



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:  
CARDIOLOGIA E CIÊNCIAS CARDIOVASCULARES**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**EXPRESSÃO DE MICRORNAS NA  
HIPERTROFIA VENTRICULAR ESQUERDA FISIOLÓGICA**

**Autora: Nidiane Carla Martinelli**

**Orientador: Prof. Dr. Luis Eduardo Rohde**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Kátia Gonçalves dos Santos**

**Colaboradora: Profa. Dra. Úrsula Matte**

**Porto Alegre, Outubro de 2011.**

**EXPRESSÃO DE MICRORNAS NA  
HIPERTROFIA VENTRICULAR ESQUERDA FISIOLÓGICA**

**AUTORA: Nidiane Carla Martinelli**

**Dissertação para obtenção do título de  
Mestre apresentada à Universidade Federal  
do Rio Grande do Sul, Faculdade de  
Medicina, Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências  
Cardiovasculares.**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Luis Eduardo Rohde**

**CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Kátia Gonçalves dos Santos**

**Colaboradora: Profa. Dra. Úrsula Matte**

**Porto Alegre, Outubro de 2011.**

**Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa Cardiovascular do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre da Universidade Federal do Rio Grande do Sul com o auxílio financeiro do CNPq e FIPE-HCPA.**

***“No esforço para compreender a realidade, somos como um homem tentando entender o mecanismo de um relógio fechado. Ele vê o mostrador e os ponteiros, ouve o seu tique-taque, mas não tem meios para abrir a caixa. Se esse homem for habilidoso, poderá imaginar um mecanismo responsável pelos fatos que observa, mas nunca poderá ficar completamente seguro de que sua hipótese seja a única possível.”***

**Albert Einstein**

## AGRADECIMENTOS

---

Agradeço a Deus por estar sempre comigo, pois como eu sempre digo: para fazer ciência, muitas vezes necessitamos ter fé.

Aos meus pais, sem os quais eu não teria chegado até aqui. Vocês fizeram dos meus sonhos os seus sonhos, os meus objetivos de vida se juntaram aos seus e hoje conquistamos mais uma vitória. Vocês são tão mestres quanto eu serei um dia. Muito obrigada pelo carinho, amor e dedicação.

À minha irmã Cati e ao meu cunhas querido Volnei, vocês fazem parte da minha base forte, são a prova de que a distância une as pessoas. Estiveram sempre do meu lado, me apoiando, me amando e me incentivando. Obrigada.

Ao meu irmão Beto e a minha cunhadinha Neiva, obrigada por todos os momentos que passamos juntos, eles foram raros devido à correria da vida, mas foram emocionantes!

À Jhennifer, minha sobrinha... Ah essa princesa... Alegria meus dias, tão pequena com conselhos tão grandiosos!!! Amo-te florzinha!!!

Ao Dhonatan, meu sobrinho tão querido... Um doce de pessoa, um doce de sobrinho que hoje me pega no colo e diz: "Não te estressa tia chata!". Amo você!

Ao Fernando, meu amor... Poder contar contigo, entender-me no olhar, apoiar-me totalmente, me amar mesmo nos meus piores dias, tudo isso é essencial para mim!!! Muito obrigada por mergulhar de cabeça, junto comigo, no mundo dos microRNAs.

Aos meus avós, tios, tias, primos, adendos, dindos e dindas, amigos e amigas, quem disse que é preciso estar perto para estar junto??? Sei que estiveram sempre comigo, mesmo com a distância que nos separa.

À Daiane Nicolli Silvello, o que vou falar para você amiga? Como agradecer o colo de mãe que me dá, a amizade que nos une? Você me pegou no colo nos momentos mais difíceis que passei, e não foi só você, foi toda a sua família também. Obrigada por me permitir isso, obrigada por me dar uma família porto-alegrense! Ah, mas além de tudo isso, obrigada por ter trazido o Pietro ao mundo, o sorriso desse guri maroto é a fuga do estresse, me faz voltar a ser criança com ele e esquecer os problemas que nos rodeiam. Pietro, “SEMPRE”!

À Carolina Rodrigues Cohen, minha amiga, minha parceira, nada como uma mochila com um nome escrito para unir duas pessoas, né? Estamos há tanto tempo juntas que pensamos juntas, basta um olhar para fazermos o que é preciso ser feito (wireless sempre ligado!). Carol, muito obrigada por também estar comigo quando eu mais precisei, pois ter amigas como você é essencial na vida.

Ao meu orientador, prof. Rohde, pela paciência e compreensão em diversos momentos difíceis, pelo conhecimento transmitido de forma tão simples sobre, muitas vezes, assuntos tão complexos. Trabalhando ao teu lado, após o medo passar, percebi que és um orientador amigo disposto a enfrentar o “horror” se preciso for. Muito obrigada por tudo.

À minha co-orientadora, Kátia, passado o “terrorismo” que fizeste comigo no início da minha vida acadêmica vejo o quão importantes foram tuas colocações para meu crescimento pessoal e profissional. Muito obrigada por tudo.

À professora Úrsula Matte, obrigada pela enorme paciência e disponibilidade em todos os momentos, desde o desenho do projeto até o desenho das placas, análises, cálculos e tudo mais. Teus conselhos e dicas foram importantíssimos para a conclusão do meu mestrado e crescimento pessoal.

À professora Nadine Clausell, exemplo de pessoa e profissional, obrigada por estar ao meu lado “desde pequeninha” como você mesma disse. Profe, é um prazer estar trabalhando ao lado de alguém tão espetacular que sabe incentivar nossas idéias e está sempre ao nosso lado em qualquer circunstância. Obrigada pela oportunidade de trabalhar contigo.

À professora Andréia, obrigada pela compreensão e pelos ensinamentos transmitidos, pelas oportunidades oferecidas e por acreditar comigo que este projeto sairia do papel! És uma pessoa maravilhosa e acredito que ainda tenho muito a aprender contigo.

Aos colegas de laboratório, Rafa, Giovanna, Micles, Luzia, Amanda, Stéfanie, Felipe, Vanessa, Paula Marson, entre muitos outros, obrigada por cada tubo alcançado, cada café passado para me manter viva, cada abraço de apoio... Queridos pesquisadores juniores, vocês fazem o dia ser mais divertido, mais leve e muito trabalhoso também! E graças a vocês, trabalhar também é uma festa!

Ao professor Flávio Kapczinski e aos amigos do Laboratório de Psiquiatria Molecular, Laura, Gabriel, Bianca A., Bianca P. e Gabi, entre tantos outros, obrigada pela paciência nas análises moleculares. Vocês foram fundamentais na finalização deste trabalho, além de me divertirem muito, é claro.

Aos funcionários da Unidade de Experimentação Animal, Marta, Fabíola, Eduardo e Juliana, agradeço a todo apoio que deram para o desenvolvimento do protocolo de hipertrofia cardíaca.

Aos funcionários do Centro de Pesquisa Experimental, Everaldo, Maria, Jeferson, Patrícia, entre tantos outros, obrigada por toda a atenção na resolução dos problemas que porventura rodearam a realização deste trabalho.



## SUMÁRIO

---

LISTA DE ABREVIATURAS .....	11
LISTA DE TABELAS .....	13
LISTA DE FIGURAS .....	14
MARCO TEÓRICO.....	16
Hipertrofia cardíaca .....	16
<i>Hipertrofia cardíaca patológica</i> .....	16
<i>Hipertrofia cardíaca fisiológica</i> .....	20
<i>Bases moleculares da hipertrofia cardíaca</i> .....	22
<i>Modelos animais de hipertrofia cardíaca fisiológica</i> .....	25
Os microRNAs (miRNAs ou miRs).....	27
<i>Biogênese de microRNAs</i> .....	29
<i>Mecanismo de ação dos microRNAs</i> .....	30
<i>Os microRNAs e o sistema cardiovascular</i> .....	33
JUSTIFICATIVA .....	37
OBJETIVO PRINCIPAL.....	39
<i>Objetivos específicos:</i> .....	39
REFERÊNCIAS.....	40
ORIGINAL ARTICLE.....	47
ABSTRACT .....	48
INTRODUCTION .....	49

<b>METHODS</b> .....	50
<i>Animals</i> .....	50
<i>Model of physiological hypertrophy</i> .....	51
<i>Echocardiography</i> .....	51
<i>Maximal exercise test</i> .....	52
<i>Heart weighing and tissue preparation for molecular analysis</i> .....	52
<i>MicroRNA microarray</i> .....	53
<i>Reverse transcription and quantitative real time PCR (qRT-PCR)</i> .....	54
<i>Statistical analysis</i> .....	54
<b>RESULTS</b> .....	55
<i>Exercise protocol and maximal exercise test</i> .....	55
<i>Left ventricular hypertrophy</i> .....	56
<i>MicroRNAs microarray</i> .....	56
<i>Real-time qRT-PCR</i> .....	57
<b>DISCUSSION</b> .....	57
<b>FIGURE LEGENDS</b> .....	63
<b>REFERENCES</b> .....	76
<b>APPENDIX</b> .....	81
<b>CONCLUSÕES, CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	93
<b>OUTROS TRABALHOS DESENVOLVIDOS NO MESTRADO</b> .....	95

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

3'UTR – região 3' não-traduzida

ACE – enzima conversora de angiotensina

Ago – proteína argonauta

Ang-II – angiotensina II

Akt – proteína cinase B (PKB)

AT-1 – receptor de angiotensina do tipo 1

AT-2 – receptor de angiotensina do tipo 2

BAT – bandejamento aórtico transtorácico

BNP – peptídeo natriurético cerebral

CT-1 – cardiotrofina 1

ERKs – família de cinases reguladas por sinais extracelulares

FTN- $\alpha$  – fator de necrose tumoral  $\alpha$

GPCRs – receptores acoplados à proteína G

HC – hipertrofia cardíaca

HVE – hipertrofia ventricular esquerda

IC – insuficiência cardíaca

IGF-1 - fator de crescimento semelhante à insulina *tipo 1*

JNK – proteínas Jun N-terminal cinase

MAPKs – proteínas tirosina cinase ativada por mitógenos

miRNAs/miRs – microRNAs

mRNA – RNA mensageiro

NFκB – fator de transcrição nuclear kappa B

p38 – proteína 38 tirosina cinase ativada por mitógenos

PI3K - fosfatidilinositol-3-cinase

PKC – proteína cinase C

Pré-miRNA – microRNA precursor

Pri-miRNA – microRNA primário

RAAS – sistema renina-angiotensina-aldosterona

STAT-3 – proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3

VD – ventrículo direito

VE - ventrículo esquerdo

α e β – MHC – miosinas de cadeia pesada do tipo α e β

## **LISTA DE TABELAS**

---

<b>TABELA 1. PADRÕES CONTRÁTEIS NA HIPERTROFIA CARDÍACA FISIOLÓGICA E PATOLÓGICA.....</b>	<b>17</b>
<b>TABELA 2. TIPOS DE TREINAMENTO PARA INDUÇÃO DE HIPERTROFIA CARDÍACA FISIOLÓGICA EM MODELOS ANIMAIS.....</b>	<b>26</b>

## **LISTA DE FIGURAS**

---

<b>FIGURA 1. PADRÕES GEOMÉTRICOS VISTOS NAS DIVERSAS APRESENTAÇÕES DA HIPERTROFIA VENTRICULAR ESQUERDA (ADAPTADO DE FOPPA, DUNCAN E ROHDE, 2005 (12)).</b> .....	19
<b>FIGURA 2. ROTAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR ENVOLVIDAS NO DESENVOLVIMENTO DE HIPERTROFIA CARDÍACA FISIOLÓGICA E PATOLÓGICA. PARA ABREVIATURAS, REFERIR-SE AO TEXTO.</b> .....	23
<b>FIGURA 3. BIOGÊNESE DE MICRORNAS.</b> .....	30
<b>FIGURA 4. PRINCIPAIS MECANISMOS DE AÇÃO DOS MICRORNAS (ADAPTADA DE NILSEN, 2007).</b> .....	32
<b>FIGURA 5. CURVA DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DOS MICRORNAS 499 E 208A PARA DETERMINAÇÃO DO DIAGNÓSTICO DE INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO. (ADAPTADO DE CORSTEN, 2010 (54)).</b> .....	35
<b>FIGURA 6. MODELO TRANSGÊNICO DE CAMUNDONGOS QUE SUPEREXPRESSAM MIR-195 E FORAM SUBMETIDOS AO BANDEAMENTO AÓRTICO TRANSTORÁCICO (ADAPTADO DE VAN ROOIJ, 2006 (55)).</b> .....	36

## MARCO TEÓRICO

---

### **Hipertrofia cardíaca**

---

A hipertrofia cardíaca (HC) é definida como o aumento da massa cardíaca devido ao aumento do tamanho dos cardiomiócitos. Este crescimento pode resultar de sobrecarga hemodinâmica, de pressão ou de volume, impostas ao coração (1, 2). Sendo assim, o aumento da massa cardíaca está diretamente associado ao aumento do peso do ventrículo esquerdo (VE) (3).

Existem basicamente duas formas distintas de HC (Tabela 1), a hipertrofia patológica que envolve a perda progressiva da função cardíaca devido à necrose e apoptose celular, substituição dos miócitos por tecido fibrótico e disfunção miocárdica, culminando na dilatação das câmaras e insuficiência cardíaca. Por outro lado, na HC adaptativa há ausência de fibrose, manutenção, ou inclusive, melhora da função cardíaca e ocorre um alargamento proporcional das câmaras sem levar à disfunção (4).

### ***Hipertrofia cardíaca patológica***

---

A HC patológica é um dos marcadores mais importantes de morbidade e mortalidade por doenças cardiovasculares. Nos portadores de hipertensão arterial ou de outras miocardiopatias, a presença de hipertrofia cardíaca constitui também um importante fator de risco para morte súbita (5). Tendo em vista que a hipertrofia está associada a uma série de condições patológicas que afetam o aparelho cardiovascular, tem havido, ao longo das últimas décadas, um grande interesse em desvendar os mecanismos celulares e

TABELA 1. PADRÕES CONTRÁTEIS NA HIPERTROFIA CARDÍACA FISIOLÓGICA E PATOLÓGICA.

	<b>Fisiológica</b>	<b>Patológica</b>
<b>Exemplo</b>	Treinamento de atletas	Estenose aórtica grave
<b>Padrão de Sinalização</b>	Sobrevivência celular	Pró-apoptótico Pró-fibrótico
<b>Moléculas Sinalizadoras</b>	IGF-1, PI3K-Akt, STAT-3	p38 MAP kinase JNK TGF- $\beta$ Angio-II
<b>Reprogramação de genes fetais</b>	Não	Sim
<b>Fibrose intersticial</b>	Não	Sim
<b>Apoptose do miócito</b>	Não	Sim
<b>Contração sistólica</b>	Normal ou aumentada	Reduzida
<b>Relaxamento diastólico</b>	Normal ou aumentada	Reduzida
<b>Enchimento ventricular ao Doppler</b>	Normal	Prejudicada

IGF-1 - fator de crescimento semelhante à insulina *tipo 1*; PI3K - fosfatidilinositol-3-cinase; Akt – proteína cinase B (PKB); STAT-3 – proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3.



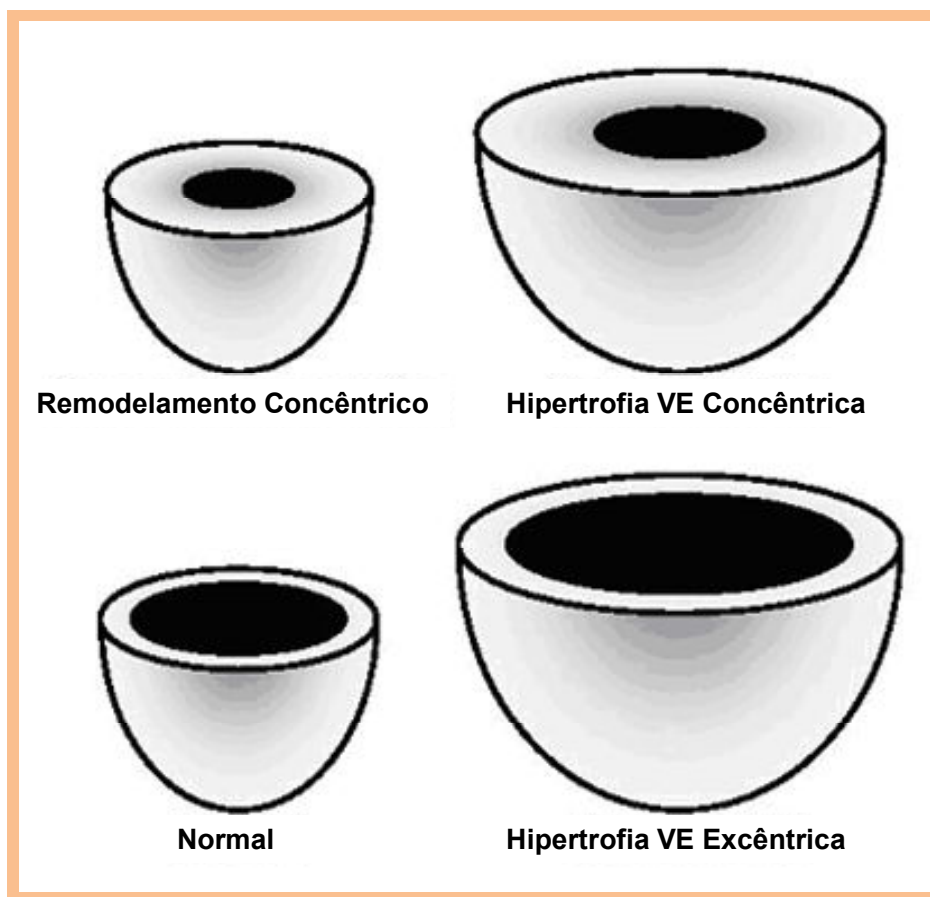
moleculares que, em última análise, controlam a expressão de genes que irão determinar o aumento da massa cardíaca quando o coração é submetido à sobrecarga de trabalho (6, 7).

A HC patológica pode ser desencadeada por diversos fatores como hipertensão, valvulopatias e infarto agudo do miocárdio, além de cardiomiopatias congênitas (4, 8, 9). Este tipo de HC geralmente caracteriza-se pela adição de sarcômeros em série levando ao aumento do comprimento do cardiomiócito, o que resulta na chamada hipertrofia excêntrica com corações de paredes afiladas e grandes cavidades. Alia-se a este processo as alterações da expressão gênica miocárdica e de moléculas sinalizadoras pró-inflamatórias e fatores de crescimento celular (4, 10, 11).

Existem quatro padrões geométricos distintos na caracterização da hipertrofia ventricular esquerda: o padrão normal do ventrículo esquerdo, o remodelamento cardíaco do tipo concêntrico, a hipertrofia concêntrica (habitualmente relacionada a sobrecargas de pressão) e, por fim, a hipertrofia excêntrica do VE, relacionada com sobrecarga de volume (Figura 1) (12). Estes padrões alterados na geometria do VE, quando atingem valores muito acima dos considerados normais, estão relacionados a um risco maior de morbidade e mortalidade cardiovascular, como demonstrado por Vakili e cols. (5).

Os critérios eletrocardiográficos que definem a hipertrofia ventricular esquerda têm a capacidade de identificar subgrupos de pessoas, principalmente em hipertensos, com alto risco de morbi-mortalidade por doenças cardiovasculares. Dados do estudo LIFE, com pacientes hipertensos demonstram que a redução nos valores de voltagem de Cornell e Sokolow-Lyon, com uso de terapia medicamentosa, está diretamente associada a uma

redução da massa ventricular, e, além disso, à redução dos riscos de morbidade e mortalidade cardiovascular (13).



**FIGURA 1. PADRÕES GEOMÉTRICOS VISTOS NAS DIVERSAS APRESENTAÇÕES DA HIPERTROFIA VENTRICULAR ESQUERDA (ADAPTADO DE FOPPA, DUNCAN E ROHDE, 2005 (12)).**

O desenvolvimento da hipertrofia, e sua posterior progressão para a insuficiência cardíaca (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 aumentados de fibronectina que, somados, comprometem tanto a função sistólica quanto a diastólica. Na miocardiopatia hipertrófica

assimétrica, entidade distinta, de origem predominantemente genética, ocorre espessamento preferencialmente no septo interventricular, o que, por fim, gera uma assimetria septal hipertrófica e também, gradiente de pressão em via de saída do ventrículo esquerdo (7).

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 protéica (tradução) não estão suficientemente elucidados (14). De forma simplista, pode-se considerar que os complexos eventos que levam à hipertrofia fazem parte de uma cascata seqüencial que inclui sinais iniciadores, acoplamento de fatores de transcrição e ativação de proteínas finalizando com a expressão de determinados genes (14).

### ***Hipertrofia cardíaca fisiológica***

---

O exercício físico é um estímulo 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. Entretanto, raramente o condicionamento atlético é puramente isotônico ou isométrico, e a maioria das atividades físicas envolve um componente dinâmico e estático, embora haja predomínio de um deles (15).

A prática regular de exercícios físicos leva a uma série de adaptações fisiológicas graduais no organismo que variam conforme as características do treinamento. Entre essas adaptações estão as cardiovasculares, dentre as quais se destaca a HC estabelecida frente a alterações hemodinâmicas que modificam as condições de sobrecarga cardíaca durante as sessões de treinamento (15, 16).

A HC induzida pelo treinamento físico refere-se ao aumento de massa muscular em resposta à sobrecarga de trabalho nas sessões de exercício. Esta hipertrofia é um mecanismo fisiológico compensatório, caracterizado principalmente pelo aumento do comprimento e diâmetro dos cardiomiócitos, desta forma sendo responsável pela manutenção da tensão na parede ventricular em níveis fisiológicos (6, 7, 15, 16). A HC ocorre pela capacidade do músculo cardíaco de adaptar-se a sobrecargas hemodinâmicas, que levam às alterações na estrutura do miocárdio de duas formas: uma causada pela sobrecarga de volume, verificada com o treinamento físico aeróbio, como a corrida e a natação, chamada de hipertrofia excêntrica, e a outra, causada pela sobrecarga de pressão, observada com o treinamento de força/isométrico, como o levantamento de peso e o judô, que é conhecida como hipertrofia concêntrica (16).

No entanto, controvérsias ainda persistem sobre seu real significado. Especula-se se este tipo de hipertrofia seria um processo puramente fisiológico (hipertrofia compensatória ou adaptativa), necessário para manter uma ótima performance cardíaca nas 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 (14, 17). Para tanto, são necessários mais estudos que visem o melhor entendimento dos mecanismos que distingam a HC fisiológica da patológica.

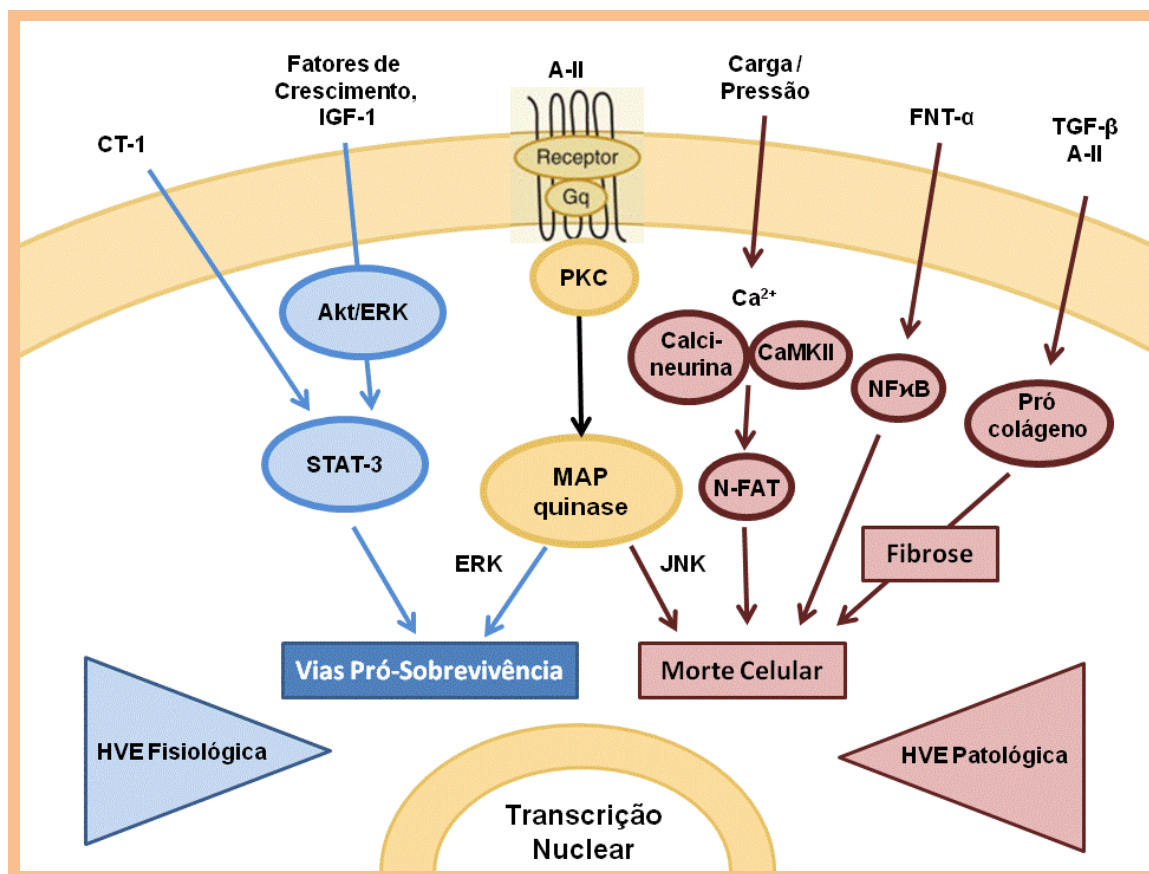
### ***Bases moleculares da hipertrofia cardíaca***

---

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 miócito, reprogramação de genes fetais e remodelamento da matriz extracelular, como representado na Figura 2 (7). O sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) parece ter muita relevância do ponto de vista das alterações moleculares que o ventrículo esquerdo sofre durante o exercício físico. Enquanto o receptor de angiotensina do tipo 1 (AT1) está implicado na progressão da hipertrofia patológica, o receptor de angiotensina do tipo 2 (AT2) está associado à hipertrofia fisiológica e parece contribuir para o desenvolvimento de células musculares e hipertrofia celular (18, 19).

Recentemente, Oliveira e cols. (2009) demonstraram a importância do eixo RAAS no processo de hipertrofia ventricular esquerda. Os animais tratados com losartana, um antagonista do receptor de angiotensina, não apresentaram hipertrofia ventricular em comparação com animais que receberam placebo no modelo de treinamento de nado forçado (20). Desta maneira, demonstrou-se o papel do receptor de angiotensina para a instalação da HC induzida pelo exercício. A angiotensina (Ang II), molécula central do sistema RAA, age de forma a estimular o crescimento de células cardíacas

neonatais através da ativação da via ERK, mas parece não possuir o mesmo efeito nas células adultas (21, 22).



**FIGURA 2. ROTAS DE SINALIZAÇÃO CELULAR ENVOLVIDAS NO DESENVOLVIMENTO DE HIPERTROFIA CARDÍACA FISIOLÓGICA E PATOLÓGICA. PARA ABREVIATURAS, REFERIR-SE AO TEXTO.**

Os receptores acoplados à proteína G (GPCRs) também desempenham um papel importante no que diz respeito aos efeitos agudos e crônicos relacionados à hipertrofia. Por exemplo, os receptores beta-adrenérgicos, de angiotensina II e endotelina-1 estão acoplados à proteína  $G\alpha$ , e alguns estudos demonstram que uma superexpressão destes parece ser um fator importante no desenvolvimento da HC (23).

Diversos estudos apontam, também, para uma ação conjunta da angiotensina II e do fator de crescimento transformante beta-1 (TGF- $\beta$ 1) como mediadores do remodelamento cardíaco. O TGF- $\beta$ 1 é particularmente expresso no miocárdio hipertrofiado e tem sua expressão induzida pela angiotensina II. Estes dados sugerem que a angiotensina II aja indiretamente na HC estimulando o crescimento dos miócitos via TGF- $\beta$ 1, este último agindo de forma parácrina e autócrina (24). O TGF- $\beta$ 1 também induz a síntese de componentes da matriz extracelular como colágeno, fibronectina e proteoglicanos, que contribuem para o estabelecimento da HC (24).

As MAP cinases (MAPKs) são proteínas do tipo serina/treonina cinases ativadas pela fosforilação dos resíduos de serina ou treonina que as constituem. As proteínas ERKs são ativadas por estresse mecânico (estiramento celular), enquanto que as JNKs e a p38 são ativadas principalmente por processos estressantes do ponto de vista celular, como citocinas inflamatórias, isquemia, oxidação, endotoxinas, choque osmótico, entre outros (7). Estresse mecânico, agonistas dos receptores de proteína G ou de receptores que possuem atividade intrínseca de cinases ativam a cascata de sinalização da ERK e, subseqüentemente, aumentam a expressão de c-fos e alfa-actina esquelética, indicando um vínculo dessas proteínas ao estresse mecânico relacionado à hipertrofia (7, 25). A p38 junto com o fator de crescimento epidermal possui a habilidade de promover respostas hipertróficas através da ativação da Stat5. Além disso, a ativação da p38 leva à ativação do peptídeo natriurético cerebral (BNP), o qual é um marcador de HC (7).

### ***Modelos animais de hipertrofia cardíaca fisiológica***

---

Existem diversos modelos animais de HC fisiológica induzida, tais como o uso de esteiras rolantes, natação e corrida voluntária em rodas de treinamento. Além do tipo de exercício ao qual os animais podem ser submetidos, ainda há o uso de diferentes espécies, como ratos, camundongos e coelhos, entre outros. Cada protocolo tem suas vantagens e desvantagens, bem como há variação na resposta hipertrófica conforme o modelo animal que se utiliza, como descrito na Tabela 2.

O uso de esteira rolante nos permite controlar fatores como intensidade do exercício e uniformidade entre os grupos de treinamento, porém, parece ser o protocolo com o menor grau de hipertrofia além de causar certo estresse nos animais. Já o protocolo de natação permite que vários animais sejam treinados ao mesmo tempo e é independente da motivação do animal, apesar de ser difícil de quantificar a intensidade do exercício, além do estresse imposto aos animais (26).

Este protocolo consegue induzir uma hipertrofia cardíaca de forma crônica e com ativação de fatores de crescimento importantes para tal fenótipo. O treinamento de corrida voluntária realizado em rodas, por sua vez, traz como benefício o fato de gerar HC de uma maneira mais “fisiológica” e “não-estressante”, pois o animal é livre para se exercitar conforme a sua vontade. Entretanto, como limitação, é um modelo no qual existe variabilidade no desempenho dos animais, seja na distância percorrida, seja na velocidade ou tempo de treino (26).



**TABELA 2. TIPOS DE TREINAMENTO PARA INDUÇÃO DE HIPERTROFIA CARDÍACA FISIOLÓGICA EM MODELOS ANIMAIS.**

<b>Espécie e tipo de treinamento</b>	<b>Comentários</b>	<b>Referência</b>
<b>Corrida em esteira</b>		
Ratos adultos, 47% de inclinação, 5x por sem., 60 min/dia, 4-13 semanas, intervalos de 8 min, 85-90% da $VO_2$ max e 2 min 50-60% da $VO_2$ max.	Exercício de alta intensidade; ↑ VE/corpo, ↑ VD/corpo, ↑ Coração/corpo, ↑ dimensão dos cardiomiócitos	Wisloff <i>et al.</i> (2001)(27)
Camundongos adultos, 47% de inclinação, 5x por sem., 60 min/dia, 4-13 semanas, intervalos de 8 min, 85-90% da $VO_2$ max e 2 min 50-60% da $VO_2$ max.	Exercício de alta intensidade; ↑ VE/corpo, ↑ VD/corpo, ↑ Coração/corpo, ↑ dimensão dos cardiomiócitos	Kemi <i>et al.</i> (2002)(28)
Ratos machos adultos, sem inclinação, 5x por sem., 30 min/dia, 6-12 sem., 0,8km/h.	↑ Peso VE/corpo	Fenning <i>et al.</i> (2003)(29)
<b>Natação</b>		
Ratos adultos machos, água 30-32°C, 5x sem., 8 sem., +5% do peso do corpo pendurado na cauda.	↑ VE/corpo, ↑ VD/corpo, ↑ Coração/corpo	Medeiros <i>et al.</i> (2004)(30)
Camundongos adultos machos, água 30-32°C, 1x versus 2x por dia, 60 vs 90 min treino, 4 ou 6 semanas, 5x/sem., +4% do peso do corpo pendurado na cauda.	Efeito das diferentes cargas, tempos e frequência do exercício; ↑ VE/corpo, ↑ Coração/corpo	Evangelista <i>et al.</i> (2003)(31)

---

### **Corrida voluntária em rodas**

Ratas adultas, 6 semanas de treino, acesso livre	↑ VE/corpo, ↑ VD/corpo, ↑ Coração/corpo	Natali <i>et al.</i> (2001)(32)
Camundongos adultos machos, 2-4 semanas de treino, acesso livre	Exercício e tempo de corrida são adquiridos: média de 4,3h/dia, 6,8km/dia na 4 <sup>a</sup> semana, ↑ Coração/corpo	Allen <i>et al.</i> (2001)(33)

---

Abreviações: VE = ventrículo esquerdo; VD = ventrículo direito; min = minutos; sem = semanas

Em resumo, não há um protocolo perfeito, com indução de HC acentuada e de pouca variabilidade. Apesar disto, dadas as dificuldades práticas de se estudar aspectos celulares e moleculares em modelo de HC fisiológica em humanos, faz-se o uso destes modelos animais, adaptando-os conforme a necessidade do pesquisador. Apesar das limitações de cada modelo, eles nos permitem identificar diversas rotas e moléculas envolvidas no processo fisiológico de instalação da hipertrofia adaptativa.

---

### **Os microRNAs (miRNAs ou miRs)**

---

Desde o seu descobrimento em 1993 por Ambros e colaboradores, os microRNAs (miRNAs ou miRs) vêm ganhando destaque no cenário científico por sua capacidade de regular finamente a expressão gênica. Naquele trabalho, os autores mostraram pela primeira vez um pequeno RNA, lin-4, tendo complementaridade parcial com a região 3'-UTR do RNA mensageiro (mRNA) da proteína lin-14, levando à redução da expressão de

tal proteína (34). Os microRNAs são moléculas curtas (18-25 nucleotídeos), endógenas, que não codificam proteínas, mas agem regulando a expressão de diversos genes por inibir a tradução ou por promover a degradação do mRNA (35).

Os microRNAs são filogeneticamente conservados e codificados por genes localizados nas regiões entre os genes codificadores de proteínas ou em introns (35). 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 (36). 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 (37, 38).

O *miRNA Registry* (39) e *miRbase Registry* definem os nomes dos genes de microRNAs. Os nomes são atribuídos pelo registro baseado em diretrizes estabelecidas por diversos pesquisadores. Os microRNAs recebem uma nomenclatura específica com 3 a 4 letras como prefixo para identificar a espécie, por exemplo, hsa-miR-101 para humanos e mmu-miR-101 para camundongos. Ainda, as seqüências 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* (39-41).

### ***Biogênese de microRNAs***

---

Os microRNAs são inicialmente transcritos como longos precursores de fita dupla chamados de microRNAs primários (pri-miRNA) dentro do núcleo celular. Ainda no núcleo, pela ação da enzima *Drosha*, o pri-miRNA é convertido em microRNA prematuro (pré-miRNA). No citoplasma, o pré-microRNA (60-70 nucleotídeos) sofre a ação de outra ribonuclease do tipo III denominada *Dicer* e dá origem a um pequeno e imperfeito duplex dupla fita de RNA (miRNA: miRNA\*) que contém tanto a fita de microRNA maduro, quanto sua fita anti-senso (microRNA\*) (42, 43). Nesta etapa, o microRNA maduro pode ser acoplado ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) constituído principalmente por proteínas da família Argonata. Apenas uma das fitas do duplex de miRNA permanece no complexo RISC para agir nos seus mRNAs-alvos (35, 44, 45) (Figura 3).

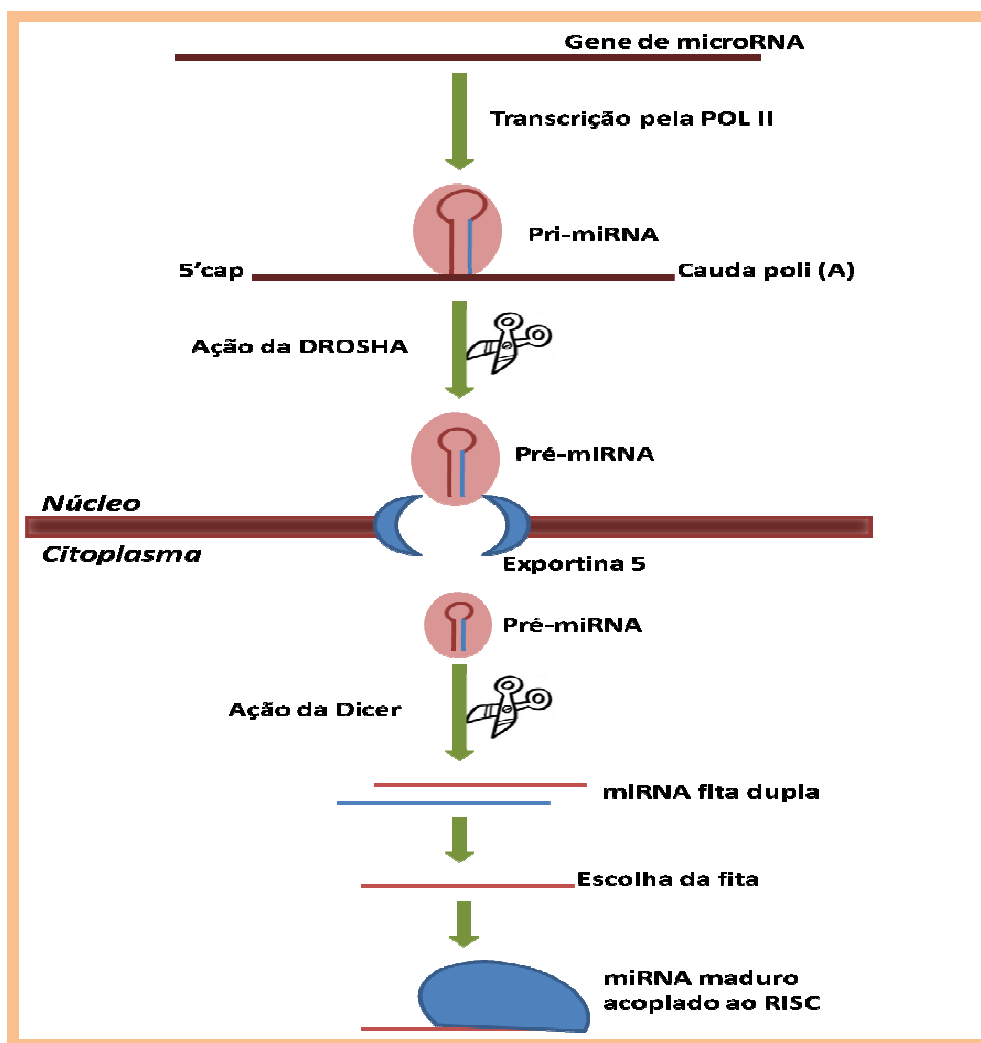


FIGURA 3. BIOGÊNESE DE MICRORNAS.

### ***Mecanismo de ação dos microRNAs***

Os microRNAs maduros interagem com a proteína argonauta (Ago) para formar o RISC, e então, guiar esse complexo até o mRNA-alvo, preferencialmente até a região 3' não-traduzida. O sítio de ligação dos microRNAs ao seu mRNA-alvo depende da complementaridade dos pares de bases (seqüência *seed* com aproximadamente 7 nucleotídeos) na região 5' do microRNA com a região 3' do mRNA (44, 46).

Esta ligação do microRNA ao mRNA é extremamente dependente de complementaridade de seqüência. Quando o microRNA é totalmente

complementar à seqüência do seu mRNA-alvo ocorre a degradação deste. Porém, havendo uma complementaridade imperfeita, a tradução do mRNA é inibida (35, 47). Em animais, a maioria dos microRNAs liga-se na região 3'-UTR do mRNA-alvo com complementaridade imperfeita, e funcionam como repressores traducionais (35). A inibição da tradução continua sendo considerada como o mecanismo principal de regulação da expressão gênica pelos microRNAs em animais (47); porém, trabalhos recentes têm apontado outros possíveis mecanismos, como a deadenilação, degradação e liberação precoce dos ribossomos, como mostrado na Figura 4 (47).

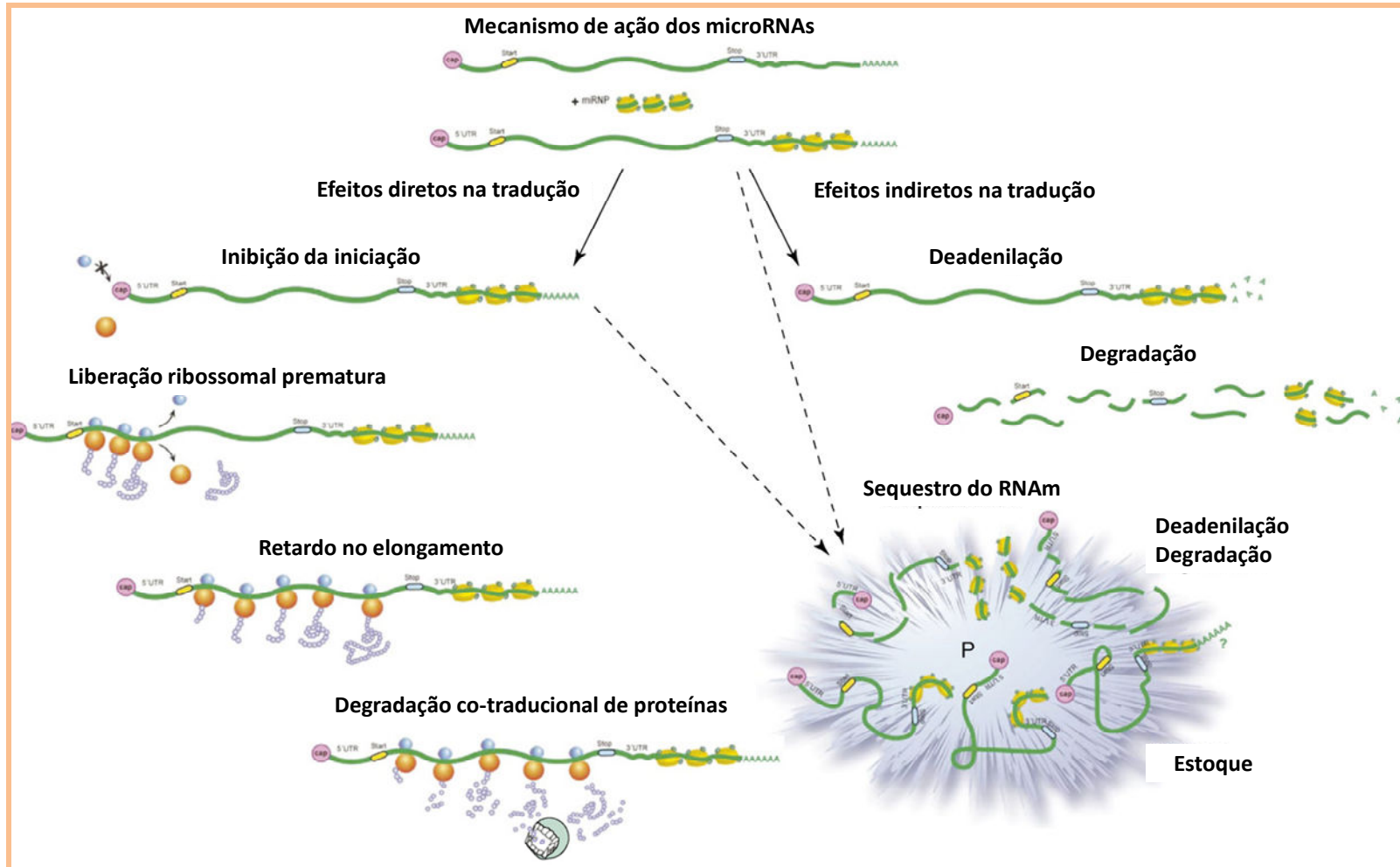


FIGURA 4. PRINCIPAIS MECANISMOS DE AÇÃO DOS MICRORNAs (ADAPTADA DE NILSEN, 2007).

### ***Os microRNAs e o sistema cardiovascular***

---

Os microRNAs miR-1 e miR-133 são preferencialmente expressos no músculo cardíaco e esquelético e parecem regular a diferenciação e a proliferação destas células. Estes dois microRNAs parecem desempenhar um papel importante no remodelamento cardíaco durante a cardiogênese (48). A superexpressão do miR-1 em camundongos resulta em paredes ventriculares delgadas, insuficiência cardíaca e malformações cardíacas no período embrionário (13° dia) (49). Um trabalho recente de Catalucci e colaboradores (2008) demonstrou que camundongos nocauteados para o miR-1 apresentavam defeitos cardíacos na condução elétrica e no controle do ciclo celular, bem como na morfogênese cardíaca (17). Outro grupo de pesquisa, coordenado por Care, demonstrou que há uma expressão reduzida do miR-1 e do miR-133 em modelos animais de HC e essa redução foi confirmada em amostras de coração provenientes de pacientes com cardiomiopatia hipertrófica ou dilatação atrial (50).

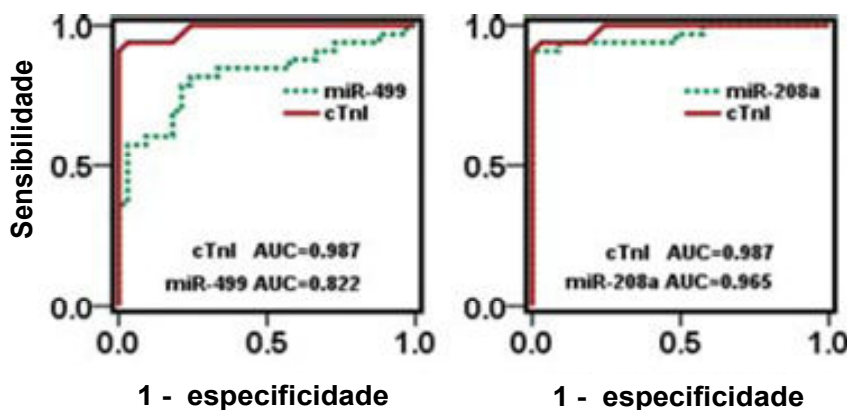
O miR-21 tem sua expressão induzida pelo estresse cardíaco e parece agir como um regulador do crescimento cardíaco e da ativação de genes fetais em cardiomiócitos primários *in vitro*; porém, o seu papel na hipertrofia do cardiomiócito ainda é controverso (48). Enquanto Tatsuguchi e colaboradores (2007) mostraram que o nocaute para o miR-21 realça os mecanismos hipertróficos (51), Cheng, em um trabalho do mesmo ano (2007), demonstrou que o nocaute para o miR-21 é capaz de suprimir o crescimento do cardiomiócito bem como a expressão de genes fetais (51, 52). Em modelos animais de HC induzida por Ang II e fenilefrina, a hipertrofia dos miócitos foi



acompanhada por um aumento de quatro a cinco vezes na expressão do miR-21. Além disso, quando realizado o nocaute para este microRNA, ocorreu uma inibição parcial do crescimento celular e da síntese protéica mediada por Ang II e fenilefrina nos cardiomiócitos de ratos neonatos (52).

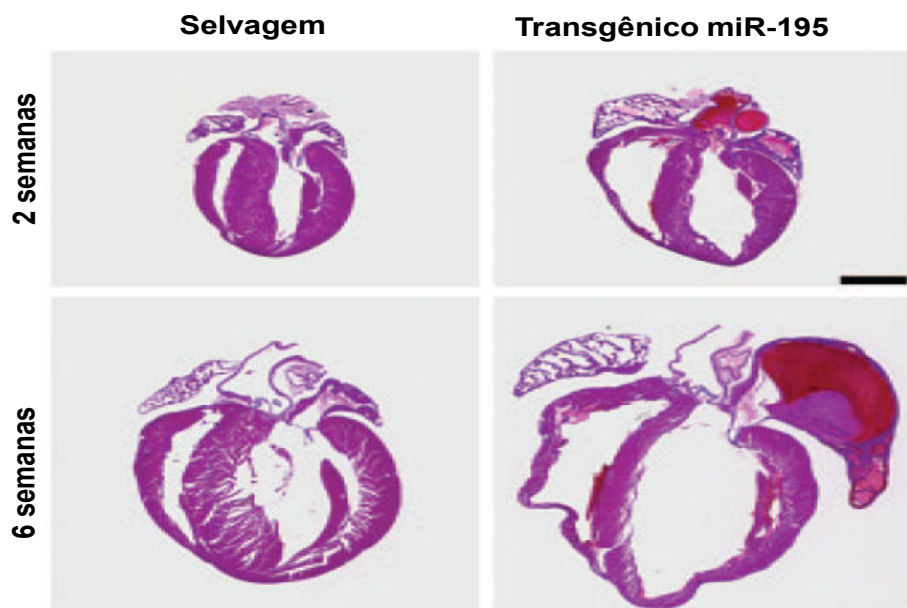
No modelo de bandejamento aórtico transtorácico (BAT), o qual resulta no desenvolvimento de hipertrofia cardíaca patológica e posterior progressão para insuficiência cardíaca, foi demonstrada a importância do miR-208. Os animais nocauteados para o miR-208 (miR-208  $-/-$ ) não desenvolviam hipertrofia cardíaca frente ao estímulo de sobrecarga de pressão com o BAT, diferentemente dos animais selvagens que apresentavam hipertrofia associada ao remodelamento irregular (53).

Os miR-208a e -208b são considerados, atualmente, microRNAs cardio-específicos, de tal forma que níveis plasmáticos aumentados do miR-208a em ratos infartados foram descritos como marcadores de infarto agudo do miocárdio tão sensíveis quanto a tradicional troponina I (54). Ainda neste trabalho de Wang e colaboradores, foi demonstrado que o miR-499 também é indicador de dano agudo ao miocárdio, porém não é tão sensível quanto o miR-208a como mostrado na figura 5 (54).



**FIGURA 5. CURVA DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DOS MICRORNAS 499 E 208A PARA DETERMINAÇÃO DO DIAGNÓSTICO DE INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO. (ADAPTADO DE CORSTEN, 2010 (54)).**

Estudo *in vivo* utilizando o modelo de BAT demonstrou que animais transgênicos, superexpressando o miR-195, apresentavam HC patológica duas semanas após o BAT evoluindo para insuficiência cardíaca decorridas seis semanas do insulto, o que associa-se a um pior prognóstico quando comparados aos animais selvagens que não apresentam níveis elevados deste microRNA (Figura 6). A superexpressão do miR-195, neste trabalho, induziu o crescimento dos cardiomiócitos e o desenvolvimento de IC nos camundongos transgênicos. Além disso, foi sugerido que níveis moderados do miR-195 causariam HC, enquanto níveis mais elevados causariam cardiomiopatia dilatada (55). Este estudo também demonstrou uma expressão aumentada de marcadores hipertróficos como o fator natriurético atrial, o BNP e a cadeia pesada de miosina ( $\alpha$ -MHC) em resposta à superexpressão do miR-195 (55).



**FIGURA 6. MODELO TRANSGÊNICO DE CAMUNDONGOS QUE SUPEREXPRESSAM MIR-195 E FORAM SUBMETIDOS AO BANDEAMENTO AÓRTICO TRANSTORÁCICO (ADAPTADO DE VAN ROOIJ, 2006 (55)).**

Recentemente Fernandes e cols. (2011) demonstraram o envolvimento dos miRs-27a e -27b e do miR-143 no modelo de HC induzida pelo exercício (natação) em ratos Wistar. Este trabalho mostra o aumento de expressão dos miRs-27a e -27b, que têm como alvo a enzima conversora de angiotensina (ACE), e a redução dos níveis teciduais de miR-143, que tem como alvo a ACE2 no coração destes animais treinados (56).

## JUSTIFICATIVA

---

Os microRNAs destacam-se como importantes reguladores da expressão gênica tanto em condições fisiológicas quanto patológicas. A identificação de um padrão de expressão destas moléculas é de extrema importância no entendimento dos mecanismos biológicos que levam à HC. Diversos estudos apontam para o papel relevante dos microRNAs na patogênese da hipertrofia ventricular patológica em modelos experimentais. Em particular, os miRs-21, -195 e -208, isoladamente, foram capazes de influenciar o desenvolvimento de fenótipos hipertróficos, semelhantes aqueles encontrados na hipertrofia patológica em humanos.

Por outro lado, o papel dos microRNAs na modulação gênica dos processos relacionados ao desenvolvimento da hipertrofia ventricular fisiológica ainda não foi estudado de forma consistente. Acredita-se que as vias intracelulares ativadas neste cenário sejam completamente distintas daquelas que ocorrem nos modelos de hipertrofia patológica. Apesar disto, o fenótipo de “hipertrofia excêntrica”, com dilatação cavitária leve e função sistólica inicialmente preservada, pode ocorrer em ambos os processos – fisiológico e patológico. Parece plausível, desta forma, que algumas rotas de ativação gênica possam ser compartilhadas nestas duas formas de hipertrofia ventricular.

O entendimento dos mecanismos moleculares que participam na gênese da hipertrofia cardíaca fisiológica, que tem caráter adaptativo, “benigno” e reversível, poderá, no futuro, viabilizar o estabelecimento de estratégias inovadoras para a prevenção, tratamento e reversão da própria hipertrofia

patológica. Esta última reconhecidamente relacionada com evolução clínica desfavorável, muitas vezes evoluindo para quadros de insuficiência cardíaca. Desta forma, o presente trabalho se propôs a avaliar o perfil de expressão de microRNAs em um modelo experimental de hipertrofia ventricular fisiológica, induzida por exercício físico voluntário em camundongos. A estratégia de avaliação planejada incluiu o estudo de microRNAs sabidamente expressos em modelos de cardiopatia e hipertrofia, além do estudo de novos microRNAs rastreados pela técnica de microarranjo. Para o entendimento dos processos que porventura venham a se estabelecer precocemente após o início da atividade física, optamos por realizar as análises moleculares após 7 dias do início do protocolo e ao final dele (35 dias).

## **OBJETIVO PRINCIPAL**

---

Identificar o perfil de expressão de microRNAs no ventrículo esquerdo de camundongos Balb/c submetidos ao protocolo de hipertrofia cardíaca induzida pelo exercício voluntário em rodas de corrida.

### ***Objetivos específicos:***

---

- ✓ Estabelecer o modelo de hipertrofia ventricular esquerda fisiológica, com exercício físico voluntário em camundongos.
- ✓ Avaliar a presença de hipertrofia cardíaca fisiológica aos 7 e 35 dias de treinamento nos animais que praticam o protocolo de exercício físico, avaliada por ecocardiografia e pela relação do peso do VE corrigido pelo peso total do animal.
- ✓ Avaliar o efeito do desenvolvimento da hipertrofia cardíaca fisiológica sobre a expressão de microRNAs sabidamente envolvidos com a hipertrofia ventricular patológica (miRs-21, -195 e -208).
- ✓ Avaliar o efeito do desenvolvimento da hipertrofia cardíaca fisiológica sobre a expressão de novos microRNAs rastreados pela técnica de microarranjo.

## REFERÊNCIAS

---

1. Gupta MP. Factors controlling cardiac myosin-isoform shift during hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2007 Oct;43(4):388-403.
2. Maron BJ, Pelliccia A. The heart of trained athletes: cardiac remodeling and the risks of sports, including sudden death. *Circulation.* 2006 Oct 10;114(15):1633-44.
3. Cooper Gt. Cardiocyte adaptation to chronically altered load. *Annu Rev Physiol.* 1987;49:501-18.
4. Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther.* 2010 Oct;128(1):191-227.
5. Vakili BA, Okin PM, Devereux RB. Prognostic implications of left ventricular hypertrophy. *Am Heart J.* 2001 Mar;141(3):334-41.
6. José Geraldo Mill EBP, Diana Meyerfreund Lemos, Cláudia Mendes Leite. Hipertrofia cardíaca: Mecanismos Bioquímicos. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul - Ano XIII 2004;03:1-4.*
7. Sudhiranjan Gupta BD, and Subha Sen. Cardiac Hypertrophy: Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & redox signaling.* 2007;9(6):623-52.
8. Hagege AA, Bruneval P, Levine RA, Desnos M, Neamatalla H, Judge DP. The Mitral Valve in Hypertrophic Cardiomyopathy : Old Versus New Concepts. *J Cardiovasc Transl Res.* 2011 Sep 10.
9. Liu L, Wang W, Meng X, Gao J, Wu H, Wang P, et al. Left ventricular hypertrophy induced by abdominal aortic banding and its prevention by

angiotensin receptor blocker telmisartan--a proteomic analysis. *J Physiol Biochem.* 2010 Dec;66(4):329-38.

10. McMullen JR, Izumo S. Role of the insulin-like growth factor 1 (IGF1)/phosphoinositide-3-kinase (PI3K) pathway mediating physiological cardiac hypertrophy. *Novartis Found Symp.* 2006;274:90-111; discussion -7, 52-5, 272-6.

11. McMullen JR, Shioi T, Zhang L, Tarnavski O, Sherwood MC, Kang PM, et al. 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.* 2003 Oct 14;100(21):12355-60.

12. Foppa M, Duncan BB, Rohde LE. Echocardiography-based left ventricular mass estimation. How should we define hypertrophy? *Cardiovasc Ultrasound.* 2005;3:17.

13. Okin PM, Devereux RB, Nieminen MS, Jern S, Oikarinen L, Viitasalo M, et al. Electrocardiographic strain pattern and prediction of new-onset congestive heart failure in hypertensive patients: the Losartan Intervention for Endpoint Reduction in Hypertension (LIFE) study. *Circulation.* 2006 Jan 3;113(1):67-73.

14. Eto Y, Yonekura K, Sonoda M, Arai N, Sata M, Sugiura S, et al. Calcineurin is activated in rat hearts with physiological left ventricular hypertrophy induced by voluntary exercise training. *Circulation.* 2000 May 9;101(18):2134-7.

15. Batlouni M. Hipertrofia Cardíaca. Fatores Determinantes e Mecanismos Moleculares. *Arq Bras Cardiol.* 1995;65 (6):533-9.

16. Flávio de Castro Magalhães DB, Nara Hashimoto, Stéphano Freitas Soares Melo, Fernanda Roberta Roque, Edilamar Menezes de Oliveira.



Hipertrofia cardíaca induzida pelo treinamento físico: eventos moleculares e celulares que modificam o fenótipo. *Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte*. 2008 189-193;7 (1).

17. Catalucci D, Latronico MV, Condorelli G. MicroRNAs control gene expression: importance for cardiac development and pathophysiology. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Mar;1123:20-9.

18. Sadoshima J, Xu Y, Slayter HS, Izumo S. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):977-84.

19. Shivakumar K, Dostal DE, Boheler K, Baker KM, Lakatta EG. Differential response of cardiac fibroblasts from young adult and senescent rats to ANG II. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Apr;284(4):H1454-9.

20. Oliveira EM, Sasaki MS, Cerencio M, Barauna VG, Krieger JE. Local renin-angiotensin system regulates left ventricular hypertrophy induced by swimming training independent of circulating renin: a pharmacological study. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2009 Mar;10(1):15-23.

21. Aikawa R KI, Nagai R, and Yazaki Y. Rho plays an important role in angiotensin II-induced hypertrophic responses in cardiac myocytes. *Mol Cell Biochem* 2000;212:177-82.

22. Rosenkranz S. TGF-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. . *Cardiovascular Research*. 2004;63:423-32.

23. Molkenin JD DIG. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. . *Annu Rev Physiol*. 2001;63:391-426.

24. Wenzel S TG, Piper HM, and Schluter KD. Redox-sensitive intermediates mediate angiotensin II-induced p38 MAP kinase activation, AP-1 binding

activity, and TGF-beta expression in adult ventricular cardiomyocytes. *FASEB J* 2001;15:2291-3.

25. Yazaki Y, Kikkawa U. Role of protein kinase system in the signal transduction of stretch-mediated myocyte growth. *Basic Res Cardiol*. 1992;87 (suppl 2):11-8.

26. Wang Y, Wisloff U, Kemi OJ. Animal models in the study of exercise-induced cardiac hypertrophy. *Physiol Res*. 2010;59(5):633-44.

27. Wisloff U, Helgerud J, Kemi OJ, Ellingsen O. Intensity-controlled treadmill running in rats: VO<sub>2</sub> max and cardiac hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Mar;280(3):H1301-10.

28. Kemi OJ, Loennechen JP, Wisloff U, Ellingsen O. Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol*. 2002 Oct;93(4):1301-9.

29. Fenning A, Harrison G, Dwyer D, Rose-Meyer R, Brown L. Cardiac adaptation to endurance exercise in rats. *Mol Cell Biochem*. 2003 Sep;251(1-2):51-9.

30. Medeiros A, Oliveira EM, Gianolla R, Casarini DE, Negrao CE, Brum PC. Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2004 Dec;37(12):1909-17.

31. Evangelista FS, Brum PC, Krieger JE. Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. *Braz J Med Biol Res*. 2003 Dec;36(12):1751-9.

32. Natali AJ, Turner DL, Harrison SM, White E. Regional effects of voluntary exercise on cell size and contraction-frequency responses in rat cardiac myocytes. *J Exp Biol*. 2001 Mar;204(Pt 6):1191-9.

33. Allen DL, Harrison BC, Maass A, Bell ML, Byrnes WC, Leinwand LA. Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. *J Appl Physiol*. 2001 May;90(5):1900-8.
34. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):843-54.
35. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):281-97.
36. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol*. 2002 Apr 30;12(9):735-9.
37. Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, Li Q, Li Y, He J, et al. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J*. 2010 Mar;31(6):659-66.
38. van Rooij E, Marshall WS, Olson EN. Toward microRNA-based therapeutics for heart disease: the sense in antisense. *Circ Res*. 2008 Oct 24;103(9):919-28.
39. Griffiths-Jones S. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res*. 2004 Jan 1;32(Database issue):D109-11.
40. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*. 2008 Jan;36(Database issue):D154-8.
41. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res*. 2006 Jan 1;34(Database issue):D140-4.

42. Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*. 2001 Jul 13;106(1):23-34.
43. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003 Sep 25;425(6956):415-9.
44. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004 Sep 16;431(7006):350-5.
45. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 2003 Oct 17;115(2):199-208.
46. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engel P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*. 2005 Feb 17;433(7027):769-73.
47. Nilsen TW. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *Trends Genet*. 2007 May;23(5):243-9.
48. Mann VDaDL. The Emerging Role of MicroRNAs in Cardiac Remodeling and Heart Failure. *Circ Res*. 2008;103:1072-83.
49. Zhao Y, Samal, E. and Srivastava, D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. . *Nature* 2005;436:214-20.
50. Care A CD, Felicetti F, Bonci D, Addario A, Gallo P, Bang ML, Segnalini P, Gu Y, Dalton ND, Elia L, Latronico MV, Hoydal M, Autore, C RM, Dorn GW, Ellingsen O, Ruiz-Lozano P, Peterson KL, Croce CM, Peschle C, Condorelli G. . MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nature Medicine*. 2007;13:613-8.

51. Tatsuguchi M SH, Callis TE, Thomson JM, Chen JF, Newman M, Rojas M, Hammond SM, Wang DZ. Expression of microRNAs is dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 2007;42:1137-41.
52. Cheng YH JR, Yue JM, Yang J, Liu XJ, Chen H, Dean DB, Zhang CX. . MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart - do they play a role in cardiac hypertrophy? *Am J Pathol.* 2007;170:1831-40.
53. van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science.* 2007 Apr 27;316(5824):575-9.
54. Corsten MF, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, et al. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet.* 2010 Dec;3(6):499-506.
55. van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Nov 28;103(48):18255-60.
56. Fernandes T, Hashimoto NY, Magalhaes FC, Fernandes FB, Casarini DE, Carmona AK, et al. Aerobic exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves regulatory MicroRNAs, decreased angiotensin-converting enzyme-angiotensin ii, and synergistic regulation of angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin (1-7). *Hypertension.* 2011 Aug;58(2):182-9.

**ORIGINAL ARTICLE**

---

**MicroRNAs in an Experimental Model of  
Physiologic Left Ventricular Hypertrophy**

Brief Title: MicroRNAs and LVH

Nidiane C. Martinelli BSc, Kátia G. Santos BSc, Andréia Biolo MD DSc,  
Carolina R. Cohen BSc, Michael E. Andrades BSc, Úrsula Matte PhD, and Luis  
E. Rohde MD, BSc

From the Cardiovascular Experimental and Molecular Laboratory, the Heart  
Failure and Cardiac Transplant Unit, Cardiology Division at Hospital de Clínicas  
de Porto Alegre, and the Post-Graduate Program in Cardiology and  
Cardiovascular Science, Medical School of the Federal University of Rio  
Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Address for correspondence:

Luis E. Rohde MD

Heart Failure and Transplant Unit

Cardiology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350, Sala 2061

Porto Alegre, RS, Brazil 90035-003

Phone/Fax 55 51 33598344

## ABSTRACT

---

**BACKGROUND** - MicroRNAs (miRs) are a class of small non-coding RNAs that regulate gene expression. Transgenic models have proved that a single miR can induce pathological cardiac hypertrophy and failure. The cellular and molecular mechanisms involved in the genesis of physiologic left ventricular hypertrophy (LVH), however, are not well elucidated.

**OBJECTIVE** - To evaluate miRs expression in an experimental model of exercise-induced LVH, based on miRs already known to be expressed in pathological hypertrophy and on miRs identified by microarray analysis.

**METHODS** - Male Balb/c mice were divided into sedentary (SED) and exercise (EXE) groups. Voluntary exercise was performed in odometer-monitored metal wheels during 35 days. Analyses were performed after 7 and 35 days of training, and consisted of transthoracic echocardiography, maximal exercise test, miRs microarray (miRBase v16; LC Sciences, TX, USA) and real-time qRT-PCR analysis.

**RESULTS** - Left ventricular weight/body weight ratio increased by 7% in the EXE group at day 7 ( $p < 0.01$ ) and by 11% at 35 days of training ( $p < 0.001$ ), compared to the SED group. Echocardiography-based data demonstrated a similar pattern of LVH. After 7 days of training, microarray identified 35 deregulated miRs: 20 had an increase in their expression and 15 were down-regulated ( $p < 0.01$ ). At day 35 of training, 25 miRs were deregulated: 15 were up-regulated and 10 had decreased their expression compared to the SED group ( $p < 0.01$ ). In qRT-PCR there was no change of expression of miRs previously associated to pathological LVH (miR-21 and miR-195), but it was identified a significant down-regulation of miR-26b and a statistical trend towards an increased expression of miR-341\*.

**CONCLUSIONS** - Our data indicated that previously established regulatory gene pathways involved in pathological LVH are not deregulated in physiologic LVH. The observed potential increase in miR-341\*, targeting altered cytoskeleton network properties, and the decrease in miR-26b expression, targeting pro-survival pathway (PI3K/Akt), deserve further gene validation studies.

## INTRODUCTION

---

MicroRNAs (miRs or miRNAs) are a class of small non-coding RNAs that regulate gene expression by inducing mRNA cleavage or by inhibiting protein translation (1). Similar to protein-coding genes, miRs expression is variable; some miRs are constantly expressed while others are expressed in a cell- and tissue-specific manner (2). miR-208a and miR-208b, for example, are cardiac-specific miRs that are co-expressed and encoded within introns of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -cardiac myosin heavy chain (MHC) gene, respectively (3,4).

Expression of miRs has been described in almost all cardiovascular disorders (5-9), but their specific role on the genesis of cardiac hypertrophy has received great attention in the last decade. Different *in vivo* models of cardiac hypertrophy such as transverse aortic constriction and calcineurin transgenic mice demonstrated a similar pattern of deregulated miRs (10). Transgenic mouse models of gain- and loss- of function have proved that a single miR can induce pathological hypertrophy and failure (4,11,12). Cardiac overexpression of miR-195 resulted in pathological cardiac growth and heart failure in transgenic mice (11).

Physiologic cardiac hypertrophy is a common adaptation that occurs in the heart under exercise training and leads to morphological changes without overall ventricular dysfunction, an alleged “benign hypertrophy” (13,14). The cellular and molecular mechanisms involved in the genesis of physiologic cardiac hypertrophy are not well elucidated than the processes implicated in pathological growth, but they also entail the activation of specific sets of genes responsible for cardiomyocyte expansion (15-17). Fernandes *et al.* have



recently suggested that miRs might also be involved in experimental cardiac hypertrophy induced by swimming training (18). In this scenario, studies that unravel the molecular mechanisms that permeate heart adaptations on physiologic hypertrophy might be instrumental in the development of strategies to prevent or reduce the detrimental impact of pathological hypertrophy. The present study was planned to evaluate the profile of miRs expression in an experimental model of exercise-induced left ventricular hypertrophy, based on miRs already known to be expressed in pathological hypertrophy and on microarray analysis.

## **METHODS**

---

### ***Animals***

---

Eight to ten 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*. Animals were divided into two groups of 10-12 animals: sedentary (SED) and exercise (EXE) groups. Analyses were performed after 7 and 35 days of training. 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 study was approved by the institution's Ethics on Research Committee.

### ***Model of physiological hypertrophy***

---

Physiological hypertrophy was induced by a standard protocol of voluntary exercise of 35 days, as previously described (19,20). In brief, animals were kept in cages with metal wheels (diameter of 12 cm) where they could perform voluntary exercise. Each cage contained four mice and a wheel for each animal. Odometers were installed in each cage in order to obtain data related to exercise load: daily distance (m), average speed (m/min), maximum speed (m/min) and running time. These measures were reviewed and recorded by an investigator every 24 hours, during the exercise protocol. Sedentary groups were kept in standard cages, with no exercise wheels. Animals were sacrificed at 7 and 35 days after the initiation of the protocol.

### ***Echocardiography***

---

Animals underwent transthoracic echocardiography at a baseline evaluation, at 7 and 35 days, without the use of anesthesia. The echocardiograms were performed by a trained operator in human and experimental echocardiography, using a commercially available equipment (EnVisor HD System, Philips Medical, Andover, MA, USA), with a 12–13 MHz linear transducer, at 2 cm depth imaging. At least three high-quality M-mode tracings of the short-axis view of the left ventricle was captured and stored for off-line analysis. The echocardiographic operator was blinded to group allocation at all times. Left ventricular diastolic and systolic transverse dimensions were then measured in at least three beats per animal to estimate left ventricular mass. Left ventricular mass was calculated using the following formula:  $[1,055 (LVSTd + LVdD + PWTd)^3 - LVDd^3]$  (21), where LVSTd represents left ventricular septal thickness in diastole, LVDd represents left

ventricular diastolic diameter, and PWTd represents posterior wall thickness in diastole.

### ***Maximal exercise test***

---

Mice were submitted to exercise testing on a motor treadmill (Space Saver Treadmill®, USA) at baseline, 7 days and 35 days of training to evaluate their maximal exercise capacity and to demonstrate the expected improvement in functional capacity in the EXE group. All animals underwent a 5-minute adaptation period on the treadmill at a speed of 7.7 m/min before the test. The test started at 15m/min and the intensity of exercise was increased by 3 m/min every 2 min at 0% grade of inclination until 45m/min or exhaustion. This test provided the total distance run by each animal that was estimated at the end of the test.

### ***Heart weighing and tissue preparation for molecular analysis***

---

After the final echocardiographic assessment, animals were anesthetized with xylazine (0.67 mg/kg) and ketamine (0.33 mg/kg) and weighed, followed by surgical chest opening and rapid excision of the hearts. Then, the atriums and the right ventricle were excised in order to isolate the left ventricle. The specimens were weighed and immediately frozen in liquid nitrogen. Left and right ventricles were weighed to calculate left ventricle/body weight ratio (LV/BW in mg/g). After weighing, a tissue sample from the left ventricle of each animal was stocked in a *RNA later*® (Qiagen, USA) solution. Total RNA and miRs were extracted using *miRNAeasy mini kit* according to manufacturer's instructions

(Qiagen, USA). After extraction, 50pM of synthetic microRNA-39 from *Caenorhabditis elegans* (cel-miR-39) were spiked-in as a standard control. Big RNAs and the enriched portion with miRs were stored at -80°C for subsequent molecular analyses. The concentration of RNA was determined by a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Tech., Rockland, DE).

### ***MicroRNA microarray***

---

A fraction of total RNA was sent to LC Sciences (LC Sciences, Houston, TX) to perform miRs microarray. We performed this analysis using a pool of four animals from each group (SED 7 days; EXE 7 days; SED 35 days and EXE 35 days). The animals to compose the RNA pool in each group were chosen based on the extremes of LV/BW, and total RNA concentration was equilibrated among animals to avoid quantity variability. RNA pools were suspended in a regular precipitation solution (3M NaOAc, pH 5.2 and 100% ethanol in final volume of 300uL) and stored at -80°C freezer until shipment. For international shipment, tubes containing RNA pools were packed in a thermo-stable shipping box using a mix of dry ice and regular freezer ice blocks to keep the temperature low. The transport was carried out by international courier service and was in accordance with IATA DG regulations of safety and non-hazardous samples. The miR microarray was performed using the miRbase version 16, which allows the screening of 1040 mature mouse miRNA. LC Sciences Company performs the analysis in triplicates and provides the basic statistical analysis to compare the differences between groups.

## ***Reverse transcription and quantitative real time PCR (qRT-PCR)***

---

Reverse Transcription (RT) reaction was carried out for miRs that have been previously described to be involved in pathological cardiac hypertrophy (miR-21 and miR-195) and in models of cardiovascular disease associated to cardiomyocyte injury (miR-499). Also, selected miRs that were significantly altered in microarray data were chosen for validation: miR-150 was down-expressed both at days 7 and 35, miR-499 was down-expressed at day 7 and miR-26b at day 35; miR-341\* was overexpressed at both days 7 and 35, while miR-1224 was overexpressed only at day 7. miR-3077\* and miR-1892 were also selected for validation, but the manufacturer (Applied Biosystems Inc., USA) could not build high-quality custom-made constructs that allowed analysis.

Reverse Transcription (RT) reactions were run at Veriti™ 96-Well Thermal Cycler according to manufacturer's instructions using miRs Reverse Transcription Kit® (Applied Biosystems Inc., USA). Dysregulated miRNAs were validated by using the TaqMan® miRs Expression Assays probes (Applied Biosystems Inc., USA). TaqMan miRNA assays and Primer sets for these miRNAs including control cel-miR-39 were purchased from Applied Biosystems Inc. All the miRs qRT-PCR reactions were run in triplicate using 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, Inc.). Relative expression was calculated using the comparative threshold cycle ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) method (22).

## ***Statistical analysis***

---

All values are expressed as mean  $\pm$  SD. Student's t-test or Mann-Whitney test was used for two-group comparisons. Comparisons of parameters among three or more groups were analyzed by one-way ANOVA for single factor, or two-way ANOVA for two-factor variables, followed by Bonferroni's correction for multiple-comparisons. A two-tailed p value  $<0.05$  was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using SPSS version 18 for Windows.

## **RESULTS**

---

### ***Exercise protocol and maximal exercise test***

---

Animals underwent a 5-week protocol of voluntary wheel running. Table 1 describes weekly and mean data on exercise load. Overall, animals ran a mean time of 5 hours per day, during all weeks of the protocol. Mean daily distance increased weekly and peaked at the third week ( $7.6 \pm 3.4$  km/day;  $p = 0.005$ ). Similarly, mean speed increased during the protocol with the highest speed achieved at the third and fourth week ( $p < 0.001$ ). There was no difference on maximal speed between all weeks.

Mice performance in exercise testing at baseline, after 7 days and 35 days of training is depicted in Figure 1. Exercised animals showed the expected improvement in functional performance compared to the control group, evaluated by the total running distance before exhaustion. This difference was already noticeable at day 7 ( $1550 \pm 108$  m versus  $522 \pm 124$  m, respectively) and increased at day 35 of training ( $1858 \pm 141$  m and  $557 \pm 141$  m, respectively).

### ***Left ventricular hypertrophy***

---

Body weight was not different between EXE and SED groups both in 7 days and 35 days of training (data not shown). LV/BW ratio increased by 7% in the EXE group at day 7 compared to SED group ( $4.84 \pm 0.17$  mg/g versus  $4.47 \pm 0.16$  mg/g, respectively;  $p < 0.01$ ; Figure 2A), and by 11% at 35 days of training ( $4.98 \pm 0.31$  mg/g versus  $4.54 \pm 0.13$  mg/g, respectively;  $p < 0.001$ ; Figure 2B). Echocardiography-based data demonstrated a similar pattern, as LVSTd and PWTd increased progressively after training, as depicted in Figures 3A and 3B. LVSTd increased by 24% and 32% after day 7 and day 35, respectively; while PWTd increased by 19% and 17% after day 7 and day 35, respectively (all  $p$  values  $< 0.005$ ). We did not observe any significant differences between the EXE and SED groups in LVDd in both time points (Figure 3C). Estimated left ventricular mass increased significantly only at day 35 in the EXE group compared to the SED animals ( $58.2 \pm 5.0$  mg and  $33.5 \pm 16.0$  mg, respectively;  $p = 0.01$ ; Figure 3D).

### ***MicroRNAs microarray***

---

Detailed data on microarray analysis is described in the supplementary data in the Appendix. Microarray analysis was performed in both groups (EXE and SED) in two time points (day 7 and day 35). Day 7 evaluation was undertaken in the expectation to assess the cellular process that was taking place as the cardiomyocyte is initiating the adaptation to exercise. At 7 days of training, microarray identified 35 deregulated microRNAs: 20 had an increase in their expression and 15 were down-regulated (Figure 4A,  $p < 0.01$ ). At day 35 of training, 25 microRNAs were deregulated, 15 were up-regulated and 10 had their expression decreased compared to the SED group (Figure 4B,  $p < 0.01$ ).

Figure 4C shows the comparison of miRs expression in both trained groups, at different time points: we detected 7 miRs down-regulated and 11 miRs up-regulated ( $p < 0.01$ ). Finally, we analyzed the temporal variation in miRs profile between sedentary groups. We detected only 6 miRs deregulated: 2 miRs were down-regulated and 4 miRs were up-regulated (from SED day 7 to SED day 35) (Figure 4D;  $p < 0.01$ ).

### ***Real-time qRT-PCR***

---

miR-21, miR-195 and miR-499. Real-time qRT-PCR analysis of the miRs that has been previously demonstrated to be involved in pathological cardiomyocyte growth are depicted in Figure 5. As demonstrated, we did not observe any significant change in expression of these miRs when comparing the EXE and SED groups in both time points.

Down-expressed miRs on the microarray. Figure 6 shows the real-time qRT-PCR of miR-26b and miR-150, demonstrating a significant decreased expression of miR-26b in exercised animals compared to the sedentary group.

Overexpressed miRs on the microarray. Figure 7 shows the real-time qRT-PCR of miR-341\* and miR-1224, demonstrating a trend towards an increased expression of miR-341\* in exercised animals compared to the sedentary group.

## **DISCUSSION**

---



In the present study, animals that underwent physical training developed physiologic left ventricular hypertrophy, demonstrated by a significant increase in left ventricular mass indices, based on direct weighing and on echo-based parameters. Voluntary exercise also implicated in a considerable improvement in the achieved distance in the maximal exercise test. These functional and morphological changes in left ventricular geometry paralleled with a distinct pattern of microRNA expression that what had been previously demonstrated in models of pathologic left ventricular hypertrophy. In particular, we did not find altered levels of miR-21, miR-195, miR-499, miR-150 and miR-1224; but we identified a reduced expression of miR-26b and a tendency towards to an increased expression of miR-341\* after 7 days of training. Importantly, few miRs were altered when comparing both sedentary groups in different time points, suggesting that the changes identified between SED and EXE groups were not merely by chance.

miR-21, miR-195 and miR-499 have been previously described as biomarkers of cardiac injury in pathological cardiac hypertrophy and in cardiovascular disorders. miR-21 levels, for example, were selectively increased in fibroblasts of the failing heart, and *in vivo* silencing of miR-21 in a mouse pressure-overload-induced disease model diminished cardiac ERK-MAP kinase activity, inhibited interstitial fibrosis and attenuated cardiac dysfunction (23). In contrast, miR-21-null mice were normal and, in response to a variety of cardiac stresses, display cardiac hypertrophy, fibrosis, upregulation of stress-responsive cardiac genes, and loss of cardiac contractility, suggesting that miR-21 might not be essential for pathological cardiac remodeling (24). Olson *et al.* have reported that overexpression of miR-195 in a model of ascending aorta

banding in mice directly induced cardiac dysfunction and heart failure in transgenic animals (11). Using the same experimental model, Busk *et al.* showed that miR-195 is induced during the early phases of hypertrophic growth (25). Finally, acute myocardial infarction and acute heart failure patients depicted significant increases in plasmatic levels of miR-499 compared to control (26). Our data indicate that microRNAs that have been previously associated with left ventricular hypertrophy during pathologic processes are not involved in the development of physiologic hypertrophy.

We found a trend of increase in miR-341\* expression at 7 days in animals that developed physiologic hypertrophy. This microRNA had not been previously described or validated in models of cardiovascular disease. However, miR-341\* has the microtubule-associated protein 4 (Mtap4 or MAP-4) as one of its gene targets ((predicted by Targetscan (27)). MAP4 overexpression causes increased tubulin expression, formation of stable microtubules, and altered microtubule network properties, such that MAP4 upregulation may be one of the causes for the dense, stable microtubule network characteristic of pressure-overloaded, hypertrophied cardiomyocytes (28). Microtubules are one of the three types of cytoskeletal filaments that are superimposed spatially on the myofilaments, a specialized system of contractile protein filaments in the mature striated muscle. Each of these systems of protein filaments has the potential to respond in an adaptive or maladaptive manner during load-induced hypertrophic cardiac growth (29). Using this line of reasoning, Cooper has suggested that “the extent to which such hypertrophy is compensatory is also critically dependent on the type of hemodynamic overload that serves as the hypertrophic stimulus” (29). Thus cardiac hypertrophy might

not be intrinsically maladaptive; rather, it is the nature of the inducing load rather than hypertrophy itself that is responsible, through effects on structural and/or regulatory proteins, for the frequent deterioration of initially compensatory hypertrophy into the congestive heart failure state. Further target validation approaches are necessary to confirm the intriguing hypothesis that miR-341 might be involved in physiologic hypertrophy through the contribution of MAP-4 de-regulation.

We observed a significantly reduction in miR-26b expression at 7 days of training. Cardiomyocyte increase in size as a response to major physiological or pathological stimuli is the process that leads to augmentation of ventricular mass defined as hypertrophic growth (30). Diverse pathways are involved and can be modulated according to initial stimuli. Exercise, for example, activates preferentially the Akt/PI3K pro-survival pathway (31,32). miR-26b has never been previously associated with models of left ventricular hypertrophy, but this microRNA has been largely studied in different tumor cells and types of cancers (33-37). For instance, ionizing radiation-induced up-regulation of activating transcription factor 2 (ATF2) was coordinately enhanced by suppression of miR-26b in lung cancer cells, which may enhance its effect in MAPK signaling pathway (33). Interestingly, miR-26b has attractive predicted target genes (predicted by Targetscan [27]) related to the pro-survival pathways, such as the insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and PI3K regulatory subunit gamma, both key signals associated to adaptative hypertrophy (30).

Although microarray analysis has suggested a decreased expression of miR-150 both at 7 and 35 days after initiation of exercise training, we did not

observe significant changes in this miR by real-time qRT-PCR. miR-150 has been described as a regulator of B- and T-cell differentiation and is expressed in mature cells (38). In addition, human studies suggest that microvesicles isolated from the plasma of patients with atherosclerosis contained higher levels of miR-150, and that they promoted cell migration more effectively than microvesicles from healthy donors (39). These results demonstrate the appealing concept that cells can secrete miRNAs and deliver them into recipient cells where the exogenous miRNAs can regulate target gene expression and recipient cell function.

Recently, Fernandes and co-workers (18) reported exercise-induced expression of microRNA-27a and -27b, targeting the classic angiotensin-converting enzyme (ACE), and decreased microRNA-143, targeting ACE2 in the heart. They demonstrated an increase in ACE2, Ang (1-7), and angiotensin II type 2 receptor in rat hearts induced by high-volume swimming training. These findings suggest that the “non-classic” cardiac renin-angiotensin system might counteract the classic cardiac renin-angiotensin system during adaptive hypertrophy (18). Our microarray analysis did not confirm these latter findings. Significant differences in the experimental models might explain these discrepancies, related to the exercise protocol itself (swimming versus voluntary exercise) and to the type of animals (rats versus mice).

Some limitations related to our study design must be considered. Microarray analysis was performed using tissue derived from a pool of four animals in each group and time period, with the expectation that the intrinsic variability on microRNA expression would be low among animals from the same

group. This was proven not to be completely true, even in animals that developed clear exercised-induced ventricular hypertrophy. Two highly deregulated microRNAs (miR-3077\* and miR-1892) that were identified by microarray analysis could not be custom-made by the manufacturer (Applied Biosystems Inc., USA). Finally, as fully recognized, microarray analysis is considered a method of screening, and for this reason it has to be confirmed by qRT-PCR.

In conclusion, our data on microRNA profiling after 7 and 35 days of voluntary exercise in mice suggest that previously established gene regulatory pathways of pathological hypertrophy are not deregulated in physiologic cardiac growth. The observed potential increase in miR-341\*, related to altered cytoskeleton network properties, and the decrease in miR-26b expression, related to prosurvival pathway of PI3K and Akt, deserve further gene validation target studies.

## FIGURE LEGENDS

---

**FIGURE 1.** Exercised and sedentary mice performance at maximal exercise test. P values represent post-hoc analysis comparing groups in different time points (day 7 and day 35).

**FIGURE 2.** Heart weight/body weight (HW/BW) ratio and left ventricular weight/body weight (LVW/BW) ratio in exercised and sedentary mice at day 7 and day 35. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation.

**FIGURE 3.** Echocardiographic data in exercised and sedentary mice at day 7 and day 35. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation.

**FIGURE 4.** Microarray analysis of microRNAs in exercised and sedentary mice at day 7 and day 35. Green boxes represent down-regulated microRNAs and red boxes represent up-regulated microRNAs, when compared to controls. (A): Analysis at day 7 comparing sedentary (3 left boxes) and exercised (3 right boxes) animals. (B): Analysis at day 35 comparing sedentary (3 left boxes) and exercised (3 right boxes) animals. (C) Analysis comparing exercised animals at day 7 (3 left boxes) and exercised animals at day 35 (3 right boxes). (D) (C) Analysis comparing sedentary animals at day 7 (3 left boxes) and sedentary animals at day 35 (3 right boxes). All comparisons have p values  $< 0.001$ .

**FIGURE 5.** Real-time qRT-PCR analysis of miR-21, miR-195 and miR-499.

**FIGURE 6.** Real-time qRT-PCR analysis of selected down-regulated microRNAs on microarray analysis.

**FIGURE 7.** Real-time qRT-PCR analysis of selected up-regulated microRNAs on microarray analysis.

Table 1. Running data during the 5 weeks of voluntary exercise.

<b>Week</b>	<b>Time (h)</b>	<b>Distance (km)</b>	<b>Mean Speed (m/min)</b>	<b>Maximal Speed (m/min)</b>
<b>1</b>	<b>05:06 ± 03:03</b>	<b>5.1 ± 3.2</b>	<b>15.8 ± 2.3</b>	<b>52.4 ± 14.5</b>
<b>2</b>	<b>05:11 ± 02:03</b>	<b>6.1 ± 3.2</b>	<b>19.2 ± 3.1</b>	<b>53.7 ± 16.2</b>
<b>3</b>	<b>05:43 ± 02:15</b>	<b>7.6 ± 3.4</b>	<b>21.8 ± 3.4</b>	<b>60.6 ± 17.3</b>
<b>4</b>	<b>05:13 ± 01:35</b>	<b>6.9 ± 2.7</b>	<b>21.6 ± 3.1</b>	<b>54.4 ± 12.2</b>
<b>5</b>	<b>05:00 ± 02:12</b>	<b>6.2 ± 2.8</b>	<b>20.5 ± 2.5</b>	<b>54.5 ± 11.3</b>
<b>Protocol Mean</b>	<b>05:13 ± 02:25</b>	<b>6.3 ± 3.1</b>	<b>19.4 ± 3.7</b>	<b>54.9 ± 14.6</b>
<b>P</b>	<b>0.77</b>	<b>0.005</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.14</b>



Figure 1.

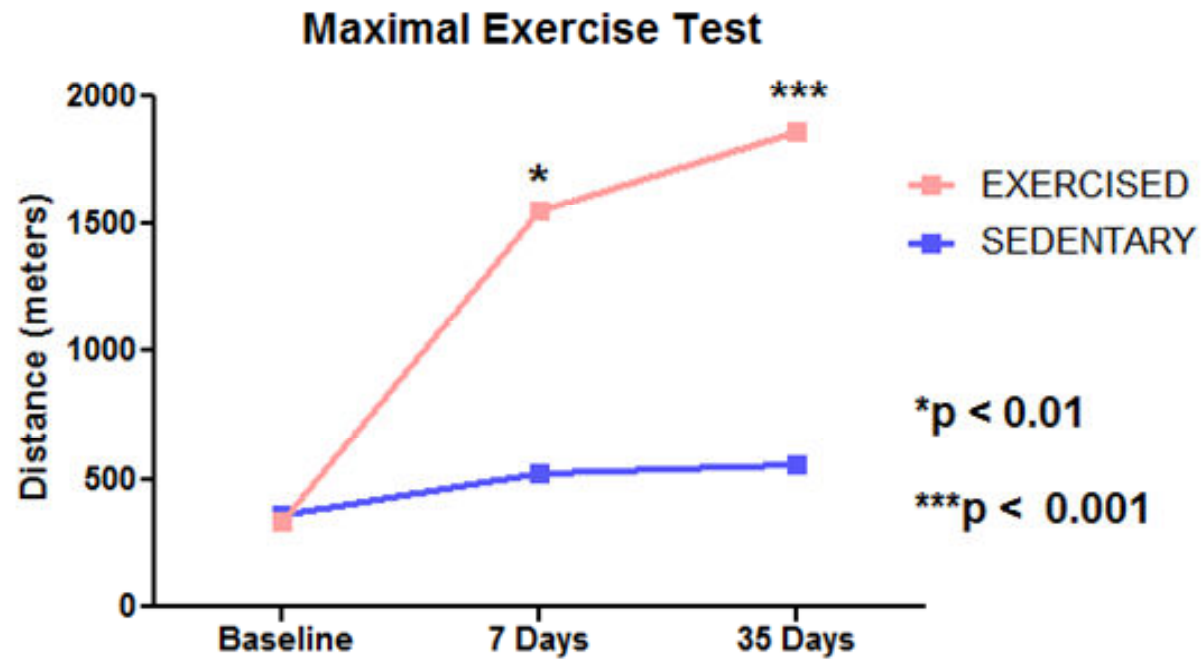


Figure 2.

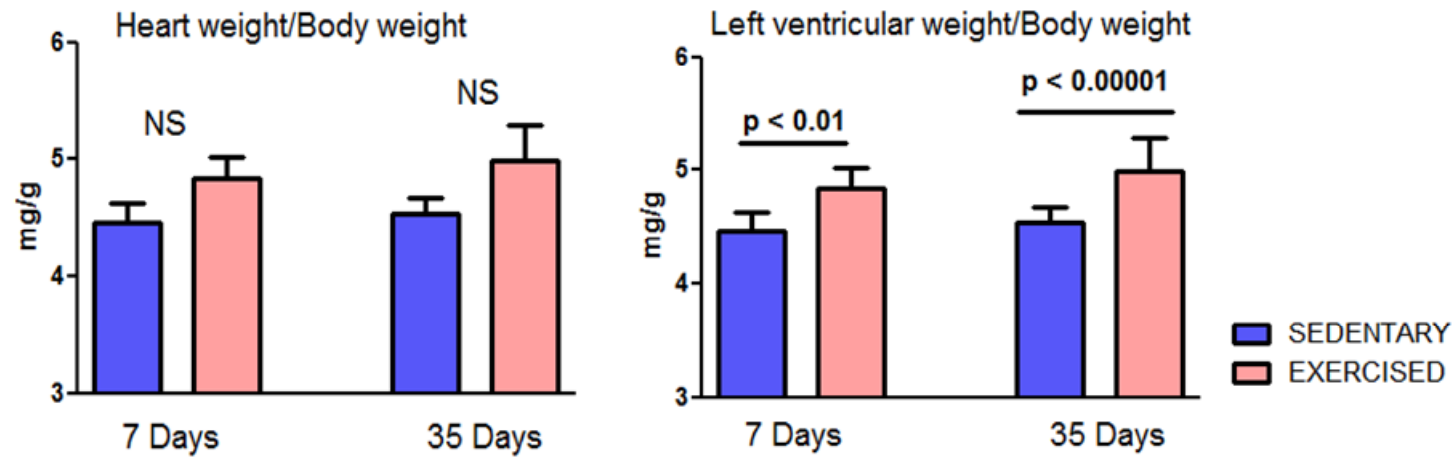


Figure 3.

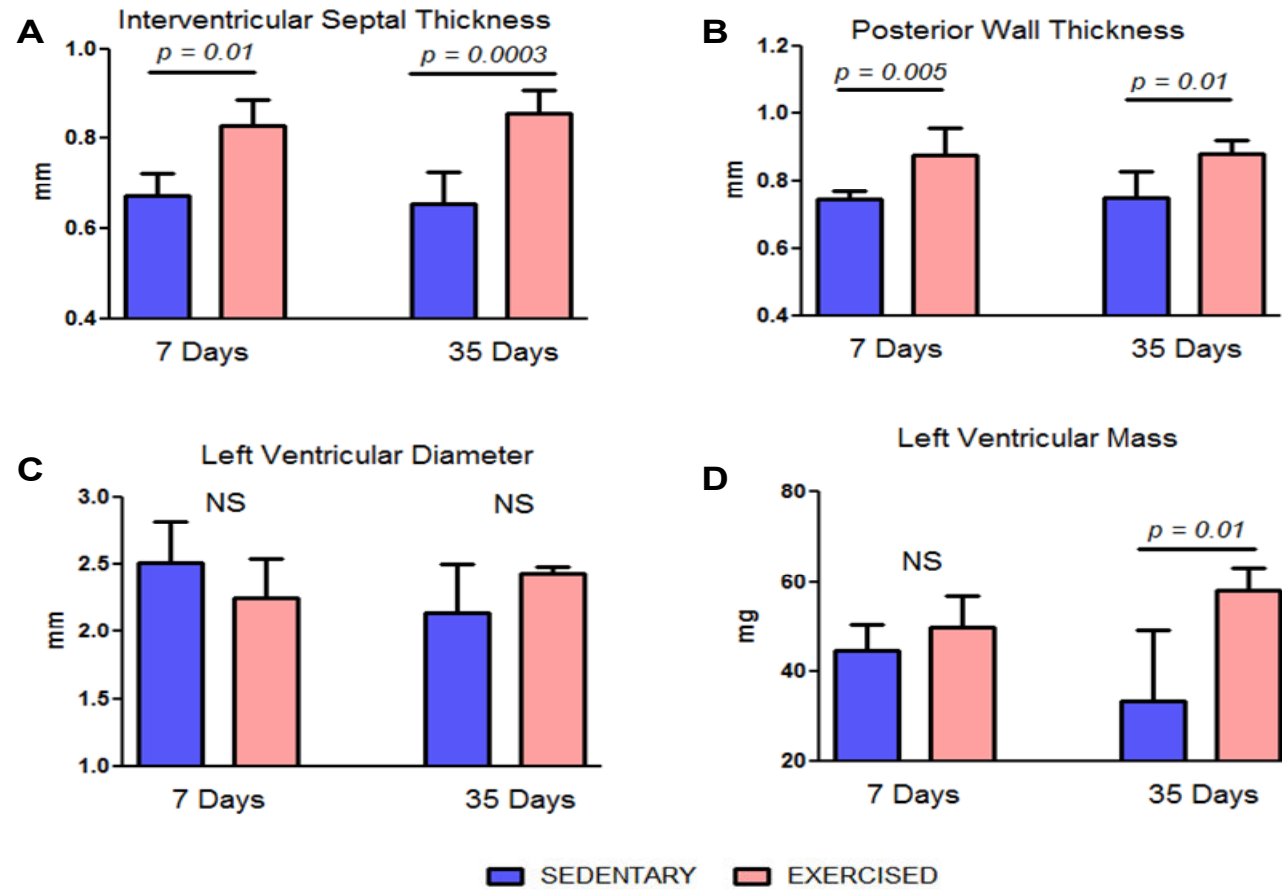


Figure 4A.

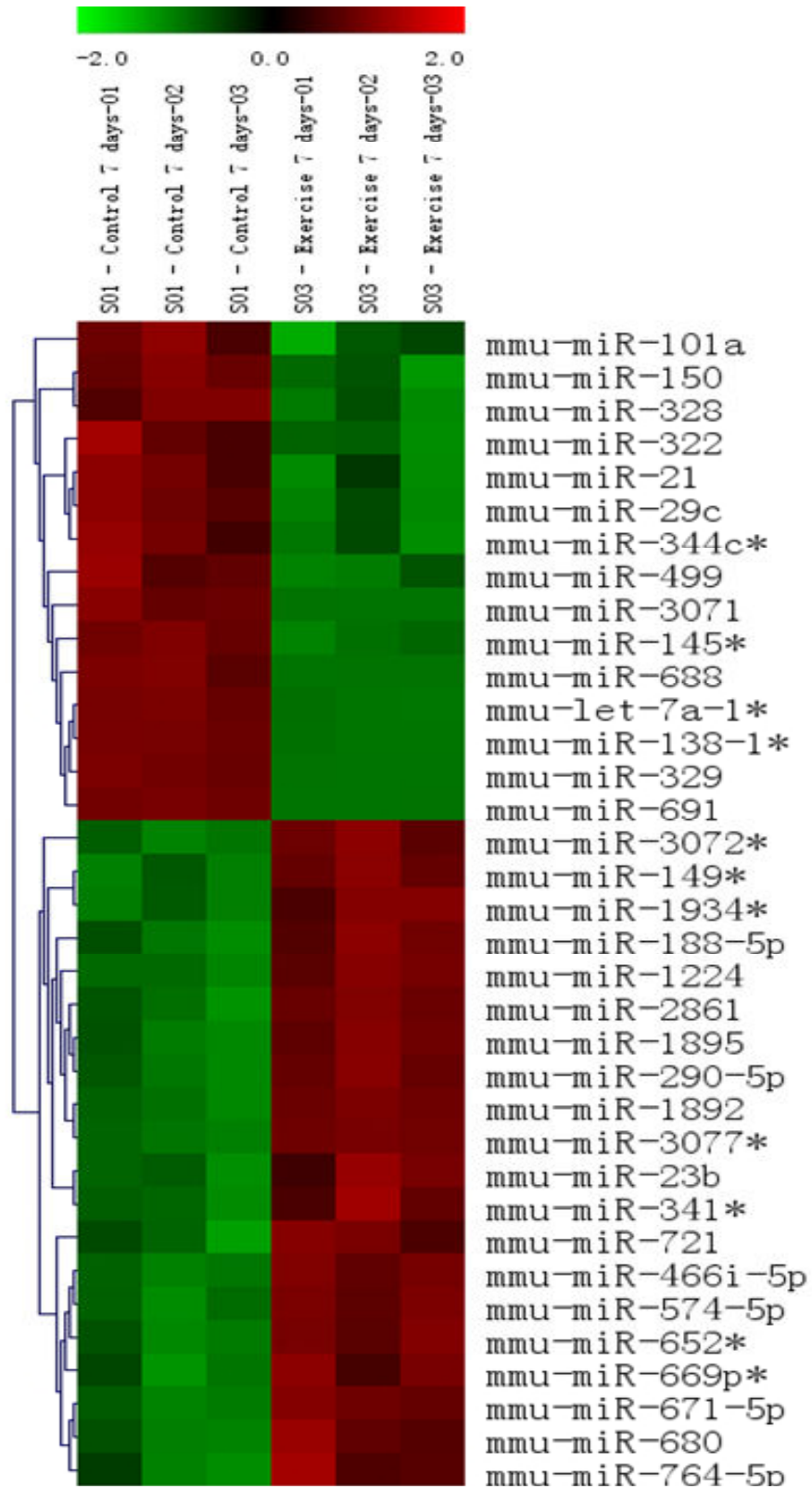


Figure 4B.

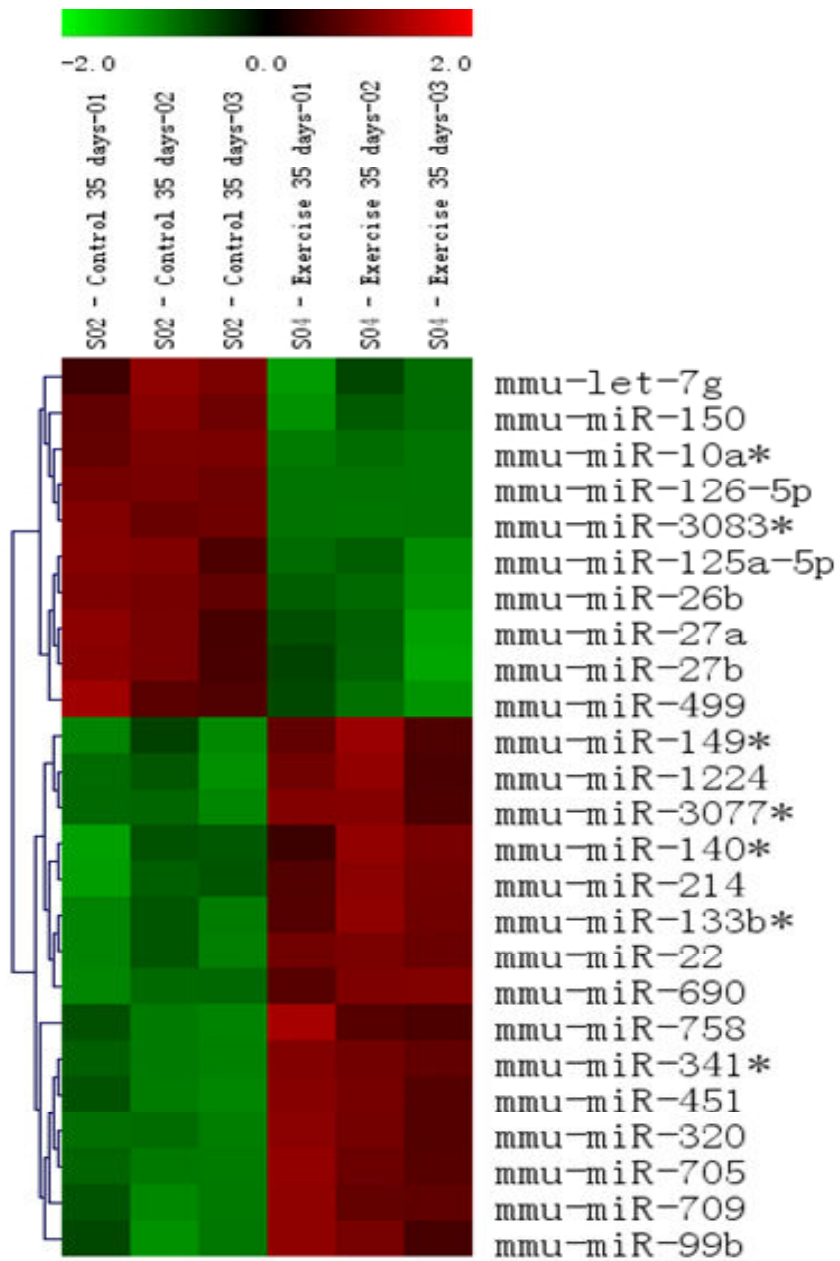


Figure 4C.

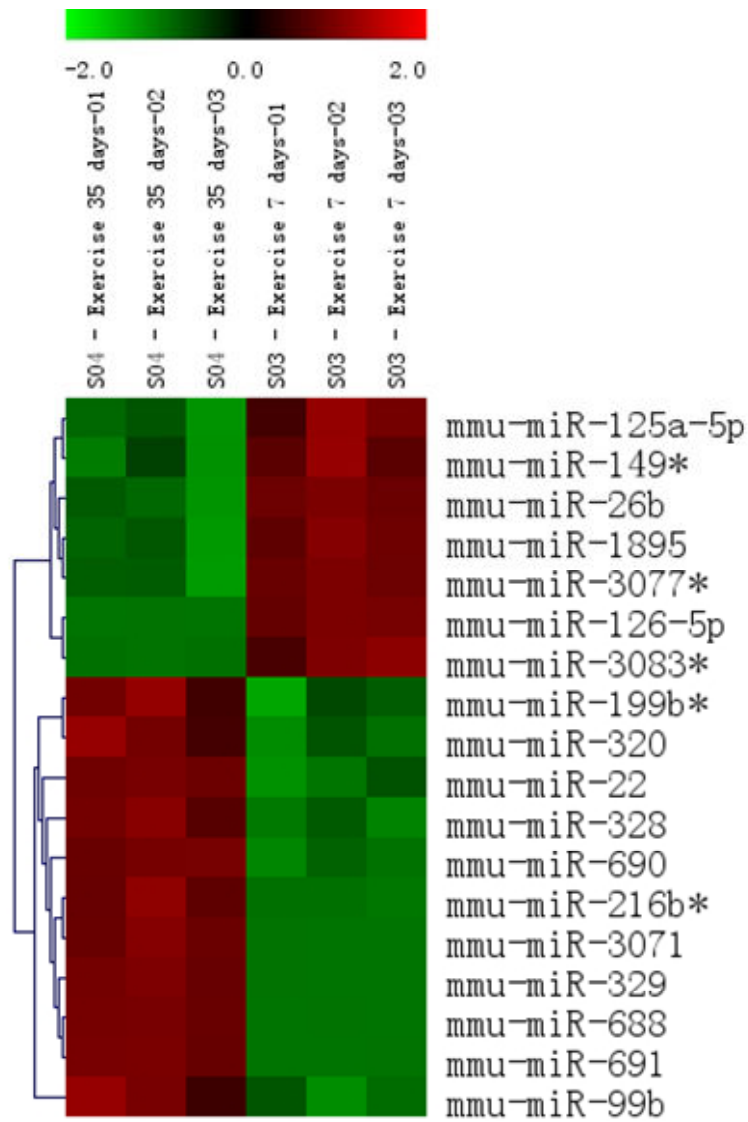


Figure 4D.

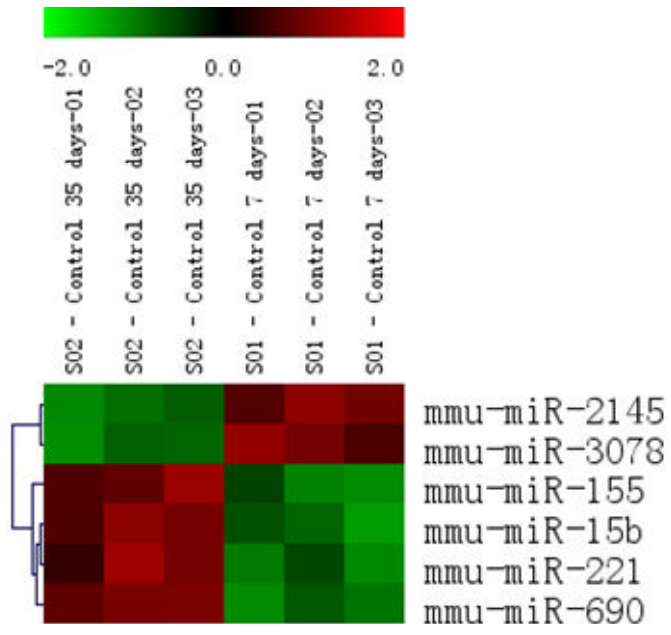


Figure 5.

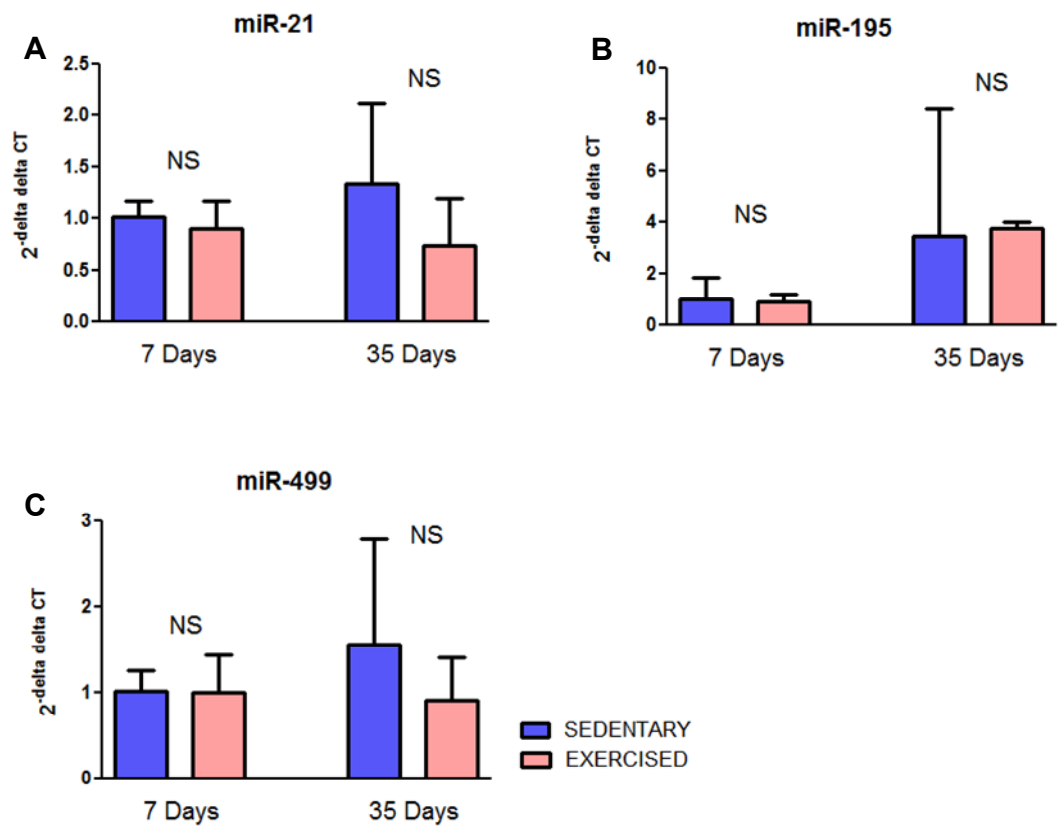




Figure 6.

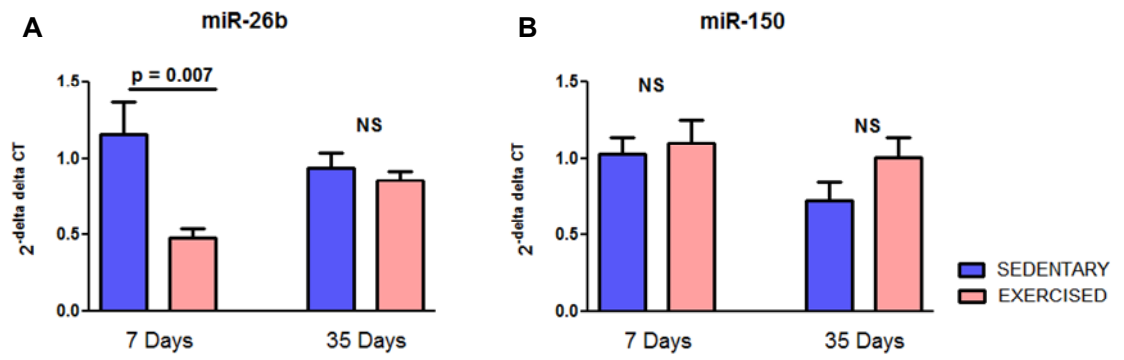
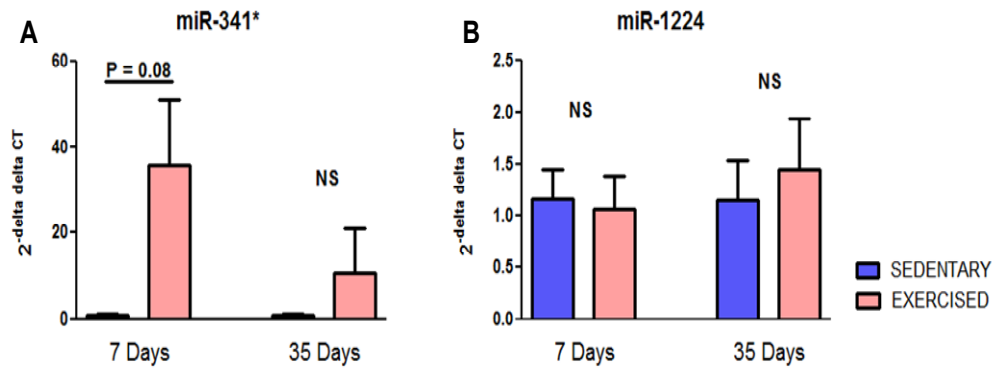


Figure 7.



## REFERENCES

---

1. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009 Jan 23;136(2):215-33.
2. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol*. 2002 Apr 30;12(9):735-9.
3. Callis TE, Pandya K, Seok HY, Tang RH, Tatsuguchi M, Huang ZP, et al. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J Clin Invest*. 2009 Sep;119(9):2772-86.
4. van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*. 2007 Apr 27;316(5824):575-9.
5. Cheng Y, Zhu P, Yang J, Liu X, Dong S, Wang X, et al. Ischaemic preconditioning-regulated miR-21 protects heart against ischaemia/reperfusion injury via anti-apoptosis through its target PDCD4. *Cardiovasc Res*. 2010 Aug 1;87(3):431-9.
6. Wang GK, Zhu JQ, Zhang JT, Li Q, Li Y, He J, et al. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J*. 2010 Mar;31(6):659-66.
7. Vasilescu C, Rossi S, Shimizu M, Tudor S, Veronese A, Ferracin M, et al. MicroRNA fingerprints identify miR-150 as a plasma prognostic marker in patients with sepsis. *PLoS One*. 2009;4(10):e7405.
8. Fukushima Y, Nakanishi M, Nonogi H, Goto Y, Iwai N. Assessment of plasma miRNAs in congestive heart failure. *Circ J*. 2011 Feb;75(2):336-40.

9. Small EM, Olson EN. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature*. 2011 Jan 20;469(7330):336-42.
10. Thum T, Catalucci D, Bauersachs J. MicroRNAs: novel regulators in cardiac development and disease. *Cardiovasc Res*. 2008 Sep 1;79(4):562-70.
11. van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Nov 28;103(48):18255-60.
12. Care A, Catalucci D, Felicetti F, Bonci D, Addario A, Gallo P, et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med*. 2007 May;13(5):613-8.
13. Dorn GW, 2nd. The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy. *Hypertension*. 2007 May;49(5):962-70.
14. Pluim BM, Zwinderman AH, van der Laarse A, van der Wall EE. The athlete's heart. A meta-analysis of cardiac structure and function. *Circulation*. 2000 Jan 25;101(3):336-44.
15. Barauna VG, Magalhaes FC, Krieger JE, Oliveira EM. AT1 receptor participates in the cardiac hypertrophy induced by resistance training in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008 Aug;295(2):R381-7.
16. Oliveira EM, Sasaki MS, Cerencio M, Barauna VG, Krieger JE. Local renin-angiotensin system regulates left ventricular hypertrophy induced by swimming training independent of circulating renin: a pharmacological study. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2009 Mar;10(1):15-23.
17. Oliveira RS, Ferreira JC, Gomes ER, Paixao NA, Rolim NP, Medeiros A, et al. Cardiac anti-remodelling effect of aerobic training is associated with a

reduction in the calcineurin/NFAT signalling pathway in heart failure mice. *J Physiol*. 2009 Aug 1;587(Pt 15):3899-910.

18. Fernandes T, Hashimoto NY, Magalhaes FC, Fernandes FB, Casarini DE, Carmona AK, et al. Aerobic exercise training-induced left ventricular hypertrophy involves regulatory MicroRNAs, decreased angiotensin-converting enzyme-angiotensin ii, and synergistic regulation of angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin (1-7). *Hypertension*. 2011 Aug;58(2):182-9.

19. Allen DL, Harrison BC, Maass A, Bell ML, Byrnes WC, Leinwand LA. Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. *J Appl Physiol*. 2001 May;90(5):1900-8.

20. Natali AJ, Turner DL, Harrison SM, White E. Regional effects of voluntary exercise on cell size and contraction-frequency responses in rat cardiac myocytes. *J Exp Biol*. 2001 Mar;204(Pt 6):1191-9.

21. Foppa M, Duncan BB, Rohde LE. Echocardiography-based left ventricular mass estimation. How should we define hypertrophy? *Cardiovasc Ultrasound*. 2005;3:17.

22. 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 Dec;25(4):402-8.

23. Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature*. 2008 Dec 18;456(7224):980-4.

24. Patrick DM, Montgomery RL, Qi X, Obad S, Kauppinen S, Hill JA, et al. Stress-dependent cardiac remodeling occurs in the absence of microRNA-21 in mice. *J Clin Invest*. 2010 Nov 1;120(11):3912-6.

25. Busk PK, Cirera S. MicroRNA profiling in early hypertrophic growth of the left ventricle in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Jun 11;396(4):989-93.
26. Corsten MF, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, et al. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010 Dec;3(6):499-506.
27. <http://www.targetscan.org/>. 2011 [cited 2011 September, 24].
28. Takahashi M, Shiraishi H, Ishibashi Y, Blade KL, McDermott PJ, Menick DR, et al. Phenotypic consequences of beta1-tubulin expression and MAP4 decoration of microtubules in adult cardiocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Nov;285(5):H2072-83.
29. Cooper Gt. Cytoskeletal networks and the regulation of cardiac contractility: microtubules, hypertrophy, and cardiac dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 Sep;291(3):H1003-14.
30. Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther*. 2010 Oct;128(1):191-227.
31. Dorn GW, 2nd, Force T. Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *J Clin Invest*. 2005 Mar;115(3):527-37.
32. Luo J, McMullen JR, Sobkiw CL, Zhang L, Dorfman AL, Sherwood MC, et al. Class IA phosphoinositide 3-kinase regulates heart size and physiological cardiac hypertrophy. *Mol Cell Biol*. 2005 Nov;25(21):9491-502.
33. Arora H, Qureshi R, Park AK, Park WY. Coordinated Regulation of ATF2 by miR-26b in gamma-Irradiated Lung Cancer Cells. *PLoS One*. 2011;6(8):e23802.

34. Liu XX, Li XJ, Zhang B, Liang YJ, Zhou CX, Cao DX, et al. MicroRNA-26b is underexpressed in human breast cancer and induces cell apoptosis by targeting SLC7A11. *FEBS Lett.* 2011 May 6;585(9):1363-7.
35. Wu N, Zhao X, Liu M, Liu H, Yao W, Zhang Y, et al. Role of microRNA-26b in glioma development and its mediated regulation on EphA2. *PLoS One.* 2011;6(1):e16264.
36. Zhang Z, Florez S, Gutierrez-Hartmann A, Martin JF, Amendt BA. MicroRNAs regulate pituitary development, and microRNA 26b specifically targets lymphoid enhancer factor 1 (Lef-1), which modulates pituitary transcription factor 1 (Pit-1) expression. *J Biol Chem.* 2010 Nov 5;285(45):34718-28.
37. Ji Y, He Y, Liu L, Zhong X. MiRNA-26b regulates the expression of cyclooxygenase-2 in desferrioxamine-treated CNE cells. *FEBS Lett.* 2010 Mar 5;584(5):961-7.
38. Vasilatou D, Papageorgiou S, Pappa V, Papageorgiou E, Dervenoulas J. The role of microRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Eur J Haematol.* 2010 Jan 1;84(1):1-16.
39. Zhang Y, Liu D, Chen X, Li J, Li L, Bian Z, et al. Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol Cell.* 2010 Jul 9;39(1):133-44.

## APPENDIX

---



## **CONCLUSÕES, CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS**

---

Nosso trabalho demonstrou que o exercício físico gera uma resposta complexa de adaptação cardiovascular. Além do desenvolvimento do fenótipo hipertrófico, os animais exercitados obtiveram melhor desempenho no teste de capacidade funcional em esteira rolante do que os animais sedentários. Observamos que os microRNAs reconhecidamente envolvidos na hipertrofia patológica não estão alterados no modelo de hipertrofia fisiológica induzida pelo exercício. Além disto, a expressão dos microRNAs-341\* e -26b pode se alterar com o estímulo do exercício, atuando em genes relacionados com alterações do citoesqueleto do cardiomiócito e em vias de sinalização envolvidas no crescimento e sobrevivência celulares (Akt/PI3K e IGF-1). Estes dados necessitam de confirmação em amostra maior de animais, além de estudos posteriores de validação de genes alvos.

O processo de validação pode ser auxiliado por ferramentas de biologia de sistemas, que nos permitem inferir vias de sinalização interligadas e reguladas por estas moléculas no processo de crescimento do cardiomiócito. Ainda, para comprovarmos a regulação de determinados genes relacionados a hipertrofia ventricular pelos microRNAs, pretendemos realizar o estudo de validação dos alvos dos microRNAs -26b e -341\* em cultura de células utilizando-se ensaio de atividade da luciferase com clonagem da região 3' não-traduzida dos mRNAs alvos, bem como estudos de ganho e perda de função utilizando miméticos e inibidores de microRNAs, respectivamente.

Nossos resultados vão ao encontro de diversos trabalhos publicados mostrando a importância dos microRNAs em diversos processos celulares

cardiovasculares. Recentemente, Fernandes *et al.*(2011)demonstraram a ativação dos miRs-27a e -27b e a redução do miR-143 no modelo de hipertrofia induzida pelo protocolo de natação. Embora os resultados do nosso microarranjo não tenham identificado alterações significativas na expressão destes microRNAs específicos, pretendemos analisá-los no nosso modelo de hipertrofia induzida por rodas de corrida, a fim de corroborar os resultados já encontrados. Além disso, gostaríamos de validar por qRT-PCR a expressão de outros microRNAs alterados na análise de microarranjo (miR-3077\* and miR-1892), que não pôde ser realizada no presente estudo por dificuldades técnicas.

Para fazermos a distinção entre os microRNAs envolvidos na hipertrofia fisiológica pretendemos estabelecer, em nosso laboratório, o modelo de hipertrofia ventricular patológica por bandejamento aórtico transtorácico. Desta forma, poderemos distinguir moléculas que atuam exclusivamente no processo adaptativo ou mal-adaptativo e que, no futuro, possam ser usadas como estratégia terapêutica para pacientes com hipertrofia cardíaca patológica.

Por fim, o estabelecimento do modelo experimental de hipertrofia ventricular fisiológica no Laboratório de Pesquisa Cardiovascular está permitindo a consolidação de uma linha de investigação profícua do Programa de Pós-Graduação em Cardiologia e Ciências Cardiovasculares, que aborda os mecanismos fisiopatológicos do exercício. Este modelo permitirá ampliação do entendimento de mecanismos moleculares e celulares, e das respostas adaptativas relacionados com o exercício físico, oportunizando novos horizontes de investigação nesta linha de pesquisa.

## OUTROS TRABALHOS DESENVOLVIDOS NO MESTRADO

---

1. Furian T, Aguiar C, Prado K, Ribeiro RV, Becker L, Martinelli N, Clausell N, Rohde LE, Biolo A. **Ventricular dysfunction and dilation in severe sepsis and septic shock: Relation to endothelial function and mortality.** J Crit Care. 2011 Aug 18. [Epub ahead of print]
2. Velho FM, Cohen CR, Santos KG, Silvello D, Martinelli N, Biolo A, Clausell N, Rohde LE. **Polymorphisms of matrix metalloproteinases in systolic heart failure: role on disease susceptibility, phenotypic characteristics, and prognosis.** J Card Fail. 2011 Feb;17(2):115-21. Epub 2010 Dec 3.
3. Martinelli NC, Santos KG, Biolo A, Porta VLP, Cohen CR, Silvello D, Andrades ME, Clausell N, Rohde LE. **Polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase gene in systolic heart failure: An haplotype analysis.** Nitric Oxide 2011 (in revision).