

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

---

*Diferenciação entre microRNAs expressos na Hipertrofia Cardíaca  
Fisiológica e Patológica*

---

**NIDIANE CARLA MARTINELLI**

**Porto Alegre**  
**2016**

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

---

*Diferenciação entre microRNAs expressos na Hipertrofia Cardíaca  
Fisiológica e Patológica*

---

**NIDIANE CARLA MARTINELLI**

**Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ursula da Silveira Matte**  
**Co-Orientador: Prof. Dr. Luis Eduardo Rohde**

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

**Porto Alegre**  
**2016**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Pesquisa Cardiovascular do Centro de Pesquisa Experimental 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).

*“Se a meta principal de um capitão fosse preservar seu  
barco, ele o conservaria no porto para sempre”*

São Tomás de Aquino

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, por me desafiar a ser cada vez melhor  
e permitir que assim seja.*

*Aos meus pais, por sempre acreditarem em  
mim e me darem todo o suporte necessário  
para que eu seguisse meus sonhos.*

*Ao Caio, meu marido, meu amor, meu  
companheiro e meu maior incentivador.  
Obrigada por acreditar em mim, por não me  
permitir desistir e por ser um dos maiores  
encorajadores da minha jornada acadêmica,  
mesmo que para isso eu tivesse que estar  
longe de casa.*

*A todos os meus familiares, por entenderem e  
me apoiarem nessa longa jornada.*

*Aos meus amigos, por vibrarem a cada etapa  
concluída.*

*A Carolina Cohen, por ser sempre presente,  
amiga e parceira de laboratório e de vida.  
Sinto e continuarei sentido saudades de dividir  
a bancada do laboratório contigo. Obrigada por  
ser uma amiga e colega tão dedicada.*

*A Carla Zangrande, por se tornar tão amiga e  
tão importante, por partilhar vinhos comigo e  
me fazer rir no meio do estresse.*

*Aos meus colegas de laboratório, todos que  
passaram pelo laboratório no período do  
doutorado, sejam eles alunos de graduação ou  
já mestres e doutores, obrigada pela parceria  
na realização deste projeto.*

*Ao Michael Andrades e Graziela Pinto, por  
colocarem a mão na massa comigo e  
desempenhar com maestria os protocolos em  
que participaram.*

*Aos funcionários do HCPA e UFRGS por  
serem tão zelosos quanto ao desenvolvimento  
deste projeto, em especial aos funcionários do  
UAMP e da UEA.*

*A minha orientadora Ursula, por se mostrar tão  
ativa e engajada, mesmo que ocupada, por me  
dar ideias e aceitar as minhas, por  
compreender todas as situações, por me  
ajudar a ser uma profissional melhor e me  
permitir crescer. Obrigada pela confiança e por  
me ajudar a ser mais independente nos*

*artigos. Foi um prazer ser tua aluna, muito  
obrigada.*

*Ao meu co-orientador Rohde, agradeço por  
sempre ter me permitido pensar e agir  
livremente no âmbito acadêmico, acreditando  
nas minhas ideias e incentivando-me mesmo  
quando elas pareciam ser grandiosas demais.*

*Graças a nossa parceria de confiança, hoje  
temos um novo modelo animal no laboratório  
que espero ser extremamente útil a outros  
projetos como foi para este. Muito obrigada por  
me guiar e me ensinar a pensar de forma  
crítica, não apenas no doutorado, mas nos  
últimos 10 anos de orientação.*

## SUMÁRIO

RESUMO .....	10
ABSTRACT .....	12
LISTA DE ABREVIATURAS.....	14
LISTA DE FIGURAS .....	17
APRESENTAÇÃO.....	18
PARTE I .....	19
INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	19
INTRODUÇÃO .....	20
Hipertrofia Cardíaca.....	20
Hipertrofia Cardíaca Fisiológica .....	22
Hipertrofia Cardíaca Patológica.....	26
Mecanismos moleculares envolvidos na hipertrofia cardíaca.....	27
MicroRNAs (miRs).....	31
Biogênese de microRNAs.....	33
Mecanismos de ação dos microRNAs .....	35
Validação dos genes alvos dos microRNAs .....	37
MicroRNAs e o sistema cardiovascular .....	38
JUSTIFICATIVA .....	50
Objetivo principal.....	52
Objetivos específicos.....	52
PARTE II .....	53
ARTIGOS CIENTÍFICOS .....	53
ARTIGO I .....	54
ARTIGO II .....	67
PARTE III .....	101
DISCUSSÃO, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....	101
DISCUSSÃO.....	102
CONCLUSÕES .....	119



PERSPECTIVAS.....	122
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DAS PARTES I E III.....	123
ANEXOS .....	155
MATERIAL SUPLEMENTAR DO ARTIGO I .....	156
PRODUÇÃO COMPLEMENTAR .....	159

## RESUMO

A hipertrofia cardíaca é uma adaptação do coração frente a estímulos de crescimento, sejam eles patológicos e irreversíveis como a sobrecarga de pressão ou de volume, ou fisiológicos e reversíveis como a gravidez e o exercício físico. A hipertrofia derivada de estímulos patológicos é conhecida como mal adaptativa enquanto que a hipertrofia proveniente de estímulos ditos fisiológicos é conhecida como benéfica ou adaptativa. Embora ambas hipertrofias tenham fatores em comum no que diz respeito ao crescimento do cardiomiócito e adaptações moleculares, elas acabam divergindo para desfechos completamente diferentes. A hipertrofia patológica evolui para um quadro de disfunção cardíaca ao passo que a hipertrofia fisiológica não acarreta nenhum dano funcional ao miocárdio. Essa linha tênue entre um fenótipo e outro envolve mecanismos celulares complexos que ainda precisam ser esclarecidos. Dentro deste cenário, os microRNAs aparecem como reguladores de diversos processos celulares, e têm sido associados ao crescimento miocárdico. Portanto, nosso objetivo foi comparar o padrão de expressão de microRNAs entre os modelos de hipertrofia fisiológica, induzido por natação (SWIM), e o modelo de hipertrofia patológica, induzida por bandejamento aórtico transtorácico (TAC). As análises foram realizadas após 28 dias para o modelo de natação, e 35 dias para o modelo de TAC. A comparação foi realizada através da técnica de microarranjo de microRNAs (Affymetrix). Interessantemente, apenas 20 microRNAs apresentaram níveis de expressão distinta entre os dois modelos de hipertrofia. Destes, 12 microRNAs apresentaram aumento de expressão (miR-193a-3p, miR-299a-5p, miR-127-5p, miR-214-5p, miR-188-5p, miR-326-3p, miR-6395, miR-547-3p, miR-199a-5p, miR-381-3p, miR-223-3p e miR-199b-5p) e 8 estavam com seus níveis diminuídos (miR-

708-5p, miR-30c-1-3p, miR-22-5p, miR-6921-5p, miR-30a-3p, miR-30e-3p, miR-27a-5p and miR-6975-5p) no grupo TAC em relação ao grupo SWIM. Além disso, apenas 3 microRNAs, miR-21a-5p, miR-206-3p e miR-1983, apresentaram aumento de expressão tanto no grupo TAC quanto no grupo SWIM em comparação aos grupos SHAM e Sedentário, respectivamente. Após isso, foi realizada uma busca por possíveis alvos destes microRNAs na base de dados KEGG Pathway que identificou 4 rotas enriquecidas (665 genes) entre os alvos dos microRNAs reduzidos, e 80 rotas (3394 genes) fortemente associadas aos microRNAs que estavam aumentados no grupo TAC comparado ao SWIM. Conclui-se que existem microRNAs específicos para o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca fisiológica, bem como patológica conforme os dados obtidos na análise de microarranjo. Além disso, os possíveis alvos destes microRNAs parecem estar envolvidos em rotas bastante envolvidas no crescimento celular, sobrevivência e adaptação cardíaca.

**PALAVRAS CHAVE:** Hipertrofia Cardíaca; MicroRNAs; Exercício; Bandejamento Aórtico Transtorácico.

## ABSTRACT

Cardiac hypertrophy is a heart adaptation in response to growth stimuli whether pathological and irreversible such as pressure overload or physiological and reversible as pregnancy and exercise. Hypertrophy because of pathological stimuli is known as maladaptive while the one that comes from physiological triggers is known as beneficial or adaptive. Although both have similarities about cardiomyocyte growth and molecular adaptations, they diverge to distinct outcomes. The pathological hypertrophy evolves to a pattern of cardiac dysfunction while the physiological one does not cause any damage to the heart. This tenuous line between those phenotypes involves complex cellular mechanisms that need to be clarified. In this context, microRNAs are considered as regulators of many biological processes, and have been associated to myocardial growth. Therefore, our aim was to compare microRNA expression between physiological (swim-induced) and pathological (TAC-induced) hypertrophy. The analysis was performed after 28 days for SWIM protocol and 35 days for TAC model. The comparison was done using microRNA microarray technology (Affymetrix). Interestingly, only 20 microRNAs were differential expressed between both models. Out of those, 12 were up regulated (miR-193a-3p, miR-299a-5p, miR-127-5p, miR-214-5p, miR-188-5p, miR-326-3p, miR-6395, miR-547-3p, miR-199a-5p, miR-381-3p, miR-223-3p and miR-199b-5p) while 8 were down regulated in TAC group compared to SWIM group. Besides, only 3 microRNAs, miR-21a-5p, miR-206-3p and miR-1983, were upregulated in TAC and SWIM model compared to SHAM and SED groups. After that, a search at KEGG Pathway database retrieved 4 pathways (665 genes) enriched with targets from microRNAs downregulated and 80 pathways (3394 genes) enriched with targets from up-regulated microRNAs in in

TAC group compared to SWIM group. In conclusion, there are microRNAs specific committed to the physiological cardiac hypertrophy development as well to the pathological cardiac growth as observed in our microarray data. Furthermore, the possible targets of those microRNAs could be involved in pathways associated with cellular growth, survival and cardiac adaptation.

**KEYWORDS:** Cardiac Hypertrophy; MicroRNAs; Exercise; Transverse Aortic Constriction;

## LISTA DE ABREVIATURAS

Akt ou PKB: Proteína quinase B  
ANP: Peptídeo natriurético atrial  
Ang II: Angiotensina II  
BNP: *Brain natriuretic peptide*  
c-Myb: Proto-oncogene c-Myb  
CaMKII: Quinase dependente de Ca/calmodulina II  
cel-miR-39: microRNA-39 de *C. elegans*  
COL1A1: *Collagen I*  
COL3A1: *Collagen III*  
CX43: Conexina 43  
DCM: Cardiomiopatia dilatada  
DGCR8: *DiGeorge Syndrome Critical Region 8*  
DNA: Ácido desoxirribonucleico  
EGR2: Gene de resposta primária de crescimento  
ERK: Quinase reguladora do sinal extracelular  
ET-1: Endotelina 1  
EXE: Exercitado  
FEVE: Fração de ejeção do ventrículo esquerdo  
FoxP1 (*Forkhead box protein P1*)  
FOXO: *Forkhead box protein O*  
GAPDH: *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*  
GATA4: *GATA binding protein 4*  
GPCR: Receptor ligado à proteína G  
GSK3 $\beta$ : Glicogênio sintase quinase 3  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de Hidrogênio  
HC: Hipertrofia cardíaca  
HF: Heart failure  
IAM: Infarto agudo do miocárdio  
IC: Insuficiência cardíaca

IGF-1: Fator de crescimento insulínico do tipo 1  
IL-6: Interleucina 6  
Jak/STAT: Janus quinase/transdutor de sinal e ativador da transcrição  
KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome  
LES: Lúpus eritematoso sistêmico  
LLC: *Lewis Lung Carcinoma*  
LV: Left ventricle  
LVH: Left ventricle hypertrophy  
LVW/TL ratio: Left ventricle weight corrected by tibia length ratio  
MAPK: Proteína-quinase ativada por mitógeno  
MI: Myocardial infarction  
Mcl-1: *Myeloid Cell Leukemia 1*  
miR: microRNA  
MST1: *Macrophage Stimulating 1*  
MST1/2: STE20-like kinase MST2  
mTOR: Proteína alvo da rapamicina em mamíferos  
mTORC1: mTOR complex 1  
mTORC2: mTOR complex 2  
Myh6: Myosin, Heavy Chain 6, Cardiac Muscle, Alpha  
Myh7: Myosin, Heavy Chain 7, Cardiac Muscle, Beta  
NF-κB: Fator nuclear κB  
NFAT: Fator nuclear ativador de célula T  
NPPA: Gene do fator natriurético atrial  
p38: Proteína 38 tirosina quinase ativada por mitógeno  
PI3K: Fosfoinositol-3-quinase  
Pré-miRNA: microRNA precursor  
Pri-miRNA: microRNA primário  
PTEN: Proteína homóloga à fosfatase e tensina  
Rassf1A: *Ras Association Domain Family Member 1*  
RISC: Complexo de Indução do Silenciamento do RNA  
RNA: Ácido ribonucleico

RNA<sub>m</sub>: RNA mensageiro  
SCA: Síndrome coronariana aguda  
SED: Sedentário  
SERCA2: Enzima ATPase cálcio dependente  
SHAM: Animal falso operado  
SWIM: Animal submetido ao modelo de natação  
PSEN1: *Presenilin 1*  
TAC: Bandejamento aórtico transtorácico  
TAK1: Mitogen-Activated Protein Kinase 7 (MAP3K7)  
Tg: Transgênico  
TGF- $\beta$ 1: *Transforming Growth Factor Beta 1*  
TGO: Transaminase glutâmica oxalacética  
TGP: Transaminase glutâmica pirúvica  
TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa  
UTR: Região não traduzida  
VE: Ventrículo esquerdo  
YAP: *Yes-associated protein*



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Diferenças entre hipertrofia patológica e fisiológica. ....	22
Figura 2 Adaptação cardíaca frente a diferentes tipos exercícios. ....	24
Figura 3. Mecanismo de formação de microRNAs. ....	35

## 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 artigos científicos em substituição às seções de Material e Métodos e Resultados;
- **Parte III:** Discussão, Conclusões e Perspectivas;
- **Anexos:** Materiais suplementares aos artigos e produção complementar da aluna.

## **PARTE I**

### **INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**

## INTRODUÇÃO

### Hipertrofia Cardíaca

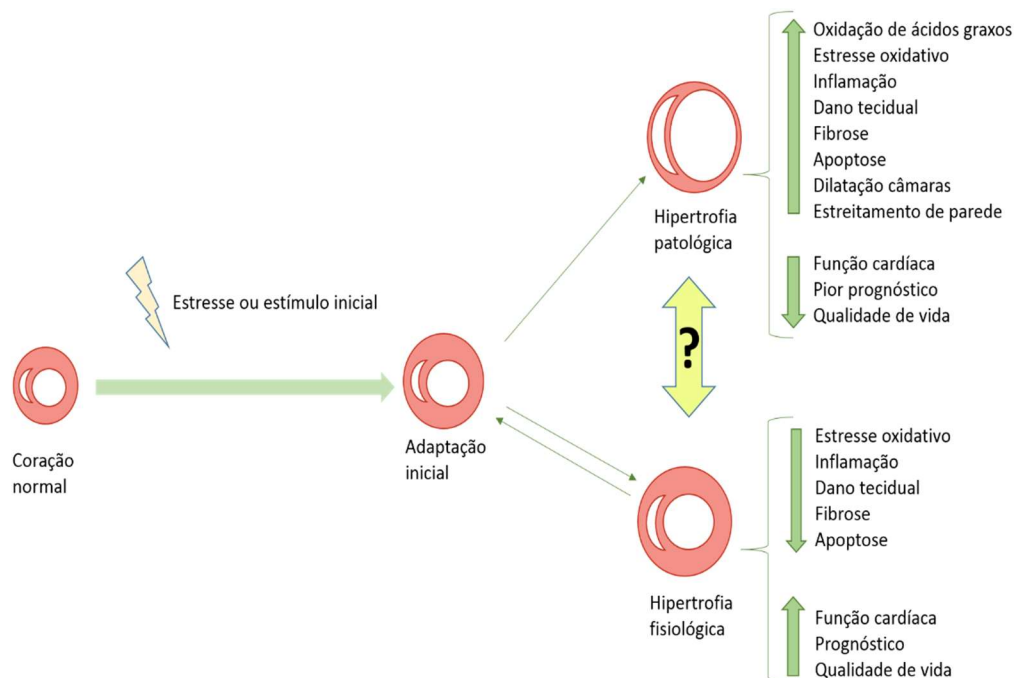
A hipertrofia cardíaca é definida como o aumento da massa cardíaca devido ao aumento do tamanho dos miócitos. Este crescimento pode resultar de sobrecarga hemodinâmica, de pressão ou de volume impostas ao coração. Diversos estímulos mecânicos e neuro-humorais têm sido implicados, e diversas moléculas e rotas de sinalização interdependentes estão associadas ao desenvolvimento da hipertrofia cardíaca (Kong, Bodyak et al. 2005, Carreno, Apablaza et al. 2006, Gupta, Das et al. 2007, Hou and Kang 2012).

A hipertrofia cardíaca é um dos mais importantes marcadores de morbidade e mortalidade por doenças cardiovasculares. Em portadores de hipertensão arterial ou de outras miocardiopatias, a presença de hipertrofia cardíaca constitui também importante fator de risco para morte súbita. Tendo em vista que a hipertrofia está associada a uma série de condições patológicas que afetam o aparelho cardiovascular, algumas delas com elevada prevalência na população, como a hipertensão arterial, existe grande interesse no estudo de mecanismos celulares e subcelulares que controlam a expressão de genes que irão determinar o aumento da massa cardíaca em resposta à sobrecarga de trabalho (Gupta, Das et al. 2007, Hou and Kang 2012).

A teoria que melhor explica os padrões de hipertrofia postula que a resposta ventricular ocorre no sentido de manter o estresse parietal relativamente constante, e o volume sistólico adequado. A hipertrofia pode ser dividida em dois tipos principais conhecidas como hipertrofia excêntrica e hipertrofia concêntrica. A hipertrofia excêntrica tem como estímulo inicial uma sobrecarga de volume e é caracterizada por apresentar

uma parede cardíaca delgada e dilatação ventricular (aumentando o diâmetro da câmara), onde ocorre a adição dos sarcômeros em série. A hipertrofia concêntrica é causada, geralmente, por uma sobrecarga de pressão, que leva a um espessamento da parede ventricular e gera a deposição de novos sarcômeros; porém, não ocorrem mudanças no raio do ventrículo (Gupta, Das et al. 2007, Hou and Kang 2012).

A hipertrofia cardíaca também pode ser classificada como hipertrofia fisiológica e patológica. Recentemente, vários estudos têm tentado demonstrar as diferenças bioquímicas e moleculares entre as hipertrofias fisiológica e patológica (Figura 1). De maneira geral, estímulos neuro-humorais que resultam na ativação da proteína G através dos receptores Gαq estão associados à hipertrofia patológica e progressão para insuficiência cardíaca (IC) (Carreno, Apablaza et al. 2006, Dorn 2007, Traynham, Cannavo et al. 2015). Por outro lado, a ativação de fatores de crescimento, que estimulam a ativação da proteína quinase Akt e fosfoinositol-3-quinase (PI3K), estão implicados em um crescimento fisiológico ou adaptativo (McMullen, Shioi et al. 2003, Carreno, Apablaza et al. 2006, Lewartowski and Mackiewicz 2006, Dorn 2007, Aoyagi and Matsui 2011). A elucidação de cascatas de sinalização que podem ter papéis distintos nestas duas formas de hipertrofia é crítica para o desenvolvimento de estratégias mais eficientes para o tratamento da IC. Desta forma, intervenções facilitadoras do processo que permite que o coração aumente em resposta a estímulos fisiológicos, enquanto mantém função normal ou aumentada, seriam estratégias terapêuticas potenciais (McMullen, Shioi et al. 2003).



**Figura 1** Diferenças entre hipertrofia patológica e fisiológica.

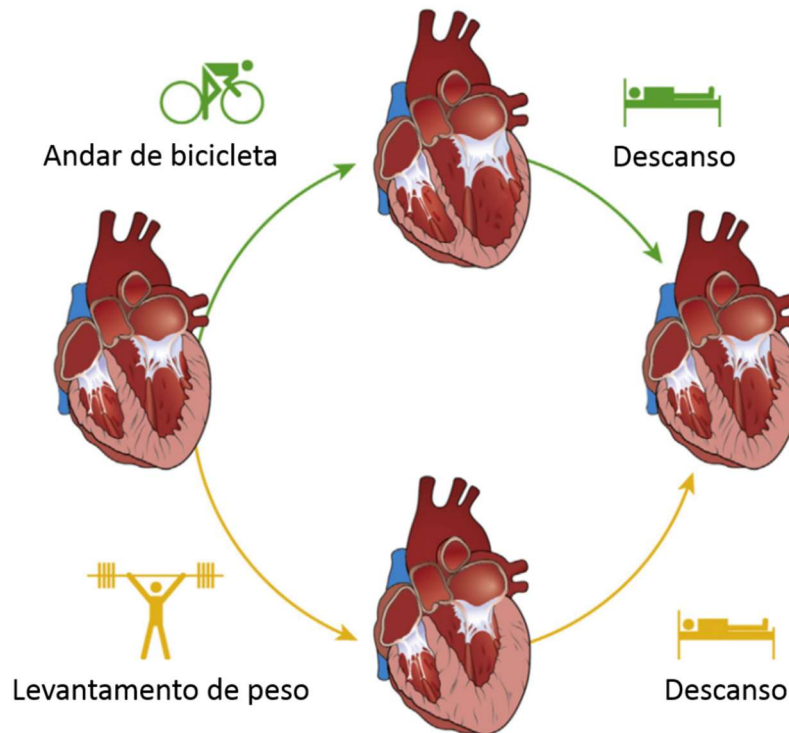
Inicialmente, o coração sofre uma hipertrofia compensatória, sem alteração de função. Com o passar do tempo, esta hipertrofia pode evoluir para uma forma fisiológica (derivada de exercício e gravidez, por exemplo), ou se encaminhar para um fenótipo patológico com marcada queda de função cardíaca e dilatação das câmaras.

### *Hipertrofia Cardíaca Fisiológica*

Os benefícios do exercício físico tais como controle da pressão arterial, melhora do painel lipídico e aumento da sensibilidade a insulina são conhecidos amplamente, tanto que as sociedades americana e europeia recomendam um mínimo de 150 minutos de exercício moderado semanalmente para indivíduos adultos (Boule, Haddad et al. 2001, Kelley, Kelley et al. 2004, Pescatello, Franklin et al. 2004, Eckel, Jakicic et al. 2014). Além dos benefícios cardíacos diretos, o exercício melhora a autoconfiança, aumenta a longevidade e tem sido considerado como antidepressivo (Lauer, Levy et al. 1992, Boule, Haddad et al. 2001, Lavie, Arena et al. 2015).

O exercício físico é um estímulo já conhecido para o desenvolvimento de hipertrofia ventricular esquerda. As alterações estruturais, resultantes do treinamento físico, dependem da natureza, duração e intensidade do exercício. As diversas modalidades esportivas têm sido classificadas, fundamentalmente, em dois grandes grupos: esportes de resistência, nos quais predominam as formas isotônicas ou dinâmicas de exercício, e esportes de força, nos quais predominam as formas isométricas ou estáticas de exercício (Kovacs and Baggish 2016) (Figura 2). Os esportes caracterizados como isotônicos incluem corridas de longa distância, ciclismo e futebol estimulam um remodelamento cardíaco marcado por dilatação bi ventricular e bi atrial e melhoramento da função diastólica do ventrículo esquerdo. Em contraste, um estresse isométrico, como visto no levantamento de peso (musculação) e artes marciais, gera uma adaptação confinada ao ventrículo esquerdo tipicamente associada a um grau médio de hipertrofia concêntrica e um grau relativo de piora da função diastólica ventricular esquerda (Kovacs and Baggish 2016). Entretanto, raramente o condicionamento atlético é puramente isotônico ou isométrico, e a maioria das atividades físicas envolve um componente dinâmico e estático, embora com predomínio de um deles. A hipertrofia induzida pelo treinamento físico é estimulada por estressores de volume e pressão dependentes do exercício físico e sua intensidade, o que resulta em aumento de massa muscular em resposta à sobrecarga de trabalho (Baggish and Wood 2011). Esta hipertrofia é um mecanismo fisiológico compensatório, reversível, caracterizado principalmente pelo aumento do comprimento e diâmetro dos cardiomiócitos, desta forma sendo responsável pela manutenção da tensão na parede

ventricular em níveis fisiológicos (Baggish and Wood 2011, Kim and Baggish 2015, Kovacs and Baggish 2016).



**Figura 2 Adaptação cardíaca frente a diferentes tipos exercícios.**

O estresse isotônico como andar de bicicleta (setas verdes) causa uma sobrecarga de volume e pode levar a dilatação das câmaras. Um estresse isométrico como levantamento de peso (setas amarelas) causa uma sobrecarga de pressão e hipertrofia das câmaras. Estas mudanças são reversíveis uma vez que o descanso reverte as mudanças causadas pelo exercício na estrutura cardíaca. Adaptado de (Kovacs and Baggish 2016).

Durante o exercício físico, o sistema cardiovascular tem como objetivo principal fornecer substratos rico em energia para os músculos em contração (glicose, ácido graxo e oxigênio) e devolver os produtos do metabolismo destes substratos para os órgãos responsáveis pela sua depuração do organismo. Todo esse processo é acompanhado por um aumento do débito cardíaco associado ao aumento da frequência cardíaca e do volume sistólico, e vasodilatação arterial periférica (Baggish and Wood 2011).



De maneira geral os atletas apresentam um aumento entre 10% e 20% do espessamento das paredes ventriculares esquerda e direita e um aumento de 10-15% no tamanho de ambas cavidades ventriculares quando comparados com indivíduos de idade e tamanho corporal similar. Em termos absolutos, a espessura da parede ventricular esquerda em atletas está dentro da variação normal aceita para a população sedentária que é de 8-12mm (Luijckx, Cramer et al. 2012). No que diz respeito ao tamanho das cavidades ventriculares, até 50% dos atletas, homens, estão acima dos limites superiores preditos. Por exemplo, um estudo com 1300 atletas olímpicos italianos mostrou que 45% deles tinha cavidade ventricular esquerda maior que os limites superiores e 14% deles tinham uma cavidade maior que 60mm o que é condizente com cardiomiopatia dilatada (Pelliccia, Culasso et al. 1999).

No eletrocardiograma de um atleta os padrões comuns encontrados são relacionados ao alto tônus vagal e os que refletem aumento de câmaras. Os achados mais comuns são bradicardia sinusal, arritmia sinusal, bloqueio de primeiro grau de ramo direito (AV) e critérios de que definem hipertrofia ventricular esquerda e direita dependente de voltagem (Sharma, Merghani et al. 2015). Esses padrões apresentados pelo coração de um atleta podem ser influenciados por idade, sexo, etnia e tipo de exercício. Torna-se importante salientar que um diagnóstico errôneo de um coração de atleta, ou hipertrofia fisiológica, em um indivíduo com cardiomiopatia pode colocar em risco a vida dessa pessoa.

No entanto, controvérsias ainda persistem sobre seu real significado. Especula-se se este tipo de hipertrofia trata-se de um processo puramente fisiológico (hipertrofia compensatória ou adaptativa), necessária para manter uma ótima performance cardíaca

em condições de sobrecarga circulatória aumentada, ou, ainda, envolveria o potencial de induzir, a longo prazo, alterações patológicas, relacionadas à estrutura miocárdica e ao comprometimento do desempenho cardíaco (Eto, Yonekura et al. 2000, Catalucci, Latronico et al. 2008). Para tanto, são necessários mais estudos que visem o melhor entendimento dos mecanismos que distinguem a hipertrofia cardíaca fisiológica da patológica.

### Hipertrofia Cardíaca Patológica

A diferenciação entre uma hipertrofia fisiológica e uma patológica requer o uso de múltiplos testes investigativos que incluem eletrocardiograma, ecocardiograma, teste de resistência cardiovascular associada a ecocardiografia, ressonância magnética, testes genéticos, entre outros. A presença de depressão do segmento ST em qualquer derivação, inversão da onda T nas derivações laterais, ondas Q patológicas (Q/R 0.25), bloqueio de ramo esquerdo no eletrocardiograma são bastante sugestivos de cardiomiopatia, assim como índices anormais de função diastólica e sistólica, mobilidade de paredes anormais, presença de arritmias complexas entre outros fatores (Corrado, Pelliccia et al. 2010, Sheikh, Papadakis et al. 2014, Sharma, Merghani et al. 2015). Clinicamente, a hipertrofia cardíaca patológica é observada em pacientes com hipertensão não controlada, infarto do miocárdio e estenose aórtica. Nos seus estados mais avançados caracteriza-se por disfunção contrátil, fibrose intersticial e expressão de genes cardíacos fetais como o peptídeo atrial natriurético e beta miosina de cadeia pesada (Mann, Bogaev et al. 2010, Shah and Solomon 2010).

A hipertrofia miocárdica patológica temporariamente preserva a função cardíaca e reduz o estresse de parede, porém quando a hipertrofia se estabelece por muito tempo,

ela torna-se um fator preditor para arritmias e morte súbita bem como de miocardiopatia dilatada e insuficiência cardíaca (Drazner, Rame et al. 2004, de Simone, Gottdiener et al. 2008, Stevens, Reinier et al. 2013). A insuficiência cardíaca é uma das mais frequentes causas de morte e hospitalizações em países desenvolvidos, e representa a via final de vários estímulos patológicos, muitos deles resultando em hipertrofia cardíaca mal adaptativa (Jessup and Brozena 2003). Na hipertrofia patológica, o desenvolvimento da hipertrofia, e sua posterior progressão para IC, resulta de múltiplos fatores incluindo alterações na expressão gênica, fatores humorais, apoptose, déficit no metabolismo energético, arritmias, disfunção vascular, bem como deposição anormal de colágeno e níveis de fibronectina que, somados, comprometem tanto a função sistólica quanto a diastólica cardíaca (Gupta, Das et al. 2007).

A resposta hipertrófica das células musculares cardíacas tem sido estudada extensamente; porém, os elos intermediários entre a condição que induz à hipertrofia e os eventos bioquímicos que aumentam a produção de RNA (transcrição) e a biossíntese proteica (tradução) não estão suficientemente elucidados. De forma simplista, pode-se considerar que os complexos eventos que levam à hipertrofia fazem parte de uma cascata sequencial que inclui sinais iniciadores, mecanismos de acoplamento e fatores de transcrição com a expressão de determinados genes (Eto, Yonekura et al. 2000).

### Mecanismos moleculares envolvidos na hipertrofia cardíaca

Diversas moléculas e sistemas neuro-hormonais participam no processo de hipertrofia cardíaca. A Angiotensina II (Ang II), principal molécula do sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS), estimula o crescimento de células cardíacas

neonatais através da ativação da via ERK, mas parece não possuir o mesmo efeito em células adultas. Já as MAP quinases (MAPKs) são proteínas do tipo serina/treonina quinases ativadas pela fosforilação dos resíduos de serina ou treonina que as constituem. As proteínas ERKs são ativadas por estresse mecânico (estiramento celular), agonistas dos receptores de proteína G ou de receptores que possuem atividade intrínseca de quinases, enquanto que as JNKs e p38 são ativadas principalmente por processos celulares como citocinas inflamatórias, isquemia, estresse oxidativo, endotoxinas, choque osmótico, entre outros (Yazaki and Komuro 1992, Gupta, Das et al. 2007, Cross, Li et al. 2009, Liu, Huang et al. 2015, Major, Salih et al. 2015, Peng, Tian et al. 2016, Yokota and Wang 2016).

Como citado acima, o TGF- $\beta$ 1 tem um papel bastante importante no remodelamento cardíaco, seja ele pós-infarto agudo do miocárdio ou decorrente de hipertrofia cardíaca. Já foi demonstrado que pacientes com elevados níveis de TGF- $\beta$ 1 tendem a ter uma fração de ejeção do ventrículo esquerdo menor, e pior prognóstico (Talasaz, Khalili et al. 2013, Ayca, Sahin et al. 2015). A ativação do TGF- $\beta$ 1 e subsequente cascata de sinalização TAK1-p38MAPK vai ao encontro do aumento de expressão de marcadores cardíacos de hipertrofia como beta miosina de cadeia pesada e peptídeo natriurético atrial, indicando mais uma vez a ação indireta desta molécula sobre o remodelamento hipertrófico no pós-infarto (Matsumoto-Ida, Takimoto et al. 2006). No modelo de sobrecarga de pressão, os níveis de TGF- $\beta$ 1 aumentam significativamente no miocárdio durante o desenvolvimento de hipertrofia (Li and Brooks 1997). Além disso, camundongos que superexpressam TGF- $\beta$ 1 apresentam grau elevado de hipertrofia cardíaca acompanhada de fibrose intersticial (Rosenkranz, Flesch et al. 2002).

Recentemente, foi demonstrado que TGF- $\beta$  atua diretamente na indução hipertrofia de cardiomiócitos e ainda, participa de forma bidirecional na sinalização existente entre cardiomiócitos e fibroblastos (Cartledge, Kane et al. 2015).

Um dos processos fundamentais para que ocorra a hipertrofia e esta se estabeleça é o aumento de síntese proteica. A proteína kinase mTOR é uma serina treonina kinase que forma complexos com outras proteínas, mTORC1 e mTORC2, e tem um papel importante na fisiopatologia cardiovascular. O mTORC1 participa da regulação da síntese de proteínas, crescimento e metabolismo celular, enquanto mTORC2 participa de funções como sobrevivência celular e polarização (Sebastiano Sciarretta, Massimo Volpe et al. 2014). A completa ablação do mTOR no coração de camundongos adultos é caracterizada por apoptose, autofagia e alteração da estrutura mitocondrial. Animais deficientes de mTOR submetidos ao modelo de hipertrofia por sobrecarga de pressão apresentam uma pior resposta hipertrófica e uma progressão mais rápida para insuficiência cardíaca (Zhang, Contu et al. 2010). Porém, uma inibição parcial da via do mTOR utilizando rapamicina é capaz de atenuar a hipertrofia cardíaca (Shioi, McMullen et al. 2003, McMullen, Sherwood et al. 2004). Além disso, a via da AKT/mTOR é ativada na hipertrofia fisiológica induzida por exercício físico enquanto na hipertrofia patológica induzida por bandejamento aórtico esta via parece estar parcialmente desativada (Kemi, Ceci et al. 2008).

Outra via bastante estudada nas respostas hipertróficas é a via da PI3K/AKT (Aoyagi and Matsui 2011, Rajan, Velmurugan et al. 2014, Major, Salih et al. 2015). A AKT é uma proteína kinase que participa de uma variedade de funções celulares em diferentes órgãos e tecidos. A AKT é a molécula efetora da via que se inicia com a Pi3k

e é essencial para o desenvolvimento cardíaco após o nascimento que se dá primariamente por hipertrofia dos cardiomiócitos. No coração adulto, uma ativação breve da AKT1 promove hipertrofia fisiológica (Shiojima, Yefremashvili et al. 2002) enquanto que uma ativação crônica desta molécula leva ao desenvolvimento de hipertrofia patológica (Matsui, Nagoshi et al. 2003, Kemi, Ceci et al. 2008). No modelo de hipertrofia por hipertensão com ratos Dahl sensíveis ao sal foi demonstrado que a ativação da via PI3K/AKT/mTOR ocasionava um efeito benéfico no remodelamento cardíaco e atenuava a insuficiência cardíaca (Miyachi, Yazawa et al. 2009). A AKT também participa da angiogênese que ocorre conjuntamente com a hipertrofia para suprir as demandas do miocárdio em crescimento, um aumento da densidade capilar está diretamente relacionado ao aumento do VEGF durante a ativação da AKT por um curto período de tempo (Shiojima and Walsh 2002, Kitamura, Asai et al. 2008). Os efeitos benéficos da ativação da via da AKT parecem decorrer do aumento da síntese proteica e da angiogênese vista nesses estudos.

A condução elétrica no coração se propaga tanto longitudinal quanto transversalmente nos miócitos ventriculares através das junções comunicantes (gap junctions). As junções comunicantes são compostas por diferentes proteínas das quais a mais abundante no tecido cardíaco é a conexina 43 (CX43). Uma expressão anormal de CX43 está geralmente associada com condução elétrica anormal e arritmias, além disso, biopsias de ventrículo esquerdo de pacientes com cardiomiopatia dilatada (DCM) apresentam uma redução heterogênea de expressão de CX43 (Dupont, Matsushita et al. 2001, Kostin, Rieger et al. 2003, van Rijen, van Veen et al. 2006). Interessantemente, em modelo animal de DCM a expressão de CX43 estava aumentada nos estágios iniciais da

hipertrofia cardíaca, porém com a sua progressão para insuficiência cardíaca, os níveis de Cx43 diminuíram, os miofilamentos de cardiomiócitos diminuíram e a fibrose aumentou (Formigli, Ibba-Manneschi et al. 2003). Um remodelamento das quantidade e/ou distribuição da CX43 pode ser responsável pela sobrecarga de cálcio intracelular o que tem sido associado a indução de arritmia isquêmica (Gao, Zhao et al. 2015). Sendo assim, não apenas moléculas que transitam no citoplasma, mas também estas que permitem a comunicação intercelular tem um papel bastante importante no desenvolvimento da hipertrofia e sua progressão para insuficiência cardíaca.

### **MicroRNAs (miRs)**

Os microRNAs ou miRNAs são moléculas curtas (18-25 nucleotídeos), endógenas, que, geralmente, não codificam proteínas, mas agem regulando a expressão de diversos genes por inibir a tradução ou promover a degradação do RNA mensageiro (mRNA) (Bartel 2004). Desde o seu descobrimento em 1993 por Ambros e colaboradores, os microRNAs vem ganhando destaque no cenário científico por sua capacidade de regular finamente a expressão gênica. Neste trabalho os autores mostraram pela primeira vez um pequeno RNA, lin-4, que possuía complementaridade parcial com a região 3'-UTR do mRNA da proteína lin-14 e que levava à redução da expressão desta proteína (Lee, Feinbaum et al. 1993). Apesar de descobertos em 1993, os microRNAs apenas passaram a ser chamados assim em 2001 no trabalho que demonstra o alto nível de conservação destas moléculas entre as espécies realizado por Lagos-Quintana e colaboradores (Lagos-Quintana, Rauhut et al. 2001). Foi definido por aqueles autores que microRNAs com alta

homologia são referidos pelo mesmo número, mas seguidos de uma letra minúscula (miR-208a e miR-208b), enquanto que múltiplas cópias genômicas de um gene de miR serão anotadas por miR acrescido de um hífen e um número (miR-17-2, por exemplo) (Lagos-Quintana, Rauhut et al. 2001).

Com o passar do tempo e a quantidade de novos miRs descobertos, foi necessário criar uma plataforma de depósito das novas sequências descritas de microRNAs. Sendo assim, atualmente, o miRNA Registry (Griffiths-Jones 2004) e o miRbase Registry definem os nomes dos genes de microRNAs. Os microRNAs recebem uma nomenclatura específica com 3 a 4 letras como prefixo para identificar a espécie, por exemplo, hsa-miR-16 para humanos e mmu-miR-16 para camundongos. Ainda, as sequências maduras dos microRNAs são designadas como “miR” enquanto que seus precursores em formato de *hairpin* são denominados “mir”. Os nomes dos genes de microRNAs têm o objetivo de transmitir informações funcionais. Por exemplo, hsa-miR-101 e mmu-miR-101 são ortólogos, ao passo que microRNAs que diferem apenas em um ou dois nucleotídeos, são chamados parálogos e recebem sufixos como, por exemplo, mmu-miR-10a e mmu-miR-10b em camundongos. Diferentes loci de *hairpin* que dão origem a um microRNA idêntico recebem sufixos numerados como dme-mir-281-1 e dme-mir-281-2 em *Drosophila melanogaster* (Griffiths-Jones 2004, Griffiths-Jones, Grocock et al. 2006, Griffiths-Jones, Saini et al. 2008).

Apesar da constante atualização das versões do miRBase, repositório oficial que mantém as sequências atualizadas dos novos microRNAs, fica difícil para as diversas plataformas manterem-se atualizadas, o que acaba gerando uma confusão

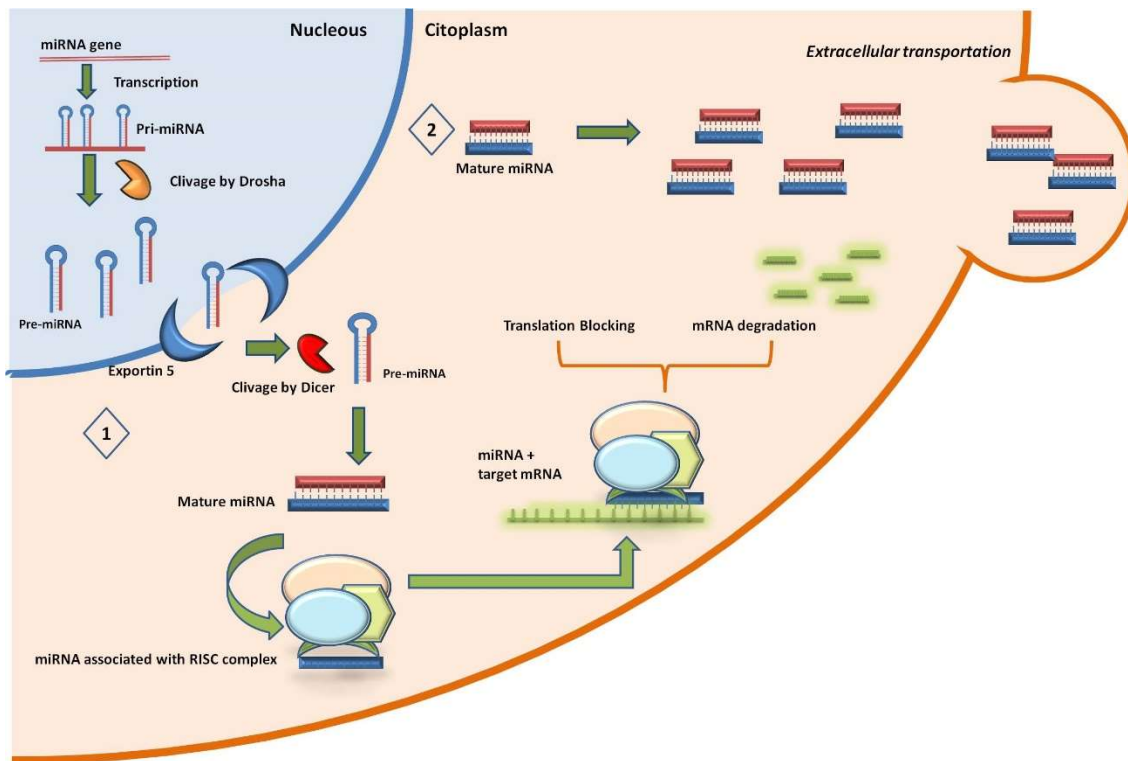


no que diz respeito aos nomes dos microRNAs. Para tentar unificar as diferentes versões existentes e ajudar os pesquisadores a entender as nomenclaturas e suas mudanças, Bonnal e colaboradores desenvolveram uma ferramenta de internet (miRiadne) que harmoniza as nomenclaturas levando em consideração as versões originais do miRBase 10 a 21 associado a 40 plataformas de expressão de 9 companhias diferentes. O miRiadne usa a sequência madura do microRNA para unificar as versões do miRBase e/plataformas e assim prevenir ambiguidades relacionadas à nomenclatura destas moléculas. O miRiadne é uma plataforma gratuita e pode ser acessada no endereço URL <http://www.miriadne.org> (Bonnal, Rossi et al. 2015).

## Biogênese de microRNAs

Os microRNAs são filogeneticamente conservados e estão distribuídos por todo o genoma (Rodriguez, Griffiths-Jones et al. 2004). Muitos genes de microRNAs são genes não codificadores de proteínas, dos quais o transcrito único é o microRNA. Porém em outros casos estão localizados dentro de íntrons ou de regiões não traduzidas (UTR) de determinados genes (Bartel 2004). Os genes de microRNAs são transcritos pela RNA polimerase II que gera um transcrito primário, chamado de pri-microRNA. O pri-microRNA tipicamente sofre *splicing*, possui cauda poliadenilada e estrutura CAP na sua extremidade 5' de maneira similar aos RNAs mensageiros codificadores de proteínas. Após essa transcrição inicial, que pode dar origem a um grupo de microRNAs sendo transcritos conjuntamente, é iniciado o processo de maturação destas moléculas. Essa maturação é mediada pelo complexo microprocessador Drosha-DCR8 (ambas localizadas no núcleo celular) que cliva os

pri-microRNA em produtos menores, de aproximadamente 70 nucleotídeos (nt), chamados de pré-microRNA (precursor de microRNA). O pré-microRNA possui, geralmente, 2 nucleotídeos extras na sua extremidade 3' e acredita-se que esta estrutura sirva como um sinalizador reconhecido pelo fator de exportação nuclear (exportina-5). Logo após a exportação do núcleo para o citoplasma, o pré-microRNA, em formato de *hairpin*, é então processado pela endonuclease DICER III que produzirá duplexes de RNA. Uma das fitas do duplex é incorporada ao complexo silenciador mediado por RNA (RISC) como microRNA maduro enquanto a outra fita é degradada (Figura 3). Como em determinadas famílias de microRNAs ambas as fitas podem ser incorporadas ao complexo, a fita originária da extremidade 5' do *stem-loop* é denominada "5p" e a 3' é denominada "3p" (Yi, Qin et al. 2003, Bartel 2004, Gregory, Yan et al. 2004, Hammond 2015). Os microRNAs maduros interagem com a proteína Argonata (Ago) para formar o Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC), e então, guiar o complexo RISC até o mRNA-alvo, preferencialmente até sua região 3' não traduzida. O sítio de ligação dos microRNAs ao seu mRNA-alvo depende da complementaridade dos pares de bases (sequência *seed* com aproximadamente 7 nucleotídeos) na região 5' do microRNA com a região 3' do mRNA (Ambros 2004, Lim, Lau et al. 2005).



**Figura 3. Mecanismo de formação de microRNAs.**

(1) Biogênese de microRNAs. Os microRNAs são transcritos no núcleo como longos transcritos chamados de pri-microRNAs. Os pri-microRNAs sofrem ação da enzima Drosha, uma RNase III, que cliva este precursor em um fragmento menor chamado de pré-microRNA. Os pré-microRNAs são exportados do núcleo para o citoplasma via Exportina 5. Já no citoplasma, os pré-microRNAs são novamente processados pela enzima Dicer com objetivo de gerar um microRNA curto, fita dupla que será convertido em microRNA maduro de fita simples e incorporado pelo complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). Finalmente, os microRNAs maduros guiam o complexo RISC para seus mRNAs alvos causando sua degradação ou repressão da tradução. (2) Mecanismo de secreção de microRNAs. No citoplasma celular, os microRNAs podem ser incorporados a pequenas microvesículas ou exossomos, formando os endossomos que se fundem com a membrana plasmática da célula e são liberados para o espaço extracelular.

## Mecanismos de ação dos microRNAs

Supõe-se que cada microRNA possua mais de 200 genes-alvo e cada um desses genes pode ser regulado por mais de um microRNA. Os microRNAs podem apresentar uma expressão constitutiva ou específica de diferentes fases do desenvolvimento, e ainda, serem expressos em certos tecidos e ausentes em outros (Lagos-Quintana, Rauhut et al. 2001). Por exemplo, o miR-208 parece ser primordialmente expresso no tecido cardíaco e seu aumento no plasma tende a refletir

um dano sofrido pelos cardiomiócitos (van Rooij, Marshall et al. 2008, Wang, Zhu et al. 2010).

A ligação do microRNA ao mRNA é extremamente dependente de complementaridade de sequência. Quando o microRNA é totalmente complementar à sequência do seu RNA alvo ocorre a degradação deste pelo sistema de proteassomos. Porém havendo uma complementaridade imperfeita, a tradução do RNAm é inibida (Bartel 2004, Nilsen 2007). Em animais, a maioria dos microRNAs liga-se na região 3'-UTR do mRNA alvo com complementaridade imperfeita e funciona como repressor traducional. A inibição da tradução continua sendo considerada como o mecanismo principal de regulação da expressão gênica por microRNAs em animais. É importante ressaltar que não há uma redução significativa no nível de mRNA e o resultado funcional mais evidente ocorre na quantidade de proteína produzida pelo mRNA que é alvo de determinado microRNA (Nilsen 2007).

A ação dos microRNAs pode ser realizada a partir de efeitos diretos ou indiretos sobre a tradução (Bartel 2004, Nilsen 2007). Os efeitos diretos sobre a tradução incluem a inibição da iniciação da síntese proteica, remoção prematura de ribossomos, redução da velocidade de alongamento da proteína e degradação co-traducional da proteína recém-formada. Neste grupo de ações os estudos mostram que o mRNA está associado aos polissomos, a síntese de proteína é iniciada, porém não é possível detectar o peptídeo nascente (Maroney, Yu et al. 2006, Nottrott, Simard et al. 2006). Outro estudo demonstrou que o mRNA estava associado aos polissomos porém, havia uma repressão da tradução, possivelmente causada por uma remoção prematura dos ribossomos associados ao mRNA (Petersen, Bordeleau et al. 2006). Por outro lado,

os efeitos indiretos, tais como a deadenilação e a degradação dos mRNAs, não ocorrem por ação direta sobre a maquinaria de tradução, mas causam uma redução dos níveis da proteína alvo. A desestabilização do mRNA e sua posterior degradação é consequência da deadenilação seguida da perda do 5'-CAP causada pelo microRNA (Giraldez, Mishima et al. 2006, Wu, Fan et al. 2006).

### Validação dos genes alvos dos microRNAs

Após a identificação dos microRNAs envolvidos em qualquer processo biológico, como a hipertrofia cardíaca por exemplo, é fundamental que se prossiga com o estudo da repercussão funcional associada a microRNAs específicos. Isto é possível através da identificação e validação de genes alvos relacionados a rotas envolvidas nos diferentes aspectos do processo biológico regulado por microRNA. Aproximadamente 30% dos genes codificadores de proteínas do genoma humano seriam alvos da regulação por microRNAs (Lai 2004). Existem diversos algoritmos que usam como estratégia a análise do alinhamento das sequências de microRNA com as sequências das regiões 3' UTR do mRNA através de fatores como a energia de ligação do híbrido ou requisitos do pareamento de bases na região *seed* do microRNA (Lewis, Shih et al. 2003). Isso leva a um número enorme de genes que podem ser regulados por um microRNA demonstrando a complexidade inerente a este tipo de regulação da expressão gênica. Dentre os diversos algoritmos utilizados na predição de genes alvos de microRNAs e os mais utilizados são: PicTar (<http://pictar.bio.nyu.edu>); TargetScan (<http://genes.mit.edu/targetscan>); Miranda (<http://www.microrna.org>) e miRecords (<http://mirecords.biolead.org/>). Após a

identificação dos possíveis alvos dos microRNAs parte-se para um estudo funcional *in vitro* de validação destes alvos com o objetivo de caracterizar o papel destas moléculas na modulação das vias em que eles estão envolvidos.

Para realizar a validação de alvos de microRNAs, as metodologias utilizadas incluem ensaio com vetores repórteres e estudos de mutação de ponto (Lewis, Shih et al. 2003, Johnson, Grosshans et al. 2005, Clancy, Nusch et al. 2007). O uso de moléculas que se ligam ao microRNA maduro, e assim, inibam a sua ação nas células tem sido amplamente usado como método de validação de um gene como alvo de determinado microRNA. Estas moléculas, conhecidas como antagomiRs, são fitas de oligonucleotídeos anti-senso que reduzem os níveis endógenos de microRNAs na célula e seu uso permite explorar o real papel de um microRNA dentro de determinada via biológica (Ishida and Selaru 2013, Tuttolomondo, Simonetta et al. 2016). Dessa maneira, podemos averiguar quão importante é determinada proteína em um dado sistema e de que forma o microRNA pode estar modulando, por exemplo, a via de crescimento celular ou metabolismo energético, no caso da hipertrofia cardíaca, por exemplo.

## MicroRNAs e o sistema cardiovascular

Os microRNAs estão envolvidos em diversos processos celulares, inclusive no desenvolvimento cardíaco no período embrionário. A cardiogênese é um processo altamente regulado e os diferentes padrões de expressão gênica em cada região do coração definem a formação de câmaras e válvulas. Por exemplo, o miR-1 é o mais abundante no tecido cardíaco e a sua superexpressão em embriões resulta na

diminuição da proliferação de cardiomiócitos, afinamento das paredes ventriculares, insuficiência cardíaca e morte embrionária precoce (Zhao, Samal et al. 2005). Outro microRNA envolvido no desenvolvimento cardíaco é o miR-133, cuja introdução em embriões de *Xenopus* resultou em um tecido cardíaco altamente desorganizado e ausência de formação das câmaras cardíacas (Chen, Mandel et al. 2006). Outro exemplo da importância dos microRNAs no desenvolvimento cardíaco é a presença de anomalias cardíacas congênitas associadas a uma parada prematura no ciclo celular em modelo transgênico de camundongo que superexpressa miR-195 (Porrello, Johnson et al. 2011). Além disso, a inibição da família do miR-15 em camundongos (que abriga os miRs -15a, -15b, -16, miR-195 e -497) logo após o nascimento até a vida adulta aumenta a proliferação de miócitos no coração adulto além de apresentar uma melhor função sistólica após infarto do miocárdio (Porrello, Mahmoud et al. 2013).

Por seu papel importante na organogênese cardíaca não surpreende o fato de os microRNAs também desempenharem um papel fundamental na adaptação cardíaca a qualquer estímulo, seja ele patológico ou fisiológico. Sendo assim, diversos estudos têm avaliado o potencial papel dos microRNAs na regulação da expressão gênica durante o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca. Care et al, utilizou os modelos de hipertrofia cardíaca de sobrecarga de pressão (TAC), treino de resistência e expressão de AKT para estudar o papel do miR-1 e -133. Eles observaram uma expressão reduzida do miR-1 e do miR-133 nos três modelos animais de hipertrofia cardíaca e essa redução foi confirmada em amostras de coração provenientes de pacientes com cardiomiopatia hipertrófica ou dilatação atrial (Care, Catalucci et al. 2007). Seguindo esta linha de raciocínio, Soci et al demonstraram redução da

expressão dos miRs-1, -133a e -133b na hipertrofia cardíaca induzida por natação com 2 treinos de diferentes intensidades e frequência (Soci, Fernandes et al. 2011). Estes estudos indicam que os miRs-1, -133a e -133b tem um papel no estabelecimento da hipertrofia cardíaca tanto patológica quanto fisiológica visto que em ambas eles apresentam a mesma mudança de expressão.

Pode-se dizer que um dos microRNAs mais estudados no contexto de hipertrofia e insuficiência cardíaca é o miR-21. O miR-21 tem sua expressão induzida pelo estresse cardíaco e parece agir como um regulador do crescimento cardíaco e da ativação de genes fetais em cardiomiócitos primários *in vitro*; porém, o seu papel na hipertrofia do cardiomiócito ainda é controverso (Cheng and Zhang 2010). Enquanto Tatsuguchi e colaboradores (Tatsuguchi, Seok et al. 2007) mostraram que o nocaute do miR-21 realça os mecanismos hipertróficos, Thum e colaboradores demonstraram que a baixa expressão de miR-21 no coração de camundongos adultos com o uso de antagomir era capaz de reduzir o tamanho dos cardiomiócitos e o peso do coração no modelo de hipertrofia cardíaca patológica (Thum, Gross et al. 2008). Além disso, sabe-se que os níveis de miR-21-5p e miR-21-3p apresentam-se bastante elevados em pacientes com hipertrofia e insuficiência cardíaca (Thum, Gross et al. 2008, Cakmak, Coskunpinar et al. 2015, Kuosmanen, Hartikainen et al. 2015, Sygitowicz, Tomaniak et al. 2015, Yan, Chen et al. 2015). De forma interessante, em modelo animal de TAC, os níveis de miR-21-3p apresentam uma redução após 2 semanas e um aumento após 4 semanas da indução de sobrecarga. Entretanto, a expressão do miR-21-5p está reduzida após 2 semanas nos animais que sofreram TAC, mas apresenta um aumento passadas 4 semanas da cirurgia. A superexpressão



de miR-21-3p (antes chamado miR-21\*) consegue suprimir a hipertrofia cardíaca resultante de TAC em camundongos e também pelo estímulo com angiotensina II *in vitro*. Além disso, esta superexpressão de miR-21-3p leva a um desequilíbrio na via Akt/Gsk3 $\beta$  de sobrevivência celular (Yan, Chen et al. 2015). Sendo assim, pode-se inferir que o papel tanto do miR-21-5p quanto do miR-21-3p no desenvolvimento e modulação da hipertrofia cardíaca ainda necessita de maior atenção, uma vez que estes miRs parecem ser boas opções terapêuticas.

Outro microRNA que tem recebido destaque em estudos experimentais de doenças cardiovasculares é o miR-22 que apesar de abundante no tecido cardíaco não é necessário para a morfogênese cardíaca (Huang, Chen et al. 2013). Contudo, camundongos nocaute para o miR-22 desenvolvem cardiomiopatia dilatada e apresentam uma desregulação de genes relacionados à hipertrofia em resposta a sobrecarga de pressão (Gurha, Abreu-Goodger et al. 2012). Além disso, uma superexpressão de miR-22 em cardiomiócitos neonatais induz hipertrofia celular evidenciada pelo aumento da área da célula e pelo aumento da expressão de biomarcadores hipertróficos como ANP e BNP (Jentzsch, Leierseder et al. 2012, Huang, Chen et al. 2013). Logo, estudos que investiguem como o miR-22 participa da fisiologia cardíaca poderão contribuir para o desenvolvimento de terapias inovadoras para o tratamento das doenças cardiovasculares.

Neste sentido, abordagens de terapia gênica que tem por alvo a modulação de microRNAs no coração têm sido avaliadas. No trabalho de Wahlquist e colaboradores (2014) os autores confirmaram que a expressão do miR-25 está aumentada em amostras de miocárdio provenientes de pacientes com insuficiência cardíaca grave

(Wahlquist, Jeong et al. 2014) embora sua expressão tenha sido descrita previamente como reduzida em modelo de TAC (Dirkx, Gladka et al. 2013). Este trabalho também demonstrou evidências de que o miR-25 é primariamente expresso nos cardiomiócitos de corações que sofreram lesão devido ao bandejamento aórtico, e não se expressa em fibroblastos ou células endoteliais. Por fim, constataram que o miR-25 é capaz de modular a expressão de SERCA2, mecanismo primário de coleta de  $Ca^{2+}$  nos cardiomiócitos. Com base no fato de que os níveis de SERCA2 estão reduzidos no miocárdio com insuficiência, e os níveis de miR-25 estão aumentados, os autores injetaram um antagomiR no tecido cardíaco. Confirmou-se que a inibição do miR-25 em camundongos pós-TAC restaura os níveis de SERCA2 e melhora a disfunção cardíaca decorrente do modelo (Wahlquist, Jeong et al. 2014). Até o presente momento não há evidências do papel do miR-25 em modelos de hipertrofia fisiológica induzida por qualquer tipo de exercício físico.

A fibrose intersticial é um processo que ocorre na hipertrofia cardíaca patológica, assim como em outras doenças cardiovasculares, e os microRNAs também aparecem como moduladores desse processo (Shimizu and Minamino 2016, Wang, Liew et al. 2016). Os microRNAs que fazem parte da família do miR-29 (29a, 29b, and 29c) estão envolvidos na formação de fibrose cardíaca que ocorre tanto nos modelos de hipertrofia patológica quanto nos modelos de remodelamento cardíaco após infarto do miocárdio (van Rooij, Sutherland et al. 2008). No modelo de hipertrofia fisiológica, os níveis de miR-29c aumentam conforme a intensidade do exercício e os níveis de expressão dos seus alvos, *COL1A1* e *COL3A1*, estão reduzidos (Soci, Fernandes et al. 2011). Outro estudo avaliou os níveis de miR-29a/b/c e miR-30c nos

modelos de hipertrofia patológica por sobrecarga de pressão e fisiológica por corrida livre. Neste estudo, os níveis de miR-29a, miR-29c e miR-30c, mas não de miR-29b, estavam significativamente reduzidos no modelo patológico, porém sem nenhuma alteração no modelo fisiológico (Abonnenc, Nabeebaccus et al. 2013).

Os miRs-27a e -27b ainda são pouco estudados no contexto da hipertrofia cardíaca. Fernandes e cols. demonstraram que a hipertrofia induzida pelo treinamento de natação era capaz de aumentar a expressão dos miRs 27a e -27b no coração dos ratos treinados, sem ter impacto na expressão de marcadores de danos ao miocárdio (Fernandes, Hashimoto et al. 2011). Um trabalho do nosso grupo (Martinelli, Cohen et al. 2014) demonstrou haver redução da expressão do miR-27a em camundongos treinados por corrida livre. Outro estudo realizado por Busk et al (2010) evidenciou aumento da expressão dos miRs-27a e -27b após bandejamento aórtico em ratos (Busk and Cirera 2010). Este miR também parece ter um papel importante no desenvolvimento dos dois tipos de hipertrofia, fisiológica e patológica, visto que o miR-27a/b estaria associado a angiogênese que acompanha o estabelecimento e manutenção da hipertrofia cardíaca (Kuehbacher, Urbich et al. 2007, Urbich, Kuehbacher et al. 2008).

A família do miR-30, que inclui o miR-30a, miR-30b e miR-30c, também tem sido estudada no contexto de remodelamento e insuficiência cardíaca (IC) (Duisters, Tijssen et al. 2009, Watson, Gupta et al. 2015). Em um estudo recente realizado por Tum e cols., o nível sérico do miR-30c encontrava-se reduzido tanto em pacientes com IC com Fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) reduzida quanto nos pacientes com FEVE preservada. Além disso, o miR-30c, quando associado aos

níveis de BNP e a outros miRs (miR-146a, miR-221, miR-328 e miR-375) apresenta potencial de diferenciar a IC com FEVE reduzida daquela em que a FEVE está preservada (Watson, Gupta et al. 2015). Estes dados vão ao encontro de estudos experimentais que mostram uma redução dos níveis teciduais de miR-30c em animais submetidos ao modelo de TAC, porém em modelo de hipertrofia cardíaca (HC) fisiológica induzida por corrida espontânea, os níveis de miR-30c não se alteraram (Abonnenc, Nabeebaccus et al. 2013). Outros membros desta família de microRNAs, como o miR-30e-3p e miR-30e-5p também apresentam expressão reduzida em modelo de hipertrofia cardíaca patológica induzida por aumento da pós-carga em modelo de coração criado por engenharia de tecidos (Hirt, Werner et al. 2015). De forma similar, uma coorte de pacientes demonstrou haver redução dos níveis de miR-30e em pacientes hospitalizados por insuficiência cardíaca aguda (Ovchinnikova, Schmitter et al. 2016). Sendo assim, existe um potencial destes microRNAs não apenas modularem as respostas do coração a determinados estímulos, mas também de agirem como sinalizadores de dano cardíaco e preditores de prognóstico.

Alguns estudos recentemente avaliaram o papel do miR-150 nos modelos de hipertrofia cardíaca. Em 2015, Liu et al mostraram que camundongos transgênicos que superexpressam miR-150 são resistentes ao desenvolvimento de hipertrofia por sobrecarga de pressão e deposição de colágeno, ou seja, eles desenvolvem uma hipertrofia em grau menor do que animais selvagens. Interessantemente, animais nocaute para miR-150 apresentam fenótipo similar aos animais selvagens, com hipertrofia patológica e deposição de colágeno no tecido cardíaco (Liu, Liu et al. 2015). No modelo de toxicidade cardíaca causada por doses cumulativas de doxorubicina,

o miR-150 teve sua expressão reduzida de forma inversamente proporcional a dose administrada ao animal, o que vai ao encontro de resultados previamente publicados em modelos de infarto do miocárdio e em pacientes com cardiomiopatia dilatada (Sayed, Hong et al. 2007, Divakaran and Mann 2008). Contudo, na hipertrofia desenvolvida após exercício físico crônico em camundongos verifica-se também um aumento dos níveis de miR-150 (Martinelli, Cohen et al. 2014). Isso indica que o miR-150 participa de forma ativa no desenvolvimento hipertrófico, e possa ter um papel protetor, visto que em altos níveis retarda a hipertrofia patológica e em baixos níveis está associado a maiores graus de cardiotoxicidade. Porém, ainda são necessários estudos mais detalhados para elucidar se o miR-150 teria um papel benéfico ou lesivo ao miocárdio.

O miR-195 foi um dos primeiros microRNAs a serem estudados no contexto da hipertrofia e insuficiência cardíaca. Em 2006, van Rooij e colaboradores demonstraram que o miR-195, o qual encontra-se superexpresso durante a hipertrofia cardíaca patológica, induz o crescimento dos cardiomiócitos e o desenvolvimento de insuficiência cardíaca em camundongos transgênicos. Foi sugerido que níveis moderados de expressão do miR-195 causariam hipertrofia cardíaca, enquanto níveis mais elevados causariam cardiomiopatia dilatada, como demonstrado em um modelo transgênico de camundongos que superexpressam o miR-195 (van Rooij, Sutherland et al. 2006). Ademais, no modelo de bandejamento da aorta transtorácica a expressão do miR-195 estava ligeiramente aumentada após 2 semanas do insulto inicial, demonstrando que o microRNA 195 parece estar relacionado aos estágios iniciais da hipertrofia cardíaca (Busk and Cirera 2010).

Talvez um dos microRNAs mais estudados, pelo menos inicialmente, no contexto da cardiopatia hipertrófica tenha sido o miR-208a/b. Os trabalhos publicados até agora tendem a mostrar o miR-208 como um microRNA pró-hipertrófico (Huang, Li et al. 2015, Paulin, Sutendra et al. 2015). Por exemplo, Callis et al. demonstraram que animais que superexpressam miR-208a de forma cardio-específica desenvolvem hipertrofia (Callis, Pandya et al. 2009). Além disso, altos níveis plasmáticos de miR-208 têm sido associados com dano ao miocárdio e pior prognóstico em estudos com pacientes com insuficiência cardíaca e infarto agudo do miocárdio (Ji, Takahashi et al. 2009, Bostjancic, Zidar et al. 2010, Satoh, Minami et al. 2010). Um trabalho bastante elegante mostrou que o miR-208 está localizado no íntron 27 do gene  $\alpha$ MHC (alfa actina) tanto em humanos quanto em camundongos, e assim como seu gene hospedeiro, o miR-208 se expressa especificamente no coração. Ainda o miR-208 foi indispensável para o desenvolvimento de hipertrofia dos cardiomiócitos, fibrose e regulação da expressão de  $\beta$ MHC (beta actina) no coração em resposta ao estresse (van Rooij, Sutherland et al. 2007). Dando seguimento a este trabalho o mesmo grupo publicou em 2011 um estudo de inibição do miR-208 em modelo murino de insuficiência cardíaca. Foi demonstrado que a inibição do miR-208a (antagomiR) de forma sistêmica e dose dependente prevenia a troca entre as miosinas (alfa para beta), o remodelamento cardíaco, causava melhora da função cardíaca e por fim, aumentava a sobrevivência dos animais tratados (Montgomery, Hullinger et al. 2011). Mais uma vez fica demonstrado que a inibição terapêutica desses RNAs não codificadores apresenta-se como uma potencial nova terapia no cenário das doenças cardiovasculares.

Recentemente, Souza e colaboradores, publicaram um estudo com ratos que desenvolveram insuficiência cardíaca após estenose aórtica e foram submetidos a sessões de exercício físico depois de 10 semanas de cirurgia. Eles demonstraram que o exercício físico foi capaz de atenuar o remodelamento cardíaco bem como sinais clínicos e patológicos de IC, preservando tanto a função sistólica quanto diastólica destes animais. De maneira interessante, 53 microRNAs tiveram seus níveis de expressão modificados apenas no grupo treinado portador de IC, entre eles o miR-21-5p, miR-27a-3p, miR-27b-5p e miR-208b-3p (Souza, Fernandez et al. 2015). Portanto, o exercício físico realmente age de forma benéfica atenuando a disfunção cardíaca e parece atuar em conjunto com a regulação gênica exercida por microRNAs.

Apesar de haverem muitos estudos envolvendo microRNAs e seus papéis, seja no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca ou para atenuar uma disfunção decorrente do crescimento exagerado dos cardiomiócitos, este é ainda um campo bastante controverso. Provavelmente muito se deve ao fato destas moléculas possuírem o potencial de regular centenas de genes simultaneamente conforme o microambiente em que estão inseridas. A Tabela 1 sumariza a modulação dos níveis de alguns microRNAs discutidos anteriormente nos contextos de hipertrofia fisiológica e patológica.

Tabela 1. Resumo dos níveis de microRNAs encontrados nos modelos de hipertrofia cardíaca fisiológica e patológica.

MicroRNA	Níveis na HC Fisiológica	Níveis na HC Patológica	REF.
<b>miR-1</b>	Reduzidos	Reduzidos/ Aumentados	(Care, Catalucci et al. 2007, Fernandes, Hashimoto et al. 2011)
<b>miR-21</b>	NA	Aumentados	(Thum, Gross et al. 2008, Cheng and Zhang 2010)
<b>miR-22</b>	NA	Aumentado	(Huang, Chen et al. 2013)
<b>miR-25</b>	NA	Reduzidos/ Aumentados	(Wahlquist, Jeong et al. 2014)
<b>miR-29a/b/c</b>	Aumentados	Reduzidos	(Soci, Fernandes et al. 2011, Abonnenc, Nabeebaccus et al. 2013)
<b>miR-27a/b</b>	Reduzidos/ Aumentados	Aumentados	(Busk and Cirera 2010, Martinelli, Cohen et al. 2014)
<b>miR-150</b>	Aumentados	Reduzidos	(Sayed, Hong et al. 2007, Divakaran and Mann 2008, Martinelli, Cohen et al. 2014)
<b>miR-208</b>	Ver Souza et al 2015	Aumentados	(Ji, Takahashi et al. 2009, Bostjancic, Zidar et al. 2010, Satoh, Minami et al. 2010)
<b>miR-143</b>	Reduzidos	NA	(Fernandes, Hashimoto et al. 2011, Martinelli, Cohen et al. 2014)

NA – Não avaliado ou não disponível.



Em suma, o coração adulto responde aos danos ou alterações hemodinâmicas pela ativação de uma variedade de rotas de sinalização intracelular bem como de mediadores transcricionais que promovem a hipertrofia do miócitos, reprogramação de genes fetais e remodelamento da matriz extracelular. Os mecanismos moleculares envolvidos na hipertrofia cardíaca mal adaptativa e consequente progressão para insuficiência cardíaca ainda não são completamente conhecidos. Da mesma forma, o coração responde aos estímulos fisiológicos necessários para desenvolver uma hipertrofia adaptativa ou compensatória de forma a manter o equilíbrio homeostático. Assim, o entendimento dos mecanismos pelos quais este equilíbrio se perde durante o processo de hipertrofia cardíaca, migrando de um estado adaptativo e sem prejuízo para um estado patológico, pode levar ao entendimento da progressão para hipertrofia patológica e insuficiência cardíaca.

## JUSTIFICATIVA

De forma bastante simplista, a hipertrofia cardíaca pode se apresentar sob duas formas, a fisiológica que é reversível e induzida por exercícios ou gravidez, e a patológica, irreversível e induzida por comorbidades como a hipertensão arterial sistêmica. Estes dois fenótipos distintos apresentam similaridades no que diz respeito as mudanças ocorridas nos cardiomiócitos e células que compõe o coração com o propósito de se adaptar a esta nova condição. O problema aparece quando a hipertrofia patológica, ultrapassa o quadro de adaptação e evolui para uma disfunção cardíaca. Saber exatamente de que forma este controle se perde, ou estas vias divergem uma da outra pode ajudar na busca por novas estratégias terapêuticas de tratamento da insuficiência cardíaca decorrente da hipertrofia mal adaptativa.

Neste contexto, recentemente os microRNAs, moléculas fitas simples de ácidos nucleicos com capacidade de regular a expressão de seus genes alvos, tem recebido bastante atenção. Alguns microRNAs já são considerados como pró-hipertróficos e outros anti-hipertróficos. Porém, os estudos realizados avaliam apenas a hipertrofia fisiológica ou patológica, dificilmente encontramos estudos que se propõe a comparar diretamente como estas moléculas se comportam nos dois cenários. Se pudéssemos encontrar um ou mais microRNAs que modulassem diferentemente os processos hipertróficos fisiológico e patológico, isto auxiliaria o desenvolvimento de terapias alternativas ou de estratégias que auxiliassem o diagnóstico precoce da hipertrofia patológica muito antes de a disfunção cardíaca se instalar. Portanto, a melhor compreensão das bases moleculares desta transição pode permitir o desenvolvimento

de novas alternativas terapêuticas para uma doença amplamente instalada na população mundial.

## Objetivo principal

Identificar microRNAs diferencialmente expressos na hipertrofia cardíaca patológica em comparação com a hipertrofia cardíaca fisiológica.

## Objetivos específicos

- Comparar diferentes abordagens metodológicas para análise de dados de expressão gênica relativa em função do grupo controle utilizado
- Estabelecer o modelo de hipertrofia patológica por bandejamento aórtico transtorácico em camundongos Balb/c adultos.
- Comparar os resultados obtidos neste modelo com os dados já existentes de hipertrofia cardíaca fisiológica induzida por exercício.
- Identificar microRNAs diferencialmente expressos na hipertrofia cardíaca patológica em comparação com a hipertrofia cardíaca fisiológica.
- Identificar possíveis alvos e vias de microRNAs por meio de ferramentas de bioinformática.

**PARTE II**  
**ARTIGOS CIENTÍFICOS**

# ARTIGO I

A ser submetido para a revista

*BMC biotechnology*

**The choice of a calibrator group: how can it affect the results in gene expression experiments?**

# **The choice of a calibrator group: how can it affect the results in gene expression experiments?**

Brief Title:

The effect of a calibrator group over qPCR results

Nidiane C. Martinelli<sup>1,3</sup>, Michael E. Andrades<sup>1,2</sup>, Luis E. Rohde<sup>1,2</sup>, Ursula Matte<sup>3,4</sup>

1 Experimental and Molecular Cardiovascular Laboratory, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

2 Post-Graduate Program in Cardiology and Cardiovascular Science,

3 Post-Graduate Program in Genetics and Molecular Biology

4 Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Address for correspondence:

**Prof. Dr. Ursula Matte**

Post-Graduate Program in Genetics and Molecular Biology and Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Porto Alegre, RS, Brazil - [www.hcpa.ufrgs.br](http://www.hcpa.ufrgs.br)

Phone: (51) 3359-8838

## ABSTRACT

The use of an accurate calibrator group is as important in gene expression studies as is the choice of a good reference gene. Despite that, very little attention is drawn to situations in which the choice of a calibrator is not obvious nor to the effects of choosing a wrong one. Sometimes, a proper calibrator group is difficult to obtain and researchers use sham or placebo groups as calibrators for gene expression analysis. Nonetheless, the improper calibrator group could lead to wrong results or could change the degree of the results. Here we discuss the importance of the adequate calibrator group to gene expression analysis by qPCR and suggest the use of a naïve group of animals to eliminate any confounding issues.

**KEY WORDS:** Gene expression analysis; qPCR analysis; calibrator group; housekeeping gene.



Currently, quantitative real time PCR (qPCR) is one of the most used techniques to analyze gene expression data, including validation of microarray analysis and other high throughput data. It is a fairly simple technique however, with great sensitivity and specificity, which contribute to its wide use. The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) guidelines target the reliability of results to help ensure scientific integrity of published data, promote consistency between laboratories, and increase experimental transparency [1, 2]. Despite that, many unreproducible results are published every year and an important factor to be considered is data analysis because the several existent methods differ substantially in their performance [3]. The relative gene expression assay is preferred over absolute quantitation, as it is independent of a calibration curve, which is often difficult to build [1, 4, 5].

The use of reference genes as internal controls is the most common method for normalizing cellular mRNA data in relative gene expression experiments. Livak and Schmittgen (2001) published the most popular method to calculate gene expression based on the threshold (Ct) difference among the gene of interest and a reference gene in the experimental and calibrator group, giving this method its usual denomination of  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [6].

Great attention is given to the choice of reference gene used in normalization [7-10]. Even computational softwares, such as GeNorm and NormFinder [11-13] are available to help researchers identifying the best reference gene for particular experimental conditions. On the other hand, however, few studies have questioned the choice of the calibrator group, assuming that it is the equivalent of an appropriate good

control group. Whereas this is straightforward reasoning for simpler experimental designs, more complex comparisons can be challenging. Thus, the aim of the present study is to discuss the proper use of the calibrator group and provide some examples of how the choice of a particular calibrator group may be misleading.

In a simple treated versus untreated study design, it is clear that the untreated group corresponds to the calibrator group. Small variations in the experimental design usually include a control group subjected to the same experimental procedures but without the intervention under testing. Examples of this situation are mock-transfected groups, vehicle groups or sham groups in experiments involving gene deliver, drug administration and surgical procedures, respectively. The aim of such groups is to isolate the effect of the intervention from confounders introduced by the experimental method itself and their use is necessary in order to adequately interpret the results. The problems arise when there is no clearly identifiable or available untreated (or naïve) control group. Many times this inexistent group is replaced only by the vehicle/mock group. Another issue is when one wants to compare two different experimental procedures – what is the suitable calibrator for both experiments?

The absence of clearly identifiable or available untreated (or naïve) control group is quite common in studies involving relative gene expression in human tissue samples. Whereas there is little doubt in judging the adequacy of study designs for a given disease from the inclusion criteria, the choice of a control group is controversial. Usually the diseased tissue is compared to samples from individuals without the disease or from unaffected areas (in case of cancer studies) [14-16]. However, mostly none of these samples come from healthy (or naïve) individuals, as it is unjustifiable to submit a healthy

person to an invasive biopsy procedure [17]. Therefore, the calibrator group is frequently constituted of samples from individuals with diseases other than the one under study [17, 18]. In cancer studies, the use of an apparently normal tissue fragment can be even more problematic as it has been shown that molecular alterations may be present in the tissue much before the appearance of histological abnormalities [19, 20], not to mention macroscopic alterations. It is reasonable to think that a more appropriate control for studies on human gene expression would be samples from cadaveric organ donors, however very few studies use them [21, 22].

The comparison of two distinct experimental models, each with its particular control group, also poses a challenge. For instance, what should be the most appropriate calibrator when comparing a surgical versus a non-surgical model? Our group compared the gene expression of *Myh6*, *Myh7* and *Nppa* in two models of cardiac hypertrophy: pathogenic (TAC) and physiological (EXE) [23]. Pathological cardiac hypertrophy is induced by transaortic constriction under surgical procedure, and its control are sham-operated animals (in which all surgical procedure is the same but without constriction). Physiological hypertrophy, on the other hand, is caused by forced or voluntary exercise (animals were either free to use a spinning wheel or forced to swim at regular intervals). Therefore, the control group in this case is sedentary animals, that are not forced to swim nor have spinning wheels in their cages. When data is calculated separately, with a calibrator group from within each experiment (sham or sedentary), results are quite different from the comparison of all groups, using sedentary as calibrator (Figure 1) for both *Myh6* and *Myh7*, but not for *Nppa*. *Myh6* gene expression could change from non-significant differences (using within group calibrator) to down regulation in TAC and

SHAM groups (using naïve calibrator). In the same way, *Myh7* levels had different results when the within group calibrator was applied compared to the analysis using naïve (sedentary group) animals.

Besides interfering in the magnitude of the effects, the choice of the calibrator group may impact on the conclusions drawn from the comparison between the control groups. Here we demonstrated that the choice of different control groups for each intervention gives the misleading result that the gene expression in each control group is about the same. Thus, when there is more than one control group it is highly advisable to choose only one as calibrator group. This approach allow comparisons even among the controls, which otherwise would be compromised.

Some studies in cardiovascular field are now showing not only the comparisons between treated and sham groups but also the parameters of normal animals. For example, a recent study about myocardial repair in non-human primates brought not only echocardiographic data of normal animals in addition to the placebo and treated groups but also apoptotic data from right ventricle to serve as a non-infarcted control region [24]. Likewise, a long-term evaluation of stem cell engraftment, again in myocardial infarction model, displayed echocardiographic data from normal animals additionally to the sham group [25]. These studies presented the data of a normal untreated animal or tissue for the same reason: to account for the bias inherent to the experimental model even in sham animals. Indeed, *in vitro* experiments usually have a non-treated control group to ponder the experimental results to control the effects of any different treatment or even media culture [26, 27].

In conclusion, our results indicate that any intervention applied to an organism results in some modifications. Sometimes the extent of these modifications are not evident as a major phenotypic alteration such as cardiac hypertrophy, or functional adaptations as occurs in heart failure. Despite the absence of phenotypic/functional modifications, the organism can be under a stress that results in molecular adaptation as demonstrated by the altered gene expression levels in this study. An accurate analysis based on a reliable control group that tries to preserve the most of a naïve animal is of utmost importance to assure unbiased results. Overall, we suggest that animal studies in basic sciences begin to include a small group of naïve animals to serve as reference point.

## REFERENCES

1. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL *et al*: **The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments.** *Clinical chemistry* 2009, **55**(4):611-622.
2. Bustin SA: **Why the need for qPCR publication guidelines?--The case for MIQE.** *Methods* 2010, **50**(4):217-226.
3. Karlen Y, McNair A, Perseguers S, Mazza C, Mermoud N: **Statistical significance of quantitative PCR.** *BMC bioinformatics* 2007, **8**:131.
4. Bustin SA: **Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.** *Journal of molecular endocrinology* 2000, **25**(2):169-193.
5. Sanders R, Mason DJ, Foy CA, Huggett JF: **Evaluation of digital PCR for absolute RNA quantification.** *PloS one* 2013, **8**(9):e75296.
6. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method.** *Methods* 2001, **25**(4):402-408.
7. Ceelen L, De Craene J, De Spiegelaere W: **Evaluation of normalization strategies used in real-time quantitative PCR experiments in HepaRG cell line studies.** *Clinical chemistry* 2014, **60**(3):451-454.
8. Everaert BR, Boulet GA, Timmermans JP, Vrints CJ: **Importance of suitable reference gene selection for quantitative real-time PCR: special reference to mouse myocardial infarction studies.** *PloS one* 2011, **6**(8):e23793.
9. Roberts TC, Coenen-Stass AM, Wood MJ: **Assessment of RT-qPCR normalization strategies for accurate quantification of extracellular microRNAs in murine serum.** *PloS one* 2014, **9**(2):e89237.

10. Martino A, Cabiati M, Campan M, Prescimone T, Minocci D, Caselli C, Rossi AM, Giannessi D, Del Ry S: **Selection of reference genes for normalization of real-time PCR data in minipig heart failure model and evaluation of TNF-alpha mRNA expression.** *Journal of biotechnology* 2011, **153**(3-4):92-99.
11. Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF: **Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets.** *Cancer research* 2004, **64**(15):5245-5250.
12. Mestdagh P, Van Vlierberghe P, De Weer A, Muth D, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J: **A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization.** *Genome biology* 2009, **10**(6):R64.
13. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F: **Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes.** *Genome biology* 2002, **3**(7):RESEARCH0034.
14. Tsai MM, Wang CS, Tsai CY, Huang CG, Lee KF, Huang HW, Lin YH, Chi HC, Kuo LM, Lu PH *et al*: **Circulating microRNA-196a/b are novel biomarkers associated with metastatic gastric cancer.** *European journal of cancer* 2016, **64**:137-148.
15. Bergeat D, Fautrel A, Turlin B, Merdrignac A, Rayar M, Boudjema K, Coulouarn C, Sulpice L: **Impact of stroma LOXL2 overexpression on the prognosis of intrahepatic cholangiocarcinoma.** *The Journal of surgical research* 2016, **203**(2):441-450.
16. Brunet Vega A, Pericay C, Moya I, Ferrer A, Dotor E, Pisa A, Casalots A, Serra-Aracil X, Oliva JC, Ruiz A *et al*: **microRNA expression profile in stage III colorectal cancer: circulating miR-18a and miR-29a as promising biomarkers.** *Oncology reports* 2013, **30**(1):320-326.

17. Fratta LX, Hoss GR, Longo L, Uribe-Cruz C, da Silveira TR, Vieira SM, Kieling CO, Dos Santos JL: **Hypoxic-ischemic gene expression profile in the isolated variant of biliary atresia.** *Journal of hepato-biliary-pancreatic sciences* 2015, **22**(12):846-854.
18. Goldraich LA, Martinelli NC, Matte U, Cohen C, Andrades M, Pimentel M, Biolo A, Clausell N, Rohde LE: **Transcoronary gradient of plasma microRNA 423-5p in heart failure: evidence of altered myocardial expression.** *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals* 2014, **19**(2):135-141.
19. Futscher BW: **Epigenetic changes during cell transformation.** *Advances in experimental medicine and biology* 2013, **754**:179-194.
20. Alemar B, Izetti P, Gregorio C, Macedo GS, Castro MA, Osvaldt AB, Matte U, Ashton-Prolla P: **miRNA-21 and miRNA-34a Are Potential Minimally Invasive Biomarkers for the Diagnosis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma.** *Pancreas* 2016, **45**(1):84-92.
21. Carstens J, Ozbay A, Topping C, Hansen HE: **Intragraft mRNA cytotoxic molecule expression in renal allograft recipients.** *Transplant immunology* 2009, **20**(4):212-217.
22. Garcia-Pravia C, Galvan JA, Gutierrez-Corral N, Solar-Garcia L, Garcia-Perez E, Garcia-Ocana M, Del Amo-Iribarren J, Menendez-Rodriguez P, Garcia-Garcia J, de Los Toyos JR *et al*: **Overexpression of COL11A1 by cancer-associated fibroblasts: clinical relevance of a stromal marker in pancreatic cancer.** *PloS one* 2013, **8**(10):e78327.
23. Martinelli NC, Cohen C, Pinto GH, Silvello D, Recamonde-Mendonza M, Andrades M, Clausell N, Biolo A, Rohde LE, Matte U: **Differences between physiological and pathological cardiac hypertrophy in microRNA expression.** Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil; 2016.
24. Hu X, Xu Y, Zhong Z, Wu Y, Zhao J, Wang Y, Cheng H, Kong M, Zhang F, Chen Q *et al*: **A Large-Scale Investigation of Hypoxia-Preconditioned Allogeneic Mesenchymal Stem Cells for Myocardial Repair in Nonhuman Primates: Paracrine Activity Without Remuscularization.** *Circulation research* 2016, **118**(6):970-983.



25. Tang XL, Li Q, Rokosh G, Sanganalmath S, Chen N, Ou Q, Stowers H, Hunt G, Bolli R: **Long-Term Outcome of Administration of c-kitPOS Cardiac Progenitor Cells After Acute Myocardial Infarction: Transplanted Cells Do Not Become Cardiomyocytes, but Structural and Functional Improvement and Proliferation of Endogenous Cells Persist for At Least One Year.** *Circulation research* 2016.
26. Li X, Kong M, Jiang D, Qian J, Duan Q, Dong A: **MicroRNA-150 aggravates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cardiac myocyte injury by down-regulating c-myb gene.** *Acta biochimica et biophysica Sinica* 2013, **45**(9):734-741.
27. Li M, Wang N, Zhang J, He HP, Gong HQ, Zhang R, Song TF, Zhang LN, Guo ZX, Cao DS *et al*: **MicroRNA-29a-3p attenuates ET-1-induced hypertrophic responses in H9c2 cardiomyocytes.** *Gene* 2016.

## Figures and Legends

Figure 1

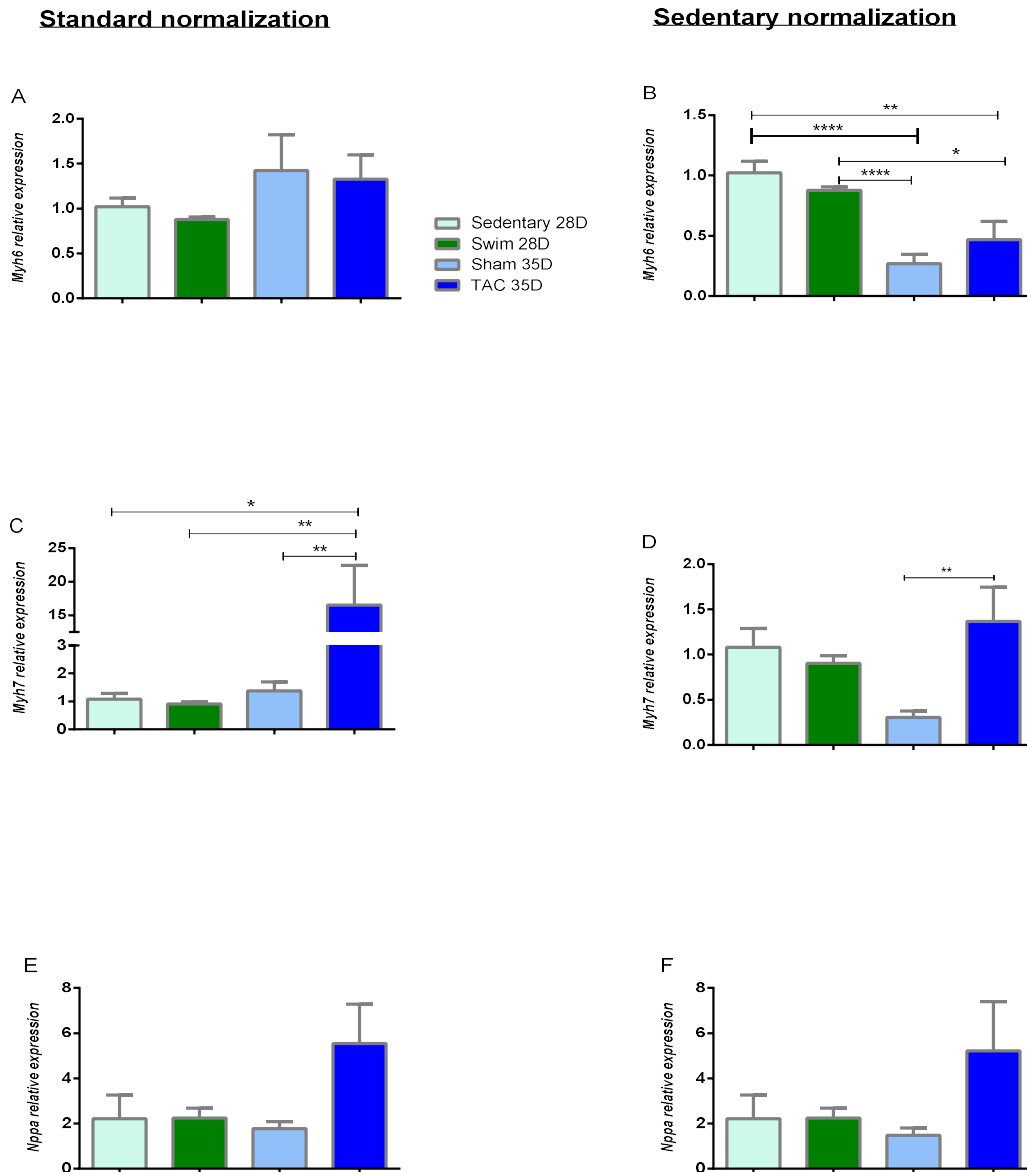


Figure 1. Fetal gene expression demonstrates different pattern depending on its group calibrator. A, C and E show the *Myh6*, *Myh7* and *Nppa* mRNA levels using within group calibrator. B, D and F show the *Myh6*, *Myh7* and *Nppa* mRNA levels using naïve group (sedentary) as calibrator. 1-way ANOVA corrected by Turkey's post-hoc analysis, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*\*p<0.0001.

## ARTIGO II

A ser submetido para a revista  
*Cardiovascular Research*

**Differences between physiological and pathological cardiac hypertrophy in  
microRNA expression**

# Differences between physiological and pathological cardiac hypertrophy in microRNA expression

Brief Title:

microRNA expression in exercise and overload-induced hypertrophy

Nidiane C. Martinelli<sup>1,3</sup>, Carolina R. Cohen<sup>1,3</sup>, Graziela H. Pinto<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>, Andréia Biolo<sup>1,2</sup>, Luis E. Rohde<sup>1,2,3</sup>, Ursula Matte<sup>1,3</sup>

1 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,

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

3 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:

**Prof. Dr. Ursula Matte**

Post-Graduate Program in Genetics and Molecular Biology and Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre  
Porto Alegre, RS, Brazil - [www.hcpa.ufrgs.br](http://www.hcpa.ufrgs.br)  
Phone: (51) 3359-8844

## ABSTRACT

Hypertrophy can be induced by physiological stimuli such as exercise, or by pathological trigger as hypertension. Despite its similarity, the pathological hypertrophy evolves to cardiac dysfunction and failure whereas the adaptive one does not. This fine tune regulation over these processes are fundamental to understand how they can be so distinct. Lately, microRNAs have been linked to many cardiovascular diseases, including cardiac hypertrophy and dysfunction. Our aim was to identify differences in the microRNA profile expression between physiological and pathological hypertrophy. We compared swim-induced hypertrophy samples (SWIM) against transverse aortic constriction (TAC) model of hypertrophy using microRNA microarray from Affymetrix. Data were analyzed from samples collected 28 days after the first day of swimming and 35 days post-TAC surgery. Interestingly, TAC group presented 12 upregulated microRNAs (miR-193a-3p, miR-299a-5p, miR-127-5p, miR-214-5p, miR-188-5p, miR-326-3p, miR-6395, miR-547-3p, miR-199a-5p, miR-381-3p, miR-223-3p and miR-199b-5p) and 8 downregulated microRNAs compared to SWIM group (miR-708-5p, miR-30c-1-3p, miR-22-5p, miR-6921-5p, miR-30a-3p, miR-30e-3p, miR-27a-5p and miR-6975-5p). Moreover, only 3 microRNAs, miR-21a-5p, miR-206-3p and miR-1983, were upregulated in both pathological and physiological hypertrophy, compared to SHAM and SED, respectively. We also observed many biological pathways possible targeted by those microRNAs deregulated in physiological and pathological hypertrophy such as AKT/PI3K, mTOR, Hippo and others. In conclusion, we identified 20 microRNAs that were differentially expressed between physiological and pathological models of cardiac adaptation.

**KEY WORDS:** cardiac hypertrophy; physiological hypertrophy; TAC-induced hypertrophy; exercise; microRNAs.

## INTRODUCTION

Left ventricular hypertrophy (LVH) occurs as an initial compensation mechanism in response to diverse cardiac stresses that can advance to heart failure<sup>1,2</sup>. Maladaptive LVH is characterized by pathological collagen deposition (interstitial fibrosis), altered protein abundance and actin-cytoskeletal reorganization, resulting in chamber enlargement, wall thinning, diastolic dysfunction and/or systolic dysfunction. All this process might lead to a limited prognosis<sup>3,4</sup> and are considered an independent cardiovascular risk factors<sup>1,2</sup>.

However, left ventricular hypertrophy can be also induced by physiological stimuli such as maturation in infancy and childhood, pregnancy and exercise<sup>5-7</sup>, called adaptive hypertrophy or physiological hypertrophy. The increased cardiac preload and afterload observed in chronic intensive exercise is associated with symmetrical enlargement of all cardiac chambers which contrasts to the asymmetrical growth found in pathological hypertrophy<sup>8</sup>. Sometimes differentiating physiological cardiac hypertrophy as a result of exercise from structural cardiac pathology may be challenging because of the phenotypic crossover between the "hearts of athletes" and mild forms of cardiomyopathy<sup>5</sup>. For this reason, distinguishing the molecular mechanisms underlying the physiological and pathological hypertrophy will help to modulate the maladaptive hypertrophy and avoid its development into heart failure.

The role of microRNA (miR) in cardiac hypertrophy, either physiological or pathological, have been previously evaluated<sup>9-14</sup>. Recently, our group has shown that a set of miRs is dysregulated in physiological hypertrophy induced by spontaneous exercise

in wheels, such as the downregulation of miR-26b and the upregulation of miR-27a, miR-150 and miR-143<sup>15</sup>. Similarly, Fernandes et al., also demonstrated that aerobic exercise training promotes physiological cardiac remodeling involving dysregulation of multiple microRNAs<sup>16</sup>. Interestingly, Lin and cols<sup>17</sup>, demonstrated that miR-154 expression was increased in pathological hypertrophy and decreased in physiological hypertrophy mediated by PI3K overexpression<sup>18</sup>. Inhibition of miR-154 attenuated pathological cardiac remodeling and lung congestion while anti-miR-154 treatment was associated with preservation of cardiac function<sup>18</sup>.

Understanding the microRNA differences between physiological and pathological hypertrophy might be used as a tool towards the discovery of new therapeutic targets against maladaptive hypertrophy and heart failure. The purpose of the current protocol was to investigate the difference in the profile of microRNAs expression in a cardiac pressure overload model of hypertrophy induced by transverse aortic constriction and a physiological model of hypertrophy induced by regular swimming.

## **METHODS**

### *Animals*

All animals were treated in accordance with the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals prepared by the National Academy of Sciences and published by the National Institutes of Health (NIH publication no. 85-23, Revised 1996). The protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Use in Research of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Project numbers #11-0470, #12-0259, #11-0473, and #14-



0082). Eight to fourteen week-old male Balb/c mice were studied and kept at the experimental animal facility in the Research Center of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, under light and dark cycles of 12 hours, room temperature ranging from 20-25°C, and water and chow ad libitum. The animals were divided into four groups: sedentary (SED, N=12), swimming (SWIM, N=15), operated but non-constricted (SHAM, N=20) and operated with transverse aortic constriction (TAC, N=20). Analyses were performed after 28 days (SED and SWIM) and 35 for SHAM and TAC groups.

### ***Models of cardiac hypertrophy***

#### *Physiological cardiac hypertrophy – Swimming protocol*

Animals were randomly allocated to sedentary (SED) or exercise-training groups (SWIM) to be evaluated after 28 days of swimming protocol. The water temperature for swimming training was 30-32°C during all sessions. Briefly, during the first week the load of exercise was increased by 10 min every day, starting with 20 minutes in day 1 until the fifth day, then in the sixth and seventh days the time was increased by 15 minutes every day, reaching a total of 90 minutes per day. Thereafter, the training session occurred in a frequency of 5 days per week, for 90 minutes per day, until the twenty-eighth day. To minimize the influence of water stress, sedentary animals were placed in the pool for five minutes twice a week during the experimental protocol <sup>19</sup>.

### *Pathological cardiac hypertrophy*

Transverse aortic constriction (TAC) was conducted as described previously<sup>20-22</sup>. Briefly, mice were anesthetized with 2.5% isoflurane in 0.1mL O<sub>2</sub> and intubated for mechanical ventilation (Model 687, Harvard Apparatus). Mice were ventilated with a constant volume of 0.2 mL and a respiratory rate of 140 breaths per minute. Animals were placed on a heating pad at 37°C and surgical procedures were performed using a stereo microscope (Leica M80). An incision was made on the sternum and the aortic arch was exposed and tied off (6-0 silk suture) together against a 26G (Ø 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 (0.1 mg/kg s.c.) for analgesia. The procedure in SHAM mice were identical, but without the aorta constriction. All mice were allowed to recover in a 37°C recovery chamber with oxygen supplied overnight.

### *Heart weighing and tissue collection*

To avoid water stress, the tissue collection from animals from the swimming and sedentary groups was performed 24 hours after the last swimming session, which was 28 days after the first training. For TAC and SHAM groups tissues were harvested after 35 days from initial surgery. All the animals were weighed and anesthetized with xylazine (100 mg/kg) and ketamine (10 mg/kg), followed by surgical chest opening and rapid excision of the heart. Then, the atriums and the right ventricle were excised to isolate the

left ventricle. The left and right ventricles were weighed to calculate the left ventricle to body weight ratio (LV/BW in mg/g).

### ***mRNA and microRNA extraction and quantitative real time PCR***

Total RNA and miRs were extracted with a miRNAeasy mini kit (Qiagen, USA) from LV samples, according to the manufacturer's instructions. Total RNAs and the portion that was enriched for miRs were stored at -80°C for subsequent molecular analyses. The concentration of RNA was determined by NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Tech., DE).

The reverse transcription (RT) reactions were processed from total RNA using High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions. mRNA levels were evaluated using TaqMan® Gene Expression Assays probes (Applied Biosystems Inc., USA) and the data was normalized for glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (*Gapdh*). The qRT-PCR reactions were run in triplicate in a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Inc., USA). The relative expression of each gene was calculated with the comparative threshold cycle ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) method <sup>23</sup>.

### ***Microarray analysis and functional enrichment of microRNAs target genes***

We selected a subgroup of 20 samples to perform the microarray analysis based on left ventricular weight, LVW/TL ratio and Nppa gene expression levels. We included animals from the extremes of all groups to make sure we had hypertrophied hearts on

TAC and SWIM groups compared to SED and SHAM groups. Data from the subgroup included in the microarray are presented in Table 1.

Each of the 20 samples were subjected to analysis on the GeneChip Scanner 3000 7G Affymetrix platform. Hybridization, washing and staining were performed using GeneChip® Hybridization, Wash, and Stain Kit (GeneChip® miRNA 4.0 Array and Flashtag™ Bundle, Affymetrix), and scanning was performed using GeneChip Scanner 3000 7G Affymetrix. We also included the GeneChip® Hybridization Control Kit for controls and normalization purposes. All the procedures were executed according to the manufacturer's instructions (Affymetrix).

To explore the functional consequences of differentially expressed microRNAs, we first determined their target genes by integrating experimentally validated targets with computationally predicted targets. A set of microRNA-target interactions with experimental support was collected from miRTarBase (release 6.0)<sup>24</sup>, restricting for interactions classified as functional, including those with weak evidence. In addition, three computational tools for target genes prediction were accessed, namely starBase v2.0<sup>25</sup>, TargetScan (release 6.2)<sup>26</sup> and Diana Micro T v4.0<sup>27</sup>, and data was filtered to reduce false positives among predicted targets. For starBase v2.0, target sites were required to be predicted by at least two of the five softwares in addition to the experimental support from CLIP-Seq data. For TargetScan (release 6.2), only predictions with total context score less than -0.3 and context score percentile higher than 50 were kept. Finally, Diana MicroT v4.0 predictions were filtered using a score cutoff of 0.5. All microRNAs identifiers were mapped to annotations from miRBase version 21 in order to allow consistent data

integration. The union of all target genes retrieved from the microRNA-target interactions obtained from the aforementioned sources was used for further analyses.

Next, we performed functional enrichment analysis of target genes using biological pathways annotation from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome (KEGG) database <sup>28</sup> and the clusterProfiler R package <sup>29</sup> through the enrichKEGG(?) function. Pathways annotated under the “Cancers: Overview” and “Cancers: specific types” categories were removed from the analysis. Over-representation of functional categories was investigated both for the sets of genes targeted by up regulated and down-regulated microRNAs, and for the target genes of each microRNA separately. Statistical significance of enriched functional categories was estimated based on a hypergeometric test and corrected for multiple hypotheses testing using the False Discovery Rate method. KEGG terms with an adjusted p-value < 0.05 were considered strongly over-represented for the gene sets analyzed.

### ***Statistical analysis***

All values are expressed as the mean  $\pm$  SD or SEM. Comparisons of parameters among three or more groups were analyzed by a one-way ANOVA for single factors, followed by Turkey’s correction for multiple comparisons. A two-tailed p value <0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 6 for Windows.

## RESULTS

### *Morphological Effect of Interventions*

The animals from the SWIM group were lighter than the SHAM and TAC group probably because of the caloric waste related to the daily swimming protocol (Figure 1A and 1B,  $p < 0.05$  for both) also, sedentary animals were not different from SHAM animals (Figure 1A,  $p > 0.05$ ). The heart weight increased 20% in TAC animals compared to SHAM ( $p < 0.001$ ) and 29% compared to SWIM group ( $p < 0.0001$ ) as depicted in Figure 1B. When compared to sedentary animals, TAC group had an increase of 38% in heart weight ( $p < 0.0001$ ), and the SWIM group had an increase of 7% compared to sedentary animals (Figure 1B). The right ventricular weight was similar among all groups (data not shown), whereas the left ventricle was heavier in the TAC group compared to SHAM animals (increased by 25%,  $p < 0.0001$ ), compared to SWIM (increased by 19%,  $p < 0.001$ ) and SED animals (increased by 36%,  $p < 0.0001$ ) as depicted in Figure 1C. The ratio between LV weight and tibia length (LVW/TL) is not affected by animal weight or body edema and is a more representative measurement of LVH. Left ventricle weight/tibia length ratio (LVW/TL – mg/mm) was greater in TAC animals compared to the SHAM group (increased by 24%,  $p < 0.0001$ ) as well as compared to the SED group (14% higher,  $p < 0.0001$ ), as shown in Figure 1D. Similarly, the SWIM group had a greater LVW/TL than SED animals (increased by 15%,  $p < 0.05$ ), although it was smaller than the hypertrophy observed in TAC group (20% higher in TAC animals,  $p < 0.001$ ), showed also in Figure 1D.

## Fetal Gene Analysis

Reactivation of fetal gene expression patterns has been demonstrated to play a crucial role in cardiac diseases, including LVH<sup>30, 31</sup>. The switch from adult  $\alpha$ -myosin heavy chain (MHC) isoform (*Myh6*) to fetal  $\beta$ -MHC isoform (*Myh7*) is a well-known process during cardiac hypertrophy as well the robust expression of B-type natriuretic peptide (BNP) in heart failure and hypertrophy<sup>32</sup>.

We analyzed the fetal gene reprogramming in both models of hypertrophy including *Myh6*, *Myh7* and *Nppa* gene expression. The gene expression of *Myh6* was similar between the SED and SWIM groups (Figure 2A). However, the SHAM group demonstrated a decrease in *Myh6* expression compared to the SWIM and SED groups ( $p < 0.0001$  for both analyses). Additionally, the TAC group also demonstrated a reduction in *Myh6* expression levels compared to SWIM ( $p < 0.05$ ) and SED ( $p < 0.01$ ) groups (Figure 2A). Levels of *Myh7* were increased only in TAC animals compared to SHAM animals as depicted in Figure 2B ( $p < 0.01$ ). We were unable to detect a difference among all groups regarding to the levels of *Nppa* gene expression (Figure 2C).

## MicroRNAs microarray analysis

As discussed above, microRNAs have an important role in many biological processes, including cardiovascular development and disease<sup>33-35</sup>. However, the next generation sequencing and microarray continuously provide new microRNAs that could be involved in many cellular pathways<sup>36, 37</sup>. We used microarray approach to evaluate 3163 microRNAs among the SED, SHAM, SWIM and TAC groups (n=4-6 per group).

Sixty-two microRNAs were deregulated among these groups (Figure 3A,  $p < 0.01$ ; for detailed miR see Supplemental Table 1). We can observe in Figure 3B that there are 19 microRNAs exclusively differentiated in TAC compared to SHAM, as well 15 others miRs that are differentially expressed between SWIM and SED groups ( $p < 0.05$  for both comparisons). Interestingly, only 3 microRNAs, miR-21a-5p, miR-206-3p and miR-1983, were up regulated in both pathological and physiological hypertrophy, compared to SHAM and SED, respectively.

Differential microRNAs expression comparing physiological (SWIM) and pathological (TAC) hypertrophy is depicted in Figure 4. We found 40 microRNAs deregulated in TAC animals compared to SWIM animals: 28 were upregulated microRNAs and only 12 were downregulated (Figure 4A). When we analyzed TAC versus SWIM we found only 20 microRNAs that were deregulated solely between these two groups ( $p < 0.05$  and  $2 < FC < 2$ , Figure 4B). TAC group presented 12 upregulated microRNAs (miR-193a-3p, miR-299a-5p, miR-127-5p, miR-214-5p, miR-188-5p, miR-326-3p, miR-6395, miR-547-3p, miR-199a-5p, miR-381-3p, miR-223-3p and miR-199b-5p) and 8 downregulated microRNAs compared to SWIM group (miR-708-5p, miR-30c-1-3p, miR-22-5p, miR-6921-5p, miR-30a-3p, miR-30e-3p, miR-27a-5p and miR-6975-5p) as depicted in Figure 4B. Comparing the swim animals who presented physiological hypertrophy with sedentary animals we found only 14 microRNAs deregulated, eight of them were upregulated and six were downregulated (Figure 4C).



### *Computationally Predicted Targets and Functional Enriched Analysis*

A total of 4970 microRNA-target gene interactions were retrieved from miRTarBase, starBase, TargetScan and Diana MicroT databases, comprising 17 out of the 20 microRNAs of interest and 3811 genes. Among these, 808 interactions have support from experimental validation and 4162 are based solely on computational prediction (Supplemental Table 2). No target genes were found for mmu-miR-6921-5p, mmu-miR-6395 and mmu-miR-6975-5p with the adopted filtering criteria. Functional enrichment analysis performed with KEGG Pathway database and clusterProfiler returned a total of 4 pathways over-represented among the targets of down-regulated microRNAs (665 genes) and 80 pathways strongly associated with the target genes of up-regulated microRNAs (3394 genes). A total of 248 target genes are shared among up- and down-regulated microRNAs. We selected the most enriched pathways containing the targets from up and down regulated microRNAs ( $p < 0.05$ , Figure 4C). Among them, we should point out the PI3K/Akt signaling, mTOR and apoptosis pathways, all involved in cardiac adaptation and hypertrophy.

## **DISCUSSION**

In this study, we compared physiological cardiac hypertrophy induced by swimming with a pathological model for cardiac hypertrophy induced by TAC. As demonstrated, the TAC model had a greater degree of hypertrophy than the SWIM model. In addition, the fetal gene reprogramming was activated in TAC animals as shown by the change in gene expression levels of Myh6 and Myh7. We were able to detect microRNAs

that were modulated only in TAC hypertrophied hearts compared to the adaptive hypertrophy induced by swimming. These microRNAs could help to comprehend the shift that occurs in the cardiomyocytes that migrates from an adaptive growth to a maladaptive and dysfunctional phenotype.

Out of more than 3000 microRNAs, only 20 were differently expressed between the hypertrophy models. Some of these microRNAs were extensively studied in cardiovascular sciences such as miR-22-5p, miR-30c and miR-214-5p. Our findings show an increase in miR-214-5p levels in TAC hearts which is in accordance with a recent study that demonstrated elevated levels of miR-214 in plasma from heart failure patients and in tissue from explanted hearts affected with severe heart failure<sup>38</sup>. Previous studies have reported an elevation of miR-214 levels after TAC<sup>38, 39</sup> and overexpression of miR-214 in transgenic mice induced the development of cardiac hypertrophy with more severe functional dysfunction with declined LV fractional shortening and ejection fraction, and increased dilation<sup>39</sup>. On the other hand, miR-214 expression levels increased after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment in cardiomyocytes in a dose dependent manner, probably as a defensive response since apoptosis was reduced when cells were treated with pre-miR-214<sup>40</sup>. A miR-214 knockout mice model indicate an increased susceptibility to death after myocardial infarction compared to wild types. They indicated that genetic deletion of miR-214 in mice causes loss of cardiac contractility, increased apoptosis, and excessive fibrosis in response to ischemia/reperfusion injury<sup>41</sup>. It seems that low levels of miR-214 are associated with a better outcome in these experimental models of cardiovascular diseases and perhaps the augmentation in its levels could be, in part, a compensatory mechanism to the heart.

The TAC model of pathological hypertrophy demonstrated reduced levels of expression of miR-30c-1-3p, miR-30a-3p and miR-30e-3p. All these three microRNAs have been studied in myocardial remodeling, cardiomyopathy or other cardiovascular related processes<sup>42, 43, 44, 45, 46</sup>. Levels of miR-30c were reduced in patients with heart failure compared to healthy individuals regardless whether LVEF was reduced or preserved<sup>47</sup>. It was also decreased in patients with aortic stenosis submitted to valve replacement surgery and in animals after TAC<sup>44, 48</sup>. Furthermore, pre-miR-30c conditioned medium had a pro-hypertrophic effect on cardiomyocytes derived from mouse embryonic stem cells and its levels were significantly reduced in a mouse model of pathological but not physiological hypertrophy<sup>48</sup>. Interestingly, miR-30a levels were reduced in cardiac tissue of TAC model but increased in plasma from those animals and in plasma samples from patients with LVH. The treatment of cardiomyocytes with miR-30a mimic attenuated the angiotensin II-induced up-regulation of hypertrophy-related genes and decreased the cardiomyocyte surface area. Conversely, treatment with miR-30a inhibitor enhanced the up-regulation of hypertrophy related genes and increased the surface area of cardiomyocytes induced by Angiotensin II<sup>43</sup>. Moreover, microRNAs belonging to the miR-30 family including miR-30a, -30b, -30c, -30d and -30e were all downregulated in endoplasmic reticulum stress, a common subcellular response to stresses, induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cardiovascular cells<sup>42</sup>. Based on the data above and on our findings it seems that the miR-30 family has an important role in cardiac homeostasis since it is related to cell stress and growth, turning to be a potential biomarker of heart failure.

Previous studies have suggested that miR-22 overexpression induces cardiomyocyte hypertrophy and heart failure<sup>49-52</sup> mediated by impairment of Ca<sup>2+</sup> handling by reducing SERCA2 activity in cardiomyocytes<sup>52</sup>. Conversely, miR-22 knockout mice developed more dilation, reduced ventricular function, accentuated fibrosis and a smaller hypertrophic response to isoproterenol treatment<sup>52</sup>. Similar findings were observed when a cardio-specific miR-22 knockout was evaluated. These animals displayed a small degree of hypertrophy but also reduced LV fractional shortening and progressed to dilated cardiomyopathy<sup>51</sup>. Conceivably the reduced levels of miR-22 found in our pathological model of hypertrophy are also related to a dilated condition and heart failure progression associated with this model.

The role of miR-27a in cardiac failure and hypertrophy is controversial. We found a decrease in miR-27a-5p levels in the TAC animals, in accordance with others studies that showed reduced miR-27a levels in similar models, aortic stenosis and ischemic cardiomyopathy<sup>53-55</sup>. A previous study, however, demonstrated that miR-27 was increased in patients with heart failure compared to healthy subjects<sup>56</sup>. MiR-27a increases  $\beta$ -MHC gene expression in ventricular myocytes and promotes skeletal muscle myoblast proliferation<sup>57, 58</sup>. In addition, miR-27a was demonstrated to modulate  $\beta$ -MHC gene regulation via thyroid hormone signaling and to be upregulated during the differentiation of mouse embryonic stem (ES) cells<sup>58</sup>.

The levels of miR-206 were increased in TAC-induced and exercise-induced hypertrophy, as well as after MI<sup>59</sup>. It has also been associated with glucose-mediated apoptosis in cardiomyocytes<sup>60</sup>, and regulation of myogenic differentiation and increased protein synthesis in post-mitotic cells of the myogenic lineage<sup>61</sup>. Mooren et al evaluated

miRs in plasma of individuals before, directly after, and 24 h after a marathon and analyzed their relation to conventional biochemical, cardiovascular, and performance indexes<sup>62</sup>. MiR-206 had the strongest increase and its levels were correlated to aerobic performance parameters such as maximum oxygen uptake (VO<sub>2</sub>max) and running speed at individual anaerobic lactate threshold<sup>62</sup>. Recently, a study showed that cardiac-specific overexpression of miR-206 in mice induced hypertrophy and protected the heart from ischemia/reperfusion injury; whereas suppression of miR-206 exacerbated ischemia/reperfusion injury and prevented pressure overload induced cardiac hypertrophy<sup>63</sup>. Our findings are in agreement with these reports, showing increase of miR-206 after exercise and after TAC. MiR-206 is a pro-hypertrophic microRNA modulating cardiac growth possibly independent of its stimuli.

MiR-1983 levels were increased in both hypertrophy models. To the best of our knowledge, this is the first time it has been described to be altered in a cardiac hypertrophy models. Edinger et al demonstrated that aldosterone stimulation alters miR expression in mouse cortical collecting duct epithelial cells and could participate as mediators in aldosterone signaling in principal cells of the distal kidney nephron, regulating Na<sup>+</sup> homeostasis<sup>64</sup>. As it is well known, dietary sodium restriction is arguably the most frequent self-care behavior recommended to patients with heart failure and is endorsed by all HF guidelines<sup>65</sup>. Thus, miR-1983 could be a new factor involved in LVH and subsequent failure. Further studies are needed to corroborate this hypothesis.

Because of the capacity of a miR to bind to many different targets, when we analyzed the pathways that altered miRs could be modulating over a hundred KEGG pathways appeared. Therefore, we decided to analyze in depth the top enriched

pathways by miR targets. Some of these pathways are particularly attractive in the processes known to be involved in hypertrophy, such as mTOR, Pi3K, Foxo and apoptosis signaling. For example, it is well known that the PI3K-Akt pathway regulates cardiomyocyte size, survival, angiogenesis, and inflammation in both physiological and pathological cardiac hypertrophy<sup>66-71</sup>. Also, mTOR, which is a downstream target of PI3K-Akt activation, has been found to be associated with the onset of heart failure, is elevated in cardiac tissue from heart failure patients and can prevent cardiac dysfunction in pathological hypertrophy<sup>72</sup>. However, transgenic mice with cardiac-specific overexpression of either dominant negative or constitutively active mTOR showed cardiac hypertrophy similar to WT animals following physiological and pathological stimuli<sup>73</sup>. Those pathways showed up in the functional analysis because they are intrinsically involved in many steps of cardiovascular development, survival and growth.

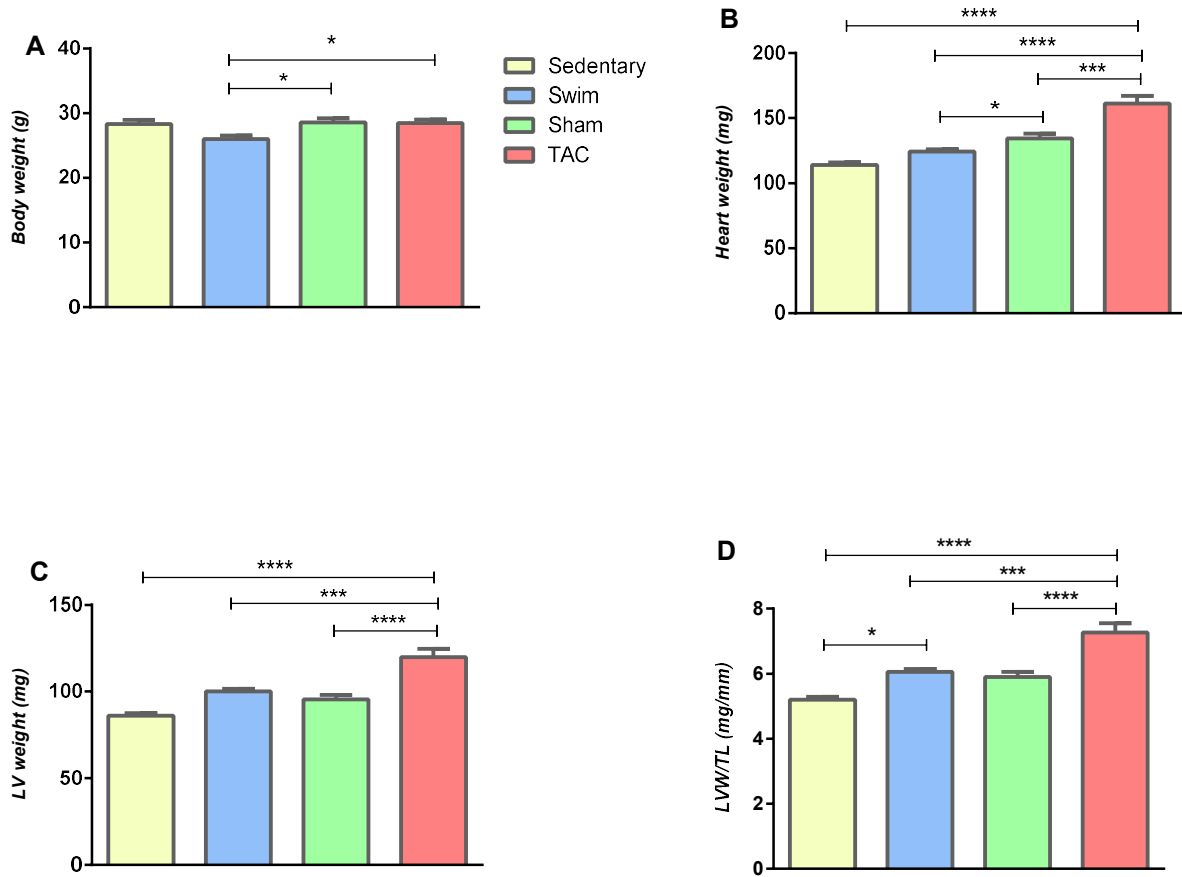
Some methodological aspects of the current protocol deserve consideration. We lack cardiac function analysis to demonstrate the difference between the pathological and physiological hypertrophies. Validation of microarray data by qRT-PCR is also necessary. Moreover, functional studies in cultured cardiomyocytes of specific microRNAs that were deregulated in the current analysis could add important insights related to their function and targets.

In conclusion, we demonstrate that pathological hypertrophy induced by pressure overload is indeed more evident than the physiological hypertrophy induced by swimming. We identified 20 microRNAs that were differentially expressed between these two models of cardiac adaptation. In the future, after validation and functional analysis, these findings

could lead to a novel targets mediated by one of these microRNAs to attenuate pathological hypertrophy.

## FIGURES & LEGENDS

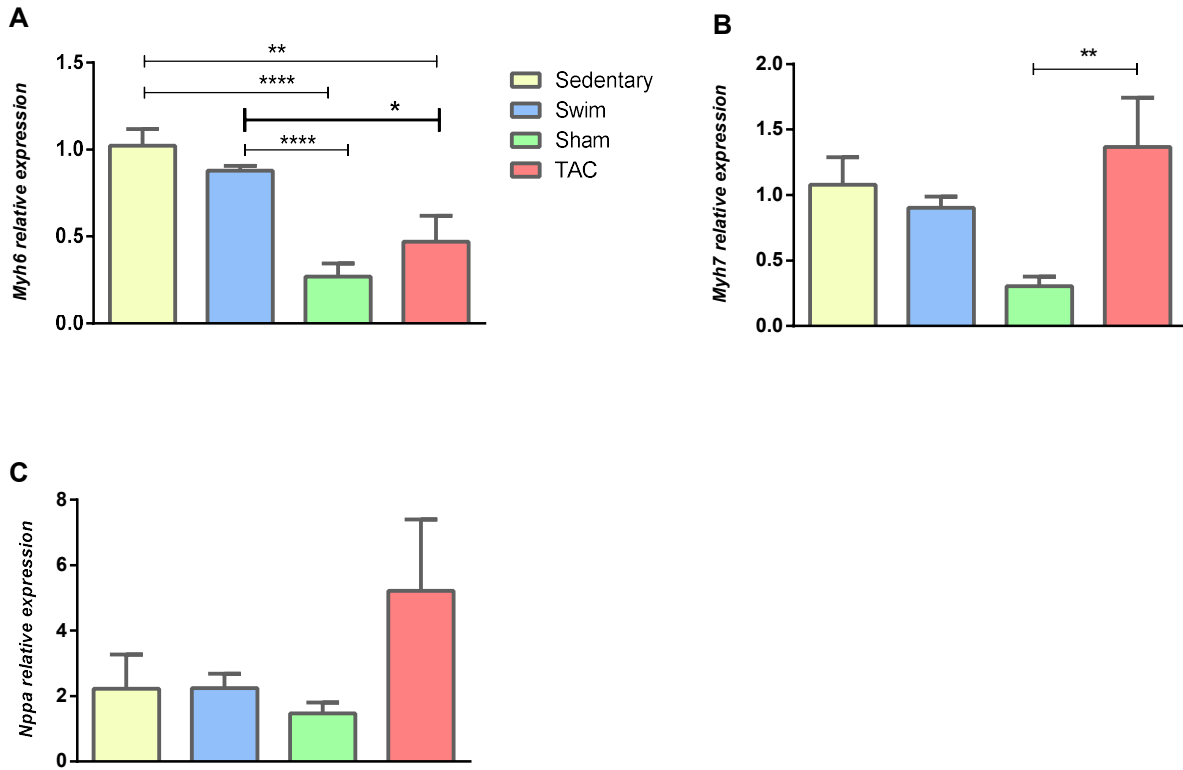
Figure 1



**Figure 1. Characterization of hypertrophic parameters in both models of hypertrophy.** (A) Body weight (grams - g) measured at the last day of the protocols; (B) Heart weight (milligrams – mg); (C) Left ventricle weight (LVW in mg); (D) Left ventricle weight to tibia length ratio (LVW/TL in mg/mm). 1-way ANOVA corrected by Turkey's post-hoc analysis, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .



Figure 2



**Figure 2. mRNA levels of hypertrophic cardiac gene markers.** (A) Myosin Heavy Chain 6 (Myh6) mRNA levels; (B) Myosin Heavy Chain 7 (Myh7) mRNA levels; (C) Natriuretic Peptide A (Nppa) mRNA levels; All data were normalized to sedentary gene groups. 1-way ANOVA corrected by Turkey's post-hoc analysis, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

*Table 1. Hypertrophic parameters from animals submitted to microarray analysis of microRNA expression.*

	<b>Body (g)</b>	<b>Heart (mg)</b>	<b>LV (mg)</b>	<b>VD (mg)</b>	<b>LV/TL Ratio</b>	<b><i>Nppa</i> Levels</b>
<b>Sedentary</b>	29±1.8	112±3.3	83±2.9	29±1.2	5.0±0.2	1.3±0.6
<b>SHAM</b>	27±0.6	127±10.6	91±4.9	24±2.9	5.7±0.4	2.6±0.3
<b>SWIM</b>	26±1.6 <sup>a</sup>	130±4.8	105±3.7 <sup>b</sup>	26±2.5	6.3±0.2 <sup>c</sup>	2.8±0.5
<b>TAC</b>	27±1.3	193±25.3 <sup>a, d, f</sup>	143±14.0 <sup>b, f, g</sup>	26.5±4.4	8.7±0.6 <sup>b, f, g</sup>	11.3±3.9 <sup>a</sup>
<b>ANOVA P-value</b>	<b>0.06</b>	<b>0.01</b>	<b>&lt; 0.0001</b>	<b>NS</b>	<b>&lt; 0,0001</b>	<b>0.01</b>

Data are presented in mean SD, except *Nppa* levels that are presented in mean±SEM. *Nppa* levels were normalized to sedentary groups. 1-way ANOVA corrected by Turkey's post-hoc analysis.

<sup>a</sup>*p*<0.05 vs Sedentary;

<sup>b</sup>*p*<0.01 vs Sedentary;

<sup>c</sup>*p*<0.001 vs Sedentary;

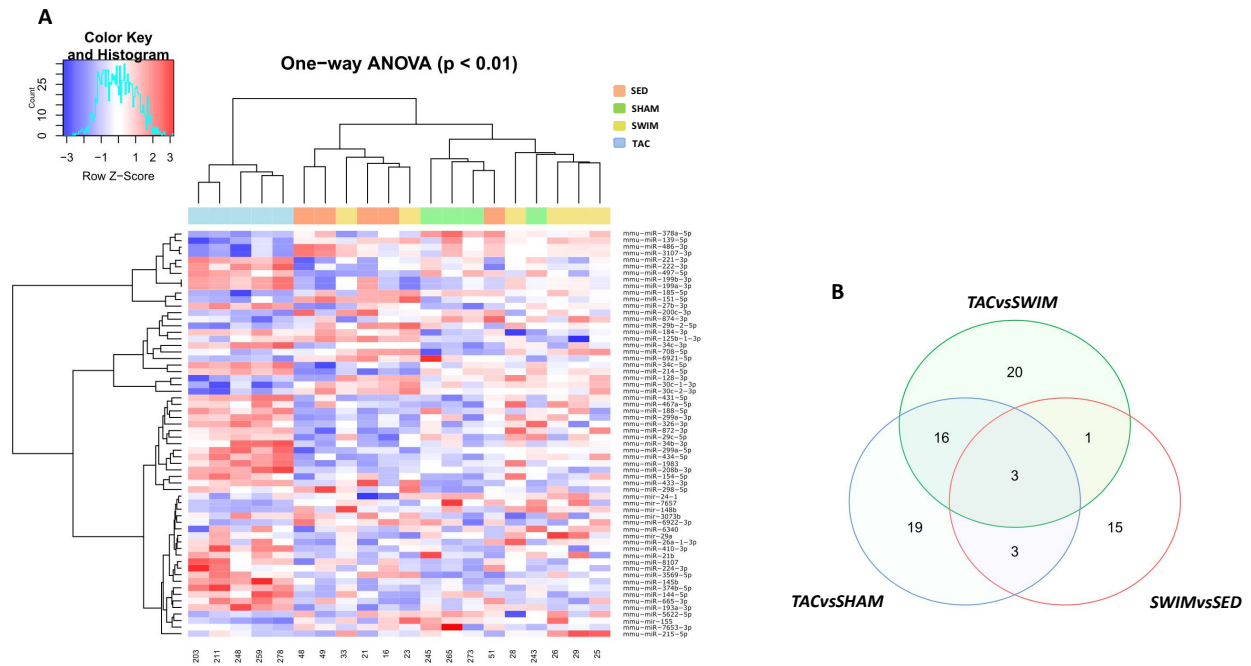
<sup>d</sup>*p*<0.0001 vs SHAM;

<sup>e</sup>*p*<0.05 vs SWIM;

<sup>f</sup>*p*<0.0001 vs SWIM;

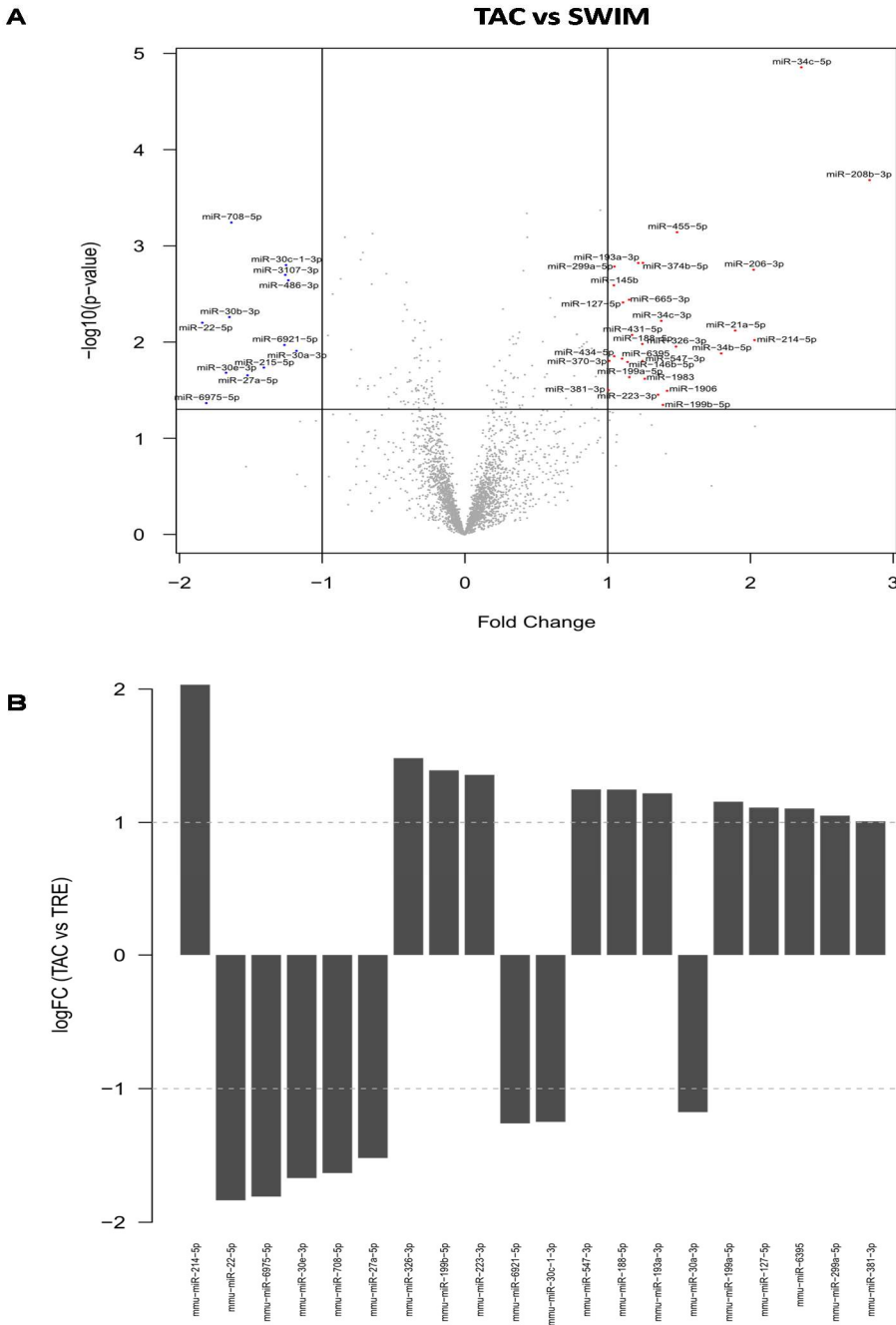
<sup>g</sup>*p*<0.0001 vs Sedentary;

Figure 3



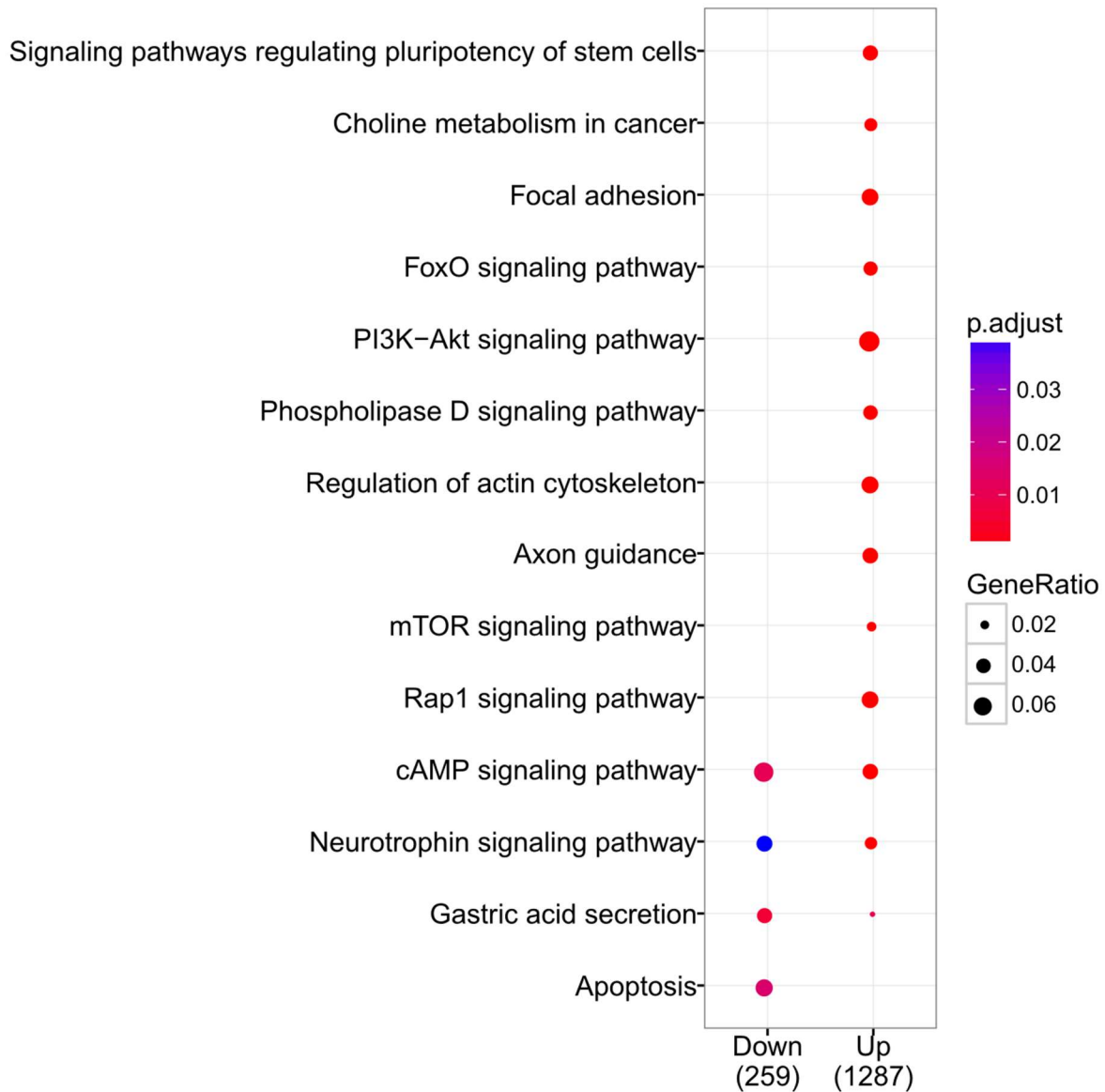
**Figure 3. MicroRNA microarray expression.** (A) Heat map for microRNAs expression levels in Sedentary (SED), SHAM, SWIM and TAC groups. Red indicates upregulated and blue indicates down regulated microRNAs. Data we compared by 1-way ANOVA with Welch's modification. Only comparisons with  $p < 0.01$ , and  $FC > 2$  or  $FC < -2$  are showed; (B) Venn diagram showing the number of microRNAs deregulated, either down or upregulated, in pairwise comparisons. Differential Expression (DE) Criterion:  $FC > 2$  or  $FC < -2$ , and  $p$ -value  $< 0.05$ .

Figure 4



**Figure 4. MicroRNA expression in cardiac pathological compared to physiological hypertrophy. (A)** Volcano plot showing microRNA expression data. Red dots indicate upregulated microRNAs and blue dots indicate downregulated microRNAs. The magnitude of fold-changes are showed in X-axis while the statistical significance ( $-\log_{10}$  of p-value) is on Y-axis. **(B)** microRNAs deregulated only between pathological and physiological hypertrophy. Differential Expression (DE) Criterion:  $FC > 2$  or  $FC < -2$ , and p-value  $< 0.05$ .

Figure 5



**Figure 5. Pathways target by microRNAs differentially expressed between physiological and pathological hypertrophy.** The graph shows the top 10 KEGG enriched pathways with the potential microRNAs targets derived from microRNAs that were down regulated or upregulated ( $p < 0.05$ ) when physiological and pathological hypertrophy were compared. For the down-regulated microRNAs, only four pathways met the conditions to be included.

## REFERENCES

1. Shenasa M, Shenasa H, El-Sherif N. Left ventricular hypertrophy and arrhythmogenesis. *Cardiac electrophysiology clinics*. 2015;7:207-220
2. Stevens SM, Reinier K, Chugh SS. Increased left ventricular mass as a predictor of sudden cardiac death: Is it time to put it to the test? *Circulation. Arrhythmia and electrophysiology*. 2013;6:212-217
3. Kooij V, Viswanathan MC, Lee DI, Rainer PP, Schmidt W, Kronert WA, Harding SE, Kass DA, Bernstein SI, Van Eyk JE, Cammarato A. Profilin modulates sarcomeric organization and mediates cardiomyocyte hypertrophy. *Cardiovascular research*. 2016
4. Lorell BH, Carabello BA. Left ventricular hypertrophy: Pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation*. 2000;102:470-479
5. Kim JH, Baggish AL. Differentiating exercise-induced cardiac adaptations from cardiac pathology: The "grey zone" of clinical uncertainty. *The Canadian journal of cardiology*. 2015
6. Kovacs R, Baggish AL. Cardiovascular adaptation in athletes. *Trends in cardiovascular medicine*. 2016;26:46-52
7. Link MS. Cardiovascular adaptation in athletes. *Trends in cardiovascular medicine*. 2016;26:53-54
8. Sharma S, Merghani A, Mont L. Exercise and the heart: The good, the bad, and the ugly. *European heart journal*. 2015;36:1445-1453
9. van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, Richardson JA, Olson EN. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103:18255-18260
10. Tatsuguchi M, Seok HY, Callis TE, Thomson JM, Chen JF, Newman M, Rojas M, Hammond SM, Wang DZ. Expression of microRNAs is dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2007;42:1137-1141
11. 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. *Journal of cellular biochemistry*. 2015;116:2166-2176
12. Huang X, Li Z, Bai B, Li X, Li Z. High expression of microRNA-208 is associated with cardiac hypertrophy via the negative regulation of the sex-determining region y-box 6 protein. *Experimental and therapeutic medicine*. 2015;10:921-926
13. Fernandes T, Hashimoto NY, Magalhaes FC, Fernandes FB, Casarini DE, Carmona AK, Krieger JE, Phillips MI, Oliveira EM. Aerobic exercise training-induced left

ventricular hypertrophy involves regulatory micrnas, decreased angiotensin-converting enzyme-angiotensin ii, and synergistic regulation of angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin (1-7). *Hypertension*. 2011;58:182-189

14. Abdellatif M. Differential expression of micrnas in different disease states. *Circulation research*. 2012;110:638-650

15. 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 micrnas in an experimental model of physiological left ventricular hypertrophy. *PloS one*. 2014;9:e93271

16. Fernandes T, Barauna VG, Negrao CE, Phillips MI, Oliveira EM. Aerobic exercise training promotes physiological cardiac remodeling involving a set of micrnas. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2015;309:H543-552

17. Lin RC, Weeks KL, Gao XM, Williams RB, Bernardo BC, Kiriazis H, Matthews VB, Woodcock EA, Bouwman RD, Mollica JP, Speirs HJ, Dawes IW, Daly RJ, Shioi T, Izumo S, Febbraio MA, Du XJ, McMullen JR. Pi3k(p110 alpha) protects against myocardial infarction-induced heart failure: Identification of pi3k-regulated mirna and mrna. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010;30:724-732

18. Bernardo BC, Nguyen SS, Gao XM, Tham YK, Ooi JY, Patterson NL, Kiriazis H, Su Y, Thomas CJ, Lin RC, Du XJ, McMullen JR. Inhibition of mir-154 protects against cardiac dysfunction and fibrosis in a mouse model of pressure overload. *Scientific reports*. 2016;6:22442

19. Evangelista FS, Brum PC, Krieger JE. Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. *Braz J Med Biol Res*. 2003;36:1751-1759

20. de Almeida AC, van Oort RJ, Wehrens XH. Transverse aortic constriction in mice. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2010

21. van Nierop BJ, van Assen HC, van Deel ED, Niesen LB, Duncker DJ, Strijkers GJ, Nicolay K. Phenotyping of left and right ventricular function in mouse models of compensated hypertrophy and heart failure with cardiac mri. *PloS one*. 2013;8:e55424

22. Rockman HA, Ross RS, Harris AN, Knowlton KU, Steinhilper ME, Field LJ, Ross J, Jr., Chien KR. Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88:8277-8281

23. 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

24. 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 research*. 2014;42:D78-85
25. Li JH, Liu S, Zhou H, Qu LH, Yang JH. Starbase v2.0: Decoding mirna-cerna, mirna-ncrna and protein-rna interaction networks from large-scale clip-seq data. *Nucleic acids research*. 2014;42:D92-97
26. 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
27. Maragkakis M, Vergoulis T, Alexiou P, Reczko M, Plomaritou K, Gousis M, Kourtis K, Koziris N, Dalamagas T, Hatzigeorgiou AG. Diana-microt web server upgrade supports fly and worm mirna target prediction and bibliographic mirna to disease association. *Nucleic acids research*. 2011;39:W145-148
28. Kanehisa M, Goto S. Kegg: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research*. 2000;28:27-30
29. Yu G, Wang LG, Han Y, He QY. Clusterprofiler: An r package for comparing biological themes among gene clusters. *Omics : a journal of integrative biology*. 2012;16:284-287
30. Rajabi M, Kassiotis C, Razeghi P, Taegtmeyer H. Return to the fetal gene program protects the stressed heart: A strong hypothesis. *Heart failure reviews*. 2007;12:331-343
31. Barry SP, Davidson SM, Townsend PA. Molecular regulation of cardiac hypertrophy. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2008;40:2023-2039
32. Kuwahara K, Nishikimi T, Nakao K. Transcriptional regulation of the fetal cardiac gene program. *Journal of pharmacological sciences*. 2012;119:198-203
33. Wang J, Liew OW, Richards AM, Chen YT. Overview of micrnas in cardiac hypertrophy, fibrosis, and apoptosis. *International journal of molecular sciences*. 2016;17
34. Hammond SM. An overview of micrnas. *Advanced drug delivery reviews*. 2015;87:3-14
35. Divakaran V, Mann DL. The emerging role of micrnas in cardiac remodeling and heart failure. *Circulation research*. 2008;103:1072-1083
36. Chini VP. Micro-rnas and next generation sequencing: New perspectives in heart failure. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2015;443:114-119
37. Wu C, Arora P, Agha O, Hurst LA, Allen K, Nathan DI, Hu D, Jiramongkolchai P, Smith JG, Melander O, Trenson S, Janssens SP, Domian I, Wang TJ, Bloch KD, Buys ES, Bloch DB, Newton-Cheh C. Novel microrna regulators of atrial natriuretic peptide production. *Molecular and cellular biology*. 2016;36:1977-1987



38. Duan Q, Yang L, Gong W, Chaugai S, Wang F, Chen C, Wang P, Zou MH, Wang DW. MicroRNA-214 is upregulated in heart failure patients and suppresses xbp1-mediated endothelial cells angiogenesis. *Journal of cellular physiology*. 2015;230:1964-1973
39. Yang T, Gu H, Chen X, Fu S, Wang C, Xu H, Feng Q, Ni Y. Cardiac hypertrophy and dysfunction induced by overexpression of mir-214 in vivo. *The Journal of surgical research*. 2014;192:317-325
40. Lv G, Shao S, Dong H, Bian X, Yang X, Dong S. MicroRNA-214 protects cardiac myocytes against h2o2-induced injury. *Journal of cellular biochemistry*. 2014;115:93-101
41. Aurora AB, Mahmoud AI, Luo X, Johnson BA, van Rooij E, Matsuzaki S, Humphries KM, Hill JA, Bassel-Duby R, Sadek HA, Olson EN. MicroRNA-214 protects the mouse heart from ischemic injury by controlling ca(2)(+) overload and cell death. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122:1222-1232
42. Chen M, Ma G, Yue Y, Wei Y, Li Q, Tong Z, Zhang L, Miao G, Zhang J. Downregulation of the mir-30 family microRNAs contributes to endoplasmic reticulum stress in cardiac muscle and vascular smooth muscle cells. *International journal of cardiology*. 2014;173:65-73
43. Pan W, Zhong Y, Cheng C, Liu B, Wang L, Li A, Xiong L, Liu S. Mir-30-regulated autophagy mediates angiotensin ii-induced myocardial hypertrophy. *PloS one*. 2013;8:e53950
44. Duisters RF, Tijssen AJ, Schroen B, Leenders JJ, Lentink V, van der Made I, Herias V, van Leeuwen RE, Schellings MW, Barenbrug P, Maessen JG, Heymans S, Pinto YM, Creemers EE. Mir-133 and mir-30 regulate connective tissue growth factor: Implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling. *Circulation research*. 2009;104:170-178, 176p following 178
45. Zhang BW, Cai HF, Wei XF, Sun JJ, Lan XY, Lei CZ, Lin FP, Qi XL, Plath M, Chen H. Mir-30-5p regulates muscle differentiation and alternative splicing of muscle-related genes by targeting mbnl. *International journal of molecular sciences*. 2016;17
46. Li Y, Maegdefessel L. My heart will go on-beneficial effects of anti-mir-30 after myocardial infarction. *Annals of translational medicine*. 2016;4:144
47. Watson CJ, Gupta SK, O'Connell E, Thum S, Glezeva N, Fendrich J, Gallagher J, Ledwidge M, Grote-Levi L, McDonald K, Thum T. MicroRNA signatures differentiate preserved from reduced ejection fraction heart failure. *European journal of heart failure*. 2015;17:405-415
48. Abonnenc M, Nabeebaccus AA, Mayr U, Barallobre-Barreiro J, Dong X, Cuello F, Sur S, Drozdov I, Langley SR, Lu R, Stathopoulou K, Didangelos A, Yin X, Zimmermann WH, Shah AM, Zampetaki A, Mayr M. Extracellular matrix secretion by cardiac fibroblasts: Role of microRNA-29b and microRNA-30c. *Circulation research*. 2013;113:1138-1147

49. Huang ZP, Wang DZ. Mir-22 in cardiac remodeling and disease. *Trends in cardiovascular medicine*. 2014;24:267-272
50. Gurha P, Wang T, Larimore AH, Sassi Y, Abreu-Goodger C, Ramirez MO, Reddy AK, Engelhardt S, Taffet GE, Wehrens XH, Entman ML, Rodriguez A. MicroRNA-22 promotes heart failure through coordinate suppression of ppar/err-nuclear hormone receptor transcription. *PLoS one*. 2013;8:e75882
51. Huang ZP, Chen J, Seok HY, Zhang Z, Kataoka M, Hu X, Wang DZ. MicroRNA-22 regulates cardiac hypertrophy and remodeling in response to stress. *Circulation research*. 2013;112:1234-1243
52. Gurha P, Abreu-Goodger C, Wang T, Ramirez MO, Drumond AL, van Dongen S, Chen Y, Bartonicek N, Enright AJ, Lee B, Kelm RJ, Jr., Reddy AK, Taffet GE, Bradley A, Wehrens XH, Entman ML, Rodriguez A. Targeted deletion of microRNA-22 promotes stress-induced cardiac dilation and contractile dysfunction. *Circulation*. 2012;125:2751-2761
53. Sayed D, Hong C, Chen IY, Lypowy J, Abdellatif M. MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circulation research*. 2007;100:416-424
54. Ikeda S, Kong SW, Lu J, Bisping E, Zhang H, Allen PD, Golub TR, Pieske B, Pu WT. Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiological genomics*. 2007;31:367-373
55. Cheng Y, Ji R, Yue J, Yang J, Liu X, Chen H, Dean DB, Zhang C. MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: Do they play a role in cardiac hypertrophy? *The American journal of pathology*. 2007;170:1831-1840
56. Thum T, Galuppo P, Wolf C, Fiedler J, Kneitz S, van Laake LW, Doevendans PA, Mummery CL, Borlak J, Haverich A, Gross C, Engelhardt S, Ertl G, Bauersachs J. MicroRNAs in the human heart: A clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation*. 2007;116:258-267
57. Huang Z, Chen X, Yu B, He J, Chen D. MicroRNA-27a promotes myoblast proliferation by targeting myostatin. *Biochemical and biophysical research communications*. 2012;423:265-269
58. Nishi H, Ono K, Horie T, Nagao K, Kinoshita M, Kuwabara Y, Watanabe S, Takaya T, Tamaki Y, Takanabe-Mori R, Wada H, Hasegawa K, Iwanaga Y, Kawamura T, Kita T, Kimura T. MicroRNA-27a regulates beta cardiac myosin heavy chain gene expression by targeting thyroid hormone receptor beta1 in neonatal rat ventricular myocytes. *Molecular and cellular biology*. 2011;31:744-755
59. Shan ZX, Lin QX, Fu YH, Deng CY, Zhou ZL, Zhu JN, Liu XY, Zhang YY, Li Y, Lin SG, Yu XY. Upregulated expression of mir-1/mir-206 in a rat model of myocardial infarction. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;381:597-601

60. Shan ZX, Lin QX, Deng CY, Zhu JN, Mai LP, Liu JL, Fu YH, Liu XY, Li YX, Zhang YY, Lin SG, Yu XY. Mir-1/mir-206 regulate hsp60 expression contributing to glucose-mediated apoptosis in cardiomyocytes. *FEBS letters*. 2010;584:3592-3600
61. Winbanks CE, Beyer C, Hagg A, Qian H, Sepulveda PV, Gregorevic P. Mir-206 represses hypertrophy of myogenic cells but not muscle fibers via inhibition of hdac4. *PLoS one*. 2013;8:e73589
62. Mooren FC, Viereck J, Kruger K, Thum T. Circulating micrnas as potential biomarkers of aerobic exercise capacity. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2014;306:H557-563
63. Yang Y, Del Re DP, Nakano N, Sciarretta S, Zhai P, Park J, Sayed D, Shirakabe A, Matsushima S, Park Y, Tian B, Abdellatif M, Sadoshima J. Mir-206 mediates yap-induced cardiac hypertrophy and survival. *Circulation research*. 2015;117:891-904
64. Edinger RS, Coronello C, Bodnar AJ, Labarca M, Bhalla V, LaFramboise WA, Benos PV, Ho J, Johnson JP, Butterworth MB. Aldosterone regulates micrnas in the cortical collecting duct to alter sodium transport. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2014;25:2445-2457
65. Riegel B, Moser DK, Powell M, Rector TS, Havranek EP. Nonpharmacologic care by heart failure experts. *Journal of cardiac failure*. 2006;12:149-153
66. Rajan KS, Velmurugan G, Pandi G, Ramasamy S. Mirna and pirna mediated akt pathway in heart: Antisense expands to survive. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2014;55:153-156
67. Kitamura T, Asai N, Enomoto A, Maeda K, Kato T, Ishida M, Jiang P, Watanabe T, Usukura J, Kondo T, Costantini F, Murohara T, Takahashi M. Regulation of vegf-mediated angiogenesis by the akt/pkb substrate girdin. *Nature cell biology*. 2008;10:329-337
68. Matsui T, Nagoshi T, Rosenzweig A. Akt and pi 3-kinase signaling in cardiomyocyte hypertrophy and survival. *Cell cycle*. 2003;2:220-223
69. Li SY, Fang CX, Aberle NS, 2nd, Ren BH, Ceylan-Isik AF, Ren J. Inhibition of pi-3 kinase/akt/mtor, but not calcineurin signaling, reverses insulin-like growth factor i-induced protection against glucose toxicity in cardiomyocyte contractile function. *The Journal of endocrinology*. 2005;186:491-503
70. Shiojima I, Yefremashvili M, Luo Z, Kureishi Y, Takahashi A, Tao J, Rosenzweig A, Kahn CR, Abel ED, Walsh K. Akt signaling mediates postnatal heart growth in response to insulin and nutritional status. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277:37670-37677
71. Fan X, Takahashi-Yanaga F, Morimoto S, Zhan DY, Igawa K, Tomooka K, Sasaguri T. Celecoxib and 2,5-dimethyl-celecoxib prevent cardiac remodeling inhibiting

akt-mediated signal transduction in an inherited dilated cardiomyopathy mouse model. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2011;338:2-11

72. Song X, Kusakari Y, Xiao CY, Kinsella SD, Rosenberg MA, Scherrer-Crosbie M, Hara K, Rosenzweig A, Matsui T. Mtor attenuates the inflammatory response in cardiomyocytes and prevents cardiac dysfunction in pathological hypertrophy. *American journal of physiology. Cell physiology*. 2010;299:C1256-1266

73. Shen WH, Chen Z, Shi S, Chen H, Zhu W, Penner A, Bu G, Li W, Boyle DW, Rubart M, Field LJ, Abraham R, Liechty EA, Shou W. Cardiac restricted overexpression of kinase-dead mammalian target of rapamycin (mtor) mutant impairs the mtor-mediated signaling and cardiac function. *The Journal of biological chemistry*. 2008;283:13842-13849

## **PARTE III**

### **DISCUSSÃO, CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS**

## DISCUSSÃO

Neste estudo de doutorado nosso objetivo foi analisar as diferenças nos níveis de expressão de microRNAs em dois modelos distintos de hipertrofia cardíaca: modelo patológico induzido por sobrecarga de pressão e o modelo fisiológico induzido por exercício físico. Nossa hipótese é de que mínimas diferenças em nível de regulação gênica poderiam explicar as diferenças morfológicas e funcionais vistas nos dois fenótipos hipertróficos. Ambos os modelos animais de hipertrofia são bem descritos e muito utilizados por outros investigadores (Iemitsu, Miyauchi et al. 2001, Evangelista, Brum et al. 2003, de Almeida, van Oort et al. 2010, Houser, Margulies et al. 2012, Ma, Qi et al. 2013, Radovits, Olah et al. 2013, Kovacs, Olah et al. 2015, Conceicao, Heinonen et al. 2016), o que nos possibilitou escolher tempos de avaliação nos quais o processo de hipertrofia cardíaca já estaria estabelecida, 28 dias para os animais da nataçao e 35 dias para os animais submetidos a cirurgia de bandejamento aórtico.

Primeiramente, nos questionamos qual seria o melhor grupo calibrador para os dados de expressão gênica e de microRNAs visto que dispúnhamos de dois grupos controles bastante distintos no que diz respeito ao tratamento ao qual foram submetidos. Por um lado, temos o grupo sedentário que não sofreu nenhum tipo de intervenção, e por outro lado temos o grupo SHAM, que foi submetido aos mesmos procedimentos cirúrgicos do grupo TAC, porém, sem a constrição aórtica. O fato dos animais SHAM serem submetidos a uma cirurgia, embora sem a constrição, já poderia ser considerado um fator de confusão visto que há processo inflamatório e de cicatrização decorrente do modelo.

Para responder a esta pergunta, normalizamos os níveis de expressão de determinados microRNAs e genes de duas maneiras. A primeira delas foi normalizar os dados de hipertrofia fisiológica pelos dados dos animais sedentários, e os dados de hipertrofia patológica pelos dados dos animais SHAM. A segunda forma de análise foi normalizar todos os dados de expressão pelo grupo sedentário, considerando que este grupo não sofre nenhum tipo de intervenção.

De forma bastante interessante, nossas análises demonstraram haver uma diferença nos resultados dependendo de como se normalizavam os dados. A expressão de genes fetais, tais como *Myh7* e *Nppa*, acontece em modelos de hipertrofia cardíaca patológica e insuficiência cardíaca (Rajabi, Kassiotis et al. 2007, Taegtmeyer, Sen et al. 2010, Kuwahara, Nishikimi et al. 2012, Nandi and Mishra 2015). Ao analisarmos os níveis desses dois genes da primeira maneira não encontramos diferenças para os níveis de *Myh6* entre os grupos. Porém, quando a análise dos dados foi normalizada pelo grupo sedentário para todos os outros grupos, diferenças significativas apareceram. Do mesmo modo, ao analisarmos os dados de expressão de *Myh7*, observamos que os animais do grupo TAC apresentavam aumento de expressão em relação a todos os outros grupos (SED, EXE e TAC). Entretanto, quando os dados foram todos normalizados pelo grupo sedentário, os níveis de *Myh7* apenas estão aumentados na comparação do grupo TAC com o grupo SHAM. Fica demonstrado que embora não tenham havido mudanças de estrutura e função cardíaca no grupo SHAM, este se exhibe diferenças moleculares em relação ao grupo sedentário.

Da mesma forma, comparamos os níveis de microRNAs utilizando as duas normalizações e obtivemos resultados diferentes. Os níveis de miR-27a estavam

aumentados no grupo TAC em comparação com os animais do grupo exercício. Contudo ao analisarmos os dados com a normalização pelos níveis dos sedentários, perde-se esta diferença de expressão. É importante destacar que o gene de referência para a normalização dos níveis dos microRNAs foi o cel-miR-39, um microRNA sintético que não sofre qualquer influência de variabilidade de amostra.

Alguns estudos com modelos animais já começaram a incluir pequenos grupos de animais sem quaisquer intervenções para que se possa fazer uma comparação mais rigorosa com o estado natural daquele modelo (Hu, Xu et al. 2016, Tang, Li et al. 2016). Esse tipo de controle é amplamente utilizado em estudos *in vitro* em cultura de células nos quais o ideal é haver um grupo de células sem qualquer tratamento para que seja utilizado como referência. Quando se migra para modelos *in vivo*, mais complexos, como é caso de roedores, é muito comum termos apenas grupos SHAM como controle do experimento. Isso provavelmente acontece por motivos de restrição de verba financeira para dispor de mais animais na análise ou questões éticas sobre o número de animais utilizados na pesquisa. Porém, se não houver um grupo de animais controles o mais próximo possível do estado natural dos animais pode-se subestimar ou superestimar os resultados encontrados.

Com a certeza de que esse é um ponto importante em vários estudos que envolvem análise da expressão gênica, elaboramos um artigo metodológico visando a discussão desse aspecto, não apenas neste trabalho, mas de uma forma geral. Nossa sugestão é de que se deva incluir um pequeno número de animais sem tratamento algum nos estudos, para melhorar a qualidade dos dados gerados, reduzindo a variabilidade inerente dos modelos de pesquisa e, provavelmente, aumentando a reprodutibilidade



dos resultados. Sendo assim, acreditamos que um pequeno grupo de animais naïve deva ser utilizado como referência em protocolos de pesquisa que incluam cirurgias de maior porte como por exemplo, os modelos de constrição aórtica e ligadura de artérias coronárias para induzir infarto, entre outros. Conseqüentemente, a partir do exposto no primeiro artigo desta tese, as análises subseqüentes foram todas feitas utilizando-se a normalização dos dados de expressão gênica ou de microRNAs pelos grupos sedentários.

No segundo artigo desta tese, testamos a hipótese de que os níveis de expressão de microRNAs são diferentes entre a hipertrofia fisiológica e patológica. Para testar esta hipótese utilizamos o protocolo de natação para indução de hipertrofia fisiológica e o protocolo de bandejamento aórtico para indução de hipertrofia patológica. Nos dois modelos de hipertrofia observamos aumento do peso do coração bem como do peso do ventrículo esquerdo. A medida mais acurada de hipertrofia se dá pela razão do peso do ventrículo esquerdo corrigido pelo comprimento da tíbia do animal. Esta medida não é influenciada por alterações de peso do animal, fato observado no nosso protocolo nos animais do grupo de natação que devido ao esforço físico perderam peso corporal durante o protocolo, e reflete de forma mais clara o grau de hipertrofia desenvolvido em cada modelo.

A reativação dos genes fetais é um fato bastante característico dos modelos de dano cardíaco (Qu, Zhou et al. 2007, Taegtmeyer, Sen et al. 2010, Nandi and Mishra 2015), e parece ocorrer como uma resposta adaptativa do coração frente a estímulos danosos. Nós observamos uma redução dos níveis de *Myh6* nos animais submetidos ao modelo de TAC comparado com os animais do grupo natação. Além disso, os níveis de

*Myh7* estavam aumentados apenas no grupo TAC em relação ao grupo SHAM e apesar de os níveis de *Nppa* apresentarem uma tendência de aumento no grupo TAC, este não foi um aumento significativo. A ausência de diferença nos níveis de *Myh7* e *Nppa* pode ser devido ao fato de termos causado apenas uma hipertrofia patológica sem alteração drástica de função cardíaca, pois os níveis destas duas moléculas tendem a aumentar em corações com insuficiência cardíaca estabelecida. Dados de função cardíaca como fração de encurtamento, fração de ejeção do VE e dados de diâmetro de câmaras certamente ajudariam a explicar estes achados. Embora tenhamos realizado ecocardiograma em um subgrupo de animais (dados não mostrados), a qualidade das imagens não nos possibilitou uma análise fidedigna dos dados de função cardíaca. Isso provavelmente se deva ao fato de o transdutor ecocardiográfico não ter sensibilidade e acuidade suficiente para a aquisição de imagens em pequenos roedores devido à alta frequência cardíaca e o tamanho pequeno do coração destes animais.

Existem diversos estudos que analisam os níveis de expressão de microRNAs em modelos de hipertrofia cardíaca patológica e fisiológica (Care, Catalucci et al. 2007, Callis, Pandya et al. 2009, Fernandes, Hashimoto et al. 2011, Jentsch, Leierseder et al. 2012, Ma, Qi et al. 2013, Hirt, Werner et al. 2015, Liu, Liu et al. 2015, Yang, Del Re et al. 2015, Wang, Liew et al. 2016), porém estes trabalhos geralmente avaliam poucos microRNAs e apenas um modelo de hipertrofia. Nossa proposta foi comparar as duas formas de hipertrofia no que diz respeito a expressão de microRNAs utilizando a técnica de microarranjo de microRNAs, o que nos possibilitou comparar todos os microRNAs até então descritos para camundongos. Até o presente momento, não temos conhecimento

de outro estudo que tenha utilizado esta abordagem para identificar os diferentes microRNAs pertencentes a cada modelo de hipertrofia.

A comparação dos níveis de expressão de microRNAs entre os quatro grupos estudados (SED, SHAM, SWIM e TAC) apresentou resultados bastante interessantes. O HeatMap demonstra que 62 microRNAs se expressam de forma distinta entre os grupos ( $p < 0.01$ ). Observou-se ainda que 20 microRNAs apresentam mudança de expressão, aumento ou redução, quando grupo TAC é comparado ao grupo natação. Da mesma forma, 15 microRNAs apresentam mudança de expressão na comparação entre grupo natação e sedentário, e 19 microRNAs na comparação apenas de TAC com SHAM. De forma interessante, apenas 3 microRNAs demonstram uma mudança de expressão em todas comparações (miR-21, miR-206 e miR-1983). Discutiremos mais detalhadamente alguns desses microRNAs abaixo.

O nosso principal objetivo era encontrar microRNAs que diferissem entre as hipertrofias patológica e fisiológica para tentar explicar a ausência de disfunção na última em comparação com a primeira. Por isso focamos nosso trabalho nos 20 microRNAs que apresentaram expressão diferenciada na comparação entre TAC em natação. Dentre esses microRNAs 12 apresentaram aumento de expressão no grupo TAC, enquanto 8 microRNAs exibiram expressão reduzida. Alguns desses microRNAs já foram bastante estudados na área cardiovascular, como por exemplo o miR-21, miR-22 e a família do miR-30 (Gurha, Abreu-Goodger et al. 2012, Gurha, Wang et al. 2013, Huang, Chen et al. 2013, Pan, Zhong et al. 2013, Chen, Ma et al. 2014, Huang and Wang 2014, Yang, Gu et al. 2014, Yan, Chen et al. 2015, Li and Maegdefessel 2016, Zhang, Cai et al. 2016), entre outros.

Dentre estes microRNAs destaca-se o miR-193a-3p que apresenta um aumento de expressão no grupo TAC em comparação com o grupo SWIM. O miR-193a-3p tem sido associado a supressão tumoral, resistência quimioterápica e indução de apoptose (Li, Deng et al. 2015). Um estudo recente (Deng, Lv et al. 2015) demonstrou que células com altos níveis de miR-193a-3p apresentavam maior resistência a quimioterapia bem como a radioterapia. Os autores atribuem essa resistência ao fato de o miR-193a-3p ter como alvo a proteína PSEN1 (*Presenilin 1*), cuja redução de níveis intensifica a quimio-tolerância. Além disso, baixos níveis de miR-193a-3p em células tumorais correlacionam-se com aumento de apoptose e inibição de crescimento celular (Deng, Lv et al. 2015). Estes achados corroboram outro estudo de 2013 que demonstra que o miR-193a-3p tem efeito inibitório sobre o crescimento celular por causar danos aos DNA, acúmulo de espécies reativas de oxigênio e induzir apoptose em linhagem de glioma. O miR-193a-3p reduz os níveis da proteína anti-apoptótica Mcl-1 causando assim a indução de apoptose nesse modelo celular (Kwon, Kim et al. 2013). Outro mecanismo pelo qual o miR-193a-3p pode regular o crescimento celular e apoptose é pela inibição dos níveis de c-kit, uma tirosina quinase proto-oncogênica associada a sobrevivência celular, em linhagens celulares de leucemia mieloide aguda (Gao, Lin et al. 2011). Portanto, os altos níveis de miR-193a-3p encontrados no modelo patológico de hipertrofia poderiam estar associados aos maiores níveis de apoptose descritos previamente no modelo de TAC.

Um outro aspecto comum a diversa das doenças cardiovasculares é a presença de inflamação após insulto às células cardíacas (Dick and Epelman 2016, Westman, Lipinski et al. 2016, Yang, Lv et al. 2016). Neste contexto inflamatório um estudo sobre lúpus eritematoso sistêmico (LES) demonstrou que os níveis de miR-326 estavam

aumentados nas células T regulatórias de pacientes com LES em comparação com controles. Além disso, os níveis de expressão de miR-326 nas células regulatórias de pacientes com LES se correlacionaram positivamente com os níveis de proteína C reativa, uma proteína de fase aguda conhecida como biomarcador inflamatório (Sun, Tao et al. 2016). Sendo assim, como nossos resultados mostraram um aumento dos níveis de miR-326-3p no grupo TAC comparado ao SWIM, isso pode dever-se ao fato de o miR-326-3p estar mediando os processos inflamatórios que ocorrem durante a hipertrofia patológica.

Os microRNAs também podem contribuir para a regulação dos níveis de cálcio intracelular, como por exemplo o miR-25 que atua sobre a SERCA2 nos cardiomiócitos (Wahlquist, Jeong et al. 2014). Outro microRNA que parece estar envolvido com regulação de níveis de cálcio e apoptose celular é o miR-708-5p, pois já foi demonstrado que este microRNA age como supressor tumoral por reduzir os níveis da neuronatina, proteína de retículo endoplasmático, e por reduzir os níveis intracelulares de cálcio em câncer de mama (Yang, Wei et al. 2015). Nos estágios mais avançados da hipertrofia patológica com disfunção cardíaca ocorre um desequilíbrio das reservas de cálcio intracelulares associado com menor contratilidade cardíaca (Schaub, Hefti et al. 1998, Park and Oh 2013, Melo, Barauna et al. 2015). O miR-708-5p parece estar envolvido também com angiogênese e estresse de retículo endoplasmático e apoptose (Huebert, Jagavelu et al. 2011). Talvez a redução de expressão do miR-708-5p esteja direta ou indiretamente modulando os níveis de cálcio intracelulares nos cardiomiócitos também e contribuindo para a disfunção cardíaca após cirurgia de TAC.

Alguns microRNAs são mais estudados em modelos celulares e experimentais de tumores, como por exemplo o miR-193a-3p que está associado à resistência a quimioterápicos (Li, Deng et al. 2015) além de fazer parte de um painel de 5 microRNAs (miR-193a-3p, miR-483-5p, miR-25, miR-214 e miR-7) capazes de distinguir nódulos benignos de malignos em câncer de pulmão de células pequenas (Wang, Ding et al. 2015). Portanto, utilizar a técnica de microarranjo nos permitirá identificar novos microRNAs relacionados aos processos de hipertrofia cardíaca fisiológica e patológica contribuindo assim, para a identificação de novas rotas com potencial terapêutico ou prognóstico.

O exame de ecocardiografia fornece um diagnóstico muitas vezes definitivo de cardiomiopatia hipertrófica, revelando a presença de hipertrofia ventricular em pacientes sem outras causas primárias. A imagem por ecocardiografia também permite uma análise da distribuição da hipertrofia e as técnicas que utilizam Doppler podem ajudar a localizar e quantificar gradientes hipertróficos intraventriculares (Maron, Gottdiener et al. 1981, Cheitlin, Alpert et al. 1997, Cheitlin, Armstrong et al. 2003). As dimensões ventriculares internas, obtidas pelo modo-M guiado pelo ecocardiograma bidimensional, podem ser usadas para estimar a massa do ventrículo esquerdo, hipertrofia ventricular esquerda ou remodelamento concêntrico de forma mais sensível e específica do que o eletrocardiograma ou o raio-X de tórax (Devereux, Casale et al. 1987, Devereux, Koren et al. 1993, Grandits, Liebson et al. 1994, Foppa, Duncan et al. 2005). O uso de técnicas mais sensíveis como a ressonância magnética também fornece um bom diagnóstico, até mais acurado do que a ecocardiografia, porém tem um alto custo associado e a sua disponibilidade ainda é bastante limitada (Devereux, Casale et al. 1987, Germain, Roul

et al. 1992). Os métodos citados aqui são ferramentas bastante úteis na detecção de uma hipertrofia já estabelecida e muitas vezes já associada a um determinado grau de disfunção cardíaca. Contudo, torna-se cada vez mais importante associar marcadores de dano precoce que permitam identificar processos iniciais antes da evolução para insuficiência cardíaca.

Neste sentido, os microRNAs tornam-se uma ferramenta emergente como teste adicional para detecção precoce da hipertrofia cardíaca patológica. Um estudo publicado recentemente avaliou 27 pacientes com síndrome coronariana aguda (SCA) admitidos na emergência hospitalar e seus níveis plasmáticos de microRNAs. Entre os microRNAs avaliados, o miR-223-3p apresentou níveis elevados e correlacionados com níveis de troponina bem como com os escores de GRACE (que estima mortalidade em 6 meses após admissão para pacientes com SCA) e Synthax (preditor de novos eventos isquêmicos). Além disso, os níveis de miR-223-3p estavam inversamente correlacionados com a função sistólica, sendo considerado como um potencial biomarcador para predição precoce de infarto agudo do miocárdio (Coskunpinar, Cakmak et al. 2016).

Além disso, um estudo derivado do ensaio clínico AtheroGene avaliou o potencial dos microRNAs como biomarcadores para estratificação de prognóstico. Para tanto, foram analisadas amostras de soro de 1112 pacientes com SCA ou angina pectoris estável e os níveis de microRNAs foram dosados e avaliados quanto ao potencial de predizer morte por causa cardíaca. O nível sérico de oito microRNAs candidatos foram dosados (miR-19a, miR-19b, miR-132, miR-140-3p, miR-142-5p, miR-150, miR-186, e miR-210) e os microRNAs -miR-132 (HR 2.85), miR-140-3p (HR 2.88), and miR-210 (HR

3.10) foram considerados preditores de morte por causa cardíaca (Karakas, Schulte et al. 2016). Outro estudo do tipo caso-controle prospectivo que acompanhou 112 indivíduos por 10 anos e tinha como desfecho principal infarto agudo do miocárdio fatal, avaliou os níveis séricos de 179 microRNAs. Destes, o melhor modelo preditor de IAM consistia de um painel de cinco microRNAs, sendo eles miR-106a-5p, miR-424-5p, let-7g-5p, miR-144-3p e miR-660-5p, o que resultou na correta classificação de risco de 77,6% dos casos. Se adicionado ao escore de risco de Framingham, este painel de microRNAs foi capaz de estratificar melhor este grupo de pacientes quanto ao risco de apresentar o desfecho principal de infarto agudo do miocárdio (Bye, Rosjo et al. 2016). Estes estudos discutidos acima corroboram a ideia de que os microRNAs se tornarão ferramentas que aprimorem os escores de classificação de risco dos indivíduos, sejam eles portadores de alguma doença cardíaca ou não. Contudo, até o momento, ainda não encontramos um estudo que avalie o real acréscimo de informação que os microRNAs trariam aos dados ecocardiográficos no que diz respeito ao desenvolvimento de disfunção cardíaca.

Tendo em vista o possível uso de microRNAs associados a outras práticas de diagnóstico já existentes, nosso estudo é gerador da hipótese de que os microRNAs vão melhorar a prática de medicina preventiva existente. Para que essa hipótese seja testada seria necessário desenvolver um experimento que avaliasse a variação dos níveis de microRNAs no soro ou plasma de animais submetidos ao modelo de TAC aliado a dados de função cardíaca obtida por ecocardiograma. Este desenho experimental nos possibilitaria identificar o momento em que a disfunção cardíaca começa a se desenvolver e correlacionar com as variações vistas nos níveis de determinados



microRNAs. Caso acrescente-se um grupo de animais com hipertrofia fisiológica, poderíamos, ainda, discernir entre um biomarcador de processo patológico ou adaptativo do coração ao estímulo de crescimento.

Após a identificação de um microRNA como biomarcador prognóstico de disfunção cardíaca com potencial para ser usado na prática clínica, os estudos devem dirigir-se para o entendimento do mecanismo de ação deste microRNA no organismo. Para elucidar o mecanismo de ação, deve-se realizar estudos sobre o comportamento deste microRNA na célula cardíaca com experimentos de hipertrofia celular em cardiomiócitos, por exemplo. Este tipo de abordagem necessita de avaliações de expressão gênica e proteica mediante desafio da célula com moléculas pró-hipertróficas como a Endotelina-1 ou Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) (hipertrofia celular patológica e fisiológica, respectivamente), posterior análise da expressão do microRNA estudado e avaliação da necessidade deste microRNA para o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca. Isso é necessário porque talvez o microRNA seja um biomarcador liberado pelas células cardíacas mediante estímulo hipertrófico, ou ainda, podem ser liberados na corrente sanguínea simplesmente porque os cardiomiócitos estão morrendo como acontece com os níveis de TGO e TGP que são biomarcadores de lesão hepática (Ozer, Ratner et al. 2008, Sookoian and Pirola 2015).

Mesmo que este microRNA seja liberado na corrente sanguínea e apresente seus níveis aumentados, para agir como molécula sinalizadora ele precisa entrar em contato com a célula-alvo, seja por fagocitose de exossomos e microvesículas ou ainda por internalização deste microRNA a algum tipo de receptor de membrana. A fagocitose de microRNAs que estão dentro de exossomos já é um processo bem descrito na literatura,

sendo que estes podem carregar e entregar DNA, mRNA, microRNAs e proteínas para locais específicos ou células associadas adjacentes. Alguns estudos demonstraram que determinados microRNAs são primariamente encontrados no meio extracelular e que esta é uma característica dependente de condições fisiológicas e/ou patológicas existentes (Noerholm, Balaj et al. 2012, Bye, Rosjo et al. 2016). De maneira bastante interessante e original, Fabbri et al, demonstraram que microRNAs secretados por células tumorais em exossomos eram capazes de se ligarem a alvos nas células receptoras. Através de ensaios de imunoprecipitação eles demonstraram pela primeira vez que os microRNAs miR-21 e miR-29a são capazes de se ligar diretamente ao receptor *Toll-like 8* (TLR8). Esta ligação induz a ativação do NF-κB e aumenta a secreção de citocinas pró-inflamatórias e pró-metastáticas como a IL-6 e TNF-α, o que por sua vez acentua o potencial metastático da linhagem celular LLC (*Lewis Lung Carcinoma*) (Fabbri, Paone et al. 2013). Esta evidência de microRNAs com ação parácrina no microambiente tumoral possivelmente regulando crescimento e migração apresenta-se como uma nova abordagem terapêutica seja na fisiopatologia do câncer ou de outras doenças como as cardiovasculares.

Contudo, talvez o microRNA a ser estudado não seja um biomarcador liberado na corrente sanguínea, mas sim um importante agente intracelular necessário ao estabelecimento da hipertrofia cardíaca. Para responder esta pergunta, deve-se realizar estudos de ganho e perda de função do microRNA em questão. Este tipo de estudo permite identificar as moléculas, sejam elas proteínas ou RNAs não-codificadores, que interagem com o microRNA bem como seus alvos dentro de determinadas rotas. Também, pode-se identificar novas rotas e moléculas atuantes no processo de hipertrofia

celular, ou ainda pode-se descobrir novas funções ou interações para proteínas existentes.

Neste sentido, as análises de bioinformática tornam-se ferramentas essenciais para se prospectar novas vias e interações entre proteínas de vias já envolvidas no processo de hipertrofia celular. Por exemplo, via de sinalização Hippo contém diversos alvos de microRNAs desregulados nos modelos de TAC e natação. Esta via foi recentemente identificada e está conservada evolutivamente, exercendo um controle sobre o tamanho de órgãos por inibir a proliferação celular, promover apoptose e regular o destino de células tronco e progenitoras (Pan 2010, Zhao, Tumaneng et al. 2011). Em mamíferos existem dois homólogos do gene Hippo encontrado em *D. Melanogaster*, que são as quinases Mst1 (Stk4) and Mst2 (Stk3), que fosforilam as quinases Lats1 e Lats2. Quando ativadas, Lats1 e Lats2 fosforilam resíduos de serina dos cofatores transcricionais Yap e Taz causando a sua inibição (Gabriel, Hamilton et al. 2016). A via de sinalização Hippo parece estar envolvida no controle do desenvolvimento da hipertrofia cardíaca por aumentar a apoptose e o grau de fibrose nos corações adultos de animais transgênicos superexpressando a proteína Mst1, o que culmina em afinamento de paredes e cardiomiopatia dilatada (Yamamoto, Yang et al. 2003). Por outro lado, no modelo de TAC, Mst1 aparece ativada e seus níveis se correlacionam com o grau de apoptose. Isso se deve a uma superexpressão da proteína Rassf1A que bloqueia a ativação de Mst1/2 e atenua a resposta hipertrófica provavelmente por inibir a apoptose e fibrose e assim reduzir o dano cardíaco (Del Re, Matsuda et al. 2010). Assim sendo, existe ainda uma discrepância de dados na literatura quanto ao real papel

desta via nas doenças cardiovasculares e necessidade de mais estudos que tentem esclarecer estas contradições.

Ainda em relação à rota de sinalização Hippo, nossos dados demonstram que pelo menos cinco microRNAs estejam envolvidos com esta via, sendo eles o miR-223-5p, miR-199b-5p, miR-193a-3p, miR-188-5p e miR-206-3p, este último, interessante, é alvo da proteína YAP. Sabe-se que a disfunção da proteína endógena YAP (*Yes-associated protein*), membro da via Hippo, causa um prejuízo na hipertrofia compensatória, proliferação e sobrevivência dos cardiomiócitos nos modelos de IAM e isquemia/reperfusão (Del Re, Yang et al. 2013, Shao, Zhai et al. 2014). Entretanto, uma superexpressão constante de YAP promove regeneração miocárdica por estimular a proliferação das células cardíacas (Xin, Kim et al. 2013, Lin, von Gise et al. 2014). Somando-se a isso, estudos prévios haviam demonstrado que o miR-206 regula positivamente a miogênese e hipertrofia em músculo esquelético (Clop, Marcq et al. 2006, Kim, Lee et al. 2006), porém o seu efeito nos cardiomiócitos ainda não estava claro. Para tentar elucidar como a YAP participaria da regulação hipertrófica, Yang e colaboradores estudaram a relação existente entre YAP e microRNAs (Yang, Del Re et al. 2015). Neste estudo eles demonstraram que o miR-206 promove hipertrofia cardíaca em animais transgênicos e que os níveis de miR-206 estão aumentados em animais submetidos ao modelo de TAC quando avaliados 7 dias após o procedimento. Além disso, eles demonstraram que a YAP regula a hipertrofia cardíaca por, na verdade, aumentar a quantidade de miR-206 nos cardiomiócitos, agindo indiretamente no silenciamento da proteína FoxP1 (*Forkhead box protein P1*) que tem um papel essencial na hipertrofia e sobrevivência destas células (Yang, Del Re et al. 2015). Nossos dados

mostram que o miR-206-3p está aumentado em ambos os modelos de hipertrofia, indo ao encontro dos resultados supracitados, e como a via Hippo ainda é recente e brevemente explorada, os microRNAs identificados no nosso trabalho que possuem como alvo proteínas da rota Hippo abrem uma nova linha de estudos para entendimento desta via nos contextos de hipertrofia cardíaca fisiológica e patológica.

Esta tese de doutorado traz uma abordagem original do ponto de vista de se comparar diretamente dois modelos distintos de hipertrofia cardíaca ao passo que a maioria dos estudos extrapola os achados de um modelo para o outro. Neste sentido, comparamos os níveis de microRNAs através da técnica de microarranjo entre o modelo de hipertrofia patológica e fisiológica após uma janela temporal em que o crescimento cardíaco já estava estabelecido. Através desta abordagem foi possível identificar microRNAs que se expressam exclusivamente nos modelos de hipertrofia cardíaca patológica ou fisiológica. Também identificaram-se microRNAs que tiveram uma expressão similar em ambos os modelos de hipertrofia independente se o estímulo inicial era fisiológico (natação) ou patológico (TAC). Estes resultados abrem um leque de perguntas que ainda precisam ser respondidas com estudos de microRNAs específicos e de rotas de sinalização conforme discutido anteriormente de forma que se possa desvendar como estas moléculas estão participando do processo hipertrófico.

Embora tenhamos encontrado resultados bastante promissores na diferenciação entre os dois modelos de hipertrofia cardíaca é necessário que se observe algumas limitações do nosso trabalho. Nosso protocolo carece de análise de função cardíaca por ecocardiograma em todos os grupos de estudados, o que nos permitiria correlacionar os níveis de microRNAs teciduais cardíacos com dados de função cardíaca. Ainda,

associado aos dados de ecocardiografia, uma análise dos níveis circulantes dos microRNAs também nos auxiliaria de forma bastante positiva para que se buscasse um biomarcador precoce de disfunção cardíaca. Igualmente importante é ter em mente que qualquer análise em modelo animal ou em cultura de células pode não se traduzir em verdade quando se avaliam pacientes com hipertrofia ou insuficiência cardíaca devido ao grau de complexidade existentes nestas enfermidades. Contudo, os modelos animais e celulares são a melhor forma, até agora, de se avaliar este tipo de condição e contribuem para desenvolvimento de novas terapias mesmo para doenças complexas como as cardiovasculares.

## CONCLUSÕES

- Foi realizada uma discussão sobre os tipos de grupo controle utilizados em experimentos de expressão gênica relativa e sugere-se o uso de um pequeno grupo de animais naïve, sempre que possível.
- O modelo de hipertrofia por bandejamento aórtico transtorácico (TAC) foi padronizado no Laboratório de Pesquisas Cardiovasculares e na Unidade Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, estando disponível para novos estudos dos grupos de pesquisa envolvidos.
- Os dados de hipertrofia patológica do modelo TAC foram comparados com os dados obtidos do modelo de hipertrofia fisiológica por exercício. Os animais submetidos a cirurgia de TAC apresentaram um grau de hipertrofia maior que os animais do modelo de hipertrofia fisiológica (natação). A razão do peso do VE corrigido pelo peso da tíbia foi maior nos animais do grupo TAC do que nos animais do grupo natação. Não houve diferença entre os grupos quanto ao peso de ventrículo direito. Além disso, pode-se identificar que os animais do grupo natação perderam peso devido a queima calórica associada ao exercício.
- A reativação da expressão dos genes fetais, aumento de *Myh7* e redução de *Myh6* foi verificada no grupo TAC tanto em comparação aos animais sedentários quanto aos animais da natação. Embora ocorra um aumento nos níveis de *Nppa* nos animais TAC, este aumento não foi

estatisticamente significativo. Nenhum destes genes foi reativado nos animais do grupo natação em relação a animais sedentários.

- Foram identificados 12 microRNAs com níveis aumentados nos animais TAC em relação aos animais da natação, sendo eles o miR-193a-3p, miR-299a-5p, miR-127-5p, miR-214-5p, miR-188-5p, miR-326-3p, miR-6395, miR-547-3p, miR-199a-5p, miR-381-3p, miR-223-3p e miR-199b-5p). Também identificou-se 8 microRNAs que estavam com seus níveis diminuídos (miR-708-5p, miR-30c-1-3p, miR-22-5p, miR-6921-5p, miR-30a-3p, miR-30e-3p, miR-27a-5p and miR-6975-5p) no grupo TAC em relação ao grupo natação. Além disso, apenas 3 microRNAs, miR-21a-5p, miR-206-3p and miR-1983, apresentaram aumento de expressão tanto no grupo TAC quanto no grupo natação (versus SHAM e SED, respectivamente).
- Foram identificadas 4 rotas biológicas enriquecidas entre os alvos dos microRNAs reduzidos, e 80 rotas fortemente associadas aos microRNAs que estavam aumentados no grupo TAC comparado ao SWIM. São aproximadamente 4 mil genes que podem estar sendo modulados por estes 20 microRNAs diferencialmente expressos nos dois modelos de hipertrofia. Estes 20 microRNAs possuem 248 genes alvos em comum, o que nos possibilita partir para a validação de determinados genes alvos.





## PERSPECTIVAS

Os próximos passos incluem realizar a validação de alguns microRNAs diferencialmente expressos nos modelos de hipertrofia cardíaca. E a partir dos dados de validação, devemos proceder para análise da expressão gênica e proteica de determinados mRNAs que possam ser alvos dos microRNAs pré-selecionados. Feito isso, poderemos avaliar o efeito da modulação de um dos microRNAs que se apresente como melhor candidato de ter algum efeito pró- ou anti-hipertrófico em cultura de cardiomiócitos.

Como já abordado anteriormente, este trabalho trouxe novas perguntas que ainda precisam ser respondidas, o que acaba por criar uma nova linha de pesquisa com o modelo de TAC no Laboratório de Pesquisas Cardiovasculares para tentar entender agora, de que forma, estes microRNAs atuam na modulação da disfunção cardíaca.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DAS PARTES I E III

Abonnenc, M., A. A. Nabeebaccus, U. Mayr, J. Barallobre-Barreiro, X. Dong, F. Cuello, S. Sur, I. Drozdov, S. R. Langley, R. Lu, K. Stathopoulou, A. Didangelos, X. Yin, W. H. Zimmermann, A. M. Shah, A. Zampetaki and M. Mayr (2013).

"Extracellular matrix secretion by cardiac fibroblasts: role of microRNA-29b and microRNA-30c." *Circ Res* 113(10): 1138-1147.

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

Aoyagi, T. and T. Matsui (2011). "Phosphoinositide-3 kinase signaling in cardiac hypertrophy and heart failure." *Curr Pharm Des* 17(18): 1818-1824.

Ayca, B., I. Sahin, S. H. Kucuk, F. Akin, D. Kafadar, M. Avsar, Avci, II, B. Gungor, E. Okuyan and M. H. Dinckal (2015). "Increased Transforming Growth Factor-beta Levels Associated With Cardiac Adverse Events in Hypertrophic Cardiomyopathy." *Clin Cardiol* 38(6): 371-377.

Baggish, A. L. and M. J. Wood (2011). "Athlete's heart and cardiovascular care of the athlete: scientific and clinical update." *Circulation* 123(23): 2723-2735.

Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." *Cell* 116(2): 281-297.

Bonnal, R. J., R. L. Rossi, D. Carpi, V. Ranzani, S. Abrignani and M. Pagani (2015). "miRiadne: a web tool for consistent integration of miRNA nomenclature." *Nucleic Acids Res* 43(W1): W487-492.

Bostjancic, E., N. Zidar, D. Stajer and D. Glavac (2010). "MicroRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-208 are dysregulated in human myocardial infarction." *Cardiology* 115(3): 163-169.

Boule, N. G., E. Haddad, G. P. Kenny, G. A. Wells and R. J. Sigal (2001). "Effects of exercise on glycemic control and body mass in type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of controlled clinical trials." *JAMA* 286(10): 1218-1227.

Busk, P. K. and S. Cirera (2010). "MicroRNA profiling in early hypertrophic growth of the left ventricle in rats." *Biochem Biophys Res Commun* 396(4): 989-993.

Bye, A., H. Rosjo, J. Nauman, G. J. Silva, T. Follestad, T. Omland and U. Wisloff (2016). "Circulating microRNAs predict future fatal myocardial infarction in healthy individuals - The HUNT study." *J Mol Cell Cardiol* 97: 162-168.

Cakmak, H. A., E. Coskunpinar, B. Ikitimur, H. A. Barman, B. Karadag, N. O. Tiryakioglu, K. Kahraman and V. A. Vural (2015). "The prognostic value of circulating microRNAs in heart failure: preliminary results from a genome-wide expression study." *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 16(6): 431-437.

Callis, T. E., K. Pandya, H. Y. Seok, R. H. Tang, M. Tatsuguchi, Z. P. Huang, J. F. Chen, Z. Deng, B. Gunn, J. Shumate, M. S. Willis, C. H. Selzman and D. Z. Wang (2009). "MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice." *J Clin Invest* 119(9): 2772-2786.

Care, A., D. Catalucci, F. Felicetti, D. Bonci, A. Addario, P. Gallo, M. L. Bang, P. Segnalini, Y. Gu, N. D. Dalton, L. Elia, M. V. Latronico, M. Hoydal, C. Autore, M. A. Russo, G. W. Dorn, 2nd, O. Ellingsen, P. Ruiz-Lozano, K. L. Peterson, C. M. Croce,

C. Peschle and G. Condorelli (2007). "MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy." *Nat Med* 13(5): 613-618.

Carreno, J. E., F. Apablaza, M. P. Ocaranza and J. E. Jalil (2006). "[Cardiac hypertrophy: molecular and cellular events]." *Rev Esp Cardiol* 59(5): 473-486.

Cartledge, J. E., C. Kane, P. Dias, M. Tesfom, L. Clarke, B. McKee, S. Al Ayoubi, A. Chester, M. H. Yacoub, P. Camelliti and C. M. Terracciano (2015). "Functional crosstalk between cardiac fibroblasts and adult cardiomyocytes by soluble mediators." *Cardiovasc Res* 105(3): 260-270.

Catalucci, D., M. V. Latronico and G. Condorelli (2008). "MicroRNAs control gene expression: importance for cardiac development and pathophysiology." *Ann N Y Acad Sci* 1123: 20-29.

Cheitlin, M. D., J. S. Alpert, W. F. Armstrong, G. P. Aurigemma, G. A. Beller, F. Z. Bierman, T. W. Davidson, J. L. Davis, P. S. Douglas, L. D. Gillam, R. P. Lewis, A. S. Pearlman, J. T. Philbrick, P. M. Shah, R. G. Williams, J. L. Ritchie, K. A. Eagle, T. J. Gardner, A. Garson, R. J. Gibbons, R. A. O'Rourke and T. J. Ryan (1997). "ACC/AHA guidelines for the clinical application of echocardiography: executive summary. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines (Committee on Clinical Application of Echocardiography). Developed in collaboration with the American Society of Echocardiography." *J Am Coll Cardiol* 29(4): 862-879.

Cheitlin, M. D., W. F. Armstrong, G. P. Aurigemma, G. A. Beller, F. Z. Bierman, J. L. Davis, P. S. Douglas, D. P. Faxon, L. D. Gillam, T. R. Kimball, W. G. Kussmaul,

A. S. Pearlman, J. T. Philbrick, H. Rakowski, D. M. Thys, E. M. Antman, S. C. Smith, Jr., J. S. Alpert, G. Gregoratos, J. L. Anderson, L. F. Hiratzka, D. P. Faxon, S. A. Hunt, V. Fuster, A. K. Jacobs, R. J. Gibbons, R. O. Russell, Acc, Aha and Ase (2003). "ACC/AHA/ASE 2003 Guideline Update for the Clinical Application of Echocardiography: summary article. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA/ASE Committee to Update the 1997 Guidelines for the Clinical Application of Echocardiography)." *J Am Soc Echocardiogr* 16(10): 1091-1110.

Chen, J. F., E. M. Mandel, J. M. Thomson, Q. Wu, T. E. Callis, S. M. Hammond, F. L. Conlon and D. Z. Wang (2006). "The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation." *Nat Genet* 38(2): 228-233.

Chen, M., G. Ma, Y. Yue, Y. Wei, Q. Li, Z. Tong, L. Zhang, G. Miao and J. Zhang (2014). "Downregulation of the miR-30 family microRNAs contributes to endoplasmic reticulum stress in cardiac muscle and vascular smooth muscle cells." *Int J Cardiol* 173(1): 65-73.

Cheng, Y. and C. Zhang (2010). "MicroRNA-21 in cardiovascular disease." *J Cardiovasc Transl Res* 3(3): 251-255.

Clancy, J. L., M. Nusch, D. T. Humphreys, B. J. Westman, T. H. Beilharz and T. Preiss (2007). "Methods to analyze microRNA-mediated control of mRNA translation." *Methods Enzymol* 431: 83-111.

Clop, A., F. Marcq, H. Takeda, D. Pirottin, X. Tordoir, B. Bibe, J. Bouix, F. Caiment, J. M. Elsen, F. Eycheenne, C. Larzul, E. Laville, F. Meish, D. Milenkovic, J.

Tobin, C. Charlier and M. Georges (2006). "A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep." *Nat Genet* 38(7): 813-818.

Conceicao, G., I. Heinonen, A. P. Lourenco, D. J. Duncker and I. Falcao-Pires (2016). "Animal models of heart failure with preserved ejection fraction." *Neth Heart J* 24(4): 275-286.

Corrado, D., A. Pelliccia, H. Heidbuchel, S. Sharma, M. Link, C. Basso, A. Biffi, G. Buja, P. Delise, I. Gussac, A. Anastasakis, M. Borjesson, H. H. Bjornstad, F. Carre, A. Deligiannis, D. Dugmore, R. Fagard, J. Hoogsteen, K. P. Mellwig, N. Panhuyzen-Goedkoop, E. Solberg, L. Vanhees, J. Drezner, N. A. Estes, 3rd, S. Iliceto, B. J. Maron, R. Peidro, P. J. Schwartz, R. Stein, G. Thiene, P. Zeppilli, W. J. McKenna, E. A. o. C. P. Section of Sports Cardiology and Rehabilitation (2010). "Recommendations for interpretation of 12-lead electrocardiogram in the athlete." *Eur Heart J* 31(2): 243-259.

Coskunpinar, E., H. A. Cakmak, A. K. Kalkan, N. O. Tiryakioglu, M. Erturk and Z. Ongen (2016). "Circulating miR-221-3p as a novel marker for early prediction of acute myocardial infarction." *Gene*.

Cross, H. R., M. Li, B. G. Petrich, E. Murphy, Y. Wang and C. Steenbergen (2009). "Effect of p38 MAP kinases on contractility and ischemic injury in intact heart." *Acta Physiol Hung* 96(3): 307-323.

de Almeida, A. C., R. J. van Oort and X. H. Wehrens (2010). "Transverse aortic constriction in mice." *J Vis Exp*(38).

de Simone, G., J. S. Gottdiener, M. Chinali and M. S. Maurer (2008). "Left ventricular mass predicts heart failure not related to previous myocardial infarction: the Cardiovascular Health Study." *Eur Heart J* 29(6): 741-747.

Del Re, D. P., T. Matsuda, P. Zhai, S. Gao, G. J. Clark, L. Van Der Weyden and J. Sadoshima (2010). "Proapoptotic Rassf1A/Mst1 signaling in cardiac fibroblasts is protective against pressure overload in mice." *J Clin Invest* 120(10): 3555-3567.

Del Re, D. P., Y. Yang, N. Nakano, J. Cho, P. Zhai, T. Yamamoto, N. Zhang, N. Yabuta, H. Nojima, D. Pan and J. Sadoshima (2013). "Yes-associated protein isoform 1 (Yap1) promotes cardiomyocyte survival and growth to protect against myocardial ischemic injury." *J Biol Chem* 288(6): 3977-3988.

Deng, H., L. Lv, Y. Li, C. Zhang, F. Meng, Y. Pu, J. Xiao, L. Qian, W. Zhao, Q. Liu, D. Zhang, Y. Wang, H. Zhang, Y. He and J. Zhu (2015). "The miR-193a-3p regulated PSEN1 gene suppresses the multi-chemoresistance of bladder cancer." *Biochim Biophys Acta* 1852(3): 520-528.

Devereux, R. B., P. N. Casale, D. C. Wallerson, P. Kligfield, I. W. Hammond, P. R. Liebson, E. Campo, D. R. Alonso and J. H. Laragh (1987). "Cost-effectiveness of echocardiography and electrocardiography for detection of left ventricular hypertrophy in patients with systemic hypertension." *Hypertension* 9(2 Pt 2): 1169-76.

Devereux, R. B., M. J. Koren, G. de Simone, P. M. Okin and P. Kligfield (1993). "Methods for detection of left ventricular hypertrophy: application to hypertensive heart disease." *Eur Heart J* 14 Suppl D: 8-15.



Dick, S. A. and S. Epelman (2016). "Chronic Heart Failure and Inflammation: What Do We Really Know?" *Circ Res* 119(1): 159-176.

Dirkx, E., M. M. Gladka, L. E. Philippen, A. S. Armand, V. Kinet, S. Leptidis, H. El Azzouzi, K. Salic, M. Bourajjaj, G. J. da Silva, S. Olieslagers, R. van der Nagel, R. de Weger, N. Bitsch, N. Kisters, S. Seyen, Y. Morikawa, C. Chanoine, S. Heymans, P. G. Volders, T. Thum, S. Dimmeler, P. Cserjesi, T. Eschenhagen, P. A. da Costa Martins and L. J. De Windt (2013). "Nfat and miR-25 cooperate to reactivate the transcription factor Hand2 in heart failure." *Nat Cell Biol* 15(11): 1282-1293.

Divakaran, V. and D. L. Mann (2008). "The emerging role of microRNAs in cardiac remodeling and heart failure." *Circ Res* 103(10): 1072-1083.

Dorn, G. W., 2nd (2007). "The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy." *Hypertension* 49(5): 962-970.

Drazner, M. H., J. E. Rame, E. K. Marino, J. S. Gottdiener, D. W. Kitzman, J. M. Gardin, T. A. Manolio, D. L. Dries and D. S. Siscovick (2004). "Increased left ventricular mass is a risk factor for the development of a depressed left ventricular ejection fraction within five years: the Cardiovascular Health Study." *J Am Coll Cardiol* 43(12): 2207-2215.

Duisters, R. F., A. J. Tijssen, B. Schroen, J. J. Leenders, V. Lentink, I. van der Made, V. Herias, R. E. van Leeuwen, M. W. Schellings, P. Barenbrug, J. G. Maessen, S. Heymans, Y. M. Pinto and E. E. Creemers (2009). "miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor: implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling." *Circ Res* 104(2): 170-178, 176p following 178.

Dupont, E., T. Matsushita, R. A. Kaba, C. Vozzi, S. R. Coppen, N. Khan, R. Kaprielian, M. H. Yacoub and N. J. Severs (2001). "Altered connexin expression in human congestive heart failure." *J Mol Cell Cardiol* 33(2): 359-371.

Eckel, R. H., J. M. Jakicic, J. D. Ard, J. M. de Jesus, N. Houston Miller, V. S. Hubbard, I. M. Lee, A. H. Lichtenstein, C. M. Loria, B. E. Millen, C. A. Nonas, F. M. Sacks, S. C. Smith, Jr., L. P. Svetkey, T. A. Wadden, S. Z. Yanovski and G. American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice (2014). "2013 AHA/ACC guideline on lifestyle management to reduce cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines." *J Am Coll Cardiol* 63(25 Pt B): 2960-2984.

Eto, Y., K. Yonekura, M. Sonoda, N. Arai, M. Sata, S. Sugiura, K. Takenaka, A. Gualberto, M. L. Hixon, M. W. Wagner and T. Aoyagi (2000). "Calcineurin is activated in rat hearts with physiological left ventricular hypertrophy induced by voluntary exercise training." *Circulation* 101(18): 2134-2137.

Evangelista, F. S., P. C. Brum and J. E. Krieger (2003). "Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice." *Braz J Med Biol Res* 36(12): 1751-1759.

Fabbri, M., A. Paone, F. Calore, R. Galli and C. M. Croce (2013). "A new role for microRNAs, as ligands of Toll-like receptors." *RNA Biol* 10(2): 169-174.

Fernandes, T., N. Y. Hashimoto, F. C. Magalhaes, F. B. Fernandes, D. E. Casarini, A. K. Carmona, J. E. Krieger, M. I. Phillips and E. M. Oliveira (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.

Foppa, M., B. B. Duncan and L. E. Rohde (2005). "Echocardiography-based left ventricular mass estimation. How should we define hypertrophy?" *Cardiovasc Ultrasound* 3: 17.

Formigli, L., L. Ibba-Manneschi, A. M. Perna, A. Pacini, L. Polidori, C. Nediani, P. A. Modesti, D. Nosi, A. Tani, A. Celli, G. G. Neri-Serneri, F. Quercioli and S. Zecchi-Orlandini (2003). "Altered Cx43 expression during myocardial adaptation to acute and chronic volume overloading." *Histol Histopathol* 18(2): 359-369.

Gabriel, B. M., D. L. Hamilton, A. M. Tremblay and H. Wackerhage (2016). "The Hippo signal transduction network for exercise physiologists." *J Appl Physiol* (1985) 120(10): 1105-1117.

Gao, J., Y. Zhao, Y. Wang, J. Xin, J. Cui, S. Ma, F. Lu, L. Qin and X. Yu (2015). "Anti-arrhythmic effect of acupuncture pretreatment in the rats subjected to simulative global ischemia and reperfusion--involvement of intracellular Ca<sup>2+</sup> and connexin 43." *BMC Complement Altern Med* 15: 5.

Gao, X. N., J. Lin, Y. H. Li, L. Gao, X. R. Wang, W. Wang, H. Y. Kang, G. T. Yan, L. L. Wang and L. Yu (2011). "MicroRNA-193a represses c-kit expression and functions as a methylation-silenced tumor suppressor in acute myeloid leukemia." *Oncogene* 30(31): 3416-3428.

Germain, P., G. Roul, B. Kastler, J. M. Mossard, P. Bareiss and A. Sacrez (1992). "Inter-study variability in left ventricular mass measurement. Comparison between M-mode echography and MRI." *Eur Heart J* 13(8): 1011-1019.

Giraldez, A. J., Y. Mishima, J. Rihel, R. J. Grocock, S. Van Dongen, K. Inoue, A. J. Enright and A. F. Schier (2006). "Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs." *Science* 312(5770): 75-79.

Grandits, G. A., P. R. Liebson, S. Dianzumba and R. J. Prineas (1994). "Echocardiography in multicenter clinical trials: experience from the Treatment of Mild Hypertension Study." *Control Clin Trials* 15(5): 395-410.

Gregory, R. I., K. P. Yan, G. Amuthan, T. Chendrimada, B. Doratotaj, N. Cooch and R. Shiekhattar (2004). "The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs." *Nature* 432(7014): 235-240.

Griffiths-Jones, S. (2004). "The microRNA Registry." *Nucleic Acids Res* 32(Database issue): D109-111.

Griffiths-Jones, S., R. J. Grocock, S. van Dongen, A. Bateman and A. J. Enright (2006). "miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature." *Nucleic Acids Res* 34(Database issue): D140-144.

Griffiths-Jones, S., H. K. Saini, S. van Dongen and A. J. Enright (2008). "miRBase: tools for microRNA genomics." *Nucleic Acids Res* 36(Database issue): D154-158.

Gupta, S., B. Das and S. Sen (2007). "Cardiac hypertrophy: mechanisms and therapeutic opportunities." *Antioxid Redox Signal* 9(6): 623-652.

Gurha, P., C. Abreu-Goodger, T. Wang, M. O. Ramirez, A. L. Drumond, S. van Dongen, Y. Chen, N. Bartonicek, A. J. Enright, B. Lee, R. J. Kelm, Jr., A. K. Reddy, G. E. Taffet, A. Bradley, X. H. Wehrens, M. L. Entman and A. Rodriguez (2012). "Targeted deletion of microRNA-22 promotes stress-induced cardiac dilation and contractile dysfunction." *Circulation* 125(22): 2751-2761.

Gurha, P., T. Wang, A. H. Larimore, Y. Sassi, C. Abreu-Goodger, M. O. Ramirez, A. K. Reddy, S. Engelhardt, G. E. Taffet, X. H. Wehrens, M. L. Entman and A. Rodriguez (2013). "microRNA-22 promotes heart failure through coordinate suppression of PPAR/ERR-nuclear hormone receptor transcription." *PLoS One* 8(9): e75882.

Hammond, S. M. (2015). "An overview of microRNAs." *Adv Drug Deliv Rev* 87: 3-14.

Hirt, M. N., T. Werner, D. Indenbirken, M. Alawi, P. Demin, A. C. Kunze, J. Stenzig, J. Starbatty, A. Hansen, J. Fiedler, T. Thum and T. Eschenhagen (2015). "Deciphering the microRNA signature of pathological cardiac hypertrophy by engineered heart tissue- and sequencing-technology." *J Mol Cell Cardiol* 81: 1-9.

Hou, J. and Y. J. Kang (2012). "Regression of pathological cardiac hypertrophy: signaling pathways and therapeutic targets." *Pharmacol Ther* 135(3): 337-354.

Houser, S. R., K. B. Margulies, A. M. Murphy, F. G. Spinale, G. S. Francis, S. D. Prabhu, H. A. Rockman, D. A. Kass, J. D. Molkentin, M. A. Sussman, W. J. Koch,

C. o. C. C. American Heart Association Council on Basic Cardiovascular Sciences, G. Council on Functional and B. Translational (2012). "Animal models of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association." *Circ Res* 111(1): 131-150.

Hu, X., Y. Xu, Z. Zhong, Y. Wu, J. Zhao, Y. Wang, H. Cheng, M. Kong, F. Zhang, Q. Chen, J. Sun, Q. Li, J. Jin, Q. Li, L. Chen, C. Wang, H. Zhan, Y. Fan, Q. Yang, L. Yu, R. Wu, J. Liang, J. Zhu, Y. Wang, Y. Jin, Y. Lin, F. Yang, L. Jia, W. Zhu, J. Chen, H. Yu, J. Zhang and J. Wang (2016). "A Large-Scale Investigation of Hypoxia-Preconditioned Allogeneic Mesenchymal Stem Cells for Myocardial Repair in Nonhuman Primates: Paracrine Activity Without Remuscularization." *Circ Res* 118(6): 970-983.

Huang, X., Z. Li, B. Bai, X. Li and Z. Li (2015). "High expression of microRNA-208 is associated with cardiac hypertrophy via the negative regulation of the sex-determining region Y-box 6 protein." *Exp Ther Med* 10(3): 921-926.

Huang, Z. P., J. Chen, H. Y. Seok, Z. Zhang, M. Kataoka, X. Hu and D. Z. Wang (2013). "MicroRNA-22 regulates cardiac hypertrophy and remodeling in response to stress." *Circ Res* 112(9): 1234-1243.

Huang, Z. P. and D. Z. Wang (2014). "miR-22 in cardiac remodeling and disease." *Trends Cardiovasc Med* 24(7): 267-272.

Huebert, R. C., K. Jagavelu, H. I. Hendrickson, M. M. Vasdev, J. P. Arab, P. L. Splinter, C. E. Trussoni, N. F. Larusso and V. H. Shah (2011). "Aquaporin-1

promotes angiogenesis, fibrosis, and portal hypertension through mechanisms dependent on osmotically sensitive microRNAs." *Am J Pathol* 179(4): 1851-1860.

Iemitsu, M., T. Miyauchi, S. Maeda, S. Sakai, T. Kobayashi, N. Fujii, H. Miyazaki, M. Matsuda and I. Yamaguchi (2001). "Physiological and pathological cardiac hypertrophy induce different molecular phenotypes in the rat." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281(6): R2029-2036.

Ishida, M. and F. M. Selaru (2013). "miRNA-Based Therapeutic Strategies." *Curr Anesthesiol Rep* 1(1): 63-70.

Jentzsch, C., S. Leierseder, X. Loyer, I. Flohrschutz, Y. Sassi, D. Hartmann, T. Thum, B. Laggerbauer and S. Engelhardt (2012). "A phenotypic screen to identify hypertrophy-modulating microRNAs in primary cardiomyocytes." *J Mol Cell Cardiol* 52(1): 13-20.

Jessup, M. and S. Brozena (2003). "Heart failure." *N Engl J Med* 348(20): 2007-2018.

Ji, X., R. Takahashi, Y. Hiura, G. Hirokawa, Y. Fukushima and N. Iwai (2009). "Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury." *Clin Chem* 55(11): 1944-1949.

Johnson, S. M., H. Grosshans, J. Shingara, M. Byrom, R. Jarvis, A. Cheng, E. Labourier, K. L. Reinert, D. Brown and F. J. Slack (2005). "RAS is regulated by the let-7 microRNA family." *Cell* 120(5): 635-647.

Karakas, M., C. Schulte, S. Appelbaum, F. Ojeda, K. J. Lackner, T. Munzel, R. B. Schnabel, S. Blankenberg and T. Zeller (2016). "Circulating microRNAs strongly predict cardiovascular death in patients with coronary artery disease-results from the large AtheroGene study." *Eur Heart J*.

Kelley, G. A., K. S. Kelley and Z. V. Tran (2004). "Walking, lipids, and lipoproteins: a meta-analysis of randomized controlled trials." *Prev Med* 38(5): 651-661.

Kemi, O. J., M. Ceci, U. Wisloff, S. Grimaldi, P. Gallo, G. L. Smith, G. Condorelli and O. Ellingsen (2008). "Activation or inactivation of cardiac Akt/mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy." *J Cell Physiol* 214(2): 316-321.

Kim, H. K., Y. S. Lee, U. Sivaprasad, A. Malhotra and A. Dutta (2006). "Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation." *J Cell Biol* 174(5): 677-687.

Kim, J. H. and A. L. Baggish (2015). "Differentiating Exercise-Induced Cardiac Adaptations from Cardiac Pathology: The "Grey Zone" of Clinical Uncertainty." *Can J Cardiol*.

Kitamura, T., N. Asai, A. Enomoto, K. Maeda, T. Kato, M. Ishida, P. Jiang, T. Watanabe, J. Usukura, T. Kondo, F. Costantini, T. Murohara and M. Takahashi (2008). "Regulation of VEGF-mediated angiogenesis by the Akt/PKB substrate Girdin." *Nat Cell Biol* 10(3): 329-337.



Kong, S. W., N. Bodyak, P. Yue, Z. Liu, J. Brown, S. Izumo and P. M. Kang (2005). "Genetic expression profiles during physiological and pathological cardiac hypertrophy and heart failure in rats." *Physiol Genomics* 21(1): 34-42.

Kostin, S., M. Rieger, S. Dammer, S. Hein, M. Richter, W. P. Klovekorn, E. P. Bauer and J. Schaper (2003). "Gap junction remodeling and altered connexin43 expression in the failing human heart." *Mol Cell Biochem* 242(1-2): 135-144.

Kovacs, A., A. Olah, A. Lux, C. Matyas, B. T. Nemeth, D. Kellermayer, M. Ruppert, M. Torok, L. Szabo, A. Meltzer, A. Assabiny, E. Birtalan, B. Merkely and T. Radovits (2015). "Strain and strain rate by speckle-tracking echocardiography correlate with pressure-volume loop-derived contractility indices in a rat model of athlete's heart." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 308(7): H743-748.

Kovacs, R. and A. L. Baggish (2016). "Cardiovascular adaptation in athletes." *Trends Cardiovasc Med* 26(1): 46-52.

Kuehbacher, A., C. Urbich, A. M. Zeiher and S. Dimmeler (2007). "Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis." *Circ Res* 101(1): 59-68.

Kuosmanen, S. M., J. Hartikainen, M. Hippelainen, H. Kokki, A. L. Levonen and P. Tavi (2015). "MicroRNA profiling of pericardial fluid samples from patients with heart failure." *PLoS One* 10(3): e0119646.

Kuwahara, K., T. Nishikimi and K. Nakao (2012). "Transcriptional regulation of the fetal cardiac gene program." *J Pharmacol Sci* 119(3): 198-203.

Kwon, J. E., B. Y. Kim, S. Y. Kwak, I. H. Bae and Y. H. Han (2013). "Ionizing radiation-inducible microRNA miR-193a-3p induces apoptosis by directly targeting Mcl-1." *Apoptosis* 18(7): 896-909.

Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, W. Lendeckel and T. Tuschl (2001). "Identification of novel genes coding for small expressed RNAs." *Science* 294(5543): 853-858.

Lai, E. C. (2004). "Predicting and validating microRNA targets." *Genome Biol* 5(9): 115.

Lauer, M. S., D. Levy, K. M. Anderson and J. F. Plehn (1992). "Is there a relationship between exercise systolic blood pressure response and left ventricular mass? The Framingham Heart Study." *Ann Intern Med* 116(3): 203-210.

Lavie, C. J., R. Arena, D. L. Swift, N. M. Johannsen, X. Sui, D. C. Lee, C. P. Earnest, T. S. Church, J. H. O'Keefe, R. V. Milani and S. N. Blair (2015). "Exercise and the cardiovascular system: clinical science and cardiovascular outcomes." *Circ Res* 117(2): 207-219.

Lee, R. C., R. L. Feinbaum and V. Ambros (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." *Cell* 75(5): 843-854.

Lewartowski, B. and U. Mackiewicz (2006). "[Cellular signal transduction pathways in cardiac hypertrophy and heart failure]." *Kardiol Pol* 64(10 Suppl 6): S591-600.

Lewis, B. P., I. H. Shih, M. W. Jones-Rhoades, D. P. Bartel and C. B. Burge (2003). "Prediction of mammalian microRNA targets." *Cell* 115(7): 787-798.

Li, J. M. and G. Brooks (1997). "Differential protein expression and subcellular distribution of TGFbeta1, beta2 and beta3 in cardiomyocytes during pressure overload-induced hypertrophy." *J Mol Cell Cardiol* 29(8): 2213-2224.

Li, Y., H. Deng, L. Lv, C. Zhang, L. Qian, J. Xiao, W. Zhao, Q. Liu, D. Zhang, Y. Wang, J. Yan, H. Zhang, Y. He and J. Zhu (2015). "The miR-193a-3p-regulated ING5 gene activates the DNA damage response pathway and inhibits multi-chemoresistance in bladder cancer." *Oncotarget* 6(12): 10195-10206.

Li, Y. and L. Maegdefessel (2016). "My heart will go on-beneficial effects of anti-MiR-30 after myocardial infarction." *Ann Transl Med* 4(7): 144.

Lim, L. P., N. C. Lau, P. Garrett-Engele, A. Grimson, J. M. Schelter, J. Castle, D. P. Bartel, P. S. Linsley and J. M. Johnson (2005). "Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs." *Nature* 433(7027): 769-773.

Lin, Z., A. von Gise, P. Zhou, F. Gu, Q. Ma, J. Jiang, A. L. Yau, J. N. Buck, K. A. Gouin, P. R. van Gorp, B. Zhou, J. Chen, J. G. Seidman, D. Z. Wang and W. T. Pu (2014). "Cardiac-specific YAP activation improves cardiac function and survival in an experimental murine MI model." *Circ Res* 115(3): 354-363.

Liu, W., Y. Liu, Y. Zhang, X. Zhu, R. Zhang, L. Guan, Q. Tang, H. Jiang, C. Huang and H. Huang (2015). "MicroRNA-150 Protects Against Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy." *J Cell Biochem* 116(10): 2166-2176.

Liu, Y. L., C. C. Huang, C. C. Chang, C. Y. Chou, S. Y. Lin, I. K. Wang, D. J. Hsieh, G. P. Jong, C. Y. Huang and C. M. Wang (2015). "Hyperphosphate-Induced Myocardial Hypertrophy through the GATA-4/NFAT-3 Signaling Pathway Is Attenuated by ERK Inhibitor Treatment." *Cardiorenal Med* 5(2): 79-88.

Luijckx, T., M. J. Cramer, N. H. Prakken, C. F. Buckens, A. Mosterd, R. Rienks, F. J. Backx, W. P. Mali and B. K. Velthuis (2012). "Sport category is an important determinant of cardiac adaptation: an MRI study." *Br J Sports Med* 46(16): 1119-1124.

Ma, Z., J. Qi, S. Meng, B. Wen and J. Zhang (2013). "Swimming exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves microRNAs and synergistic regulation of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway." *Eur J Appl Physiol* 113(10): 2473-2486.

Major, J. L., M. Salih and B. S. Tuana (2015). "Interplay between the E2F pathway and beta-adrenergic signaling in the pathological hypertrophic response of myocardium." *J Mol Cell Cardiol* 84: 179-190.

Mann, D. L., R. Bogaev and G. D. Buckberg (2010). "Cardiac remodelling and myocardial recovery: lost in translation?" *Eur J Heart Fail* 12(8): 789-796.

Maron, B. J., J. S. Gottdiener and S. E. Epstein (1981). "Patterns and significance of distribution of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy. A wide angle, two dimensional echocardiographic study of 125 patients." *Am J Cardiol* 48(3): 418-428.

Maroney, P. A., Y. Yu, J. Fisher and T. W. Nilsen (2006). "Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells." *Nat Struct Mol Biol* 13(12): 1102-1107.

Martinelli, N. C., C. R. Cohen, K. G. Santos, M. A. Castro, A. Biolo, L. Frick, D. Silvello, A. Lopes, S. Schneider, M. E. Andrades, N. Clausell, U. Matte and L. E. Rohde (2014). "An analysis of the global expression of microRNAs in an experimental model of physiological left ventricular hypertrophy." *PLoS One* 9(4): e93271.

Matsui, T., T. Nagoshi and A. Rosenzweig (2003). "Akt and PI 3-kinase signaling in cardiomyocyte hypertrophy and survival." *Cell Cycle* 2(3): 220-223.

Matsumoto-Ida, M., Y. Takimoto, T. Aoyama, M. Akao, T. Takeda and T. Kita (2006). "Activation of TGF-beta1-TAK1-p38 MAPK pathway in spared cardiomyocytes is involved in left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290(2): H709-715.

McMullen, J. R., M. C. Sherwood, O. Tarnavski, L. Zhang, A. L. Dorfman, T. Shioi and S. Izumo (2004). "Inhibition of mTOR signaling with rapamycin regresses established cardiac hypertrophy induced by pressure overload." *Circulation* 109(24): 3050-3055.

McMullen, J. R., T. Shioi, L. Zhang, O. Tarnavski, M. C. Sherwood, P. M. Kang and S. Izumo (2003). "Phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) 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.

Melo, S. F., V. G. Barauna, V. J. Neves, T. Fernandes, S. Lara Lda, D. R. Mazzotti and E. M. Oliveira (2015). "Exercise training restores the cardiac microRNA-1 and -214 levels regulating Ca<sup>2+</sup> handling after myocardial infarction." *BMC Cardiovasc Disord* 15: 166.

Miyachi, M., H. Yazawa, M. Furukawa, K. Tsuboi, M. Ohtake, T. Nishizawa, K. Hashimoto, T. Yokoi, T. Kojima, T. Murate, M. Yokota, T. Murohara, Y. Koike and K. Nagata (2009). "Exercise training alters left ventricular geometry and attenuates heart failure in dahl salt-sensitive hypertensive rats." *Hypertension* 53(4): 701-707.

Montgomery, R. L., T. G. Hullinger, H. M. Semus, B. A. Dickinson, A. G. Seto, J. M. Lynch, C. Stack, P. A. Latimer, E. N. Olson and E. van Rooij (2011). "Therapeutic inhibition of miR-208a improves cardiac function and survival during heart failure." *Circulation* 124(14): 1537-1547.

Nandi, S. S. and P. K. Mishra (2015). "Harnessing fetal and adult genetic reprogramming for therapy of heart disease." *J Nat Sci* 1(4).

Nilsen, T. W. (2007). "Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells." *Trends Genet* 23(5): 243-249.

Noerholm, M., L. Balaj, T. Limperg, A. Salehi, L. D. Zhu, F. H. Hochberg, X. O. Breakefield, B. S. Carter and J. Skog (2012). "RNA expression patterns in serum microvesicles from patients with glioblastoma multiforme and controls." *BMC Cancer* 12: 22.

Nottrott, S., M. J. Simard and J. D. Richter (2006). "Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes." *Nat Struct Mol Biol* 13(12): 1108-1114.

Ovchinnikova, E. S., D. Schmitter, E. L. Vegter, J. M. Ter Maaten, M. A. Valente, L. C. Liu, P. van der Harst, Y. M. Pinto, R. A. de Boer, S. Meyer, J. R. Teerlink, C. M. O'Connor, M. Metra, B. A. Davison, D. M. Bloomfield, G. Cotter, J. G. Cleland, A. Mebazaa, S. Laribi, M. M. Givertz, P. Ponikowski, P. van der Meer, D. J. van Veldhuisen, A. A. Voors and E. Berezikov (2016). "Signature of circulating microRNAs in patients with acute heart failure." *Eur J Heart Fail* 18(4): 414-423.

Ozer, J., M. Ratner, M. Shaw, W. Bailey and S. Schomaker (2008). "The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity." *Toxicology* 245(3): 194-205.

Pan, D. (2010). "The hippo signaling pathway in development and cancer." *Dev Cell* 19(4): 491-505.

Pan, W., Y. Zhong, C. Cheng, B. Liu, L. Wang, A. Li, L. Xiong and S. Liu (2013). "MiR-30-regulated autophagy mediates angiotensin II-induced myocardial hypertrophy." *PLoS One* 8(1): e53950.

Park, W. J. and J. G. Oh (2013). "SERCA2a: a prime target for modulation of cardiac contractility during heart failure." *BMB Rep* 46(5): 237-243.

Paulin, R., G. Sutendra, V. Gurtu, P. Dromparis, A. Haromy, S. Provencher, S. Bonnet and E. D. Michelakis (2015). "A miR-208-Mef2 axis drives the decompensation of right ventricular function in pulmonary hypertension." *Circ Res* 116(1): 56-69.

Pelliccia, A., F. Culasso, F. M. Di Paolo and B. J. Maron (1999). "Physiologic left ventricular cavity dilatation in elite athletes." *Ann Intern Med* 130(1): 23-31.

Peng, K., X. Tian, Y. Qian, M. Skibba, C. Zou, Z. Liu, J. Wang, Z. Xu, X. Li and G. Liang (2016). "Novel EGFR inhibitors attenuate cardiac hypertrophy induced by angiotensin II." *J Cell Mol Med* 20(3): 482-494.

Pescatello, L. S., B. A. Franklin, R. Fagard, W. B. Farquhar, G. A. Kelley, C. A. Ray and M. American College of Sports (2004). "American College of Sports Medicine position stand. Exercise and hypertension." *Med Sci Sports Exerc* 36(3): 533-553.

Petersen, C. P., M. E. Bordeleau, J. Pelletier and P. A. Sharp (2006). "Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells." *Mol Cell* 21(4): 533-542.

Porrello, E. R., B. A. Johnson, A. B. Aurora, E. Simpson, Y. J. Nam, S. J. Matkovich, G. W. Dorn, 2nd, E. van Rooij and E. N. Olson (2011). "MiR-15 family regulates postnatal mitotic arrest of cardiomyocytes." *Circ Res* 109(6): 670-679.

Porrello, E. R., A. I. Mahmoud, E. Simpson, B. A. Johnson, D. Grinsfelder, D. Canseco, P. P. Mammen, B. A. Rothermel, E. N. Olson and H. A. Sadek (2013). "Regulation of neonatal and adult mammalian heart regeneration by the miR-15 family." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(1): 187-192.

Qu, J., J. Zhou, X. P. Yi, B. Dong, H. Zheng, L. M. Miller, X. Wang, M. D. Schneider and F. Li (2007). "Cardiac-specific haploinsufficiency of beta-catenin



attenuates cardiac hypertrophy but enhances fetal gene expression in response to aortic constriction." *J Mol Cell Cardiol* 43(3): 319-326.

Radovits, T., A. Olah, A. Lux, B. T. Nemeth, L. Hidi, E. Birtalan, D. Kellermayer, C. Matyas, G. Szabo and B. Merkely (2013). "Rat model of exercise-induced cardiac hypertrophy: hemodynamic characterization using left ventricular pressure-volume analysis." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 305(1): H124-134.

Rajabi, M., C. Kassiotis, P. Razeghi and H. Taegtmeyer (2007). "Return to the fetal gene program protects the stressed heart: a strong hypothesis." *Heart Fail Rev* 12(3-4): 331-343.

Rajan, K. S., G. Velmurugan, G. Pandi and S. Ramasamy (2014). "miRNA and piRNA mediated Akt pathway in heart: antisense expands to survive." *Int J Biochem Cell Biol* 55: 153-156.

Rodriguez, A., S. Griffiths-Jones, J. L. Ashurst and A. Bradley (2004). "Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units." *Genome Res* 14(10A): 1902-1910.

Rosenkranz, S., M. Flesch, K. Amann, C. Haeuseler, H. Kilter, U. Seeland, K. D. Schluter and M. Bohm (2002). "Alterations of beta-adrenergic signaling and cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing TGF-beta(1)." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283(3): H1253-1262.

Satoh, M., Y. Minami, Y. Takahashi, T. Tabuchi and M. Nakamura (2010). "Expression of microRNA-208 is associated with adverse clinical outcomes in human dilated cardiomyopathy." *J Card Fail* 16(5): 404-410.

Sayed, D., C. Hong, I. Y. Chen, J. Lypowy and M. Abdellatif (2007). "MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy." *Circ Res* 100(3): 416-424.

Schaub, M. C., M. A. Hefti, R. A. Zuellig and I. Morano (1998). "Modulation of contractility in human cardiac hypertrophy by myosin essential light chain isoforms." *Cardiovasc Res* 37(2): 381-404.

Sebastiano Sciarretta, Massimo Volpe and J. Sadoshima (2014). "Mammalian Target of Rapamycin Signaling in Cardiac Physiology and Disease." *Circ Res* 114: 549-564.

Shah, A. M. and S. D. Solomon (2010). "A unified view of ventricular remodelling." *Eur J Heart Fail* 12(8): 779-781.

Shao, D., P. Zhai, D. P. Del Re, S. Sciarretta, N. Yabuta, H. Nojima, D. S. Lim, D. Pan and J. Sadoshima (2014). "A functional interaction between Hippo-YAP signalling and FoxO1 mediates the oxidative stress response." *Nat Commun* 5: 3315.

Sharma, S., A. Merghani and L. Mont (2015). "Exercise and the heart: the good, the bad, and the ugly." *Eur Heart J* 36(23): 1445-1453.

Sheikh, N., M. Papadakis, S. Ghani, A. Zaidi, S. Gati, P. E. Adami, F. Carre, F. Schnell, M. Wilson, P. Avila, W. McKenna and S. Sharma (2014). "Comparison of electrocardiographic criteria for the detection of cardiac abnormalities in elite black and white athletes." *Circulation* 129(16): 1637-1649.

Shimizu, I. and T. Minamino (2016). "Physiological and pathological cardiac hypertrophy." *J Mol Cell Cardiol* 97: 245-262.

Shioi, T., J. R. McMullen, O. Tarnavski, K. Converso, M. C. Sherwood, W. J. Manning and S. Izumo (2003). "Rapamycin attenuates load-induced cardiac hypertrophy in mice." *Circulation* 107(12): 1664-1670.

Shiojima, I. and K. Walsh (2002). "Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis." *Circ Res* 90(12): 1243-1250.

Shiojima, I., M. Yefremashvili, Z. Luo, Y. Kureishi, A. Takahashi, J. Tao, A. Rosenzweig, C. R. Kahn, E. D. Abel and K. Walsh (2002). "Akt signaling mediates postnatal heart growth in response to insulin and nutritional status." *J Biol Chem* 277(40): 37670-37677.

Soci, U. P., T. Fernandes, N. Y. Hashimoto, G. F. Mota, M. A. Amadeu, K. T. Rosa, M. C. Irigoyen, M. I. Phillips and E. M. Oliveira (2011). "MicroRNAs 29 are involved in the improvement of ventricular compliance promoted by aerobic exercise training in rats." *Physiol Genomics* 43(11): 665-673.

Sookoian, S. and C. J. Pirola (2015). "Liver enzymes, metabolomics and genome-wide association studies: from systems biology to the personalized medicine." *World J Gastroenterol* 21(3): 711-725.

Souza, R. W., G. J. Fernandez, J. P. Cunha, W. P. Piedade, L. C. Soares, P. A. Souza, D. H. de Campos, K. Okoshi, A. C. Cicogna, M. Dal-Pai-Silva and R. F. Carvalho (2015). "Regulation of cardiac microRNAs induced by aerobic exercise training during heart failure." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 309(10): H1629-1641.

Stevens, S. M., K. Reinier and S. S. Chugh (2013). "Increased left ventricular mass as a predictor of sudden cardiac death: is it time to put it to the test?" *Circ Arrhythm Electrophysiol* 6(1): 212-217.

Sun, X. G., J. H. Tao, N. Xiang, X. M. Li, G. S. Wang, X. Fang, C. Dai, M. Zhang, Z. Chen and X. P. Li (2016). "Negative Correlation Between miR-326 and Ets-1 in Regulatory T Cells from new-Onset SLE Patients." *Inflammation* 39(2): 822-829.

Sygitowicz, G., M. Tomaniak, O. Blaszczyk, L. Koltowski, K. J. Filipiak and D. Sitkiewicz (2015). "Circulating microribonucleic acids miR-1, miR-21 and miR-208a in patients with symptomatic heart failure: Preliminary results." *Arch Cardiovasc Dis* 108(12): 634-642.

Taegtmeyer, H., S. Sen and D. Vela (2010). "Return to the fetal gene program: a suggested metabolic link to gene expression in the heart." *Ann N Y Acad Sci* 1188: 191-198.

Talasaz, A. H., H. Khalili, Y. Jenab, M. Salarifar, M. A. Broumand and F. Darabi (2013). "N-Acetylcysteine effects on transforming growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha serum levels as pro-fibrotic and inflammatory biomarkers in patients following ST-segment elevation myocardial infarction." *Drugs R D* 13(3): 199-205.

Tang, X. L., Q. Li, G. Rokosh, S. Sanganalmath, N. Chen, Q. Ou, H. Stowers, G. Hunt and R. Bolli (2016). "Long-Term Outcome of Administration of c-kitPOS Cardiac Progenitor Cells After Acute Myocardial Infarction: Transplanted Cells Do

Not Become Cardiomyocytes, but Structural and Functional Improvement and Proliferation of Endogenous Cells Persist for At Least One Year." *Circ Res*.

Tatsuguchi, M., H. Y. Seok, T. E. Callis, J. M. Thomson, J. F. Chen, M. Newman, M. Rojas, S. M. Hammond and D. Z. Wang (2007). "Expression of microRNAs is dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy." *J Mol Cell Cardiol* 42(6): 1137-1141.

Thum, T., C. Gross, J. Fiedler, T. Fischer, S. Kissler, M. Bussen, P. Galuppo, S. Just, W. Rottbauer, S. Frantz, M. Castoldi, J. Soutschek, V. Koteliansky, A. Rosenwald, M. A. Basson, J. D. Licht, J. T. Pena, S. H. Rouhanifard, M. U. Muckenthaler, T. Tuschl, G. R. Martin, J. Bauersachs and S. Engelhardt (2008). "MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts." *Nature* 456(7224): 980-984.

Traynham, C. J., A. Cannavo, Y. Zhou, A. G. Vouga, B. P. Woodall, J. Hullmann, J. Ibeti, J. I. Gold, J. K. Chuprun, E. Gao and W. J. Koch (2015). "Differential Role of G Protein-Coupled Receptor Kinase 5 in Physiological Versus Pathological Cardiac Hypertrophy." *Circ Res* 117(12): 1001-1012.

Tuttolomondo, A., I. Simonetta and A. Pinto (2016). "MicroRNA and receptor mediated signaling pathways as potential therapeutic targets in heart failure." *Expert Opin Ther Targets*.

Urbich, C., A. Kuehbacher and S. Dimmeler (2008). "Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis." *Cardiovasc Res* 79(4): 581-588.

van Rijen, H. V., T. A. van Veen, D. Gros, R. Wilders and J. M. de Bakker (2006). "Connexins and cardiac arrhythmias." *Adv Cardiol* 42: 150-160.

van Rooij, E., W. S. Marshall and E. N. Olson (2008). "Toward microRNA-based therapeutics for heart disease: the sense in antisense." *Circ Res* 103(9): 919-928.

van Rooij, E., L. B. Sutherland, N. Liu, A. H. Williams, J. McAnally, R. D. Gerard, J. A. Richardson and E. N. Olson (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., L. B. Sutherland, X. Qi, J. A. Richardson, J. Hill and E. N. Olson (2007). "Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA." *Science* 316(5824): 575-579.

van Rooij, E., L. B. Sutherland, J. E. Thatcher, J. M. DiMaio, R. H. Naseem, W. S. Marshall, J. A. Hill and E. N. Olson (2008). "Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(35): 13027-13032.

Wahlquist, C., D. Jeong, A. Rojas-Munoz, C. Kho, A. Lee, S. Mitsuyama, A. van Mil, W. J. Park, J. P. Sluijter, P. A. Doevendans, R. J. Hajjar and M. Mercola (2014). "Inhibition of miR-25 improves cardiac contractility in the failing heart." *Nature* 508(7497): 531-535.

Wang, C., M. Ding, M. Xia, S. Chen, A. Van Le, R. Soto-Gil, Y. Shen, N. Wang, J. Wang, W. Gu, X. Wang, Y. Zhang, K. Zen, X. Chen, C. Zhang and C. Y. Zhang (2015). "A Five-miRNA Panel Identified From a Multicentric Case-control Study

Serves as a Novel Diagnostic Tool for Ethnically Diverse Non-small-cell Lung Cancer Patients." *EBioMedicine* 2(10): 1377-1385.

Wang, G. K., J. Q. Zhu, J. T. Zhang, Q. Li, Y. Li, J. He, Y. W. Qin and Q. Jing (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., O. W. Liew, A. M. Richards and Y. T. Chen (2016). "Overview of MicroRNAs in Cardiac Hypertrophy, Fibrosis, and Apoptosis." *Int J Mol Sci* 17(5).

Watson, C. J., S. K. Gupta, E. O'Connell, S. Thum, N. Glezeva, J. Fendrich, J. Gallagher, M. Ledwidge, L. Grote-Levi, K. McDonald and T. Thum (2015). "MicroRNA signatures differentiate preserved from reduced ejection fraction heart failure." *Eur J Heart Fail* 17(4): 405-415.

Westman, P. C., M. J. Lipinski, D. Luger, R. Waksman, R. O. Bonow, E. Wu and S. E. Epstein (2016). "Inflammation as a Driver of Adverse Left Ventricular Remodeling After Acute Myocardial Infarction." *J Am Coll Cardiol* 67(17): 2050-2060.

Wu, L., J. Fan and J. G. Belasco (2006). "MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(11): 4034-4039.

Xin, M., Y. Kim, L. B. Sutherland, M. Murakami, X. Qi, J. McAnally, E. R. Porrello, A. I. Mahmoud, W. Tan, J. M. Shelton, J. A. Richardson, H. A. Sadek, R. Bassel-Duby and E. N. Olson (2013). "Hippo pathway effector Yap promotes cardiac regeneration." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(34): 13839-13844.

Yamamoto, S., G. Yang, D. Zablocki, J. Liu, C. Hong, S. J. Kim, S. Soler, M. Odashima, J. Thaisz, G. Yehia, C. A. Molina, A. Yatani, D. E. Vatner, S. F. Vatner and J. Sadoshima (2003). "Activation of Mst1 causes dilated cardiomyopathy by stimulating apoptosis without compensatory ventricular myocyte hypertrophy." *J Clin Invest* 111(10): 1463-1474.

Yan, M., C. Chen, W. Gong, Z. Yin, L. Zhou, S. Chaugai and D. W. Wang (2015). "miR-21-3p regulates cardiac hypertrophic response by targeting histone deacetylase-8." *Cardiovasc Res* 105(3): 340-352.

Yang, J., J. Wei, Y. Wu, Z. Wang, Y. Guo, P. Lee and X. Li (2015). "Metformin induces ER stress-dependent apoptosis through miR-708-5p/NNAT pathway in prostate cancer." *Oncogenesis* 4: e158.

Yang, T., H. Gu, X. Chen, S. Fu, C. Wang, H. Xu, Q. Feng and Y. Ni (2014). "Cardiac hypertrophy and dysfunction induced by overexpression of miR-214 in vivo." *J Surg Res* 192(2): 317-325.

Yang, Y., D. P. Del Re, N. Nakano, S. Sciarretta, P. Zhai, J. Park, D. Sayed, A. Shirakabe, S. Matsushima, Y. Park, B. Tian, M. Abdellatif and J. Sadoshima (2015). "miR-206 Mediates YAP-Induced Cardiac Hypertrophy and Survival." *Circ Res* 117(10): 891-904.

Yang, Y., J. Lv, S. Jiang, Z. Ma, D. Wang, W. Hu, C. Deng, C. Fan, S. Di, Y. Sun and W. Yi (2016). "The emerging role of Toll-like receptor 4 in myocardial inflammation." *Cell Death Dis* 7: e2234.



Yazaki, Y. and I. Komuro (1992). "Role of protein kinase system in the signal transduction of stretch-mediated myocyte growth." *Basic Res Cardiol* 87 Suppl 2: 11-18.

Yi, R., Y. Qin, I. G. Macara and B. R. Cullen (2003). "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs." *Genes Dev* 17(24): 3011-3016.

Yokota, T. and Y. Wang (2016). "p38 MAP kinases in the heart." *Gene* 575(2 Pt 2): 369-376.

Zhang, B. W., H. F. Cai, X. F. Wei, J. J. Sun, X. Y. Lan, C. Z. Lei, F. P. Lin, X. L. Qi, M. Plath and H. Chen (2016). "miR-30-5p Regulates Muscle Differentiation and Alternative Splicing of Muscle-Related Genes by Targeting MBNL." *Int J Mol Sci* 17(2).

Zhang, D., R. Contu, M. V. Latronico, J. Zhang, R. Rizzi, D. Catalucci, S. Miyamoto, K. Huang, M. Ceci, Y. Gu, N. D. Dalton, K. L. Peterson, K. L. Guan, J. H. Brown, J. Chen, N. Sonenberg and G. Condorelli (2010). "mTORC1 regulates cardiac function and myocyte survival through 4E-BP1 inhibition in mice." *J Clin Invest* 120(8): 2805-2816.

Zhao, B., K. Tumaneng and K. L. Guan (2011). "The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal." *Nat Cell Biol* 13(8): 877-883.

Zhao, Y., E. Samal and D. Srivastava (2005). "Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis." *Nature* 436(7048): 214-220.

## **ANEXOS**

## MATERIAL SUPLEMENTAR DO ARTIGO I

### Supplemental Files

**Supplemental Table 1.** MicroRNAs deregulated among among SED, SHAM, SWIM and TAC groups (n=4-6 per group, p<0.01); Data are expressed as normalized log2 of expression values.

ProbeID	Transcript ID	Pvalue	FDR	SED	SHAM	TAC	SWIM
MIMAT0001420_st	mmu-miR-433-3p	0.000117	0.092169	1.96	1.05	2.91	2.31
MIMAT0029813_st	mmu-miR-7653-3p	0.000258	0.14517	1.77	1.76	1.23	1.23
MIMAT0004939_st	mmu-miR-208b-3p	0.000332	0.14517	0.90	1.72	4.04	1.20
MIMAT0000381_st	mmu-miR-34c-5p	0.000338	0.14517	3.12	4.34	5.91	3.55
MIMAT0001418_st	mmu-miR-431-5p	0.000367	0.14517	1.95	1.47	3.57	2.40
MIMAT0004632_st	mmu-miR-29c-5p	0.000444	0.155894	1.32	3.18	3.37	3.14
MIMAT0000669_st	mmu-miR-221-3p	0.000638	0.201949	9.21	9.67	9.91	9.48
MIMAT0000230_st	mmu-miR-199a-3p	0.001001	0.263916	10.19	10.22	11.23	10.45
MIMAT0004667_st	mmu-miR-199b-3p	0.001001	0.263916	10.19	10.22	11.23	10.45
MIMAT0009455_st	mmu-miR-1983	0.001128	0.273842	0.70	1.27	3.12	1.85
MIMAT0000214_st	mmu-miR-185-5p	0.00128	0.273842	11.74	11.66	10.93	11.58
MIMAT0001421_st	mmu-miR-434-5p	0.001299	0.273842	0.99	1.20	2.55	1.50
MI0000177_st	mmu-mir-155	0.001556	0.307532	1.09	1.29	0.81	1.36
MIMAT0000742_st	mmu-miR-378a-5p	0.001825	0.315616	9.89	10.20	9.33	9.70
MIMAT0000213_st	mmu-miR-184-3p	0.001833	0.315616	5.17	3.56	5.43	4.36
MIMAT0003453_st	mmu-miR-497-5p	0.001896	0.315616	8.44	9.40	9.44	8.49
MIMAT0001091_st	mmu-miR-410-3p	0.002055	0.322221	0.52	0.66	1.08	0.72
MIMAT0004828_st	mmu-miR-708-5p	0.002139	0.322221	3.66	2.20	2.85	4.48
MIMAT0000376_st	mmu-miR-298-5p	0.002604	0.374419	2.68	1.17	2.44	2.37
MIMAT0003727_st	mmu-miR-374b-5p	0.002807	0.385986	1.04	1.41	2.51	1.26
MIMAT0000657_st	mmu-miR-200c-3p	0.003451	0.419505	5.32	4.97	4.07	4.82
MIMAT0003409_st	mmu-miR-467a-5p	0.003566	0.419505	2.08	1.52	2.71	2.60
MIMAT0027742_st	mmu-miR-6921-5p	0.003598	0.419505	4.26	4.09	2.37	3.63
MIMAT0025105_st	mmu-miR-145b	0.003941	0.419505	0.61	0.67	1.87	0.83
MIMAT0000126_st	mmu-miR-27b-3p	0.003948	0.419505	12.09	12.01	12.71	12.27
MIMAT0029854_st	mmu-miR-3569-5p	0.004094	0.419505	1.01	0.65	1.44	1.13
MIMAT0022371_st	mmu-miR-5622-5p	0.004168	0.419505	1.67	1.80	1.21	1.50
MIMAT0004581_st	mmu-miR-34b-3p	0.004205	0.419505	1.62	2.19	4.21	2.90
MIMAT0004580_st	mmu-miR-34c-3p	0.004468	0.419505	3.24	2.98	5.15	3.77

<b>MI0024997_st</b>	mmu-mir-7657	0.004702	0.419505	0.87	0.98	0.67	0.83
<b>MIMAT0000656_st</b>	mmu-miR-139-5p	0.004744	0.419505	9.72	9.57	8.98	9.70
<b>MI0000576_st</b>	mmu-mir-29a	0.004748	0.419505	0.54	0.76	0.78	0.88
<b>MIMAT0000670_st</b>	mmu-miR-222-3p	0.004775	0.419505	8.93	9.24	9.52	9.11
<b>MIMAT0017062_st</b>	mmu-miR-224-3p	0.005283	0.451597	1.09	0.69	1.15	0.80
<b>MIMAT0004616_st</b>	mmu-miR-30c-1-3p	0.005747	0.468886	6.61	6.33	5.43	6.68
<b>MIMAT0014944_st</b>	mmu-miR-3107-3p	0.005978	0.468886	9.81	9.34	8.28	9.54
<b>MIMAT0004536_st</b>	mmu-miR-151-5p	0.006183	0.468886	11.88	11.20	11.00	11.53
<b>MIMAT0000904_st</b>	mmu-miR-215-5p	0.006237	0.468886	0.70	1.58	1.17	2.58
<b>MIMAT0004664_st</b>	mmu-miR-214-5p	0.00634	0.468886	2.06	4.73	5.45	3.41
<b>MIMAT0005438_st</b>	mmu-miR-30c-2-3p	0.006384	0.468886	8.43	8.04	7.36	8.28
<b>MIMAT0004577_st</b>	mmu-miR-299a-3p	0.006583	0.468886	1.34	1.92	2.85	1.92
<b>MIMAT0000559_st</b>	mmu-miR-326-3p	0.006671	0.468886	1.74	2.65	3.66	2.18
<b>MIMAT0000377_st</b>	mmu-miR-299a-5p	0.00699	0.4693	1.40	1.78	2.63	1.58
<b>MIMAT0017206_st</b>	mmu-miR-486-3p	0.007036	0.4693	9.93	9.48	8.39	9.62
<b>MIMAT0025121_st</b>	mmu-miR-21b	0.007516	0.4693	0.59	0.99	1.02	0.76
<b>MI0019192_st</b>	mmu-mir-3073b	0.007539	0.4693	0.85	0.55	0.80	0.68
<b>MIMAT0003733_st</b>	mmu-miR-665-3p	0.007733	0.4693	1.36	1.08	2.16	1.01
<b>MIMAT0031412_st</b>	mmu-miR-8107	0.00823	0.4693	0.92	0.64	1.41	0.91
<b>MIMAT0000217_st</b>	mmu-miR-188-5p	0.008253	0.4693	1.53	2.38	3.26	2.01
<b>MIMAT0000140_st</b>	mmu-miR-128-3p	0.008496	0.4693	6.86	6.90	6.51	7.15
<b>MI0000231_st</b>	mmu-mir-24-1	0.008512	0.4693	0.68	0.97	0.76	0.94
<b>MIMAT0004853_st</b>	mmu-miR-874-3p	0.008623	0.4693	4.68	5.05	3.92	4.52
<b>MIMAT0017020_st</b>	mmu-miR-26a-1-3p	0.008691	0.4693	0.51	0.48	0.72	0.75
<b>MIMAT0017063_st</b>	mmu-miR-29b-2-5p	0.008715	0.4693	5.83	5.61	5.01	5.87
<b>MIMAT0000223_st</b>	mmu-miR-193a-3p	0.008722	0.4693	0.81	1.35	2.25	1.03
<b>MIMAT0027745_st</b>	mmu-miR-6922-3p	0.008754	0.4693	0.87	0.58	0.39	0.61
<b>MIMAT0016988_st</b>	mmu-miR-144-5p	0.009333	0.484357	0.88	1.50	1.85	1.00
<b>MIMAT0004669_st</b>	mmu-miR-125b-1-3p	0.009454	0.484357	5.33	4.07	4.58	4.45
<b>MI0000617_st</b>	mmu-mir-148b	0.009611	0.484357	0.57	0.72	0.40	0.80
<b>MIMAT0000164_st</b>	mmu-miR-154-5p	0.009647	0.484357	1.79	1.39	3.16	2.44
<b>MIMAT0025083_st</b>	mmu-miR-6340	0.009901	0.484772	0.28	0.56	0.47	0.59
<b>MIMAT0004935_st</b>	mmu-miR-872-3p	0.009962	0.484772	1.68	2.88	3.71	3.29

**Supplemental Table 2.** Number of experimentally validated and computationally predicted target genes retrieved for each microRNA

microRNA	Number of experimental targets	Number of predicted targets	Total number of targets
mmu-miR-127-5p	1	85	86
mmu-miR-188-5p	25	244	265
mmu-miR-193a-3p	8	611	604
mmu-miR-199a-5p	32	486	486
mmu-miR-199b-5p	0	343	343
mmu-miR-214-5p	0	23	23
mmu-miR-22-5p	0	109	109
mmu-miR-223-3p	307	375	607
mmu-miR-27a-5p	3	24	27
mmu-miR-299a-5p	0	326	326
mmu-miR-30a-3p	0	124	124
mmu-miR-30c-1-3p	0	40	40
mmu-miR-30e-3p	0	118	118
mmu-miR-326-3p	21	551	559
mmu-miR-381-3p	43	697	645
mmu-miR-547-3p	13	202	215
mmu-miR-708-5p	7	392	393

## PRODUÇÃO COMPLEMENTAR

1. 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. *Submitted to AJP-Heart and Circulatory Physiology*.
2. Vitamin E affects angiogenesis and microRNA expression in mice with physiological cardiac hypertrophy. Cohen CR; **Martinelli N**; Recamonde-Mendoza M; Santos KG; Andrades ME; Clausell N; Rohde LE; Ashton-Prolla P; Andreia Biolo. *Submitted to PLOS ONE*.
3. 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. doi:10.1007/s12265-015-9633-5.
4. 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. doi: 10.1371/journal.pone.0093271. eCollection 2014.
5. 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. doi: 10.3109/1354750X.2013.870605.
6. Serum levels and polymorphisms of matrix metalloproteinases (MMPs) in carotid artery atherosclerosis: higher MMP-9 levels are associated with plaque

vulnerability. Silvello D, Narvaes LB, Albuquerque LC, Forgiarini LF, Meurer L, **Martinelli NC**, Andrades ME, Clausell N, dos Santos KG, Rohde LE. Biomarkers. 2014 Feb;19(1):49-55. doi: 10.3109/1354750X.2013.866165.

7. 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. doi: 10.1016/j.niox.2012.01.003.
8. Endothelial dysfunction assessed by brachial artery ultrasound in severe sepsis and septic shock. Becker L, Prado K, Foppa M, **Martinelli N**, Aguiar C, Furian T, Clausell N, Rohde LE. J Crit Care. 2012 Jun;27(3):316.e9-14. doi: 10.1016/j.jcrc.2011.08.002.
9. Ventricular dysfunction and dilation in severe sepsis and septic shock: relation to endothelial function and mortality. Furian T, Aguiar C, Prado K, Ribeiro RV, Becker L, **Martinelli N**, Clausell N, Rohde LE, Biolo A. J Crit Care. 2012 Jun;27(3):319.e9-15. doi: 10.1016/j.jcrc.2011.06.017. Epub 2011 Aug 19.



