 210-231, 1991.
- STRATTON, J. R.; LEVY, W. C.; CERQUEIRA, M. D.; SCHWARTZ, R. S.; ABRASS, I. B. Cardiovascular responses to exercise. Effects of aging and exercise training in healthy men. Circulation **89**(4): 1648-1655, 1994.
- THUM, T.; CATALUCCI, D.; BAUERSACHS, J. MicroRNAs: novel regulators in cardiac development and disease. Cardiovasc Res **79**(4): 562-570, 2008.
- TIPTON, C. M. Exercise, training and hypertension: an update. Exerc Sport Sci Rev **19**: 447-505, 1991.
- TOTH, M. J.; POEHLMAN, E. T. Effects of exercise on daily energy expenditure. Nutr Rev **54**(4 Pt 2): S140-148, 1996.
- URHAUSEN, A.; KINDERMANN, W. Sports-specific adaptations and differentiation of the athlete's heart. Sports Med **28**(4): 237-244, 1999.
- VALENCIA-SANCHEZ, M. A.; LIU, J.; HANNON, G. J.; PARKER, R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. Genes Dev **20**(5): 515-524, 2006.
- VAN ROOIJ, E.; OLSON, E. N. MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. J Clin Invest **117**(9): 2369-2376, 2007.
- VAN ROOIJ, E.; SUTHERLAND, L. B.; LIU, N.; WILLIAMS, A. H.; MCANALLY, J.; GERARD, R. D.; RICHARDSON, J. A.; OLSON, E. N. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. Proc Natl Acad Sci U S A **103**(48): 18255-18260, 2006.
- VAN ROOIJ, E.; SUTHERLAND, L. B.; THATCHER, J. E.; DIMAIO, J. M.; NASEEM, R. H.; MARSHALL, W. S.; HILL, J. A.; OLSON, E. N. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. Proc Natl Acad Sci U S A **105**(35): 13027-13032, 2008.
- VERAS-SILVA, A. S.; MATTOS, K. C.; GAVA, N. S.; BRUM, P. C.; NEGRAO, C. E.; KRIEGER, E. M. Low-intensity exercise training decreases cardiac output and hypertension in spontaneously hypertensive rats. Am J Physiol **273**(6 Pt 2): H2627-2631, 1997.
- WANG, J.; XU, R.; LIN, F.; ZHANG, S.; ZHANG, G.; HU, S.; ZHENG, Z. MicroRNA: novel regulators involved in the remodeling and reverse remodeling of the heart. Cardiology **113**(2): 81-88, 2009.

WEINECK. Manual de treinamento esportivo. São Paulo, 1986.

XU, X. D.; SONG, X. W.; LI, Q.; WANG, G. K.; JING, Q.; QIN, Y. W. Attenuation of microRNA-22 derepressed PTEN to effectively protect rat cardiomyocytes from hypertrophy. J Cell Physiol 2011.

ZAMO, F. S.; LACCHINI, S.; MOSTARDA, C.; CHIAVEGATO, S.; SILVA, I. C. M.; OLIVEIRA, E. M.; IRIGOYEN, M. C. Hemodynamic, morphometric and autonomic patterns hypertensive rats - Renin-Angiotensin-System modulation. Clinics **65**: 85-92, 2010.

ZAMO, F. S.; BARAUNA, V. G.; CHIAVEGATTO, S.; IRIGOYEN, M. C.; OLIVEIRA, E. M. The renin-angiotensin system is modulated by swimming training depending on the age of spontaneously hypertensive rats. Life Sciences **18**: 93-99, 2011.

ZHANG, B.; WANG, Q.; PAN, X. MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants. J Cell Physiol **210**(2): 279-289, 2007.

ZHANG, X.; WANG, X.; ZHU, H.; ZHU, C.; WANG, Y.; PU, W. T.; JEGGA, A. G.; FAN, G. C. Synergistic effects of the GATA-4-mediated miR-144/451 cluster in protection against simulated ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte death. J Mol Cell Cardiol **49**(5): 841-850, 2010.

ZIERHUT, W.; STUDER, R.; LAURENT, D.; KASTNER, S.; ALLEGRINI, P.; WHITEBREAD, S.; CUMIN, F.; BAUM, H. P.; DE GASPARO, M.; DREXLER, H. Left ventricular wall stress and sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase gene expression in renal hypertensive rats: dose-dependent effects of ACE inhibition and AT1-receptor blockade. Cardiovasc Res **31**(5): 758-768, 1996.