

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA  
MOLECULAR**

**HIPERTROFIA CARDÍACA FISIOLÓGICA E PATOLÓGICA: DIFERENÇAS  
MORFOLÓGICAS E MOLECULARES MODULADAS PELA SUPLEMENTAÇÃO  
DE VITAMINA E**

**CAROLINA RODRIGUES COHEN**

**Porto Alegre**

**2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA**  
**MOLECULAR**

**HIPERTROFIA CARDÍACA FISIOLÓGICA E PATOLÓGICA: DIFERENÇAS**  
**MORFOLÓGICAS E MOLECULARES MODULADAS PELA SUPLEMENTAÇÃO**  
**DE VITAMINA E**

**CAROLINA RODRIGUES COHEN**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Ashton-  
Prolla**

**Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andréia Biolo**

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Genética e Biologia  
Molecular, UFRGS, como requisito para  
obtenção do título de Doutor

**Porto Alegre**

**2015**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Pesquisa Cardiovascular do Centro de Pesquisa Experimental e do Serviço de Cardiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Apoio experimental

Unidade de Experimentação Animal (HCPA),  
Unidade de Patologia Experimental (HCPA),  
Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (HCPA),  
Laboratório de Psiquiatria Experimental (HCPA)

Apoio financeiro

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),  
Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e  
Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
(FIPE-HCPA).

“Vá até onde puder ver; quando lá  
chegar poderá ver ainda mais longe.”

Johann Goethe

## **AGRADECIMENTOS**

*À Deus, pois sem Ele eu nada seria.*

*Aos meus pais, Jaques e Rita,  
pelo exemplo, amor incondicional, compreensão e dedicação.*

*Aos meus irmãos, Alexandre, André, Maurício e Marina,  
pelo apoio e companheirismo.*

*Ao Bruno,  
pelo amor, companheirismo e compreensão.*

*Às Professoras Andréia e Patrícia,  
por terem me dado a oportunidade de trabalhar nesse projeto  
que foi tão desafiador desde o início.  
Obrigada pela orientação, apoio e confiança.*

*Aos Professores Rohde, Nadine e Kátia,  
pela orientação que me deram desde o início da minha trajetória acadêmica.  
Obrigada pelo apoio intelectual e científico.*

*Ao Dr. Michael,  
pela amizade, ensino e exemplo profissional.  
A tua participação nesse trabalho foi essencial.*

*À Nidiane,  
por todos os anos de amizade e de parceria.  
Obrigada por me apresentar o mundo dos microRNAs,  
tua participação foi fundamental neste projeto.*

*Às amigas Daiane, Amanda, Graziela e Mariana,  
pelo apoio científico, experimental e logístico.  
Obrigada pela amizade e preocupação que sempre tiveram com esse projeto.*

*Aos meus queridos colegas de laboratório,  
pela companhia agradável e por mostrarem-se sempre dispostos a ajudar.*

*Às minhas queridas colegas de trabalho Francine, Renata, Jaqueline e Cláudia,  
pela compreensão e disposição em ajudar, que sempre tiveram.*

*À UFRGS, ao HCPA e aos professores do PPGBM,  
pela estrutura e conhecimento que proporcionaram.*

*Às Unidades de Experimentação Animal, Patologia Experimental,  
Análises Moleculares e de Proteínas e ao Laboratório de Psiquiatria Experimental  
pelo apoio fundamental em toda a realização deste projeto.*

*Ao apoio financeiro do CNPq, FAPERGS e FIPE-HCPA,  
por tornar realidade este e tantos outros projetos.*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>4</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>5</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>6</b>
<b>APRESENTAÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>PARTE I.....</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>1. HIPERTROFIA CARDÍACA.....</b>	<b>11</b>
1.1. HIPERTROFIA CARDÍACA FISIOLÓGICA .....	12
1.2. HIPERTROFIA CARDÍACA PATOLÓGICA.....	13
1.3. DIFERENÇAS ENTRE HIPERTROFIA CARDÍACA FISIOLÓGICA E PATOLÓGICA .....	15
<b>2. ANGIOGÊNESE E HIPERTROFIA CARDÍACA .....</b>	<b>17</b>
<b>3. MICRORNAs (miRs) .....</b>	<b>21</b>
3.1. BIOGÊNESE E MECANISMO DE AÇÃO DE MIRs .....	22
3.2. BUSCA DE mRNA ALVOS DE MIRs .....	23
3.3. MIRs E DOENÇAS CARDIOVASCULARES .....	24
3.3.1. MIR-499 .....	24
3.3.2. MIR-21 .....	26
3.3.3. MIR-210 .....	28
3.3.4. MIR-26b .....	29
3.3.5. MIR-150 .....	30
<b>4. ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO (EROs).....</b>	<b>31</b>
4.1. SISTEMAS ANTIOXIDANTES E A VITAMINA E.....	32
4.2. ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO E SINALIZAÇÃO CELULAR.....	34
4.3. ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO E HIPERTROFIA CARDÍACA.....	35
4.4. EROS, ANGIOGÊNESE E HIPERTROFIA CARDÍACA .....	36
4.5. ESTRESSE OXIDATIVO E MIRS.....	37
<b>5. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>39</b>
<b>6. OBJETIVOS.....</b>	<b>40</b>
6.1. Objetivo geral .....	40
6.2. Objetivos secundários.....	40
<b>PARTE II.....</b>	<b>41</b>
<b>ARTIGO 1 .....</b>	<b>42</b>
<b>ARTIGO 2 .....</b>	<b>66</b>
<b>PARTE III.....</b>	<b>92</b>



<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>93</b>
<b>8. CONCLUSÕES.....</b>	<b>101</b>
<b>9. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>102</b>
<b>10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DAS PARTES I E III .....</b>	<b>103</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>114</b>
<b>MATERIAL SUPLEMENTAR ARTIGO 1 .....</b>	<b>115</b>
<b>MATERIAL SUPLEMENTAR ARTIGO 2 .....</b>	<b>123</b>
<b>FIGURAS ANEXAS DA DISCUSSÃO .....</b>	<b>126</b>
<b>APROVAÇÃO ÉTICA.....</b>	<b>133</b>
<b>PRODUÇÃO COMPLEMENTAR .....</b>	<b>135</b>

## RESUMO

A hipertrofia cardíaca é um mecanismo de adaptação do coração ao aumento de demanda. De acordo com o estímulo, fisiológico ou patológico, a hipertrofia apresenta diferentes características morfológicas e moleculares. Compreender os mecanismos comuns e distintos entre os dois tipos de hipertrofia é um passo importante para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e tratamento da IC. Dentre os mecanismos distintos cabe ressaltar a participação das espécies reativas do oxigênio (EROs) que parecem estar presentes em altos níveis na hipertrofia cardíaca patológica e em baixos na fisiológica. Além disso, o papel regulatório dos microRNAs (miRs) tem sido demonstrado nas doenças cardiovasculares. No entanto, a influência das EROs no desenvolvimento da hipertrofia e nas adaptações decorrentes a ela ainda não está estabelecido. Assim, nosso objetivo foi avaliar as diferenças morfológicas e moleculares da hipertrofia cardíaca fisiológica, induzida pelo exercício, e da patológica, induzida por bandejamento aórtico (TAC), e sua modulação pela vitamina E. Os modelos de exercício e TAC desenvolveram hipertrofia cardíaca de forma compatível com o estímulo recebido. Essas adaptações ocorreram conjuntamente com alterações na expressão dos miRs-21, -26b, -150, -210 e -499. A vitamina E inibiu o estímulo angiogênicos, no modelo fisiológico, assim como a expressão dos miRs-21, -150 e -210. No entanto, esses efeitos não alteraram o fenótipo final da hipertrofia cardíaca fisiológica. No modelo patológico, por outro lado, a vitamina E reduziu a fibrose e o dano oxidativo, além de alterar a expressão de miRs já descritos no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca patológica. Novamente, esse efeito não foi suficiente para reduzir a hipertrofia cardíaca. Em conjunto, os dados desse estudo sugerem que a vitamina E e/ou sua capacidade antioxidante têm a capacidade de influenciar de forma benéfica a hipertrofia patológica; no entanto, seus efeitos podem ser desfavoráveis no estímulo fisiológico.

**PALAVRAS CHAVE:** Hipertrofia Cardíaca; Vitamina E; MicroRNAs; Exercício Voluntário; Bandejamento Aórtico Transtorácico; Angiogênese.

## ABSTRACT

Cardiac hypertrophy is an adaptive mechanism of the heart to the increased demand. According to the stimulus, physiological or pathological, cardiac hypertrophy present different morphological and molecular features. Understanding both the unique and the shared features in each type of hypertrophy is an important step to the development of novel approaches in the HF management. Among the unique mechanisms, the participation of reactive oxygen species (ROS) seems to be present at high levels in pathological and at low levels in physiological cardiac hypertrophy. Furthermore, the regulatory role of microRNAs (miRs) have been shown in cardiovascular diseases. However, ROS influence in cardiac hypertrophy development and their adaptations were not established yet. Thus, our objective was to evaluate morphological and molecular differences between physiological cardiac hypertrophy (physical exercise-induced) and pathological cardiac hypertrophy (transverse aortic constriction-induced), and its modulation by vitamin E. Exercise and TAC models developed cardiac hypertrophy in a manner consistent with the received stimulus. These adaptations occurred along with changes in miR-21, -26b, -150, -210 and -499 expression. Vitamin E inhibited angiogenic adaptations, as well as miR-21, -150 and -210 expression in physiological model. However, these effects did not change the final physiological cardiac hypertrophy phenotype. On the other hand, in the pathological model, vitamin E reduced oxidative damage and fibrosis, and altered the expression of miRs described in pathological cardiac hypertrophy development. Again, this effect was not sufficient to reduce cardiac hypertrophy. In conclusion, vitamin E and/or its antioxidant capacity have the capacity to influence the pathological hypertrophy in a beneficial way, but its effects can be unfavorable in the physiological stimulus.

**KEYWORDS:** Cardiac Hypertrophy; Vitamin E; MicroRNAs; Voluntary Exercise; Transverse Aortic Constriction; Angiogenesis.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da hipertrofia cardíaca fisiológica e patológica (Maillet <i>et al.</i> , 2013). .....	11
Figura 2 – Modelo ilustrando as principais vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento de hipertrofia fisiológica e patológica (Burgoyne <i>et al.</i> , 2012).....	16
Figura 3 – Esquema ilustrando as principais adaptações celulares do processo de hipertrofia cardíaca (Bernardo <i>et al.</i> , 2010). .....	17
Figura 4 – Modelo ilustrando as vias de sinalização envolvidas na hipertrofia cardíaca e angiogênese (Oka <i>et al.</i> , 2014). .....	18
Figura 5 – Representação da ativação e inativação do HIF-1 $\alpha$ em situações de hipóxia e normóxia. OH, representa a hidroxilação. ....	20
Figura 6 – Esquema ilustrando a biogênese dos microRNAs (Mack, 2007). .....	23
Figura 7 – Esquema da geração de espécies reativas do oxigênio a partir da redução do oxigênio. (Halliwell <i>et al.</i> , 2007) .....	32
Figura 8. Esquema demonstrando a formação das espécies reativas do oxigênio e sua participação em processos celulares (Finkel <i>et al. et al.</i> , 2000).....	32
Figura 9. Estrutura dos compostos formadores da vitamina E (Rimbach <i>et al.</i> , 2010).....	33
Figura 10 – Esquema demonstrando as principais vias de sinalização do processo hipertrófico e a participação das EROs (Burgoyne <i>et al.</i> , 2012). .....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS

Akt ou PKB: Proteína quinase B  
ANF: Fator natriurético atrial  
Ang II: Angiotensina II  
AP-1 ou c-Jun: Proteína ativadora-1  
ARE: Elementos de resposta antioxidante  
ASK1: Quinase reguladora do sinal de apoptose  
ATP: Adenosina trifosfato  
c-Myb: Proto-oncogene c-Myb  
CaMKII: Quinase dependente de Ca/calmodulina II  
CAT: Catalase  
CBP ou CREB: *cAMP response element-binding protein*  
cGMP: Guanosina monofosfato cíclico  
CI: Intervalo de confiança  
CXCR4: *Chemokine (C-X-C motif) receptor 4*  
DNA: Ácido desoxirribonucléico  
Efna3: *Ephrin-A3*  
EGR2: Gene de resposta primária de crescimento  
ERK: Quinase reguladora do sinal extracelular  
EROs: Espécies reativas do oxigênio  
ET-1: Endotelina 1  
EX: Exercitado  
FIH: Fator inibidor da HIF  
FOXO: *Forkhead box protein O*  
GATA4: *GATA binding protein 4*  
GPCR: Receptor ligado à proteína G  
GPx: Glutaciona peroxidase  
GSH: Glutaciona reduzida  
GSK3 $\beta$ : Glicogênio sintase quinase 3  
HIF: Fator de transcrição induzível por hipóxia  
IAM: Infarto agudo do miocárdio

IC: Insuficiência cardíaca  
IGF: Fator de crescimento insulínico  
*ISCU1/2: Iron-sulfur cluster assembly*  
Jak/STAT: Janus quinase/transdutor de sinal e ativador da transcrição  
L-NAME: L-nitro-arginina-metil-éster  
MAPK: Proteína-quinase ativada por mitógeno  
MEC: Matriz extracelular  
MHC: Miosina de cadeia pesada  
miR: microRNA  
mTOR: Proteína alvo da rapamicina em mamíferos  
NF-κB: Fator nuclear κB  
NFAT: Fator nuclear ativador de célula T  
*NOTCH3: Neurogenic locus notch homolog protein 3*  
NPPA: Gene do fator natriurético atrial  
*Nrf2: NF-E2-related factor 2*  
OAG: Oxidação de ácidos graxos  
P2X7R: P2X7 receptor  
*p300: E1A binding protein p300*  
p38: Proteína 38 tirosina quinase ativada por miógeno  
p53: Proteína tumoral p53  
PDCD4: Proteína de morte celular programada 4  
PDGF: Fator de crescimento derivado de plaquetas  
PDK1: Quinase piruvato desidrogenase  
PHD: Enzima prolil-hidroxilase  
PI3K: Fosfoinositol-3-quinase  
PKA: Proteína quinase A  
PKC: Proteína quinase C  
PKD: Proteína quinase D  
PKG: Proteína quinase G  
PLCβ1: Fosfolipase nuclear C β1  
Pré-miRNA: microRNA precursor  
Pri-miRNA: microRNA primário

PTEN: Proteína homóloga à fosfatase e tensina  
Ptp1b: Proteína tirosina fosfatase 1B  
Pur $\beta$ : *Purine-rich element binding protein- $\beta$*   
RISC: Complexo de Indução do Silenciamento do RNA  
RNAm: RNA mensageiro  
SED: Sedentário  
SERCA: Enzima ATPase calcio dependente  
SHAM: Animal falso operado  
SHR: Animais espontaneamente hipertensos  
SMAD1: *Mothers Against Decapentaplegic Homolog 1*  
SOD: Superóxido dismutase  
Sox6: *SRY-box containing gene 6*  
SP-1: *Specificity protein 1*  
Spry1: *Sprouty homologue 1*  
SRF: *Serum response factor*  
T3: Hormônio tireoidiano  
TAC: Bandejamento aórtico transtorácico  
Tg: Transgênico  
TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa  
UTR: Região não traduzida  
VE: Ventrículo esquerdo  
VEGF: Fator de crescimento do endotélio vascular  
VHL: Proteína supressora tumoral von Hippel-Lindau  
VIT: Vitamina E  
ZEB: *Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1*

## APRESENTAÇÃO

A presente tese de doutorado está organizada em três partes principais, descritas abaixo:

- **Parte I:** Introdução e Objetivos
- **Parte II:** Resultados apresentados na forma de dois artigos científicos, organizados em capítulos, em substituição às seções de Material e Métodos e Resultados;
- **Parte III:** Discussão, Conclusões e Perspectivas;
- **Anexos:** Materiais suplementares aos artigos, figuras anexas da discussão, documentos de aprovação dos projetos de pesquisa e produção complementar da aluna de doutorado.



# **PARTE I**

## **INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**

## INTRODUÇÃO

### 1. HIPERTROFIA CARDÍACA

A hipertrofia cardíaca é definida como o aumento da massa cardíaca devido ao aumento do tamanho dos miócitos. Este crescimento pode resultar de uma sobrecarga hemodinâmica, de pressão ou de volume imposta ao coração (Gupta *et al.*, 2007, Heineke *et al.*, 2006). O aumento da demanda cardíaca desencadeia uma série de mecanismos de adaptação denominados remodelamento cardíaco. Neste processo ocorrem modificações intersticiais, celulares e moleculares que promovem alterações no formato e tamanho do coração, assim como podem alterar sua função (Dorn 2007). De acordo com as adaptações e a natureza da sobrecarga imposta ao coração, a hipertrofia cardíaca pode ser classificada como patológica ou fisiológica (Kong *et al.*, 2005). Esses dois tipos de hipertrofia apresentam características estruturais e funcionais diferentes, como demonstrado na Figura 1.

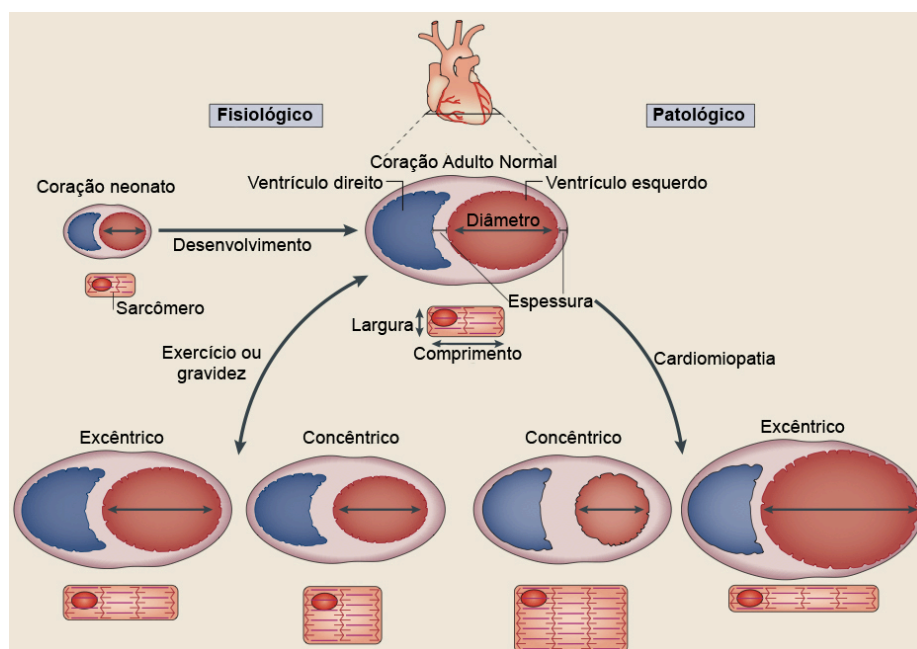


Figura 1 – Representação esquemática da hipertrofia cardíaca fisiológica e patológica (Maillet *et al.*, 2013).

## 1.1. HIPERTROFIA CARDÍACA FISIOLÓGICA

A hipertrofia cardíaca fisiológica resulta de um estímulo fisiológico, como o exercício físico ou a gravidez. A hipertrofia cardíaca fisiológica apresenta o crescimento não prejudicial do coração, sem a presença de fibrose e se caracteriza por manter a função cardíaca normal ou até aumentada, além de ser um processo reversível. Além disso, a hipertrofia cardíaca fisiológica não apresenta a reativação de genes fetais, apenas a ativação de rotas de crescimento e sobrevivência celular (Heineke *et al.*, 2006, Weeks *et al.*, 2011).

A prática regular de exercícios físicos leva a uma série de adaptações fisiológicas no organismo que se instalam de forma gradual e variam conforme as características do treinamento. Entre as adaptações cardiovasculares se destaca a hipertrofia cardíaca fisiológica, que ocorre em resposta às alterações hemodinâmicas, que geram sobrecarga cardíaca durante as sessões de treinamento (Ellison *et al.*, 2012, Gielen *et al.*, 2010).

O exercício físico é um estímulo já conhecido para o desenvolvimento de hipertrofia ventricular esquerda (Tao *et al.*, 2015). As alterações estruturais, resultantes do treinamento físico, dependem do tipo, duração e intensidade do exercício. Os diferentes tipos de exercício físico podem ser classificados em dois grupos: de resistência e de força. Os exercícios de resistência, como a corrida, resultam em aumento de massa muscular em resposta à sobrecarga de trabalho. Esta hipertrofia é um mecanismo fisiológico compensatório, de padrão mais excêntrico, caracterizado principalmente pelo aumento do comprimento e diâmetro dos cardiomiócitos, desta forma sendo responsável pela manutenção da tensão na parede ventricular em níveis fisiológicos. Nos exercícios de força, como o levantamento de peso, predominam as formas isométricas ou estáticas do exercício, gerando uma sobrecarga de pressão. A hipertrofia resultante é de padrão mais concêntrico, caracterizado principalmente pela adição de sarcômeros em paralelo. Entretanto, a maioria das atividades físicas envolvem força e resistência (Bernardo *et al.*, 2010, Maillet *et al.*, 2013).

Diversos estudos têm utilizado modelos de exercício físico aeróbico em animais a fim de compreender os mecanismos da hipertrofia cardíaca fisiológica (Wang *et al.*, 2010). Dentre esses protocolos, os mais utilizados são

o exercício forçado em esteira, natação forçada e exercício voluntário em rodas de treinamento. Os protocolos de esteira e natação são compostos por sessões de treinamento que variam em duração, frequência e velocidade. Esses modelos têm demonstrado ocorrência de hipertrofia cardíaca em torno de 15 a 20% nos animais treinados, compatível com o padrão de hipertrofia cardíaca encontrado em atletas (Bellafiore *et al.*, 2007, Maillet *et al.*, 2013, Medeiros *et al.*, 2004, Morán *et al.*, 2003). Já o exercício em rodas de treinamento, apesar de ser voluntário, tem apresentado um grau similar de hipertrofia cardíaca após quatro semanas de treinamento (Allen *et al.*, 2001, Lerman *et al.*, 2002). Este tipo de protocolo produz menos estresse para os animais e mimetiza o exercício em humanos (Wang *et al.*, 2010). A resposta hipertrófica das células musculares cardíacas tem sido estudada extensamente; porém, os elos intermediários entre a hipertrofia compensatória a sobrecarga de trabalho e a sua progressão para a morte celular não estão suficientemente elucidados.

## **1.2. HIPERTROFIA CARDÍACA PATOLÓGICA**

A hipertrofia cardíaca patológica é um importante marcador de morbimortalidade em doenças cardiovasculares (Braunwald, 2013). Ela pode ser desencadeada por diversos fatores como hipertensão, estenose aórtica, valvulopatias e infarto agudo do miocárdio (IAM) (Burchfield *et al.*, 2013). O padrão patológico vem sendo estudado na busca da compreensão dos mecanismos que determinam a sua evolução para a insuficiência cardíaca (IC). A hipertrofia cardíaca patológica, por sobrecarga de pressão, inicialmente é um mecanismo compensatório para a adaptação a um aumento de demanda no miocárdio. Ela é caracterizada pelo crescimento dos sarcômeros em paralelo apresentando um padrão concêntrico, com a presença de pouca fibrose e a diminuição da função cardíaca. No entanto, quando o estresse sobre o miocárdio é crônico, esse mecanismo de adaptação acumula alterações que comprometem a função cardíaca. Nessa fase de descompensação da hipertrofia cardíaca, o coração evolui para um padrão excêntrico, caracterizado pela dilatação do ventrículo esquerdo (VE), fibrose extensa, morte de cardiomiócitos e IC (Heineke *et al.*, 2006, Weeks *et al.*, 2011).

Além de mudanças estruturais, alterações na expressão gênica, remodelamento da matriz extracelular e sinalização pró-inflamatórias promovem o desenvolvimento da hipertrofia, e sua posterior progressão para a IC. Dentre as alterações na expressão gênica, a reprogramação de genes fetais é a mais característica (Burchfield *et al.*, 2013). A miosina de cadeia pesada (MHC) é a principal proteína contrátil no músculo cardíaco e esquelético e a determinante da eficiência da contração. Os músculos cardíaco e esquelético modulam a expressão dos genes da miosina em resposta à sinalização hormonal e aumento de demanda. A contratilidade cardíaca é dependente da expressão de dois genes da MHC,  $\alpha$  e  $\beta$ , que são regulados de forma contrária pelo desenvolvimento, sinalização fisiológica e patológica. A MHC- $\beta$  é uma ATPase relativamente lenta, com maior atividade oxidativa e menor capacidade contrátil, predominantemente expressa no coração embrionário, enquanto que a MHC- $\alpha$  é uma ATPase rápida, com maior atividade glicolítica e velocidade contrátil e é a principal isoforma cardíaca em roedores adultos. Por outro lado, a MHC- $\beta$  é predominante nos corações humanos adultos e pode tornar-se ainda mais abundante durante a doença cardíaca quando MHC- $\alpha$  tem sua expressão reduzida. Variações relativamente sutis na proporção das MHC- $\alpha$  e  $\beta$  podem influenciar profundamente a função cardíaca. Diversas formas de estresse cardíaco, como a hipertrofia cardíaca patológica, promovem a reativação fetal, ou seja, aumentam a expressão da MHC- $\beta$  e a diminuem da MHC- $\alpha$ , com a consequente diminuição do desempenho cardíaco (van Rooij *et al.*, 2009). Outros genes importantes como marcadores da reativação fetal são o gene da  $\alpha$ -actina que é bastante expresso no período fetal, mas não no coração adulto e o gene do fator natriurético atrial (NPPA), que é um peptídeo hormonal secretado no coração adulto em resposta ao estresse de parede cardíaca (Cox *et al.*, 2014).

Além das alterações ocorridas nos cardiomiócitos os demais componentes celulares do coração sofrem alterações durante o processo hipertrófico e a progressão para IC. Sob estresse os fibroblastos cardíacos proliferam e se diferenciam em miofibroblastos que têm a capacidade de contrair e secretar colágenos tipo I e II e fibronectina, iniciando um processo de deposição anormal de matriz extracelular e formação de fibrose. Sendo o fibroblasto o tipo celular mais abundante do miocárdio, a fibrose promove disfunção contrátil e distúrbios de ritmo cardíaco. Além dessas alterações,

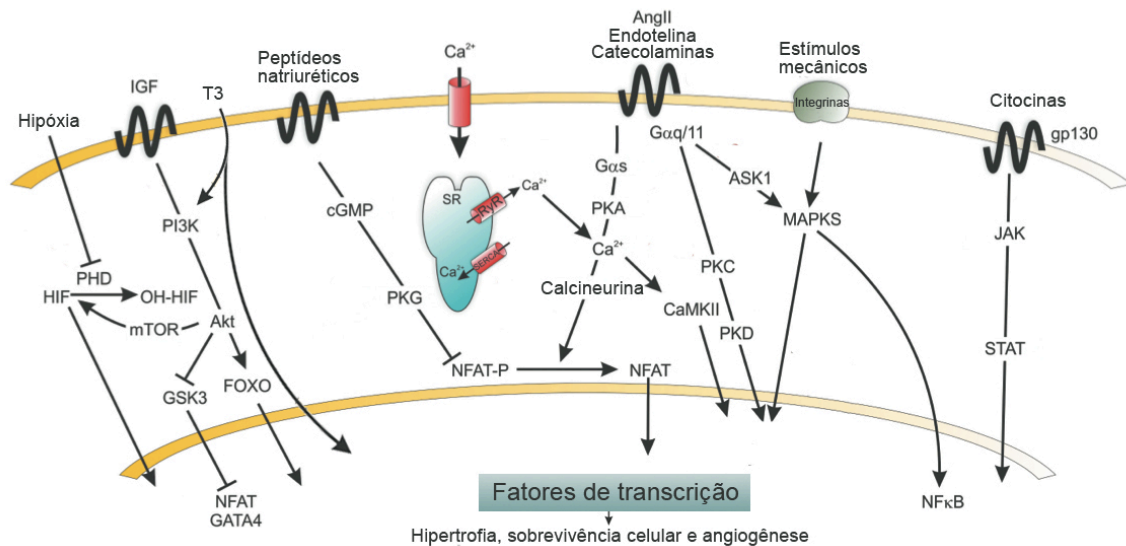
muitas outras que comprometem a função cardíaca ocorrem durante a hipertrofia cardíaca patológica tais como: déficit no metabolismo energético, remodelamento vascular e eletrofisiológico e morte de cardiomiócitos por apoptose e necrose (Burchfiel *et al.*, 2013).

Para estudar a hipertrofia cardíaca patológica diferentes modelos animais têm sido utilizados, como os modelos cirúrgicos de bandejamento aórtico e IAM, animais espontaneamente hipertensos (SHR) ou sensíveis ao sal e modelos com uso de drogas (monocrotalina, L-NAME, epinefrina, isoproterenol, entre outras). O modelo de bandejamento aórtico transtorácico (TAC) consiste em realizar cirurgicamente um grau de estenose entre o tronco braquiocefálico e a carótida comum esquerda. Esse modelo tem sido amplamente utilizado por causar hipertensão aguda sobre o ventrículo esquerdo, desencadeando um fenótipo de hipertrofia cardíaca patológica com progressão para a IC (Patten *et al.*, 2009). Diferentes grupos têm demonstrado que o modelo de TAC induz hipertrofia cardíaca patológica com reativação de genes fetais, fibrose e disfunção cardíaca com um aumento da massa do VE de cerca de 22% e 40% em 7 e 14 dias, respectivamente (Hou *et al.*, 2015, Sano *et al.*, 2007, Toischer *et al.*, 2010). A gravidade da hipertrofia cardíaca patológica induzida por esse modelo depende do grau de estenose na artéria carótida comum esquerda durante a cirurgia, podendo ser moderada ou severa (van Nierop *et al.*, 2013).

### **1.3. DIFERENÇAS ENTRE HIPERTROFIA CARDÍACA FISIOLÓGICA E PATOLÓGICA**

Diversos estudos têm tentado demonstrar as diferenças bioquímicas e moleculares entre esses dois tipos de hipertrofia (Bernardo *et al.*, 2010, Dorn 2007, Maillet *et al.*, 2013, McMullen *et al.*, 2007, McMullen *et al.*, 2003, van Berlo *et al.*, 2013, Weeks *et al.*, 2011) (Figura 2). De maneira geral, estímulos neuro-humorais como a angiotensina II (Ang II) e a endotelina 1, resultam na ativação da proteína G, através dos receptores G $\alpha$ q que estão associados à hipertrofia patológica e progressão para IC (Maillet *et al.*, 2013, McMullen *et al.*, 2003). Essa sinalização conta com a participação da calcineurina, uma fosfatase dependente de Ca<sup>+2</sup>, que regula a transcrição de genes hipertróficos

através do fator nuclear ativador de célula T (NFAT). Por outro lado, a ativação de fatores de crescimento, como o insulínico (IGF) e vascular endotelial (VEGF), dos hormônios tireoídiano (T3) e insulina, estimulam a via da fosfoinositol-3-quinase (PI3K), e estão implicados em um crescimento fisiológico ou adaptativo (Weeks *et al.*, 2011). Há ainda rotas que podem ser comuns às duas formas de hipertrofias como os estímulos mecânicos, a ativação das vias da proteína quinase B (PKB ou Akt), das proteínas-quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e do receptor de citocinas que levam à ativação da via JAK/STAT. Essas rotas parecem ser ativadas tanto por estímulos patológicos como pelo exercício (Bernardo *et al.*, 2010, McMullen *et al.*, 2007, Weeks *et al.*, 2011).



**Figura 2 – Modelo ilustrando as principais vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento de hipertrofia fisiológica e patológica (Burgoyne *et al.*, 2012).**

Além das cascatas de sinalização, aspectos moleculares e morfológicos são distintos entre os estímulos fisiológico e patológico. De forma geral, a hipertrofia cardíaca patológica é caracterizada pelo aumento de morte celular, fibrose, produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) e diminuição de densidade capilar e síntese mitocondrial. Além de alterações no perfil energético, com diminuição no metabolismo de ácidos graxos e aumento da glicólise (Bernardo *et al.*, 2010, Tham *et al.*, 2015). Já na hipertrofia cardíaca fisiológica todos esses processos parecem estar em equilíbrio para a melhora da eficiência cardíaca (Weeks *et al.*, 2011). Ainda, o fenótipo observado no desenvolvimento da hipertrofia passa pela regulação de diversos genes e

moléculas como os microRNAs (Figura 3). A elucidação de aspectos morfológicos e moleculares que podem ter papéis distintos nestas duas formas de hipertrofia é crítica para o desenvolvimento de estratégias mais eficientes para frear o processo de descompensação e progressão a IC.

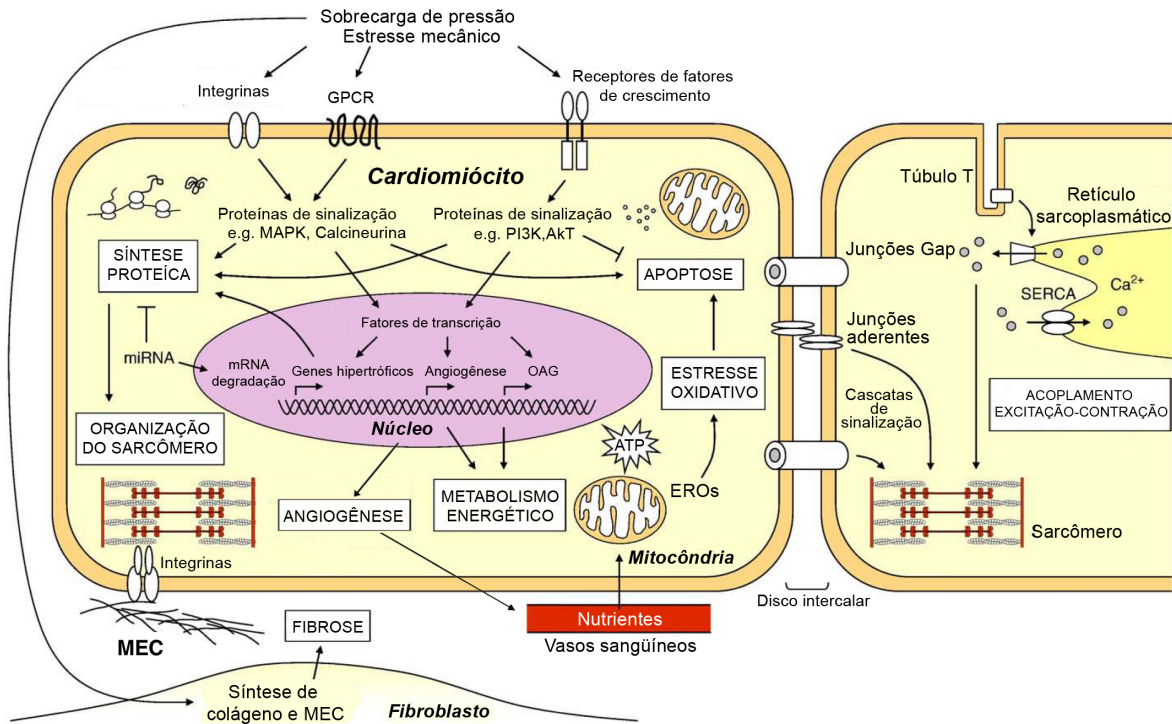


Figura 3 – Esquema ilustrando as principais adaptações celulares do processo de hipertrofia cardíaca (Bernardo *et al.*, 2010).

## 2. ANGIOGÊNESE E HIPERTROFIA CARDÍACA

O crescimento dos cardiomiócitos e a angiogênese devem ocorrer de forma coordenada durante a hipertrofia, a fim de garantir o aumento apropriado da disponibilidade de oxigênio e nutrientes (Dorn, 2007, Hudlicka *et al.*, 1992, Walsh *et al.*, 2007). Sob condições fisiológicas e patológicas o miocárdio secreta fatores de crescimento angiogênicos que estimulam a angiogênese para suprir a demanda e sustentar o crescimento e desempenho do miocárdio. Interessantemente, o aumento nos níveis desses fatores de crescimento, em especial do VEGF, tem um *feedback* positivo sinalizando a hipertrofia (Figura 4)(Oka *et al.*, 2014).



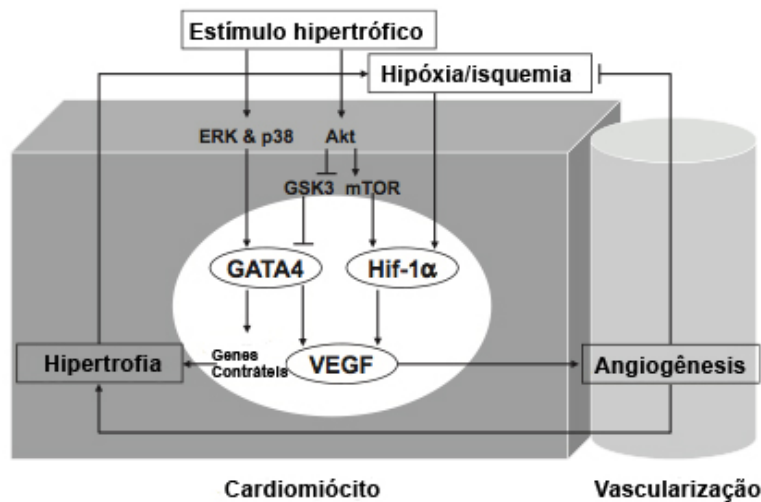


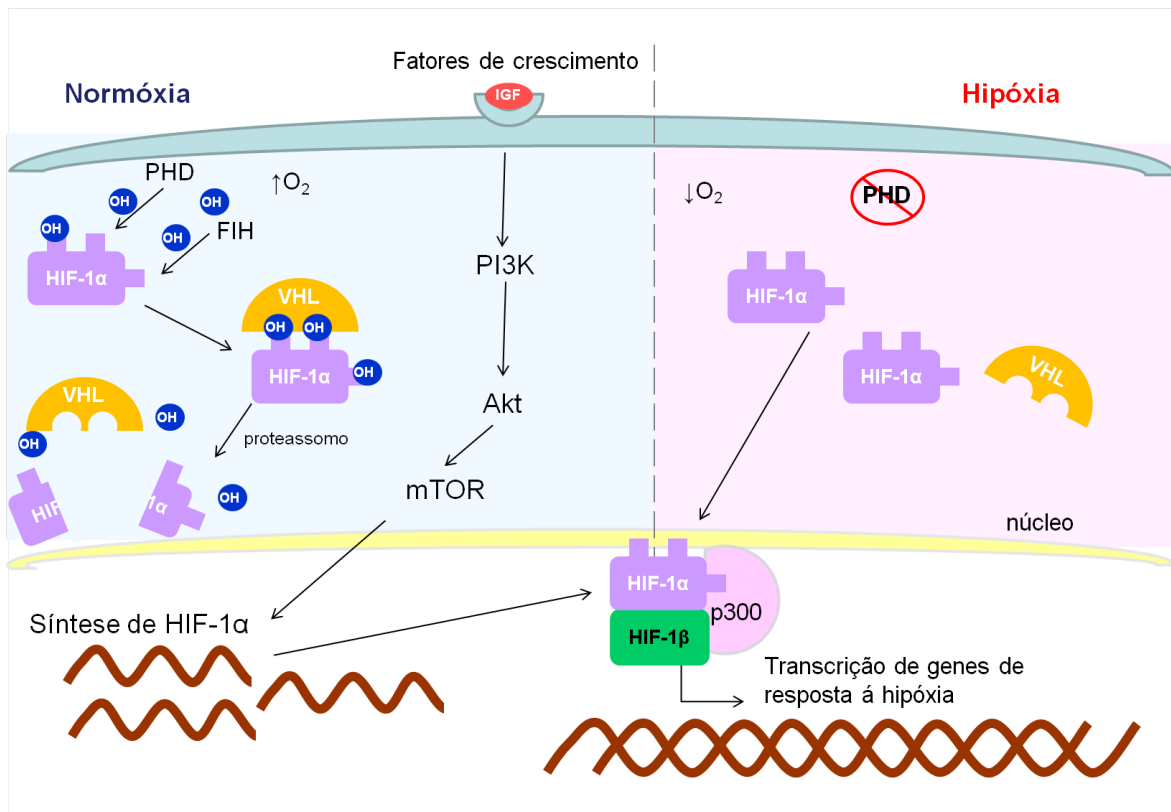
Figura 4 – Modelo ilustrando as vias de sinalização envolvidas na hipertrofia cardíaca e angiogênese (Oka *et al.*, 2014).

A angiogênese é um dos determinantes do tipo de hipertrofia cardíaca: fisiológica ou patológica, compensada ou descompensada. A hipertrofia cardíaca fisiológica está associada a uma densidade capilar aumentada, enquanto em modelos de hipertrofia patológica esta densidade está reduzida e tem sido implicada em disfunção contrátil e progressão para IC (Dorn, 2007, Hudlicka *et al.*, 1992, Walsh *et al.*, 2007). Em um modelo de hipertrofia cardíaca induzida por aumento na expressão da proteína Akt, estímulos hipertróficos induziram a expressão de fatores angiogênicos na fase de hipertrofia adaptativa, e o bloqueio destes fatores resultou na redução da densidade capilar e acelerou a progressão para IC (Shiojima *et al.*, 2005). Desta forma, o balanço entre o crescimento de cardiomiócitos e a angiogênese é um dos determinantes do quanto a hipertrofia cardíaca é fisiológica ou patológica, e o bloqueio da angiogênese durante a hipertrofia é crítico para a progressão da fase adaptativa para a mal-adaptativa (Carmeliet, 2000).

O exercício físico é um estímulo mecânico e bioquímico à angiogênese. O aumento do fluxo sanguíneo e do estresse de cisalhamento, assim como, estímulos de crescimento e o aumento das necessidades energéticas do músculo, estimulam a adaptação aguda do fluxo sanguíneo, principalmente por meio de vasodilatação e formação de novos vasos (Carmeliet, 2000). O aumento no consumo de oxigênio e/ou diminuição da tensão tecidual de oxigênio (hipóxia) iniciam um vasto leque de respostas adaptativas, sistêmicas,

locais e a nível celular, todas com o objetivo de restaurar a homeostase do oxigênio. As respostas celulares à hipóxia são mediadas pelos fatores de transcrição induzíveis por hipóxia (HIFs).

O HIF-1 é um fator de transcrição heterodimérico com papel importante nas rotas de sinalização que transmitem informações sobre os níveis celulares de oxigênio (Ke *et al.*, 2006, Semenza, 2009, Semenza, 2007, Smith *et al.*, 2008). O HIF-1 é composto por duas subunidades: HIF-1 $\alpha$  e HIF-1 $\beta$ . O HIF-1 $\beta$  é constitutivamente expresso e não é afetado pela hipóxia. O HIF-1 $\alpha$  é expressado principalmente pela ação do fator de transcrição Sp1 (*specificity protein 1*); porém, existem na região promotora do gene sítios de ligação aos fatores de transcrição AP-1 (proteína ativadora-1) e NF- $\kappa$ B (fator nuclear  $\kappa$ B) (Déry *et al.*, 2005, Semenza, 2009). Em situações de normóxia o HIF-1 $\alpha$  é hidroxilado pelas enzimas proil-hidroxilases (PHD). Essas enzimas têm sua atividade dependente de O<sub>2</sub> como substrato e do ferro (Fe<sup>+2</sup>), ascorbato e  $\alpha$ -cetoglutarato como cofatores obrigatórios (Kietzmann *et al.*, 2005, Pagé *et al.*, 2008, Semenza, 2009, Traber *et al.*, 2011). O processo de hidroxilação aumenta a afinidade do HIF-1 $\alpha$  pela proteína supressora tumoral von Hippel-Lindau (VHL). A ligação do HIF-1 $\alpha$  hidroxilado com o VHL o marca para a degradação pelo proteassomo. Há ainda o fator inibidor da HIF (FIH) que regula a atividade da HIF-1 $\alpha$  sob normóxia, hidroxilando o sítio de ligação do complexo co-ativador p300/CBP, impedindo assim sua ligação ao HIF-1 $\alpha$  (Déry *et al.*, 2005, Smith *et al.*, 2008). Entretanto, em situações de hipóxia a PHD é inibida e o HIF-1 $\alpha$  se acumula e dimeriza com o HIF-1 $\beta$ , recrutando o p300/CBP (Figura 5). Este complexo se liga ao DNA para desencadear a transcrição de mais de 100 genes de resposta à hipóxia, coordenando um amplo espectro de processos celulares fisiológicos, incluindo angiogênese, eritropoiese, metabolismo energético, sobrevivência e proliferação celular (Cerretelli *et al.*, 2011, Semenza, 2007, Smith *et al.*, 2008).



**Figura 5 – Representação da ativação e inativação do HIF-1 $\alpha$  em situações de hipóxia e normóxia.** OH, representa a hidroxilação.

Com relação à angiogênese, o HIF-1 $\alpha$  regula a transcrição de fatores angiogênicos como o VEGF e seus receptores (Semenza, 2007). Outro papel importante do HIF-1 $\alpha$  é estabelecer um balanço ótimo entre metabolismo glicolítico e oxidativo em qualquer concentração de oxigênio para maximizar a produção de ATP sem aumentar os níveis de EROs (Cadenas *et al.*, 2010, Cerretelli *et al.*, 2011). Desta forma, sob hipóxia, HIF-1 $\alpha$  ativa a quinase piruvato desidrogenase (PDK1) o que causa a inibição da atividade da enzima piruvato desidrogenase e diminuição da entrada de substrato no ciclo de Krebs. Assim, a célula sob hipóxia mantém a produção de ATP pela glicólise anaeróbica, preservando o oxigênio intracelular e diminuindo a produção de EROs (Cadenas *et al.*, 2010, Cerretelli *et al.*, 2011, Kim *et al.*, 2006).

Mesmo em situações de normóxia, fatores de crescimento como o IGF e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), citocinas e hormônios parecem ser capazes de induzir e/ou ativar a expressão do HIF-1 $\alpha$ , através da ativação da via PI3K. Sugere-se que esse mecanismo seria suficiente para desencadear a expressão de genes de resposta à hipóxia, apesar da PHD e FIH estarem ativas (Déry *et al.*, 2005, Ikeda *et al.*, 2009, Lee *et al.*, 2004).

Desta forma, o HIF-1 $\alpha$  participaria de processos como hipertrofia cardíaca através, também, de estímulos de crescimento e não apenas modulado pela hipóxia.

O HIF-1 $\alpha$  parece ter papel fundamental na adaptação cardíaca a estímulos hipertróficos e na coordenação entre hipertrofia e angiogênese (Cai *et al.*, 2008, Kim *et al.*, 2002, Qing *et al.*, 2007, Walsh *et al.*, 2007). A deleção cardiomiócito-específica do HIF-1 $\alpha$ , em condições de normóxia, leva à alteração na expressão de vários genes envolvidos no controle do cálcio, na angiogênese e no metabolismo da glicose, com consequente redução da contratilidade cardíaca e vascularização (Huang *et al.*, 2004). Em um modelo de hipertrofia patológica por TAC, a hipertrofia inicial compensatória foi acompanhada por neovascularização, a qual ocorreu através da estimulação do HIF-1 $\alpha$ . Na transição para fase mal-adaptativa, a supressão de HIF-1 $\alpha$  se associou à angiogênese reduzida e disfunção sistólica, enquanto o bloqueio desta supressão atenuou a progressão para a fase descompensada (Sano *et al.*, 2007). Além disso, Marini e colaboradores, utilizando um protocolo de treinamento em esteira com ratos, observaram o aumento na angiogênese e vascularização nos animais treinados após 10 semanas. Esse aumento na angiogênese foi acompanhado de um aumento na expressão de VEGF e HIF-1 $\alpha$  (Marini *et al.*, 2008). Desta forma, o HIF-1 $\alpha$  parece ser crucial na sinalização entre o miocárdio e a vasculatura para permitir seu crescimento coordenado (Shohet *et al.*, 2007, Shyu *et al.*, 2002, Zolk *et al.*, 2008). Assim, os mecanismos envolvidos na angiogênese adaptativa parecem contar com o envolvimento do HIF-1 $\alpha$ , que é fundamental para os processos da hipertrofia fisiológica e patológica.

### **3. MICRORNAs (miRs)**

O primeiro microRNA (miR) foi descoberto na espécie *Caenorhabditis elegans* em 1993 e foi chamado *lin-4* (Lee *et al.*, 1993). Esse miR apresentava complementaridade parcial com a região 3'-UTR do RNA mensageiro (RNAm) da proteína *lin-14*. O complexo *lin-14* e *lin-4* resultou na inibição da tradução do RNAm *lin-14*, demonstrando uma regulação da expressão gênica em nível pós-transcricional. Embora este achado tenha sido inédito, o interesse da

comunidade científica pelos miRs surgiu apenas quando eles foram descritos em mamíferos, demonstrando que mecanismos de regulação gênica pós-transcricional poderiam ter caráter conservado entre as espécies e regular funções nas células eucarióticas (Lagos-Quintana *et al.*, 2001, Lim *et al.*, 2005). Os miRs representam uma classe de pequenos RNAs endógenos, de fita simples com 19–25 nucleotídeos, que não codificam proteínas e agem regulando a expressão gênica (Bartel, 2004).

### 3.1. BIOGÊNESE E MECANISMO DE AÇÃO DE MIRs

Os miRs são filogeneticamente conservados e podem ser codificados por genes localizados em éxons ou introns tanto de genes codificadores de proteínas quanto de genes não-codificadores (Bartel, 2004). Os miRs podem ser expressos constitutivamente, em uma situação específica ou em tecidos específicos (Lagos-Quintana *et al.*, 2001). Por exemplo, diferentes estudos têm demonstrado que o miR-208 é expresso somente no tecido cardíaco e quando detectado no plasma reflete dano miocárdico (van Rooij *et al.*, 2009, Wang *et al.*, 2010).

O processo de maturação de miRs envolve uma série de etapas resumidas na Figura 6 (Mack, 2007). Inicialmente, ocorre a transcrição primária do miR (pri-miR), que é processado no núcleo pela ribonuclease Drosha, formando uma estrutura do tipo *hairpin* chamada de pré-miR. Esse é exportado para o citoplasma pela exportina 5 e clivado pela ribonuclease Dicer, dando origem ao miR maduro de fita simples e sua fita antissenso (miR\*) (Bartel, 2004). O miR maduro se liga à proteína Argonauta para formar o complexo RISC (Indução do Silenciamento do RNA). O complexo RISC direciona o miR para a região complementar 3'-UTR do RNAm alvo. Os microRNAs se ligam ao seu mRNA-alvo dependendo da complementaridade dos pares de bases da sequência *seed* (Ambros, 2004, Lim *et al.*, 2005). A sequência *seed* corresponde aos primeiros 7-8 nucleotídeos da extremidade 5' do miR, essa sequência é crítica para o reconhecimento do mRNA-alvo pelo miR. Quando essa ligação do microRNA é totalmente complementar ao mRNA-alvo ocorre a marcação para degradação por proteassomos, entretanto quando a complementaridade é imperfeita a tradução do RNAm é inibida (Bartel, 2004,

Nilsen, 2007). A inibição da tradução continua sendo considerada o principal mecanismo de regulação da expressão gênica por miRs em animais, porém trabalhos recentes têm apontado outros mecanismos possíveis como a de-adenilação, degradação e liberação precoce dos ribossomos (Nilsen, 2007).

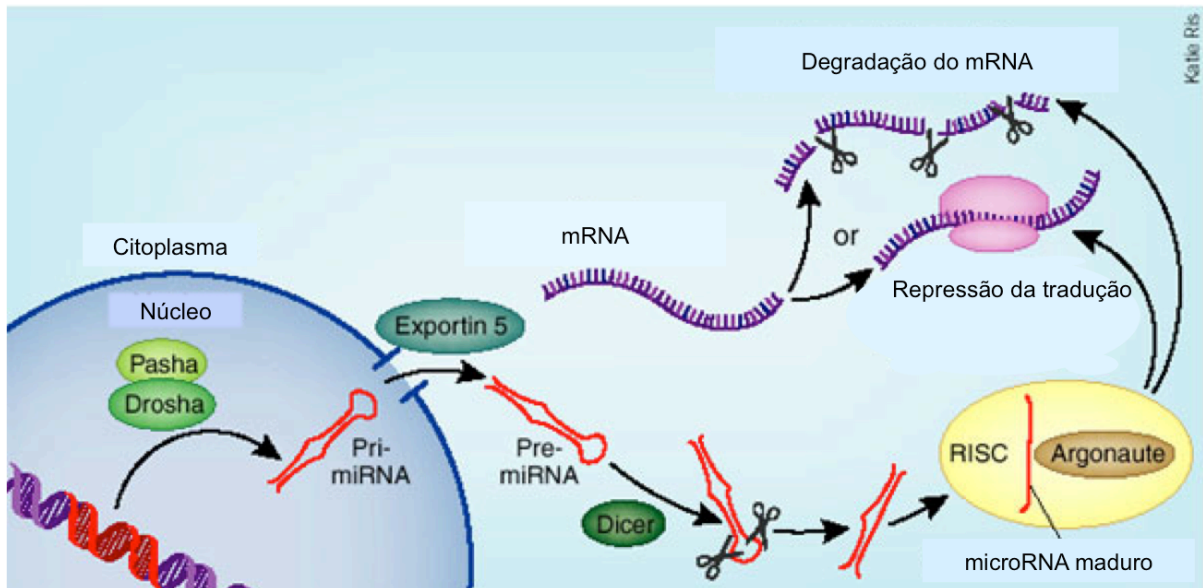


Figura 6 – Esquema ilustrando a biogênese dos microRNAs (Mack, 2007).

### 3.2. BUSCA DE mRNA ALVOS DE MIRs

Supõe-se que cada miR pode possuir mais de 200 genes alvo, assim como cada gene pode ser regulado por mais de um miR. Desta forma, o leque de possibilidade de regulação dos diferentes genes e miRs seria enorme (Lewis *et al.*, 2005). Para avaliar essas possibilidades existem vários algoritmos de predição de alvos de miR como por exemplo: miRanda, miRBase, PicTar e TargetScan. Estes algoritmos analisam a complementaridade das sequências de miR com as regiões 3'-UTR de RNAm através de fatores como: energia livre, pareamento da sequência *seed*, conservação filogenética dos sítios de ligação. No entanto, apesar desses algoritmos serem excelentes para a predição, apenas a validação biológica de alvos é capaz de confirmar a ação de um miR sobre o mRNA-alvo.

### 3.3. MIRs E DOENÇAS CARDIOVASCULARES

No sistema cardiovascular foi observada a expressão de mais de 200 miRs diferentes. As funções e mecanismos de ação da maioria desses miRs ainda está longe de ser compreendida. No entanto, há evidências de que os miRs têm papel importante no desenvolvimento cardíaco e em situações de estresse, contribuindo tanto para a homeostase cardíaca quanto para a doença (Thum *et al.*, 2007, van Rooij *et al.*, 2006).

Alguns miRs já foram identificados como sendo tecido-específicos ou demonstraram um forte papel no sistema cardiovascular (van Rooij *et al.*, 2007). O miR-208a/b já foi estabelecido como cardio-específico e os estudos têm demonstrado que esse miR desempenha um papel importante no desenvolvimento e função cardíaca (van Rooij *et al.*, 2009, Wang *et al.*, 2010). Além do miR-208a/b, há outros miRs que são músculo específico como os miR-1, -133, 206 e -499. Esses miRs são conhecidos como miomiRs e estão envolvidos em uma série de processos que incluem: miogênese (proliferação, diferenciação e especificação do tipo de fibra), regeneração e hipertrofia muscular (Carè *et al.*, 2007). Interessantemente, os miR-208a, -208b e -499 estão em regiões intrônicas dos genes da miosina de cadeia pesada Myh6 ( $\alpha$ -MHC), Myh7 ( $\beta$ -MHC), e Myh7b, respectivamente, sugerindo sua associação com essas isoformas (Thum *et al.*, 2007, van Rooij *et al.*, 2009). Além destes, outros miRs têm demonstrado associação com a hipertrofia cardíaca ou com os mecanismos que a compõe. Abordaremos em maior detalhe esses miRs a seguir.

#### 3.3.1. MIR-499

O miR-499 é um microRNA músculo específico, encontrado em altos níveis no coração fetal (Shieh *et al.*, 2011). O miR-499 é codificado dentro do íntron 19 do gene Myh7b, um gene de miosina sarcomérica expresso no músculo esquelético, mas não expresso de forma significativa no coração. A expressão do miR-499 é desacoplada da expressão do gene Myh7b por *splicing* alternativo do transcrito primário, o RNAm do Myh7b é eliminado e o miR-499 é protegido por exportação nuclear. Ou seja, o miR-499 é altamente expresso no coração, mas o seu gene hospedeiro Myh7b não. A observação

de que o coração retém e regula dinamicamente o miR-499 as custas da transcrição do Myh7 e, em seguida, elimina ativamente o RNAm do gene hospedeiro, sugere uma função importante desse miR no coração (Matkovich *et al.*, 2012).

O miR-499 é um dos membros da família dos miomiRs que coordenadamente regulam a expressão das isoformas da miosina na hipertrofia cardíaca. Foi demonstrado que o miR-208a controla a expressão do miR-499, pois no animal transgênico miR-208 *null* (miR-208Tg<sup>-/-</sup>) a expressão de miR-499 e Myh7 foram extintas (van Rooij *et al.*, 2009). Os miR-208a e -208b são capazes de ativar a expressão de Myh7b/miR-499. Tanto o miR-208b quanto o miR-499 alteram o padrão de miofibrilas rápidas para lentas provavelmente mediado pela regulação negativa de Sox6. Os genes de miosinas não apenas codificam as principais proteínas contráteis, mas agem de forma mais ampla controlando a expressão gênica e performance do músculo através de uma rede de microRNAs presentes na sua região intrônica (van Rooij *et al.*, 2009). A relação dos miR-499 e -208 com a função e composição do músculo também foi evidenciada por um estudo com modelo de atrofia muscular esquelética que resultou em diminuição de 40% do miR-499 e 60% do miR-208 associado ao aumento dos alvos Sox6 e Purβ, genes que reprimem a expressão de β-MHC (McCarthy *et al.*, 2009).

Em relação à função do miR-499 nas doenças cardíacas, há dados discrepantes na literatura associando tanto a cardioproteção, quanto a indução e exacerbação da IC. Um estudo com abordagem de perda e ganho de função em camundongos, no contexto de isquemia/reperfusão, demonstrou que a superexpressão do miR-499 melhorou o remodelamento e função cardíaca, enquanto a ausência do miR-499 foi deletéria, associada a disfunção cardíaca. Esse estudo concluiu que o miR-499 é cardioprotetor através da modulação pró-hipertrofica da calcineurina (Wang *et al.*, 2011). Outro estudo com camundongos transgênicos demonstrou que a superexpressão do miR-499 causava hipertrofia celular e disfunção cardíaca de forma dose dependente. Esse aumento de expressão afetava genes de resposta ao estresse agudo (Shieh *et al.*, 2011). Assim, a função do miR-499, no coração, e as consequências de sua expressão, não estão completamente claras.



Para tentar contribuir com essa questão Matkovich e col. desenvolveram linhagens transgênicas de superexpressão do miR-499, uma com padrão de expressão similar ao encontrado em humanos com IC e outra com expressão 3 vezes maior (Matkovich *et al.*, 2012). Foi observado que essas linhagens progressivamente apresentaram alargamento e disfunção cardíaca e a reprogramação de genes fetais similar ao encontrado em humanos. Além disso, foram identificados 67 alvos diretos que incluíam vias importantes como Akt e MAPK (Matkovich *et al.*, 2012). Os níveis de miR-499 estavam aumentados nos corações de homens com hipertrofia cardíaca patológica e níveis ainda maiores foram encontrados em pacientes com IC. Esse aumento foi acompanhado da expressão elevada do gene hospedeiro *Myh7b*. Para determinar se o aumento do miR-499 era uma resposta específica dos cardiomiócitos ao estímulo cardiomiopático, eles avaliaram o miR-499 em camundongos transgênico superexpressando *Gαq*, que é um modelo de hipertrofia cardíaca por sobrecarga de pressão. De forma similar, o modelo *Gαq* apresentou expressão elevada de miR-499, demonstrando que esse miR está associado a hipertrofia cardíaca patológica e progressão para IC (Matkovich *et al.*, 2012).

A associação de níveis circulante de miR-499 com doenças cardíacas tem sido amplamente investigada. Diversos estudos com pacientes com IC, pós-IAM e com síndrome coronariana aguda têm observado níveis aumentados do miR-499 circulante. A maioria desses estudos comparou pacientes com controles saudáveis e observou a elevação do miR-499 associado ao dano agudo no miocárdio pós-IAM (D'Alessandra *et al.*, 2010, Devaux *et al.*, 2012). Recentemente, uma meta-análise investigou o papel dos miRs-1, -133a, -208b e -499 como biomarcadores de IAM. Para o miR-499, foram incluídos 8 estudos com um total de 1634 participantes. O miR-499 demonstrou ser o melhor biomarcador analisado com sensibilidade de 0.88 (95%CI:0.86–0.90) e especificidade de 0.87 (95% CI:0.84–0.90) (Cheng *et al.*, 2014).

### **3.3.2. MIR-21**

O miR-21 é um dos miRs mais estudados em condições fisiológicas e em muitas doenças como as cardiovasculares e o câncer (Asangani *et al.*, 2008, Cheng *et al.*, 2010, Meng *et al.*, 2007). Isso se deve ao fato de o miR-21

estar envolvido em muitos processos importantes como angiogênese, apoptose, inflamação e crescimento celular. Em relação a apoptose, a maioria dos estudos têm demonstrado o papel protetor do miR-21 e sua ação sobre os alvos PTEN e PDCD4 (Asangani *et al.*, 2008, Meng *et al.*, 2007, Roy *et al.*, 2009). A inibição da apoptose é de particular importância nas doenças cardiovasculares. Estudos de modelos de isquemia/reperfusão e IAM demonstraram redução na área de infarto e melhora na função cardíaca, assim como, menor apoptose e deposição de colágeno associados a expressão elevada de miR-21 (Cheng *et al.*, 2010, Dong *et al.*, 2009, Gu *et al.*, 2015, Yin *et al.*, 2008). Além disso, foi sugerido que o miR-21 também participa do processo inflamatório, sendo induzido por interleucina 6 e TNF- $\alpha$ , tendo como os principais alvos são PDCD4, Jak/STAT e vias de citocinas, demonstrando assim um potencial efeito anti-inflamatório (Greco *et al.*, 2014, Löffler *et al.*, 2007, Roy *et al.*, 2012). O miR-21 parece ter um papel importante na angiogênese, seu aumento de expressão inibe a PTEN aumentando assim a via HIF-1 $\alpha$  e VEGF e ativação da sinalização de Akt/ERK induzindo angiogênese (Liu *et al.*, 2011). Além disso, o bloqueio da HIF-1 $\alpha$  aboliu a angiogênese induzida pelo miR-21. Desta forma, miR-21 parece atuar no estímulo á angiogênese de forma dependente da ativação da HIF-1 $\alpha$ .

Na hipertrofia cardíaca e IC o papel do miR-21 permanece controverso. MiR-21 está envolvido com o desenvolvimento cardíaco fetal e progressão da IC em células humanas. Esses dois processos tem muitas similaridades na expressão de genes e miRs (Thum *et al.*, 2007). Thum e cols. encontraram o miR-21 aumentado nos fibroblastos isolados de pacientes com IC, assim como em modelos animais (Thum *et al.*, 2008). Esse grupo demonstrou que o miR-21 ativa as rotas ERK e MAPK através da inibição de Spry1, levando a fibrose, hipertrofia e disfunção cardíaca no modelo de TAC em camundongos (Thum *et al.*, 2008). Outro estudo, demonstrou que altos níveis de miR-21 foram acompanhados de alargamento do VE, hipo-contratilidade e fibrose em ratos com IC pós-IAM (Cardin *et al.*, 2012). A superexpressão de miR-21 foi detectada no coração de animais submetidos ao modelo de TAC (Sayed *et al.*, 2007, van Rooij *et al.*, 2006). Além disso, o nocaute gênico do miR-21 (miR-21<sup>-/-</sup>) foi suficiente para reduzir a hipertrofia cardíaca *in vitro* (Cheng *et al.*, 2007). Entretanto, Tatsuguchi e cols. sugeriram que o miR-21 regula negativamente a hipertrofia cardíaca patológica em uma abordagem de perda e

ganho de função no modelo TAC em camundongos (Tatsuguchi *et al.*, 2007). Além disso, em resposta a diferentes estresses cardíacos os camundongos nocaute para miR-21 (miR-21<sup>-/-</sup>) apresentam todo o fenótipo de hipertrofia cardíaca, demonstrando que o miR-21 não é essencial para o remodelamento cardíaco patológico (Patrick *et al.*, 2010).

No contexto do exercício, os níveis circulantes do miR-21 foram avaliados em humanos mostrando resultados divergentes. Em alguns estudos níveis elevados de miR-21 foram encontrados na circulação de atletas após exercícios de resistência (corrida ou esteira) (Baggish *et al.*, 2011, Tonevitsky *et al.*, 2013, Wardle *et al.*, 2015). No entanto, outros estudos em humanos e modelos animais não encontraram alteração nos níveis do miR-21 ou esses estavam diminuídos pelo exercício (Fernandes *et al.*, 2011, Martinelli *et al.*, 2014, Mooren *et al.*, 2014, Nielsen *et al.*, 2014).

### 3.3.3. MIR-210

Vários grupos têm destacado o miR-210 como o mais importante miR induzido por hipóxia e um alvo direto do HIF-1 $\alpha$  (Chan *et al.*, 2010, Cicchillitti *et al.*, 2012, Fasanaro *et al.*, 2008, Huang *et al.*, 2009, Ivan *et al.*, 2014). Sua principal ação é sobre a angiogênese, mas tem sido mostrado que o miR-210 é crucial para a sobrevivência celular, função cardíaca, inibição da apoptose e metabolismo oxidativo (Greco *et al.*, 2014, Hu *et al.*, 2010, Huang *et al.*, 2009). Mutharasan e cols. explorou os mecanismos de ativação do miR-210 em cardiomiócitos sob hipóxia e encontrou que a p53 regula o miR-210, provavelmente através da ativação de HIF-1 $\alpha$  enquanto que a Akt regula o miR-210 por um mecanismo independente HIF-1 $\alpha$  (Mutharasan *et al.*, 2011). Ainda, o aumento de expressão do miR-210 teve efeito citoprotetor, diminuindo a produção de EROs. Da mesma forma, o miR-210 diminuiu a morte celular em células submetida a estresse oxidativo em diferentes estudos (Chan *et al.*, 2010, Magenta *et al.*, 2013, Movafagh *et al.*, 2015, Mutharasan *et al.*, 2011). Além disso, a proteína *iron-sulfur cluster assembly* (ISCU1/2) foi identificada como alvo do miR-210. Essa proteína é principalmente implicada com a respiração mitocondrial e a geração de EROs (Chan *et al.*, 2009, Kim *et al.*, 2013). Assim, parece que o miR-210 pode ser modulado pela geração de EROs e esta modulada pelo miR-210 (Kim *et al.*, 2013).

Nas doenças cardiovasculares o miR-210 tem sido extensivamente estudado. Hu e cols. testou o efeito da superexpressão de miR-210 no modelo de IAM em camundongos (Hu *et al.*, 2010). O miR-210 teve um papel protetor aumentando a angiogênese, inibindo apoptose e melhorando a função cardíaca. Nesse estudo foram identificados os alvos Efna3 e Ptp1b, proteínas implicadas com inibição de angiogênese e indução de apoptose, respectivamente (Fasanaro *et al.*, 2008, Hu *et al.*, 2010). Kim e cols. avaliaram o papel miR-210 na sobrevivência celular pós-isquemia em ratos submetidos ao modelo de IAM seguido de transplante de células tronco mesenquimais transfectadas com miR-210 (Kim *et al.*, 2012). Eles observaram a sobrevivência dessas células sob hipóxia letal na área infartada. Além disso, a superexpressão do miR-210 no cardiomiócito diminuiu a área infartada e aumentou a angiogênese (Kim *et al.*, 2012). Assim como os outros miRs, existem estudos com dados conflitantes. Um estudo comparando hipertrofia cardíaca fisiológica e patológica por aumento ou diminuição de PI3K(p110 $\alpha$ ) observou o miR-210 aumentado na hipertrofia cardíaca patológica e sugeriu que a inibição de miR-210 pode ser benéfica (Lin *et al.*, 2010).

#### **3.3.4. MIR-26b**

A família do miR-26 é composta pelo miR-26a e -26b com uma diferença de apenas dois nucleotídeos, mas com a mesma sequência *seed*, o que sugere que estes miRs compartilham genes alvos (Icli *et al.*, 2014, Lewis *et al.*, 2005). Suh e cols. demonstraram que o miR-26a promove a apoptose em cardiomiócitos em cultura induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e identificou GSK3 $\beta$  como um alvo direto (Suh *et al.*, 2012). Icli e cols. num estudo bastante completo mostrou que a superexpressão de miR-26a inibia a angiogênese *in vitro* e *in vivo* em células endoteliais e identificou a proteína SMAD1 como um alvo nessas células (Icli *et al.*, 2013). Além disso, a inibição do miR-26a resultou em menor área de infarto, diminuição da apoptose, melhora na angiogênese e fração de ejeção após isquemia/reperfusão em camundongos. Em adição, foi investigada a relação desse miR com a angiogênese fisiológica, utilizando um modelo de aumento farmacológico de miR-26a (miR-26a mimético) foi observada a diminuição da angiogênese no músculo esquelético após 8 dias de exercício em rodas de treinamento (Icli *et al.*, 2013).

Existem poucos estudos avaliando miR-26b no coração, mas esses demonstraram que ele desempenha um papel na regulação da sobrevivência dos miócitos e hipertrofia cardíaca (Ding *et al.*, 2011, Icli *et al.*, 2014). No contexto da hipóxia, foi observado o aumento do miR-26b em cardiomiócitos neonatais de rato em cultura, acompanhado por apoptose e diminuição dos níveis da PTEN (Wang *et al.*, 2015). Para estudar a superexpressão do miR-26b Han e cols. desenvolveram um modelo transgênico e validaram a GATA4 e PLC $\beta$ 1 como alvos (Han *et al.*, 2012). Os camundongos transgênicos desenvolveram-se normalmente e após uma semana da cirurgia TAC apresentaram menor hipertrofia cardíaca, fibrose e níveis de MHC- $\beta$ . Esses dados demonstraram que a superexpressão de miR-26b inibiu GATA4, uma proteína envolvida com o desenvolvimento do coração e da hipertrofia cardíaca, mas os camundongos demonstraram melhora tanto na disfunção cardíaca como no prognóstico da doença cardiovascular (Han *et al.*, 2012). Da mesma forma, Zhang e cols. demonstraram que o miR-26a/b estava diminuído após 4 semanas, no modelo de constrição na aorta abdominal em ratos, enquanto que a superexpressão de miR-26a/b diminuiu hipertrofia cardíaca e os marcadores de reativação fetal ANF e MHC- $\beta$  (Zhang *et al.*, 2013). Esse estudo validou a GSK3 $\beta$  como alvo direto e atribuiu a essa proteína os principais efeitos do miR-26a/b encontrados (Zhang *et al.*, 2013). Desta forma, parece que a superexpressão de miR-26b inibe a hipertrofia cardíaca patológica.

### **3.3.5. MIR-150**

O miR-150 é altamente expresso nos gânglios linfáticos, timo, baço, cérebro, coração, e está envolvido na regulação da imunidade inata. Este miR foi encontrado reduzido em pacientes com IAM e IC, assim como em modelos animais dessas doenças (Liu *et al.*, 2015, Sayed *et al.*, 2007, Thum *et al.*, 2007, van Rooij *et al.*, 2006). A superexpressão do miR-150 reduziu a migração de monócitos e produção de citocinas pró-inflamatórias e isso resultou na melhora da função cardíaca, com redução da área infarto, da apoptose e dos níveis inflamatórios após o IAM. Em uma abordagem de perda e ganho de função foi identificada a proteína CXCR4 como um alvo de miR-150 (Liu *et al.*, 2015). Níveis elevados de miR-150 foram associados a formação cardíaca em fetos e a pacientes com prognóstico favorável, demonstrando um papel protetor e no

desenvolvimento do coração (Devaux *et al.*, 2013, Thum *et al.*, 2007, van Rooij *et al.*, 2006, Zidar *et al.*, 2011). Esse papel protetor foi demonstrado por Liu e cols. utilizando um modelo transgênico de miR-150 seguido por cirurgia TAC em camundongos (Liu *et al.*, 2015). Esses animais tiveram uma taxa de sobrevivência 25% maior comparados aos animais selvagens, 8 semanas após a cirurgia. Além disso, a superexpressão miR-150 atenuou a fibrose, hipertrofia e disfunção cardíaca. Em uma abordagem de perda e ganho de função foi demonstrado que o miR-150 regula negativamente os níveis de proteína SRF no coração (Liu *et al.*, 2015). Da mesma forma, outro estudo com abordagem de perda de função do miR-150 demonstrou o aumento da apoptose cardíaca, fibrose, disfunção cardíaca e menor sobrevivência após IAM em camundongos (Tang *et al.*, 2015). Foi identificado que o miR-150 inibe diretamente os genes pró-apoptóticos EGR2 e P2X7R, sugerindo que miR-150 protege o coração contra o estresse isquêmico, em parte, pela repressão desses genes (Tang *et al.*, 2015). Outros estudos identificaram ZEB1, NOTCH3, c-Myb como alvos do miR-150, demonstrando um possível efeito desse miR sobre a proliferação celular, angiogênese, apoptose e sobrevivência (Li *et al.*, 2013, Luo *et al.*, 2013, Zhang *et al.*, 2010).

#### **4. ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO (EROs)**

Os radicais livres são definidos como qualquer substância química que apresente um ou mais elétrons desemparelhados. Por isso os radicais livres são extremamente reativos e capazes de atacar outras biomoléculas para se estabilizar. No processo de respiração celular, o oxigênio recebe quatro elétrons ao longo da cadeia transportadora de elétrons, resultando na sua redução até água. Porém, neste processo formam-se compostos intermediários, as espécies reativas de oxigênio (EROs), que são bastante reativas (Figura 7). A formação das EROs ocorre em 2-5% de todo oxigênio que passa pelo processo de respiração celular na mitocôndria (Halliwell *et al.*, 2007). A hipóxia, situações patológicas ou que aumentem o consumo de oxigênio, como o exercício físico, podem estar associadas ao aumento da produção de EROs (Chua *et al.*, 2010, Giordano, 2005, Kietzmann *et al.*, 2005).

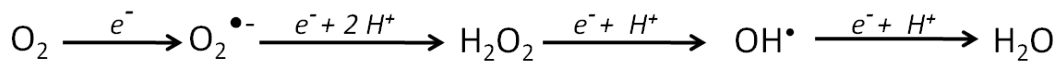


Figura 7 – Esquema da geração de espécies reativas do oxigênio a partir da redução do oxigênio. (Halliwell *et al.*, 2007)

#### 4.1. SISTEMAS ANTIOXIDANTES E A VITAMINA E

O organismo humano possui um sistema de defesa antioxidante que evita o aumento excessivo das EROs e mantém o equilíbrio redox. O estresse oxidativo ocorre quando radicais livres são gerados além da capacidade antioxidante intrínseca. A geração excessiva de EROs desencadeia disfunção celular, peroxidação de lipídios, mutagênese de DNA e pode levar a danos celulares irreversíveis e morte celular (Figura 8) (Halliwell *et al.*, 2007).

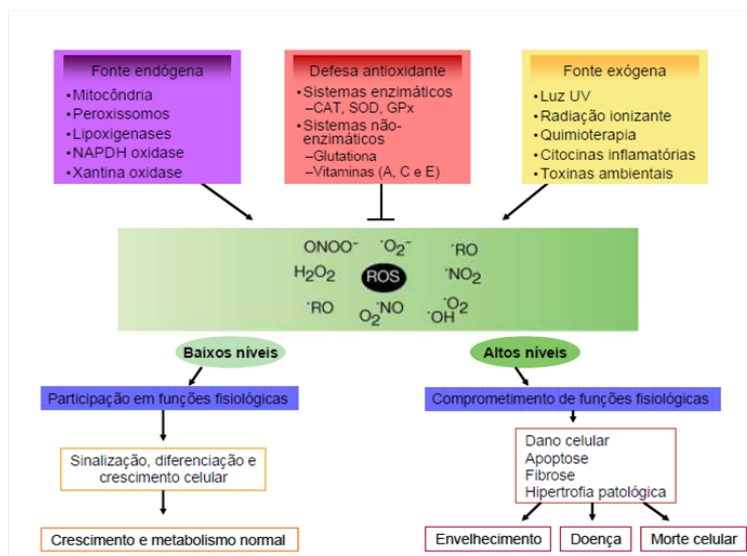


Figura 8. Esquema demonstrando a formação das espécies reativas do oxigênio e sua participação em processos celulares (Finkel *et al.*, 2000).

O sistema antioxidante é formado pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) e por compostos não-enzimáticos como as vitaminas A, C e E, e a glutatona. Condições fisiológicas e patológicas podem alterar a atividade dessas enzimas. Modelos de exercício físico em ratos e camundongos demonstram o aumento da atividade da CAT e diminuição das enzimas SOD e GPx (Silva *et al.*, 2009, Silva *et al.*, 2011).

O sistema antioxidante não-enzimático é formado por compostos lipofílicos, como os tocoferóis, carotenóides, flavonóides e os hidrofílicos, como

a vitamina A e o ácido ascórbico. Dentre eles destaca-se a vitamina E que é constituída por uma mistura de tocoferóis e tocotrienóis que são sintetizadas pelas plantas. Todos são derivados de 6-cromanol com uma cadeia lateral alifática. Os tocoferóis são nomeados de acordo com a posição e o número de grupos metila no anel de fenol, como  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  (Figura 9). Estas diferenças estruturais determinam a atividade biológica, sendo o  $\alpha$ -tocoferol o mais biologicamente ativo (Rimbach *et al.*, 2010).

A vitamina E atua como *scavenger* (varredor) de radicais livres, pois possui em sua molécula um grupo hidroxila, no qual o átomo de hidrogênio é facilmente removido. Após sua atividade antioxidante, o  $\alpha$ -tocoferol torna-se  $\alpha$ -tocoferil, um radical livre de baixa reatividade que pode reagir com outros antioxidantes, como a vitamina C, para ser regenerado ao seu estado original (Yu,1994). A vitamina E preserva a integridade das membranas biológicas, estabiliza sua permeabilidade e fluidez e previne a apoptose induzida por estresse oxidativo. Além disso, o  $\alpha$ -tocoferol é capaz de prender óxidos de nitrogênio na membrana solúvel eletrofílica e, assim, de forma eficiente inibir danos derivados de espécies reativas de nitrogênio (Rimbach *et al.*, 2010).

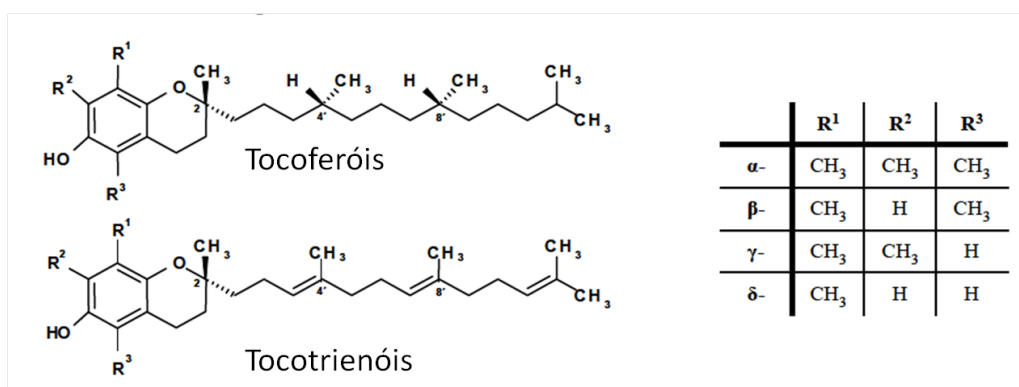


Figura 9. Estrutura dos compostos formadores da vitamina E (Rimbach *et al.*, 2010).

As células ainda tem um mecanismo de defesa endógeno contra o estresse oxidativo, o fator de transcrição Nrf2 que atua como um regulador mestre da sobrevivência celular. O Nrf2 regula a transcrição de antioxidantes como a glutathiona, reduzida ligando-se aos elementos de resposta antioxidante (ARE) um conjunto de genes específicos de resposta ao estresse oxidativo.



## 4.2. ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO E SINALIZAÇÃO CELULAR

A geração de EROs é normal na fosforilação oxidativa, em peroxissomos, retículo endoplasmático, leucócitos e endotélio. Em cada sítio as EROs desempenham papéis como a defesa contra microorganismos invasores, metabolismos de aminoácidos, detoxificação de drogas e controle de rotas de sinalização (Halliwell *et al.*, 2007). Estudos têm demonstrado a participação das EROs em rotas de sinalização fisiológicas, estimulando fatores de transcrição e quinases sinalizadoras de hipertrofia cardíaca (Figura 8) (Dröge, 2002, Giordano, 2005, Kietzmann *et al.*, 2005). As EROs parecem ter um papel importante como segundo mensageiro de estímulos principalmente dos fatores de crescimento IGF e PDGF e na modulação de fatores de transcrição como o NF- $\kappa$ B e a AP-1 (Giordano, 2005). Um estudo demonstrou que ratos que recebiam vitamina E apresentaram uma diminuição da Akt fosforilada quando comparados ao grupo controle, sugerindo que as EROs são possíveis mediadoras da ativação da via da PI3K/Akt (Araujo *et al.*, 2007). Há evidências desta relação em um estudo com camundongos heterozigotos para o HIF-1 $\alpha$  (Hif1 $\alpha^{+/-}$ ) que passaram pelo pré-condicionamento de isquemia e reperfusão. Este trabalho observou que os animais Hif1 $\alpha^{+/-}$  não aumentaram a produção de EROs mitocondrial, a inativação da PTEN ou a fosforilação da Akt, diferentemente dos animais selvagens que tiveram todas essas respostas. Esses dados sugerem que o HIF-1 $\alpha$  está associada ao acúmulo de EROs que inativa a PTEN, um regulador negativo da via da Akt (Cai *et al.*, 2008). Além disso, a hipóxia aguda leva ao aumento da produção de EROs a partir da mitocôndria e isso pode ser necessário para inibir a prolil hidroxilase e acumular o HIF-1 $\alpha$ . Assim, diversos estudos tem sugerido que as EROs participariam da ativação da via da HIF/Akt e essa ativação pode ocorrer via modulação de microRNAs (Brunelle *et al.*, 2005, Cadenas *et al.*, 2010, Cerretelli *et al.*, 2011, Chandel *et al.*, 2000, Movafagh *et al.*, 2015).

### 4.3. ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO E HIPERTROFIA CARDÍACA

O potencial papel das EROs na hipertrofia mal-adaptativa e na progressão para insuficiência cardíaca tem sido extensivamente estudado. As EROs participam nos principais mecanismos da IC como a disfunção contrátil, desregulação de cálcio, morte celular, fibrose, arritmia e hipertrofia de cardiomiócitos. Experimentos *in vitro* e modelos animais demonstraram a participação das EROs nas respostas celulares hipertróficas (Araujo *et al.*, 2007, Kwon *et al.*, 2003, Pimentel *et al.*, 2001, Sabri *et al.*, 2003, Takano *et al.*, 2003, Xiao *et al.*, 2002), bem como ativação e aumento do estresse oxidativo em resposta a estímulos patológicos e na presença de insuficiência cardíaca (Heymes *et al.*, 2003, Sam *et al.*, 2005, Singh *et al.*, 1995, Takimoto *et al.*, 2007). O estresse oxidativo participa do estímulo hipertrófico acoplado a proteína G por estimulação dos receptores da Ang II e  $\alpha$ -adrenérgicos (Giordano, 2005, Patten *et al.*, 2010, Takimoto *et al.*, 2007). O papel do estresse oxidativo na hipertrofia patológica foi também demonstrado através do uso de antioxidantes e seu papel no remodelamento cardíaco e progressão para insuficiência cardíaca. Em diversos modelos experimentais de hipertrofia patológica, antioxidantes como vitamina E, resveratrol, ou mesmo a superexpressão geneticamente determinada de antioxidantes, reduziram hipertrofia cardíaca e/ou progressão para insuficiência cardíaca (Dhalla *et al.*, 1996, Gupta *et al.*, 2014, Qin *et al.*, 2010).

No entanto, o papel das EROs na hipertrofia cardíaca fisiológica, ainda não está estabelecido. O exercício físico é um potencial gerador de EROs na musculatura esquelética e no coração. Motivados por isso, diversos estudos têm avaliado as EROs e dano oxidativo em atletas e modelos animais de exercício. Enquanto alguns estudos têm associado o exercício a alterações e adaptações benéficas outros têm reforçado a hipótese inicial (Boveris *et al.*, 2008, Gomez-Cabrera *et al.*, 2008, Powers *et al.*, 2008, Powers *et al.*, 2011, Wagner *et al.*, 2011). Assim, muitos estudos com intervenção antioxidante (vitaminas E e C) não observaram melhora para o exercício e além disso, as adaptações metabólicas e de enzimas antioxidantes foram abolidas pela intervenção (Cobley *et al.*, 2015, Garelnabi *et al.*, 2012, Gomez-Cabrera *et al.*, 2008, Ristow *et al.*, 2009, Venditti *et al.*, 2014). Além disso, os estudos em

humanos têm falhado em demonstrar benefício clínico com intervenção antioxidante. Meta-análises recentes não têm demonstrado benefícios ou diminuição na incidência de eventos cardiovasculares com o uso de diferentes intervenções antioxidantes (Myung *et al.*, 2013, Paganini-Hill *et al.*, 2015, Sesso *et al.*, 2008).

#### 4.4. EROS, ANGIOGÊNESE E HIPERTROFIA CARDÍACA

A importância da participação das EROs em processos biológicos normais tem sido reconhecida nos últimos anos. As EROs parecem participar de processos celulares em uma maneira concentração-dependente, onde em baixas doses participaria de processos fisiológicos como sinalização de rotas hipertróficas, e em concentrações elevadas como um estímulo a rotas de toxicidade e morte celular (Burgoyne *et al.*, 2012, Hafstad *et al.*, 2013, Kwon *et al.*, 2003, Madamanchi *et al.*, 2013). O processo hipertrófico apresenta muitos pontos de conexão com as EROs. Estímulos mecânicos e estímulos relacionados a proteína G aumentam a produção de EROs e essas ativam moléculas intermediárias causando um *feedback* positivo do mecanismo patológico (Figura 10).

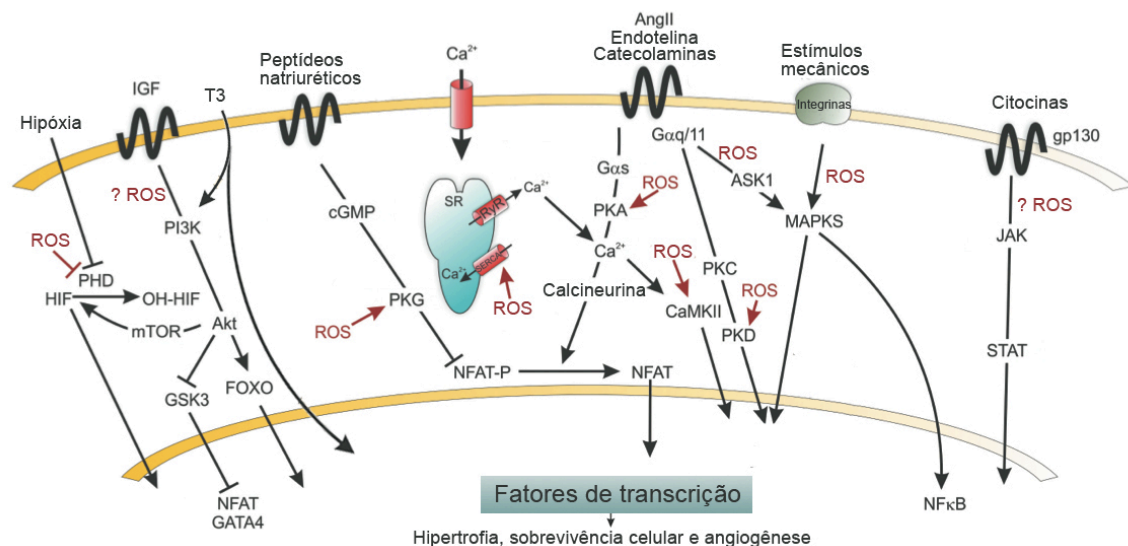


Figura 10 – Esquema demonstrando as principais vias de sinalização do processo hipertrófico e a participação das EROs (Burgoyne *et al.*, 2012).

Diversos estudos têm explorado a inter-relação entre EROs e a ativação do HIF-1 $\alpha$ . As EROs parecem ser necessárias para a ativação de HIF-1 $\alpha$  tanto em resposta a hipóxia quanto em resposta a estímulos hipertróficos como IGF (Biswas *et al.*, 2007, Cadenas *et al.*, 2010, Chandel *et al.*, 2000, Mansfield *et al.*, 2005, Movafagh *et al.*, 2015). Enquanto antioxidantes bloqueiam completamente a ativação de HIF-1 $\alpha$  insulino-estimulada, o peróxido de hidrogênio restabelece esta ativação, o que confirma o papel das EROs na sinalização do crescimento celular e angiogênese (Biswas *et al.*, 2007). Da mesma forma, células tronco embrionárias utilizam EROs como sinalizadores para diferenciação celular induzida por estiramento mecânico, resultando em cardiogênese e vasculogênese coordenadas (Schmeler *et al.*, 2006). Neste processo, o bloqueio das EROs com o antioxidante vitamina E inibe o aumento na expressão de HIF-1 $\alpha$  e a angiogênese, mais uma vez demonstrando o papel das EROs como mecanotransdutoras do estímulo hipertrófico e como reguladoras da resposta coordenada de crescimento e angiogênese (Schmeler *et al.*, 2006). Além disso, as EROs têm uma estreita relação com fatores de crescimento como o IGF. O estímulo do IGF desencadeia a ativação da via PI3K, mas também aumenta a produção de EROs. As EROs inibem a PTEN que é um conhecido inibidor da via do IGF/PI3K. Desta forma, as EROs podem ativar a HIF-1 $\alpha$  indiretamente a partir do estímulo do IGF (Kietzmann *et al.*, 2005, Movafagh *et al.*, 2015, Tormos *et al.*, 2010).

#### **4.5. ESTRESSE OXIDATIVO E MIRS**

De um lado, as EROs têm um papel de sinalização e mediação celular bem estabelecido. De outro lado, estudos têm demonstrado que os microRNAs são importantes moduladores da expressão gênica. No entanto, poucos estudos avaliaram a possível inter-relação entre as EROs e a expressão de microRNAs.

Os miRs parecem ter a habilidade de regular processos como a geração e controle de EROS (Cheng *et al.*, 2013). De fato, as análises *in silico* revelam que 85 miRs têm como alvo predito o RNAm do Nrf2. Dentre esses miRs, o miR-27a promoveu a diminuição do alvo Nrf2 em células neurais (Narasimhan *et al.*, 2012). Outra evidência da relação miR-EROS foi a utilização do nocaute

gênico da enzima Dicer, que gera uma diminuição global nos níveis de miRs, resultando na diminuição da produção de ROS em resposta a estimulação de dano em cultura de células endoteliais (Shilo *et al.*, 2008). Além disso, existe a possibilidade de os miRs serem modificados pelas EROS alterando sua integridade, estabilidade, afinidade e funcionalidade, contribuindo para a sinalização redox e para os mecanismos de doença (Shilo *et al.*, 2008).

Por outro lado, as EROs parecem ter a capacidade de regular diretamente a expressão de microRNAs. Estudos tem destacado a participação de EROS na ativação de miR-21 (Dando *et al.*, 2015, Lin *et al.*, 2009). O miR-21 está aumentado em cultura de cardiomiócitos em resposta a adição de peróxido de hidrogênio, promovendo a redução da morte celular e apoptose induzidas pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Cheng *et al.*, 2009). Da mesma forma, o miR-499 teve seus níveis aumentados e inibiu a apoptose em cultura de cardiomiócitos em resposta a adição de peróxido de hidrogênio. Nesse estudo foi demonstrado que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induziu a fosforilação da c-Jun que teve uma atividade promotora sobre o gene *Myh7b* promovendo a expressão do miR-499 (Wang *et al.*, 2014). Além disso, o miR-210 também parece ter um efeito citoprotetor controlando a geração de EROS, principalmente inibindo seu alvo ISCU 1/2 (Chan *et al.*, 2009, Kim *et al.*, 2013).

A inter-relação entre EROs e a ativação da resposta angiogênica via HIF-1 $\alpha$  têm sido explorada. Estudos já citados têm indicado a participação de EROs na ativação da HIF-1 $\alpha$  (Chandel *et al.*, 2000, Kietzmann *et al.*, 2005, Movafagh *et al.*, 2015, Tormos *et al.*, 2010). Ainda, a resposta a hipóxia via HIF-1 $\alpha$  pode passar por uma sinalização via microRNAs. Dentre os miR envolvidos nessa rota, o principal parece ser o miR-210 que aparece super expresso em todas as linhagens celulares testadas sob hipóxia.

Desta forma, parece que tanto os miRs quanto as EROs tem a capacidade de modular processos quanto de influenciar um ao outro. Ainda, como demonstrado anteriormente, ambos podem participam dos processos de homeostase e doença de forma bastante distinta. No entanto, a participação e interrelação de EROs e miRs no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca ainda não está elucidado.

## 5. JUSTIFICATIVA

O entendimento e a diferenciação dos processos envolvidos nas hipertrofias cardíacas fisiológica e patológica é um passo fundamental para a avaliação de rotas indispensáveis para a manutenção da função miocárdica. Ainda, o conhecimento desta diferenciação é fundamental para o desenvolvimento de intervenções que tentem evitar a progressão da resposta maladaptativa e insuficiência cardíaca. Os microRNAs aparecem como importantes reguladores da expressão gênica tanto em condições fisiológicas quanto patológicas. Além disso, estudos começam a demonstrar a ação de EROs sobre a regulação e modulação de miRs, fazendo com que a participação das EROs no processo de hipertrofia cardíaca possa ocorrer através da modulação da expressão de miRs. Assim, a presença das EROs pode ser necessária, e seu efeito dependente da modulação de miRs. A elucidação destas interações pode auxiliar no entendimento de dados conflitantes e por vezes inesperados sobre o resultado do bloqueio das EROs em diversas situações fisiológicas ou patológicas.

Desta forma, a identificação do papel dos miRs e de sua modulação por EROs na hipertrofia cardíaca fisiológica e patológica constitui passo fundamental para o estudo de rotas que possam interferir neste processo para garantir a coordenação de diversas respostas e a manutenção da função cardíaca. Ainda, o papel de intervenções que bloqueiam espécies reativas do oxigênio neste cenário trará um importante avanço no conhecimento da participação destas espécies em um modelo de adaptação fisiológica cardíaca, bem como de seu papel na resposta maladaptativa e progressão para insuficiência cardíaca.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1. Objetivo geral**

Avaliar as diferenças morfológicas e moleculares da hipertrofia cardíaca fisiológica (induzida pelo exercício) e patológica (por bandejamento aórtico) e sua possível modulação pela vitamina E.

### **6.2. Objetivos secundários**

- Avaliar o efeito da suplementação com vitamina E no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca fisiológica induzida pelo exercício físico em camundongos.
- Analisar a participação dos microRNAs no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca fisiológica e sua possível modulação pela vitamina E.
- Avaliar o efeito do tratamento com vitamina E no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca patológica induzida por bandejamento aórtico em camundongos.
- Analisar a participação dos microRNAs no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca patológica e sua possível modulação pela vitamina E.
- Identificar as diferenças morfológicas e moleculares entre as hipertrofias cardíacas fisiológica e patológica.

## **PARTE II**

ARTIGOS CIENTÍFICOS



**Vitamin E affects angiogenesis and microRNA expression in mice with  
physiological cardiac hypertrophy**

ARTIGO SUBMETIDO A REVISTA  
CARDIOVASCULAR RESEARCH

**Vitamin E affects angiogenesis and microRNA expression in mice with  
physiological cardiac hypertrophy.**

Brief Title: Vitamin E effects on physiological cardiac hypertrophy

Carolina R. Cohen<sup>1,2,3</sup>, Nidiane C. Martinelli<sup>1,2,3</sup>, Mariana Recamonde-  
Mendonza<sup>1</sup>, Kátia G. Santos<sup>1,2</sup>, Michael E. Andrades<sup>1,2</sup>, Nadine Clausell<sup>1,2</sup>, Luis  
E. Rohde<sup>1,2</sup>, Patrícia Ashton-Prolla<sup>3</sup>, Andréia Biolo<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Experimental and Molecular Cardiovascular Laboratory and the Heart Failure and Cardiac Transplant Unit from the Cardiology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil,

<sup>2</sup> Post-Graduate Program in Cardiology and Cardiovascular Science, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil,

<sup>3</sup> Post-Graduate Program in Genetics and Molecular Biology and Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Word count: 5555

Address for correspondence:

Andréia Biolo MD

Heart Failure and Transplant Unit

Cardiology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350, Sala 2060

Porto Alegre, RS, Brazil 90035-003

Phone/Fax 55 51 33598844

E-mail address: [biolo.andreia@gmail.com](mailto:biolo.andreia@gmail.com)

## ABSTRACT

**AIMS:** We evaluated the effects of vitamin E supplementation on cardiac hypertrophy, angiogenesis and microRNA (miR) expression induced by exercise in mice. **METHODS AND RESULTS:** Male Balb/c mice were randomly divided into four cohorts: sedentary (SED,  $n=24$ ), exercise only (EX,  $n=32$ ), vitamin E only (SED+VIT,  $n=24$ ), and exercise plus vitamin E (EX+VIT,  $n=32$ ). Once a day VIT groups received 200 mg/kg of  $\alpha$ -tocopherol, and SED and EX groups received placebo, both by gavage. After 7 and 35 days of training, analyses of cardiac hypertrophy, angiogenesis, miRs and gene expression were performed. Left ventricle mass increased in both EX and EX+VIT groups (all  $p<0.05$  vs. SED groups). However, the EX+VIT group animals had lower cellular hypertrophy compared with EX ( $p<0.01$ ). Likewise, angiogenic analyses demonstrated decreased HIF-1 $\alpha$  and capillary density in the EX+VIT group compared with the EX group in 7 days ( $p<0.01$ ). MiR-21 and -210 expression levels were increased in EX but not in EX+VIT mice compared to SED at both time points. Furthermore, only EX group animals had an augmentation in miR-150 levels at 35 days. Bioinformatic analyses suggest the participation of these miRs in pathways previously implicated in the mechanisms of cardiac hypertrophy and angiogenesis. **CONCLUSION:** Supplementation with vitamin E affected both the magnitude of cardiac hypertrophy and the angiogenic response mainly in early development of hypertrophy. Also, vitamin E seems to interfere with miR-21, -150 and -210 changes that occur in response to voluntary exercise and that might underscore the role of those microRNAs in physiologic cardiac hypertrophy.

**Keywords:** Cardiac Hypertrophy; Vitamin E; Voluntary Exercise; Angiogenesis; MicroRNAs.

## INTRODUCTION

Physiological cardiac hypertrophy, such as that induced by exercise, is characterized by uniform growth of the ventricle, with normal or increased cardiac function and absent fibrosis<sup>1, 2</sup>. Coordinated angiogenesis seems to be crucial to maintain cardiac function and the adaptative response to exercise<sup>1, 3</sup>. Hypoxia inducible factor 1  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) is a regulator of oxygen homeostasis that controls more than 100 genes of metabolism, survival, proliferation, migration, angiogenesis, including the vascular endothelial growth factor (VEGF)<sup>4</sup>. HIF-1 $\alpha$  seems to play a critical role in cardiac adaptation to hypertrophic stimuli and angiogenesis<sup>5, 6</sup>. Moreover, cardio-specific deletion of HIF-1 $\alpha$  resulted in reduction in cardiac contractility and vascularization<sup>7</sup>.

Reactive oxygen species (ROS) have a concentration-dependent participation in several cell signaling processes, both physiological (at low concentrations) and pathological (at high concentrations), the latter inducing irreversible cellular damage and death<sup>8-10</sup>. The potential role of ROS in pathological hypertrophy and heart failure progression has been extensively studied<sup>11</sup>. However, intervention trials with antioxidants such as vitamins E, C,  $\beta$ -carotene and selenium alone or combined failed in demonstrating benefits to reduce cardiovascular outcomes or improve exercise capacity<sup>12-14</sup>. Since low levels of ROS have an important role in several biological processes, their inhibition could even be deleterious under physiological conditions<sup>13, 15, 16</sup>.

MicroRNAs (miRs) play pivotal roles in many physiological and pathological processes, and under different diseases or conditions they show a differential expression profile<sup>17</sup>. Several miRs have been identified to have effects on cardiac hypertrophy, angiogenesis, and/or cardiac function, including miR-21, miR-210 and miR-150<sup>18, 19</sup>. Furthermore, some studies have demonstrated ROS modulation of miR-21 and -210<sup>20, 21</sup>. This complex interplay underscores the potential participation of miRs in regulating ROS-mediated hypertrophy and angiogenesis. We therefore aimed to investigate the effects of vitamin E supplementation in the development of physiological cardiac hypertrophy induced by voluntary exercise in mice by evaluating the degree of hypertrophy, angiogenesis, microRNAs and gene expression, and exercise performance.

## METHODS

**Animals and experimental protocol** – Eight to ten-week-old male Balb/c mice were randomly divided into four cohorts: sedentary (SED,  $n=24$ ), exercise only (EX,  $n=32$ ), vitamin E only (SED+VIT,  $n=24$ ), and exercise plus vitamin E (EX+VIT,  $n=32$ ). Once a day SED+VIT and EX+VIT groups received  $\alpha$ -tocopherol (200 mg/kg) (Sigma-Aldrich, US) and SED and EX groups received placebo (soybean oil vehicle) by gavage<sup>22</sup>. Training with a standard exercise protocol (below) and gavage occurred every day until euthanasia, which was performed after 7 (D7) and 35 days (D35) of training.

Mice were studied and kept at the experimental animal facility in the Research Center of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Consumption of food and water were checked daily and body weight was measured weekly. All animals were supplied with food and water *ad libitum* and were kept on a 12-h light and 12-h dark regime at 23°C. This study was approved by the institutional ethics in research committee (protocol numbers 08-694 and 11-470) and performed in accordance with Brazilian and international guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals<sup>23</sup> and the ARRIVE guidelines<sup>24</sup>.

**Model of Physiological Hypertrophy** – Physiological hypertrophy was induced by a standard protocol of voluntary exercise for 35 days, as previously described<sup>25</sup>. In brief, EX and EX+VIT animals were placed in cages with metal training wheels which they could access freely 24 h/day. SED and SED+VIT mice were housed in standard cages without training wheels.

**Maximal Exercise Test** – Individual maximal exercise capacity was performed using a rodent treadmill without inclination (Space Saver TreadmillH, US) as previously described<sup>26</sup>.

**Euthanasia protocol** – For acute and chronic evaluations, animals were euthanized in equal numbers at two moments: 7 and 35 days after starting the protocol. Mice were anesthetized with a mixture of ketamine and xylazine (100mg/kg and 10mg/kg respectively), weighted and then had their heart quickly removed. The left ventricle (LV) was isolated and separated in RNA *later* (Qiagen, US) or snap-frozen in liquid nitrogen and were stored at -80°C until molecular analyses.

**Histological and immunohistochemistry analyses** – In order to examine the cellular hypertrophy, LV samples were formalin-fixed, embedded with paraffin,

sectioned at 4  $\mu\text{m}$  thickness and hematoxylin and eosin stained. In order to estimate angiogenesis, the sections were incubated with rat anti-mouse CD31 (PECAM-1) monoclonal antibody. A blinded investigator measured histological parameters.

### **Molecular analyses**

Total RNA and miRs were isolated from 30 mg of LV using the miRNeasy mini kit (Qiagen, US), according to the manufacturer's instructions. After extraction, 50 pM of synthetic microRNA-39 from *Caenorhabditis elegans* (cel-miR-39, Qiagen, US) was added to each sample as a standard control for quantitative real time PCR (qRT-PCR). QRT-PCR was conducted to assess miR, HIF-1 $\alpha$  and VEGF gene expression run in triplicate using TaqMan Assays in a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Inc., US). Gene expression levels were normalized for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH). The relative expression of each miR and gene was calculated with the comparative threshold cycle ( $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ ) method<sup>27</sup>. All qRT-PCR data used the SED group as reference group.

### **Computational prediction and functional annotation of miR targets –**

Target prediction analyses was carried out with TargetScan and miRTarBase and gene-annotation enrichment analysis was performed for pathway maps from KEGG using DAVID resource.

**Statistical analysis –** Data are expressed as mean and standard error. Student's t-test, ANOVA followed by Tukey *post-hoc* or Kruskal-Wallis followed by Dunn's *post-hoc* were used as appropriated. The level of significance was set at 5%.

For more details on methods, see Supplementary material online.

## **RESULTS**

**Voluntary exercise –** The protocol employed in this study was effective in stimulating mice to spontaneously exercise. EX group animals ran approximately  $5\pm 0.2$  hours and  $6\pm 0.2$  km daily. EX+VIT group animals ran a daily average of  $6\pm 0.2$  hours ( $p>0.05$  vs. EX) and  $7\pm 0.3$  km of distance ( $p=0.03$  vs. EX) during the training protocol. Both groups ran at an average speed of  $19\pm 0.3\text{m/min}$  ( $p>0.05$ ).

**Maximal exercise capacity on treadmill** – All mice had similar performance at baseline, as depicted in Figure 1. EX mice showed the expected improvement in exercise performance compared with SED animals at 7 days ( $p=0.16$ ) and after 35 days ( $p=0.006$ ). Similarly, EXE+VIT mice increased their exercise capacity after 7 days ( $p=0.02$ ) and 35 days ( $p<0.001$ ). Improvement on maximal exercise capacity on treadmill was similar between EX and EX+VIT groups ( $p>0.05$ ).

**Cardiac hypertrophy** – The voluntary wheel exercise was effective to induce cardiac hypertrophy. LV weight/body weight (LVW/BW) increased by 9% at 7 days ( $p=0.002$ ) and by 12% after 35 days ( $p<0.001$ ) in the EX group (Figure 2A, B). In the EX+VIT group, LVW/BW increased by 6% after 7 days ( $p=0.007$ ) and by 9% after 35 days ( $p<0.001$ ). Despite the lower nominal increases in the EX+VIT group, there was no difference between EX and EX+VIT groups regarding cardiac hypertrophy at both time points ( $p>0.05$  for all). However, histological analyses of myocyte cross-section area demonstrated more significant cardiac hypertrophy in the EX animals compared to the EX+VIT animals in 7 days and 35 days ( $p<0.001$ ;  $p=0.006$ ; respectively; Figure 2C,D).

**Gene expression and angiogenic analyses** – Gene expression of HIF-1 $\alpha$  at 7 days was increased in EX compared with SED animals ( $p=0.042$ ); vitamin E abrogated this effect ( $p<0.001$ ; Figure 3A). At 35 days, there was a trend to higher VEGF expression in EX compared with SED animals ( $p=0.075$ ; Figure 3D). Interestingly, vitamin E not only prevented VEGF and HIF-1 $\alpha$  expression augmentation associated with exercise, but resulted in an accentuated decrease in the expression of these genes at 35 days (VEGF:  $0.37\pm 0.1$  fold; HIF-1 $\alpha$ :  $0.24\pm 0.1$  fold, both  $p<0.001$  vs. EX group Figure 3B, D).

Moreover, analyses of angiogenesis showed that trained mice in both groups had increased capillary density compared to sedentary animals in 7 days (Figure 4A;  $p<0.05$  for all). However, vitamin E attenuated this increase in capillary density ( $p=0.003$  vs. EX group). On chronic evaluation, both EX and EX+VIT mice maintained larger capillary density (EX:  $165\pm 14\%$  vs. SED:  $100\pm 4\%$ ,  $p<0.001$ ; EX+VIT:  $163\pm 11\%$  vs. SED+VIT:  $121\pm 5\%$ ,  $p=0.084$ ; Figure 4), but without a significant difference between groups.

**MicroRNA analyses** – MiR-21 expression was increased in EX mice compared to SED at both time points ( $p<0.05$ ; Figure 5A, B). This increase was abrogated by vitamin E both at 7 days ( $p=0.012$  vs. EX) and at 35 days ( $p<0.001$  vs. EX).

In the same way, miR-210 expression was increased by exercise in EX compared to SED animals at both time points ( $p < 0.05$ ; Figure 5C, D). Again, this increase was not seen in mice receiving vitamin E. Furthermore, vitamin E abrogated increase of miR-150 expression observed with exercise at 35 days (EX:  $2.53 \pm 0.3$  vs. SED:  $1.03 \pm 0.1$ ;  $p < 0.001$ ; EX+VIT:  $1.56 \pm 0.1$ ;  $p = 0.04$  vs. EX; Figure 5F).

**Prediction of miR targets** – Computational target prediction by TargetScan returned a total of 454 conserved genes potentially regulated by studied miRs. Specifically, 205 target genes were found for miR-150, 246 for miR-21 and 32 for miR-210. Moreover, 19 experimentally validated target genes were retrieved from miRTarBase, one of which was also predicted by TargetScan analysis. Based on data from experimental validation, we found 3 target genes for miR-150, 11 for miR-21 and 5 for miR-210. Merging both sources, we obtained a total of 472 unique putative target genes for the miRs of interest (Table S1). As observed in Figure 6A, all miRs share common targets, but a higher overlap is found between targets of miR-150 and miR-210, as measured by Jaccard similarity coefficient. This data suggest a higher complement between miRs. The exact number of targets shared by different miRs is depicted in the Venn diagram of Figure S1. Interestingly, there is few overlap among the targets, suggesting a complementary role for the studied miRs.

**Pathway enrichment analysis of miR targets** – Pathway enrichment analysis carried out with DAVID identified 33 KEGG pathways associated with the putative targets of the studied miRs, 8 of which have corrected  $p < 0.05$  (Table S2). Among the most enriched KEGG terms, we found ‘MAPK signaling pathway’ ( $n = 27$  genes), ‘Wnt signaling pathway’ ( $n = 12$  genes), ‘Neurotrophin signaling pathway’ ( $n = 15$  genes) and ‘Focal adhesion’ ( $n = 14$  genes). Figure 6B depicts the interaction map between miRs and target genes participating in six KEGG pathways found in the enrichment analysis, which were selected based on their high biological plausibility for the scenario of cardiac hypertrophy. We may observe that the three miRs regulate genes involved in the MAPK signaling pathway, reinforcing the relevance of their activity in this intracellular signaling cascade.



## DISCUSSION

Our study is the first to explore vitamin E supplementation on microRNAs and angiogenesis adaptation in physiological cardiac hypertrophy induced by voluntary exercise in mice. The cardiac hypertrophy development occurred in parallel with increased microRNAs expression and angiogenesis. However, vitamin E supplementation seems to affect the magnitude of cardiac hypertrophy and angiogenic response demonstrated by lower cellular hypertrophy and decreased numbers of capillaries mainly on early evaluation. Moreover, higher expression of miR-21, -150 and -210 in the EX compared to SED group suggests that these miRs participate in cardiac hypertrophy development in response to voluntary exercise. Nonetheless, this signaling was not observed in the EX+VIT group, which may indicate that vitamin E blocks this adaptation. Despite the differences, EX+VIT mice showed cardiac hypertrophy, angiogenesis and exercise capacity similar to EX animals in 35 days, suggesting the existence of compensatory mechanisms that result in similar established hypertrophic phenotypes.

We monitored the effectiveness of training by daily assessment of time and distance ran, as well as by testing maximal exercise capacity. The protocol was effective in stimulating mice to spontaneously exercise consistent with previous studies<sup>25, 28</sup>. Analysis of maximal exercise capacity showed that all trained mice improved similarly their exercise performance. Thus, it seems that vitamin E does not change the ability to exercise. Voluntary wheel exercise demonstrated higher left ventricle mass early as 7 days and was set at 35 days. The degree of hypertrophy was consistent with previous studies of voluntary and forced exercise, demonstrating that our model effectively induced physiological cardiac hypertrophy<sup>25, 29</sup>. The LV mass augmentation was followed by increased myocyte cross-section area, in line with other studies<sup>30, 31</sup>. On the other hand, EX+VIT mice showed numerically lower LV mass but without a statistically significant difference. Nonetheless, we observed lower myocyte cross-section area in EX+VIT mice compared with EX mice in 7 days of training, and this difference was attenuated after 35 days. It appears the effect of vitamin E on the magnitude of hypertrophy was not enough to result in significant differences in LV mass, although a nominal difference could be observed.

Coordinated angiogenesis seems to be crucial to maintain cardiac function and the adaptative response during cardiac hypertrophy development, and is accompanied by HIF-1 $\alpha$  and VEGF activation<sup>6, 32</sup>. In the present study, exercise stimulated angiogenic signaling, shown by increased HIF-1 $\alpha$  gene expression after 7 days, followed by an increased VEGF expression at 35 days. Further, the numbers of capillaries increased after 7 days and 35 days of training. Angiogenic signaling appears to be uneven and dependent on time and stimulus. In fact, studies have failed to detect increased VEGF expression in the heart of trained mice<sup>33, 34</sup>. In addition, a recent study evaluating angiogenesis after 4 weeks of training, in skeletal muscle, found increased VEGF expressions only in forced exercise and proteins regulated by HIF-1 $\alpha$ , only after voluntary exercise<sup>35</sup>. Angiogenesis triggered by exercise is stimulated by growth factors, shear stress and local hypoxia<sup>1, 3, 5</sup>. In all these situations, ROS appear to be involved. In the present study, we observed a marked decrease of VEGF and HIF-1 $\alpha$  gene expression in exercise mice receiving vitamin E, as well as lower numbers of capillaries. Taken together, these results suggest that vitamin E attenuated the angiogenic stimulus. These findings also suggest ROS involvement on HIF-1 $\alpha$  pathway activation and VEGF regulation by hypertrophic stimuli. In fact, some studies have already highlighted the possible HIF-1 $\alpha$  activation by ROS<sup>10, 36, 37</sup>.

In order to block possible damage caused by ROS or increase antioxidant capacity, several human intervention trials used antioxidant supplementation, including vitamin E<sup>12, 38</sup>. However, these trials failed in demonstrating benefits. Likewise, studies in athletes have failed to demonstrate improvement in antioxidant levels and exercise capacity with such supplementation<sup>13, 14, 39</sup>. Here we demonstrated attenuation in hypertrophy, angiogenesis and inhibition of miR expression in animals treated with vitamin E. Probably, ROS increase is temporary and necessary for endogenous antioxidant modulation and signaling of physiological adaptations<sup>15, 16</sup>. Thus, vitamin E supplementation seems to have deleterious effects early in the process but no effect on late exercise adaptations. We hypothesize compensatory mechanisms might take place in order to achieve compensated hypertrophy. But, our study was not delineated to identify such mechanisms.

MicroRNAs have been widely studied for their ability to regulate different processes in a dynamic way. MiR-21, one of the most studied miRs, is involved

in many important processes such as angiogenesis, apoptosis, inflammation and cardiac hypertrophy<sup>40</sup>. MiR-21 overexpression increases HIF-1 $\alpha$  and VEGF expression and activates Akt/ERK signaling, inducing angiogenesis<sup>41</sup>. In the context of exercise, human studies have shown increased circulating miR-21 levels after exercise in athletes, while animal models, no changes in miR-21 were observed<sup>26, 42-44</sup>. In the present study, however, we found increased miR-21 expression in physiological cardiac hypertrophy induced by exercise and suppression of this effect by vitamin E supplementation. It is possible that there is an interrelationship between ROS and miR-21 that leads to the Akt/ERK activation, contributing to HIF-1 $\alpha$  activation and angiogenesis and also apoptosis control<sup>37, 45</sup>. These mechanisms are in tune in physiological cardiac hypertrophy, but supplementation with vitamin E seems to inhibit this process, possibly by decreasing ROS.

Several groups have highlighted miR-210 as the most important hypoxia-induced miR and a direct target of HIF-1 $\alpha$ <sup>21, 46-48</sup>. Its major action is on facilitating angiogenesis, but it has been discovered that miR-210 is critical for cell survival, cardiac function, apoptosis inhibition and oxidative metabolism<sup>48, 49</sup>. MiR-210 can modulate ROS generation and decrease cellular death in cells subjected to oxidative stress<sup>21, 37, 46, 50</sup>. The present study is the first to identify increased miR-210 expression in physiological cardiac hypertrophy. Likewise, most studies have described pro-angiogenic miR-210 actions, necessary to physiological cardiac hypertrophy development. Thus, by interfering with miR-210 activation, vitamin E supplementation might interfere with adaptations such as angiogenesis. Hamama *et al* demonstrated a possible modulation effect of vitamin E analog under miR-210 studying fibrotic cells in culture<sup>51</sup>.

MiR-150 has been reported to play a role in regulating the innate immunity, monocyte migration, inflammation and apoptosis<sup>52</sup>. Moreover, higher levels of miR-150 have been demonstrated protective role for heart disease<sup>53-55</sup>. In the present study, we identified increased miR-150 expression in animals submitted to chronic exercise, in agreement with previous results from our group<sup>26</sup>. This is in line with the potential protective role of miR-150, regulating inflammation, apoptosis and fibrosis that is not characteristic of physiological cardiac hypertrophy. Increased miR-150 expression was not observed in animals treated with vitamin E. Again, vitamin E seems to suppress adaptations induced by exercise.

Pathway enrichment analysis of miR targets identified many mechanisms already described in LV hypertrophy, such as MAPK signaling pathway, focal adhesion and cytokine-cytokine receptor interaction. Among the enriched KEGG terms, we found five pathways described in a previous genome-wide association study that determined the top ten molecular mechanisms involved in physiological cardiac hypertrophy<sup>56</sup>. Moreover, we observed strong enrichment of Wnt signaling, which has been implicated in the regulation of endothelial cell growth and angiogenesis<sup>57</sup>. Taken together, these results suggest possible molecular mechanisms that explain the participation of these miRs in this physiological model. Interestingly, our results show that vitamin E supplementation has an effect on miR expression in the process of physiological cardiac hypertrophy and exercise adaptations, but over time these effects abrogated and a final similar phenotype is obtained in animals with and without vitamin E supplementation.

Some limitations of the present study deserve consideration. First, vitamin E administration does not block ROS production completely, although its effect was sufficient to observe the results of ROS decrease in this physiological context. Second, we studied only a few miRs and development of cardiac hypertrophy probably involves other miRs and regulatory genes. Although these limitations must be considered, we believe any component of this complex regulation is worth studying and our findings will help to elucidate how ROS affects cardiac responses during the process of physiologic hypertrophy. Finally, we have used bioinformatics as an additional tool to explore our findings. Bioinformatics has become an increasingly useful research tool since it provides exploratory data-mining procedures for gaining insight into the underlying biology of differentially expressed miRs, performing hypothesis-free analysis of large-scale data. Nonetheless, results should be interpreted with caution, given the predictive nature of this methodology. In this sense, a careful interpretation of the enrichment analysis done here, focusing on biological plausibility and accompanied by experimental validation of the expression of putative targets, are crucial to confirm the major biological meaning behind the effect of altered miR expression in the highlighted biological pathways.

In conclusion, our data show that, in a model of physiological cardiac hypertrophy developed by voluntary exercise in mice, vitamin E supplementation affects the development of hypertrophy, angiogenesis and

associated expression of miR-21, -150 and -210. These effects are more prominent during development of hypertrophy, however with minimal effects in the final hypertrophic phenotype. Our findings suggest a role for ROS in the development of physiological cardiac hypertrophy and associated angiogenesis, and support that regulation of microRNA expression may be a pivotal step in this interaction.

## FUNDING

This work was supported in part by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA).

## CONFLICT OF INTEREST

Conflict of interest: none declared.

## REFERENCES

1. Ellison GM, Waring CD, Vicinanza C, Torella D. Physiological cardiac remodelling in response to endurance exercise training: cellular and molecular mechanisms. *Heart* 2012;**98**:5-10.
2. Wilson MG, Ellison GM, Cable NT. Basic science behind the cardiovascular benefits of exercise. *Heart* 2015;**101**:758-765.
3. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000;**6**:389-395.
4. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease. *Annu Rev Physiol* 2014;**76**:39-56.
5. Gielen S, Schuler G, Adams V. Cardiovascular effects of exercise training: molecular mechanisms. *Circulation* 2010;**122**:1221-1238.
6. Lundby C, Calbet JA, Robach P. The response of human skeletal muscle tissue to hypoxia. *Cell Mol Life Sci* 2009;**66**:3615-3623.
7. Huang Y, Hickey RP, Yeh JL, Liu D, Dadak A, Young LH, Johnson RS, Giordano FJ. Cardiac myocyte-specific HIF-1 $\alpha$  deletion alters vascularization, energy availability, calcium flux, and contractility in the normoxic heart. *FASEB J* 2004;**18**:1138-1140.
8. Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Viña J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med* 2008;**44**:126-131.
9. Brown DI, Griendling KK. Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system. *Circ Res* 2015;**116**:531-549.

10. Weidinger A, Kozlov AV. Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. *Biomolecules* 2015;**5**:472-484.
11. Madamanchi NR, Runge MS. Redox signaling in cardiovascular health and disease. *Free Radic Biol Med* 2013;**61**:473-501.
12. Paganini-Hill A, Kawas CH, Corrada MM. Antioxidant vitamin intake and mortality: the Leisure World Cohort Study. *Am J Epidemiol* 2015;**181**:120-126.
13. Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Klötting N, Birringer M, Kiehntopf M, Stumvoll M, Kahn CR, Blüher M. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;**106**:8665-8670.
14. Paulsen G, Cumming KT, Holden G, Hallén J, Rønnestad BR, Sveen O, Skaug A, Paur I, Bastiani NE, Østgaard HN, Buer C, Midttun M, FReuchen F, Wiig H, Ulseth ET, Garthe I, Blomhoff R, Benestad HB, Raastad T. Vitamin C and E supplementation hampers cellular adaptation to endurance training in humans: a double-blind, randomised, controlled trial. *J Physiol* 2014;**592**:1887-1901.
15. Yavari A, Javadi M, Mirmiran P, Bahadoran Z. Exercise-induced oxidative stress and dietary antioxidants. *Asian J Sports Med* 2015;**6**:e24898.
16. Cobley JN, McHardy H, Morton JP, Nikolaidis MG, Close GL. Influence of vitamin C and vitamin E on redox signaling: Implications for exercise adaptations. *Free Radic Biol Med* 2015;**84**:65-76.
17. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009;**136**:215-233.
18. Condorelli G, Latronico MV, Cavarretta E. microRNAs in cardiovascular diseases: current knowledge and the road ahead. *J Am Coll Cardiol* 2014;**63**:2177-2187.
19. Ding SL, Zhou LY, Li PF. MicroRNAs in cardiac hypertrophy: angels or devils. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2011;**2**:124-134.
20. Lee S, Choi E, Cha MJ, Hwang KC. Looking into a conceptual framework of ROS-miRNA-atrial fibrillation. *Int J Mol Sci* 2014;**15**:21754-21776.
21. Magenta A, Greco S, Gaetano C, Martelli F. Oxidative stress and microRNAs in vascular diseases. *Int J Mol Sci* 2013;**14**:17319-17346.
22. McDonald SR, Sohal RS, Forster MJ. Concurrent administration of coenzyme Q10 and alpha-tocopherol improves learning in aged mice. *Free Radic Biol Med* 2005;**38**:729-736.
23. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington (DC): National Academies Press (US), 8th ed., 2011.
24. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *J Pharmacol Pharmacother* 2010;**1**:94-99.
25. Allen DL, Harrison BC, Maass A, Bell ML, Byrnes WC, Leinwand LA. Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. *J Appl Physiol (1985)* 2001;**90**:1900-1908.
26. Martinelli NC, Cohen CR, Santos KG, Castro MA, Biolo A, Frick L, Silvello D, Lopes A, Schneider S, Andrades ME, Clausell N, Matte U, Rohde LE. An analysis of the global expression of microRNAs in an

- experimental model of physiological left ventricular hypertrophy. *PLoS One* 2014;**9**:e93271.
27. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;**25**:402-408.
  28. Soffe Z, Radley-Crabb HG, McMahon C, Grounds MD, Shavlakadze T. Effects of loaded voluntary wheel exercise on performance and muscle hypertrophy in young and old male C57Bl/6J mice. *Scand J Med Sci Sports* 2015.
  29. Wang Y, Wisloff U, Kemi OJ. Animal models in the study of exercise-induced cardiac hypertrophy. *Physiol Res* 2010;**59**:633-644.
  30. Natali AJ, Turner DL, Harrison SM, White E. Regional effects of voluntary exercise on cell size and contraction-frequency responses in rat cardiac myocytes. *J Exp Biol* 2001;**204**:1191-1199.
  31. DeBosch B, Treskov I, Lupu TS, Weinheimer C, Kovacs A, Courtois M, Muslin AJ. Akt1 is required for physiological cardiac growth. *Circulation* 2006;**113**:2097-2104.
  32. Oka T, Akazawa H, Naito AT, Komuro I. Angiogenesis and cardiac hypertrophy: maintenance of cardiac function and causative roles in heart failure. *Circ Res* 2014;**114**:565-571.
  33. Suzuki J. Microvascular angioadaptation after endurance training with L-arginine supplementation in rat heart and hindleg muscles. *Exp Physiol* 2005;**90**:763-771.
  34. Tang K, Xia FC, Wagner PD, Breen EC. Exercise-induced VEGF transcriptional activation in brain, lung and skeletal muscle. *Respir Physiol Neurobiol* 2010;**170**:16-22.
  35. Vogel J, Kruse C, Zhang M, Schröder K. Nox4 supports proper capillary growth in exercise and retina neo-vascularization. *J Physiol* 2015;**593**:2145-2154.
  36. Kim JH, Park SG, Song SY, Kim JK, Sung JH. Reactive oxygen species-responsive miR-210 regulates proliferation and migration of adipose-derived stem cells via PTPN2. *Cell Death Dis* 2013;**4**:e588.
  37. Movafagh S, Crook S, Vo K. Regulation of hypoxia-inducible factor-1a by reactive oxygen species: new developments in an old debate. *J Cell Biochem* 2015;**116**:696-703.
  38. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud C. Antioxidant supplements and mortality. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2014;**17**:40-44.
  39. Garelnabi M, Veledar E, White-Welkley J, Santanam N, Abramson J, Weintraub W, Parthasarathy S. Vitamin E differentially affects short term exercise induced changes in oxidative stress, lipids, and inflammatory markers. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2012;**22**:907-913.
  40. Cheng Y, Zhang C. MicroRNA-21 in cardiovascular disease. *J Cardiovasc Transl Res* 2010;**3**:251-255.
  41. Liu LZ, Li C, Chen Q, Jing Y, Carpenter R, Jiang Y, Kung HF, Lai L, Jiang BH. MiR-21 induced angiogenesis through AKT and ERK activation and HIF-1 $\alpha$  expression. *PLoS One* 2011;**6**:e19139.
  42. Fernandes T, Hashimoto NY, Magalhães FC, Fernandes FB, Casarini DE, Carmona AK, Krieger JE, Phillips MI, Oliveira EM. Aerobic exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves regulatory MicroRNAs, decreased angiotensin-converting enzyme-angiotensin ii, and synergistic regulation of angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin (1-7). *Hypertension* 2011;**58**:182-189.

43. Baggish AL, Hale A, Weiner RB, Lewis GD, Systrom D, Wang F, Wang TJ, Chan SY. Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training. *J Physiol* 2011;**589**:3983-3994.
44. Tonevitsky AG, Maltseva DV, Abbasi A, Samatov TR, Sakharov DA, Shkurnikov MU, Lebedev AE, Galatenko VV, Grigoriev AI, Northoff H. Dynamically regulated miRNA-mRNA networks revealed by exercise. *BMC Physiol* 2013;**13**:9.
45. Cheng Y, Liu X, Zhang S, Lin Y, Yang J, Zhang C. MicroRNA-21 protects against the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced injury on cardiac myocytes via its target gene PDCD4. *J Mol Cell Cardiol* 2009;**47**:5-14.
46. Chan SY, Loscalzo J. MicroRNA-210: a unique and pleiotropic hypoxamir. *Cell Cycle* 2010;**9**:1072-1083.
47. Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V, Melchionna R, Romani S, Pompilio G, Capogrossi MC, Martelli F. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *J Biol Chem* 2008;**283**:15878-15883.
48. Ivan M, Huang X. miR-210: fine-tuning the hypoxic response. *Adv Exp Med Biol* 2014;**772**:205-227.
49. Hu S, Huang M, Li Z, Jia F, Ghosh Z, Lijkwan MA, Fasanaro P, Sun N, Wang X, Martelli F, Robbins RC, Wu JC. MicroRNA-210 as a novel therapy for treatment of ischemic heart disease. *Circulation* 2010;**122**:S124-131.
50. Mutharasan RK, Nagpal V, Ichikawa Y, Ardehali H. microRNA-210 is upregulated in hypoxic cardiomyocytes through Akt- and p53-dependent pathways and exerts cytoprotective effects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;**301**:H1519-1530.
51. Hamama S, Noman MZ, Gervaz P, Delanian S, Vozenin MC. MiR-210: A potential therapeutic target against radiation-induced enteropathy. *Radiother Oncol* 2014;**111**:219-221.
52. Davidson-Moncada J, Papavasiliou FN, Tam W. MicroRNAs of the immune system: roles in inflammation and cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2010;**1183**:183-194.
53. Devaux Y, Vausort M, McCann GP, Zangrando J, Kelly D, Razvi N, Zhang L, Nq LL, Wagner DR, Squire IB. MicroRNA-150: a novel marker of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Circ Cardiovasc Genet* 2013;**6**:290-298.
54. Liu W, Liu Y, Zhang Y, Zhu X, Zhang R, Guan L, Tang Q, Jiang H, Huang C, Huang H. MicroRNA-150 protects against pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *J Cell Biochem* 2015.
55. Tang Y, Wang Y, Park KM, Hu Q, Teoh JP, Broskova Z, Ranganathan P, Jayakumar C, Li J, Su H, Tang Y, Ramesh G, Kim IM. MicroRNA-150 protects the mouse heart from ischaemic injury by regulating cell death. *Cardiovasc Res* 2015;**106**:387-397.
56. Drozdov I, Tsoka S, Ouzounis CA, Shah AM. Genome-wide expression patterns in physiological cardiac hypertrophy. *BMC Genomics* 2010;**11**:557.
57. Dejana E. The role of wnt signaling in physiological and pathological angiogenesis. *Circ Res* 2010;**107**:943-952.



## FIGURE LEGENDS

**Figure 1 – Mice maximal exercise capacity on treadmill at baseline, 7 and 35 days.** Distance values were compared by repeated measures ANOVA followed by Bonferroni correction and represent as the means  $\pm$  SEM; N per group = 10 mice on each time; \* $p < 0.05$  comparing EX and EX+VIT groups on each week; <sup>a</sup>  $p < 0.05$  compared SED and EX group on each time; <sup>b</sup>  $p < 0.05$  compared SED+VIT and EX+VIT group on each time.

**Figure 2 – Cardiac hypertrophy analyses in mice. A, B** Left ventricle weight / body weight ratio after 7 and 35 days, respectively; N per group = 12-16 mice on each time; **C, D** Myocyte cross-section area by histological analyses in 7 and 35 days, respectively; N per group = 5 mice on each time. Values are means  $\pm$  SEM. LVW/BW comparisons were performed by using ANOVA with Tukey post-hoc and histological analyses by Kruskal-Wallis with Dunn`s post-hoc; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$

**Figure 3 – Real-time RT-qPCR of angiogenesis-related genes. A, B** HIF-1 $\alpha$  gene expression at 7 and 35 days, respectively; **C, D** VEGF gene expression at 7 and 35 days, respectively. Data were normalized to GAPDH gene and are expressed as means  $\pm$  SEM; Comparisons were performed by Kruskal-Wallis with Dunn`s post-hoc; N per group = 8 mice on each time; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$

**Figure 4 – Angiogenesis analyses by CD31 immunohistochemistry in mice. A, B** capillaries percentage in relation to the SED in 7 and 35 days, respectively; Values are means  $\pm$  SEM; Comparisons were performed by Kruskal-Wallis with Dunn`s post-hoc; N per group = 5 mice on each time; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$

**Figure 5 – Real-time RT-qPCR of microRNAs A, B** miR-21 expression at 7 and 35 days, respectively; **C, D** miR-210 expression at 7 and 35 days, respectively; **E, F** miR-150 expression at 7 and 35 days, respectively; Data were normalized to cel-miR-39 and are expressed as mean  $\pm$  SEM; Comparisons were performed by Kruskal-Wallis with Dunn`s post-hoc; N per group = 8 mice on each time; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$

**Figure 6 – A** Similarity among miRs in terms of their shared target genes. Node size is proportional to the number of targets predicted for each miR, while edge width represents the degree of overlap among miRs targets estimated by the

Jaccard similarity coefficient. **B** Interaction map between miRs and genes that participate in six enriched KEGG pathways selected based on biological plausibility. The node size is proportional to the number of interactors associated to each miR or gene.

FIGURE 1

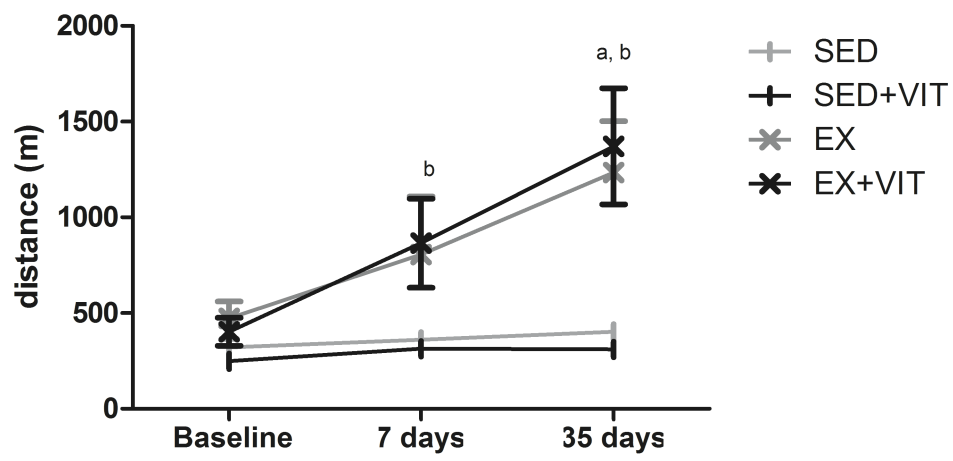


FIGURE 2

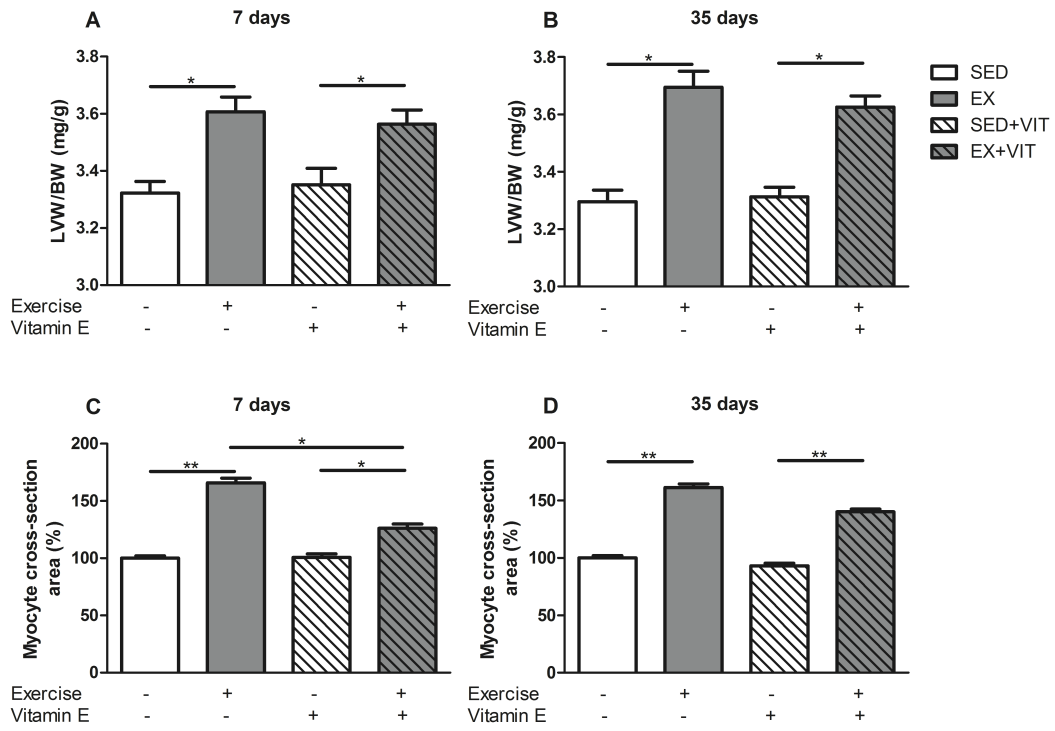


FIGURE 3

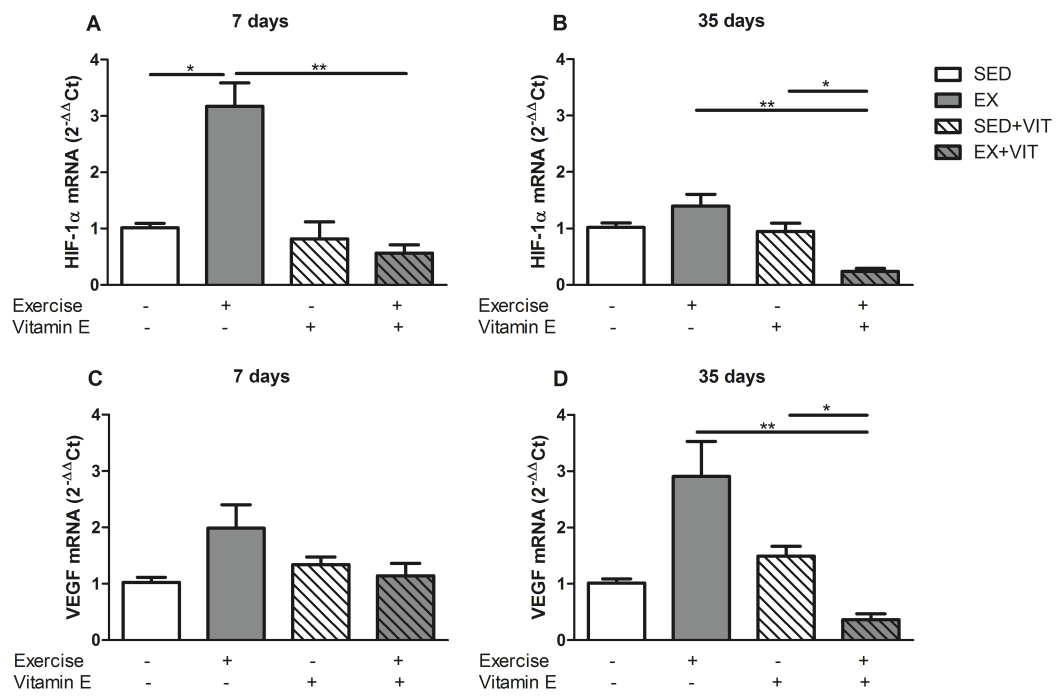


FIGURE 4

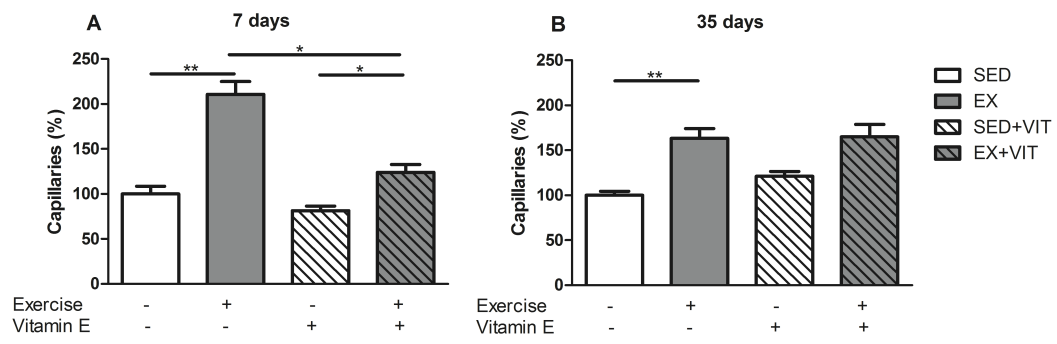


FIGURE 5

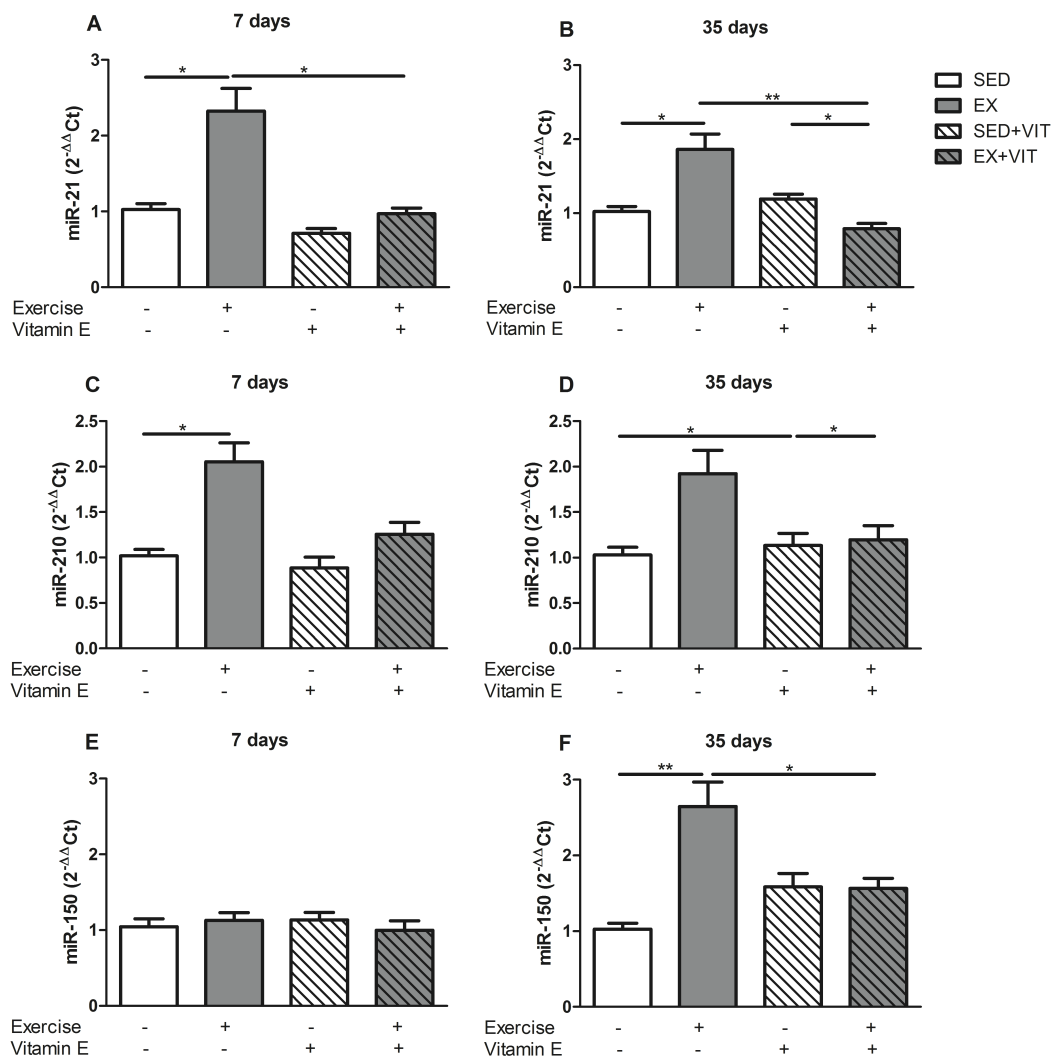
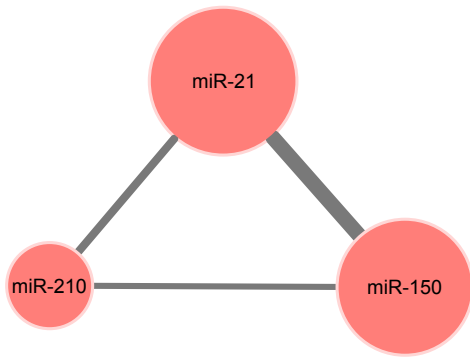
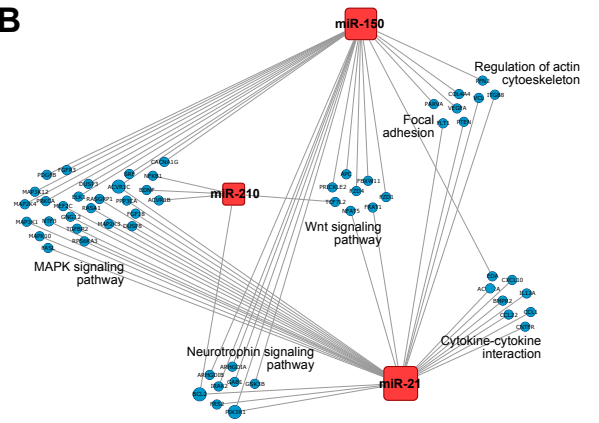


FIGURE 6

**A**



**B**





**Vitamin E affects pathological cardiac hypertrophy and  
microRNAs expression in mice.**

ARTIGO EM PREPARO

**Vitamin E affects pathological cardiac hypertrophy and  
microRNAs expression in mice.**

Brief Title: Vitamin E effects on pathological cardiac hypertrophy

Carolina R. Cohen<sup>1,2,3</sup>, Nidiane C. Martinelli<sup>1,2,3</sup>, Graziela H. Pinto<sup>1,2</sup>, Amanda  
Phaelante<sup>1,2</sup>, Daiane Silvello<sup>1,2</sup>, Mariana Recamonde-Mendonza<sup>1</sup>, Michael E.  
Andrades<sup>1,2</sup>, Nadine Clausell<sup>1,2</sup>, Luis E. Rohde<sup>1,2</sup>,  
Patrícia Ashton-Prolla<sup>3</sup>, Andréia Biolo<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Experimental and Molecular Cardiovascular Laboratory and the Heart Failure and Cardiac Transplant Unit from the Cardiology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil,

<sup>2</sup> Post-Graduate Program in Cardiology and Cardiovascular Science, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil,

<sup>3</sup> Post-Graduate Program in Genetics and Molecular Biology and Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Address for correspondence:

Andréia Biolo MD

Heart Failure and Transplant Unit

Cardiology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350, Sala 2060

Porto Alegre, RS, Brazil 90035-003

Phone/Fax 55 51 33598844

E-mail address: biolo.andreia@gmail.com

## ABSTRACT

**AIMS:** Vitamin E is a usual antioxidant, but little is known about its effects on cardiac hypertrophy and microRNAs (miRs) expression induced by transverse aortic constriction (TAC) in mice.

**METHODS AND RESULTS:** Male Balb/c mice were randomly divided into four cohorts: SHAM ( $n=22$ ), TAC ( $n=34$ ), SHAM supplemented with vitamin E (SHAM+VIT,  $n=22$ ), and TAC supplemented with vitamin E (TAC+VIT,  $n=34$ ). VIT groups received 200 mg/kg of  $\alpha$ -tocopherol once a day, and the other groups received placebo, both by gavage. After 7 and 35 days of surgery analysis of cardiac hypertrophy, fibrosis, miRs and gene expression and carbonyl concentrations in cardiac tissue, were performed. Left ventricle mass increased similarly between TAC and TAC+VIT groups (all  $p<0.05$  vs. SHAM groups). Likewise, the expression of HIF-1 $\alpha$  and VEGF was increased, in both TAC groups but only after 35 days (all  $p<0.05$  vs. SHAM groups). As expected, cardiac pathological hypertrophy was accompanied by reactivation of fetal genes ANP and  $\beta$ -MHC. Cardiac fibrosis was increased by TAC surgery as early as 7 days and remained high after 35 days. Still, TAC mice exhibit higher levels of protein damage at 35 days. This pathological phenotype was not seen in animals of the TAC+VIT group. Vitamin E seems to inhibit cardiac fibrosis and oxidative damage. Cardiac hypertrophy was followed by increased miR-21 and -499 and decreased miR-26b expression in the TAC group. However, TAC+VIT mice displayed a different miR expression profile, with higher miR-210 expression and inhibition on miR-21 and -499.

**CONCLUSION:** TAC model induced pathological cardiac hypertrophy, fibrosis and protein damage followed by changes in miRs expression. Vitamin E supplementation was associated with a different miR expression profile and mitigated the pathological phenotype.

**Keywords:** Cardiac Hypertrophy; Vitamin E; Transverse Aortic Constriction; MicroRNAs.

## INTRODUCTION

Heart failure is a final stage of different cardiac diseases, and is associated with high morbidity and mortality<sup>1</sup>. Mechanisms underlying the development of cardiac hypertrophy (CH) and its progression to heart failure include alterations in gene expression, extracellular matrix, vascular network, energy metabolism and also cell loss due to necrosis and apoptosis<sup>2,3</sup>. Upregulation of fetal genes including atrial natriuretic peptide (ANP), B-type natriuretic peptide (BNP) and fetal isoforms of  $\beta$ -myosin heavy chain ( $\beta$ -MHC) participates in the transition process from adaptive hypertrophy to heart failure<sup>4</sup>.<sup>5</sup> Angiogenesis is a determinant of cardiac hypertrophy and maintains cardiac function<sup>6, 7</sup>. Several studies demonstrated that hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) is critical to cardiac adaptation to hypertrophic stimuli and angiogenesis<sup>8-10</sup>. Moreover, HIF-1 $\alpha$  downregulation resulted in decrease in angiogenic factors and reduction in cardiac function under physiological and pathological conditions<sup>11, 12</sup>.

The role of reactive oxygen species (ROS) in pathological hypertrophy and heart failure progression has been extensively studied<sup>13, 14</sup>. ROS augmentation or decreases in endogenous antioxidants are involved in fibrosis, apoptosis, contractile dysfunction and are a contributing factor in the transition to the decompensated stage<sup>14,15</sup>. Intervention trials with antioxidants such as vitamins E, C, resveratrol and others have produced encouraging results that show arrest of the cardiac dysfunction progression<sup>16, 17</sup>. However, both ROS as antioxidants may also play an important role in physiologic and pathologic mechanisms that occur during cardiac hypertrophy and manipulation of their status must be done with care<sup>15, 18</sup>.

MicroRNAs (miRs) are a small non-coding RNAs that negatively regulate protein expression at the posttranscription level<sup>19</sup>. Several miRs, in particular miR-21, -26b, -150, -210 and -499 have been implicated on cardiac hypertrophy, angiogenesis, apoptosis, and cardiac function<sup>20-22</sup>. Furthermore, it seems ROS modulates miR-21 and -210<sup>23, 24</sup>, but little is known about the effects of antioxidant interventions on miR expression profile in pathological cardiac hypertrophy. Thus, the aim of this study was investigate vitamin E treatment effects on pathological cardiac hypertrophy induced by transverse

aortic constriction (TAC) in mice. We evaluated cardiac hypertrophy, fibrosis, protein damage, as well as gene and microRNAs expression.

## METHODS

**Animals and experimental protocol** – Ten-week-old male Balb/c mice were randomly divided into four cohorts: SHAM ( $n=22$ ), TAC ( $n=34$ ), SHAM supplemented with vitamin E (SHAM+VIT,  $n=22$ ), and TAC supplemented with vitamin E (TAC+VIT,  $n=34$ ). SHAM+VIT and TAC+VIT groups received  $\alpha$ -tocopherol (200 mg/kg) once a day (Sigma-Aldrich, US) and SHAM and TAC groups received placebo (soybean oil vehicle) by gavage<sup>25</sup>. Mice were studied and kept at the experimental animal facility in the Research Center of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Consumption of food and water were checked daily and body weight was measured weekly. All animals were supplied with food and water *ad libitum* and were kept on a 12-h light and 12-h dark regime at 23°C. This study was approved by the institutional ethics in research committee (protocol numbers 11-0470 and 14-0082) and performed in accordance with Brazilian and international guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals and the ARRIVE guidelines<sup>26, 27</sup>.

**Transverse Aortic Constriction** – Transverse aortic constriction (TAC) was conducted as described previously<sup>28</sup>. Briefly, mice were anaesthetized with 2.5% isoflurane in 0.1mL O<sub>2</sub> and intubated for mechanical ventilation (Model 687, Harvard Apparatus, US). Mice were ventilated with a constant volume of 0.2 mL and a respiratory rate of 140 breaths per minute. Mice were placed on a heating pad at 37°C and surgical procedures were performed using a dissecting microscope (Model 2020, Walter Products Inc., CA). An incision was made on the sternum and the aortic arch was exposed and tied off (6-0 silk suture) together against a 26G ( $\varnothing$  0.45 mm) needle between the brachiocephalic trunk and the left common carotid artery. The needle was immediately removed to restore blood flow. The chest was then closed and animals received ketoprofen (2 mg/kg intramuscular) for analgesia. SHAM mice were treated identically, but not submitted to the constriction procedure. All mice were allowed to recover in a 37°C neonatal recovery chamber with oxygen supplied overnight. Surgery had a mortality of approximately 10% in accordance with previously published outcomes<sup>28</sup>.

**Euthanasia protocol** – For acute and chronic evaluations of pathological hypertrophy, animals were euthanized in equal numbers at two moments: 7 and 35 days after surgery. Animals were anesthetized with a mixture of ketamine and xylazine (100mg/kg and 10mg/kg respectively), weighted, and had the heart quickly removed and left ventricle (LV) isolated. Medial LV was fixed in 10% buffered formalin, apical and basal LV regions were divided and separated in *RNA later* (Qiagen, US) or snap-frozen in liquid nitrogen and both were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until molecular analyses. Animal's legs were removed for x-ray assessment to determine the tibial bone length. Cardiac hypertrophy was determined as the ratio between LV weight and tibial length (LVW/TL).

**Histological analyses** – LV samples were fixed in 10% buffered formalin and embedded in paraffin for evaluation of fibrosis. Slices were sectioned at  $4\mu\text{m}$  thickness and stained with Masson's trichrome to estimate cardiac fibrosis. Four random microscopic fields under light microscopy were photographed using Q Capture Software v.2.81.0 at 400-fold magnification (Q Imaging Co., CA). Fibrosis was quantified using the Image J software and the color deconvolution plug-in (n=7-13 per group). Fibrosis intensity was calculated according to the formula:  $f=255-i$ , where  $f$  is final blue intensity and  $i$  is the mean blue intensity varying from 0 (dark blue, highest expression) to 255 (white, no expression). A blinded investigator measured histological parameters.

**Biochemical analyses** – Biochemical analyses were performed in VE samples and normalized by total protein content, determined using the Bradford method<sup>29</sup>.

*Protein carbonyls* – The oxidative damage to protein was measured by the determination of carbonyl groups based on the reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH). Briefly, protein was isolated with 10% TCA and reacted with 20mM DNPH dissolved in 2M HCl, for 30 min. After, samples were centrifuged (10000  $\text{xg}/10$  min) and pellets were washed three times in ethanol:ethyl acetate (1:1). Protein pellets were dissolved in 6M guanidine hydrochloride and carbonyl contents were determined spectrophotometrically (370 nm). A second set of samples was reacted with 2M HCl and run in parallel, as a blank. Results were expressed as nmol carbonyl/mg of protein<sup>30,31</sup>.

*Ferric reducing ability of plasma (FRAP)* – The antioxidant power on each sample was evaluated by FRAP<sup>32</sup>. In brief, the FRAP assay measures the change in absorbance at 593nm due to the formation of a blue coloured Fe<sup>2</sup>-tripirydyltriazine compound from a colourless oxidised Fe<sup>3</sup> form by the action of electron donating antioxidants. Results were expressed as nmol FRAP/mg of protein<sup>33</sup>.

### **Molecular analyses**

*RNA extraction* – Total RNA and miRs were isolated from 30 mg of LV using miRNeasy mini kit (Qiagen, US), according to the manufacturer's instructions. After extraction, 50 pM of synthetic microRNA-39 from *Caenorhabditis elegans* (cel-miR-39, Qiagen, US) was added to each sample as a standard control for quantitative real time PCR (qRT-PCR), as previously recommended and validated<sup>34,35</sup>. Concentration of RNA samples was assessed using the NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, US).

*Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)* – qRT-PCR was conducted for miR-21, -26b and -499 that had been previously described in cardiac hypertrophy (assays TM000397, TM000407, TM001045 respectively), mir-210 related to angiogenesis (assay TM000473) and miR-150 associated to immunity (assay TM000473). The reverse transcription (RT) reactions were run in a Veriti 96-Well Thermal Cycler with a miR Reverse Transcription Kit, according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems Inc., US). MiR qRT-PCR reactions were run in triplicate using the TaqMan miR Expression Assay probes in a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Inc., US). Gene expression was measured for genes that are responsible for angiogenesis, namely HIF-1 $\alpha$  and VEGF (assays Mm01283760\_m1\* and Mm01281449\_m1\*, respectively) and reprogrammed fetal genes ANP (NPPA) and  $\beta$ -MHC (Myh7) (assays MM01255747\_g1 and MM01319006\_g1 respectively). First-strand cDNA samples were synthesized from total RNA using a High Capacity cDNA Reverse Transcription kit run in a Veriti 96-Well Thermal Cycler, according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems Inc., US). QRT-PCR were performed in 7500 Real-Time PCR System, using Taqman gene expression assays (Applied Biosystems Inc, US), following the manufacturer's instructions. Gene expression results were normalized for glyceraldehyde 3-phosphate

dehydrogenase gene expression (GAPDH; assay number 4352339E). The relative expression of each miR and gene was calculated with the comparative threshold cycle ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) method<sup>36</sup>. qRT-PCR data used the SHAM group as reference.

**Computational prediction and functional annotation of miR targets –** Target prediction analysis was carried out with TargetScan (release 6.2) to identify genes potentially modulated by the activity of the miRs of interest<sup>37</sup>. Additionally, experimentally validated miR targets were retrieved from miRTarBase (release 4.5), which contains a large collection of miR-target interactions validated in functional studies of miRs<sup>38</sup>. Next, gene-annotation enrichment analysis was performed for the list of putative target genes collected from both resources. Enrichment for pathways maps from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) was investigated with the package clusterProfiler for R environment<sup>39</sup>. KEGG terms were considered statistically significant for  $p < 0.05$  after Benjamin-Hochberg correction.

**Statistical analyses –** Data were expressed as mean and standard error. Comparisons among groups were performed by using ANOVA followed by Tukey post-hoc or Kruskal-Wallis followed by Dunn`s post-hoc as appropriated. The level of significance was set at 5%. The softwares used for analysis of the data were SPSS version 18 and Prism 5 (GraphPad Software Inc., US). Significance for KEGG pathway enrichment was estimated with DAVID`s EASE score 8, computed based on a modified Fisher`s exact test, and adjusted with Benjamini multiple testing correction. Pathways with a minimum count of 2 query genes and a  $p$ -value  $< 0.1$  were considered enriched for miR targets.

## RESULTS

**Pathological Cardiac hypertrophy –** LV weight/tibial length ratio (LVW/TL) increased 23% at 7 days and 35% after 35 days in TAC group ( $p < 0.001$  vs. SHAM, Figure 1A,B). Similarly, in the TAC+VIT group, LVW/TL increased 29% after 7 days and 34% after 35 days ( $p < 0.001$  vs. SHAM+VIT). Heart weight, LV weight and LV weight/body weight (LVW/BW) had a similar increase in both TAC and TAC+VIT groups compared to the SHAM groups (Table S1). TAC and TAC+VIT animals had a difference in body weight at 35 days, hence we used LVW/TL ratio for comparisons.



As expected, cardiac fibrosis intensity was higher in TAC group compared to SHAM in both assessments ( $p < 0.05$ ; Figure 2). On the other hand, TAC+VIT group did not have the increase in fibrosis at both time points ( $p > 0.05$  vs. SHAM+VIT).

**Gene expression** – Cardiac mRNA expression of atrial natriuretic peptide (NPPA) was higher in both TAC groups, as expected. However, a trend towards lower expression was observed in TAC+VIT mice, especially in 35 days (TAC:  $13 \pm 3$  fold vs. TAC+VIT:  $7 \pm 1$  fold;  $p = 0.068$ ; Figure 3A, B). The fetal gene reactivation of  $\beta$ -myosin heavy chain (Myh7) was demonstrated by augmentation of Myh7 gene expression in both TAC and TAC+VIT groups (Figure 3 C,D).

The expression of angiogenic genes HIF-1 $\alpha$  and VEGF was not altered by TAC surgery at 7 days in both groups (Figure 4). However, on late evaluation HIF-1 $\alpha$  and VEGF expression were increased in TAC and TAC+VIT groups compared to SHAM groups ( $p < 0.05$ ).

**Biochemical analyses** – Levels of protein carbonyls were similar between groups at 7 days ( $p > 0.05$  for all; Figure 5A). However, after 35 days, protein damage was increased only in TAC group ( $p = 0.029$  vs. SHAM; Figure 5B). TAC+VIT animals did not show similar augmentation on protein damage probably by its antioxidant effect. Analyses of FRAP demonstrated a slightly higher antioxidant power in mice receiving vitamin E, but without statistic significance ( $p > 0.05$  for all; Figure 5C,D).

**MicroRNAs analyses** – MiR-26b expression was decreased 7 days after TAC surgery, especially in TAC+VIT mice ( $p = 0.033$  vs. TAC; Figure 6A,B). After 35 days, only a tendency towards lower miR-26b expression levels was found in TAC and TAC+VIT groups. MiR-21 demonstrated increased expression in TAC mice compared to SHAM at both time points ( $p < 0.05$ ; Figure 6C,D). In TAC+VIT group this increase was not seen at 7 and 35 days ( $p < 0.01$  vs. TAC). MiR-499 expression had similar responses, particularly at 35 days ( $p < 0.001$  vs. SHAM; Figure 6E,F). Low miR-499 gene expression was found in TAC+VIT animals in both time points ( $p < 0.001$  vs. TAC; Figure 6E,F). MiR-210 expression increased in TAC group, but without statistical significance ( $p > 0.05$  vs. SHAM; Figure 6). However, TAC mice receiving vitamin E demonstrated a consistent increase in

miR-210 expression at both times ( $p < 0.001$  vs. SHAM+VIT;  $p = 0.034$  vs. TAC after 35 days). MiR-150 showed a group and time-dependent expression. Initial evaluation showed a tendency of increased expression only in TAC group ( $p = 0.061$  vs. SHAM) and later on, a decrease in both TAC groups (Figure 6I,J). TAC+VIT animals demonstrated lower miR-150 expression compared to TAC animals at 7 and 35 days ( $p < 0.05$ ). Vitamin E alone had effects on miRs expression demonstrated by a decrease in miR-150 and -499 expression in SHAM+VIT group compared to SHAM group at both time points ( $p < 0.05$ ; Figure 6).

**Prediction of miRs targets** – Computational target prediction by TargetScan returned a total of 1308 conserved genes to be potentially regulated by our miRs. Specifically, 205 target genes were found for miR-150, 246 for miR-21, 32 for miR-210, 748 for miR-26b and 230 for miR-499. Moreover, 20 experimentally validated target genes were retrieved from miRTarBase, 9 of which were also present in the TargetScan prediction. Based on data from experimental validations, we found 3 target genes for miR-150, 11 for miR-21, 5 for miR-210 and 1 for miR-26b. Merging both sources, we obtained a total of 1319 putative target genes for the miRs of interest (Table S2). As observed in Figure 7A, all miRs share common targets, but a higher overlap is found between targets of miR-21, 26b, -150 and -499, as measured by Jaccard similarity coefficient.

**Pathway enrichment analysis of miR targets** – This analysis identified a total of 33 KEGG pathways (Table S3) potentially modulated by our miRs ( $p < 0.05$ ). Among the top 30 KEGG pathways enriched for the genes targeted by miR-21, -210, -150, 26b and -499 (Figure S1), we found the ‘MAPK signaling pathway’ (n= 45 genes), ‘Neurotrophin signaling pathway’ (n= 24 genes), ‘Ras signaling pathway’ (n= 35 genes), ‘Wnt signaling pathway’ (n= 26 genes), ‘mTOR signaling pathway’ (n= 14 genes) and ‘PI3K-Akt signaling pathway’ (n=42 genes). Based on enrichment analysis data it was built an interaction map between the five miRs and target genes participating in KEGG pathways (Figure 7B). These pathways were selected based on their high biological plausibility for the scenario of cardiac hypertrophy.

## DISCUSSION

Our study is the first to explore vitamin E effects on pathological cardiac hypertrophy development induced by transverse aortic constriction in mice. This model induced an increase in LV mass and fibrosis as soon as 1 week after TAC surgery. After 35 days LV hypertrophy increased, further along with fibrosis and protein damage. The increase in NPPA and Myh7 gene expression confirm the pathological phenotype of this model. These changes were accompanied by altered miRs expression involving miR-21, 26b and -499, (previously associated with cardiac hypertrophy), and miR-150 and -210 whose role in CH is not clear yet. In this scenario, vitamin E treatment was not able to prevent cardiac hypertrophy or fetal gene reactivation. However, the cardiac hypertrophy in the presence of vitamin E did not show fibrosis or protein damage. Even more, vitamin E treatment was associated with increased miR-210 and decreased miR-21 and miR-499 expression. Taken together, these data suggest that oral vitamin E administration can attenuate some of the pathological features and modify miRs expression on pathological cardiac hypertrophy induced by TAC.

TAC mice demonstrated high LVW/TL ratios as early as 7 days post-TAC and even higher ratios at 35 days. The LV hypertrophy was consistent with previous studies of severe TAC<sup>12, 40, 41</sup>. Fibrosis is a common discovery in the TAC model and, as expected, we detected an increase in fibrosis deposition after 7 and 35 days of surgery in line with other studies<sup>16, 17, 42, 43</sup>. Additionally, we observed an increase in protein damage after 5 weeks, detected by carbonyl analysis. Usually TAC surgery and them progression to HF increase oxidative stress biomarkers like malonaldehyde, 8-hydroxydeoxyguanosine and 4-hydroxy-2-nonenal<sup>44, 45</sup>. Therefore, ROS participation is important in CH but oxidative damage is not always seen<sup>46</sup>.

Degree of cardiac hypertrophy between TAC only and TAC+VIT animals was pretty similar, suggesting that vitamin E treatment does not inhibit hypertrophy development. There is only one study that evaluates vitamin E effects on cardiac hypertrophy, performed by Dhalla *et al* using TAC surgery in guinea pigs. After 20 weeks, the authors show similar CH results, but the animals supplemented with vitamin E group had lower mortality rates and less cardiac dysfunction<sup>47</sup>. Additionally, in our study TAC+VIT animals did not have

fibrosis deposition as TAC animals did. This result demonstrates that vitamin E can alter extracellular matrix mechanisms which will likely reduce collagens deposition and fibrosis formation. Only little evidence has been published about vitamin E and fibrosis formation. Studies include, for example, dermatologic use of topic vitamin E to reduce scar size<sup>48</sup>, vitamin E supplementation to prevent fibrogenesis in patients with hepatitis<sup>49</sup>. In our study, TAC+VIT mice did not show protein damage at 35 days as detected in TAC animals only, probably due to the antioxidant action of vitamin E, despite total antioxidant capacity (FRAP) was similar in all groups.

It is well known that increases in NPPA and MYH7 gene expression are indicative of fetal reactivation in pathological cardiac hypertrophy and failure. Both TAC and TAC+VIT groups had an increase in these genes. However, TAC+VIT had a tendency of lower NPPA gene expression in both evaluations suggesting that vitamin E may be able to inhibit, at least in part, expression of the NPPA gene.

Some papers suggested that the compensated hypertrophy phase is characterized by increased HIF-1 $\alpha$  and VEGF expression and a corresponding increase in vascularization<sup>12, 50</sup>. Recent studies on HIF-1 $\alpha$  and VEGF expression in TAC mice are controversial, some showing little or no increase in expression in up to 12 weeks<sup>42, 43, 45</sup>. In our study, we only observed an increase in expression of both genes after 35 days in TAC and TAC+VIT mice. Thus, expression of these genes seems to be quite variable and not limited to CH initial stage.

MicroRNAs have been widely studied in physiologic and pathologic contexts<sup>20, 22</sup>. MiR-26b is not well studied in cardiovascular diseases, but it seems to be involved in apoptosis, angiogenesis and hypertrophy<sup>22, 51</sup>. We observed a reduction in miR-26b expression both in TAC and TAC+VIT group. MiR-26b decreased expression has been found in pathological cardiac hypertrophy models whereas its overexpression *in vivo* and *in vitro* was associated with lower hypertrophy, fibrosis and fetal gene reactivation<sup>52-54</sup>.

MiR-21 seems to be involved in different processes such as apoptosis, angiogenesis, inflammation and cardiac hypertrophy<sup>55-57</sup>. Several studies have demonstrated an increase in miR-21 expression in TAC and AMI models, whereas miR-21 knockout was enough to reduce hypertrophy *in vitro*<sup>54, 55, 58, 59</sup>. In agreement with these observations, we observed an increase in miR-21

levels at both time points in TAC groups. Nonetheless, TAC+VIT animals did not show this increase. Thus, our findings suggest the antioxidant effect of vitamin E modulates miR-21 expression. The inhibition of miR-21 however was not able to reduce cardiac hypertrophy, although we did not observe significant fibrosis in the TAC+VIT group. Thum *et al* had already described an association between miR-21 and fibrosis in fibroblasts of HF patients and in animal models overexpressing miR-21. This increase was associated with fibrosis, cardiac hypertrophy and dysfunction caused by TAC<sup>55</sup>.

MiR-499 is one of *myomiRs*, it is localized inside MYH7 gene. In the present study, we observed a tendency to higher miR-499 levels at 7 days; this was confirmed after 35 days in TAC group. In line, higher miR-499 expression was associated with pathological hypertrophy and its progression to HF<sup>60, 61</sup>. The role of miR-499 as a biomarker of cardiac damage was evidenced in many human studies<sup>62</sup>. Interestingly, vitamin E treatment abolished the increase of miR-499 and this inhibition was seen not only in TAC+VIT group but also in SHAM+VIT mice. Considering that miR-499 levels increase is associated with cardiac damage and its progression to heart failure, the daily treatment with vitamin E seems to be beneficial to TAC+VIT group. The mechanism involved in this inhibition is still unclear.

MiR-210 has its major role in hypoxia and angiogenesis and participates in HIF-1a and AKT pathways. Increased miR-210 levels have protective effect in cells subjected to ROS<sup>24, 63-65</sup>. In cardiac diseases, miR-210 overexpression inhibited apoptosis, increased angiogenesis and improve cardiac function<sup>66, 67</sup>. We did not find any statistical increase in miR-210 levels in TAC group. On the other hand, vitamin E influenced miR-210 in a group-dependent manner, SHAM+VIT animals showed decreased basal levels of miR-210 while in TAC+VIT group had increased miR-210 expression. Hamama *et al* found lower levels of miR-210 after treatment with trolox, an analogue of vitamin E, in fibrotic cancer cells, suggesting a possible modulation<sup>68</sup>. This modulation its viewed in SHAM+VIT mice, but it seems that there is a differential effect on TAC animals treated with vitamin E. Considering that miR-210 is important to cardiac function and angiogenesis, vitamin E seems to be beneficial after TAC surgery.

Despite that miR-150 is well related to immune system, low expression has been observed in patients with cardiac diseases and in TAC mice<sup>54, 69-71</sup>. Evidences supporting that miR-150 is a protective miR for heart and associated

with a better prognosis when it is high expressed after AMI<sup>72</sup>. Transgenic mice overexpressing miR-150 showed less fibrosis, less heart dysfunction and they survived longer than wild type animals after TAC surgery<sup>69</sup>. We observed only a tendency towards increase in miR-150 expression in TAC group after 7 days, while at the final evaluation, we found miR-150 reduced levels in TAC and TAC+VIT groups. Vitamin E had an important effect over miR-150 expression levels because it was able to reduce miR-150 levels in both SHAM+VIT and TAC+VIT groups.

Virtually, a miR can modulate many different targets, and on the other hand, a single target can be under the action of many miRs. Therefore, the study of pathways that might be modulated by differentially expressed miRs is crucial to better understand the biological processes dependent on miR's actions. Our analysis of pathways related to miR-21, 26b, -150, -210 and -499 identified multiple processes and pathways involved in cardiac hypertrophy such as MAPK, Wnt, mTOR and PI3K-AKT signaling pathways, suggesting that the association of these miRs with cardiac hypertrophy is of great biological plausibility.

Our study has some limitations that should be considered. First, we did not perform functional or survival analyses that could demonstrate vitamin E impact on prognosis. Another important point is the lack of phenotypic evaluation of angiogenesis, an important marker of compensated HC that can be influenced by vitamin E and ROS. Finally, pathological cardiac hypertrophy is a complex process that involves many mechanisms, genes e probably many miRs. We studied a few, but representative miRs in this scenario based in previous studies and also in bioinformatics analyses.

In conclusion, transverse aortic constriction in mice induced a pathological cardiac hypertrophy phenotype and resulted in alteration of miR-21, -26b, -150 and -499 expression in time-dependent way. In this context, vitamin E treatment results in inhibition of fibrosis and protein damage as well as a differential miR profile. Taken together, these data suggest that oral administration of vitamin E might be beneficial in pathological cardiac hypertrophy induced by transverse aortic constriction in mice without however abrogating the pathological phenotype.

## FUNDING

This work was supported in part by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Conselho de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA).

### CONFLICT OF INTEREST

There is no conflict of interest with this submission.

### REFERENCES

1. Braunwald E. Heart failure. *JACC Heart Fail* 2013;**1**:1-20.
2. Gupta S, Das B, Sen S. Cardiac hypertrophy: mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2007;**9**:623-652.
3. Tham YK, Bernardo BC, Ooi JY, Weeks KL, McMullen JR. Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. *Arch Toxicol* 2015;**89**:1401-1438.
4. McMullen JR, Jennings GL. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007;**34**:255-262.
5. Dirkx E, da Costa Martins PA, De Windt LJ. Regulation of fetal gene expression in heart failure. *Biochim Biophys Acta* 2013;**1832**:2414-2424.
6. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000;**6**:389-395.
7. Taimeh Z, Loughran J, Birks EJ, Bolli R. Vascular endothelial growth factor in heart failure. *Nat Rev Cardiol* 2013;**10**:519-530.
8. Oka T, Akazawa H, Naito AT, Komuro I. Angiogenesis and cardiac hypertrophy: maintenance of cardiac function and causative roles in heart failure. *Circ Res* 2014;**114**:565-571.
9. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol (1985)* 2000;**88**:1474-1480.
10. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease. *Annu Rev Physiol* 2014;**76**:39-56.
11. Huang Y, Hickey RP, Yeh JL, Liu D, Dadak A, Young LH *et al*. Cardiac myocyte-specific HIF-1 $\alpha$  deletion alters vascularization, energy availability, calcium flux, and contractility in the normoxic heart. *FASEB J* 2004;**18**:1138-1140.
12. Sano M, Minamino T, Toko H, Miyauchi H, Orimo M, Qin Y *et al*. p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. *Nature* 2007;**446**:444-448.
13. Madamanchi NR, Runge MS. Redox signaling in cardiovascular health and disease. *Free Radic Biol Med* 2013;**61**:473-501.
14. Hafstad AD, Nabeebaccus AA, Shah AM. Novel aspects of ROS signalling in heart failure. *Basic Res Cardiol* 2013;**108**:359.
15. Burgoyne JR, Mongue-Din H, Eaton P, Shah AM. Redox signaling in cardiac physiology and pathology. *Circ Res* 2012;**111**:1091-1106.

16. Gupta PK, DiPette DJ, Supowit SC. Protective effect of resveratrol against pressure overload-induced heart failure. *Food Sci Nutr* 2014;**2**:218-229.
17. Tsujimoto I, Hikoso S, Yamaguchi O, Kashiwase K, Nakai A, Takeda T *et al*. The antioxidant edaravone attenuates pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. *Hypertension* 2005;**45**:921-926.
18. Paganini-Hill A, Kawas CH, Corrada MM. Antioxidant vitamin intake and mortality: the Leisure World Cohort Study. *Am J Epidemiol* 2015;**181**:120-126.
19. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009;**136**:215-233.
20. Da Costa Martins PA, De Windt LJ. MicroRNAs in control of cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res* 2012;**93**:563-572.
21. Condorelli G, Latronico MV, Cavarretta E. microRNAs in cardiovascular diseases: current knowledge and the road ahead. *J Am Coll Cardiol* 2014;**63**:2177-2187.
22. Ding SL, Zhou LY, Li PF. MicroRNAs in cardiac hypertrophy: angels or devils. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2011;**2**:124-134.
23. Lee S, Choi E, Cha MJ, Hwang KC. Looking into a conceptual framework of ROS-miRNA-atrial fibrillation. *Int J Mol Sci* 2014;**15**:21754-21776.
24. Magenta A, Greco S, Gaetano C, Martelli F. Oxidative stress and microRNAs in vascular diseases. *Int J Mol Sci* 2013;**14**:17319-17346.
25. McDonald SR, Sohal RS, Forster MJ. Concurrent administration of coenzyme Q10 and alpha-tocopherol improves learning in aged mice. *Free Radic Biol Med* 2005;**38**:729-736.
26. Kilkeny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *J Pharmacol Pharmacother* 2010;**1**:94-99.
27. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington (DC): National Academies Press (US), 2011.
28. Rockman HA, Ross RS, Harris AN, Knowlton KU, Steinhilber ME, Field LJ *et al*. Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;**88**:8277-8281.
29. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;**72**:248-254.
30. Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1994;**233**:346-357.
31. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG *et al*. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990;**186**:464-478.
32. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996;**239**:70-76.
33. Katalinic V, Modun D, Music I, Boban M. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2005;**140**:47-52.
34. McDonald JS, Milosevic D, Reddi HV, Grebe SK, Algeciras-Schimmich A. Analysis of circulating microRNA: preanalytical and analytical challenges. *Clin Chem* 2011;**57**:833-840.
35. Sourvinou IS, Markou A, Lianidou ES. Quantification of circulating miRNAs in plasma: effect of preanalytical and analytical parameters on their isolation and stability. *J Mol Diagn* 2013;**15**:827-834.
36. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;**25**:402-408.
37. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005;**120**:15-20.



38. Hsu SD, Tseng YT, Shrestha S, Lin YL, Khaleel A, Chou CH *et al.* miRTarBase update 2014: an information resource for experimentally validated miRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res* 2014;**42**:D78-85.
39. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 2000;**28**:27-30.
40. Date MO, Morita T, Yamashita N, Nishida K, Yamaguchi O, Higuchi Y *et al.* The antioxidant N-2-mercaptopropionyl glycine attenuates left ventricular hypertrophy in in vivo murine pressure-overload model. *J Am Coll Cardiol* 2002;**39**:907-912.
41. van Nierop BJ, van Assen HC, van Deel ED, Niesen LB, Duncker DJ, Strijkers GJ *et al.* Phenotyping of left and right ventricular function in mouse models of compensated hypertrophy and heart failure with cardiac MRI. *PLoS One* 2013;**8**:e55424.
42. Gogiraju R, Xu X, Bochenek ML, Steinbrecher JH, Lehnart SE, Wenzel P *et al.* Endothelial p53 deletion improves angiogenesis and prevents cardiac fibrosis and heart failure induced by pressure overload in mice. *J Am Heart Assoc* 2015;**4**.
43. Moc C, Taylor AE, Chesini GP, Zambrano CM, Barlow MS, Zhang X *et al.* Physiological activation of Akt by PHLPP1 deletion protects against pathological hypertrophy. *Cardiovasc Res* 2015;**105**:160-170.
44. Kameda Y, Hasegawa H, Kubota A, Tadokoro H, Kobayashi Y, Komuro I *et al.* Effects of pitavastatin on pressure overload-induced heart failure in mice. *Circ J* 2012;**76**:1159-1168.
45. Wang B, Yang Q, Bai WW, Xing YF, Lu XT, Sun YY *et al.* Tongxinluo protects against pressure overload-induced heart failure in mice involving VEGF/Akt/eNOS pathway activation. *PLoS One* 2014;**9**:e98047.
46. Schwarzer M, Osterholt M, Lunkenbein A, Schreppe A, Amorim P, Doenst T. Mitochondrial reactive oxygen species production and respiratory complex activity in rats with pressure overload-induced heart failure. *J Physiol* 2014;**592**:3767-3782.
47. Dhalla AK, Hill MF, Singal PK. Role of oxidative stress in transition of hypertrophy to heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1996;**28**:506-514.
48. Foo CW, Tristani-Firouzi P. Topical modalities for treatment and prevention of postsurgical hypertrophic scars. *Facial Plast Surg Clin North Am* 2011;**19**:551-557.
49. Azzi A, Gysin R, Kempná P, Munteanu A, Negis Y, Villacorta L *et al.* Vitamin E mediates cell signaling and regulation of gene expression. *Ann N Y Acad Sci* 2004;**1031**:86-95.
50. Shiojima I, Sato K, Izumiya Y, Schiekofer S, Ito M, Liao R *et al.* Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. *J Clin Invest* 2005;**115**:2108-2118.
51. Icli B, Dorbala P, Feinberg MW. An emerging role for the miR-26 family in cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 2014;**24**:241-248.
52. Han M, Yang Z, Sayed D, He M, Gao S, Lin L *et al.* GATA4 expression is primarily regulated via a miR-26b-dependent post-transcriptional mechanism during cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res* 2012;**93**:645-654.
53. Zhang ZH, Li J, Liu BR, Luo CF, Dong Q, Zhao LN *et al.* MicroRNA-26 was decreased in rat cardiac hypertrophy model and may be a promising therapeutic target. *J Cardiovasc Pharmacol* 2013;**62**:312-319.
54. Sayed D, Hong C, Chen IY, Lypowy J, Abdellatif M. MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circ Res* 2007;**100**:416-424.
55. Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M *et al.* MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* 2008;**456**:980-984.
56. Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S *et al.* MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcdcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* 2008;**27**:2128-2136.
57. Cheng Y, Zhang C. MicroRNA-21 in cardiovascular disease. *J Cardiovasc Transl Res* 2010;**3**:251-255.

58. Cardin S, Guasch E, Luo X, Naud P, Le Quang K, Shi Y *et al.* Role for MicroRNA-21 in atrial profibrillatory fibrotic remodeling associated with experimental postinfarction heart failure. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2012;**5**:1027-1035.
59. Cheng Y, Ji R, Yue J, Yang J, Liu X, Chen H *et al.* MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: do they play a role in cardiac hypertrophy? *Am J Pathol* 2007;**170**:1831-1840.
60. Matkovich SJ, Hu Y, Eschenbacher WH, Dorn LE, Dorn GW. Direct and indirect involvement of microRNA-499 in clinical and experimental cardiomyopathy. *Circ Res* 2012;**111**:521-531.
61. Shieh JT, Huang Y, Gilmore J, Srivastava D. Elevated miR-499 levels blunt the cardiac stress response. *PLoS One* 2011;**6**:e19481.
62. Cheng C, Wang Q, You W, Chen M, Xia J. MiRNAs as biomarkers of myocardial infarction: a meta-analysis. *PLoS One* 2014;**9**:e88566.
63. Mutharasan RK, Nagpal V, Ichikawa Y, Ardehali H. microRNA-210 is upregulated in hypoxic cardiomyocytes through Akt- and p53-dependent pathways and exerts cytoprotective effects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;**301**:H1519-1530.
64. Chan SY, Loscalzo J. MicroRNA-210: a unique and pleiotropic hypoxamir. *Cell Cycle* 2010;**9**:1072-1083.
65. Movafagh S, Crook S, Vo K. Regulation of hypoxia-inducible factor-1a by reactive oxygen species: new developments in an old debate. *J Cell Biochem* 2015;**116**:696-703.
66. 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**:S124-131.
67. 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**:15878-15883.
68. Hamama S, Noman MZ, Gervaz P, Delanian S, Vozenin MC. MiR-210: A potential therapeutic target against radiation-induced enteropathy. *Radiother Oncol* 2014;**111**:219-221.
69. Liu W, Liu Y, Zhang Y, Zhu X, Zhang R, Guan L *et al.* MicroRNA-150 protects against pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *J Cell Biochem* 2015.
70. Thum T, Galuppo P, Wolf C, Fiedler J, Kneitz S, van Laake LW *et al.* MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation* 2007;**116**:258-267.
71. van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD *et al.* A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;**103**:18255-18260.
72. Devaux Y, Vausort M, McCann GP, Zangrando J, Kelly D, Razvi N *et al.* MicroRNA-150: a novel marker of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Circ Cardiovasc Genet* 2013;**6**:290-298.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1 – Cardiac hypertrophy analyses in mice. A, B** Left ventricle weight / tibial length ratio after 7 and 35 days, respectively; N per group = 11-17 mice in each time point. Values are means  $\pm$  SEM. Comparisons were performed using ANOVA with Tukey post-hoc; \* $p$ <0.05; \*\* $p$ <0.001

**Figure 2 – Cardiac fibrosis analyses in mice. A, B** Fibrosis arbitrary units were calculated in Masson's trichrome stained sections using Image J after 7 and 35 days, respectively; **C** Example of Masson's trichrome staining; N per group = 10-17 mice in each time point. Values are means  $\pm$  SEM. Comparisons were performed using ANOVA with Tukey post-hoc; \* $p$ <0.05.

**Figure 3 – Real-time RT-qPCR of reprogramming fetal genes ANP (NPPA) and  $\beta$ -MHC (Myh7). A, B** NPPA gene expression at 7 and 35 days, respectively; **C, D** Myh7 gene expression at 7 and 35 days, respectively. Data were normalized to GAPDH gene and are expressed as means  $\pm$  SEM; Comparisons were performed by Kruskal-Wallis with Dunn's post-hoc; N per group = 10-17 mice in each time point; \* $p$ <0.05; \*\* $p$ <0.001

**Figure 4 – Real-time RT-qPCR of angiogenesis-related genes. A, B** VEGF gene expression at 7 and 35 days, respectively; **C, D** HIF-1 $\alpha$  gene expression at 7 and 35 days, respectively. Data were normalized to GAPDH gene and are expressed as means  $\pm$  SEM; Comparisons were performed by Kruskal-Wallis with Dunn's post-hoc; N per group = 10-17 mice in each time point; \* $p$ <0.05.

**Figure 5 – Biochemical analyses in mice. A, B** Protein carbonyls in 7 and 35 days, respectively; **C, D** Ferric reducing ability of plasma (FRAP) in 7 and 35 days, respectively; Values are means  $\pm$  SEM; Comparisons were performed by ANOVA with Tukey post-hoc; N per group = 8-17 mice in each time point; \* $p$ <0.05

**Figure 6 – Real-time RT-qPCR of microRNAs. A, B** miR-26b expression at 7 and 35 days, respectively; **C, D** miR-21 expression at 7 and 35 days, respectively; **E, F** miR-499 expression at 7 and 35 days, respectively; **G, H** miR-210 expression at 7 and 35 days, respectively; **I, J** miR-150 expression at 7 and 35 days, respectively; Data were normalized to cel-miR-39 and are expressed as mean  $\pm$  SEM; Comparisons were performed by Kruskal-Wallis with Dunn's post-hoc; N per group = 8-17 mice in each time point; \* $p$ <0.05; \*\* $p$ <0.001

**Figure 7 – Bioinformatics analyses. A** Genes overlap among miRNAs computed in terms of their Jacquard Similarity. Node size is proportional to the number of genes targeted by each miRNA, while edge width is proportional to the similarity coefficient. **B** Interaction map between miRs and genes that participate in major enriched KEGG pathways selected based on biological plausibility.

FIGURE 1

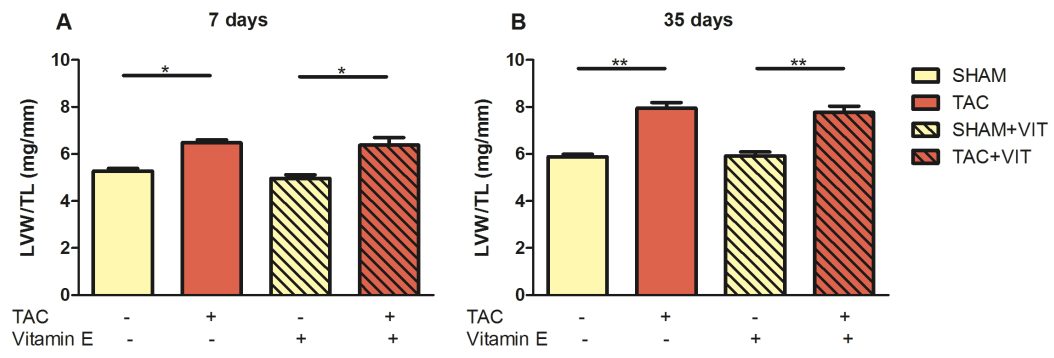


FIGURE 2

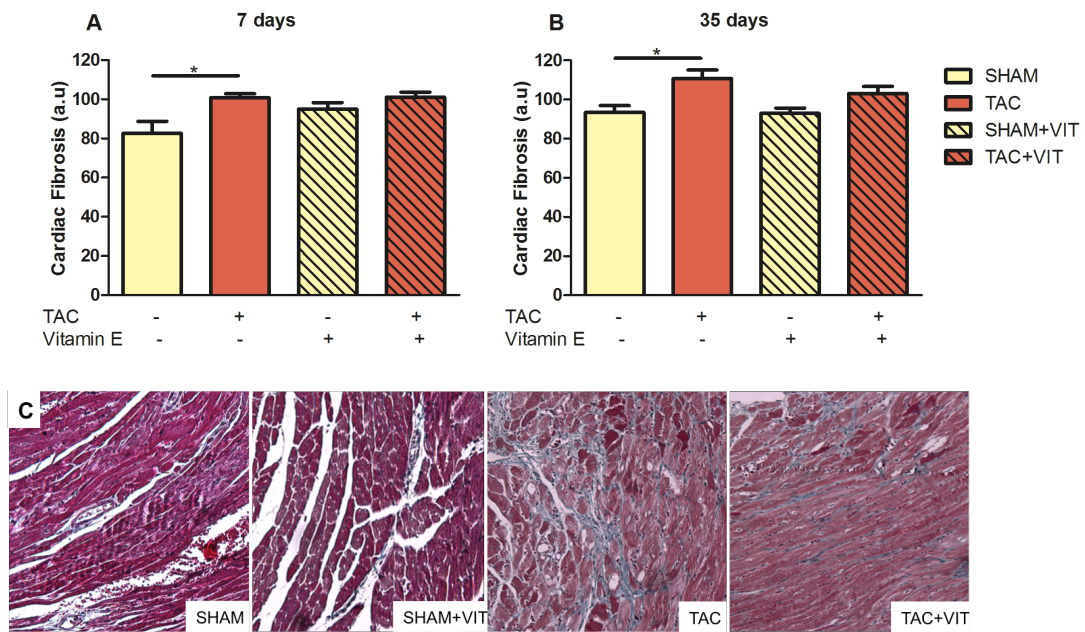


FIGURE 3

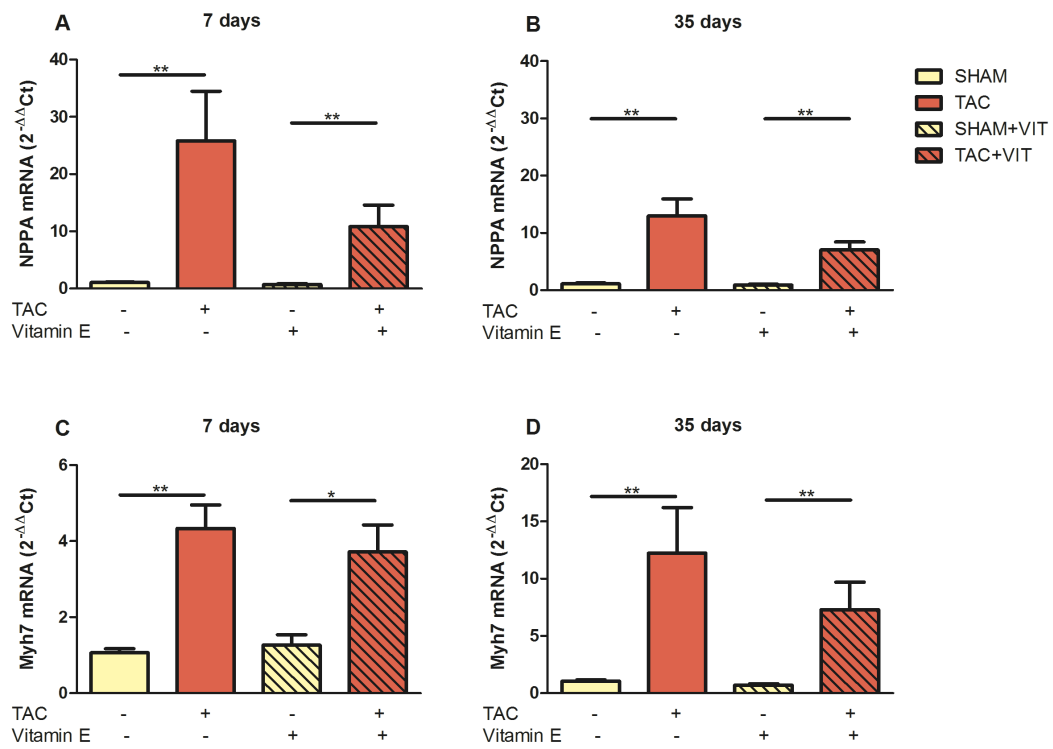


FIGURE 4

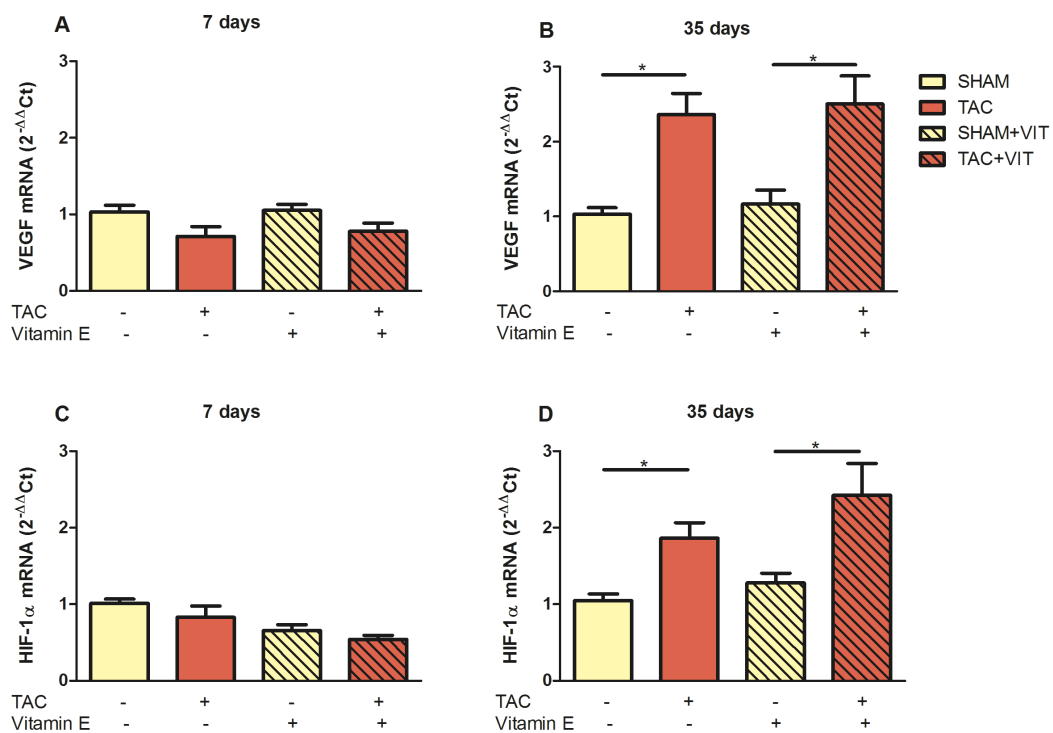


FIGURE 5

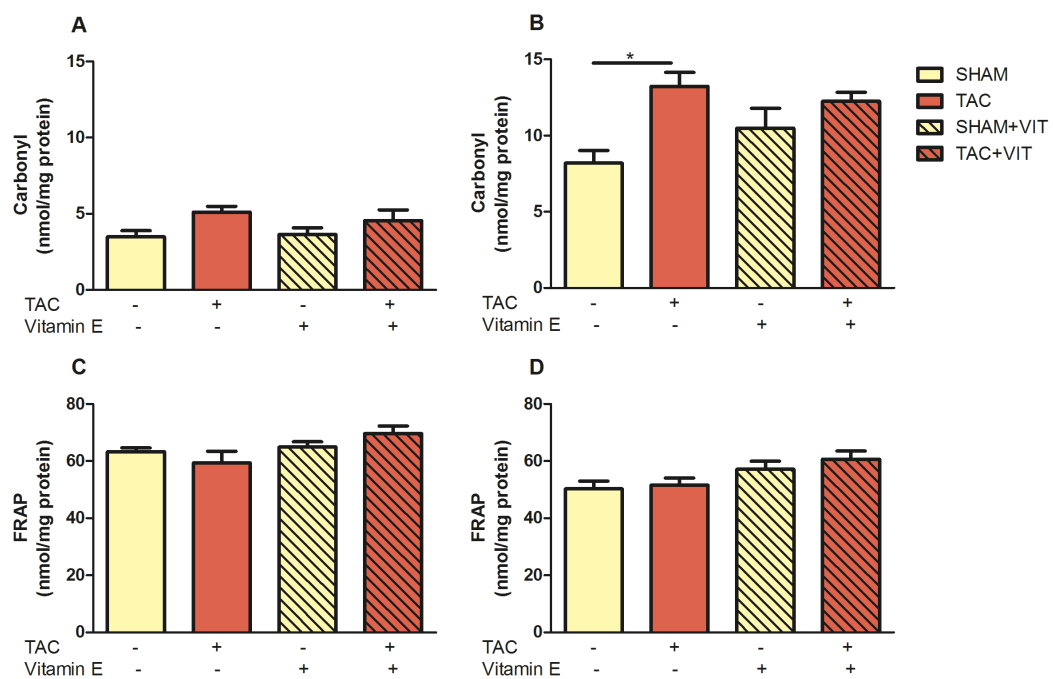




FIGURE 6

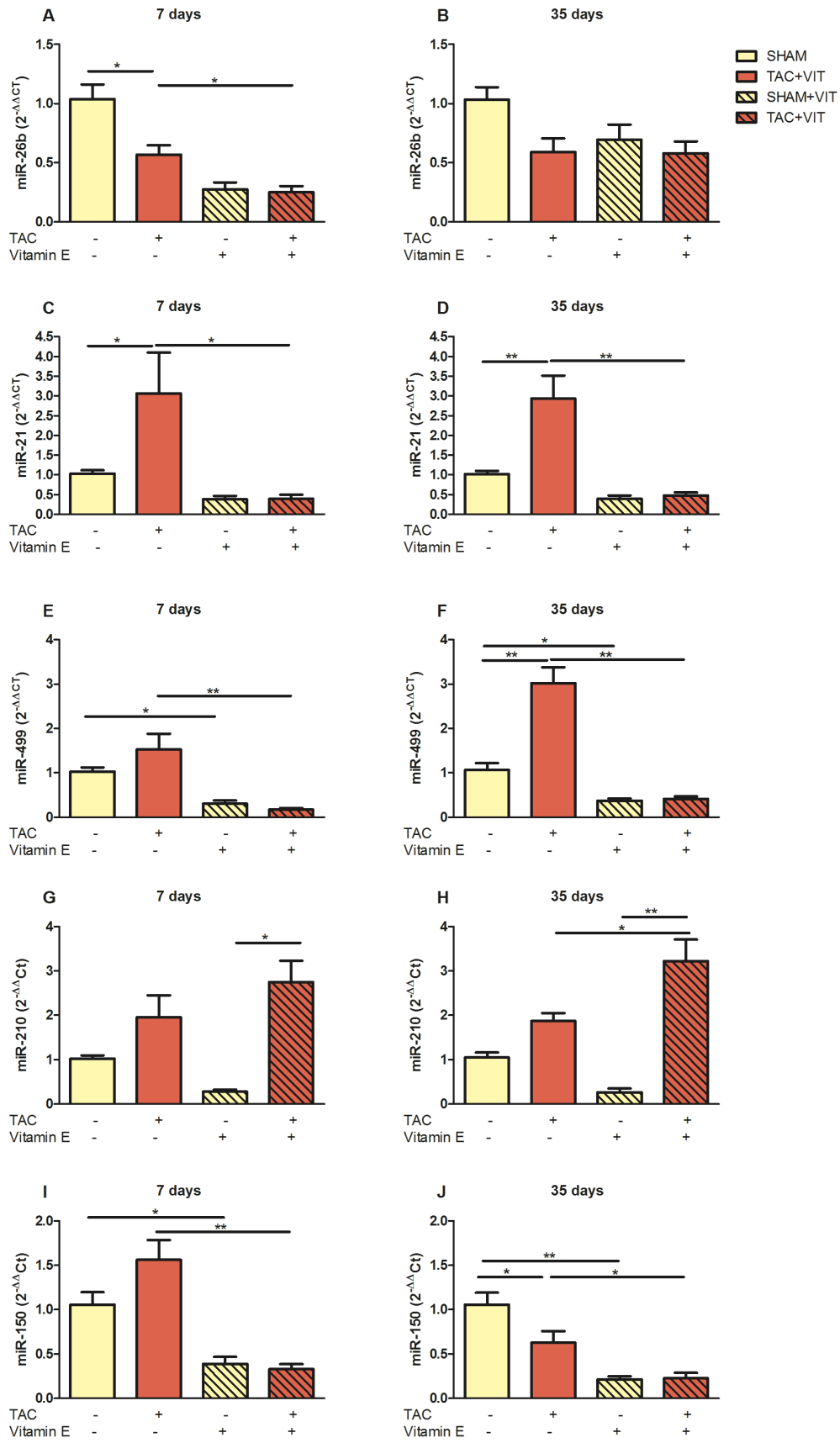
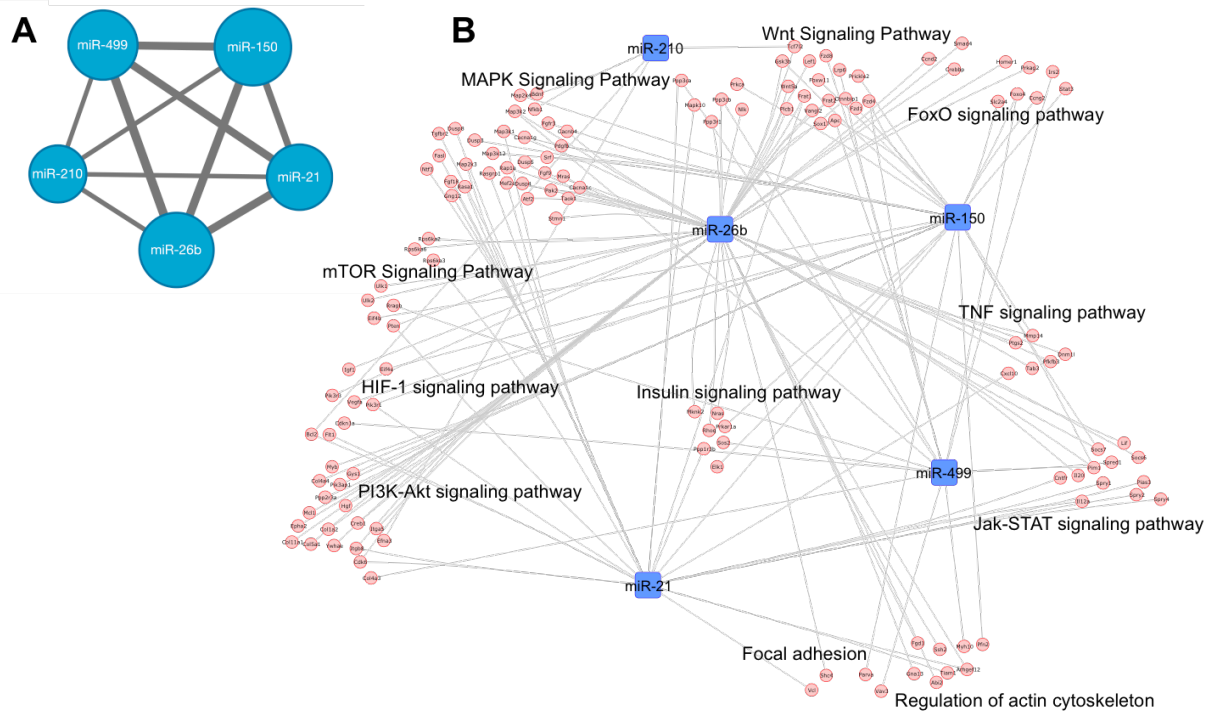


FIGURE 7



## **PARTE III**

DISCUSSÃO, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

## 7. DISCUSSÃO

Neste estudo, nossa proposta foi avaliar o efeito da suplementação com vitamina E sobre os processos de hipertrofia cardíaca por estímulo fisiológico e patológico (Figura anexa 1). Nesses processos, nosso foco era o desenvolvimento da hipertrofia, as adaptações secundárias a ela, assim como a expressão gênica e de microRNAs durante o processo. As avaliações foram realizadas após 7 dias do início do exercício ou da cirurgia de bandejamento aórtico transtorácico (TAC), para observar a sinalização inicial da hipertrofia e 35 dias após exercício ou TAC, para observar a hipertrofia já instalada. Esse projeto, assim como seus achados são bastante originais.

Inicialmente, exploramos o efeito da suplementação com vitamina E no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca fisiológica induzida pelo exercício voluntário em camundongos. O modelo utilizado foi efetivo em estimular os camundongos ao exercício espontâneo, assim como em gerar hipertrofia cardíaca consistente com estudos de exercício voluntário e forçado (Allen *et al.*, 2001, DeBosch *et al.*, 2006, Natali *et al.*, 2001, Soffe *et al.*, 2015, Wang *et al.*, 2010). Por outro lado, os animais treinados que recebiam vitamina E apresentaram menor hipertrofia celular, porém na massa do VE essa diferença não foi significativa. Esses resultados demonstraram que há um efeito da vitamina E sobre o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca fisiológica, mas não o suficiente para alteração do fenótipo.

Avaliamos também o efeito da vitamina E no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca patológica induzida pelo TAC. Nosso modelo induziu hipertrofia cardíaca acompanhada de fibrose e reativação de genes fetais já em 1 semana e o efeito foi ainda maior 35 dias após a cirurgia. Nossos resultados de aumento de massa do VE e fibrose são consistentes com outros estudos de hipertrofia patológica severa (Gogiraju *et al.*, 2015, Gupta *et al.*, 2014, Moc *et al.*, 2015, van Nierop *et al.*, 2013). Os animais submetidos ao TAC que receberam vitamina E demonstraram hipertrofia cardíaca similar aos animais placebo. Apesar disso, esses animais não apresentaram o aumento de fibrose encontrado nos animais placebo. Demonstrando que o tratamento com vitamina E pode influenciar mecanismos de deposição de colágeno. Há poucas evidências ligando a vitamina E diretamente à fibrose, no entanto, essas

sempre apontam para uma atividade anti-fibrótica (Azzi *et al.*, 2004, Ehrlich *et al.*, 1972, Foo *et al.*, 2011).

Os dois modelos de hipertrofia cardíaca foram efetivos em causar aumento do ventrículo esquerdo nos dois tempos analisados. Conforme esperado, o modelo patológico induziu aumento mais pronunciado nos dois tempos (Figura anexa 2). Os animais que receberam vitamina E também desenvolveram hipertrofia cardíaca em ambos os modelos e tempos. A vitamina E atenuou a hipertrofia celular no modelo fisiológico, porém sem efeito sobre a massa do VE nesse modelo.

Avaliamos também a angiogênese, que parece ser indispensável para a manutenção da função cardíaca durante o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca (Lundby *et al.*, 2009, Oka *et al.*, 2014). Considerando que as EROs estão envolvidas com muitos processos e estímulos à angiogênese, inclusive levando a ativação de HIF-1 $\alpha$  (Kim *et al.*, 2013, Movafagh *et al.*, 2015, Weidinger *et al.*, 2015), avaliamos o comportamento de genes diretamente relacionados a angiogênese (HIF-1 $\alpha$  e VEGF) no processo de hipertrofia cardíaca e sua relação a vitamina E. Observamos que o exercício promoveu o aumento da sinalização angiogênica no VE, demonstrado pela expressão dos genes HIF-1 $\alpha$  e VEGF. Além disso, foi observado o aumento no número de capilares nos dois tempos analisados. A suplementação com vitamina E não só inibiu o aumento de expressão, observado no exercício, como induziu uma diminuição acentuada da expressão dos genes HIF-1 $\alpha$  e VEGF. Além disso, o VE dos animais EX+VIT apresentou menor número de capilares. Esses dados sugerem que a vitamina E pode atenuar o estímulo angiogênico.

Na hipertrofia cardíaca patológica estudos têm demonstrado que a fase da hipertrofia compensada é caracterizada pela expressão de HIF-1 $\alpha$  e VEGF e aumento de vascularização. No nosso estudo observamos que o aumento da expressão desses genes ocorreu apenas em 35 dias, e de forma similar nos grupos TAC e TAC+VIT. Estudos recentes também tem observado pouco ou nenhum aumento de expressão desses genes na fase inicial do modelo TAC (Gogiraju *et al.*, 2015, Moc *et al.*, 2015).

A angiogênese e sua sinalização são muito importantes para o desenvolvimento e manutenção da hipertrofia cardíaca. Nós observamos essa

sinalização nos dois modelos, mas de forma mais pronunciada no modelo fisiológico, como era esperado (Figura anexa 3). Destacamos que no presente estudo, a vitamina E pareceu influenciar o estímulo angiogênico apenas no modelo fisiológico.

Os microRNAs têm sido bastante estudados devido a sua capacidade de regular a expressão gênica de forma pós-transcricional. Dentre eles, o miR-21 se destaca por participar de processos importantes como angiogênese, apoptose e inflamação. No contexto do exercício, a participação do miR-21 não está estabelecida. Estudos em humanos tem demonstrado o aumento nos níveis circulantes do miR-21 após o exercício em atletas (Baggish *et al.*, 2011, Tonevitsky *et al.*, 2013). No entanto, há estudos em humanos e em modelo animal de exercício que não observaram alteração na expressão desse miR (Fernandes *et al.*, 2011, Martinelli *et al.*, 2014, Mooren *et al.*, 2014). Em nosso estudo observamos um aumento da expressão de miR-21 induzida pelo exercício e a supressão desse aumento pela vitamina E. Há evidências indiretas que sugerem que as EROs ativem a expressão do miR-21 (Cheng *et al.*, 2009, Lee *et al.*, 2014, Magenta *et al.*, 2013). Desta forma, a atenuação das EROs poderia também atenuar a expressão de miR-21, como foi observado nos animais que recebiam vitamina E.

Na hipertrofia cardíaca e IC o papel do miR-21 também permanece controverso, embora a maioria dos estudos observe aumento de expressão associado a hipertrofia cardíaca patológica (Cardin *et al.*, 2012, Cheng *et al.*, 2007, Sayed *et al.*, 2007, Tatsuguchi *et al.*, 2007, Thum *et al.*, 2008). No presente estudo, observamos o aumento de expressão do miR-21 no grupo TAC. No entanto, o grupo TAC tratado com vitamina E não demonstrou esse aumento de miR-21. Esse dado pode sugerir que a vitamina E ou seu efeito antioxidante modulam a expressão de miR-21. Essa modulação do miR-21 não foi capaz de diminuir a hipertrofia cardíaca, no entanto, não foi observada fibrose significativa neste grupo. A associação do miR-21 com fibrose foi demonstrada por Thum e cols. que encontraram o aumento de expressão de miR-21 em fibroblastos de pacientes e modelos animais de IC. Esse aumento de miR-21 foi associado a fibrose, hipertrofia e disfunção cardíaca secundária ao modelo TAC (Thum *et al.*, 2008).

De forma geral, o miR-21 tem sido envolvido com o desenvolvimento cardíaco fetal e hipertrofia cardíaca fisiológica e patológica. Em nosso estudo, observamos o aumento de expressão do miR-21 nas duas formas de hipertrofia, porém de forma mais acentuada nos animais TAC (Figura anexa 4A,B). Assim, o miR-21 parece participar do processo hipertrófico, especialmente o patológico. De forma consistente, a vitamina E bloqueou o aumento de expressão do miR-21 em ambos os modelos. No modelo fisiológico essa inibição não parece ser favorável, no entanto, no modelo patológico esse bloqueio pode ter sido benéfico especialmente sobre o controle da fibrose.

O miR-210 é destacado ser um alvo direto de HIF-1 $\alpha$ , promovendo angiogênese, porém estudos têm evidenciado sua importância em processos como apoptose e sobrevivência celular (Hu *et al.*, 2010, Ivan *et al.*, 2014). Ainda, o miR-210 teve efeito citoprotetor, diminuindo a produção de EROs (Chan *et al.*, 2009, Magenta *et al.*, 2013, Mutharasan *et al.*, 2011). Nosso estudo é o primeiro a identificar o aumento do miR-210 na hipertrofia cardíaca fisiológica. No entanto, esse aumento de miR-210 associado ao exercício não foi observado nos animais suplementados com vitamina E. Há uma evidência indireta de que o análogo da vitamina E, Trolox, diminuiu a expressão de miR-210 em cultura de células fibróticas (Hamama *et al.*, 2014). Considerando a importância do miR-210 na angiogênese e sua relação com o HIF-1 $\alpha$  o aumento de expressão no modelo fisiológico parece apropriado e sua inibição pode não ser benéfica.

Nas doenças cardiovasculares o miR-210 tem demonstrado um papel protetor aumentando a angiogênese e melhorando a função cardíaca e sobrevivência celular pós doenças isquêmicas (Fasanaro *et al.*, 2008, Hu *et al.*, 2010, Kim *et al.*, 2012). Nosso estudo não observou aumento significativo do miR-210 nos animais TAC. No entanto, os animais TAC+VIT apresentaram um aumento bastante consistente na expressão do miR-210. Interessantemente, a inibição da vitamina E sobre a expressão do miR-210 vista no modelo fisiológico foi também observada de forma bastante acentuada nos animais SHAM+VIT. Enquanto os animais TAC+VIT apresentaram aumento de miR-210. Esse dado demonstra que a expressão do miR-210 não foi apenas influenciada pela vitamina E ou pelo modelo, mas por ambos.

O miR-210 parece ter um efeito benéfico no sistema cardiovascular, sobretudo promovendo a angiogênese. Nosso estudo observou o aumento de expressão do miR-210 apenas na hipertrofia fisiológica. Porém quando comparamos os grupos EX e TAC observamos que a expressão do miR-210 também estava aumentada nos animais TAC comparados ao grupo SED, porém sem diferença estatisticamente significativa em relação aos animais SHAM. (Figura anexa 4E,F). Já a vitamina E teve um efeito diferente em cada modelo: no fisiológico ela suprimiu o aumento de expressão do miR-210 associado ao exercício, enquanto no patológico o miR-210 apresentou expressão elevada. Assim, parece que a vitamina E teve um efeito benéfico apenas no modelo patológico.

O miR-150 está envolvido com a regulação da imunidade inata, migração de monócitos, inflamação e apoptose (Davidson-Moncada *et al.*, 2010). Na patofisiologia cardiovascular este miR tem sido descrito como protetor em doenças cardíacas e participante do desenvolvimento fetal cardíaco (Devaux *et al.*, 2013, Thum *et al.*, 2007, van Rooij *et al.*, 2006, Zidar *et al.*, 2011). No contexto do exercício, o aumento do miR-150 foi associado a hipertrofia cardíaca (Martinelli *et al.*, 2014). Nosso estudo, também observou o aumento desse miR associado ao exercício, apenas na avaliação de 35 dias. No entanto, esse aumento não foi observado nos animais exercitados suplementados com vitamina E. Considerado a importância dos processos que esse miR regula e seu aumento no grupo EX, a vitamina E pode estar suprimindo adaptações induzidas pelo exercício.

O papel protetor em doenças cardiovasculares do miR-150 têm sido evidenciado por vários estudos (Devaux *et al.*, 2013, Liu *et al.*, 2015, Liu *et al.*, 2015). A superexpressão do miR-150 reduziu a área de infarto, apoptose e inflamação após o modelo de IAM (Liu *et al.*, 2015). Além disso, camundongos miR-150Tg apresentaram uma sobrevida 25% maior, além menor fibrose e disfunção cardíaca após a cirurgia TAC (Liu *et al.*, 2015). De modo similar, o nocaute gênico de miR-150 foi associado apoptose, fibrose, disfunção cardíaca e menor sobrevida após o modelo de IAM (Tang *et al.*, 2015). Em nosso estudo observamos uma tendência de aumento do miR-150 no grupo TAC em 7 dias, mas após 35 dias a expressão desse miR estava reduzida. A vitamina E teve



um efeito importante sobre o miR-150, sua expressão estava diminuída tanto em animais SHAM+VIT, quanto nos TAC+VIT nos dois tempos avaliados.

Evidências indicam que o miR-150 tem papel protetor no coração, atuando no sistema imune. Nessa linha, nosso estudo observou o aumento do miR-150 apenas na hipertrofia cardíaca fisiológica em 35 dias (Figura anexa 4C,D). Enquanto na hipertrofia patológica o miR-150 estava diminuído também em 35 dias, demonstrando assim que, esse miR apresenta um papel de resposta mais tardio. De forma consistente, a vitamina E teve um efeito de inibição do miR-150 similar nos dois modelos. Em ambos os modelos a vitamina E parece não ter um efeito benéfico.

O miR-26b ainda é pouco estudado na patofisiologia cardiovascular, no entanto os estudos sugerem que esse miR esteja envolvido com apoptose, angiogênese e hipertrofia (Ding *et al.*, 2011). No presente estudo, foi observada a diminuição de expressão do miR-26b nos animais TAC e TAC+VIT principalmente em 7 dias. Esse achado pode demonstrar que a participação do miR-26b está mais associada a instalação da hipertrofia cardíaca, do que com sua manutenção. Outros estudos também têm demonstrado menor expressão do miR-26b em modelos de hipertrofia cardíaca patológica (Han *et al.*, 2012, Zhang *et al.*, 2013). Esses estudos utilizaram ainda a superexpressão de miR-26b para demonstrar sua importância no processo de hipertrofia. Han e cols. demonstrou *in vivo* que os camundongos miR-26bTg apresentavam menores hipertrofia cardíaca, fibrose e expressão de GATA4 após a cirurgia TAC (Han *et al.*, 2012). GATA4 é uma proteína envolvida no desenvolvimento do coração e da hipertrofia cardíaca, além de ser um alvo descrito do miR-26b. Zhang e cols. demonstraram *in vitro* que a superexpressão de miR-26b estava associada a menor hipertrofia e reativação fetal. Esses efeitos foram atribuídos a menor expressão de GSK3 $\beta$ , uma proteína envolvida no processo de hipertrofia cardíaca (Zhang *et al.*, 2013).

O miR-499 é um miR da família dos miomiRs e parece ser um bom biomarcador de dano cardíaco em humanos (Cheng *et al.*, 2014). Nosso estudo observou o aumento de expressão do miR-499 associado a hipertrofia cardíaca patológica, principalmente em 35 dias. Dados similares têm sido demonstrados na literatura em modelos TAC, superexpressão de G $\alpha$ q e IC (Matkovich *et al.*, 2012, Shieh *et al.*, 2011). Por outro lado, a vitamina E inibiu a expressão do

miR-499 tanto nos animais TAC+VIT quanto nos SHAM+VIT, demonstrando um efeito indiferente a indução cirúrgica. Considerando a associação do miR-499 com dano cardíaco a inibição do aumento de expressão parece ser benéfico.

Cada miR tem a capacidade de regular muitos genes, assim como um gene pode ser regulado por muitos miRs. Sendo assim, torna-se necessário analisar essas variáveis em conjunto e observar em qual contexto biológico estão inseridas. A análise de predição de alvos dos miRs avaliados no modelo fisiológico demonstrou a possível participação das seguintes vias de sinalização: MAPK, Wnt, Neurotrofina, Adesão Focal, Regulação do citoesqueleto de actina, Interação de citocinas. Essas vias de sinalização estão bastante envolvidas no processo de hipertrofia e nas adaptações desencadeadas por ela, demonstrando que as alterações na expressão dos miRs encontrados nesse modelo podem estar influenciando nesses mecanismos (Bernardo *et al.*, 2010, Drozdov *et al.*, 2010). De forma similar, a predição de alvos dos miRs avaliados no modelo patológico demonstrou a possível participação das vias de sinalização: MAPK, Wnt, mTOR, PI3k/Akt, TNF, FoxO, Adesão Focal, HIF-1, Insulina, Jak/STAT e Regulação do citoesqueleto de actina. A ativação de algumas dessas vias de sinalização compõe o processo hipertrófico e angiogênico, outras participam das adaptações desse processo (Bernardo *et al.*, 2010). Novamente, a participação dos miRs avaliados em nosso no processo de hipertrofia cardíaca é biologicamente plausível .

A produção de EROs no corpo humano é fisiológica e essas desempenham diversos papéis como a defesa a microorganismos, participação no metabolismo de aminoácidos e controle de rotas de sinalização. Ainda, os sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos são responsáveis por controlar a produção das EROs e evitar danos aos tecidos. O exercício tem o potencial de aumentar a produção de EROs, e por este motivo alguns estudos utilizaram antioxidantes com o objetivo de atenuar as EROs e promover melhor performance no exercício. No presente estudo utilizamos a vitamina E como antioxidante para atenuar as EROs durante o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca fisiológica. Nosso protocolo de exercício, por ser voluntário, não produziu aumento em marcadores de dano oxidativo ou alteração nas enzimas

antioxidantes (Figura anexa 5). A vitamina E não influenciou os marcadores de dano, mas foi observada maior atividade da enzima catalase em 35 dias (Figura anexa 5F).

Na hipertrofia cardíaca patológica e progressão para IC ocorre um aumento de EROs, que participam nos processos de disfunção contrátil, desregulação de cálcio, morte celular, fibrose, arritmia e no processo hipertrófico de cardiomiócitos. Estudos experimentais de hipertrofia patológica têm demonstrado que o uso de antioxidantes está associado a redução de fibrose, apoptose, dano oxidativo, hipertrofia cardíaca e/ou progressão para insuficiência cardíaca (Gupta *et al.*, 2014, Qin *et al.*, 2010). Novamente utilizamos a vitamina E para atenuar as EROs durante o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca patológica induzido por bandejamento aórtico. O modelo TAC induziu aumento do marcador de dano a proteínas e a vitamina E foi capaz de suprimir esse aumento nos animais TAC+VIT.

Analisando os dados conjuntamente, o marcador de dano a proteínas carbonil demonstrou maiores valores no modelo patológico, enquanto o potencial antioxidante total (FRAP) foi maior no modelo fisiológico (Figura anexa 6).

De forma geral, parece que as EROs participam do processo de HC de forma concentração-dependente, onde baixos níveis são adaptativos e necessários enquanto altos níveis são deletérios. Isso foi demonstrado nos modelos de hipertrofia cardíaca fisiológica e patológica. A suplementação com vitamina E não mostrou associação com a melhora na capacidade para o exercício e ainda bloqueou uma série de adaptações observadas na hipertrofia cardíaca fisiológica. Esses efeitos não estiveram associados a alterações significativas no fenótipo final da hipertrofia cardíaca fisiológica. No modelo patológico, a vitamina E reduziu a fibrose e o dano oxidativo, além de alterar a expressão de miR descritos no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca patológica. No entanto, novamente esse efeito não foi suficiente para reduzir a hipertrofia cardíaca.

## 8. CONCLUSÕES

No modelo de hipertrofia cardíaca fisiológica

- A suplementação com vitamina E diminuiu a magnitude da hipertrofia celular, a sinalização angiogênica e o número de capilares na avaliação inicial do desenvolvimento da hipertrofia cardíaca fisiológica. No entanto, essas alterações não influenciaram o fenótipo final da hipertrofia cardíaca fisiológica ou a capacidade para o exercício desses animais.
- O desenvolvimento da hipertrofia cardíaca fisiológica foi acompanhado pelo aumento de expressão dos miR-21, -150 e -210. Esses miRs parecem regular proteínas e rotas de sinalização importantes no contexto da hipertrofia cardíaca. No entanto, a suplementação com vitamina E bloqueou o aumento de expressão desses miRs.

No modelo de hipertrofia cardíaca patológica

- A suplementação com vitamina E diminuiu a fibrose e o dano a proteínas, no entanto, não foi capaz de diminuir a hipertrofia cardíaca patológica.
- O desenvolvimento da hipertrofia cardíaca patológica foi acompanhado pela expressão diferencial dos miR-21, -26b, -150, -210 e -499. Esses miRs parecem regular proteínas e rotas de sinalização importantes no contexto da hipertrofia cardíaca. No entanto, a suplementação com vitamina E bloqueou o aumento de expressão dos miR-21 e -499 e induziu o aumento de expressão do miR-210.
- A magnitude da hipertrofia cardíaca, assim como o dano a proteínas foram maiores no modelo patológico, enquanto a sinalização angiogênica e o potencial antioxidante foram maiores no modelo fisiológico. Os miR-21 e -210 parecem participar do processo hipertrófico independente do estímulo. Por outro lado, o miR-150 parece participar apenas modelo fisiológico

## **9. PERSPECTIVAS**

Avaliações histológicas de hipertrofia celular, angiogênese no modelo patológico e fibrose no fisiológico estão em andamento. De posse desses dados, devemos proceder com a submissão do manuscrito de comparação entre os modelos de hipertrofia cardíaca fisiológica e patológica. Além disso, pretendemos realizar uma análise de sobrevida em um novo lote de animais, para verificar se as alterações observadas no grupo TAC+VIT se traduzirão em maior sobrevida desses animais.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DAS PARTES I E III

- Allen DL, Harrison BC, Maass A, Bell ML, Byrnes WC, Leinwand LA (2001) Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. *J Appl Physiol* (1985), 90(5):1900-1908.
- Ambros V (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431(7006):350-355.
- Araujo AS, Enzweiler AT, Schenkel P, Fernandes TR, Ribeiro MF, Partata WA, Llesuy S, Belló-Klein A (2007) Oxidative stress activates insulin-like growth factor I receptor protein expression, mediating cardiac hypertrophy induced by thyroxine. *Mol Cell Biochem*, 303(1-2):89-95.
- Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S, Allgayer H (2008) MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*, 27(15):2128-2136.
- Azzi A, Gysin R, Kempná P, Munteanu A, Negis Y, Villacorta L, Visarius T, Zingg JM (2004) Vitamin E mediates cell signaling and regulation of gene expression. *Ann N Y Acad Sci*, 1031:86-95.
- Baggish AL, Hale A, Weiner RB, Lewis GD, Systrom D, Wang F, Wang TJ, Chan SY (2011) Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training. *J Physiol*, 589(Pt 16):3983-3994.
- Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2):281-297.
- Bellafiore M, Siverini G, Palumbo D, Macaluso F, Bianco A, Palma A, Farina F (2007) Increased cx43 and angiogenesis in exercised mouse hearts. *Int J Sports Med*, 28(9):749-755.
- Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR (2010) Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther*, 128(1):191-227.
- Biswas S, Gupta MK, Chattopadhyay D, Mukhopadhyay CK (2007) Insulin-induced activation of hypoxia-inducible factor-1 requires generation of reactive oxygen species by NADPH oxidase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292(2):H758-766.
- Boveris A, Navarro A (2008) Systemic and mitochondrial adaptive responses to moderate exercise in rodents. *Free Radic Biol Med*, 44(2):224-229.
- Braunwald E (2013) Heart failure. *JACC Heart Fail*, 1(1):1-20.
- Brunelle JK, Bell EL, Quesada NM, Vercauteren K, Tiranti V, Zeviani M, Scarpulla RC, Chandel NS (2005) Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation. *Cell Metab*, 1(6):409-414.
- Burchfield JS, Xie M, Hill JA (2013) Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2. *Circulation*, 128(4):388-400.
- Burgoyne JR, Mongue-Din H, Eaton P, Shah AM (2012) Redox signaling in cardiac physiology and pathology. *Circ Res*, 111(8):1091-1106.
- Cadenas S, Aragonés J, Landázuri MO (2010) Mitochondrial reprogramming through cardiac oxygen sensors in ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res*, 88(2):219-228.
- Cai Z, Zhong H, Bosch-Marce M, Fox-Talbot K, Wang L, Wei C, Trush MA, Semenza GL (2008) Complete loss of ischaemic preconditioning-induced cardioprotection in mice with partial deficiency of HIF-1 alpha. *Cardiovasc Res*, 77(3):463-470.
- Cardin S, Guasch E, Luo X, Naud P, Le Quang K, Shi Y, Tardif JC, Comtois P, Nattel S (2012) Role for MicroRNA-21 in atrial profibrillatory fibrotic remodeling associated with experimental postinfarction heart failure. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 5(5):1027-1035.
- Carè A, Catalucci D, Felicetti F, Bonci D, Addario A, Gallo P, Bang ML, Segnalini P, Gu Y, Dalton ND *et al* (2007) MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med*, 13(5):613-618.
- Carmeliet P (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*, 6(4):389-395.

- Cerretelli P, Gelfi C (2011) Energy metabolism in hypoxia: reinterpreting some features of muscle physiology on molecular grounds. *Eur J Appl Physiol*, 111(3):421-432.
- Chan SY, Loscalzo J (2010) MicroRNA-210: a unique and pleiotropic hypoxamir. *Cell Cycle*, 9(6):1072-1083.
- Chan SY, Zhang YY, Hemann C, Mahoney CE, Zweier JL, Loscalzo J (2009) MicroRNA-210 controls mitochondrial metabolism during hypoxia by repressing the iron-sulfur cluster assembly proteins ISCU1/2. *Cell Metab*, 10(4):273-284.
- Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, Schumacker PT (2000) Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  during hypoxia: a mechanism of O<sub>2</sub> sensing. *J Biol Chem*, 275(33):25130-25138.
- Cheng C, Wang Q, You W, Chen M, Xia J (2014) MiRNAs as biomarkers of myocardial infarction: a meta-analysis. *PLoS One*, 9(2):e88566.
- Cheng X, Ku CH, Siow RC (2013) Regulation of the Nrf2 antioxidant pathway by microRNAs: New players in micromanaging redox homeostasis. *Free Radic Biol Med*, 64:4-11.
- Cheng Y, Ji R, Yue J, Yang J, Liu X, Chen H, Dean DB, Zhang C (2007) MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: do they play a role in cardiac hypertrophy? *Am J Pathol*, 170(6):1831-1840.
- Cheng Y, Liu X, Zhang S, Lin Y, Yang J, Zhang C (2009) MicroRNA-21 protects against the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced injury on cardiac myocytes via its target gene PDCD4. *J Mol Cell Cardiol*, 47(1):5-14.
- Cheng Y, Zhang C (2010) MicroRNA-21 in cardiovascular disease. *J Cardiovasc Transl Res*, 3(3):251-255.
- Chua YL, Dufour E, Dassa EP, Rustin P, Jacobs HT, Taylor CT, Hagen T (2010) Stabilization of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  protein in hypoxia occurs independently of mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem*, 285(41):31277-31284.
- Cicchillitti L, Di Stefano V, Isaia E, Crimaldi L, Fasanaro P, Ambrosino V, Antonini A, Capogrossi MC, Gaetano C, Piaggio G *et al* (2012) Hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$  induces miR-210 in normoxic differentiating myoblasts. *J Biol Chem*, 287(53):44761-44771.
- Cobley JN, McHardy H, Morton JP, Nikolaidis MG, Close GL (2015) Influence of vitamin C and vitamin E on redox signaling: Implications for exercise adaptations. *Free Radic Biol Med*, 84:65-76.
- Cox EJ, Marsh SA (2014) A systematic review of fetal genes as biomarkers of cardiac hypertrophy in rodent models of diabetes. *PLoS One*, 9(3):e92903.
- D'Alessandra Y, Devanna P, Limana F, Straino S, Di Carlo A, Brambilla PG, Rubino M, Carena MC, Spazzafumo L, De Simone M *et al* (2010) Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur Heart J*, 31(22):2765-2773.
- Dando I, Cordani M, Dalla Pozza E, Biondani G, Donadelli M, Palmieri M (2015) Antioxidant Mechanisms and ROS-Related MicroRNAs in Cancer Stem Cells. *Oxid Med Cell Longev*, 2015:425708.
- Davidson-Moncada J, Papavasiliou FN, Tam W (2010) MicroRNAs of the immune system: roles in inflammation and cancer. *Ann N Y Acad Sci*, 1183:183-194.
- DeBosch B, Treskov I, Lupu TS, Weinheimer C, Kovacs A, Courtois M, Muslin AJ (2006) Akt1 is required for physiological cardiac growth. *Circulation*, 113(17):2097-2104.
- Déry MA, Michaud MD, Richard DE (2005) Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Biol*, 37(3):535-540.
- Devaux Y, Vausort M, Goretti E, Nazarov PV, Azuaje F, Gilson G, Corsten MF, Schroen B, Lair ML, Heymans S *et al* (2012) Use of circulating microRNAs to diagnose acute myocardial infarction. *Clin Chem*, 58(3):559-567.

- Devaux Y, Vausort M, McCann GP, Kelly D, Collignon O, Ng LL, Wagner DR, Squire IB (2013) A panel of 4 microRNAs facilitates the prediction of left ventricular contractility after acute myocardial infarction. *PLoS One*, 8(8):e70644.
- Devaux Y, Vausort M, McCann GP, Zangrando J, Kelly D, Razvi N, Zhang L, Ng LL, Wagner DR, Squire IB (2013) MicroRNA-150: a novel marker of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Circ Cardiovasc Genet*, 6(3):290-298.
- Dhalla AK, Hill MF, Singal PK (1996) Role of oxidative stress in transition of hypertrophy to heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 28(2):506-514.
- Ding SL, Zhou LY, Li PF (2011) MicroRNAs in cardiac hypertrophy: angels or devils. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2(1):124-134.
- Dong S, Cheng Y, Yang J, Li J, Liu X, Wang X, Wang D, Krall TJ, Delphin ES, Zhang C (2009) MicroRNA expression signature and the role of microRNA-21 in the early phase of acute myocardial infarction. *J Biol Chem*, 284(43):29514-29525.
- Dorn GW (2007) Myocardial angiogenesis: its absence makes the growing heart founder. *Cell Metab*, 5(5):326-327.
- Dorn GW, 2nd (2007) The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy. *Hypertension*, 49(5):962-970.
- Dröge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82(1):47-95.
- Drozov I, Tsoka S, Ouzounis CA, Shah AM (2010) Genome-wide expression patterns in physiological cardiac hypertrophy. *BMC Genomics*, 11:557.
- Ehrlich HP, Tarver H, Hunt TK (1972) Inhibitory effects of vitamin E on collagen synthesis and wound repair. *Ann Surg*, 175(2):235-240.
- Ellison GM, Waring CD, Vicinanza C, Torella D (2012) Physiological cardiac remodelling in response to endurance exercise training: cellular and molecular mechanisms. *Heart*, 98(1):5-10.
- Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V, Melchionna R, Romani S, Pompilio G, Capogrossi MC, Martelli F (2008) MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *J Biol Chem*, 283(23):15878-15883.
- Fernandes T, Hashimoto NY, Magalhaes FC, Fernandes FB, Casarini DE, Carmona AK, Krieger JE, Phillips MI, Oliveira EM (2011) Aerobic exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves regulatory MicroRNAs, decreased angiotensin-converting enzyme-angiotensin ii, and synergistic regulation of angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin (1-7). *Hypertension*, 58(2):182-189.
- Finkel T, Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809):239-247.
- Foo CW, Tristani-Firouzi P (2011) Topical modalities for treatment and prevention of postsurgical hypertrophic scars. *Facial Plast Surg Clin North Am*, 19(3):551-557.
- Garelnabi M, Veledar E, White-Welkley J, Santanam N, Abramson J, Weintraub W, Parthasarathy S (2012) Vitamin E differentially affects short term exercise induced changes in oxidative stress, lipids, and inflammatory markers. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 22(10):907-913.
- Gielen S, Schuler G, Adams V (2010) Cardiovascular effects of exercise training: molecular mechanisms. *Circulation*, 122(12):1221-1238.
- Giordano FJ (2005) Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest*, 115(3):500-508.
- Gogiraju R, Xu X, Bochenek ML, Steinbrecher JH, Lehnart SE, Wenzel P, Kessel M, Zeisberg EM, Dobbelsstein M, Schäfer K (2015) Endothelial p53 deletion improves angiogenesis and prevents cardiac fibrosis and heart failure induced by pressure overload in mice. *J Am Heart Assoc*, 4(2).
- Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Romagnoli M, Arduini A, Borrás C, Pallardo FV, Sastre J, Viña J (2008) Oral administration of vitamin C decreases muscle



- mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. *Am J Clin Nutr*, 87(1):142-149.
- Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Viña J (2008) Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radic Biol Med*, 44(2):126-131.
- Greco S, Gaetano C, Martelli F (2014) HypoxamiR regulation and function in ischemic cardiovascular diseases. *Antioxid Redox Signal*, 21(8):1202-1219.
- Gu GL, Xu XL, Sun XT, Zhang J, Guo CF, Wang CS, Sun B, Guo GL, Ma K, Huang YY *et al* (2015) Cardioprotective Effect of MicroRNA-21 in Murine Myocardial Infarction. *Cardiovasc Ther*, 33(3):109-117.
- Gupta PK, DiPette DJ, Supowit SC (2014) Protective effect of resveratrol against pressure overload-induced heart failure. *Food Sci Nutr*, 2(3):218-229.
- Gupta S, Das B, Sen S (2007) Cardiac hypertrophy: mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*, 9(6):623-652.
- Hafstad AD, Nabeebaccus AA, Shah AM (2013) Novel aspects of ROS signalling in heart failure. *Basic Res Cardiol*, 108(4):359.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Oxford University Press.
- Hamama S, Noman MZ, Gervaz P, Delanian S, Vozenin MC (2014) MiR-210: A potential therapeutic target against radiation-induced enteropathy. *Radiother Oncol*, 111(2):219-221.
- Han M, Yang Z, Sayed D, He M, Gao S, Lin L, Yoon S, Abdellatif M (2012) GATA4 expression is primarily regulated via a miR-26b-dependent post-transcriptional mechanism during cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*, 93(4):645-654.
- Heineke J, Molkentin JD (2006) Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(8):589-600.
- Heymes C, Bendall JK, Ratajczak P, Cave AC, Samuel JL, Hasenfuss G, Shah AM (2003) Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 41(12):2164-2171.
- Hou Y, Adrian-Segarra JM, Richter M, Kubin N, Shin J, Werner I, Walther T, Schönburg M, Pöling J, Warnecke H *et al* (2015) Animal Models and "Omics" Technologies for Identification of Novel Biomarkers and Drug Targets to Prevent Heart Failure. *Biomed Res Int*, 2015:212910.
- Hu S, Huang M, Li Z, Jia F, Ghosh Z, Lijkwan MA, Fasanaro P, Sun N, Wang X, Martelli F *et al* (2010) MicroRNA-210 as a novel therapy for treatment of ischemic heart disease. *Circulation*, 122(11 Suppl):S124-131.
- Huang X, Ding L, Bennewith KL, Tong RT, Welford SM, Ang KK, Story M, Le QT, Giaccia AJ (2009) Hypoxia-inducible mir-210 regulates normoxic gene expression involved in tumor initiation. *Mol Cell*, 35(6):856-867.
- Huang Y, Hickey RP, Yeh JL, Liu D, Dadak A, Young LH, Johnson RS, Giordano FJ (2004) Cardiac myocyte-specific HIF-1 $\alpha$  deletion alters vascularization, energy availability, calcium flux, and contractility in the normoxic heart. *FASEB J*, 18(10):1138-1140.
- Hudlicka O, Brown M, Egginton S (1992) Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle. *Physiol Rev*, 72(2):369-417.
- Icli B, Dorbala P, Feinberg MW (2014) An emerging role for the miR-26 family in cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med*, 24(6):241-248.
- Icli B, Wara AK, Moslehi J, Sun X, Plovie E, Cahill M, Marchini JF, Schissler A, Padera RF, Shi J *et al* (2013) MicroRNA-26a regulates pathological and physiological angiogenesis by targeting BMP/SMAD1 signaling. *Circ Res*, 113(11):1231-1241.
- Ikeda H, Shiojima I, Ozasa Y, Yoshida M, Holzenberger M, Kahn CR, Walsh K, Igarashi T, Abel ED, Komuro I (2009) Interaction of myocardial insulin receptor and IGF receptor signaling in exercise-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*, 47(5):664-675.
- Ivan M, Huang X (2014) miR-210: fine-tuning the hypoxic response. *Adv Exp Med Biol*, 772:205-227.

- Ke Q, Costa M (2006) Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol*, 70(5):1469-1480.
- Kietzmann T, Görlach A (2005) Reactive oxygen species in the control of hypoxia-inducible factor-mediated gene expression. *Semin Cell Dev Biol*, 16(4-5):474-486.
- Kim CH, Cho YS, Chun YS, Park JW, Kim MS (2002) Early expression of myocardial HIF-1 $\alpha$  in response to mechanical stresses: regulation by stretch-activated channels and the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *Circ Res*, 90(2):E25-33.
- Kim HW, Jiang S, Ashraf M, Haider KH (2012) Stem cell-based delivery of Hypoxamir-210 to the infarcted heart: implications on stem cell survival and preservation of infarcted heart function. *J Mol Med (Berl)*, 90(9):997-1010.
- Kim JH, Park SG, Song SY, Kim JK, Sung JH (2013) Reactive oxygen species-responsive miR-210 regulates proliferation and migration of adipose-derived stem cells via PTPN2. *Cell Death Dis*, 4:e588.
- Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV (2006) HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab*, 3(3):177-185.
- Kong SW, Bodyak N, Yue P, Liu Z, Brown J, Izumo S, Kang PM (2005) Genetic expression profiles during physiological and pathological cardiac hypertrophy and heart failure in rats. *Physiol Genomics*, 21(1):34-42.
- Kwon SH, Pimentel DR, Remondino A, Sawyer DB, Colucci WS (2003) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways. *J Mol Cell Cardiol*, 35(6):615-621.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294(5543):853-858.
- Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW (2004) Hypoxia-inducible factor (HIF-1) $\alpha$ : its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med*, 36(1):1-12.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5):843-854.
- Lee S, Choi E, Cha MJ, Hwang KC (2014) Looking into a conceptual framework of ROS-miRNA-atrial fibrillation. *Int J Mol Sci*, 15(12):21754-21776.
- Lerman I, Harrison BC, Freeman K, Hewett TE, Allen DL, Robbins J, Leinwand LA (2002) Genetic variability in forced and voluntary endurance exercise performance in seven inbred mouse strains. *J Appl Physiol (1985)*, 92(6):2245-2255.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120(1):15-20.
- Li X, Kong M, Jiang D, Qian J, Duan Q, Dong A (2013) MicroRNA-150 aggravates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cardiac myocyte injury by down-regulating *c-myc* gene. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 45(9):734-741.
- Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, 433(7027):769-773.
- Lin RC, Weeks KL, Gao XM, Williams RB, Bernardo BC, Kiriazis H, Matthews VB, Woodcock EA, Bouwman RD, Mollica JP *et al* (2010) PI3K(p110  $\alpha$ ) protects against myocardial infarction-induced heart failure: identification of PI3K-regulated miRNA and mRNA. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30(4):724-732.
- Lin Y, Liu X, Cheng Y, Yang J, Huo Y, Zhang C (2009) Involvement of MicroRNAs in hydrogen peroxide-mediated gene regulation and cellular injury response in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 284(12):7903-7913.
- Liu LZ, Li C, Chen Q, Jing Y, Carpenter R, Jiang Y, Kung HF, Lai L, Jiang BH (2011) MiR-21 induced angiogenesis through AKT and ERK activation and HIF-1 $\alpha$  expression. *PLoS One*, 6(4):e19139.

- Liu W, Liu Y, Zhang Y, Zhu X, Zhang R, Guan L, Tang Q, Jiang H, Huang C, Huang H (2015) MicroRNA-150 protects against pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *J Cell Biochem*.
- Liu Z, Ye P, Wang S, Wu J, Sun Y, Zhang A, Ren L, Cheng C, Huang X, Wang K *et al* (2015) MicroRNA-150 protects the heart from injury by inhibiting monocyte accumulation in a mouse model of acute myocardial infarction. *Circ Cardiovasc Genet*, 8(1):11-20.
- Löffler D, Brocke-Heidrich K, Pfeifer G, Stocsits C, Hackermüller J, Kretzschmar AK, Burger R, Gramatzki M, Blumert C, Bauer K *et al* (2007) Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer. *Blood*, 110(4):1330-1333.
- Lundby C, Calbet JA, Robach P (2009) The response of human skeletal muscle tissue to hypoxia. *Cell Mol Life Sci*, 66(22):3615-3623.
- Luo Z, Wen G, Wang G, Pu X, Ye S, Xu Q, Wang W, Xiao Q (2013) MicroRNA-200C and -150 play an important role in endothelial cell differentiation and vasculogenesis by targeting transcription repressor ZEB1. *Stem Cells*, 31(9):1749-1762.
- Mack GS (2007) MicroRNA gets down to business. *Nat Biotechnol*, 25(6):631-638.
- Madamanchi NR, Runge MS (2013) Redox signaling in cardiovascular health and disease. *Free Radic Biol Med*, 61:473-501.
- Magenta A, Greco S, Gaetano C, Martelli F (2013) Oxidative stress and microRNAs in vascular diseases. *Int J Mol Sci*, 14(9):17319-17346.
- Maillet M, van Berlo JH, Molkentin JD (2013) Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(1):38-48.
- Mansfield KD, Guzy RD, Pan Y, Young RM, Cash TP, Schumacker PT, Simon MC (2005) Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF- $\alpha$  activation. *Cell Metab*, 1(6):393-399.
- Marini M, Falcieri E, Margonato V, Treré D, Lapalombella R, di Tullio S, Marchionni C, Burattini S, Samaja M, Esposito F *et al* (2008) Partial persistence of exercise-induced myocardial angiogenesis following 4-week detraining in the rat. *Histochem Cell Biol*, 129(4):479-487.
- Martinelli NC, Cohen CR, Santos KG, Castro MA, Biolo A, Frick L, Silvello D, Lopes A, Schneider S, Andrades ME *et al* (2014) An analysis of the global expression of microRNAs in an experimental model of physiological left ventricular hypertrophy. *PLoS One*, 9(4):e93271.
- Matkovich SJ, Hu Y, Eschenbacher WH, Dorn LE, Dorn GW (2012) Direct and indirect involvement of microRNA-499 in clinical and experimental cardiomyopathy. *Circ Res*, 111(5):521-531.
- McCarthy JJ, Esser KA, Peterson CA, Dupont-Versteegden EE (2009) Evidence of MyomiR network regulation of beta-myosin heavy chain gene expression during skeletal muscle atrophy. *Physiol Genomics*, 39(3):219-226.
- McMullen JR, Jennings GL (2007) Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 34(4):255-262.
- McMullen JR, Shioi T, Zhang L, Tarnavski O, Sherwood MC, Kang PM, Izumo S (2003) Phosphoinositide 3-kinase(p110 $\alpha$ ) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(21):12355-12360.
- Medeiros A, Oliveira EM, Gianolla R, Casarini DE, Negrao CE, Brum PC (2004) Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. *Braz J Med Biol Res*, 37(12):1909-1917.
- Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T (2007) MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*, 133(2):647-658.

- Moc C, Taylor AE, Chesini GP, Zambrano CM, Barlow MS, Zhang X, Gustafsson Å, Purcell NH (2015) Physiological activation of Akt by PHLPP1 deletion protects against pathological hypertrophy. *Cardiovasc Res*, 105(2):160-170.
- Mooren FC, Viereck J, Krüger K, Thum T (2014) Circulating microRNAs as potential biomarkers of aerobic exercise capacity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 306(4):H557-563.
- Morán M, Saborido A, Megías A (2003) Ca<sup>2+</sup> regulatory systems in rat myocardium are altered by 24 weeks treadmill training. *Pflugers Arch*, 446(2):161-168.
- Movafagh S, Crook S, Vo K (2015) Regulation of hypoxia-inducible factor-1a by reactive oxygen species: new developments in an old debate. *J Cell Biochem*, 116(5):696-703.
- Mutharasan RK, Nagpal V, Ichikawa Y, Ardehali H (2011) microRNA-210 is upregulated in hypoxic cardiomyocytes through Akt- and p53-dependent pathways and exerts cytoprotective effects. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 301(4):H1519-1530.
- Myung SK, Ju W, Cho B, Oh SW, Park SM, Koo BK, Park BJ, Group KM-AS (2013) Efficacy of vitamin and antioxidant supplements in prevention of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ*, 346:f10.
- Narasimhan M, Patel D, Vedpathak D, Rathinam M, Henderson G, Mahimainathan L (2012) Identification of novel microRNAs in post-transcriptional control of Nrf2 expression and redox homeostasis in neuronal, SH-SY5Y cells. *PLoS One*, 7(12):e51111.
- Natali AJ, Turner DL, Harrison SM, White E (2001) Regional effects of voluntary exercise on cell size and contraction-frequency responses in rat cardiac myocytes. *J Exp Biol*, 204(Pt 6):1191-1199.
- Nielsen S, Åkerström T, Rinnov A, Yfanti C, Scheele C, Pedersen BK, Laye MJ (2014) The miRNA plasma signature in response to acute aerobic exercise and endurance training. *PLoS One*, 9(2):e87308.
- Nilsen TW (2007) Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *Trends Genet*, 23(5):243-249.
- Oka T, Akazawa H, Naito AT, Komuro I (2014) Angiogenesis and cardiac hypertrophy: maintenance of cardiac function and causative roles in heart failure. *Circ Res*, 114(3):565-571.
- Paganini-Hill A, Kawas CH, Corrada MM (2015) Antioxidant vitamin intake and mortality: the Leisure World Cohort Study. *Am J Epidemiol*, 181(2):120-126.
- Pagé EL, Chan DA, Giaccia AJ, Levine M, Richard DE (2008) Hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization in nonhypoxic conditions: role of oxidation and intracellular ascorbate depletion. *Mol Biol Cell*, 19(1):86-94.
- Patrick DM, Montgomery RL, Qi X, Obad S, Kauppinen S, Hill JA, van Rooij E, Olson EN (2010) Stress-dependent cardiac remodeling occurs in the absence of microRNA-21 in mice. *J Clin Invest*, 120(11):3912-3916.
- Patten DA, Lafleur VN, Robitaille GA, Chan DA, Giaccia AJ, Richard DE (2010) Hypoxia-inducible factor-1 activation in nonhypoxic conditions: the essential role of mitochondrial-derived reactive oxygen species. *Mol Biol Cell*, 21(18):3247-3257.
- Patten RD, Hall-Porter MR (2009) Small animal models of heart failure: development of novel therapies, past and present. *Circ Heart Fail*, 2(2):138-144.
- Pimentel DR, Amin JK, Xiao L, Miller T, Viereck J, Oliver-Krasinski J, Baliga R, Wang J, Siwik DA, Singh K *et al* (2001) Reactive oxygen species mediate amplitude-dependent hypertrophic and apoptotic responses to mechanical stretch in cardiac myocytes. *Circ Res*, 89(5):453-460.
- Powers SK, Jackson MJ (2008) Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev*, 88(4):1243-1276.
- Powers SK, Talbert EE, Adihetty PJ (2011) Reactive oxygen and nitrogen species as intracellular signals in skeletal muscle. *J Physiol*, 589(Pt 9):2129-2138.

- Qin F, Lennon-Edwards S, Lancel S, Biolo A, Siwik DA, Pimentel DR, Dorn GW, Kang YJ, Colucci WS (2010) Cardiac-specific overexpression of catalase identifies hydrogen peroxide-dependent and -independent phases of myocardial remodeling and prevents the progression to overt heart failure in G(alpha)q-overexpressing transgenic mice. *Circ Heart Fail*, 3(2):306-313.
- Qing M, Quing M, Görlach A, Schumacher K, Wöltje M, Vazquez-Jimenez JF, Hess J, Seghaye MC (2007) The hypoxia-inducible factor HIF-1 promotes intramyocardial expression of VEGF in infants with congenital cardiac defects. *Basic Res Cardiol*, 102(3):224-232.
- Rimbach G, Moehring J, Huebbe P, Lodge JK (2010) Gene-regulatory activity of alpha-tocopherol. *Molecules*, 15(3):1746-1761.
- Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Klötting N, Birringer M, Kiehntopf M, Stumvoll M, Kahn CR, Blüher M (2009) Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(21):8665-8670.
- Roy S, Khanna S, Hussain SR, Biswas S, Azad A, Rink C, Gnyawali S, Shilo S, Nuovo GJ, Sen CK (2009) MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue. *Cardiovasc Res*, 82(1):21-29.
- Roy S, Sen CK (2012) miRNA in wound inflammation and angiogenesis. *Microcirculation*, 19(3):224-232.
- Sabri A, Hughie HH, Lucchesi PA (2003) Regulation of hypertrophic and apoptotic signaling pathways by reactive oxygen species in cardiac myocytes. *Antioxid Redox Signal*, 5(6):731-740.
- Sam F, Kerstetter DL, Pimental DR, Mulukutla S, Tabaei A, Bristow MR, Colucci WS, Sawyer DB (2005) Increased reactive oxygen species production and functional alterations in antioxidant enzymes in human failing myocardium. *J Card Fail*, 11(6):473-480.
- Sano M, Minamino T, Toko H, Miyauchi H, Orimo M, Qin Y, Akazawa H, Tateno K, Kayama Y, Harada M *et al* (2007) p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. *Nature*, 446(7134):444-448.
- Sayed D, Hong C, Chen IY, Lypowy J, Abdellatif M (2007) MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circ Res*, 100(3):416-424.
- Schmelter M, Ateghang B, Helmig S, Wartenberg M, Sauer H (2006) Embryonic stem cells utilize reactive oxygen species as transducers of mechanical strain-induced cardiovascular differentiation. *FASEB J*, 20(8):1182-1184.
- Semenza GL (2009) Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology (Bethesda)*, 24:97-106.
- Semenza GL (2009) Regulation of vascularization by hypoxia-inducible factor 1. *Ann N Y Acad Sci*, 1177:2-8.
- Semenza GL (2007) Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: mechanisms of blood vessel formation and remodeling. *J Cell Biochem*, 102(4):840-847.
- Sesso HD, Buring JE, Christen WG, Kurth T, Belanger C, MacFadyen J, Bubes V, Manson JE, Glynn RJ, Gaziano JM (2008) Vitamins E and C in the prevention of cardiovascular disease in men: the Physicians' Health Study II randomized controlled trial. *JAMA*, 300(18):2123-2133.
- Shieh JT, Huang Y, Gilmore J, Srivastava D (2011) Elevated miR-499 levels blunt the cardiac stress response. *PLoS One*, 6(5):e19481.
- Shilo S, Roy S, Khanna S, Sen CK (2008) Evidence for the involvement of miRNA in redox regulated angiogenic response of human microvascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28(3):471-477.
- Shiojima I, Sato K, Izumiya Y, Schiekofer S, Ito M, Liao R, Colucci WS, Walsh K (2005) Disruption of coordinated cardiac hypertrophy and angiogenesis contributes to the transition to heart failure. *J Clin Invest*, 115(8):2108-2118.
- Shohet RV, Garcia JA (2007) Keeping the engine primed: HIF factors as key regulators of cardiac metabolism and angiogenesis during ischemia. *J Mol Med (Berl)*, 85(12):1309-1315.

- Shyu KG, Wang MT, Wang BW, Chang CC, Leu JG, Kuan P, Chang H (2002) Intramyocardial injection of naked DNA encoding HIF-1 $\alpha$ /VP16 hybrid to enhance angiogenesis in an acute myocardial infarction model in the rat. *Cardiovasc Res*, 54(3):576-583.
- Silva LA, Pinho CA, Scarabelot KS, Fraga DB, Volpato AM, Boeck CR, De Souza CT, Streck EL, Pinho RA (2009) Physical exercise increases mitochondrial function and reduces oxidative damage in skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol*, 105(6):861-867.
- Silva LA, Tromm C, da Rosa GL, Gonçalves CL, Pinho CA, De Souza CT, Streck EL, Pinho RA (2011) Interval training does not decrease oxidative stress in the heart of mice. *Int J Cardiol*, 147(2):308-309.
- Singh N, Dhalla AK, Seneviratne C, Singal PK (1995) Oxidative stress and heart failure. *Mol Cell Biochem*, 147(1-2):77-81.
- Smith TG, Robbins PA, Ratcliffe PJ (2008) The human side of hypoxia-inducible factor. *Br J Haematol*, 141(3):325-334.
- Soffe Z, Radley-Crabb HG, McMahon C, Grounds MD, Shavlakadze T (2015) Effects of loaded voluntary wheel exercise on performance and muscle hypertrophy in young and old male C57Bl/6J mice. *Scand J Med Sci Sports*.
- Suh JH, Choi E, Cha MJ, Song BW, Ham O, Lee SY, Yoon C, Lee CY, Park JH, Lee SH *et al* (2012) Up-regulation of miR-26a promotes apoptosis of hypoxic rat neonatal cardiomyocytes by repressing GSK-3 $\beta$  protein expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 423(2):404-410.
- Takano H, Zou Y, Hasegawa H, Akazawa H, Nagai T, Komuro I (2003) Oxidative stress-induced signal transduction pathways in cardiac myocytes: involvement of ROS in heart diseases. *Antioxid Redox Signal*, 5(6):789-794.
- Takimoto E, Kass DA (2007) Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. *Hypertension*, 49(2):241-248.
- Tang Y, Wang Y, Park KM, Hu Q, Teoh JP, Broskova Z, Ranganathan P, Jayakumar C, Li J, Su H *et al* (2015) MicroRNA-150 protects the mouse heart from ischaemic injury by regulating cell death. *Cardiovasc Res*, 106(3):387-397.
- Tao L, Bei Y, Zhang H, Xiao J, Li X (2015) Exercise for the heart: signaling pathways. *Oncotarget*, 6(25):20773-20784.
- Tatsuguchi M, Seok HY, Callis TE, Thomson JM, Chen JF, Newman M, Rojas M, Hammond SM, Wang DZ (2007) Expression of microRNAs is dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*, 42(6):1137-1141.
- Tham YK, Bernardo BC, Ooi JY, Weeks KL, McMullen JR (2015) Pathophysiology of cardiac hypertrophy and heart failure: signaling pathways and novel therapeutic targets. *Arch Toxicol*, 89(9):1401-1438.
- Thum T, Galuppo P, Wolf C, Fiedler J, Kneitz S, van Laake LW, Doevendans PA, Mummery CL, Borlak J, Haverich A *et al* (2007) MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation*, 116(3):258-267.
- Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S *et al* (2008) MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature*, 456(7224):980-984.
- Toischer K, Rokita AG, Unsöld B, Zhu W, Kararigas G, Sossalla S, Reuter SP, Becker A, Teucher N, Seidler T *et al* (2010) Differential cardiac remodeling in preload versus afterload. *Circulation*, 122(10):993-1003.
- Tonevitsky AG, Maltseva DV, Abbasi A, Samatov TR, Sakharov DA, Shkurnikov MU, Lebedev AE, Galatenko VV, Grigoriev AI, Northoff H (2013) Dynamically regulated miRNA-mRNA networks revealed by exercise. *BMC Physiol*, 13:9.
- Tormos KV, Chandel NS (2010) Inter-connection between mitochondria and HIFs. *J Cell Mol Med*, 14(4):795-804.
- Traber MG, Stevens JF (2011) Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radic Biol Med*, 51(5):1000-1013.

- van Berlo JH, Maillet M, Molkenin JD (2013) Signaling effectors underlying pathologic growth and remodeling of the heart. *J Clin Invest*, 123(1):37-45.
- van Nierop BJ, van Assen HC, van Deel ED, Niesen LB, Duncker DJ, Strijkers GJ, Nicolay K (2013) Phenotyping of left and right ventricular function in mouse models of compensated hypertrophy and heart failure with cardiac MRI. *PLoS One*, 8(2):e55424.
- van Rooij E, Quiat D, Johnson BA, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Kelm RJ, Olson EN (2009) A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Dev Cell*, 17(5):662-673.
- van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, Richardson JA, Olson EN (2006) 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.
- van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN (2007) Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*, 316(5824):575-579.
- Venditti P, Napolitano G, Barone D, Di Meo S (2014) Vitamin E supplementation modifies adaptive responses to training in rat skeletal muscle. *Free Radic Res*, 48(10):1179-1189.
- Wagner KH, Reichhold S, Neubauer O (2011) Impact of endurance and ultraendurance exercise on DNA damage. *Ann N Y Acad Sci*, 1229:115-123.
- Walsh K, Shiojima I (2007) Cardiac growth and angiogenesis coordinated by intertissue interactions. *J Clin Invest*, 117(11):3176-3179.
- Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, Li Q, Li Y, He J, Qin YW, Jing Q (2010) Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J*, 31(6):659-666.
- Wang J, Jia Z, Zhang C, Sun M, Wang W, Chen P, Ma K, Zhang Y, Li X, Zhou C (2014) miR-499 protects cardiomyocytes from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis via its effects on Pcd4 and Pacs2. *RNA Biol*, 11(4):339-350.
- Wang JX, Jiao JQ, Li Q, Long B, Wang K, Liu JP, Li YR, Li PF (2011) miR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1. *Nat Med*, 17(1):71-78.
- Wang X, Li C, Dai Q (2015) Down-regulation of microRNA-26b rescued hypoxia-induced apoptosis in cultured neonatal rat cardiac myocytes by regulating PTEN. *Int J Clin Exp Med*, 8(3):4073-4079.
- Wang Y, Wisloff U, Kemi OJ (2010) Animal models in the study of exercise-induced cardiac hypertrophy. *Physiol Res*, 59(5):633-644.
- Wardle SL, Bailey ME, Kilikevicius A, Malkova D, Wilson RH, Venckunas T, Moran CN (2015) Plasma microRNA levels differ between endurance and strength athletes. *PLoS One*, 10(4):e0122107.
- Weeks KL, McMullen JR (2011) The athlete's heart vs. the failing heart: can signaling explain the two distinct outcomes? *Physiology (Bethesda)*, 26(2):97-105.
- Weidinger A, Kozlov AV (2015) Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. *Biomolecules*, 5(2):472-484.
- Xiao L, Pimentel DR, Wang J, Singh K, Colucci WS, Sawyer DB (2002) Role of reactive oxygen species and NAD(P)H oxidase in alpha(1)-adrenoceptor signaling in adult rat cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 282(4):C926-934.
- Yin C, Wang X, Kukreja RC (2008) Endogenous microRNAs induced by heat-shock reduce myocardial infarction following ischemia-reperfusion in mice. *FEBS Lett*, 582(30):4137-4142.
- Yu BP (1994) Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*, 74(1):139-162.
- Zhang Y, Liu D, Chen X, Li J, Li L, Bian Z, Sun F, Lu J, Yin Y, Cai X *et al* (2010) Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol Cell*, 39(1):133-144.

- Zhang ZH, Li J, Liu BR, Luo CF, Dong Q, Zhao LN, Zhong Y, Chen WY, Chen MS, Liu SM (2013) MicroRNA-26 was decreased in rat cardiac hypertrophy model and may be a promising therapeutic target. *J Cardiovasc Pharmacol*, 62(3):312-319.
- Zidar N, Boštjančič E, Glavač D, Stajer D (2011) MicroRNAs, innate immunity and ventricular rupture in human myocardial infarction. *Dis Markers*, 31(5):259-265.
- Zolk O, Solbach TF, Eschenhagen T, Weidemann A, Fromm MF (2008) Activation of negative regulators of the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway in human end-stage heart failure. *Biochem Biophys Res Commun*, 376(2):315-320.



## **ANEXOS**

## MATERIAL SUPLEMENTAR ARTIGO 1

### SUPPLEMENTARY MATERIAL

#### Supplementary Methods

**Model of Physiological Hypertrophy** – Physiological hypertrophy was induced by a standard protocol of voluntary exercise for 35 days, as previously described<sup>1-4</sup>. In brief, animals were placed in cages with metal training wheels (with diameters of 12 cm) where they could perform voluntary exercise. EX and EX+VIT mice were allowed free access to the wheel 24 h/day. Total exercise time, distance, and average speed were monitored daily by odometers installed in each cage (Cateye, JP). These measures were reviewed and recorded by a blind investigator every day during the protocol. SED and SED+VIT mice were housed in standard cages without training wheels.

**Maximal Exercise Test** – Individual maximal exercise capacity was performed using a rodent treadmill without inclination (Space Saver TreadmillH, US) as previously described<sup>2, 5</sup>. Briefly, mice were familiarized with the treadmill for 5 minutes. For tests, the treadmill was set at initial speed of 15 m/min and was increase by 3 m/min every 2 minutes until 45 m/min or exhaustion. Time was recorded and then converted to distance. Blind researchers performed exercise tests.

**Euthanasia protocol** – For acute and chronic evaluations, animals were euthanized in equal number at two moments: 7 and 35 days after the start of protocol. The mice were anesthetized with a mixture of ketamine and xylazine (100mg/kg and 10mg/kg respectively). The animals were weighted and had the heart quickly removed and left ventricle (LV) was isolated. Medial LV was fixed in 10% buffered formalin, apical and basal LV regions are divided and separated in RNA *later* (Qiagen, US) or snap-frozen in liquid nitrogen and both were store at  $-80^{\circ}\text{C}$  until molecular analyses. Cardiac hypertrophy was determined as the ratio between LV weight and body weight (LVW/BW).

**Histological and immunohistochemistry analyses** – In order to examine the cellular hypertrophy, LV samples were formalin-fixed, embedded with paraffin, sectioned at 4  $\mu\text{m}$  thickness and hematoxylin and eosin stained<sup>6</sup>. Ten random

microscopic fields were photographed using Q Capture Pro Software v.5.1.1.14 at 400-fold magnification (Q Imaging Co., CA). Only transversal cut myocyte with central nucleus were measured and the cross-section area was determined by numbers of pixels using Adobe Photoshop CS2 v.9.0 software (Adobe Systems Incorporated, US). A minimum of 53 and a maximum of 100 cells were analyzed from each heart (n=5 per group). Data will be presented as a percentage in relation to the SED group in each time.

In order to estimate angiogenesis, the sections were incubated with rat anti-mouse CD31 (PECAM-1) monoclonal antibody (BD Pharmingen, US; material code 550274) followed by incubation with the anti-rat antibody (Sigma-Aldrich, US; material code B7139). To development of the chromogen reaction, the sections were incubated with streptavidin-HRP (Dako, DK) followed by incubation with 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Biocare Medical, US). Negative controls were incubated with TBS buffer. The vessels were quantified by manual counting under light microscopy. Capillary density was determined by counting capillaries obtained in 10 random microscopic fields for each mouse (n=5 per group). Only small capillaries near to cardiomyocytes were counted, medium and large vessels or arteriole were disregarded <sup>7</sup>. Data will be presented as a percentage in relation to the SED group in each time.

Blinded investigator measured histological parameters.

### **Molecular analyses**

*RNA extraction* – Total RNA and miRs were isolated from 30 mg of LV using miRNeasy mini kit (Qiagen, US), according to the manufacturer's instructions. After extraction, 50 pM of synthetic microRNA-39 from *Caenorhabditis elegans* (cel-miR-39, Qiagen, US) was added to each sample as a standard control for quantitative real time PCR (qRT-PCR), as previously recommended and validated <sup>8, 9</sup>. Concentration of RNA samples was assessed using the NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, US).

*Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)* – qRT-PCR was conducted for miRs that had been previously described to be involved in cardiac hypertrophy (miR-21) and angiogenesis (miR-210). Additionally, we investigated miR-150 that was significantly altered in other study in our research group <sup>2</sup>. The reverse transcription (RT) reactions were run in a Veriti 96-Well Thermal Cycler with a miR Reverse Transcription Kit, according to the manufacturer's instructions

(Applied Biosystems Inc., US). MiR-39, -21, -150, -210 qRT-PCR reactions were run in triplicate using the TaqMan miR Expression Assays probes (assays number TM000200, TM000397, TM000473, TM000512, respectively) in a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Inc., US).

Gene expression was measured for genes that are responsible for angiogenesis, namely HIF-1 $\alpha$  and VEGF (assays number Mm01283760\_m1\* and Mm01281449\_m1\*, respectively). First-strand cDNA samples were synthesized from total RNA using a High Capacity cDNA Reverse Transcription kit run in a Veriti 96-Well Thermal Cycler, according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems Inc., US). qRT-PCR were performed in 7500 Real-Time PCR System, using Taqman gene expression assays (Applied Biosystems Inc, US), following the manufacturer's instructions. Gene expressions were normalized for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH; assay number 4352339E).

The relative expression of each miR and gene was calculated with the comparative threshold cycle ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) method <sup>10</sup>. All qRT-PCR data were use SED group as reference group.

#### **Computational prediction and functional annotation of miR targets –**

Target prediction analysis was carried out with TargetScan (release 6.2, accessed March 2015) <sup>11</sup> to identify genes potentially modulated by the activity of miRs of interest. Additionally, experimentally validated miR targets were retrieved from miRTarBase (release 4.5, accessed March 2015) <sup>12</sup>, which contains a large collection of miR-target interactions validated in functional studies of miRs. Next, gene-annotation enrichment analysis was performed for the list of putative target genes collected from both resources. Enrichment for pathways maps from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) <sup>13</sup> was investigated with DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) resource v6.7 <sup>14</sup>, using the '*functional annotation chart*' tool with default parameters.

**Statistical analysis –** Data are expressed as mean and standard error. Student's t-test was used for comparison between EX and EX+VIT groups on exercise measurements. For exercise capacity test was performed repeated measures ANOVA followed by Bonferroni correction. Comparisons among groups were performed by using ANOVA followed by Tukey *post-hoc* or

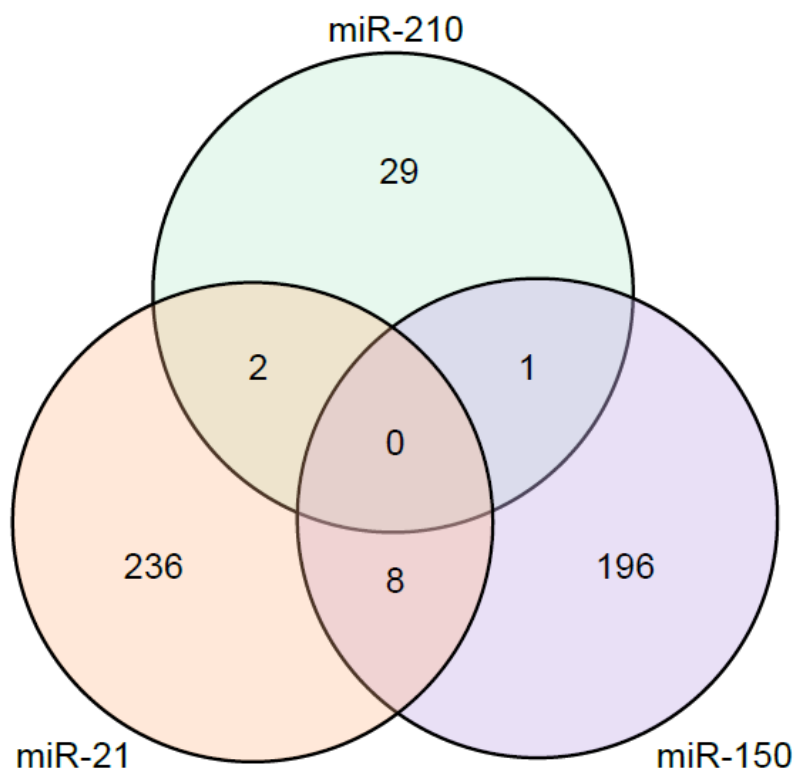
Kruskal-Wallis followed by Dunn's *post-hoc* as appropriated. The level of significance was set at 5%. The softwares used for analysis of the data were SPSS version 17 and Prism 5 (GraphPad Software Inc., US). Significance for KEGG pathways enrichment was estimated with DAVID's EASE score <sup>14</sup>, computed based on a modified Fisher's exact test, and adjusted with Benjamini multiple testing correction. Pathways with a minimum count of 2 query genes and a *p*-value < 0.1 were considered enriched for miR targets.

## Supplementary Figures

**Figure S1.** Venn Diagram depicting the exact number of target genes shared among different miRs. As we may observe, none of the predicted targets is shared by all three miRs and few genes are targeted by two or more miRs.

**Table S1.** List of predicted and experimentally validated targets for miR-150, miR-21 and miR-210. Predicted targets were obtained with TargetScan algorithm and experimentally verified targets were retrieved from miRTarBase. (XLSX)

**Table S2.** Pathway enrichment analysis performed with DAVID resource for the list of putative target genes found for our group of miRs. P-values were determined by DAVID's EASE score, a modified Fisher's exact test, followed by Benjamini multiple test correction. All pathways with p-value < 0.1 are shown in the table (DAVID default cutoff). Pathways with adjusted p-value < 0.05 are shown in boldface. (XLSX)



## Supplementary References

1. Allen DL, Harrison BC, Maass A, Bell ML, Byrnes WC, Leinwand LA. Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. *J Appl Physiol (1985)* 2001;**90**:1900-1908.
2. Martinelli NC, Cohen CR, Santos KG, Castro MA, Biolo A, Frick L, Silvello D, Lopes A, Schneider S, Andrades ME, Clausell N, Matte U, Rohde LE. An analysis of the global expression of microRNAs in an experimental model of physiological left ventricular hypertrophy. *PLoS One* 2014;**9**:e93271.
3. Natali AJ, Turner DL, Harrison SM, White E. Regional effects of voluntary exercise on cell size and contraction-frequency responses in rat cardiac myocytes. *J Exp Biol* 2001;**204**:1191-1199.
4. Soffe Z, Radley-Crabb HG, McMahan C, Grounds MD, Shavlakadze T. Effects of loaded voluntary wheel exercise on performance and muscle hypertrophy in young and old male C57Bl/6J mice. *Scand J Med Sci Sports* 2015.
5. Biolo A, Greferath R, Siwik DA, Qin F, Valsky E, Fylaktakidou KC, Pothukanuri S, Duarte CD, Schwarz RP, Lehn JM, Nicolau C, Colucci WS. Enhanced exercise capacity in mice with severe heart failure treated with an allosteric effector of hemoglobin, myo-inositol trispyrophosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;**106**:1926-1929.
6. Kato R, Nomura A, Sakamoto A, Yasuda Y, Amatani K, Nagai S, Sem Y, Ijiri Y, Okada Y, Yamaguchi T, Izumi Y, Yoshiyama M, Tanaka K, Hayashi T. Hydrogen gas attenuates embryonic gene expression and prevents left ventricular remodeling induced by intermittent hypoxia in cardiomyopathic hamsters. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2014;**307**:H1626-1633.
7. Zhu Z, Zhong H, Zhou Q, Hu X, Chen D, Wang J, Wu J, Cai J, Zhou S, Chen AF. Inhibition of PKR impairs angiogenesis through a VEGF pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2015;**308**:E518-524.
8. McDonald JS, Milosevic D, Reddi HV, Grebe SK, Algeciras-Schimnich A. Analysis of circulating microRNA: preanalytical and analytical challenges. *Clin Chem* 2011;**57**:833-840.
9. Sourvinou IS, Markou A, Lianidou ES. Quantification of circulating miRNAs in plasma: effect of preanalytical and analytical parameters on their isolation and stability. *J Mol Diagn* 2013;**15**:827-834.
10. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;**25**:402-408.
11. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005;**120**:15-20.
12. Hsu SD, Tseng YT, Shrestha S, Lin YL, Khaleel A, Chou CH, Chu CF, Huang HY, Lin CM, Ho SY, Jian Ty, Lin FM, Chang TH, Weng SL, Liao KW, Liao IE, Liu CC, Huang HD. miRTarBase update 2014: an information resource for experimentally validated miRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res* 2014;**42**:D78-85.
13. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 2000;**28**:27-30.



14. Huang dW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 2009;4:44-57.

## MATERIAL SUPPLEMENTAR ARTIGO 2

### SUPPLEMENTARY MATERIAL

**Table S1.** Mice data for heart and body weight.

**Table S2.** List of predicted and experimentally validated targets for miR-21, miR-26b, miR-150, miR-210 and miR-499. Predicted targets were obtained with TargetScan algorithm and experimentally verified targets were retrieved from miRTarBase. (XLSX)

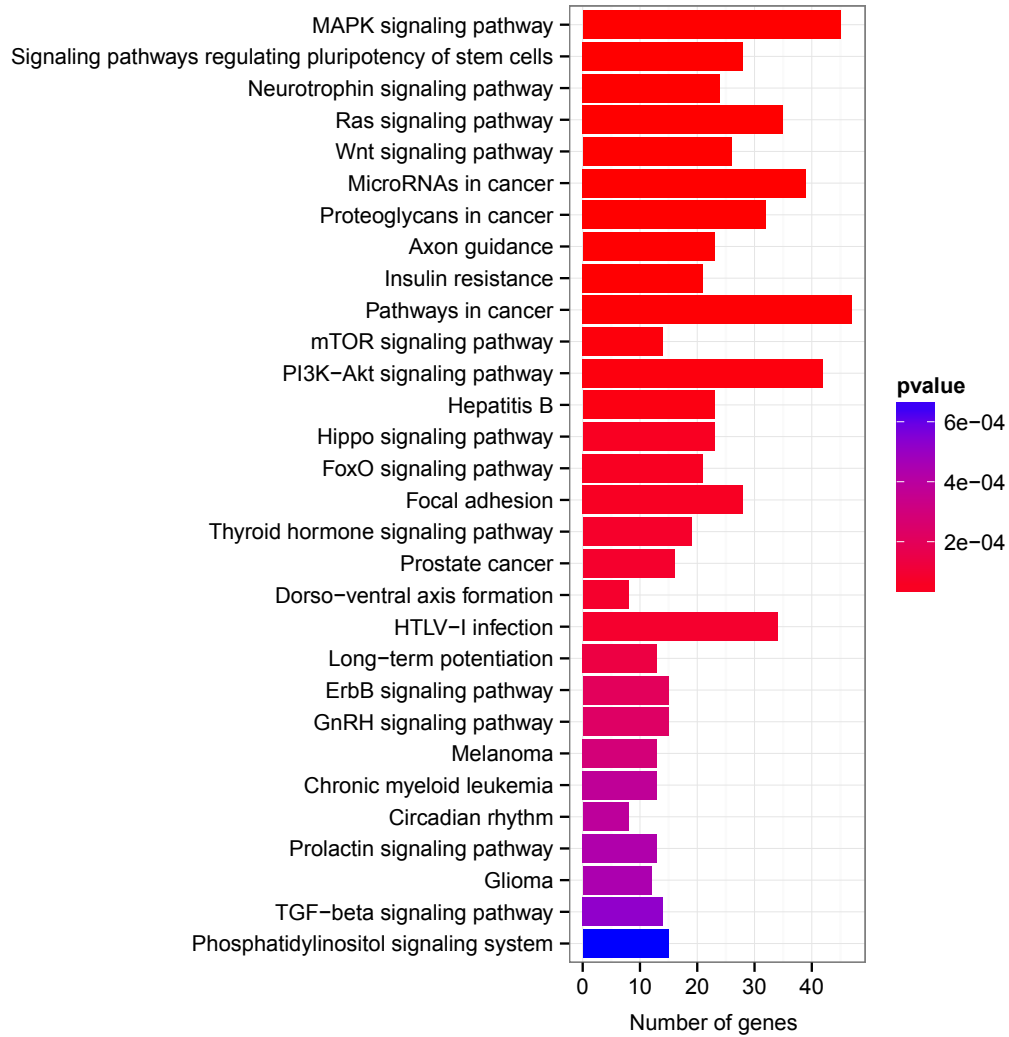
**Table S3.** Pathway enrichment analysis performed with the clusterProfiler R package and annotation terms from KEGG database. (XLSX)

**Figure S1. Bioinformatics analyses** Top 30 KEGG pathways enriched for the genes targeted by miR-21, -210, -150, 26b and -499.

	7 days				35 days			
	SHAM	TAC	SHAM+VIT	TAC+VIT	SHAM	TAC	SHAM+VIT	TAC+VIT
BW (g)	27 ± 0.6	26 ± 0.4	27 ± 0.9	28 ± 0.6	28 ± 0.6	28 ± 0.5	31 ± 0.6	32 ± 0.7 *
HW (mg)	124 ± 3	142 ± 3 <sup>a</sup>	119 ± 4	146 ± 6 <sup>b</sup>	133 ± 3	175 ± 7 <sup>a</sup>	141 ± 3	177 ± 5 <sup>b</sup>
LV (mg)	87 ± 2	104 ± 2 <sup>a</sup>	84 ± 3	107 ± 5 <sup>b</sup>	95 ± 2	131 ± 5 <sup>a</sup>	102 ± 3	133 ± 4 <sup>b</sup>
RV (mg)	24 ± 0.7	22 ± 0.7	22 ± 1.3	23 ± 1.1	25 ± 0.8	25 ± 1.0	24 ± 0.6	25 ± 0.7
HW/BW (mg/g)	4.6 ± 0.05	5.4 ± 0.09 <sup>a</sup>	4.5 ± 0.1	5.2 ± 0.2 <sup>b</sup>	4.7 ± 0.05	6.2 ± 0.3 <sup>a</sup>	4.6 ± 0.09	5.6 ± 0.2 <sup>b</sup>
LVW/BW (mg/g)	3.2 ± 0.04	3.9 ± 0.07 <sup>a</sup>	3.1 ± 0.08	3.8 ± 0.2 <sup>b</sup>	3.3 ± 0.04	4.6 ± 0.2 <sup>a</sup>	3.3 ± 0.05	4.2 ± 0.2 <sup>b</sup>
LVW/TL (mg/mm)	5.3 ± 0.1	6.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	5.0 ± 0.2	6.4 ± 0.3 <sup>b</sup>	5.9 ± 0.1	7.9 ± 0.2 <sup>a</sup>	5.9 ± 0.2	7.8 ± 0.3 <sup>b</sup>

BW – body weight; HW – heart weight; LV – left ventricle; RV – right ventricle; TL – tibial length. Values are means ± SEM; N per group= 11 – 17 mice on each time; \*  $p < 0.05$  comparing TAC and TAC+VIT groups on each time; <sup>a</sup>  $p < 0.05$  comparing SHAM and TAC groups on each time; <sup>b</sup>  $p < 0.05$  comparing SHAM+VIT and TAC+VIT groups on each time.

FIGURE S1



## FIGURAS ANEXAS DA DISCUSSÃO

**Figura Anexa 1 – Design experimental simplificado.**

**Figura Anexa 2 – Comparação de hipertrofia do VE entre os modelos fisiológico e patológico em 7 e 35 dias.** Valores da razão do peso do VE/peso corporal comparados por ANOVA seguido de Tukey *post-hoc* e apresentados com média ± erro padrão; N por grupo 12-17 em cada tempo; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$ ; SED animais sedentários; EX animais exercitados; TAC animais com bandejamento aórtico.

**Figura Anexa 3 – Comparação de expressão relativa de genes angiogênicos. A,B** expressão do gene HIF-1 $\alpha$  em 7 e 35 dias, respectivamente **C,D** expressão do gene VEGF em 7 e 35 dias, respectivamente; Dados normalizados para o gene GAPDH, utilizando com o grupo controle SED; Valores de expressão relativa comparados por ANOVA seguido de Tukey *post-hoc* e apresentados com média ± erro padrão; N por grupo 12-17 em cada tempo; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$ ; SED animais sedentários; EX animais exercitados; TAC animais com bandejamento aórtico.

**Figura Anexa 4 – Comparação de expressão relativa de microRNAs. A,B** expressão do miR-21 em 7 e 35 dias, respectivamente **C,D** expressão do miR-150 em 7 e 35 dias, respectivamente; **E,F** expressão do miR-210 em 7 e 35 dias, respectivamente. Dados normalizados para o cel-miR-39, utilizando com grupo o controle SED; Valores de expressão relativa comparados por ANOVA seguido de Tukey *post-hoc* e apresentados com média ± erro padrão; N por grupo 12-17 em cada tempo; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$ ; SED animais sedentários; EX animais exercitados; TAC animais com bandejamento aórtico.

Figura Anexa 1

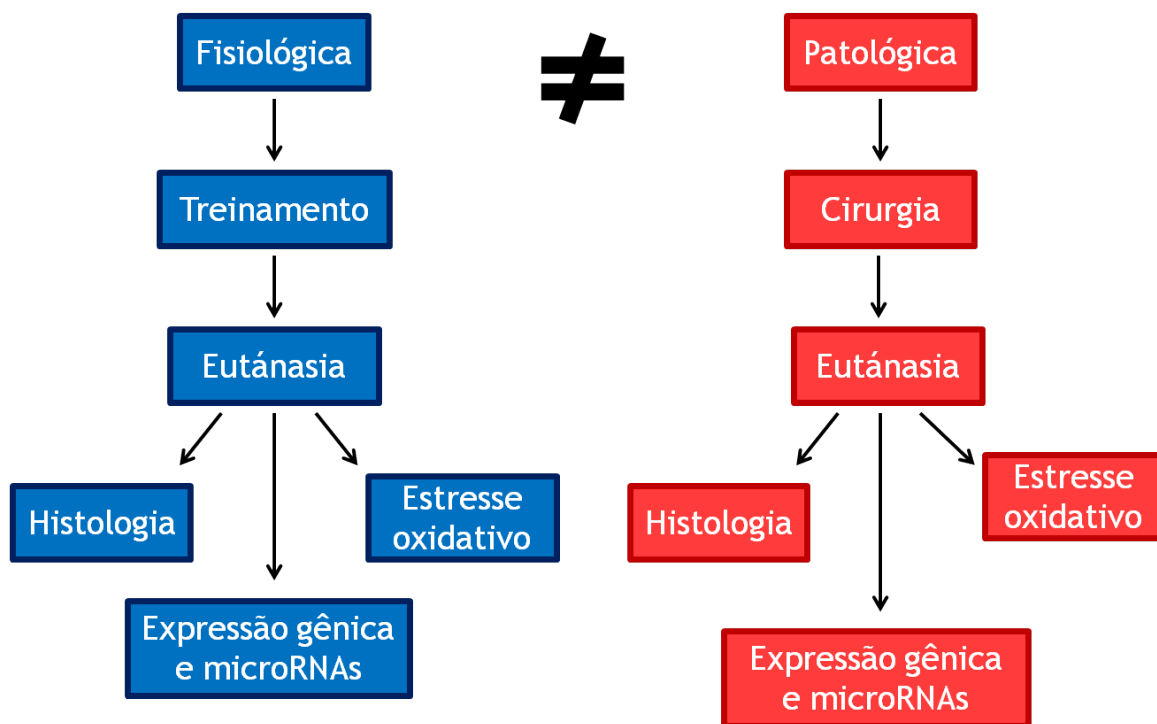


Figura Anexa 2

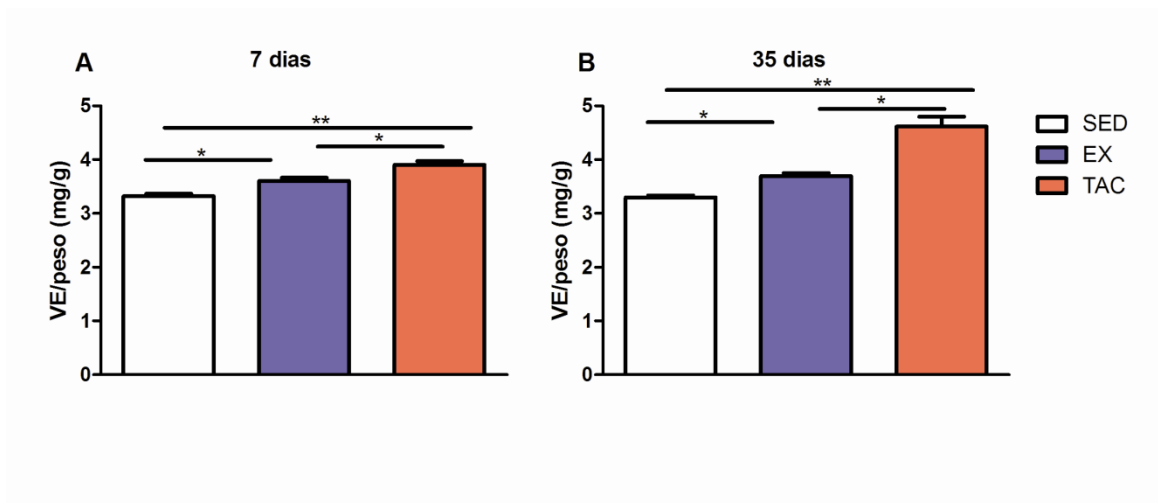


Figura Anexa 3

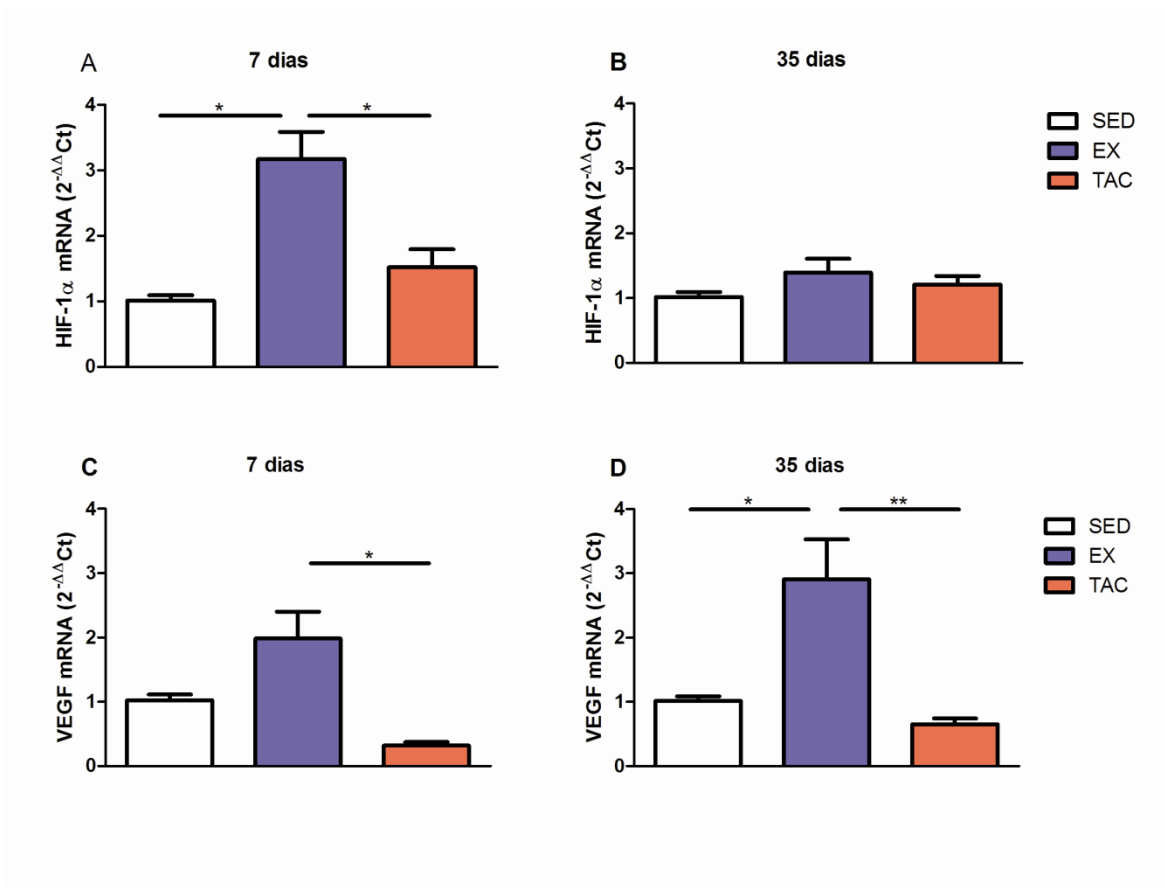
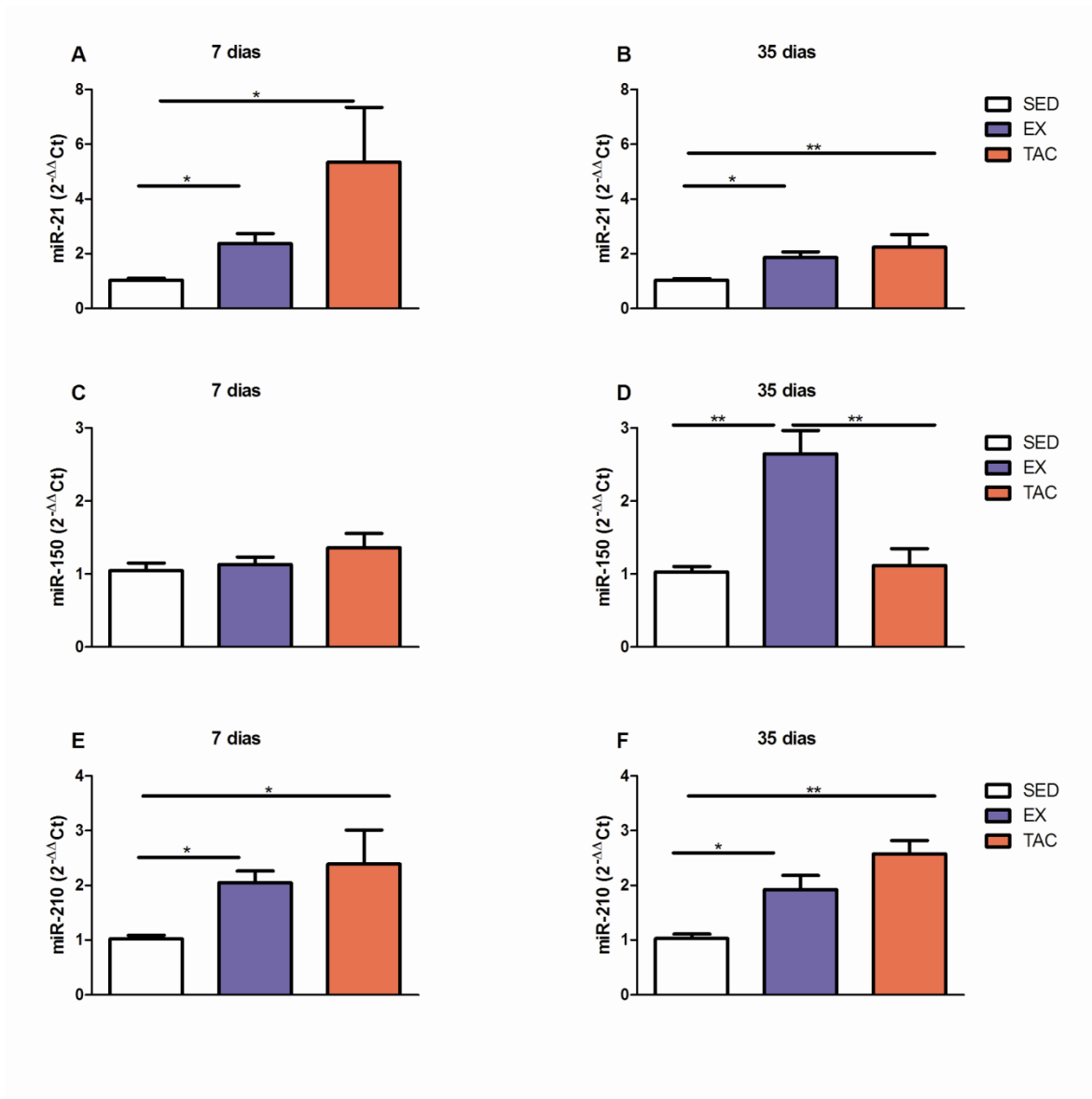




Figura Anexa 4



**Figura Anexa 5**

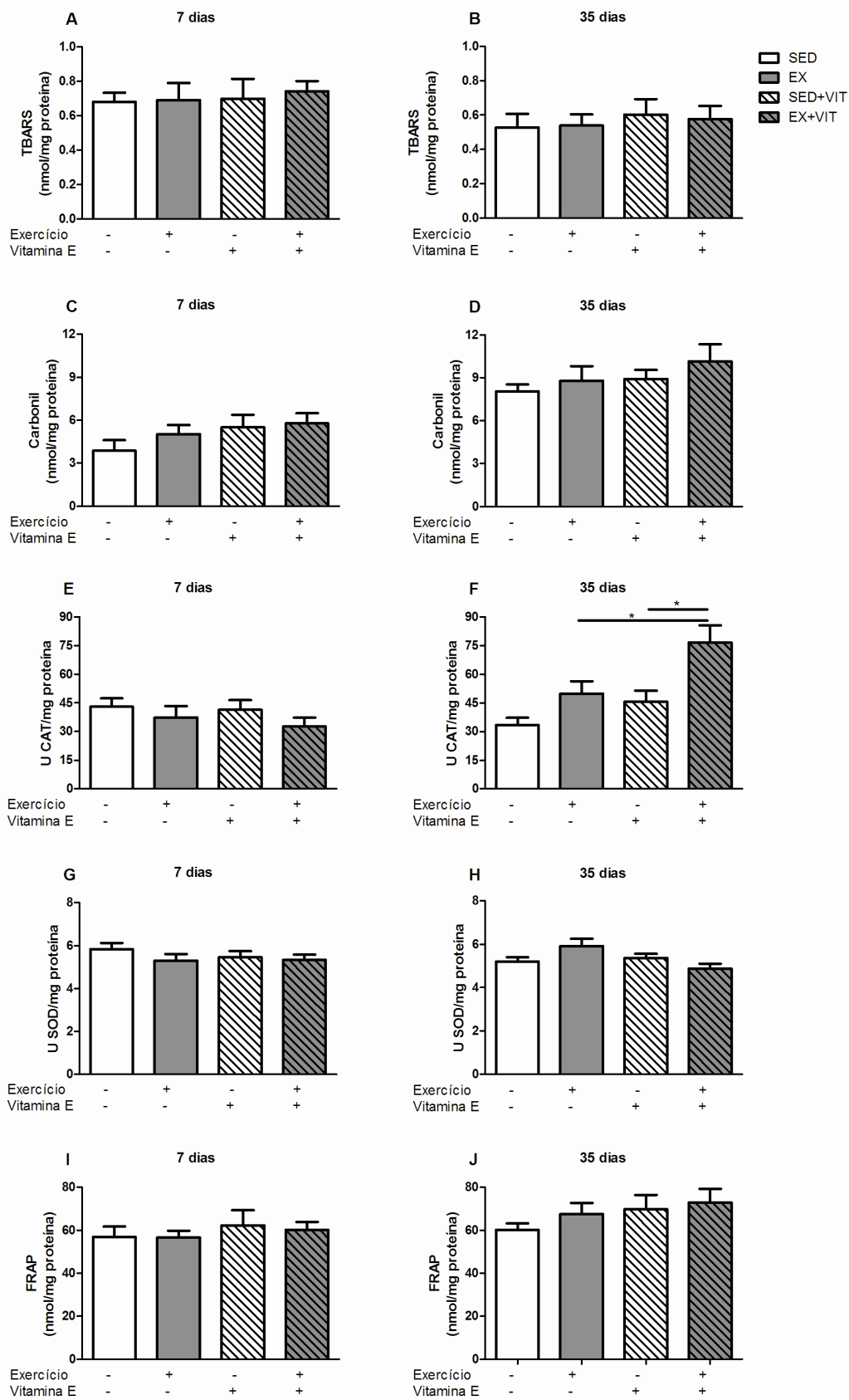
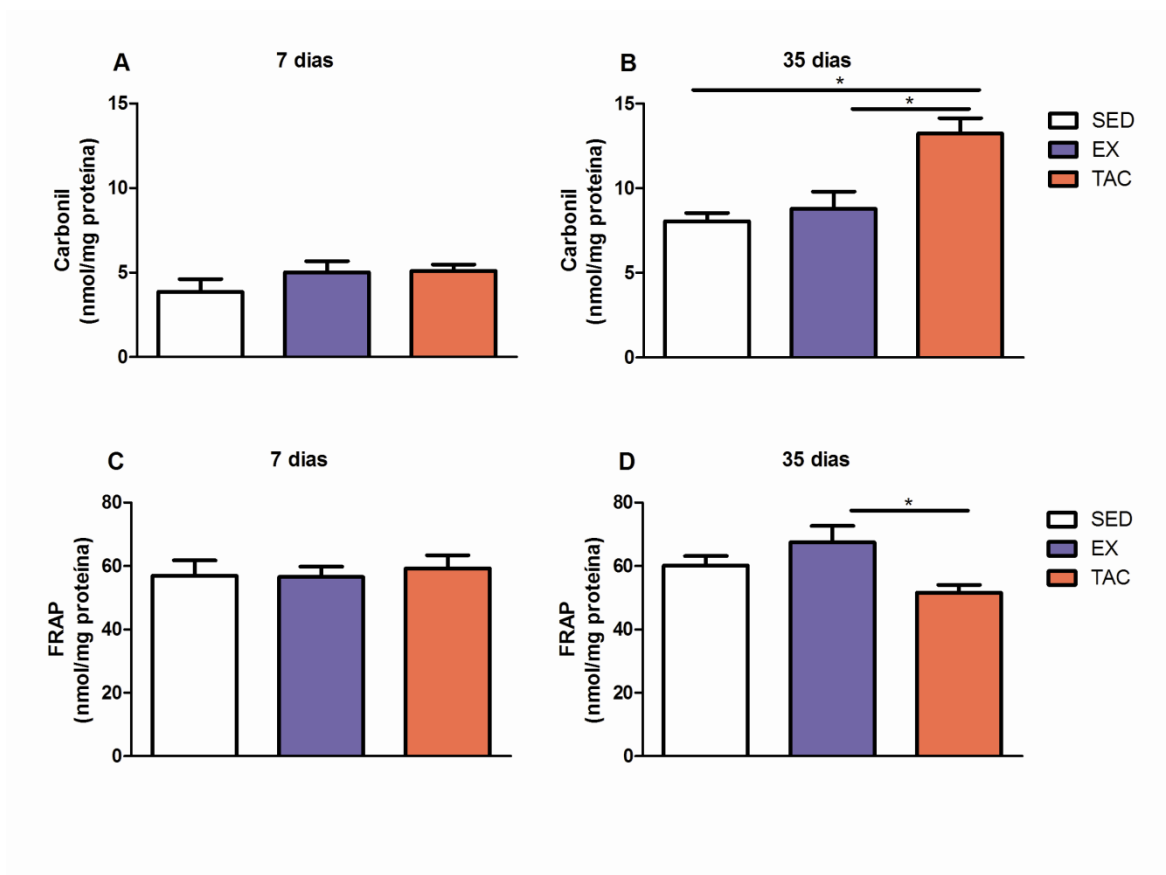


Figura Anexa 6



## APROVAÇÃO ÉTICA



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

A Comissão Científica e a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisaram o projeto:

**Projeto:** 110470

**Data da Versão do Projeto:** 05/09/2011

**Pesquisadores:**

ANDREIA BIOLO

NIDIANE CARLA MARTINELLI


CAROLINA RODRIGUES COHEN

**Título:** Papel dos MicroRNAs na Hipertrofia Cardíaca Fisiológica: Avaliação da Modulação por Espécies Reativas do Oxigênio

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEP/HCPA.

Porto Alegre, 04 de novembro de 2011.



Dr. Alessandro Bersch Osvaldt  
Coordenador da CEUA/HCPA



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/HCPA) analisou o projeto:

**Projeto:** 140082

**Data da Versão do Projeto:** 20/04/2014

**Pesquisadores:**

ANDREIA BILOLO

NIDIANE CARLA MARTINELLI

MARIANA RECAMONDE MENDOZA

PATRICIA ASHTON PROLLA

VIRGILIO DA ROCHA OLSEN

**Título:** Papel dos MicroRNAs na Hipertrofia Cardíaca Fisiológica e Patológica: Expressão e Avaliação da Modulação por Espécies Reativas do Oxigênio

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais.

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação de projetos onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

Porto Alegre, 15 de outubro de 2014.

  
Profª Iraci Lucena da Silva Torres  
Coordenadora CEUA/HCPA

## PRODUÇÃO COMPLEMENTAR

- **Reduced autophagy and myostatin levels in a mouse model of physiological cardiac hypertrophy** Pinto GH, Andrades ME, **Cohen CR**, Martinelli NC, Leitão SAT, Clausell N, Rohde LE, Biolo A. (em processo de submissão)
- **N-acetylcysteine Plus Deferoxamine Improves Cardiac Function in Wistar Rats After Non-reperfused Acute Myocardial Infarction.** Phaelante A, Rohde LE, Lopes A, Olsen V, Tobar SA, **Cohen C**, Martinelli N, Biolo A, Dal-Pizzol F, Clausell N, Andrades M. J Cardiovasc Transl Res. 2015 Jul;8(5):328-37.
- **An analysis of the global expression of microRNAs in an experimental model of physiological left ventricular hypertrophy.** Martinelli NC, **Cohen CR**, Santos KG, Castro MA, Biolo A, Frick L, Silvello D, Lopes A, Schneider S, Andrades ME, Clausell N, Matte U, Rohde LE. PLoS One. 2014 Apr 21;9(4):e93271.
- **Transcoronary gradient of plasma microRNA 423-5p in heart failure: evidence of altered myocardial expression.** Goldraich LA, Martinelli NC, Matte U, **Cohen C**, Andrades M, Pimentel M, Biolo A, Clausell N, Rohde LE. Biomarkers. 2014 Mar;19(2):135-41.
- **Association study of polymorphisms in the receptor for advanced glycation end-products (RAGE) gene with susceptibility and prognosis of heart failure.** **Cohen CR**, Diel VB, La Porta VL, Rohde LE, Biolo A, Clausell N, Dos Santos KG. Gene. 2012 Nov 15;510(1):7-13.
- **Polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase gene in systolic heart failure: an haplotype analysis.** Martinelli NC, Santos KG, Biolo A, La Porta VL, **Cohen CR**, Silvello D, Andrades ME, Clausell N, Rohde LE. Nitric Oxide. 2012 Mar 31;26(3):141-7.