

Efeito Cardioprotetor de Crocina Combinado com Exercício Voluntário em Ratos: Papel do Mir-126 e Mir-210 na Angiogênese Cardíaca

Cardioprotective Effect of Crocin Combined with Voluntary Exercise in Rat: Role of Mir-126 and Mir-210 in Heart Angiogenesis

Vajihe Ghorbanzadeh, Mustafa Mohammadi, Hassan Dariushnejad, Alireza Abhari, Leila Chodari, Gisou Mohaddes
Drug Applied Research Center - Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz – Irã

Resumo

Fundamentos: A crocina tem uma vasta gama de atividades biológicas, tais como a proteção cardiovascular. Estudos epidemiológicos recentes demonstraram que o exercício reduz a morbidade e a mortalidade cardiovasculares na população em geral.

Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da crocina e do exercício voluntário nos níveis de expressão miR-126 e miR-210 e na angiogênese no tecido cardíaco.

Métodos: Os animais foram divididos em 4 grupos: controle, exercício, crocina e exercício-crocina. Os animais receberam a administração oral de crocina (50 mg/kg) ou realizaram exercício voluntário sozinhos ou em conjunto durante 8 semanas. Os níveis de proteína Akt, ERK1/2, e a expressão de miR-126 e miR-210 foram medidos no tecido cardíaco. O método imunohistoquímico foi utilizado para detectar CD31 no tecido cardíaco.

Resultados: Os níveis de Akt e ERK1/2 do tecido cardíaco foram maiores no grupo tratado com crocina e no grupo de exercício voluntário após 8 semanas. A combinação de crocina e exercício também aumentou significativamente os níveis de Akt e ERK1/2 no tecido cardíaco. A expressão de MiR-126, miR-210 e CD31 no coração aumentou tanto em no grupo de crocina como no grupo de exercício voluntário em comparação com o grupo de controle. Além disso, a combinação de exercício e crocina amplificou seu efeito na expressão de miR-126 e miR-210 e angiogênese.

Conclusão: A Crocina e o exercício voluntário melhoram a angiogênese cardíaca possivelmente através do aumento da expressão de miR-126 e miR-210. O exercício voluntário e a suplementação dietética com crocina podem ter efeitos benéficos na prevenção de doenças cardiovasculares. (Arq Bras Cardiol. 2017; 109(1):54-62)

Palavras-chave: Ratos; Moduladores da Angiogênese; Exercício; Crocus Sativus; Antioxidantes; miR-126, miR-210.

Abstract

Background: Crocin is reported to have a wide range of biological activities such as cardiovascular protection. Recent epidemiologic studies have shown that exercise reduces cardiovascular morbidity and mortality in the general population.

Objective: The aim of this study was to evaluate the effect of crocin and voluntary exercise on miR-126 and miR-210 expression levels and angiogenesis in the heart tissue.

Methods: Animals were divided into 4 groups: control, exercise, crocin, and exercise-crocin. Animals received oral administration of crocin (50 mg/kg) or performed voluntary exercise alone or together for 8 weeks. Akt, ERK1/2 protein levels, miR-126 and miR-210 expression were measured in the heart tissue. Immunohistochemical method was used to detect CD31 in the heart tissue.

Results: Akt and ERK1/2 levels of the heart tissue were higher in crocin treated group and voluntary exercise trained group after 8 weeks. Combination of crocin and exercise also significantly enhanced Akt and ERK1/2 levels in the heart tissue. MiR-126, miR-210 expression and CD31 in the heart increased in both crocin and voluntary exercise groups compared with control group. In addition, combination of exercise and crocin amplified their effect on miR-126 and miR-210 expression, and angiogenesis.

Conclusion: Crocin and voluntary exercise improve heart angiogenesis possibly through enhancement of miR-126 and miR-210 expression. Voluntary exercise and diet supplementation with crocin could have beneficial effects in prevention of cardiovascular disease. (Arq Bras Cardiol. 2017; 109(1):54-62)

Keywords: Rats; Angiogenesis Modulating Agents; Exercise; Crocus Sativus; Antioxidants; miR-126; miR-210.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Gisou Mohaddes •
Golgasht Ave. 5166614766. Meadle East. Tabriz – East Azarbaijan - Irã
E-mail: gmohades@yahoo.com
Artigo recebido em 14/07/2016, revisado em 20/01/2017, aceito em 09/03/2017

DOI: 10.5935/abc.20170087

Introdução

A crocina é um componente bioativo encontrado nos frutos da gardênia e nos estigmas do açafraão.¹ A crocina tem sido usada há muito tempo na medicina tradicional e tem sido relatada como tendo várias atividades farmacológicas, como antioxidante, anticancerígena, anti-inflamatória, efeitos ateroscleróticos e proteção contra doenças cardiovasculares.² Os efeitos cardioprotetores da crocina têm sido relatados em alguns estudos que estão relacionados à modulação de atividades enzimáticas antioxidantes endógenas e biomarcadores cardíacos.^{3,4} Evidências recentes indicaram o efeito protetor da crocina na lesão por hipóxia das células miocárdicas devido à elevação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), como fator proangiogênico.⁵

A atividade física desempenha um papel crítico no metabolismo, função cardiovascular e função imunológica. Nos últimos anos, tornou-se evidente que o treinamento físico é uma estratégia terapêutica muito poderosa para a prevenção do desenvolvimento e progressão da doença cardiovascular.⁶ No entanto, exercícios exaustivos podem ser problemáticos, pois são estressantes pela produção de espécies reativas de oxigênio e podem causar danos no tecido muscular e outros órgãos.^{7,8} Sugeriu-se que o exercício voluntário pode ser um modelo melhor com mias efeitos benéficos.⁹ No modelo animal de exercício voluntário, o animal tem livre acesso a uma roda de corrida e eua a roda de acordo com seu limiar fisiológico para a atividade física. Descobriu-se que a atividade física desencadeia a extensão da rede capilar ou angiogênese. Sabe-se que esse processo é dependente do VEGF.¹⁰ No entanto, os mecanismos subjacentes ao exercício ainda não foram totalmente elucidados.

Os micro-RNAs (miRs) são pequenos RNAs de 18 a 25 nucleótidos não codificantes que desempenham um papel chave na regulação da expressão de genes, inibindo a tradução de proteínas ou aumentando a degradação do RNA mensageiro.^{11,12} A sua participação nas doenças cardiovasculares tem sido reconhecida nos últimos anos.¹¹⁻¹³ O MiR-126 é um dos poucos miRNAs que é um miRNA específico de células endoteliais e desempenha um papel essencial na neoangiogênese. O MiRNA-126 é fortemente expresso no endotélio cardíaco e alvos Sprouty relacionados à proteína-1 (Sprd-1), PIK3R2, uma subunidade reguladora de PI3K.^{14,15} A desregulação desses alvos ativa as quinases ERK e Akt e melhora a ação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).^{16,17} O VEGF exerce muitos dos seus efeitos na angiogênese através das vias Akt e ERK1/2. Durante a vasculogênese do desenvolvimento, a via Akt regula a especificação venosa, enquanto a via ERK regula a especificação arterial.^{18,19} O MiR-210 em células endoteliais normóxicas estimulou a formação de estruturas semelhantes a capilares, bem como a migração celular impulsionada pelo VEGF.²⁰ A indução de MiR-210 é uma característica praticamente constante da resposta hipóxica que é importante na patogênese de várias doenças humanas como as cardíacas.²¹

De acordo com os efeitos de vantagem da crocina e do exercício voluntário sobre o diabetes mencionado acima, a hipótese é que, em comparação com crocina ou exercício voluntário sozinho, 8 semanas de crocina combinadas com exercício voluntário em ratos diabéticos iria produzir uma

maior melhoria nas complicações cardiovasculares do diabetes tipo 2. O presente estudo foi realizado para esclarecer o efeito da crocina e do exercício voluntário na expressão de miR-126 e miR-210 em miócitos cardíacos de ratos diabéticos.

Métodos

Animais

Ratos Wistar machos (200-250g) foram obtidos da Faculdade de Medicina de Tabriz (Irã-Tabriz). Os animais foram alojados numa sala com uma temperatura constante de 24°C, uma humidade relativa de 50% e um ciclo de 12h escuridão / luz com acesso a alimentos e água à vontade. Os animais do grupo de exercícios foram colocados em unidades individuais de gaiolas de rodas, enquanto os grupos sedentários foram alojados em gaiolas de plástico normais. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal (documento número 92197) de acordo com a instrução para o cuidado e uso de animais de laboratório preparado pela Universidade de Ciências Médicas de Tabriz.

Design experimental

Quarenta animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos. Dez animais foram alocados para cada grupo experimental no início do estudo. Grupo 1: Ratos receberam solução de NaCl a 0,9% como grupo de controle (Con). Grupo 2: Os ratos receberam uma dose única de crocina (50 mg/kg) durante oito semanas (Cro). Grupo 3: Os ratos realizaram exercício voluntário durante oito semanas (Exe). Grupo 4: Os animais receberam crocina e realizaram, simultaneamente, exercício voluntário durante oito semanas (Cro-Exe). O pó de crocina (Sigma, Alemanha) foi diluído por solução salina normal (0,9%). A crocina foi administrada por gavagem (50 mg/kg) 6 dias por semana durante 8 semanas.²² Também, a solução de NaCl a 0,9% foi administrada por gavagem nos grupos 1 e 3 durante a experiência.

Para a avaliação do exercício voluntário, os ratos foram alojados individualmente numa gaiola contendo uma roda (circunferência de 1,00 m, TajhizGostar). Cada rato de exercício tinha uma roda de funcionamento separada na sua gaiola que lhe permitiu correr voluntariamente durante as 8 semanas do estudo. Esta roda de aço inoxidável foi equipada com um contador magnético digital que foi ativado pela rotação da roda e as revoluções da roda foram registradas diariamente. Então a distância de corrida por dia foi calculada como o número de rotações de roda por dia. Os ratos com uma distância de corrida inferior a ~ 2000 m por dia foram eliminados antes da análise estatística.²³ Considerando os critérios de exclusão (exercício abaixo dos protocolos padrão) foi realizada análise estatística para 7 animais em cada grupo.

Quantificação de Akt e ERK1/2 no coração por ELISA

No último dia da experiência, os ratos foram sacrificados sob anestesia profunda com cetamina/xilazina (88/10 mg/kg, i.p.). O tecido cardíaco foi imediatamente removido e lavado com soro fisiológico 0,9%. As amostras de tecido foram pesadas, homogeneizadas em PBS (pH 7,2-7,4) e centrifugadas durante

20 min à velocidade de 3000 rpm e 4°C. Em seguida, os sobrenadantes foram recolhidos em novo tubo e os níveis de Akt e ERK1/2 foram medidos utilizando kits sanduíche ELISA de rato. O ensaio ELISA foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. A ativação da proteína Akt por fosforilação no resíduo de serina 473 (P-Akt) e a fosforilação da ERK1/2 (PT202/Y204) foi analisada com ELISA (Akt: Cat. N°. CK-E91385; Hangzhou Eastbiopharm Co., Ltd., Hangzhou, China. ERK1/2: Abcam Cambridge, UK) e normalizada para a concentração de proteína total para cada amostra como determinado pelo ensaio de Bradford.²⁴

Extração total de RNA, síntese de cDNA e PCR em tempo real

A expressão de miR-126 e miR-210 foi avaliada por qRT-PCR. Foram realizados ensaios em triplicado para cada amostra de RNA. O MicroRNA foi extraído do tecido cardíaco utilizando o kit de isolamento de RNA miRCURYTM (Exiqon, Dinamarca) de acordo com o protocolo do fabricante. O procedimento foi realizado com base na coluna de spin utilizando uma resina patenteada como matriz de separação de RNA de outros componentes celulares. O teor de RNA e a pureza foram medidos a um comprimento de onda de 260-280 nm utilizando o espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington DE 19810 EUA).

A síntese de cDNA foi realizada de acordo com o kit de PCR de miRNA RT LNA universal (Exiqon, Dinamarca). Resumidamente, o RNA total contendo microRNA foi poliadenilado e o cDNA foi sintetizado utilizando um primer poli (T) com uma âncora degenerada 3' e uma etiqueta universal 5'.

Syber Green qPCR Mix adquirido da Exiqon (Dinamarca) e utilizado para PCR em tempo real. O PCR em tempo real foi feito usando Rotor-Gene 6000 Corbett. O método 2^{- $\Delta\Delta C_t$} foi utilizado para determinar níveis quantitativos relativos de miR-126 e miR-210. Os resultados foram expressos como o dobro do grupo de controle. Utilizou-se Mir-1 como o miARN de controle endógeno.

Avaliações imunohistoquímicas

Para a investigação da angiogênese no tecido cardíaco, as amostras do ventrículo esquerdo foram imersas em formol a 10% após excisão, embebidas em parafina e cortadas em fatias de 4 μ m de espessura. As secções foram desparafinadas em xileno e desidratadas numa série graduada de etanol. As lâminas foram incubadas sequencialmente em proteinase K e tratadas com peróxido de hidrogénio a 0,3% para bloquear a atividade de peroxidase endógena. As fatias foram sobrepostas pelo anticorpo primário CD31 (Santa Cruz, EUA) um marcador de angiogênese e incubadas a + 4°C toda a noite. As secções foram então lavadas e incubadas com complexo avidina-biotina padrão (ABC, Santa Cruz) de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, as lâminas foram incubadas em DAB (di-amino-benzidina, Santa Cruz), como cromogénio e coradas por contraste com hematoxilina de Mayer. Finalmente, as secções foram clareadas em xileno, montadas com Entellan e avaliadas por microscópio óptico (Olympus BX 40, Japão). Os capilares foram visualizados no miocárdio como um precipitado

castanho. As estruturas vasculares positivas para CD31 foram contadas para 5 a 6 lâminas por animal e 10 campos por lâmina.

Análise estatística

Os resultados são apresentados como média \pm DP. A análise estatística foi realizada usando o software estatístico SPSS versão 21.0 para Windows. Todos os parâmetros foram testados quanto à normalidade utilizando o teste Kolmogorov-Smirnov de uma amostra. As médias das distâncias diárias percorridas pelos ratos em cada grupo de exercício foram médias para cada semana e foram comparadas utilizando ANOVA de medidas repetidas. A atividade física entre os grupos Exe e Cro-Exe foi analisada utilizando o teste t independente. Para os parâmetros de Akt, ERK, CD31, miR-126 e miR-210, os dados foram analisados utilizando ANOVA bidirecional seguida pelo teste post hoc de Tukey. Um valor p inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

Exercício voluntário

A Figura 1 ilustra a média de distância percorrida por semana durante o período de 8 semanas do experimento. Os animais realizaram voluntariamente uma média de 2,949 \pm 178 m/semana no grupo de exercícios e uma média de 3,090 \pm 140 m/semana no grupo de crocina e exercícios. Não houve diferença significativa na atividade física entre os grupos Exe e Cro-Exe com base em uma análise de teste t independente.

A distância média percorrida aumentou gradualmente nos grupos Exe e Cro-Exe da primeira para a oitava semana. Este aumento no grupo Exe foi significativamente diferente da semana anterior na quarta (p < 0,05) e sexta (p < 0,05) semanas. No grupo Cro-Exe, os animais correram uma distância significativamente maior na segunda (p < 0,01), terceira (p < 0,01), quinta (p < 0,05) e sexta (p < 0,05) do que na semana anterior.

Efeitos da crocina combinada com o exercício voluntário nos níveis de Akt no tecido cardíaco

Após 8 semanas de administração de crocina ou realização de exercício voluntário, o nível de p-Akt aumentou significativamente nos grupos Exe (p < 0,01), Cro (p < 0,01) e Cro-Exe (p < 0,001) em comparação com o grupo Con (Figura 2). Uma comparação entre o grupo Cro-Exe com os grupos Exe e Cro apresentou diferença significativa entre esses grupos (p < 0,01 e p < 0,001, respectivamente).

Efeitos da crocina combinada com o exercício voluntário nos níveis ERK1/2 no tecido cardíaco

A ANOVA de duas vias mostrou que os níveis de p-ERK1/2 foram significativamente mais elevados em ratos tratados com crocina ou em exercícios voluntários do que nos ratos de controle (Exe: p < 0,01, Cro: p < 0,05 e Cro-Exe: p < 0,001). A administração de crocina combinada com

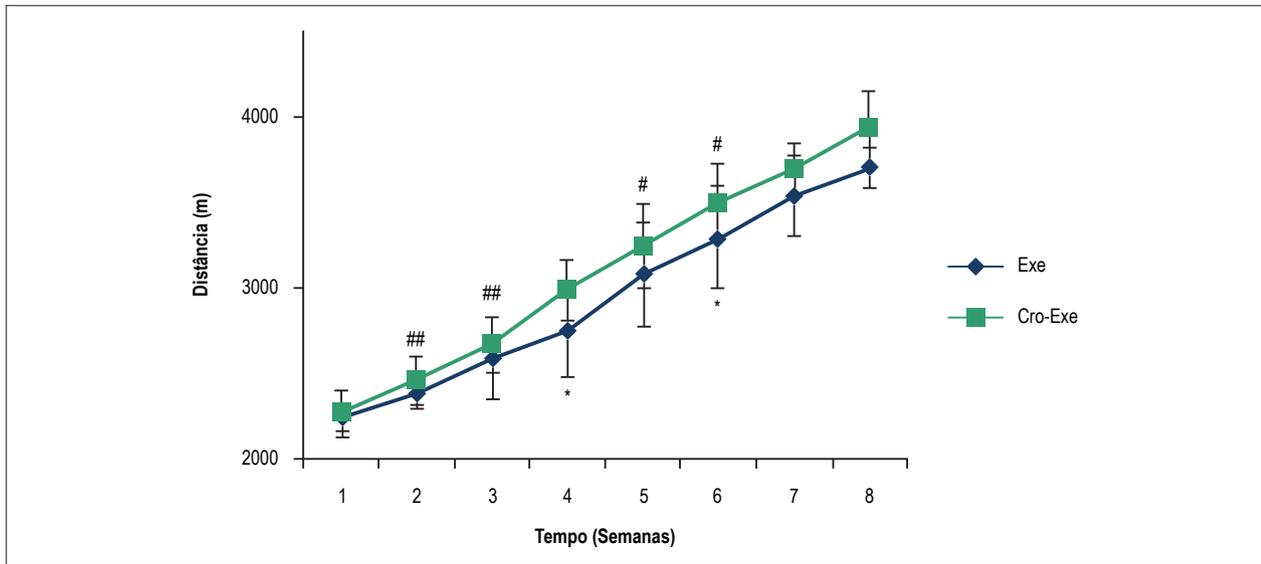


Figura 1 – A média de distância percorrida foi calculada cada semana de acesso à roda (média \pm DP) durante a duração de 8 semanas do experimento, para os grupos Exe e Cro-Exe ($n = 7$ /grupo). Não houve diferença significativa entre os grupos. Animais em ambos os grupos Exe e Cro-Exe aumentaram a sua distância média semanal de corrida nas semanas subsequentes. * $p < 0,05$ indica uma diferença significativa entre as semanas consecutivas no grupo Exe. # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ indicam diferenças significativas entre semanas consecutivas no grupo Cro-Exe.

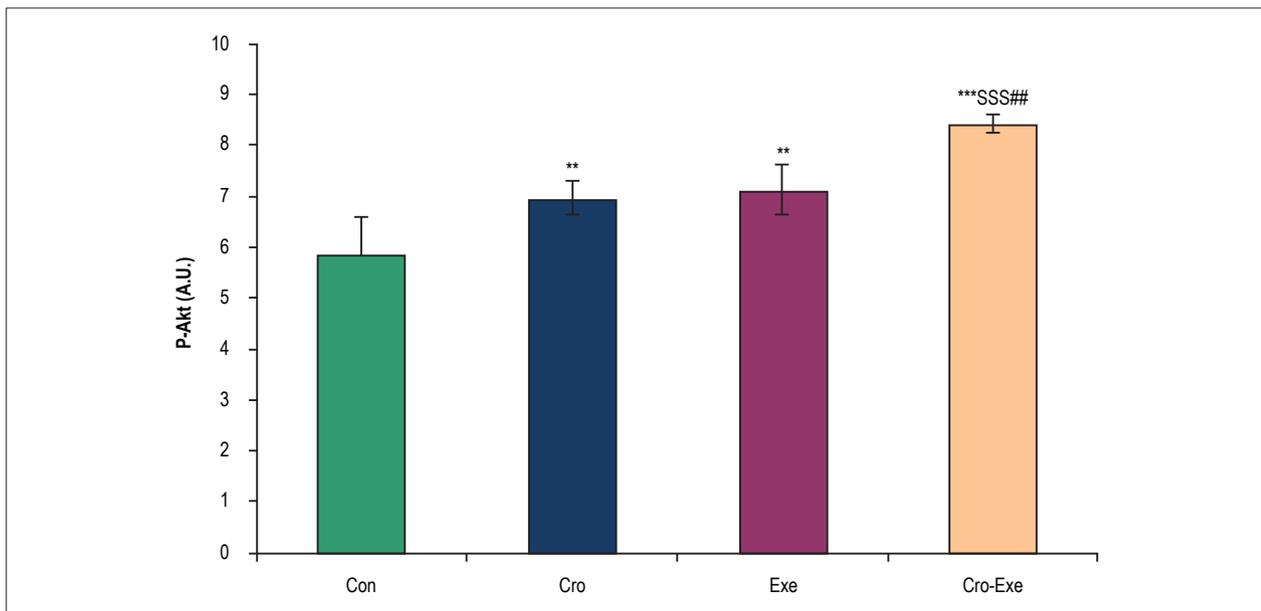


Figura 2 – Efeito da crocina e exercício voluntário sobre os níveis de p-Akt. Os dados são apresentados como média \pm DP para $n = 7$ animais. *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$ indicam diferenças significativas com o grupo controle, SSS $p < 0,001$ indica uma diferença significativa com o grupo Cro, e ## $p < 0,01$ indica uma diferença significativa com o grupo Exe.

exercício aumentou significativamente os níveis de p-ERK1/2 do tecido cardíaco em comparação com os grupos Exe ($p < 0,01$) e Cro ($p < 0,001$) (Figura 3). A Figura 2 também indica que a crocina combinada com o exercício voluntário tem um efeito sinérgico nos níveis de proteína p-ERK1/2 no tecido cardíaco.

Efeitos da crocina combinada com o exercício voluntário na expressão de miR-126 no tecido cardíaco

A ANOVA bidirecional mostrou que a expressão de miR-126 foi significativamente maior em ratos tratados com crocina ($p < 0,001$), exercício voluntário ($p < 0,01$) e combinação de crocina com exercício ($p < 0,001$) do

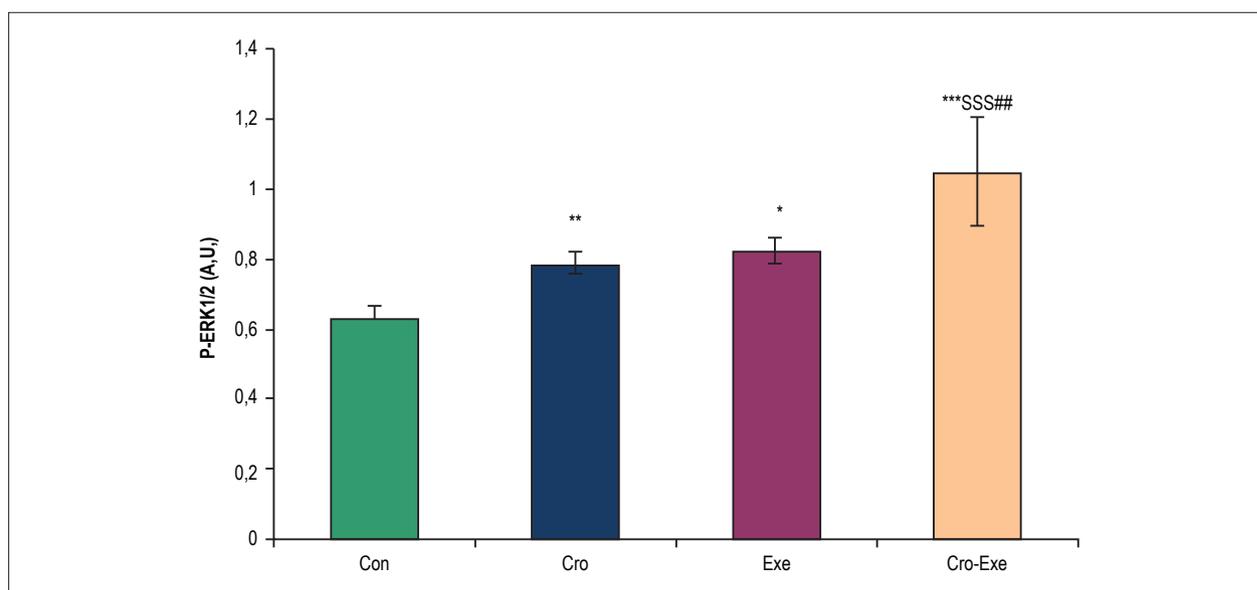


Figura 3 – Efeito da crocina e exercício voluntário sobre os níveis de p-ERK1/2. Os dados são apresentados como média \pm DP para $n = 7$ animais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ indicam diferenças significativas com o grupo de controle. \$\$\$ $p < 0,001$ indica uma diferença significativa com o grupo Cro e ## $p < 0,01$ indica uma diferença significativa com o grupo Exe.

que em ratos controle. Nos ratos submetidos a exercício voluntário e que simultaneamente receberam crocina durante 8 semanas, a expressão do miR-126 cardíaco aumentou significativamente em comparação com os grupos Exe ($p < 0,01$) e Cro ($p < 0,001$) (Figura 4).

Efeitos da crocina combinada com o exercício voluntário na expressão de miR-210 no tecido cardíaco

Conforme ilustrado na Figura 5, após a administração de crocina e a execução de exercícios, o nível de expressão cardíaca de miR-210 foi significativamente aumentado nos grupos Cro e Exe quando comparado com o grupo de controle ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente). Por outro lado, a expressão de miR-210 aumentou significativamente no grupo Cro-Exe em comparação com o grupo controle ($p < 0,001$). Além disso, há uma diferença significativa entre os grupos Cro-Exe e Cro ($p < 0,01$).

Efeitos da crocina combinada com o exercício voluntário em células CD31 + na rede capilar miocárdica

Conforme demonstrado na Figura 6, o número de células CD31 + foi maior nos animais que receberam crocina ($p < 0,05$) ou realizaram exercícios ($p < 0,05$) em comparação com o grupo controle (Figuras 6A, B, C). Além disso, as células CD31 + foram significativamente mais elevadas em seções do coração do grupo Cro-Exe do que nos grupos Exe ($p < 0,01$) e Cro ($p < 0,01$) (Figura 6D). Assim, a combinação de crocina com o exercício voluntário parece aumentar a resposta vasculogênica.

Discussão

No presente estudo, demonstramos que a expressão de miR-126 e miR-210 do tecido cardíaco de ratos aumentou nos

grupos de crocina, exercício voluntário e exercício-crocina. Além disso, a crocina e o exercício voluntário estimularam as proteínas Akt e ERK1/2 e a angiogênese no tecido cardíaco. Pela primeira vez, nosso estudo demonstrou que o miR-126 cardíaco e suas vias relacionadas incluindo Akt e ERK1/2 aumentaram em resposta à crocina combinada com o exercício voluntário em ratos. Além disso, nossos achados mostraram que a administração de crocina e a realização de exercício voluntário aumentaram a expressão do miR-210 cardíaco.

MiR-210, um miRNA específico da hipóxia, depende da ativação de HIF e aumentou após a hipóxia.²⁵ Quando o miR-210 é superexpressado em células endoteliais, a capacidade dessas células para formar vasos sanguíneos torna-se mais pronunciada do que a das células com níveis normais de expressão. Confirmando o papel pró-angiogênico do miR-210, a regulação positiva do miR-210 em células CD34 + aumentou a perfusão tecidual e a densidade capilar em um modelo de isquemia de membros posteriores em ratos.²⁶ Pesquisas prévias indicaram que o miR-210 pode melhorar a angiogênese através da regulação negativa de seu gene alvo, a efrina A3, que é um membro importante da família de efrinas de genes reguladores da angiogênese.²⁷ O tecido cardíaco expressa uma variedade de miRNAs, mas pouco se sabe sobre a resposta angiogênica cardíaca à crocina e exercício.²⁸ O trabalho pré-clínico demonstrou que as injeções intracardíacas com um vetor minicírculo transportando miR-210 em um modelo murino de infarto do miocárdio promoveu melhora significativa do encurtamento fracionário ventricular esquerdo, diminuição da apoptose celular e aumento da neovascularização.²⁹ No presente estudo, observamos que a crocina e o exercício voluntário aumentaram os níveis de expressão de miR-210 no tecido cardíaco usando análise quantitativa da PCS em tempo real. O aumento do miR-210 parece ser dependente do exercício realizado porque o grupo que realizou exercício

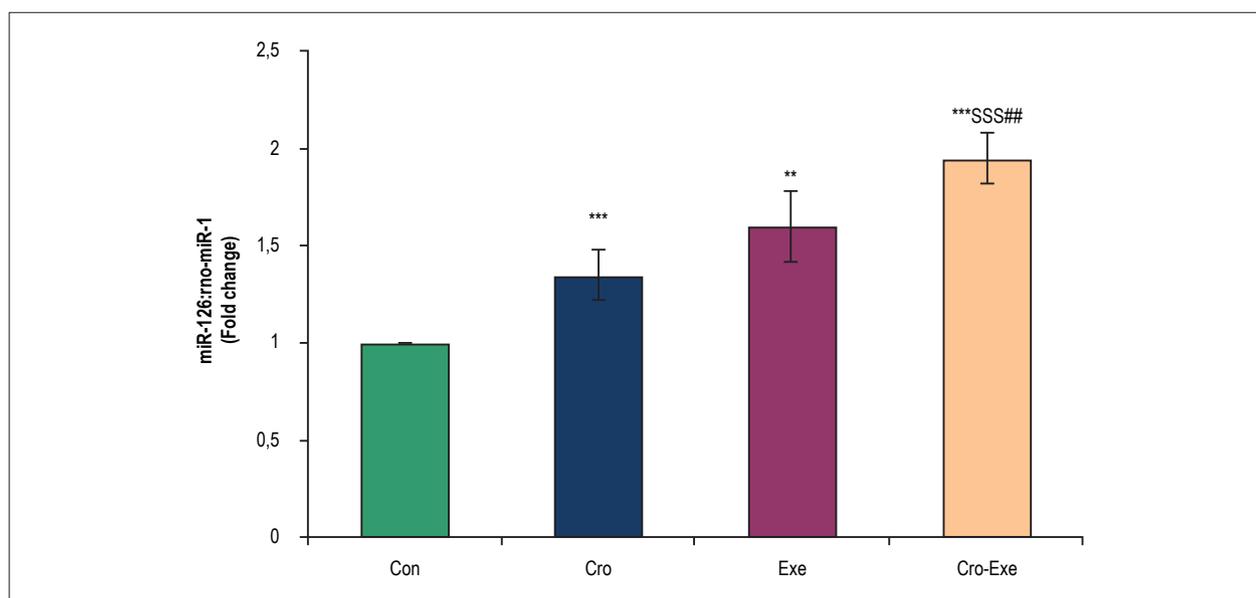


Figura 4 – Efeito da crocina e exercício voluntário nos níveis de expressão de miR-126. Os dados são apresentados como média \pm DP para $n = 7$ animais. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ indicam diferenças significativas com o grupo de controle. SSS $p < 0,001$ indica uma diferença significativa com o grupo Cro e ## $p < 0,01$ indica uma diferença significativa com o grupo Exe.

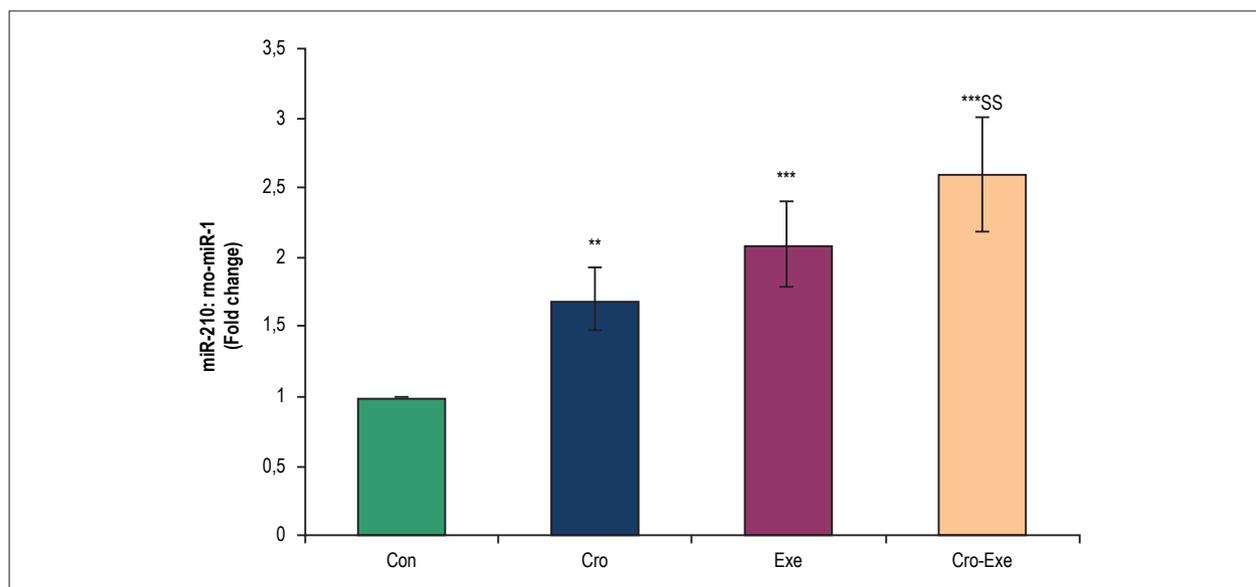


Figura 5 – Efeito da crocina e exercício voluntário sobre os níveis de expressão de miR-210. Os dados são apresentados como média \pm DP para $n = 7$ animais. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ indicam diferenças significativas com o grupo de controle e S $p < 0,001$ indica uma diferença significativa com o grupo Cro.

voluntário mostrou uma expressão mais forte do miR-210 do que o grupo crocina. Um mecanismo provável é que, durante o exercício, podem ocorrer condições hipóxicas locais no músculo cardíaco e a situação hipóxica desencadear um número de respostas fisiológicas como a angiogênese através da expressão de miR-210 induzida por HIF-1 α .^{30,31} Estes dados estão de acordo com as observações feitas por Bye et al.³² quanto ao aumento significativo da expressão de miR-210 em indivíduos com baixa Vo₂max após a atividade de exercício.

MiR-126 é um miR pró-angiogênico, que é fortemente expresso no endotélio cardíaco e aponta diretamente para SPRED1 e PIK3R2 para repressão e funções afim de promover a sinalização VEGF.^{14,15} De fato, o miR-126 ativa quinases de sobrevivência incluindo ERK e Akt por regulação negativa dos seus alvos e aumenta as ações do VEGF.^{16,17} Nas células endoteliais, o VEGF promove a angiogênese através da fosforilação de ERK1 e Akt. ERK e Akt são quinases bem conhecidas que ativam e promovem a proliferação celular estimulando fatores de crescimento.¹⁸

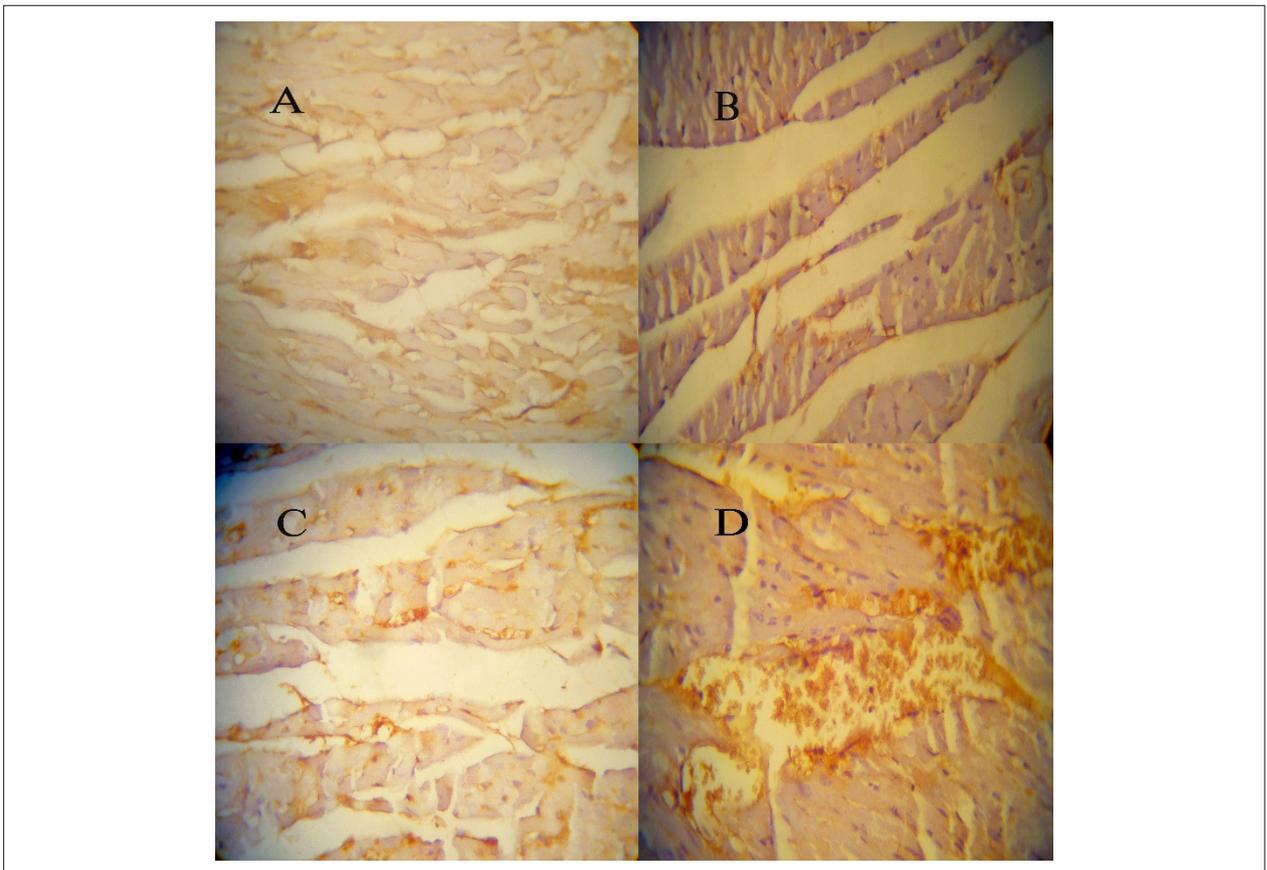


Figura 6 – A) Imagens representativas da coloração CD31 (castanha) em vasos cardíacos de grupos de controle, exercício, crocina e exercício-crocina (Ampliação $\times 400$). A: Con, B: Exe, C: Cro, D: Cro-Exe. B) A densidade de microvasos foi analisada por imunohistoquímica para CD31. A densidade de microvasos foi quantificada utilizando 6 lâminas por animal e 10 campos por lâmina. Os dados são apresentados como média \pm DP para $n = 7$ animais. *** $p < 0,001$ indica uma diferença significativa com o grupo de controle. ### $p < 0,001$ e \$\$\$ $p < 0,001$ indicam diferenças significativas com o grupo de exercício e grupo de crocin, respectivamente.

No presente estudo, mostramos que o miR-126 regula a angiogênese cardíaca através das vias Akt e ERK1/2 em resposta à crocina e exercício voluntário. No entanto, existem alguns estudos disponíveis que sinalizam que o exercício pode aumentar a expressão miR no tecido cardíaco. Em linha com nossos resultados, Uhlemann et al.³³ relataram que a expressão de miR-126 aumentou após exercício de resistência aguda. Importantes conclusões também surgem de Fernandes et al.,³⁴ indicando que o exercício físico restabeleceu os níveis de miR-126 periférico associado à revascularização na hipertensão. Apesar da observação de que o exercício afeta a função endotelial, o mecanismo exato permanece especulativo. Está bem estabelecido que o exercício pode aumentar os níveis de VEGF, que é um dos principais reguladores da angiogênese e da sobrevivência celular.³⁵ O VEGF liga-se ao VEGFR2 e promove os sinais de sobrevivência e angiogênese endoteliais que são mediados pela PI3K e o seu alvo a jusante do Akt e ERK1/2. Além disso, mostraram que os níveis de ERK1/2 e Akt aumentaram sob alta expressão de miR-126. Portanto, parece que o exercício voluntário alivia a influência repressiva de Spred-1/PI3K na superexpressão de Akt e ERK1/2 por miR-126, o que finalmente melhora a angiogênese cardíaca. Este achado está de acordo com um estudo prévio que mostrou que a expressão de ARNm de PI3KR2 no coração diminuiu nos

grupos de exercícios e foi associada ao aumento na expressão protéica de PI3K e Akt fosforilado.³⁶

Neste estudo, também mostramos que a crocina regula a angiogênese cardíaca através do miR-126 e as vias relacionadas a Akt e ERK1/2. A crocina, um pigmento carotenóide do açafrão, tem diferentes funções farmacológicas nos sistemas nervoso,³⁷ cardíaco³⁸ e renal.³⁹ Efeitos cardioprotetores da crocina têm sido relatados em alguns estudos que estão relacionados à melhoria das atividades antioxidantes e biomarcadores cardíacos.^{3,40}

Embora muitos pesquisadores tenham explorado os papéis da crocina em diferentes tecidos, apenas alguns estudos têm investigado os efeitos da crocina sobre a angiogênese no tecido cardíaco. Bie et al.,⁴¹ demonstraram que o açafrão aumentou a expressão de VEGF-R2 e promoveu angiogênese após lesão cerebral em ratos. Além disso, tem sido relatado que as vias PI3K/Akt são ativadas pela crocina na camada de células ganglionares após lesão de retina IR.⁴² Kang et al.,⁴³ também mostraram que o açafrão aumentou a fosforilação de proteínas-quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), como um membro da família ERK, nas células musculares. Também o nosso estudo anterior confirma que a crocina aumenta os níveis de VEGF-A no tecido cardíaco de ratos diabéticos e não diabéticos.⁴⁰

Com base nos presentes resultados, pode concluir-se que o pré-tratamento com crocina melhorou a angiogênese cardíaca, efeito que pode ser atribuído à sua capacidade de aumentar os níveis de Akt e ERK1/2 através do aumento de miR-126. A preservação da histo-arquitetura do tecido cardíaco pelo pré-tratamento com crocina confirma estes efeitos. Em relação às limitações deste estudo, não se avaliaram outros fatores envolvidos na angiogênese e nos referimos a estudos prévios. São necessários mais estudos para explorar outros possíveis mecanismos e vias que possam estar direta ou indiretamente envolvidos nos seus efeitos cardioprotectores. Por conseguinte, sugerimos que o incremento do miR-126 pela crocina e o aumento das vias de sinalização do VEGF através de Akt e ERK1/2 pode induzir a formação de capilares cardíacos. Além disso, mostramos que a combinação de crocina com exercício voluntário tem efeitos sinérgicos sobre a expressão do miR-126 e os níveis de Akt, ERK1/2 no tecido cardíaco, o qual foi o primeiro estudo na angiogênese cardíaca de ratos.

Conclusão

Este estudo mostra que a crocina combinada com o exercício voluntário promove angiogênese cardíaca e isso pode estar relacionado à expressão do miRNA-126 e do miR-210. Novos estudos sobre o mecanismo da crocina e exercício voluntário na angiogênese cardíaca podem fornecer uma base

para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas ou preventivas para superar doenças cardiovasculares.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa, Redação do manuscrito e Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Ghorbanzadeh V, Mohammadi M, Mohaddes G; Obtenção de dados: Ghorbanzadeh V, Dariushnejad H, Abhari A, Chodari L; Análise e interpretação dos dados: Ghorbanzadeh V, Dariushnejad H, Abhari A; Análise estatística: Ghorbanzadeh V, Dariushnejad H, Mohaddes G.

Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pelo Drug Applied Research Center of Tabriz University of Medical Sciences.

Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de tese de Doutorado de Vajih Ghorbanzadeh pela *Tabriz University of Medical Sciences*.

Referências

1. Lee IA, Lee JH, Baek NI, Kim DH. Antihyperlipidemic effect of crocin isolated from the fructus of *Gardenia jasminoides* and its metabolite Crocetin. *Biol Pharm Bull*. 2005;28(11):2106-10.
2. Farkhondeh T, Samarghandian S. The effect of saffron (*Crocus sativus* L.) and its ingredients on the management of diabetes mellitus and dyslipidemia. *Afr J Pharm Pharmacol*. 2014;8(20):541-9.
3. Hariri AT, Moallem SA, Mahmoudi M, Memar B, Hosseinzadeh H. Sub-acute effects of diazinon on biochemical indices and specific biomarkers in rats: protective effects of crocin and safranal. *Food Chem Toxicol*. 2010;48(10):2803-8.
4. Shen XC, Qian ZY. Effects of crocetin on antioxidant enzymatic activities in cardiac hypertrophy induced by norepinephrine in rats. *Pharmazie*. 2006;61(4):348-52.
5. Wu Y, Pan RR, Geng P. [The effect of Crocin against hypoxia damage of myocardial cell and its mechanism]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*. 2010;26(4):453-7.
6. Lavie CJ, Milani RV. Cardiac rehabilitation and exercise training in secondary coronary heart disease prevention. *Prog Cardiovasc Dis*. 2011;53(6):397-403.
7. Gustafsson T, Ameln H, Fischer H, Sundberg C, Timmons J, Jansson E. VEGF-A splice variants and related receptor expression in human skeletal muscle following submaximal exercise. *J Appl Physiol* (1985). 2005;98(6):2137-46.
8. Huang KC, Wu WT, Yang FL, Chiu YH, Peng TC, Hsu BG, et al. Effects of freshwater clam extract supplementation on time to exhaustion, muscle damage, pro/anti-inflammatory cytokines, and liver injury in rats after exhaustive exercise. *Molecules*. 2013;18(4):3825-38.
9. Hilberg T, Menzel K, Gläser D, Zimmermann S, Gabriel HH. Exercise intensity: platelet function and platelet-leukocyte conjugate formation in untrained subjects. *Thromb Res*. 2008;122(1):77-84.
10. Bloor CM. Angiogenesis during exercise and training. *Angiogenesis*. 2005;8(3):263-71.
11. Osman A. MicroRNAs in health and disease--basic science and clinical applications. *Clin Lab*. 2011;58(5-6):393-402.
12. Small EM, Olson EN. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature*. 2011;469(7330):336-42.
13. Papageorgiou N, Tousoulis D, Androulakis E, Siasos G, Briassoulis A, Vogiatzi C, et al. The role of microRNAs in cardiovascular disease. *Curr Med Chem*. 2012;19(16):2605-10.
14. Fish JE, Santoro MM, Morton SU, Yu S, Yeh RF, Wythe JD, et al. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev Cell*. 2008;15(2):272-84.
15. Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, McAnally J, Hill JA, et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell*. 2008;15(2):261-71.
16. Wakioka T, Sasaki A, Kato R, Shouda T, Matsumoto A, Miyoshi K, et al. Sprouty-related suppressor of Ras signalling. *Nature*. 2001;412(6847):647-51.
17. Ueki K, Fruman DA, Yballe CM, Fasshauer M, Klein J, Asano T, et al. Positive and negative roles of p85 α and p85 β regulatory subunits of phosphoinositide 3-kinase in insulin signaling. *J Biol Chem*. 2003;278(48):48453-66.
18. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling? In control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(5):359-71.
19. Hong CC, Peterson QP, Hong JY, Peterson RT. Artery/vein specification is governed by opposing phosphatidylinositol-3 kinase and MAP kinase/ERK signaling. *Curr Biol*. 2006;16(13):1366-72.
20. Fasanaro P, Greco S, Lorenzi M, Pescatori M, Brioschi M, Kulshreshtha R, et al. An integrated approach for experimental target identification of hypoxia-induced miR-210. *J Biol Chem*. 2009;284(50):35134-43.

21. Pulkkinen K, Malm T, Turunen M, Koistinaho J, Ylä-Herttuala S. Hypoxia induces microRNA miR-210 in vitro and in vivo: Ephrin-A3 and neuronal pentraxin 1 are potentially regulated by miR-210. *FEBS Lett.* 2008;582(16):2397-401.
22. Jalili C, Tabatabaei H, Kakaberiei S, Roshankhah S, Salahshoor MR. Protective role of Crocin against nicotine-induced damages on male mice liver. *Int J Prev Med.* 2015;6.
23. Tsalouhidou S, Petridou A, Mougios V. Effect of chronic exercise on DNA fragmentation and on lipid profiles in rat skeletal muscle. *Exp Physiol.* 2009;94(3):362-70.
24. Glass C, Singla DK. MicroRNA-1 transfected embryonic stem cells enhance cardiac myocyte differentiation and inhibit apoptosis by modulating the PTEN/Akt pathway in the infarcted heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;301(5):H2038-49.
25. Kelly TJ, Souza AL, Clish CB, Puigserver P. A hypoxia-induced positive feedback loop promotes hypoxia-inducible factor 1 α stability through miR-210 suppression of glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like. *Mol Cell Biol.* 2011;31(13):2696-706. Erratum in: *Mol Cell Biol.* 2012;32(4):898.
26. Alaiti MA, Ishikawa M, Masuda H, Simon DI, Jain MK, Asahara T, et al. Up-regulation of miR-210 by vascular endothelial growth factor in ex vivo expanded CD34+ cells enhances cell-mediated angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 2012;16(10):2413-21.
27. Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V, Melchionna R, Romani S, Pompilio G, et al. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *J Biol Chem.* 2008;283(23):15878-83.
28. Laganà A, Veneziano D, Spata T, Tang R, Zhu H, Mohler PJ, et al. Identification of general and heart-specific miRNAs in sheep (*Ovis aries*). *PLoS One.* 2015;10(11):e0143313.
29. Hu S, Huang M, Li Z, Jia F, Ghosh Z, Lijkwan MA, et al. MicroRNA-210 as a novel therapy for treatment of ischemic heart disease. *Circulation.* 2010;122(11 Suppl 1):S124-31.
30. Wenger RH. Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *J Exp Biol.* 2000;203(Pt 8):1253-63.
31. Xu L, Wang F, Wei W, Dai WQ, He SS, Wang XP, et al. Effects of hypoxia on the expressions of hypoxia-inducible factor-1 alpha and miR-210 in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Tumor.* 2011;31(6):502-7.
32. Bye A, Røsjø H, Aspenes ST, Condorelli G, Omland T, Wisløff U. Circulating microRNAs and aerobic fitness—the HUNT-Study. *PLoS One.* 2013;8(2):e57496.
33. Uhlemann M, Möbius-Winkler S, Fikenzer S, Adam J, Redlich M, Möhlenkamp S, et al. Circulating microRNA-126 increases after different forms of endurance exercise in healthy adults. *Eur J Prev Cardiol.* 2014;21(4):484-91.
34. Fernandes T, Magalhães FC, Roque FR, Phillips MI, Oliveira EM. Exercise training prevents the microvascular rarefaction in hypertension balancing angiogenic and apoptotic factors role of microRNAs-16,-21, and-126. *Hypertension.* 2012;59(2):513-20.
35. Suhr F, Brixius K, de Marées M, Böck B, Kleinöder H, Achtzehn S, et al. Effects of short-term vibration and hypoxia during high-intensity cycling exercise on circulating levels of angiogenic regulators in humans. *J Appl Physiol (1985).* 2007;103(2):474-83.
36. Da Silva ND Jr, Fernandes T, Soci UP, Monteiro AW, Phillips MI, de Oliveira EM. Swimming training in rats increases cardiac MicroRNA-126 expression and angiogenesis. *Med Sci Sports Exerc.* 2012;44(8):1453-62.
37. Zheng YQ, Liu JX, Wang JN, Xu L. Effects of crocin on reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to cerebral microvessels after global cerebral ischemia. *Brain Res.* 2007;1138:86-94.
38. Goyal S, Arora S, Sharma A, Joshi S, Ray R, Bhatia J, et al. Preventive effect of crocin of *Crocus sativus* on hemodynamic, biochemical, histopathological and ultrastructural alterations in isoproterenol-induced cardiotoxicity in rats. *Phytomedicine.* 2010;17(3-4):227-32.
39. Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR, Ziaee T, Danaee A. Protective effect of aqueous saffron extract (*Crocus sativus* L.) and crocin, its active constituent, on renal ischemia-reperfusion-induced oxidative damage in rats. *J Pharm Pharm Sci.* 2005;8(3):387-93.
40. Ghorbanzadeh V, Mohammadi M, Dariushnejad H, Chodari L, Mohaddes G. Effects of crocin and voluntary exercise, alone or combined, on heart VEGF-A and HOMA-IR of HFD/STZ induced type 2 diabetic rats. *J Endocrinol Invest.* 2016;39(10):1179-86.
41. Bie X, Chen Y, Zheng X, Dai H. The role of crocetin in protection following cerebral contusion and in the enhancement of angiogenesis in rats. *Fitoterapia.* 2011;82(7):997-1002.
42. Qi Y, Chen L, Zhang L, Liu WB, Chen XY, Yang XG. Crocin prevents retinal ischaemia/reperfusion injury-induced apoptosis in retinal ganglion cells through the PI3K/AKT signalling pathway. *Exp Eye Res.* 2013;107:44-51.
43. Kang C, Lee H, Jung ES, Seyedian R, Jo M, Kim J, et al. Saffron (*Crocus sativus* L.) increases glucose uptake and insulin sensitivity in muscle cells via multipathway mechanisms. *Food Chem.* 2012;135(4):2350-8.