Ursula Paula Renó Soci

**Perfil de microRNAs expressos no coração de ratas
normotensas treinadas e o potencial terapêutico na
hipertensão arterial**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Programa de Pós-graduação em
Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Edilamar
Menezes de Oliveira

**São Paulo
2014**

Ursula Paula Renó Soci

**Perfil de microRNAs expressos no coração de ratas
normotensas treinadas e o potencial terapêutico na
hipertensão arterial**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Programa de Pós-graduação em
Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Edilamar
Menezes de Oliveira

**São Paulo
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Soci, Ursula Paula Renó

Perfil de microRNAs expressos no coração de ratas normotensas treinadas e o potencial terapêutico na hipertensão arterial / Ursula Paula Renó Soci. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Edilamar Menezes de Oliveira.

Descritores: 1.Colágeno 2.Exercício 3.Expressão gênica 4.Hipertensão
5.Hipertrofia cardíaca 6.Terapia genética 7.microRNAs 8.Ratos 9.Feminino

USP/FM/DBD-395/14

Dedicatória

Aos meus filhos, Maria Luíza, Eduardo e
Ricardo, os verdadeiros amores da minha vida,
pelos quais eu me eduquei.

Agradecimentos:

À minha família, que vem me acompanhado há tanto em felicidade e percalços, que sabem o que eu tenho de melhor e pior e ainda assim permanecem me apoiando. Maria Luíza, Eduardo e Ricardo pela ordem de chegada e pelo tamanho do amor que tenho por vocês. Se vocês não existissem jamais eu teria me esforçado para chegar até aqui. Paloma e Carina, minhas queridas, e mamãe e papai, por terem me dado vida. Ao Eduardo, por ter passado comigo várias vitórias e adversidades, sem seu apoio e ponderação também acho que não chegaria aqui. Obrigada.

À minha orientadora, sem a qual jamais teria achado que teria alguma chance e algum talento para a vida acadêmica.

Aos meus queridos colegas de grupo Tiago, Fernanda, Stephano, Vander, Marco, por me apoiarem e me provocarem a conhecer. Ao meu querido Mauro, por ter compartilhado sua alegria comigo nesses anos.

Ao Professor Valério Garrone Baraúna, por todo apoio e tempo que dispensou ao estudo, sem o qual não teria nem saído do papel. Obrigada. Às professoras Sílvia Lacchini e Maria Cláudia Irigoyen, pelo apoio acadêmico e disponibilidade para discutir e realizar as técnicas cirúrgicas, vosso apoio foi precioso.

Às pessoas que tornaram meu caminho mais difícil, que ajudaram a conhecer o que realmente sou capaz, e às pessoas que me ajudaram a percorrê-lo, com as quais aprendi o valor do apoio que deram.

Por fim, agradecimento à CAPES pela Bolsa concedida, remuneração que propiciou dedicação exclusiva ao estudo.

Gratidão eterna a ter tido força para chegar até aqui!

Sumário:

LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XIV
LISTA DE SIGLAS.....	XV
RESUMO.....	XIV
ABSTRACT.....	XX
1. INTRODUÇÃO.....	21
2. JUSTIFICATIVA.....	26
3. OBJETIVOS.....	28
4. REVISÃO DE LITERATURA.....	29
4.1 Hipertensão arterial e treinamento físico.....	29
4.2. O coração.....	30
4.3. Remodelamento Cardíaco ou Hipertrofia cardíaca.....	31
4.3.1. Tipos de sobrecargas hemodinâmicas: volumétricas vs.pressórica.....	34
4.3.2. Hipertrofia Cardíaca Patológica vs. Fisiológica.....	35
4.3.3. Hipertrofia Cardíaca Concêntrica vs. Excêntrica.....	36
4.4. Hipertrofia cardíaca induzida pelo treinamento físico.....	38
4.5. Características bioquímicas e moleculares.....	42
4.6. Vias de sinalização e fatores de transcrição.....	43
4.7. Mecanismos de regulação epigenética.....	44
4.8. Mecanismos pós-transcricionais.....	47
4.9. MicroRNAs.....	49
4.9.1. Descoberta dos miRNAs.....	52
4.9.2. Localização dos miRNAs no genoma.....	53
4.9.3. Biogênese dos miRNAs.....	55

4.9.4.	Mecanismo de ação dos MiRNAs.....	56
4.9.5.	MiRNAs e hipertrofia cardíaca.....	57
4.10.	Transferência gênica por vetores virais.....	62
5.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	67
5.1	Desenho experimental.....	67
5.2.	Animais Experimentais.....	68
5.2.1.	HC induzida pelo treinamento físico aeróbio.....	68
5.2.2.	Estudo em animais SHR jovens.....	69
5.2.3.	Modulação do miRNA-29c em animais SHR com HA estabelecida.....	70
5.3.	Protocolo de Treinamento.....	70
5.4.	Protocolos de infecção do miRNA <i>in vivo</i>	71
5.4.1.	Tratamento <i>in vivo</i>	71
5.4.2.	Preparação do vetor viral para transfecção.....	72
5.4.3.	Produção do vetor lentiviral do miRNA-29c.....	72
5.4.4.	Protocolo de titulação das partículas virais.....	73
5.4.5.	Cirurgias para injeção das partículas lentivirais no coração dos animais.....	74
5.5.	Marcadores de Treinamento.....	74
5.5.1.	Medidas hemodinâmicas – Frequência Cardíaca e Pressão Arterial.....	74
5.5.2.	Avaliação do consumo de oxigênio.....	75
5.6.	Avaliação morfofuncional- Ecocardiografia com Doppler.....	77
5.7.	Medidas morfométricas.....	78

5.7.1.	Peso do coração e do Ventrículo Esquerdo Pelo Peso corporal.....	78
5.7.2.	Diâmetro de cardiomiócitos.....	79
5.7.3.	Análise histológica da fração volumétrica de colágeno no coração.....	79
5.8.	Análises moleculares.....	79
5.8.1	Extração de RNA e síntese de cDNA.....	79
5.8.2.	Quantificação de mRNA e miRNAs por PCR em tempo real.....	80
5.8.2.1.	Genes relacionados com a HC.....	80
5.8.2.2.	MicroRNAs.....	81
5.8.3.	miRNA microarray.....	82
5.9.	Análises bioquímicas.....	83
5.9.1.	Atividade de Citrato Sintase.....	83
5.9.2.	Determinação da concentração de colágeno por Hidroxiprolina.....	83
5.9.3.	<i>Western Blott</i>	84
6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	86
7.	RESULTADOS.....	87
7.2.	Frequência Cardíaca e Pressão Arterial de Repouso.....	88
7.3.	Consumo de Oxigênio (VO ₂ max) e teste de esforço máximo.....	88
7.4.	Atividade da citrato sintase.....	89
7.5.	Hipertrofia Cardíaca.....	90
7.6.	Função Ventricular.....	92

7.7.	Expressão gênica de marcadores moleculares de Hipertrofia Cardíaca.....	95
7.8.	Escolha de um microRNA a partir do perfil de expressão nos modelos.....	96
7.9	Confirmação da expressão gênica de microRNAs.....	101
7.9.1.	MicroRNAs modulados pelo Treinamento Físico.....	101
7.9.2.	MicroRNAs modulados pela Hipertensão Arterial.....	103
7.10.	Expressão gênica e proteica de alvos do microRNA-29c.....	103
7.11.	Superexpressão in vivo do miRNA-29c utilizando vetor lentiviral no coração de animais jovens.....	106
7.11.1.	Titulação.....	106
7.11.2.	Expressão de <i>Green Fluorescent Protein</i> em fígado e coração de SHR.....	107
7.11.3.	Expressão de miRNA-29c por real time-PCR no Ventrículo Esquerdo.....	108
7.11.4.	Expressão gênica de Colágeno do tipo I e do tipo III no Ventrículo Esquerdo.....	109
7.11.5.	Fração volumétrica de colágeno por análise histológica.....	111
7.11.6.	Concentração de Hidroxiprolina Cardíaca.....	112
7.11.7.	Hipertrofia Cardíaca.....	113
7.11.7.1.	Peso do Ventrículo Esquerdo corrigido pelo Peso Corporal.....	114
7.11.7.2.	Peso do Coração corrigido pelo Peso Corporal.....	114
7.11.7.3.	Diâmetro de cardiomiócitos.....	115
7.11.8.	Pressão Arterial.....	116

8.	DISCUSSÃO.....	119
8.1.	Marcadores de Treinamento Físico	119
8.2.	Índices de Hipertrofia Cardíaca.....	121
8.3.	Função Cardíaca por Ecodopplecardiografia.....	122
8.4.	Expressão gênica de marcadores moleculares de Hipertrofia Cardíaca.....	127
8.5.	Screening para escolha dos microRNAs.....	130
8.6.	Expressão de Colágeno cardíaco e sua relação com o microRNA-29c em resposta ao treinamento físico aeróbio.....	133
8.7.	Transfecção in vivo do vetor lentiviral de superexpressão do miRNA-29c no coração de SHR.....	134
9.	CONCLUSÃO.....	139
10.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	140

Lista de Figuras

Figura		Página
Figura 1	Efeito do TF aeróbio e da Hipertensão arterial (HA) na hipertrofia cardíaca (HC)	41
Figura 2	Representação esquemática dos diferentes tipos de RNAs não codificantes e suas funções.	48
Figura 3	Localizações genômicas dos miRNAs conhecidos. UT: Unidades e Transcrição	54
Figura 4	Biogênese dos miRNAs e seu mecanismo de ação. (adaptado de He & Hannon, 2004).	57
Figura 5	Desenho experimental do estudo.	67
Figura 6	Sistema de natação para ratos.	69
Figura 7	Visão esquemática dos protocolos de treinamento físico	71
Figura 8	Evolução do peso corporal, em gramas (g), durante as 10 semanas de protocolo de treinamento.	87
Figura 9	Medidas hemodinâmicas cardiovasculares.	88
Figura 10	Medidas de aptidão cardiorrespiratória.	89
Figura 11	Atividade da enzima citrato sintase como marcador enzimático do metabolismo oxidativo.	90
Figura 12	Percentual de Hipertrofia Cardíaca por medidas obtidas por ecocardiografia, pela razão entre o peso do ventrículo esquerdo e o peso corporal e pelo diâmetro de cardiomiócitos.	91

Figura	13	Correlação entre o consumo do O ₂ (VO ₂ max) e a HC induzida pelo TF aeróbio	92
Figura	14	Marcadores moleculares de hipertrofia cardíaca por PCR em tempo real.	95
Figura	15	MiRNAs com mudança de expressão por miRNA array.	98
Figura	16	Diferenças na expressão de miRNAs selecionados pelos critérios de interesse do array de miRNAs.	100
Figura	17	Confirmação da diferença de expressão de miRNAs determinantes para o fenótipo de HC fisiológica (induzida pelo TF) e patológica (induzida pela hipertensão arterial).	102
Figura	18	Sítios no mRNA de diferentes tipos de colágeno cardíaco (COLIAI, COLIAII e COLIIIAI) para os miRNAs-29.	104
Figura	19	Expressão de mRNA de colágeno tipo IAI e IIIAI (COLIAI e COLIIIAI) por PCR em tempo real.	104
Figura	20	Correlação negativa entre a concentração total de colágeno no ventrículo esquerdo e a expressão de miRNA-29c.	105
Figura	21	Placa de titulação de partículas lentivirais.	106
Figura	22	Curva padrão obtida no experimento de titulação das partículas virais contendo os plasmídeos do estudo).	107
Figura	23	Expressão proteica de GFP (Green Fluorescent Protein) por Western blot de coração e fígado de SHR tratados e não tratados.	108
Figura	24	Expressão do miRNA-29c realizada por reação de PCR em tempo real.	109

Figura	25	Expressão relativa do colágeno COLIAI e COLIIIAI, alvos do miRNA-29c, realizado por PCR em tempo real.	110
Figura	26	Fração volumétrica de colágeno no ventrículo esquerdo por análise histológica em SHR tratados com pré-miRNA-29c.	112
Figura	27	Conteúdo total de colágeno em cardiomiócitos avaliado pela quantificação da concentração da Hidroxiprolina (OH-Prolina -mg/g) em SHR tratados com pré-miRNA-29c.	113
Figura	28	Hipertrofia cardíaca medida pelo peso do Ventrículo esquerdo corrigido pelo peso corporal em SHR tratados com pré-miRNA-29c em mg/g.	114
Figura	29	Hipertrofia cardíaca medida pelo peso do coração corrigido pelo peso corporal em SHR tratados com pré-miRNA-29c em mg/g.	115
Figura	30	Hipertrofia cardíaca medida pelo diâmetro de cardiomiócitos em SHR tratados com pré-miRNA-29c em mg/g.	116
Figura	31	Pressão arterial sistólica de SHR tratados com pré-miRNA-29c (mm/Hg) obtida por pletismografia de cauda.	117
Figura	32	Pressão arterial diastólica de SHR tratados com pré-miRNA-29c (mm/Hg) obtida por pletismografia de cauda.	118

Lista de Tabelas

Tabela		Página
Tabela 1	Valores de Pressão Arterial Sistólica e Diastólica em repouso	88
Tabela 2	Medidas morfológicas por ecocardiograma	94
Tabela 3	Resultados de função cardíaca por ecodopplercardiografia	94
Tabela 4	MiRNAs com expressão linearmente modificada pelos protocolos de natação	99
Tabela 5	Seleção de miRNAs com potencial terapêutico na hipertensão arterial.	99

Lista de siglas

3'UTR	3' untranslated region
acetyl-CoA	acetilcoenzima-A
ANF/ANP	Atrial Natriuretic Factor/Peptide
ATP	Adenosina trifosfato
BNP	Brain natriuretic peptide
cap5'm7 G	cap 5' metil7guanosina
cDNA	DNA complementar
c-fos	proteína do gene FOS (fator de transcrição)
c-jun	proteína do gene JUN (fator de transcrição)
CMO	Cardiomiócitos
c-myc	proteína do gene myc (fator de transcrição)
COLIAI	Colágeno do tipo I
COLIIIAI	Colágeno do tipo III
CSX/NKX2.5	Fator de transcrição homeobox
CT	cycle threshold
CT-1	Cardiotrofina 1
DC	Débito Cardíaco
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region gene 8
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
dNTPs	deoxynucleotide triphosphates
DTT	Ditiotreitol
DROSHA	double-stranded RNA-specific endoribonuclease

EDTA	Ácido Etilenodiamino
EIF4E	Eukaryotic initiation fator 4E
EIF2B	Eukaryotic initiation fator 2B
EIF2	Eukaryotic initiation fator 2
EPM	Erro padrão da média
FC	Frequência Cardíaca
FeO2	fração expirada de O2
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GATA2	Proteína 2 ligante a GATA (fator de transcrição)
GATA4	Proteína 4 ligante a GATA (fator de transcrição)
GATA6	Proteína 6 ligante a GATA (fator de transcrição)
GFP	Green Fluorescent Protein
GTP	Guanosina trifosfato
HC	Hipertrofia Cardíaca
HCL	Hydrochloric acid
HDACI	Histona deacetilase classe I
HDACII	Histona deacetilase classe II
HEK293T	Human Embryonic Kidney 293 cells
IGF-1	Insulin Growth Factor-1
iRNA	RNA de interferência
Lin-4	Lineage-deficient-4
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEF2	Myocyte enhancer factor-2

miRNAs	microRNAs
mRNA	RNA mensageiro
NaF	Sodium fluoride
ncRNAs	Non coding RNAs
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
OH-prolina	Hidroxiprolina
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PMSF	phenylmethanesulfonylfluoride
PAM	Pressão Arterial Média
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PC	peso corporal
Pico A	Pico de onda A
Pico E	Pico de onda E
PLV	plasmídeo para vetor lentiviral
poli(a)	cauda de poli A
pre-miRNA	precursor microRNA
pri-miRNA	primary microRNA
P70s6K	Proteína 70S6 kinase
qRT-PCR	quantitative rev. transcriptase polymerase chain reaction
Ran-GTPase	RAs-related Nuclear protein GTP dependent
RNAPII	RNA polymerase II
relação E/A	razão entre Pico E e Pico A
REV	Regulator of Expression of Virion Proteins
RISC	RNA-induced silence complex

RNA	Ácido Ribonucleico
SERCA2 A	ATPase de Cálcio do retículo sarcoplasmático tipo 2
SHR	Spontaneously Hypertensive Rats
SMAD3	Mothers against decapentaplegic homolog 3
TAT	Trans-Activator of Transcription
TDE	Tempo de desaceleração da onda E
TF	Treinamento Físico
TGF β	Transforming Growth factor β
TRIV	tempo de relaxamento isovolumétrico
TU	Transcription unit
U6	non-coding small nuclear RNA U6
UNG	Uracil DNA Glycosilase
VE	Ventrículo Esquerdo
VO ₂ -MAX	Consumo de oxigênio pico
VS	Volume Sistólico
α -actina	α -actina esquelética
α -MHC	Miosina de Cadeia Pesada do tipo alfa
β -MHC	Miosina de Cadeia Pesada do tipo beta
4E-BP1	Translator inhibitor 4E-BP1

Resumo:

O treinamento físico aeróbio (TF) e a hipertensão arterial (HA) induzem hipertrofia cardíaca (HC) com características diferentes, e entre as diferenças moleculares podem estar a elucidação de abordagens terapêuticas como os microRNAs (miRNAs). Seleccionamos de dados de *miRNAarray*, 15 miRNAs cardíacos induzidos por dois protocolos de treinamento físico de natação (TF) e comparamos com o *miRNAarray* em modelo de hipertensão arterial (animais espontaneamente hipertensos, SHR). Foram seleccionados 4 miRNAs de interesse (miRNA-27a, 27b, 126 e 29c) que seguiram para a confirmação de sua expressão por qRT-PCR. Destes, seleccionamos o miRNA-29c para que fosse realizada a modulação *in vivo* em SHR jovens. Foi realizada injeção cardíaca intramuscular de partículas de vetor lentiviral para a superexpressão do miRNA-29c. Foram testadas duas doses: baixa (B), $0,6 \times 10^9$ pv/animal e alta (A), 3×10^9 pv/animal; e por dois períodos de tratamento: 7 e 14 dias. Foi avaliada a expressão de GFP em fígado e coração por *western blott* para observar a eficiência da transdução viral *in vivo*. Os efeitos do tratamento na pressão arterial (PA) foram analisados por pletismografia de cauda; na HC pela razão VE/PC (peso do ventrículo esquerdo/peso corporal), peso do coração/PC e (cor/PC), e pelo diâmetro de cardiomiócitos (dCMO) por histologia. qRT-PCR foi utilizado para investigar a expressão do miRNA-29c e seus alvos, colágeno do tipo I e do tipo III (COLIAI e COLIIIAI). O conteúdo de colágeno também foi medido por análise histológica (picrossírius), pela fração volumétrica de colágeno (% col), e pela concentração de OHprolina no VE. Os grupos que receberam baixa dose das partículas lentivirais foram positivos para GFP em coração e fígado, tendo sido assumida a dose baixa como eficiente para futuras transduções. Todos os grupos tratados apresentaram aumento da expressão do miRNA-29c. A expressão gênica do COLIAI diminuiu para os grupos tratados o que não ocorreu para o COLIIIAI. A fração volumétrica foi menor em todos os grupos tratados o que mostra evidência que o tratamento foi eficaz para diminuir a concentração de colágeno cardíaco. Houve diminuição no cor/PC de 7-11% para os grupos SHR7A e SHR7B, que foi concatenada com um aumento no dCMO, com diminuição da fibrose. Nossos resultados sugerem, portanto, que o tratamento com o miRNA29c induz remodelamento cardíaco benéfico, abrindo perspectivas para investigações adicionais sobre terapias antifibróticas para doenças cardiovasculares.

Descritores: Colágeno, Exercício, Expressão Gênica, Hipertensão, Hipertrofia Cardíaca, Terapia Genética, MicroRNAs, Ratos, Feminino.

Abstract

Both aerobic exercise training (*ET*) and Hypertension (*HY*) induce different cardiac hypertrophy (CH) phenotypes which molecular differences and may lead to new targets for therapies in cardiovascular disease, as microRNAs (miRNAs). We selected 15 miRNAs that were changed by ET from miRNAarray data and compared them with other from HY miRNAarray data. Four miRNAs were selected for qRT-PCR confirmation: miRNA-27a, 27b, 126 e 29c. Among then, miRNA 29c was chosen to be modulated by lentiviral vector due its role in fibrosis regulation. Intramuscular cardiac injection of the lentiviral vector particles was performed following two doses; low-dose , $0,6 \times 10^9$ vp/rat and high 3×10^9 vp/rat; and for two different times (7 and 14 days). The transduction efficiency was assessed by GFP expression by western blot. Blood pressure (BP) was measured by caudal pletysmography, CH was analysed by ratio LVw/BW (left ventricle weight/body weight), heartw/BW (heart weight/body weight) and by cardiomyocyte diameter (dCMO). qRT-PCR was used to assess miRNA-29c expression and its targets COLIAI and COLIIIAI gene expression. The LV collagen content was assessed by histology (*Picrosirius red*), by collagen volume fraction, and by Hydroxiprolin concentration. Both groups that received the lowe doses were GFP positive in the heart and liver tissue, We assumed that low doses were better for future *in vivo* transduction. BP did not increase to SHR14A and SHR14B, what did not occurred to the 7 days groups. The miRNA-29c expression increased in all treated groups *versus* their control (CSI). COLIAI expression decreased in treated groups, while COLIIIAI did not change. Collagen volume fraction decreased in all treated groups, which shows that the treatment was efficient to decrease the cardiac collagen. Heart/BW decreased 7-11% in SHR14B and SHR14A and there were an increase in dCMO in all treated groups, that shows that cardiac remodeling of treated SHR included an increase in size of CMO and a decrease in cardiac fibrosis Our data suggests that there is a beneficial cardiac remodeling after treatment with miRNA-29c, which opens perspective for further investigation of antifibrotic therapies for cardiovascular disease.

Descriptors: Collagen, Physical Exercise, Gene Expression, Gene Therapy, Cardiac Hypertrophy, Hypertension, MicroRNAs, Rats, Female.

1. INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial (HA) é uma síndrome multifatorial causada por diversos fatores genéticos e ambientais, caracterizada por elevação sustentada da pressão arterial (PA). Na HA a sobrecarga pressórica cardíaca crônica ocasionada pelo aumento da resistência vascular periférica é um estímulo à hipertrofia cardíaca (HC) do ventrículo esquerdo, na qual o aumento da massa cardíaca é irregular, concêntrico e acompanhado de disfunção ventricular. Essa HC é considerada patológica e pode ocorrer também em decorrência de outras doenças, com alterações genéticas isoladas, como a cardiomiopatia hipertrófica, doença coronariana ou hiperatividade simpática (Pimenta, 2008).

Entre os vários efeitos benéficos do exercício dinâmico sobre a musculatura esquelética, o metabolismo, o coração, e a circulação, uma importante e benéfica adaptação é a HC. A HC induzida pelo treinamento físico (TF) aeróbio, diferente de processos patológicos, é definida como um aumento fisiológico da massa cardíaca, que ocorre em consequência do aumento da sobrecarga de trabalho sobre o coração durante a prática do exercício físico. (Mathews & Fox, 1985; Dickhuth, Nause et al., 1983; O'Toole, Hiller et al., 1987).

Entretanto, é importante ressaltar que existem diferenças marcantes no tipo de HC quando o coração é submetido a uma sobrecarga fisiológica ou patológica. Essas diferenças podem ser ocasionadas pela frequência que a sobrecarga é imposta ao músculo cardíaco, já que a sobrecarga induzida pelo exercício é intermitente, enquanto na HA a sobrecarga é contínua (Pimenta, 2008; Fernandes, Soci & Oliveira, 2011). O aumento do tamanho do músculo cardíaco como adaptação ao exercício físico regular pode advir tanto de uma sobrecarga de volume ocasionando uma HC excêntrica, (treinamento físico aeróbico), quanto de sobrecarga pressórica levando a uma HC concêntrica (treinamentos

em modalidades de força e potência). A caracterização de protocolos de treinamento que geram estes tipos de HC e o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos tanto na HC concêntrica (Baraúna, Magalhães et al., 2007; Carneiro Junior, Quintão Jr et al., 2014;), quanto na excêntrica (Hashimoto, Fernandes et al. 2011; Oliveira, Sasaki et al., 2009) tem sido uma importante vertente de estudos de nosso laboratório nos últimos anos.

Para melhor compreender os aspectos moleculares envolvidos na HC excêntrica, desenvolvemos um protocolo de treinamento com diferentes volumes de TF aeróbio, que levasse a uma HC mais robusta que os modelos existentes. Neste modelo, desenvolvemos dois protocolos de treinamento, os quais levam a diferentes graus de HC, no qual os animais apresentam aumento de consumo de O₂ pós-treinamento, bradicardia de repouso, melhora de função ventricular sem aumento de marcadores de HC patológica. (Oliveira, Sasaki et al, 2009; Hashimoto, Fernandes et al, 2011; Soci, Fernandes et al, 2011).

Os benefícios cardiovasculares, metabólicos e autonômicos das adaptações crônicas do exercício físico têm levado muitos investigadores a sugerir o TF como conduta não farmacológica importante no tratamento de diversas patologias, dentre elas a HA e a insuficiência cardíaca (Tripton, 1991, Jennings, Nelson et al., 1986).

Adaptações positivas decorrentes do TF conduziram a sua utilização como parte importante no tratamento de diversas doenças crônico-degenerativas. Por exemplo, em pacientes hipertensos, o TF aeróbio leva à diminuição e, em alguns casos até a suspensão do uso de medicamentos, reduzindo, portanto, o ônus para os órgãos de saúde pública e os efeitos colaterais decorrentes do tratamento medicamentoso (Fagard, 2005).

Apesar de estudos clínicos demonstrarem efeitos positivos do TF nas doenças cardiovasculares e questões importantes a respeito dos mecanismos envolvidos nesse processo terem sido respondidas, novos aspectos têm sido alvos de investigação, como o

padrão de expressão gênica envolvido nas adaptações do coração ao exercício (Miyazaki, Oka et al., 2006). Alguns estudos têm observado a regulação da expressão gênica de diferentes componentes envolvidos no processo de HC, como: receptores de membrana, proteínas de sinalização e fatores de transcrição. A re-expressão de genes fetais como a miosina de cadeia pesada do tipo beta (β -MHC) e o fator natriurético atrial (ANF), e a α -actina-esquelética, ausentes na HC fisiológica, possibilitou a utilização destes genes como marcadores de HC patológica. (Rimbaud, Sanches et al., 2009; Freire, Ocampo et al., 2007).

No mesmo sentido, estudos tanto em modelos animais quanto em humanos têm demonstrado que alterações na expressão gênica de proteínas de matriz no miocárdio como colágeno (principalmente o tipo I e tipo III), geram aumentos na trama de colágeno intersticial em condições patológicas, tendo assim papel crucial no desenvolvimento da disfunção ventricular. Existe a hipótese de que a deposição de colágeno, particularmente no interstício, seja um fator primário para o desenvolvimento da disfunção miocárdica. Desta forma, o controle da expressão de proteínas da matriz e de fibras de colágeno no coração é um determinante na diferenciação entre a HC fisiológica e patológica, já que têm influência direta sobre a contratilidade e sobre a complacência ventricular (Montera, Drumond et al., 2009; Bouzeghrane, Reinhardt et al, 2005).

Recentemente as atenções de diversos setores da comunidade científica, se voltaram para uma nova classe de reguladores de expressão gênica: os microRNAs (miRNAs), moléculas reguladoras que têm se mostrado importantes no controle da HC, cardiogênese e em doenças cardiovasculares, além de outros tecidos (Van Rooij, Sutherland et al, 2006; Van Rooij, Sutherland et al, 2007, Van Rooij, Marshall and Olson, 2008; Van Rooij, Thatcher et al 2008).

Embora existam estudos relacionando os miRNAs à HC em eventos cardiovasculares fisiológicos e patológicos, a influência do TF como indutor de modificações na expressão de miRNAs, além do perfil de expressão de miRNAs no processo de HC e seu potencial terapêutico em doenças cardiovasculares, esta longe de ser elucidado, consistindo este em um campo de estudo incipiente e promissor, com potencial de descoberta de novas moléculas terapêuticas.

Neste sentido, a utilização das técnicas de biologia molecular associada à utilização de modelos experimentais permite que aspectos fundamentais da regulação dos diversos mecanismos subjacentes à HC fisiológica e patológica sejam elucidados, dentre eles, os passos da expressão gênica, que acabam por se refletir na quantidade e qualidade de proteínas importantes relacionadas com a HC. Com o avanço das técnicas de transferência gênica, a manipulação genética do músculo cardíaco ganhou grande projeção como instrumentação terapêutica, para investigar questões de ciência básica e investigar mecanismos de patogênese e etiologias de doenças multifatoriais como a HA, o que abre perspectiva de estudos clínicos que mudem as moléculas envolvidas desses mecanismos. Sob este ponto de vista as modulações gênicas, efetivadas por vetores virais ou não virais, são instrumentos úteis para ampliar o conhecimento sobre os atuais desafios da ciência básica o que pode abrir perspectiva para novas abordagens terapêuticas em doenças cardiovasculares (Davis, Westfall et al, 2008).

Além disso, a possibilidade de interromper ou reverter a HC patológica, interferindo no desenvolvimento da insuficiência cardíaca é um tópico de grande importância clínica e, portanto, de interesse investigativo (Carreño, Aplaaza et al, 2006).

Este estudo iniciou-se com um *screening* do perfil de expressão dos miRNAs no coração de animais treinados com dois volumes de TF aeróbio crescente. Foram

utilizados resultados da técnica de *miRNA Array*, uma técnica de varredura que mapeou a mudança de expressão de miRNAs na HC em resposta ao TF aeróbio e na HA em ratos espontaneamente hipertensos (*spontaneously hypertensive rats*, SHR). Em uma segunda etapa, através do uso de técnicas de biologia molecular, um miRNA específico foi modulado nesse modelo animal para observar seu potencial em reverter as adaptações patológicas da HA.

2. JUSTIFICATIVA

O papel dos miRNAs vem sendo bastante estudado na HC patológica, enquanto o seu envolvimento na HC fisiológica induzida pelo TF aeróbio é pouco explorado. No primeiro estudo publicado com TF avaliando a HC, foi utilizado um protocolo de treinamento intervalado, que não caracteriza a HC excêntrica do treinamento aeróbico por ter picos de alta intensidade intercalados durante o exercício (Carè, Catalucci et al, 2007).

A avaliação dos efeitos do TF aeróbio sobre a expressão de miRNAs na HC fisiológica é uma linha de pesquisa na qual nosso grupo é pioneiro, com a primeira publicação em março de 2011 (Soci, Fernandes et al., 2011) e desde então, diversas outras já foram realizadas (Fernandes, Soci et al, 2011; da Silva Jr, Fernandes et al, 2012; Fernandes, Magalhães et al, 2012, Melo, Fernandes et al, 2014). O objetivo do nosso grupo é buscar no treinamento físico aeróbio possíveis miRNAs com potencial terapêutico sobre as doenças cardiovasculares.

Uma vez que, o exercício físico promove HC fisiológica com adaptações benéficas ao sistema cardiovascular, a identificação de miRNAs específicos que modulem o processo hipertrófico fisiológico pode servir de base para uso terapêutico na doença cardíaca. Assim sendo, abre-se a perspectiva do uso de miRNAs, miRmímico ou AntagomiR, para corrigir ou atenuar um processo patológico, pela superexpressão ou inibição *in vivo* de miRNAs diferencialmente expressos na HC fisiológica.

Acreditamos que a modulação da expressão de miRNAs no coração reverta o processo patológico similar a prática do TF, tanto no crescimento hipertrófico patológico cardíaco, quanto em suas consequências na função ventricular de animais SHR. Isso poderá fortalecer o entendimento tanto dos mecanismos de atuação dos miRNAs quanto

do processo hipertrófico e de remodelamento cardíaco, melhor discriminando o processo fisiológico do patológico induzido pela hipertensão.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

1. Investigar o potencial terapêutico dos miRNAs em reverter as adaptações cardíacas patológicas induzidas pela HA utilizando-se de um miRNA específico selecionado da adaptação cardíaca fisiológica com o TF aeróbio.

3.2. Objetivos Específicos

1. Selecionar entre os miRNAs que tem mudança de expressão induzida pelo TF aeróbio quais são os que tem um padrão de mudança inverso induzido pela HA.
2. Confirmar a expressão desses miRNAs em animais treinados e SHR, por real time-PCR.
3. Investigar o efeito do TF sob o miRNA selecionado e seus genes alvo em animais normotensos.
4. Modular *in vivo* em animais SHR, através de um vetor lentiviral, a expressão do miRNA selecionado.
5. Investigar o efeito desta modulação no modelo animal de HA sobre as seguintes variáveis:
 - Peso do VE corrigido pelo peso corporal
 - Diâmetro dos Cardiomiócitos
 - Pressão arterial por pletismografia de cauda
 - Expressão gênica de colágeno cardíaco do tipo I e III
 - O percentual de colágeno total por histologia
 - O conteúdo de OH-prolina cardíaca
 - A função ventricular sistólica e diastólica por Ecocardiografia com Doppler

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Hipertensão Arterial e Treinamento Físico Aeróbico

A HA é uma síndrome multifatorial, causada por diversos fatores, principalmente genéticos e ambientais, caracterizada por um aumento na resistência vascular periférica e elevação sustentada da pressão arterial. Na HA o aumento da resistência vascular periférica induz ao remodelamento cardíaco irregular, patológico e acompanhado de disfunção ventricular (Pimenta, 2008).

A HA é uma doença complexa que demanda atenção da comunidade científica na compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos em sua progressão. Diversos mecanismos têm sido associados com a patogênese da HA, como a hiperatividade do sistema nervoso simpático, o sistema renina angiotensina, diminuição da produção de óxido nítrico, rigidez e espessamento vascular e rarefação capilar (Neves, Fernandes et al. 2014).

O TF é também um estímulo crônico, capaz de induzir o remodelamento cardíaco. Porém, o processo é estruturalmente diferente e concatenado com uma função cardíaca preservada, o que faz do TF uma abordagem não farmacológica utilizada como coadjuvante no tratamento de doenças cardiovasculares, devido seus benefícios metabólicos, vasculares, estruturais e funcionais sobre o coração. (Soci, Fernandes et al, 2001; Villella & Villella, 2014).

Há uma intrincada rede de mecanismos que podem estar envolvidos nessas diferenças e existe muito a ser clarificado sobre esta questão. Estes mecanismos podem ser considerados em diversos níveis: em relação ao estímulo que os deflagra, quanto as vias de sinalização envolvidas, do ponto de vista estrutural, e também a respeito dos

mecanismos de regulação da expressão de genes (Bernardo, Weeks et al. 2010). Uma síntese desses mecanismos será revisada nos próximos tópicos.

4.2.O Coração:

O coração é um órgão muscular oco com grande plasticidade, ou seja, que possui uma grande capacidade de remodelamento frente à estímulos externos e ambientais. (Hill & Olson, 2008).

A parte celular do tecido cardíaco é composta de células musculares (cardiomiócitos, CMO) que contém o aparato contrátil do coração, células musculares lisas e também de células não-musculares, como os fibroblastos, células endoteliais e mastócitos (Estigoy, Ponten et al, 2009).

Estruturalmente, os CMO são compostos por feixes de miofibrilas que, por sua vez são miofilamentos compostos de sarcômeros (dispostos longitudinalmente e transversalmente na miofibrila), a unidade básica de contração muscular. A organização espacial dos CMO é feita em orientação circunferencial e espiral na extensão do VE, e funcionam em sincício para assegurar eficiência e ritmo da bomba cardíaca. Os discos intercalares, localizados entre as terminações dos CMO, são responsáveis pela adesão entre as células, permitindo a propagação da força contrátil e a troca de substâncias e íons entre as células adjacentes (Estigoy, Ponten et al, 2009).

Os CMO embora componham um terço do número celular total do coração, representam aproximadamente 70-80% da massa cardíaca, sendo assim as células de maior volume nesse órgão (Nag, 1980; Zak, 1984). A maioria das células musculares cardíacas dos mamíferos, logo após o nascimento, perde sua capacidade proliferativa (hiperplasia), e desta forma o crescimento cardíaco pós-natal ocorre quase

exclusivamente pelo aumento no tamanho dos miócitos, embora, recentemente essa teoria seja alvo de debate (Senyo, Lee & Kuhn, 2014). Experimentos de marcação de DNA mostram que a síntese de DNA ocupa uma fração muito pequena da população total de CMO, o que sugere a quase absoluta predominância da hipertrofia no aumento do coração pós-natal (Nakagawa, Hamaoka et al., 1988; Anversa, Leri et al., 2002; Anversa & Nadal-Ginard, 2002, Pasumarthi & Field, 2002, Senyo, Lee & Kuhn, 2014).

Os fibroblastos também constituem outra classe de células bastante abundante no coração. São células mesenquimatosas que compreendem cerca de 70% do número das células do coração. Essas células formam o esqueleto fibroso do coração e servem de arcabouço para o restante dos tipos celulares. Expressam proteínas que mantêm a homeostase da matriz extracelular (ECM), como Elastina, Colágeno e Fibronectina, além de citocinas e fatores de crescimento que contribuem para o remodelamento cardíaco. A parte não celular do coração é representada pela matriz extracelular, com função de aderir os CMO em uma malha, mantendo a conformidade do tecido em questão. A quantidade de ECM também é um determinante para a função cardíaca e em condições patológicas um aumento pronunciado de sua quantidade é um importante componente envolvido com o prejuízo da função cardíaca (Deb & Ubil, 2014).

4.3. Remodelamento Cardíaco ou Hipertrofia Cardíaca

A HC é definida como o crescimento, ou aumento da massa do coração, seja pelo aumento do volume de seus componentes contráteis (CMO) ou pelo aumento da quantidade dos componentes não contráteis (Fibroblastos e ECM) (Krieger e Justo, 2000; Bernardo, Weeks et al, 2010).

O aumento da massa cardíaca, ou HC, é uma das adaptações morfológicas de

sobrecargas aplicadas ao tecido muscular cardíaco seja ele o TF ou doenças cardiovasculares. A HC é uma resposta adaptativa aos aumentos da sobrecarga de trabalho hemodinâmica sobre miocárdio e consequência da ativação de vias de sinalização que geram o aumento dos mecanismos de transcrição gênica e tradução proteica que em conjunto produzem o fenótipo hipertrófico do miocárdio (Oliveira, Alves et al., 2005; Frey, Katus et al., 2004).

Estudos em necropsia de corações humanos apontam que a massa ventricular esquerda em humanos sem doenças cardiovasculares é de aproximadamente 175 g em homens e 150 g em mulheres de porte médio, não ultrapassando 215g em sujeitos de grande porte. A massa do ventrículo direito em conjunto ao septo interventricular pode chegar até 65g em homens e 50 g em mulheres saudáveis (Bove, Rowland et al. 1966). Estudos com ecocardiografia também demonstram que a massa do VE ocupa até 134 g/m² em homens e ≤ 109 g/m² em mulheres (Lorenz, Walker et al., 1999).

O aumento de massa do coração pode ser decorrente de causas fisiológicas ou patológicas. O TF, a gravidez e o crescimento pós-natal promovem o crescimento fisiológico do coração, enquanto a ativação neuro-humoral exacerbada, a HA e a lesão do miocárdio podem promover o crescimento patológico. É importante salientar que a maior parte das doenças cardíacas é acompanhada por aumento de massa miocárdica (Hill & Olson, 2008; Franchini, 2001).

Sendo a indução de HC analisada desde o ponto de vista mecânico e molecular, o processo é resultado de mecanismos complexos de transdução de sinal aos quais se somam fatores hemodinâmicos, neurais, genéticos, endócrinos, autócrinos e parácrinos. Dentre os vários mecanismos implicados muito se discute a respeito do estímulo simpático, da ativação do sistema renina-angiotensina e do envolvimento de vias de sinalização de fatores de crescimento e de inflamação como o fator de crescimento de

fibroblastos (FGF2), fator de crescimento semelhante a Insulina (IGF-I), fator de necrose tumoral (TNF α), Interleucina-1 β e endotelina (Franchini, 2001).

Entretanto, é bem estabelecido que o estímulo mecânico, isoladamente, também é crucial para ativar vias de sinalização e desencadear o processo de expressão e reprogramação gênica, bem como o de síntese protéica associados ao processo de HC dos CMO (Baraúna, Magalhães et al. 2008; Miyazaki, Oka et al, 2006, Dong, Mosca et al. 2013,).

Estudos bem delineados já demonstraram esta relação em humanos e animais. Um estudo realizado em gatos submetidos à bandagem da artéria pulmonar, comparou os efeitos da sobrecarga hemodinâmica em músculos papilares retirados da parede do VD. Os ventrículos direitos foram denervados, e foi feito duplo bloqueio dos receptores adrenérgicos α e β , extirpando-se assim efeitos do sistema nervoso simpático. Constatou-se que a área de secção transversa dos CMO apresentou alta correlação positiva com a carga mecânica do músculo papilar, independentemente da ativação autonômica (Cooper, Kent et al., 1985).

Outro estudo realizado em ratos estabeleceu uma relação clara entre o estímulo mecânico e a HC descrevendo o padrão de expressão gênica. Ratos Wistar foram submetidos à sobrecarga pressórica por constrição da aorta abdominal ou sobrecarga volumétrica por *shunt* aortocaval. Este estudo mostrou que as HC induzidas por diferenças sobrecargas eram fenotipicamente diferentes, e mostrou evidências de que essas diferenças ocorriam por uma expressão de genes diferentes. (Miyazaki, Oka et al, 2006).

Por fim, é interessante ressaltar que os aumentos de espessura de paredes cardíacas ou no tamanho das cavidades é uma resposta biológica adaptativa ao estímulo mecânico, que serve para equalizar ou diminuir o estresse nas paredes do coração.

4.3.1. Tipos de sobrecargas hemodinâmicas: volumétrica vs pressórica

As sobrecargas hemodinâmicas aplicadas ao miocárdio e que são capazes de induzir o fenótipo hipertrófico podem ser de duas naturezas: de volume ou de pressão. A sobrecarga volumétrica é caracterizada pelo aumento da pré-carga cardíaca devido, geralmente ao aumento do retorno venoso que aumenta o enchimento ventricular e que induz principalmente HC excêntrica, cujas características morfológicas encontram-se explicadas no próximo tópico. Já a sobrecarga pressórica é caracterizada pelo aumento da pós-carga cardíaca devido ao aumento da resistência vascular periférica o que aumenta a força contra a qual o ventrículo esquerdo tem que contrair para causar a ejeção. Nesse caso a HC é do tipo concêntricas, explicada no tópico seguinte (Katz, 2001). O perfil molecular e morfológico das HC apresentada também é dependente do tipo de sobrecarga aplicada e caracterizará consequentemente o tipo de HC (Grossman, Jones et al., 1975; Soci, Fernandes et al, 2011; Franchini, 2001; Oliveira, Alves et al, 2005).

Desta forma, HCs induzidas por estímulos pressóricos geram um padrão morfológico distinto daquela induzida por estímulos volumétricos, o que pode ser observado através das relações pressão-volume dentro do ciclo cardíaco. As paredes do ventrículo são submetidas a uma série de alterações de estresse e comprimento durante cada ciclo de contração e relaxamento, que podem ser mostradas por um diagrama de trabalho, chamado curva de pressão/volume, e no qual a pressão é plotada como função de volume, gerando forças mensuráveis de Pré-carga e Pós-carga (Katz, 2001).

Outro importante determinante deste padrão morfológico também é a intermitência ou cronicidade do estímulo. Em relação à temporalidade do estímulo discute-se que a HC em doenças é oriunda de estímulos crônicos, já a HC induzida pelo TF é oriunda de estímulos intermitentes (Bernardo, Weeks et al, 2010).

Os ratos espontaneamente hipertensos (SHR), modelo genético de HA experimental espontânea, é o modelo que mais se assemelha à HA primária no homem. Isto porque apresenta respostas hemodinâmicas e endócrinas semelhantes as do homem com HA essencial (Chen, Hu et al., 1996). Sharma, Tomanek et al. (1985), afirmam que este modelo de HA tem uma vantagem sobre os outros, pois apresenta um aumento gradual da pressão arterial. A HC ventricular esquerda é descrita em grande parte dos trabalhos como uma compensação que ocorre em primeiro momento para manter normal a função do VE e a mecânica miocárdica (Sharma, Tomanek et al., 1985). Precocemente esses animais desenvolvem HC no VE, que é responsável pela manutenção da função cardíaca normal, apesar da elevada pressão arterial sistêmica (Cicogna, Robinson et al., 1997). Entretanto, o aumento crônico da pressão deve estar associado a uma eventual descompensação da função cardíaca (Kannel, 1977).

4.3.2. HC Patológica *versus* Fisiológica

É bem estabelecido que existem diferenças no tipo de HC quando o coração é submetido a uma sobrecarga fisiológica ou patológica, o que é explicado pela diferença na intensidade e no tipo de sobrecarga que é imposta ao músculo cardíaco. A sobrecarga induzida pelo exercício é intermitente, já a HC patológica é desenvolvida por uma sobrecarga contínua, como ocorre no indivíduo com HA. A HC fisiológica vem acompanhada de melhora na função cardíaca, enquanto a HC patológica está associada a maior índice de morbidade e mortalidade (Kannel, 1977; Myers, Prakash et al., 2002).

O crescimento fisiológico (normal) do coração inclui o crescimento normal pós-natal, o induzido pela gravidez e o induzido pelo exercício físico. Em contraste, o crescimento patológico ocorre em resposta à pressão crônica ou sobrecarga de volume em uma situação de doença, como por exemplo, a HA, valvulopatias, infarto do miocárdio ou

doença coronária isquêmica ou condições anormais que levam a cardiomiopatia, como mutações gênicas e como o diabetes (Bernardo, Weeks et al, 2010). Ambos os crescimentos, o fisiológico e o patológico estão associados com um aumento no tamanho do coração, no entanto a HC patológica é também tipicamente associada pelo aumento do tecido fibrótico, disfunção cardíaca e risco aumentado de morte súbita (Levy, Garrison et al., 1990; Weber, Brilla et al., 1993; Cohn, Bristow et al., 1997).

O crescimento fisiológico é acompanhado com uma estrutura cardíaca normal, função normalizada ou melhorada e é reversível quando é induzido pelo exercício ou pela gravidez (Ferrans, 1984; Schaible & Scheuer, 1984; Fagard, 1997).

A HC é associada com remodelamento estrutural dos componentes das paredes ventriculares para acomodar aumentos no tamanho dos CMO, o que inclui alterações na trama fibrilar de colágeno e na angiogênese. Em condições basais ou na HC fisiológica a fina rede de colágeno intersticial fornece integridade estrutural que auxilia na junção dos CMO, facilitando o encurtamento de miócitos, o que se traduz em uma função de bombeamento eficiente ou normalizada do coração. Por outro lado, a HC patológica é associada com morte celular, por apoptose e necrose, sendo que a perda celular é substituída com uma expressão excessiva de colágeno, conhecida como fibrose. (Gunasinghe & Spinale, 2004)

4.3.3. HC concêntrica vs excêntrica

As HC podem ser subdivididas como concêntricas ou excêntricas. Essas classificações são baseadas em mudanças no formato do ventrículo que são dependentes do estímulo que a deflagra. (Grossman, Jones et al., 1975; Pluim, Zwinderman et al., 2000).

A HC concêntrica fisiológica se refere a um aumento na espessura de parede

relativa e na massa cardíaca, com uma pequena redução ou sem mudança no volume das câmaras. Este tipo de HC é caracterizado por um padrão paralelo de adição de sarcômeros, levando a um aumento maior no diâmetro de CMO e na espessura da parede. O TF de força, também referido como exercício isométrico ou estático, resulta em sobrecargas pressóricas sobre o coração, gerando aumento de Pós-carga e assim HC concêntrica, mas sem diminuição do tamanho do VE, e sem prejuízo de função ventricular (Zak, 1984; Pluim, Zwinderman et al. 2000).

Um estímulo patológico causando sobrecarga de pressão, como na HA ou a estenose aórtica, produz um aumento no estresse de parede sistólico, o qual resulta nesta classificação de HC, entretanto a espessura da parede é aumentada desproporcionalmente o que gera um aumento concêntrico da parede e uma diminuição da cavidade do VE (Grossman, Jones et al., 1975). Nesse caso define-se como HC concêntrica patológica.

A HC excêntrica se refere a um aumento na massa cardíaca com o volume de câmara aumentado, como no caso da dilatação de câmaras. Neste caso a espessura pode ser normal, diminuída ou aumentada. Na HC excêntrica, a adição de sarcômeros em série leva a um aumento no comprimento celular dos CMO (Grossman, Jones et al., 1975). Nesta classificação, um estímulo que causa sobrecarga de volume, como o da regurgitação aórtica e fístula arterio-venosa, induz a um aumento no estresse de parede diastólico e resulta nesta classe de HC excêntrica patológica. (Grossman Jones et al., 1975; Pluim, Zwinderman et al., 2000).

O TF aeróbico, também referido com o de endurance, isotônico ou dinâmico, como por exemplo, corrida e natação de longa duração, aumentam o retorno venoso para o coração, resultando em uma sobrecarga de volume, aumento de Pré-carga e assim a HC excêntrica. Este tipo é normalmente caracterizado pelo alargamento das câmaras cardíacas e uma mudança proporcional na espessura de parede, enquanto a HC excêntrica

em situações de doença é geralmente associada com aumento da cavidade ventricular esquerda, sem aumento proporcional na massa ventricular, o que leva a dilatação da câmara cardíaca como em pacientes com doença de Chagas. (Zak,1984; Pluim, Zwinderman et al., 2000; Eghbali, Deva et al., 2005).

4.4. Remodelamento cardíaco ou HC fisiológica induzida pelo treinamento físico

Na medicina esportiva contemporânea o termo “coração de atleta” é bastante difundido e utilizado para descrever o aumento característico do coração em resposta ao treinamento físico, além de ser considerado como “*benchmark*” para a caracterização de atletas de elite. A principal característica do “coração de atleta” consiste na presença de um aumento do tamanho do coração, que permite compensar a demanda por um maior débito cardíaco (Maron, 1986).

A HC induzida pelo TF é assim considerada como uma adaptação fisiológica fundamental, que ocorre em função do aumento da carga de trabalho no músculo cardíaco, sendo também interpretada como uma resposta compensatória para equalizar o estresse hemodinâmico nas paredes ventriculares, mantendo o adequado funcionamento da bomba cardíaca (Oliveira & Krieger, 2002; Colan, 1997; Urhausen & Kinderman, 1999).

O ponto de partida para este estudo, é a decorrente do TF aeróbio, com sessões de longa duração de natação ou corrida, que apresenta estímulos dinâmicos, causados pela sobrecarga intermitente de volume gerada durante as sessões. Este tipo de HC, denominado HC excêntrica, os atletas desenvolvem um aumento de tamanho da cavidade do VE, com aumento proporcional da estrutura de parede, caracterizada por uma relação mantida entre a espessura da parede ventricular e o raio do VE, associada a um DC

elevado (Colan, 1997; Pluim, Zwindermann et al., 2000).

Estruturalmente, o aumento da massa muscular do miocárdio induzido pelo TF aeróbio é uma adaptação que ocorre principalmente no VE, é associada ao aumento do volume diastólico final, caracterizando uma HC do tipo excêntrica (Abraman & Dzhuganyan 1969; Fleck 1988; Stone, Fleck et al., 1994; Brandão, Wanjgarten et al., 1993; Huonker, Hale et al., 1996; Forjaz, Brum et al., 1998). Como há maior enchimento ventricular, mantendo-se a fração de ejeção, o coração ejeta maior volume absoluto de sangue. Portanto, é necessário um menor número de batimentos por minuto para manter o DC.

Ainda, a morfologia da HC induzida pelo TF aeróbio é determinada por uma soma de fatores, relacionados com a eficiência do miocárdio, tais como um aumento do volume diastólico, para o aumento do volume de sangue ejetado, às custas de um menor encurtamento cardíaco, uma menor geração de energia de fricção e uma menor tensão. O aumento de tamanho das fibras aumenta sua capacidade de gerar tensão o que pode gerar também uma diminuição do gasto energético do início da contração, em cargas submáximas, em relação às máximas (Shapiro, 1997).

O TF aeróbio aumenta a velocidade máxima de enchimento do VE no limiar anaeróbio e durante esforços máximos, o que sugere assim a capacidade de acomodação de um volume maior de sangue quando comparado com seus controles sedentários, o que mostra uma melhora da eficiência cardíaca, principalmente pelo aumento da capacidade de volume do VE ao final da diástole. Portanto, assim como definido pela lei de Laplace, num aumento de volume ventricular o estresse de parede aumenta para manter a pressão interventricular, o que tende a diminuir a eficiência cardíaca, e o aumento da massa cardíaca ocorre através da ativação de vias de sinalização e de mecanismos de síntese protéica para compensar este aumento de estresse e diminuir a tensão em cada

cardiomiócito (Brandão, Wanjgarten et al, 1993; Shapiro, 1997).

Em animais experimentais, o aumento do tamanho do músculo cardíaco como adaptação ao exercício físico regular também pode ser explicado pela aplicação de sobrecargas, ou de volume ocasionando uma HC excêntrica, mais relacionada ao treinamento aeróbio, ou de pressão levando a uma HC concêntrica, que é mais relacionada a treinamentos em modalidades de força. A caracterização de protocolos de treinamento que geram estes tipos de HC e o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos tanto na HC concêntrica (Baraúna, Batista et al., 2005; Baraúna, Rosa et al., 2007; Baraúna, Magalhães et al., 2008), quanto na excêntrica (Oliveira, Sasaki et al., 2009; Hashimoto, Fernandes et al, 2011; Soci, Fernandes et al., 2011) tem sido uma importante vertente de estudos de nosso laboratório, já que em modelos experimentais o controle sobre variáveis de interferência são maiores e a possibilidade de isolar variáveis de interesse é aumentada.

Para melhor compreender os aspectos moleculares envolvidos na HC excêntrica, desenvolvemos um protocolo de treinamento com diferentes volumes de TF aeróbio, que levasse a uma HC mais robusta (Oliveira Sasaki et al., 2009). Neste modelo, desenvolvemos dois protocolos de treinamento, os quais levam a diferentes graus de HC (13% e 28%), aumento do consumo de O₂ pós-treinamento, bradicardia de repouso, melhora de função ventricular e ausência de marcadores patológicos de HC (ANF, α -actina esquelética e β -MCP), caracterizando a HC fisiológica (Hashimoto, Fernandes et al., 2011; Soci, Fernandes et al., 2011).

No mesmo sentido, os modelos animais têm permitido nos últimos anos um melhor entendimento da HC decorrente de diferentes doenças, incluindo a HA. Isto porque possibilitam o estudo da evolução de doenças cardiovasculares desde seus estágios iniciais, a partir da investigação dos mecanismos dessas doenças e dos efeitos de

diferentes intervenções, incluindo drogas. No decorrer dos anos houve o desenvolvimento de vários modelos experimentais de hipertensão, a fim de encontrar o modelo mais similar à doença que ocorre em humanos, tanto no perfil agudo como crônico, nos quais fosse possível a medida de parâmetros hemodinâmicos, cardíacos e bioquímicos, e que também atendessem às necessidades econômicas e de bem estar do animal.

A relevância em se estudar mecanismos moleculares subjacentes à tipos diferentes de HC em modelos animais está justamente na possibilidade de comparar a indução molecular a que são submetidos modelos animais diferentes, com diferentes tipos e aumentos de sobrecarga. A figura 1 resume as diferenças características entre a HC induziada pelo TF aeróbico e a da HA que serão alvo de estudo nesse trabalho.

Figura 1: Efeito do TF aeróbico e da Hipertensão arterial (HA) na hipertrofia cardíaca (HC). A HC fisiológica induzida pelo TF aeróbico é caracterizada por um perfil regular de aumento de espessura de parede e septo, cavidade do VE aumentada sem fibrose ou disfunção, sendo induzida por aumentos intermitentes de sobrecarga volumétrica. A HC induzida pela hipertensão apresenta crescimento irregular de parede e septo, cavidade do VE diminuída, é induzida por um aumento contínuo na sobrecarga pressórica, induzindo à fibrose e prejuízo de função (Adaptado de Fernandes, Soci & Oliveira, 2011).

4.5. Características bioquímicas e moleculares

No final da década de 70 e início da década de 80 foi reconhecido que a HC fisiológica induzida pelo TF era associada com elevações na atividade de ATPase miosínica e aumento na contratilidade, enquanto a HC patológica, induzida pela HA e por bandagem aórtica foi associada com decréscimo na atividade de ATPase miosínica e prejuízo na função contrátil (Wikman-Coffelt, Parmley et al. 1979; Rupp, 1981). Desde então existem vários estudos mostrando que a HC fisiológica e patológica são associadas com padrões de assinatura molecular distintos. Iemitsu, Miyauchi et al., (2001) compararam a expressão de mRNA entre ratos SHR (HC patológica) e ratos treinados por natação (HC fisiológica) e foi demonstrado um padrão distinto de expressão de miosinas ao comparar entre os dois modelos (Iemitsu, Miyauchi et al, 2001). Hoje é bem reconhecido que a HC patológica é associada com alterações distintas nas proteínas contráteis cardíacas (miosinas de cadeia pesada do tipo α e β , expressão aumentada de genes fetais (β -MHC, peptídeo natriurético atrial e tipo B – ANP e BNP e α -actina esquelética) e diminuída de proteínas de lançamento de cálcio, como a SERCA2a – (ATPase de cálcio do retículo sarcoplasmático). A geração de modelos animais transgênicos e *knockout* em combinação com modelos de HC fisiológica e patológica, também tem permitido aos investigadores delinear as proteínas sinalizadoras que possuem papéis distintos na regulação da HC fisiológica e patológica (Bernardo, Weeks et al., 2010).

Adicionalmente, em resposta ao aumento na sobrecarga hemodinâmica os miócitos cardíacos estão sujeitos ao estiramento mecânico e fatores humorais autócrinos, parácrinos são lançados. Dentre estes inúmeros fatores estão Angiotensina II, Endotelina 1, Fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1), fator de crescimento transformante- β (TGF- β) e cardiotrofina1 (CT-1). Estes fatores se ligam a receptores nos

CMO, que por sua vez ativam vias de sinalização intracelular que levam ao processo de HC. As cascatas de sinalização são composta por uma complexa rede de proteínas e apresentam *crosstalk* extensivo entre si (Bernardo, Weeks et al., 2010). É importante ressaltar que estudos em humanos e animais demonstram que certos fatores são preferencialmente lançados em resposta à HC patológica e fisiológica. Por exemplo, é bem reconhecido que IGF-1 é preferencialmente lançado em resposta ao TF, inclusive em ratos submetidos ao treinamento aeróbio por natação e em atletas profissionais (Conlon & Raff, 1999; Koziris, Hickson et al. 1999; Neri Serneri, Boddi et al., 2001, Scheinowitz Kessler-Icekson et al. 2003; Perrino, Schroder et al., 2007). Estas publicações reafirmam que, em termos moleculares a HC fisiológica difere em alguns pontos da patológica, mecanismos que requerem estudos adicionais para serem elucidados e que consistem em importantes alvos de estudo com foco terapêutico.

4.6. Vias de sinalização e Fatores de transcrição

Existe uma intrincada rede de vias sinalizadoras compostas por proteínas responsáveis pelo processo de HC e existem evidências que esta rede se diferencia em alguns aspectos entre a HC fisiológica e patológica cujas diferenças são oriundas, primariamente, de um padrão de expressão gênica diferente (Bernardo, Weeks et al., 2010, Mckinsey, Zhang et al., 2002; Trivedi, Luo et al., 2007; Nuremberg Gilsbach et al., 2013).

Em contrapartida, essas vias ativam fatores de transcrição específicos. Os fatores de transcrição se acoplam em regiões promotoras de genes e no núcleo celular para regular as alterações de longo prazo na expressão de genes que são associadas com a HC (Sadoshima & Izumo, 1997; Aoki & Izumo, 2001).

As vias de sinalização intracelular, por sua vez, são acopladas com fatores de

transcrição, como por exemplo, GATA-4, GATA-6, Csx/Nkx2.5, MEF2, c-jun, c-fos, c-myc, nfKappa-B e NFAT para HC patológica e P70s6K, EIF4E, 4E-BP1 EIF2B e EIF2 para fisiológica (Bernardo, Weeks et al. 2010). Embora existam fatores de transcrição (MEF-2, NFAT) acionados pela mesma via comum a ambos os tipos de resposta aguda ao TF e HC patológica, como a das MAPK, vale ressaltar também que sua forma de ativação é intermitente, não crônica, e relacionada ao estímulo estressor, e sua ativação tende a diminuir com o desenvolvimento da HC fisiológica (Iemitsu, Maeda et al., 2006).

Classicamente a HC patológica também é associada com ao aumento da expressão de genes fetais como ANP, BNP, α -actina esquelética, e β -MHC, e a diminuição de genes normalmente muito expressos em altos níveis como a SERCA-2 (Izumo, Nadal-Ginard et al. 1988; Chien, Knowlton et al., 1991). Esta reexpressão de genes fetais e mudanças na composição de proteínas contráteis não ocorrem em modelos de HC fisiológica, como a submetida pelo TF aeróbico, e o impacto direto da mudança de expressão destes genes na HC, função e fibrose cardíacas ainda não está esclarecido (Mcmullen, Shioi et al., 2003; Soci, Fernandes et al., 2011).

4.7.Mecanismos de regulação epigenética

São considerados como mecanismos centrais para a regulação gênica, que interferem no estado de afrouxamento dos nucleossomos, e consequentemente a exposição de sítios de ligação a fatores de transcrição. Estes mecanismos podem interferir no estado de acetilação e metilação ou fosforilação dos nucleossomos, e pode ser efetivado pelas acetilases, deacetilases, metilases e desmetilases e por complexos de famílias de proteínas ligantes ao DNA podendo interferir no padrão de ligação dos fatores de transcrição em seus sítios em regiões promotoras de genes relacionados aos tipos de HC. (McKinsey, Zhang et al., 2002; Trivedi, Luo et al., 2007; Nuremberg, Gilsbach et al.,

2013; Chang & Bruneau, 2012; Han, Hang et al., 2011).

As Histonas desacetilases (HDAC), principalmente as HDAC classe I e II promovem condensação da cromatina e reprimem a transcrição. Estudos diversos com animais transgênicos com as três classes dessas enzimas convergem para um ponto em comum, a ausência desses supressores de HC causa exacerbação da HC, sendo que as HDAC do tipo II e II são implicadas na repressão da HC patológica, e as HDAC do tipo I são relatadas como promotoras de HC (McKinsey et al, 2002; Trivedi et al, 2007).

A metilação do DNA é um mecanismo conservado em procariotos e eucariotos, consistindo a adição de grupos metil (CH₃) em Citosinas seguidas de Guaninas em regiões palindrômicas denominadas Ilhas CpG. Essa reação é catalisada pelas DNAmethyltransferases (DNMT) e a remoção ativa desses grupos é realizada pelas enzimas *ten-eleven* (TET). Em linhas gerais, durante o desenvolvimento cardíaco a desmetilação expõe sítios de ligação a fatores de transcrição em zonas promotoras de expressão gênica (*enhancers*), enquanto a metilação as oculta. Os padrões de metilação também podem variar de tecido a tecido, localização gênica, sítios de iniciação de transcrição e *enhancers* estando longe de serem elucidados (Nuremberg, Gilsbach et al, 2014).

Existe relação com o estado de metilação cardíaco e doenças como a Insuficiência Cardíaca. Experimentos de imunoprecipitação de DNA metilado mostram que diferenças tanto em promotores como em corpos gênicos quando comparados com biópsias cardíacas saudáveis. Nos corações dos pacientes há um padrão expressão gênica aumentado correlacionado com desmetilação de seus promotores, concomitante com hipermetilação em ilhas CpG de Dux4, um gene downregulado também em distrofia fascioescapulohumeral. (Movassag, Choy et al, 2011). A metilação e diminuição de expressão de Ly75 (antígeno 75 de linfócitos) e Adora2a (receptor 2 a de

adenosina) também tem sido lincada com doenças cardíacas (Haas, Frese et al, 2013).

Pouco é conhecido sobre estados de metilação e o exercício físico. Sabe-se, no entanto que os padrões de metilação são influenciados pela nutrição e pelo ambiente, sendo esta uma área bastante promissora para investigação. Um estudo mostrou, através de real-timePCR e avaliação de metilação global por DNA bissulfito-convertido em 161 participantes que os sujeitos que realizavam tempos de atividade física diária de 26-30 minutos tinham um grau mais alto de metilação do DNA comparados aos que se exercitavam por menos de 10 minutos (Zhang, Cardarelli et al. 2011)

O remodelamento da cromatina dependente de ATP expõe sítios de ligação a fatores de transcrição e é efetivado por famílias de complexos protéicos, que movem, retiram ou rearranjam os nucleossomos com utilização da energia da hidrólise do ATP. Este remodelamento é feito por 4 famílias de complexos SWI/SNF (Switching defective /sucrose nonfermenting), CHD (Chromodomain helicase DNA binding), ISWI (Imitation switch) INO80 (Inositol requiring 80). Estas famílias possuem todas subunidades ATPásicas similar, mas diferem em outros domínios (Chang e Bruneau, 2012, Han, Hang et al, 2011)

Entre outros relacionados ao sistema cardiovascular, na família SWI/SNF há 2 complexos: fator associado a BRG/BRM (Brahma related gene 1) (BAF) e PBAF (Polibromo BRG). Estas proteínas são exigidas para a proliferação de CMO no VE e no VD. BRG1 é expressa no período fetal e importante para balancear as isoformas de miosinas de cadeias pesada, regulando assim a rapidez e eficiência da contração cardíaca, sendo sua expressão relacionada com a cardiomiopatia dilatada hipertrófica (Hang, Yang et al, 2010).

4.8. Mecanismos pós-transcricionais

No sentido de melhor compreender quais são os mecanismos que diferenciam a expressão de genes no processo hipertrófico fisiológico e patológico e de relacioná-lo com a função *in vivo*, vários investigadores tem conduzido estudos de perfil de expressão de genes em corações de modelos animais de HC e em pacientes com tecnologia de microarray e sequenciamento de última geração. Embora alguns aspectos estejam esclarecidos na diferenciação dos vários níveis de controle desde a transcrição do gene até sua tradução em uma proteína funcional, muito ainda há o que investigar. Existe grande interesse em ações terapêuticas para reverter um ou mais aspectos do processo hipertrófico patológico (McMullen, Shioi et al., 2004; Myazaki, Oka et al., 2006).

Nesse sentido, genes com papéis únicos na mediação da HC fisiológica induzida pelo exercício, assim como aqueles que têm um papel na HC patológica consistem em alvos atrativos para o tratamento de doenças cardíacas e na interrupção de sua progressão para a insuficiência cardíaca.

Na última década, as atenções de investigadores científicos tem se voltado para outros tipos de mecanismos reguladores gênicos da HC: os mecanismos pós-transcricionais. A descoberta de pequenos RNAs, incluindo miRNAs e pequenos RNA de interferência (siRNA), com destaque na edição de dezembro de 2002 da revista Science (Couzin, 2002). Desde a descoberta do RNA de interferência (RNAi) em nematóides, os siRNAs proporcionaram um avanço técnico para a genética em sistemas biológicos de mamíferos.

Os mecanismos pós-transcricionais de regulação da expressão de genes compreendem mecanismos de processamento do RNA mensageiro (mRNA) e possuem vários níveis de ocorrência: splicing, poliadenilação, estabilidade e tradução. Entre estes estão os *P-Bodies* ou *processing bodies*, que consistem em várias enzimas com

localizações distintas no citoplasma envolvidas no *turnover* e na reformatação de mRNAs mal formados, importante para retirada do cap na região 5' do gene, no armazenamento e também na repressão da tradução, junto aos RNAs não codificantes (Kulkarni, Ozgur & Stoecklin, 2010).

Um nível adicional de regulação reúne fatores regulatórios com o envolvimento dos RNAs não codificantes (non coding RNAs – ncRNAs). São mecanismos que regulam negativamente a tradução, ou seja, a conversão do mRNA processado em uma proteína pelas unidades ribossomais. Os ncRNAs são RNAs sem capacidade de codificar proteínas, incluindo pequenos RNAs *housekeeping*, constitutivamente expressos, como RNAs ribossomais (rRNAs), de transferência (tRNAs), small nuclear (snRNAs) e small nucleolar (snoRNAs), transfer-messenger (tmRNAs) e telomerase RNAs. Há também outros RNAs que realizam essa regulação negativa, os quais são descritos como os miRNAs (ou miRs) e a família de ncRNAs mais longos ncRNAs, os *long non-coding* (lncRNAs). (Morceau, Chateauvieux et al, 2013).

Figura 2: Representação esquemática dos diferentes tipos de RNAs não codificantes e suas funções (adaptado de Olena e Patton, 2009)

4.9. MicroRNAs (miRNAs)

Os miRNAs são RNAs de fita simples de 17–25 nucleotídeos, não codificadores de proteínas, que agem como potentes reguladores pós-transcricionais da expressão gênica em plantas e animais (Kim, 2005).

Os miRNAs tem sido implicadas em inúmeros processos celulares, incluindo o desenvolvimento, diferenciação e proliferação celular, além de apoptose, hematopoiese, secreção de insulina e outros hormônios além de atuar no desenvolvimento e funcionamento muscular esquelético e cardíaco (Thum, Catalucci et al., 2008, Cheng & Lodish, 2005).

Os miRNAs são também implicados em doenças como câncer, doenças renais e cardíacas, e dentre essas últimas também no processo de HC. Essa nova classe de reguladores de expressão gênica têm se mostrado importantes no processo hipertrófico, cardiogênese e em doenças cardiovasculares, e também diversos outros tecidos e processos além do coração (Van Rooij, Sutherland et al., 2006; Van Rooij Sutherland et al., 2007, Van Rooij, Marshall and Olson, 2008; Van Rooij, Thatcher et al. 2008).

Os miRNAs foram descobertos na década de 90, mas apenas na última década tem sido atribuído aos mesmos o papel de reguladores da expressão gênica em organismos procariotos e eucariotos em diversos tipos celulares, dentre estes os CMO e fibroblastos cardíacos (Shabalina & Koonin, 2008; Lee, Feibaum & Ambros, 1993, Cordes & Srivasta, 2009).

Embora, existam os miRNAs altamente expressos no coração, o papel que desempenham nos processos fisiológicos e patológicos estão longe de uma completa elucidação (Cheng, Ji et al., 2007), assim conhecer os miRNAs que estão envolvidos no processo de HC pode trazer respostas importantes no entendimento da HC patológica e fisiológica e futuras intervenções como alvos terapêuticos.

Até recentemente, de acordo com o site de banco de dados de bioinformática (miRBase) 21.0, identificou-se cerca de 2588 miRNAs maduros em humanos, oriundos de 1881 precursores (<http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl>). E até o momento, o número de sequências publicadas no miRBase continua a crescer rapidamente, principalmente oriundas de experimentos de sequenciamento de última geração. A versão 21.0 do banco de dados contém 28645 entradas representando miRNAs precursores que expressam 35828 produtos de miRNAs maduros em 223 espécies. (<ftp://mirbase.org/pub/mirbase/CURRENT/README>) (Kozomara & Griffith-Jones, 2013). É possível que este número seja muito maior, e que esta classe seja uma das maiores reguladoras gênicas endógenas encontradas até hoje (Olena & Patton 2009). Adicionalmente um grande número de miRNAs parece ocorrer de acordo à maior complexidade do organismo (Prochnik, Rokhsar et al. 2007).

Em humanos, aproximadamente um terço dos miRNAs são organizados em *clusters*. É provável que um dado *cluster* seja uma única unidade transcricional, sugerindo uma regulação coordenada de miRNAs no *cluster*. Análise *in silico*, revelou que mais da metade dos *clusters* contêm duas ou mais sequências de miRNAs semelhantes. No entanto, é muito raro miRNAs que apresentam sequências idênticas quando maduro serem repetidos em um *cluster*. Esta organização genômica confere expressão simultânea de miRNAs semelhante, possivelmente levando a diversidade combinatória e sinergia dos efeitos biológicos. No entanto, todos os miRNAs derivados de um mesmo *cluster* não são expressos em níveis iguais, sugerindo que os miRNAs são regulados também em nível pós-transcricional. Além disso, uma parcela significativa de miRNAs estão localizados na região intrônicas de genes codificadores de proteínas, podendo atuar de forma sinérgica a esta (Lee & Dutta, 2009).

Os miRNAs exercem seus efeitos regulatórios ligando-se à região 3' não

traduzida (3'UTR) de RNAs mensageiros (mRNA)-alvo. Este mecanismo de atuação permite a redução dos níveis protéicos de seus genes-alvo, raramente afetando o nível de expressão transcricional (Kim, 2005). Embora a regulação negativa dos miRNAs em seus mRNAs alvos seja bem estabelecida, existem estudos mostrando que estes pequenos RNAs podem também se ligar, em regiões promotoras ou em regiões 5' não traduzíveis de genes alvos e que este tipo de interação, induz a um aumento da transcrição e tradução do mRNA, provocando assim aumento da expressão da proteína produzida por aquele gene ou mRNA em questão (Place, Li et al., 2008; Janssen, Reesink et al., 2013).

A regulação pós-transcricional exercida pelos miRNAs na região 3' UTR depende do grau de complementaridade com o mRNA-alvo, podendo ocorrer por inibição da tradução ou degradação do mRNA. O pareamento de modo imperfeito com o mRNA acarreta a inibição da tradução do alvo, sendo o mecanismo principal de atuação dos miRNAs em mamíferos. Pelo fato de os miRNAs possuírem seqüências pequenas e agirem sem a necessidade de pareamento completo, um único miRNA pode regular muitos mRNA-alvo, além de cooperarem no controle de um único mRNA (Brennecke, Stark et al., 2005).

Alguns estudos indicam que um miRNA possa regular centenas de mRNA apresentando funções totalmente diversas. Desta forma, os miRNAs constituem uma enorme e complexa rede regulatória da sinalização celular. Em plantas, a regulação dos miRNAs ocorre principalmente através de sua interação perfeita com o mRNA, levando-o à sua degradação (mecanismo de iRNA). No entanto, já se têm exemplos da ocorrência deste tipo de silenciamento gênico também em mamíferos (Valencia-Sanches, Liu et al., 2006; Hammond, 2005).

4.9.1. Descoberta dos miRNAs

O primeiro miRNA descoberto foi denominado Lin-4, e foi identificado por Lee e Ambros em nematóides (*Caernobitis Elegans*), no ano de 1993, após um *screening* genético por defeitos no controle temporal do desenvolvimento larval, tendo como alvo o gene Lin-14. Nesses organismos as linhagens celulares possuem características diferentes durante 4 estágios larvais (L1-L2-L3-L4). A Mutação em Lin-4, gerou uma ruptura na regulação temporal do desenvolvimento das larvas, gerando padrões de divisão celular específicos do primeiro estágio larval (L1) que se repetiam em estágios desenvolvimentais posteriores (Lee, Feibaum & Ambros, 1993).

Fenótipos desenvolvimentais opostos, com omissão dos desfechos celulares de L1 e desenvolvimento prematuro no estágio L2 são observados nos nematóides que eram deficientes para Lin-14, alvo do miRNA Lin-4 (Lee, Feibaum & Ambros, 1993). Este miRNA é parcialmente complementar a sítios conservados localizados na região 3' não traduzível (3'UTR) do mRNA de lin-14. LIN-14 codifica, em nemátoides uma proteína nuclear, que é downregulada no final da fase L1 e inicia a progressão desenvolvimental para L2. A regulação negativa da expressão protéica de LIN-14 exige uma 3'-UTR intacta para este mRNA, assim como um Lin-4 funcional. O pareamento incompleto entre Lin-4 e a 3'-UTR de LIN-14 foi considerado essencial para o controle de expressão protéica de LIN-14 (Lee, Feibaum & Ambros, 1993).

A descoberta de Lin-4 a sua inibição de regulação alvo-específica mostrou evidência de um novo mecanismo que orquestrava a regulação gênica durante o desenvolvimento. Em 2000, quase 7 anos depois da identificação do miRNA Lin-4 foi descoberto o segundo miRNA, também usando estudos genéticos em nematóides. Let-7 codifica um pequeno RNA temporalmente regulado que controla a transição desenvolvimental do estágio L4 para o estágio adulto, se ligando à região 3'UTR de LIN-

41 e hbl-1 (LIN-57) e consequentemente inibindo sua tradução (Reinhart, Slack et al. 2000; Pasquinelli, Reinhart et al. 2000, Vella, Choi et al., 2004).

Essa segunda descoberta, além de fornecer outro vívido exemplo da regulação do desenvolvimento por pequenos RNAs, também possibilitou o levantamento da hipótese de que os mesmos pudessem desempenhar funções similares em outras espécies e estar presentes em vários tecidos, o que abriu perspectivas para a descoberta de novos miRNAs e de outros processos biológicos que incluíam seu mecanismo de regulação (Pasquinelli, Reinhart et al, 2000).

4.9.2. Localização dos miRNAs no genoma

Os miRNAs conhecidos de mamíferos são expressos a partir de diversas regiões do genoma, podendo estar presentes em regiões intergênicas, em íntrons codificadores, e em éxons de unidades de transcrição (UT) codificadoras e não codificadoras (Olena & Patton, 2009)(Figura3).

Em adição, aproximadamente 50% dos miRNAs encontrados em mamíferos são localizados em estreita proximidade com outros miRNAs, e são chamados de *clusters* (Mukherji, Ebert et al. 2011). Esses aglomerados são transcritos a partir de uma única unidade de transcrição (TU), policistrônica (Thum, Catalucci et al. 2008 & Van Rooij, Marshall & Olson 2008). Não obstante, há miRNAs que podem ser transcritos a partir de promotores separados, sugerindo que estes possuam suas próprias UT (Montgomery & Van Rooij, 2010). Alguns miRNAs são gerados a partir de UT que não são codificantes, outros são gerados de UT (Olena & Patton, 2009). Dos não codificantes, aproximadamente 50-80% dos *loci* de miRNAs estão localizados em regiões intrônicas, não codificantes, enquanto aproximadamente 10% são encontrados em região exônica não codificantes (Kim & Kim, 2007; Mukherji, Ebert et al., 2011). Alguns miRNAs

podem ser classificados como intrônicos ou exônicos dependendo dos padrões de *splicing* alternativo que seus genes hóspedes são submetidos (Vasudevan, Tong et al., 2007).

Figura 3: Localizações genômicas dos miRNAs conhecidos. UT: Unidades e Transcrição. (Adaptado de Kim, Han & Siomi, 2009)

Normalmente, os miRNAs intrônicos são expressos de forma coordenada com o mRNA do gene no qual reside, formando um único transcrito primário (Montgomery & Van Rooij, 2010). Relata-se também a existência de transcritos primários codificadores apenas para miRNAs, que são similares aos mRNA, com cap 5' m7G e cauda poli(A) na extremidade 3', provavelmente também transcritos pela RNA polimerase II (RNAPII). Os precursores de miRNAs podem ser expressos em *clusters*, constituindo verdadeiros RNAs policistrônicos, o que ocorre com 37% dos miRNAs humanos, estes apresentam padrões de expressão semelhantes entre si (He & Hannon, 2004; Kim, 2005, Dee & Getts, 2011; Olena & Patton, 2009). A existência desses *clusters* de 2 - 6 precursores de miRNAs sugere que a expressão de alguns tipos de miRNAs pode ocorrer de forma coordenada, provavelmente através de um único promotor. Ainda, é possível que alguns miRNAs possuam suas próprias UT pois possuem locais de codificação próximos do aparato de outros miRNAs (Olena & Patton, 2009; Kim, 2005). Os miRNAs intrônicos

também podem ou não se expressar juntamente com seu genes hóspedes. Um estudo envolvendo o escaneamento de regiões regulatórias e promotoras preditas para miRNAs, tanto relacionadas a RNAPII quanto à Polimerase III (RNAPIII) mostrou que a clonagem dessas regiões promotoras junto ao precursor de diversos miRNAs intrônicos, em plasmídeos sem promotores, era capaz de aumentar a expressão do miRNA clonado comparado aos seus controles, o que mostra evidência que estes miRNAs podem ser transcritos independentemente de seus genes hóspedes (Monteys, Spengler et al, 2010).

4.9.3. Biogênese dos microRNAs (Via canônica)

A maioria dos miRNAs são transcritos pela RNAPII, que geram um transcrito primário chamado pri-miRNA (Czech & Hannon, 2011). Esses miRNAs primários, foram transcritos como se fossem um gene codificador de proteínas, por isso apresentam a estrutura cap 5'e a cauda de poli (A) (Williams, Liu et al. 2009). A produção do miRNA maduro, é precedida de eventos de clivagens realizados por complexos enzimáticos (He & Hannon 2004).

O processo de formação dos miRNAs tem início a partir do produto primário da transcrição do gene de miRNA que é denominado pri-miRNA, o qual apresenta uma estrutura de dupla hélice do tipo “*hairpin*” (~300 nucleotídeos) e é processado no núcleo por uma ribonuclease do tipo III denominada Drosha, e seu cofator DGCR8 (“*DiGeorge syndrome critical region gene 8*”). A molécula resultante do processamento da Drosha é denominada de precursor do miRNA (pré-miRNA), o qual é exportado do núcleo para o citoplasma pela exportina 5, uma proteína de exportação nuclear dependente de Ran-GTP como cofator. No citoplasma, o pré-miRNA sofre a ação de outra ribonuclease do tipo III denominada Dicer e dá origem a um pequeno e imperfeito duplex dupla fita de RNA que contém tanto a fita de miRNA maduro quanto sua fita *anti-sense* (Kingwell, 2011; Olena

e Patton, 2009 ; Kim, 2005).

O produto da Dicer é incorporado por um complexo multimérico denominado RISC (*RNA-induced silence complex*), o qual contém proteínas da família Argonauta como principais componentes de atuação na catálise a qual realiza (Czech and Hannon 2011). Apenas uma das fitas do duplex de miRNA permanece no complexo RISC para controlar a expressão pós-transcricional de genes alvos. Geralmente a parte do duplex com menor estabilidade, será selecionada para ser elemento do complexo (miRISC) (Khvorova, Reynolds et al. 2003; Schwarz, Hutvagner et al. 2003; Vasques, Schoofand & Botelho, 2012).

A quantidade expressa do miRNA pode ser controlada na transcrição do pri-miRNA, nos passos da biogênese, e também no *turnover* do miRNA maduro (Schwarz , Grande et al., 2008).

4.9.4. Mecanismo de ação dos miRNAs

A expressão endógena dos genes pode ser regulada de duas formas pelos miRNAs maduros. A primeira é pela clivagem ou degradação total do miRNA com o seu mRNA induzida pelo pareamento perfeito dos nucleotídeos do miRNA com seu mRNA alvo, regulação que é mais comum em plantas (Rhoades, Reinhart et al. 2002).

A segunda forma de regulação, mais comum em animais, ocorre por intermédio de repressão da tradução, por complementariedade parcial (Doench & Sharp, 2004). Nesse tipo de regulação há apenas total complementariedade com o mRNA alvo de uma região do miRNA que abrange do segundo ao oitavo nucleotídeos. Essa sequência é denominada como região *seed*, ou semente, e é responsável pela especificidade do miRNA (Lewis, Burge et al. 2005; Vasques, Schoofand & Botelho, 2012). Os animais possuem regiões de complementariedade ao *seed*, muito frequentemente em regiões 3' UTR dos seus mRNA alvos sendo essa região do mRNA preferencial para o acoplamento

dos miRNAs e a efetivação do seu mecanismo de ação de regulação negativa (Lau et al. 2001; Vasques, Schoofand & Botelho, 2012). O miRNA maduro de fita simples, incorporado ao complexo protéico RISC, direciona o miRNA para a região de complementaridade na região 3'-UTR do mRNA alvo, para efetuar a regulação negativa da expressão de genes por repressão traducional (Schwarz, Grande et al., 2008)(Figura3).

Figura 4. Biogênese dos miRNAs e seu mecanismo de ação. (adaptado de He & Hannon, 2004).

4.9.5. MiRNAs e HC

Estima-se que os miRNAs regulam pelo menos 30% dos genes em uma célula,

não sendo surpreendente se estiveram envolvidos em todas as principais funções celulares. Essas pequenas moléculas estão envolvidas também em programas genéticos na biologia cardiovascular, e têm se mostrado como moléculas críticas para o desenvolvimento cardíaco, função endotelial, metabolismo lipídico, HC ventricular e arritmias pós- infarto do miocárdio (Kingwell, 2011; Montgomery & Van Rooij, 2011; Van Rooij e Olson, 2007).

O miRNA-133 possui um papel crítico na determinação da HC de CMO. Observou-se diminuição da expressão deste miRNA e do miRNA-1, que pertencem à mesma UT, em modelos animais e humanos. Com a superexpressão *in vitro* de miRNA-133 ou miRNA-1 teve-se inibida a HC. Por outro lado, com a supressão do miRNA-133 obteve-se a HC mais pronunciada do que após a estimulação com indutores convencionais de HC. Na inibição *in vivo* de miRNA-133 por uma única infusão do antagomir houve marcante e persistente HC. O MiRNA-1 e o MiRNA-133 foram inibidos em dois modelos de HC fisiológica, tanto por TF intervalado em ratos, quanto em camundongos transgênicos que com super-expressão de Akt. Embora isso tenha ocorrido em modelos fisiológicos, o mesmo resultado foi encontrado em outro modelo patológico de sobrecarga pressórica e em pacientes com insuficiência cardíaca. Os resultados demonstram que os miRNA-133 são reguladores chave da HC participando de um programa gênico global regulando a HC, já que em HC induzida pelo TF intervalado em esteira e em animais com superexpressão de Akt também apresentou expressão diminuída (Carè, Catalucci et al., 2007).

Algumas questões tem sido levantadas a respeito da participação dos miRNAs no coração e nos processos de HC. Em um estudo de revisão sistemática, Divakaran & Mann (2008) analisaram o perfil de expressão de 71 miRNAs cardíacos, de um total de 10 diferentes estudos, 5 de corações humanos, 4 de ratos e 1 estudo em cardiomiócito

isolado. Houve aumento na expressão de 25 miRNAs (7b, 7c, 10b, 15b, 21, 23a, 23b, 24, 27a, 27b, 29a, 103, 125B, 140*, 195, 199A, 199A*, 199B, 208, 210, 211, 214, 330, 341, 424), em uma ou mais amostras dos estudos analisados, o que reforça a idéia de que mudanças nos padrões de expressão de miRNA em modelos experimentais e em humanos podem fornecer uma visão para a nossa compreensão da regulação gênica, responsável pela função cardíaca em situações fisiológicas e patológicas (Kawashima & Shioi, 2011; Anghel & Pogwizd, 2007; Barringhaus & Zamore, 2009) e ainda esclarecer sobre aspectos que a diferenciam.

Evidências mostram que alterações na expressão de miRNAs no coração está diretamente ligada ao remodelamento cardíaco. Vários estudos tem demonstrado um padrão de “assinatura” de miRNAs que são superexpressos ou apresentam expressão diminuída no remodelamento cardíaco hipertrófico patológico, em humanos e em animais experimentais (van Rooij, Sutherland et al, 2006; Callis, Pandya et al., 2009; Wang, Zhou et al, 2009). O miR-1, miR-29, miR-30, miR133 e miR-150 apresentam, freqüentemente, expressão diminuída, enquanto o miR-21, miR-23a, miR-125, miR-195, miR-199 e miR-214 são superexpressos na HC patológica (Wang, Zhou et al, 2009).

Van Rooij, Sutherland et al. (2006), mostraram em um modelo de HC patológica através de constrição transversa da aorta, houve um aumento na expressão de um grupo específico de miRNAs na HC. Observações *in vitro* mostraram que o miR-23a, miR-23b, miR-24, miR-195, miR-199a e miR-214 são suficientes para induzir a HC em CMO. Em contraste, o miR-150 e miRNA-181b, que se mostraram diminuídos no modelo de HC, quando aumentados *in vitro* resultou na diminuição do tamanho dos CMO.

Outro fato importante foi observado com o miRNA-208a. Esse miRNA em é codificado no intron 27 do gene da miosina de cadeia pesada do tipo alfa (α -MHC) e foi demonstrada relação com a regulação da expressão de β -MHC. A deleção do íntron onde

o miRNA-208a está localizado, em camundongos, mostrou que este miRNA atua indiretamente na inibição da expressão β -MHC, exercendo papel fundamental na manutenção da função cardíaca (Van Rooij, Sutherland et al., 2007; Van Rooij & Olson, 2007). Recentemente a superexpressão cardíaca do miRNA-208a mostrou causar HC patológica, com aumento de espessura de paredes, prejuízo de função cardíaca e aumento na expressão de β -MHC em camundongos e pacientes com insuficiência cardíaca terminal (Callis, Pandya et al., 2009).

Assim, miRNAs localizados em genes de proteínas sarcoméricas, como miRNA-208a, miR-208b e miR-499, hospedados nos genes da α -MHC, β -MHC e MHC-7b, respectivamente, podem ser importantes alvos de estudo na HC induzida pelo TF.

Ao contrário, muitos estudos recentes tem identificado o perfil de expressão de miRNAs associados com a HC patológica. Estes estudos têm revelado funções surpreendentes funções destes miRNAs em diferentes funções cardíacas, incluindo o controle da HC dos CMO, contratilidade, fibrose e angiogênese, e o consequente vislumbre de um novo mecanismo regulatório e também de um potencial terapêutico para doenças cardíacas.

Além dos miRNAs musculares, assim considerados por sua importância e expressão em tecidos musculares (miRNA – 1, 133a e 133b, 208a, 208b, 206), outros tem sido considerados como tendo expressiva participação no processo de remodelamento cardíaco, como a família dos miRNAs-29, que regulam a expressão de Colágeno do tipo I e III, os mais abundantes no coração, a partir dos fibroblastos cardíacos, além de proteínas de matriz extracelular como Fibrilina e Elastina, tendo importante participação na regulação da fibrose, um importante determinante estrutural que diferencia a HC fisiológica da patológica (Van Rooij, Thatcher et al., 2008).

Os resultados da literatura levam à reflexão de que, embora existam miRNAs

que apresentem mudança de expressão similar na HC fisiológica e patológica, é possível que existam outros, com mudança de expressão antagônica à da HC patológica, realizando uma regulação fina de mRNA alvos determinantes na indução de um fenótipo hipertrófico fisiológico, ou seja com manutenção ou melhora da função, como o induzido pelo TF aeróbico.

Os genes alvos destes miRNAs, que reconhecidamente possuem um papel determinante na diferenciação molecular entre a HC fisiológica e patológica, são candidatos passíveis de investigação e de questionamento se sua expressão é regulada pelos miRNAs de forma diversa na HC induzida pelo TF aeróbico em comparação à regulação na HC patológica, o que abre e reforça a possibilidade de considerar seus respectivos miRNAs regulatórios como alvos terapêuticos promissores para futuro desenvolvimento de abordagens na reversão e interrupção da progressão de doenças cardiovasculares para a insuficiência cardíaca.

Embora existam estudos relacionando os miRNAs à HC em eventos cardiovasculares fisiológicos e patológicos, a influência do TF como indutor de modificações na expressão de miRNAs, além do perfil de expressão de miRNAs no processo de HC e seu potencial como terapia gênica em doenças cardiovasculares, estão longe de ser elucidados, consistindo este em um campo de estudo transcriptômico ainda incipiente e altamente promissor no sentido terapêutico. Neste sentido, a utilização das técnicas de biologia molecular associada à utilização de modelos experimentais permite que aspectos fundamentais da regulação dos diversos e intrincados mecanismos envolvidos na HC fisiológica e patológica sejam elucidados, dentre eles, os passos de regulação gênica, com a perspectiva de interromper ou reverter a HC patológica, interferindo na sua progressão para insuficiência cardíaca (Carreño, Apablaza et al., 2006).

Neste estudo, delimitamos e delineamos um mecanismo de regulação dos miRNAs e seu envolvimento na diferença fenotípica entre animais saudáveis treinados e com prejuízo de função, e posteriormente testamos o potencial terapêutico dessas moléculas com objetivo de investigar sua capacidade a reversão de um ou mais componentes da HC induzida em doenças, neste caso a HA em animais SHR.

4.10. Transferência gênica por vetores virais

Com o avanço contínuo das técnicas de biotecnologia para varredura e de biologia molecular para modulação e transferência de genes, a manipulação genética do músculo cardíaco tanto *in vivo* como *in vitro*, ganhou grande projeção como instrumentação experimental e terapêutica, no sentido de resolver questões de ciência básica e investigar mecanismos de patogênese e etiologias de doenças multifatoriais, como a HA. Em doenças como estas, o desafio consiste em definir se um defeito funcional é uma adaptação ou se é uma manifestação direta de um determinado gene, ou se é o efeito de diversos mecanismos e de diversos desfechos juntos (Davis, Westfall et al, 2008).

As modulações gênicas são efetivadas por intermédio de vetores de transferência, que em células e organismos, constituem instrumentos úteis para ampliar o conhecimento sobre estes desafios da ciência básica. Esses vetores podem ser virais, ou não virais, como os lipossomos e as nanopartículas (Das, Bedja et. al., 2014; Eloy, Claro de Souza et al, 2014).

Os vetores virais podem ser de três tipos principais: vetores de retrovírus, de adenovírus e de adenovírus associado. Estes formam um conjunto de vírus geneticamente modificados, de modo a reduzir a sua patogenicidade, sem anular totalmente o seu poder de infecção. Com as técnicas da engenharia genética é possível

somar ao material genético do vírus a sequência que se deseja modular (subclonagem) e o vírus infectando a célula produtora, criará uma unidade de replicação capaz de produzir cópias do gene de interesse dentro do organismo, tecido ou célula a qual se deseja estudar o mecanismo em questão (Davis, Westfall et al., 2008).

Os Adenovírus são membros da classe *Adenoviridae de vírus*, composta de vírus formados por DNA dupla fita com 36 kb e encapsado com repetições terminais invertidas (ITR's) que funcionam como origens de replicação do genoma viral. Esses vetores tem uma ampla variedade de sorotipos, com tropismo por diferentes organismos e tecidos. Há mais de 50 diferentes sorotipos sendo que alguns causam doenças em humanos como conjuntivite e resfriados (Chroboczek, Bieber & Jacrot, 1992). Os adenovírus não são capazes de integrar o seu DNA ao cromossomo do hospedeiro e podem transportar genes de grandes dimensões, mas a expressão deles é transitória e de curta duração, não ultrapassando 18 meses. Os vetores de adenovírus possuem uma boa capacidade de infecção no coração, com relatos de transdução da ordem de 60-70% por injeção direta no miocárdio e a transdução de culturas celulares também é bastante eficiente. Porém, sua injeção intravascular resulta em pobre transdução e necessidade de grandes doses, o que vem a ser tóxico particularmente aos hepatócitos e elicitarem uma forte resposta imune (Blankinship Gregorevic & Chamberlain, 2006; Joss, Yang et al. 1998)

Os adenovírus associados (AAV) integram o seu DNA ao cromossomo da célula hospedeira (Blankinship Gregorevic & Chamberlain, 2006). AAV é membro da família *Parvoviridae*, nos quais as proteínas Rep são cruciais para sua replicação, integração e empacotamento. Como os Adenovirus, eles também tem uma quantidade grande de sorotipos, dos quais o sorotipo 8, 6, e 9 tem grande tropismo pelo coração. Os vetores de AAV são formados de DNA de fita única e com tamanho pequeno (4,5 kb).

AAV são relativamente seguros terapeuticamente, e podem permanecer em tecidos musculares por muitos anos, não elicitam respostas imunológicas potentes, porém como as proteínas Rep são deletadas no vetor sua taxa de integração é menor que nos vírus selvagens. Outra desvantagem é sua capacidade limitada de clonagem, já que o inserto de interesse, junto com o *open reading frame* e a sequência regulatória transcricional não podem exceder 4,5 kb, o que permite 300 bp para as duas regiões ITR, importantes para o empacotamento a estabilidade e a replicação do vetor. AAV recombinantes tipicamente apresentam uma baixa taxa de integração e aparentemente favorecem a integração na cromatina aberta e transcricionalmente ativa (Hacein-Bey-Abina, von Kalle et al. 2003; Nakai, Montini et al. 2003; Nakai Montini et al. 2003, Nakai, Xu et al, 2005). Porém, até mesmo na ausência de integração, a expressão do cassete de interesse pode permanecer em músculos, como o coração, por alguns anos (Arruda, Schuettrumpf et al. 2004).

Os vetores de retrovírus são derivados modificados de uma grande quantidade de retrovírus selvagens. Existem 7 gêneros dentro da família *Retroviridae*: Alfarretrovirus (Vírus de sarcoma e leucemia de aves ou AVL) Betarretrovirus (Vírus de tumor mamário de murina), Gammarretrovirus (MLV, Vírus relacionado com leucemia de murina), Deltarretrovirus = (Vírus de leucemia T humano e bovino - HTLV-I/II), BLV), Epsilonretrovirus (vírus de sarcoma da derme) Lentivirus (Vírus da imunodeficiência Humana (HIV I e II) Espumavírus (HFV). Dentre esses, MLV e lentivírus são os mais utilizados (Negroni & Buc, 2001).

Os retrovírus também possuem a habilidade de integrar o seu material genético dentro dos cromossomos da célula infectada. Assim, a sequência de interesse será inserida no genoma das células hospedeiras e, podem assim ser transmitidos a todas as células-filhas das infectadas, permanecendo por um longo período de tempo. Estes

vírus armazenam a informação genética na forma de RNA de fita única que é reversamente transcrito em DNA fita dupla (pró-vírus) uma vez que o vírus adentra a célula hospedeira (Negroni & Buc, 2001)

Este tipo de vírus infecta células em proliferação, com exceção dos vetores lentivirais, que permitem também transferir eficientemente material genético para células que não proliferam (cardiomiócitos, neurônios e hepatócitos) ou para células refratárias para o retrovírus (como as células retiradas da medula óssea). Os vetores lentivirais tem potencial de uma integração eficiente e de longa duração através de um único evento de transdução, com uma toxicidade média ou baixa, quando comparado aos adenovírus e uma boa capacidade de produção (De Palma, Montini et al., 2005, Laufs, Gentner et al. 2005).

Os lentivírus são eficientes em estudos no coração. Em um estudo os autores mostraram que os vetores lentivirais apresentavam eficiência de transdução maiores em células tronco cardíacas do que todos os nove sorotipos de AAV. Para isso o promotor de NCX (Trocador Sódio Cálcio), um gene com altíssima especificidade cardíaca para dirigir a síntese de GFP de diferentes vetores em 7 tipos de células, os vetores, e a intensidade dos vetores foi medida por citômetro de fluxo. Os autores mostraram que os vetores lentivirais ancorando o promotor de NCX era um biosensor altamente acurado de moléculas cardiogênicas em células tronco cardíacas, promovendo assim relatos de desfechos celulares com importantes implicações para estudos de drogas e terapias (Barth, Kizana et al. 2008). Em um outro estudo 3 fitas individuais de *short hairpin* de p38 MAPK foram integradas por vetores lentivirais no genoma de ratos normotensos para investigar o papel da vias das MAPK na apoptose cardíaca mediada por Aldosterona e de cultura de CMO. Embora apenas um deles tenha sido eficiente em diminuir a apoptose e a expressão de p38 MAPK, os autores mostraram evidência, por

intermédio dos vetores lentivirais que aldosterona induz apoptose diretamente pela via das MAPK, e que o silenciamento de p38 é protetor ao coração (Zhou, Liang et al. 2013).

Um terceiro estudo empregando vetores lentivirais que inibia o miRNA-377 no coração mostrou que quatro semanas de implantação dos vetores em corações infartados a densidade dos vasos aumentou, a fibrose diminuiu e isso foi acompanhado por uma melhora de função comparada ao controle. A superexpressão do miRNA-377 teve efeito contrário, o que sugere o miRNA-377 como um alvo terapêutico para o tratamento do coração isquêmico (Wen, Huang et al, 2014).

Assim, as modulações gênicas, incluindo as de miRNAs efetivadas por vetores virais na ciência experimental são instrumentos capazes de ampliar a perspectiva para elucidação de mecanismos, abrindo perspectiva para abordagens terapêuticas nas doenças cardiovasculares e processos a elas relacionados, como a HC.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Desenho experimental

Figura 5: Desenho experimental do estudo.

5.2. Animais experimentais

5.2.1. HC induzida pelo treinamento físico

Foram estudadas 42 ratas Wistar divididas em 2 grupos para diferentes análises: Grupo 1) análises das variáveis hemodinâmicas, morfológicas e funcionais; Grupo 2) análise do consumo de oxigênio e expressão gênica e molecular. As ratas foram fornecidas pelo biotério central da USP e pesavam inicialmente 180 a 200 g e foram mantidas em gaiolas com temperatura ambiente entre 22 e 24° C com luz controlada e ciclos invertidos de 12 horas (claro-escuro). Os animais foram pesados semanalmente, receberam água e comida *ad libitum* tendo sido divididos aleatoriamente em 3 grupos experimentais: um sedentário (S) e dois treinados (Protocolo 1 e Protocolo 2, descritos a seguir). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da USP sob número de protocolo 044/10. Deste lote de animais, foram utilizados 7 animais para a análise dos efeitos de treinamento e um pool de três corações para análise de miRNAarray no coração, com o objetivo de identificar quais os miRNAs cardíacos apresentavam expressão modificada na HC fisiológica induzida pelo TF de natação. O gênero feminino foi escolhido já que a HC fisiológica em resposta ao treinamento em fêmeas é exacerbada comparada aos machos (Foryst-Ludwig, Kreissl et al. 2011).

Figura 6: Sistema de natação para ratos.

5.2.2. Estudo em animais SHR jovens

Foram utilizados nessa fase do estudo, 18 animais SHR com 3 meses de idade e peso de 205 a 262 g mantidos no mesmo biotério e sob as mesmas condições que os animais do ítem anterior. Este lote de animais foi utilizado com objetivo de ver o efeito da superexpressão cardíaca do miRNA-29c (escolhido pelo miRNAarray realizado nos animais normotensos treinados). Os animais foram pesados semanalmente durante o protocolo e divididos em 8 grupos experimentais: Tratados 7 dias baixa dose (SHR7B, n=3), Tratados 7 dias alta dose (SHR7A, n=3), Tratados 14 dias baixa dose (SHR14B, n=3), Tratados 14 dias alta dose (SHR14A, n=3), Controle sem inserto 7/14 dias (CSI, n=3 por grupo) ou Controle soro 7/14 dias (COS)(n=2). Os animais tratados receberam por injeção apical no VE, partículas virais do lentivírus pLV-miRNA-29c #miR-p050 (Biossettia – San Diego - US) subclonado com a sequência do pré-miRNA29c, o grupo CSI recebeu o mesmo número de partículas virais do lentivírus pLV-controle, ou seja sem a sequência do pré-miRNA, os animais COS receberam o mesmo volume de injeção com soro. Para o grupo de baixa dose foram injetados 200 uL de meio contendo 6×10^8 partículas virais e para o grupo de alta dose também foram injetados 200 uL de meio contendo 3×10^9 partículas virais.

5.2.3. Modulação do miRNA-29c em animais SHR com hipertensão arterial estabelecida.

Para o estudo do miRNA escolhido foram utilizados 16 ratos SHR com idade de 1 ano e 6 meses e peso entre 307 e 389 g. Os animais foram pesados semanalmente e foram divididos em 2 grupos: Tratados com miRNA-29c (SHR29c, n=10) e Controle (SHRctrl, n=6). Os animais tratados receberam as partículas virais do lentivírus pLV-miRNA-29c #miR-p050 (Biossettia – San Diego - US) clonado com a sequência do pré-miRNA29c e os animais controle receberam o mesmo número de partículas virais do lentivírus pLV-control, porém sem a sequência do pré-miRNA. Para ambos os grupos foram utilizadas 6×10^8 partículas virais diluídas em 100 µl de meio.

5.3. Protocolos de treinamento

O treinamento físico foi realizado em um sistema de natação para ratos em água aquecida de 30 a 32° C (Figura 6). Os protocolos utilizados foram caracterizados como sendo de moderada intensidade e longa duração, sendo efetivo na promoção de adaptações cardiovasculares e no aumento da capacidade oxidativa muscular. Os protocolos utilizados foram de acordo com estudos prévios e já publicados do grupo (Oliveira, Sasaki et al., 2009, Medeiros, Oliveira et al., 2004; Soci, Fernandes et al. 2011, Hashimoto, Fernandes et al, 2011; Da Silva Jr, Fernandes et al., 2012; Fernandes, Magalhães et al., 2012). As ratas foram identificadas e pesadas semanalmente, para a correção da sobrecarga de TF em função do aumento do peso corporal.

Figura 7: Visão esquemática dos protocolos de treinamento físico.

O protocolo 1 (P1) consistiu em sessões de natação com duração de 60 minutos, realizadas uma vez ao dia durante o período de 10 semanas. O protocolo 2 (P2) consistiu no mesmo treinamento que P1 até a oitava semana, sendo o volume de treinamento foi aumentado a partir deste momento: na 9ª semana as ratas treinaram duas vezes ao dia e na 10ª semana três vezes ao dia. (Figura 7). A meta do aumento do volume de treinamento no P2 foi induzir HC de maior magnitude e mimetizar um alto desempenho aeróbio compatível com o de atletas de elite, caracterizados previamente em diversos estudos realizados por nosso grupo de estudo (Oliveira, Sasaki et al, 2009, Medeiros, Oliveira et al., 2004; Soci, Fernandes et al. 2011, Hashimoto, Fernandes et al, 2011; Da Silva Jr, Fernandes et al., 2012; Fernandes, Magalhães et al., 2012).

5.4. Protocolos para infecção do miRNA *in vivo*

5.4.1. Tratamento *in vivo*

Foram realizados dois experimentos pilotos de infecção das partípartículas lentivirais para padronizar os métodos. Esses experimentos

consistiram na injeção de partículas lentivirais para superexpressão do miRNA 29c.

5.4.2. Preparação do Vetor Viral para Transfecção

Para a modulação do miRNA de escolha foi utilizado um plasmídeo (pLV-miR-29c) clonado com a a sequência do pré-miRNA29c (Biossettia Inc, San Diego, CA).

5.4.3. Produção do vetor lentiviral do miRNA-29c

A produção das partículas virais foram utilizadas células HEK293T. Foram plaqueadas $4,5 \times 10^6$ células por placa (P100, 100 mm de diâmetro) previamente gelatinizadas com gelatina a 1% para melhor aderência das células. As células plaqueadas foram incubadas por 24h a 37° C e 5% de CO₂. Após as 24 horas, o meio das células foi trocado para DMEM-H, sem soro e antibiótico. Para a produção das partículas virais, células HEK293T foram transfectadas com o plasmídeo de interesse (pLV-miRNA 29c ou pLV-controle) mais os plasmídeos acessórios HGM, HSVG, REV e TAT gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Gustavo Mosloslavsky da Universidade de Boston, seguindo o protocolo do reagente lipofectamina 2000 (Invitrogen, CA, EUA). Em resumo, em um tubo foram adicionados 655 µL de meio Opti-Mem (Gibco, Invitrogen, CA, USA) mais 300 ng de cada plasmídeo acessório (TAT, REV, HSVG e HGM) e 4 µg do plasmídeo controle ou do plasmídeo de expressão do pré-miRNA-29c. Em outro tubo foram adicionados 655 µL de meio Opti-Mem mais 275 µL lipofectamina 2000 (Invitrogen CA, USA). TAT e REV são plasmídeos com genes reguladores da expressão de proteínas virais (REV) e que aumentam a eficiência da transcrição viral (TAT). HSVG é um plasmídeo que expressa o gene que regula a integração e envelopamento e do vetor ao DNA hospedeiro, e HGM é o plasmídeo com o gene de uma citosina que induz a diferenciação e o recrutamento de antígenos específicos relacionados à célula aumentando a compatibilidade do plasmídeo à célula

em cultura (Cai & Mikkelsen, 2014, Kohn & Hollis, 2014, Liechman & Tigelaar, 2000).

Esse tubo foi incubado em temperatura ambiente por 5 minutos. O segundo tubo foi suavemente pipetado ao primeiro tubo e a solução foi incubada novamente em temperatura ambiente por 20 minutos. Após a incubação, foi adicionado o volume total do tubo em cada placa P100 de células HEK293T.

Após 8 horas, o meio foi trocado para o meio completo (DMEM-H, 10% FBS e 1 % de penicilina). Após 72 horas, uma amostra de 1 mL de sobrenadante das células foi retirado para ser submetido à titulação. O restante do sobrenadante contendo as partículas virais produzidas pelas células HEK293T foi submetido à ultracentrifugação com velocidade de 20.000 g durante 90 minutos (Sorvall – Ultra PRO- 80) e os pellets foram ressuspensos e concentrados 1000 x em meio DMEM.

Para o experimento foram produzidas 40 placas P100 (100mm de diâmetro) do vetor lentiviral de expressão do miRNA-29c para os animais tratados e também 20 placas do vetor lentiviral controle (CSI), que continha o vetor lentiviral adicionado do plasmídeo sem o inserto do pré-miRNA-29c, totalizando 60 placas.

5.4.4. Protocolo de Titulação das partículas virais:

Para a titulação das partículas virais produzidas, 1 ml de sobrenadante das células foi retirado e o título obtido por intermédio do kit de titulação QuickTiter™Lentivirus Titer Kit (VPK-107, San Diego, CA). A titulação obtida foi de $2,0 \times 10^8$ partículas virais/mL de sobrenadante para o plasmídeo Controle e $2,25 \times 10^8$ partículas virais/mL para o plasmídeo contendo o inserto do pré-miR-29c.

5.4.5. Cirurgias para injeção das partículas lentivirais no coração dos animais:

Os ratos foram anestesiados com uma mistura de ketamina/xilazina (50 mg/kg de ketamina, 10 mg/kg de xilazina) intraperitoneal. Em seguida, os ratos foram entubados para ventilação mecânica e foi realizada toracotomia esquerda, entre a terceira e quarta costela dos animais. O VE foi exposto e foi realizada a infusão intramuscular, por intermédio de injeção com a entrada do biséu paralela ao pericárdio (observada por transparência) uma injeção no VE, contendo as partículas virais em 200µL de meio de cultura. Duas diferentes quantidades de partículas virais foram testadas: Alta dose = $3,0 \times 10^9$ partículas virais, e Baixa dose = $6,0 \times 10^8$ partículas virais.

5.5. Marcadores de Treinamento

5.5.1. Medidas Hemodinâmicas - Frequência Cardíaca e Pressão Arterial de Repouso

Para os grupos S, P1 e P2, a frequência cardíaca de repouso e a pressão arterial da repouso foram medidas de forma direta com o animal acordado. Os animais foram anestesiados (50 mg/kg de ketamina, 10 mg/kg de xilazina) e canulados (cânula PE-50) na artéria carótida. As cânulas foram heparinizadas e preenchidas com soro fisiológico e a extremidade externa foi ocluída. Os cateteres foram direcionados subcutaneamente, por meio de um trocáter, e exteriorizados no dorso do animal para facilitar o manuseio e a medida. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais nas 24 horas em que antecederam o experimento. Para a medida, a cânula foi conectada a um tubo de polietileno (PE-100) e este a um transdutor eletromagnético (P23 Db - Gould Statham)

que por sua vez estava conectado em um amplificador (General Purpose Amplifier Stemtech). O sinal analógico da pressão arterial foi então convertido para digital (Stemtech, Inc.) e registrado em tempo real em um microcomputador com sistema CODAS, que foi analisado com sistema compatível com Windows com uma frequência de amostragem de 100 Hz por canal, com o qual se obteve, batimento-a-batimento valores de Pressão Sistólica (PS), Pressão Diastólica (PD) e pressão média (PAM).

A PA foi avaliada antes e após o tratamento dos animais SHR com as patículas virais para expressão do miRNA-29c ou controle pelo método de pletismografia de cauda para ratos (KENT SCIENTIFIC RTPB1001, Litchfield, USA) em todos os grupos de animais. Este método permite a avaliação de PA e FC ao longo de todo o protocolo. Os animais estavam acordados, em repouso e seus movimentos eram restringidos por um aparato de acrílico, onde eles permaneciam para as medidas serem realizadas. Para evitar erros e garantir uma boa mensuração os animais foram ambientados no sistema no período de uma semana anterior ao da medida. O equipamento consiste em um manguito de borracha que é adaptado na região proximal da cauda, que está ligado ao pletismógrafo para insuflar e desinsuflar gradualmente o manguito até 250 mmHg. Em uma região mais distal da cauda é acoplado um transdutor de pulso, pelo qual é detectado o sinal de PA e FC e então feita a aquisição dos sinais.

5.5.2. Avaliação do Consumo de Oxigênio

Na última semana de TF os animais foram adaptados à corrida progressiva na esteira e submetidos a um teste progressivo de esforço máximo em esteira rolante adaptado de Brooks e White (1978), com incremento de carga de 3m/min a cada 3 min, até a exaustão, para a obtenção do VO₂max.

O consumo de oxigênio pico foi mensurado por determinação da fração expirada

de oxigênio (FeO_2) durante o teste de exercício progressivo, até exaustão.

Neste protocolo os ratos foram colocados numa caixa metabólica sobre a esteira rolante, que serviu como câmara de mistura dos gases expirados. Esta câmara é conectada a um tubo na forma de “T”, para a retirada de amostras de ar (1.000 ml/min) para avaliação da FeO_2 em um analisador de gases. A outra via do tubo em “T” é utilizada para a aspiração do ar em fluxo contínuo (2.500 ml/min), regulável por bomba aspiradora. A parte da frente da caixa metabólica possui uma abertura de 2 mm da superfície, que permite a entrada de ar ambiente unidirecional sugado pela bomba aspiradora. O fluxo de ar na caixa metabólica é de 3.500 ml/min.

O rato foi colocado dentro da caixa metabólica por um período de repouso de 30 minutos para o registro do estado basal e, em seguida, o teste foi iniciado com velocidade de 3 m/min. Durante cada estágio (3min) de exercício realizado, foram analisadas as FeO_2 dos gases contidos no ar da caixa metabólica. Foram consideradas as frações expiradas dos trinta últimos segundos de cada estágio para a determinação do $\text{VO}_{2\text{max}}$ de cada estágio.

Ao atingir a exaustão, o rato foi mantido na caixa metabólica por aproximadamente 3 min e as frações expiradas foram registradas para verificar a recuperação do animal e o funcionamento dos analisadores. O consumo de oxigênio foi calculado através da seguinte fórmula matemática:

Onde:

$$\text{VO}_2 = \text{ml.Kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$$

Fluxo de ar = 1000 ml/min (analisador) + 2500 ml/min (bomba de aspiração) = 3500 ml/min.

FiO₂ = fração de oxigênio inspirada (ar ambiente).

FeO₂ = fração de oxigênio expirada (caixa de mistura).

Peso corporal = Kg.

Para a análise dos dados foi utilizado o maior valor do VO₂.

5.6. Avaliação morfofuncional – Ecocardiografia

A avaliação da função e morfologia cardíaca foi realizada através de ecocardiografia. As medidas ecocardiográficas seguiram as recomendações do Comitê de Padronização do modo M da Sociedade Americana de Ecocardiografia (Sahn, De Maria et al., 1978), com acurácia e reprodutibilidade reconhecidas na estimativa do tamanho e da função do VE (Litwin, Katz et al., 1994).

O exame ecocardiográfico transtorácico foi realizado após o período de treinamento físico. O exame ecocardiográfico foi realizado com o animal anestesiado (ketamina 90mg/Kg e xilazina 10 mg/Kg intraperitonal). Foi utilizado o aparelho SEQUOIA 512 (ACUSON Corporation, Mountain View, CA), com transdutor de 15 MHz. As imagens foram obtidas com frequência de cerca de 10 MHz para a otimização da resolução e a penetração do animal. O registro foi realizado com utilização de gel de transmissão para ultrassom de viscosidade média/alta (General Imaging Gel, ATL, Reedsville, USA). As imagens foram armazenadas em fita de videocassete (Sony SVO-9500 MD), em discos ópticos (Sony 128Mb) e em papel fotográfico geradas por impressão colorida (Sony, Color Video Print Mavigraph UP-5600 MDU).

A partir da visualização do VE (corte transversal) ao nível dos músculos papilares foi realizado o modo M e foram obtidas as medidas das seguintes variáveis: diâmetro diastólico (DDiaVE) e sistólico (DSisVE) do VE, a espessura do septo interventricular na diástole (SIVEDia), a espessura do septo interventricular na sístole

(SIVESIs) e da parede posterior do VE em sístole (PPSis) e diástole (PPDia). A função sistólica foi determinada pela fração de encurtamento (FEn), fração de ejeção (FEj) e pela velocidade média de encurtamento das fibras circunferenciais do VE (VME), calculada pela seguinte fórmula matemática: $VME = \frac{DDiaVE - DSisVE}{DDiaVe - TE}$ – tempo de ejeção (TE). Já as imagens obtidas através do Doppler foram utilizadas para determinar a função diastólica, através do pico da velocidade da onda E (pico E) e do pico da velocidade a onda A (pico A), a relação E/A e o Tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV). A Função Global foi avaliada pelo cálculo do Índice de performance do miocárdio (IPM), calculado pela seguinte fórmula matemática: $IPM = TCI + TRIV / TE$ (TCI: tempo de contração isovolumétrica)

Além disso, foi calculada a massa do VE, segundo orientação da Sociedade Americana de Ecocardiografia, que estima a MVE através da seguinte fórmula matemática: $MVE = [(DDVE + SIV + PP)^3 - (DDVE)^3] \times 1,047$, onde 1,047 (mg/mm³), que corresponde à densidade do miocárdio.

5.7. Medidas Morfométricas – Hipertrofia Cardíaca

5.7.1. Peso do Coração e do VE corrigido pelo peso corporal – Razão Cor/PC - VE/PC

Ao final do protocolo experimental os animais foram decapitados e o coração foi removido da cavidade torácica, pesado e dissecado para a separação do VE (parede livre do VE e septo), ventrículo direito, e átrios (átrios direito e esquerdo). A HC foi avaliada através do peso úmido do Coração e do VE e os resultados estão expressos pela relação entre o peso do Coração ou do VE corrigido pelo peso corporal.

5.7.2. Diâmetro de Cardiomiócitos

A HC também foi avaliada pela análise do diâmetro dos cardiomiócitos. O VE foi fixado em 6% de formaldeído, embebido em parafina e foram realizados cortes histológicos de 5µm no nível do músculo papilar. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE). A imagem foi ampliada 400x e os miócitos com núcleos visíveis e membrana celular intacta foram escolhidos para análise. A análise foi realizada por microscópio óptico associado a um sistema de análise de imagens Quantimet Leica®, (Leica, UK). Cinco campos visuais foram analisados por animal.

5.7.3. Análise histológica da fração volumétrica de colágeno no coração

O VE foi dissecado e uma parte foi adicionada com Tissutek em cortiça e armazenada em Nitrogênio líquido. Foram realizadas secções de 5 µm, ao nível do músculo papilar. A fração volumétrica de colágeno foi mensurada pelo método de detecção da cor. As secções foram coradas com *Picrosírius red* e examinadas em microscópio ótico Leica acoplado ao programa de análise de imagem Quantimet 500 (Leica, Bannockburn, IL) usando aumento de 20x de magnitude dos 20 campos adquiridos para cada animal (de Figueiredo Borges, Jaldin et al, 2008).

5.8. Análises moleculares

5.8.1. Extração de RNA e síntese de cDNA

Todo procedimento foi realizado com a utilização de luvas, materiais e soluções autoclavados conforme descrito por Chomczynski & Sacchi (1987). Amostras de tecido

dos animais foram mantidos em freezer -80° C. Aproximadamente 50-100 µg de tecido foi homogeneizado em 1 mL de Trizol® Reagent (Invitrogen Life Technologies, USA) conforme a indicação do fabricante. A integridade da amostra foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídeo, durante 40min a 100V e avaliada pela intensidade das bandas do RNA ribossomal 28S e 18S. Na sequência, foi realizada a síntese de cDNA com 2µg de RNA total. As amostras foram incubadas por uma hora a 42° com 0,5µg/mL de oligo dT (12-18 pb) a 65°C por 5 min, para se obter o cDNA. A transcrição reversa das amostras foi realizada em um volume total de 20µL contendo 3U de RNAsin (PROMEGA, USA), 10mM de dNTPs, 0,1M de DTT, 1X tampão da enzima, e 2,5U de SuperScript Reverse Transcriptase II (Invitrogen Life Technologies, USA) pelo período de 1 hora a 42°C; subsequentemente a temperatura foi elevada a 95°C por 5 minutos e as amostras rapidamente colocadas em gelo. As reações de real-time PCR foram realizadas pelo sistema da detecção do produto específico amplificado, no equipamento ABI 7700 (Applied-Biosystems, USA) e com o composto fluorescente SYBR-Green I, conforme instruções do fabricante.

5.8.2. Quantificação de mRNA e microRNAs por PCR em tempo real

5.8.2.1. Genes relacionados com a HC

A expressão gênica relativa para α -MHC, β -MHC, α -actina esquelética, ANF e Colágenos do tipo I e III no VE foram analisadas por reação em cadeia de polimerase em tempo real (real-time PCR). Os *primers* foram desenhados usando o programa *Primer 3 software* (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi), sendo utilizados: α -MHC: sense: 5-CgA gTC CCA ggT CAA CAA g-3', antisense: 5'-Agg CTC TTT CTg CTg gAC C-3'; β -MHC: sense: 5'-CAT CCC CAA TgA gAC gAA g-3', antisense: 5'-Agg CTC TTT CTg CTg gAC A-3'; ANF: sense: 5'- CTT Cgg ggg

TAg gAT TgA C-3', antisense: 5'-CTT ggg ATC TTT TgC gAT CT-3'; α -actina esquelética: sense: 5'-ACC ACA ggC ATT gTT CTg gA-3', antisense: 5'-TAA ggT AgT CAg TgA ggT CC-3'; Ciclofilina: sense: 5'-AAT gCT ggA CCA AAC ACA AA - 3', antisense: 5'-CCT TCT TTC ACC TTC CCA AA -3'; COLIAI: sense: 5'-AGA GAG CAT GAC CGA TGGA-3', antisense: 5'-GAGGTTGCC AGT CTG TTG G-3'; COLIIIAI: sense: 5'-AAG GTC CAC GAGGTG ACA A-3' antisense 5'-AGG GCC TGGACT ACC AAC T-3'. A expressão relativa dos genes estudados foi normalizada pela expressão do gene da ciclofilina (Δ CT). A expressão gênica foi calculada usando as diferenças em valores de Δ CT entre as amostras ($\Delta\Delta$ CT) e a equação $2^{-\Delta\Delta ct}$.

5.8.2.2. MicroRNAs

O ensaio da análise da expressão gênica feito para confirmar os miRNAs identificados com expressão alterada no MiRNA Array, de acordo com o protocolo descrito por TaqMan MiRNA Assay from Applied Biosystems (# 4373142). As amostras foram normalizadas pela avaliação da expressão do gene *housekeeping* U6 (# 4373381).

Foram utilizados o Kit MirvanaT-QRT-PCR miRNA detection Kit e SuperTaq™ Plus Polymerase (Applied Biosystem, PE, Foster City, CA), bem como primers específicos para serem utilizados com esses kits (RT Primers e PCR Primers).

Para ensaios com TaqMan MiRNA Assay foi utilizado o kit TaqMan MiRNA *Reverse Transcriptase* da *Applied Biosystems*. Foram utilizados 1-10 ng de RNA em 1 μ l. Foi preparada uma RT master mix com dNTPs 100mM, transcriptase reversa multiscript 50U/ml, tampão 10x para a enzima, inibidores de RNase 20U/ml e água livre de nuclease para completar o volume de 15 μ l de reação. A reação de PCR foi realizada a 16°C por 30 min, 42°C por 30 min, 85°C por 5 min e após as amostras foram

mantidas a 4°C. Para a reação de Real Time-PCR o produto da reação de PCR foi diluído 1:15 e será realizada uma nova master mix com TaqMan miRNA Assay 20x, TaqMan 2x universal PCR master mix, No Amp Erase, UNG e água livre de nucleases para completar o volume de 20µl. A reação da transcriptase reversa foi realizada por 30 min a 16°C; 30 min a 42°C; 5 min a 85°C e na sequência as amostras foram mantidas a 4°C. As fluorescências foram lidas em detector ABI PRISM 7500 (*Applied Biosystems*). Essa reação é específica para ser lida a fluorescência nesta geração de equipamentos da *Applied Biosystems* (ABI PRISM 7000, 7500, 7900). Uma curva de dissociação foi gerada ao final da reação para verificar que um único produto foi amplificado. Cada amostra de VE foi analisada em triplicata. As quantidades relativas de expressão dos MiRNAs dos ratos S versus P1 e P2 foram comparadas depois da normalização com os valores de expressão de U6 (mudanças no *cycle threshold*, ΔCT). O *fold change* na expressão dos miRNAs foi calculado usando as diferenças nos valores de ΔCT entre duas amostras ($\Delta\Delta CT$) e a equação $2^{-\Delta\Delta CT}$. Dados estão expressos em valores percentuais comparados ao grupo S (controle).

5.8.3. MicroRNA microarray

Os MiRNAs do VE (grupos S, P1 e P2 e SHR e WKY) foram isolados pela utilização do kit de isolamentos de miRNAs mirVana™ qRT-PCR miRNA Isolation Kit (Ambion, Austin, TX) . Após a extração as amostras foram diluídas 1:100 com tampão TE e quantificadas usando o espectrofotômetro nanodrop 2000. (Thermo Fisher Scientific, USA). O RNA do coração de três animais em cada grupo foi misturado em 1 *pool* e utilizado para a análise da expressão de miRNAs (LC Science, Houston, TX) com a plataforma Agilent. Os arrays consistem em 15,000 caracteres incluindo probes de 349 miRNAs baseados na versão do Sanger miRBASE 13.0. A plataforma Agilent

para miRNA exigiu 100 ng de RNA total por reação realizada.

A qualidade das amostras de RNA foi confirmando usando o miRMAX microarray. Os resultados são expressos em valores percentuais, calculados pelos resultados como unidades arbitrárias (u.a.) e foram calculados destes valores usando a relação entre os grupos P1 e P2 e o grupo S (controle). Os dados de SHR comparados a WKY foram utilizados para observar o padrão de mudança de expressão inverso ao do induzido pelo TF aeróbio nos grupos treinados.

5.9. Análises Bioquímicas

5.9.1. Atividade de Citrato Sintase

A atividade da enzima Citrato Sintase foi determinada por espectrofotômetro e utilizada como um marcador da atividade oxidativa muscular esquelética em homogeneizados de Sólitos de acordo ao método previamente descrito por Srere (1968).

A atividade enzimática foi mensurada em homogeneizados do músculo de predominância de fibras vermelhas e a quantidade do complexo resultante de acetyl-CoA e oxaloacetato foi determinada no comprimento de onda de 412 nm e 25° C, com um intervalo de 10 minutos. A atividade da citrato sintase foi expressa em $\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína e foi mensurada nesses grupos para evidenciar a efetividade dos protocolos do treinamento de natação através de um parâmetro bioquímico.

5.9.2. Determinação da concentração de Colágeno pela quantificação de hidroxiprolina (OH prolina).

A quantidade total de colágeno no VE foi indiretamente quantificado pelo método modificado de concentração de hidroxiprolina (OH-prolina, como previamente

descrito por Bergman & Loxley, (1970) e Gunja-Smith, Lin et al. (1989).

Todas as amostras de tecido (aproximadamente 100 mg de peso úmido) foram excisadas da mesma área de parede do VE. Os tecidos sofreram hidrólise ácida em 1 mL de HCl 8 N na temperatura de 115°C por 18 h sob vácuo. As amostras hidrolisadas foram filtradas e secas a vácuo. Seguiu-se o processo de oxidação realizado com adição de 0,5 mL de Chloramina T, o conteúdo oxidado foi vortexado e deixado em descanso por 4 minutos. Após este tempo foi adicionado 3 ml de reagente de cor, denominado reagente de Erlich juntamente com 16 mL de isopropanol. Os tubos foram então vortexados por mais 4 minutos e após isso mantido a 60° por 21 minutos. A intensidade da coloração foi mensurada no comprimento de onda de 558 nm após uma hora a temperatura ambiente. O conteúdo de OH-prolina foi determinado de amostras em duplicata de 150 µl usando uma curva de calibração de 0.5–5 µg of OH-prolina. Os dados são expressos como miligramas de OH-prolina por grama de tecido, neste caso de VE.

5.9.3. Western blott

Esta técnica foi utilizada para observar a eficiência de transfecção do vetor. Foi assim medida a expressão de GFP (Green fluorescent protein) nos corações dos animais.

Aproximadamente 100mg de VE foi homogeneizado em tampão de lise hipotônico contendo tampão fosfato de potássio 50mM (pH 7,0), sucrose 0,3 M, DTT 0,5mM, EDTA 1mM (pH 8,0), PMSF 0,3mM, NaF 10mM e coquetel de inibidor de fosfatase (1:100). O homogeneizado foi centrifugado por 10min a 4° C com 12.000 rpm. A concentração de proteína das amostras foi analisada pelo método de Bradford (1976). Foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl) pH 6,8, 240mM; SDS 0,8%; β-mercaptoetanol 200mM; Glicerol 40% e Azul de bromofenol 0,02 %) 50 µ g de

proteína. Os níveis proteicos de GFP e GAPDH (normalizador) foram avaliados por *Western blot*. Foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida (SDSPAGE, 10%), no aparelho para minigel (*Mini Protean, BioRad, USA*). Posteriormente, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (*Amersham Biosciences, USA*), que sofreu bloqueio de ligações inespecíficas (solução com caseína a 5%) e posteriormente foi incubada com o anticorpo primário: mouse monoclonal anti-GFP, SC9996 (Santa Cruz Biotechnology – Dallas TX - USA). A membrana foi lavada 3x10min com TBS-T, incubada por 2 horas com os respectivos anticorpos secundários, exposta a filme de PVC mediante reação de quimiluminescência (ECL), e os *blots* foram analisados pelo software *Scion Image*, fornecido gratuitamente pela NIH (USA) via internet. GAPDH foi utilizada como proteína normalizadora.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Análise de variância (ANOVA) de uma via foi utilizada para comparar os valores dos grupos e teste *post-hoc* de Tukey foi aplicado para diferenças (*Statistical software, StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA*).

Para os dados de pressão arterial pré e pós-treinamento foram utilizadas ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguidas do teste *post-hoc* de Tukey.

Para os dados de miRNA Array para SHR comparados a Wistar Kyoto (WKY) foi utilizado teste "t" *de student* para amostras não pareadas.

Adotou-se como significativo um $p < 0,05$. Os resultados estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM).

7.RESULTADOS

A apresentação dos dados será feita em 2 partes: Primeiro com relação aos treinamento físico e a busca pelo miRNA alvo, e na sequência os resultados da modulação do miRNA proposto no modelo de hipertensão.

7.1. Peso corporal

O PC dos grupos de animais não apresentou diferença no início do treinamento (S, 213 ± 8 g; P1, 210 ± 8 g; P2, 206 ± 6 g.). Os grupos apresentaram aumento semelhante de PC durante as 10 semanas de protocolo experimental e não houve diferença também ao final do treinamento (S, 269 ± 4 g ; P1, $278 \pm 6,7$ g; P2, 271 ± 10 g) . O PC de todos os grupos passou a ser diferente do inicial após a quinta semana de treinamento.

Figura 8: Evolução do peso corporal, em gramas (g), durante as 10 semanas de protocolo de treinamento. Dados estão apresentados como média ($p < 0,05$). Sedentário controle (S) está representada como linha cheia com círculo, protocolo 1 (P1) como linha pontilhada com quadrado e protocolo 2 (P2) como linha pontilhada com triângulo. * $p < 0,05$ vs. Semana 1.

7.2. Frequência Cardíaca e Pressão Arterial

Não houve diferença entre os valores de Pressão Arterial Média (PAM) (S, 113 ± 7 ; P1, 110 ± 6 ; P2, 108 ± 9 , mmHg; Figura 9A), Pressão Arterial Diastólica (PAD) e Pressão Arterial Sistólica (PAS, Tabela 1) após o protocolo de TF. Já com relação a frequência cardíaca, observamos a bradicardia de repouso nos grupos treinados (S, 345 ± 12 ; P1, 301 ± 15 ; P2, 309 ± 14 , bpm, Figura 9B), um marcador da eficiência do TF.

Figura 9: Medidas hemodinâmicas cardiovasculares. A) Pressão Arterial Média (mmHg) e B) Frequência Cardíaca de Repouso (bpm). Dados estão apresentados como média $\pm$ EPM, S, n=7; P1, n=6; P2, n=7, * $p < 0,05$ vs. S.

Tabela 1: Valores de Pressão Arterial Sistólica e Diastólica em repouso

Grupos	PAS(mmHg)	PAD(mmHg)
S	$127,6 \pm 3,9$	$97,6 \pm 10,3$
P1	$123,3 \pm 8,5$	$96,4 \pm 5,2$
P2	$123,0 \pm 8,4$	$94,3 \pm 8,9$

Valores expressos em média $\pm$ EPM. Resultados de pressão arterial sistólica

(PAS), pressão arterial diastólica (PAD) S, n=7; P1, n=6; P2, n=7.

7.3. Consumo de oxigênio (VO_2 max) e teste de esforço máximo

O VO_2 pico e a tolerância ao esforço máximo após o período de treinamento aumentaram em ambos os grupos treinados P1 e P2 em relação a S. A Figura 10A mostra o VO_2 pico dos animais antes e após o período de TF. No período pré-TF, todos os grupos tinham o mesmo nível médio de VO_2 pico, entretanto, após o período de TF

observa-se que o VO_2 pico dos grupos treinados P1 e P2 aumentou quando comparado ao grupo S, (S, $67,6 \pm 2,2$; P1, $75,63 \pm 2,2$; P2, $80,05 \pm 2,4$, $\text{mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$).

O tempo de duração do teste de esforço máximo aumentou em ambos os grupos treinados P1 e P2 comparado ao grupo S, (S, $6,12 \pm 3,7$; P1, $35,99 \pm 5,1$; P2, $35,7 \pm 4,1$ minutos, Figura 10B). Antes do protocolo de TF, os grupos apresentavam o mesmo desempenho físico, entretanto, após o TF os grupos treinados P1 e P2 apresentaram, respectivamente, aumento de 20,7% e 29,4% no tempo de tolerância ao exercício até da fadiga comparado ao grupo S.

Figura 10: Medidas de aptidão cardiorrespiratória. A) Consumo de Oxigênio e B) Teste de Esforço Máximo, em minutos ambos pós treinamento de natação. Dados estão apresentados como média $\pm$ EPM, $n=7$ por grupo. S, $n=7$; P1, $n=6$; P2, $n=7$ * $p<0,05$ e ** $p<0,01$ vs. S, † $p<0,05$ vs. P1.

7.4. Atividade da Citrato Sintase

A atividade da enzima citrato sintase no músculo sóleo foi significativamente maior tanto no grupo P1 ($262,0 \pm 59,6 \mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{mg}^{-1}$, $P<0,05$) quanto no grupo P2 ($366,2 \pm 46,4 \mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{mg}^{-1}$, $P<0,05$) quando comparadas ao grupo S ($178,6 \pm 63 \mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{mg}^{-1}$; Figura 11). A atividade dessa enzima caracteriza a adaptação aeróbica induzidas pelo TF

Figura 11: Atividade da enzima citrato sintase como marcador enzimático do metabolismo oxidativo. Dados estão apresentados como média $\pm$ EPM, S, n=7; P1, n=6; P2, n=7, *p<0,05 vs. S.

7.5. Hipertrofia Cardíaca

A HC foi mensurada por 3 diferentes índices: estimativa pela ecocardiografia, razão peso VE/PC, e diâmetro dos CMO. A Figura 12 mostra o resultado pelas 3 análises. A massa do VE pela análise ecocardiográfica mostrou aumento no grupo P1 ($4,59 \pm 0,21$ mg/g) e P2 ($4,94 \pm 0,42$ mg/g) comparado a S ($4,15 \pm 0,42$ mg/g). A razão peso VE/PC obtida nos grupos P1 e P2 foi 13% ($2,8 \pm 0,14$ mg/g; p<0,05) e 27 % maior ($3,2 \pm 0,12$ mg/g; p<0,01), respectivamente, comparado ao grupo de S ($2,5 \pm 0,06$ mg/g). Houve diferença também entre os grupos P1 e P2, sendo o P2 14% maior (p<0,05). A terceira análise, confirmou a HC observada pelos outros 2 métodos, sendo que o diâmetro dos CMO aumentou 20% no grupo P1 ($13,2 \pm 1,3\mu\text{m}$, p<0,05) e 30% do grupo P2 ($14,4 \pm 1,3\mu\text{m}$, p<0,05) comparado ao grupo S ($11 \pm 1,1 \mu\text{m}$).

A)

B)

Figura 12: Percentual de Hipertrofia Cardíaca por medidas obtidas por ecocardiografia, pela razão entre o peso do VE e o PC e pelo diâmetro de CMO. B) Fotos ilustrativas dos cortes histológicos de coração mostrando o diâmetro dos CMO. Dados estão apresentados como média $\pm$ EPM, n=7; P1, n=6; P2, n=7 *p<0,05 vs. S, † p<0,05 vs. P1, **P<0,01 vs. S.

A figura 13 mostra correlação positiva e significativa ($p<0,05$) da HC pela razão peso VE/PC com o consumo de O₂.

Figura 13: Correlação entre o consumo do O₂ (VO₂max) e a HC induzida pelo TF aeróbio (Razão VE/PC: peso do VE corrigido pelo peso corporal) S, n=8, P1, n=7, P2, n=8. p<0,05, R=0,68.

A tabela 2 contém os dados morfométricos de ecocardiografia corrigidos pelo PC. A HC foi classificada como excêntrica nos grupos treinados, tanto pelo aumento do diâmetro diastólico final quanto do diâmetro sistólico final do VE. As espessuras de parede e o septo interventricular em sístole e em diástole também apresentaram hipertrofia tanto no grupo P1 quanto P2 em relação ao grupo S.

7.6. Função Ventricular

Para responder se o TF foi capaz de melhorar parâmetros da função cardíaca foi realizada análise funcional, através de Ecodopplercardiografia de repouso.

A Tabela 3 sumariza os dados de função ventricular (sistólica, diastólica e global). A função sistólica não apresentou diferença entre os grupos. Para a função diastólica, entretanto, houve um aumento da relação das ondas E/A no grupo P2 ($1,644 \pm 0,11$ m/s, p<0,05) enquanto no grupo P1 ($1,50 \pm 0,19$ m/s) o aumento não foi significativo em comparação a S ($1,39 \pm 0,16$ m/s). Este aumento significativo no

grupo P2 ocorreu em função de: aumento não significativo nos valores de velocidade de pico de onda E (Pico E), e diminuição também pequena para a velocidade de pico de onda A (Pico A).

O tempo de desaceleração da onda E (TDE) consiste o tempo em que a onda E leva para desacelerar, e é outra medida de função diastólica que apresentou diferenças para ambos os grupos P1 ($1,8 \pm 0,1$ ms, $p < 0,05$) e P2 ($1,9 \pm 0,2$ ms, $p < 0,05$) em comparação ao S ($2,2 \pm 0,1$ ms).

Outra medida de função diastólica analisada foi o tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), que apresentou diminuição significativa no grupo P2 ($28,2 \pm 1,6$ ms, $p < 0,05$) comparado a S ($31,0 \pm 1,7$ ms), embora para P1 ($30,7 \pm 0,8$ ms) não foi diferente.

Adicionalmente o Índice de Performance do Miocárdio (IPM), que consiste em um índice de função global, independente de pós-carga, consistindo na soma do tempo de relaxamento isovolumétrico e do tempo de contração isovolumétrica, dividida pelo tempo de ejeção do VE foi reduzido nos grupos P1 ($0,35 \pm 0,06$) e P2 ($0,38 \pm 0,07$) comparado a S ($0,51 \pm 0,06$).

Tabela 2: Medidas morfológicas por Ecodopplercardiografia

Medidas morfológicas	S (n=6)	P1(n=6)	P2(n=6)
Massa do VE (mg/g)	4,150 ± 0,18	4,593 ± 0,21*	4,945± 0,42*
Diâmetro diastólico final do VE (cm)	0,644 ± 0,03	0,672±0,01	0,688± 0,03*
Diâmetro sistólico final do VE (cm)	0,388± 0,026	0,410 ± 0,012	0,428± 0,027*
Espessura da parede posterior em diástole (cm)	0,130 ± 0,006	0,138± 0,005*	0,157 ± 0,006#
Espessura da parede posterior em sístole (cm)	0,208± 0,017	0,220±0,016*	0,232 ± 0,011*
Espessamento relativo posterior do VE (cm)	0,406 ± 0,02	0,431 ± 0,04	0,456 ± 0,02*
Septo Interventricular em sístole (cm)	0,184± 0,015	0,209 ±0,018*	0,215±0,017#
Septo Interventricular em diástole (cm)	0,130± 0,006	0,138±0,005*	0,154±0,006#

Valores expressos em média ± EPM. Diferença Significativa vs. *S, vs #P1, p<0,01

Tabela 3: Resultados de função cardíaca por Ecodopplercardiografia

Medidas de função cardíaca	S (n=7)	P1(n=6)	P2(n=6)
Índice de Performance do Miocárdio	0,51±0,06	0,35±0,09*	0,38±0,07*
Função Sistólica			
LVEF (%) - Fração de Ejeção	77±5	75±2	73±2
LVFS (%) - Fração de Encurtamento	39±4	38±3	36±2
VCF (m/s) - Vel. Média de Enc. Circunferencial	0,204±0,02	0,211±0,2	0,222±0,04
Função Diastólica			
PicoE - Velocidade do Pico de onda E (m/s)	0,451±0,05	0,499±0,05	0,458±0,03
Pico A- Velocidade do Pico de onda A (m/s)	0,328±0,03	0,333±0,03	0,279±0,01
Razão E/A- Relação E/A	1,396±0,16	1,504±0,19	1,644±0,11*
TDE (ms)- Tempo de desaceleração da onda E	2,2±0,2	1,8±0,1*	1,9±0,2*
TRIV (ms) -Tempo de relaxamento isovolumétrico	31,00±1,7	30,7±1,8	28,2±1,6*

Valores expressos em média ± EPM. Dados de Função Sistólica e Diastólica. *p<0,05 vs. S.

7.7. Expressão Gênica de Marcadores Moleculares de Hipertrofia

Cardíaca

Também foram usados marcadores moleculares para classificar a HC entre fisiológica e patológica. A Figura 14 A mostra que o grupo P1 não modificou a expressão cardíaca dos genes ANF, α -actina esquelética, nem na razão entre a α/β -MHC. Entretanto, no grupo P2 foi observado aumento de 98% da relação α/β -MHC (aumento de 37% na expressão gênica da α -MHC e redução de 70% da β -MHC), nenhuma alteração na expressão de ANF, e redução de 53% da α -actina esquelética comparado ao grupo S ($p < 0,05$). Os resultados de expressão de α e β – MHC estão ilustrados separadamente, mostrando uma melhora na expressão das isoformas de miosina (α -MHC, S, $1,00 \pm 0,22$; P1, $1,28 \pm 0,26$; P2, $1,72 \pm 0,35$, $p < 0,05$, $2^{-\Delta\Delta C_t}$) (β -MHC, S, $1,00 \pm 0,12$; P1, $0,54 \pm 0,16$, P2, $0,05 \pm 0,017$ $p < 0,05$, $2^{-\Delta\Delta C_t}$)

A)

Figura 14: Marcadores moleculares de hipertrofia cardíaca por PCR em tempo real. A) Expressão gênica dos marcadores de hipertrofia cardíaca: relação α/β -MHC (Miosina de cadeia pesada do tipo α e β) ANF (Fator Natriurético Atrial) e α -actina esquelética. B) Expressão gênica de α -MHC (miosina de cadeia pesada do tipo alfa). C) Expressão gênica de β -MHC (miosina de cadeia pesada do tipo beta). A expressão gênica foi normalizada pela expressão da ciclofilina. Resultados expressos em percentual do grupo S $\pm$ EPM. S, n=7; P1, n=6; P2, n=7 *p<0,05 vs. S, † p<0,05 vs. P1.

7.8. Escolha de um miRNA a partir do perfil expressão dos miRNA nos modelos propostos

Para selecionarmos um miRNA de interesse, foram utilizados dados prévios de *arrays* já realizados pelo nosso grupo. Foram comparados o perfil de expressão dos miRNA entre os grupos S, P1 e P2 e também entre animais Wistar Kyoto e SHR, conforme indicado na figura 5 (vide desenho experimental). A plataforma que usamos contemplou a expressão de 349 miRNAs diferentes, e para a análise utilizamos *pool* de 3 animais por grupo experimental.

Dos 349 miRNAs estudados, 87 apresentaram expressão modificada nos grupos P1 e P2 comparados com o grupo S, sendo 48 com expressão aumentada e 39 com expressão reduzida. (Figura 15A e 15B).

Já no modelo de hipertensão, 86 miRNAs apresentaram expressão modificada no grupo SHR comparado ao WKY, sendo 37 com expressão aumentada e 49 com

expressão reduzida (Figura 15C e 16D).

Destes miRNAs com diferença de expressão nos grupos treinados, foi estabelecido um *cut off* de 300 unidades arbitrárias, ou seja, os miRNAs que apresentavam expressão abaixo desse valor não seguiram para a próxima análise. Essa estratégia foi utilizada com o objetivo de selecionar, através dos valores de expressão arbitrários, aqueles eventos possivelmente mais significantes (Figura 15B e 15D).

Após essa pré-seleção, dos 87 miRNAs diferentemente expressos pelo TF, 72 miRNAs apresentaram expressão superior ao corte para os grupos P1 e P2, e dos 86 para os SHR, todos continuaram a ser considerados como relevantes.

Como próximo passo, selecionados aqueles com mudança de expressão superior a 30%. Dos 72 modulados nos grupos P1 e P2, 25 miRNAs atingiram esse requisito com aumento de expressão e 20 com diminuição da expressão.

A seguir, foram então procurados aqueles miRNAs que apresentaram aumento ou diminuição de expressão de maneira linear entre os grupos P1 e P2, já que o volume de treinamento é fundamental para a magnitude da HC induzida pelo TF (Soci, Fernandes et al, 2011). Após esse procedimento, 11 miRNAs continuavam entre os de expressão aumentada e 4 com expressão diminuída. Os resultados desses 15 miRNAs estão expostos na Tabela 4.

Estes 15 miRNAs selecionados nos grupos P1 e P2 foram então confrontados com os 87 miRNAs diferencialmente expressos no modelo de Hipertensão Arterial. Na tabela 5 são mostrados os miRNAs selecionados e comparados com a expressão deles na HA. Dos 15 selecionados, 4 apresentaram padrão de mudança de expressão inversa entre o TF e o SHR, 4 apresentaram padrão de mudança igual e 7 não apresentaram mudança significativa de expressão com a hipertensão, embora tenham apresentado mudanças com o treinamento.

Figura 15: MiRNAs com mudança de expressão por mRNA array. A) Diagrama mostrando quantidade e proporção de miRNAs diferencialmente expressos pelo TF por miRNAarray. B) Linha de corte para miRNA Array dos grupos S, P1 e P2 ($p < 0,01$). C) Diagrama mostrando quantidade e proporção de miRNAs diferencialmente expressos pela Hipertensão arterial por miRNAarray D) Mudança de expressão de miRNAs para checar padrão de mudança de expressão inverso ao fisiológico por miRNA Array dos animais SHR e WKY ($p < 0,01$).

Tabela 4: MiRNAs com expressão linearmente modificada pelos protocolos de natação.

MiRNA	S	P1	P2	Alvos Validados	Processo biológico
Aumento de Expressão					
rno-miR-27a	1	1,3*	1,8*†	GATA2/ACE-1/Miostatina	Hipertrofia Cardíaca
rno-miR-27b	1	1,3*	1,4*†	ACE-1/Miostatina	Hipertrofia Cardíaca
rno-miR-126	1	1,7*	1,8*†	PI3KR2 / SPRED1	Angiogênese
rno-miR-222	1	1,5*	2,8*†	PTEN	Angiogênese
rno-miR-221	1	2,1*	4,6*†	PTEN	Angiogênese
rno-miR-29c	1	1,5*	2,2*†	COLI e COLIII, Elastina Fibrilina	Hipertrofia Cardíaca e Fibrose
rno-miR-15b	1	2,0*	2,7*†	TGFBR1	Hipertrofia Cardíaca
rno-miR-23a	1	14,9*	17,7*†	E2F1/ Sprout2	Hipertrofia Cardíaca/Angiogênese
miR-23b	1	1,7*	2,0*†	E2F1/ Sprout2	Hipertrofia Cardíaca/Angiogênese
miR-let-7a	1	1,1*	1,5*†	c-myc/k-RAS	Proliferação Celular Vascular
miR-199a-3p	1	1,1*	1,2*†	TWIST1	Degradação Protéica
Diminuição de Expressão					
rno-miR-22	1	0,9*	0,4*†	ESR1/Sirt1/HDAC4	Metabolismo e Hipertrofia Cardíaca
rno-miR-296*	1	0,8*	0,4*†	*	Gênese da Hipertensão
rno-miR-191	1	0,6*	0,4*†	BDNF	Hipertrofia Cardíaca
rno-miR-329	1	0,6*	0,2*†	E2F1	Proliferação Celular

Valores expressos em *fold change* do S. n=pool de 3 por grupo experimental * p<0,01 vs S.

† p>0,01 vs P1

Tabela 5: Seleção de miRNAs com potencial terapêutico na hipertensão arterial.

miRNA	TF	Hipertensão	<i>Fold change</i> (SHR vs. WKY)
miR-27a	↑	↓	0,7*
miR-27b	↑	↓	0,7*
miR-126	↑	↓	0,8*
miR-222	↑	↔	0,97*
miR-221	↑	↔	0,96*
miR-29c	↑	↓	0,8*
miR-15b	↑	↔	1,0*
miR-23a	↑	↔	1,0*
miR-23b	↑	↔	1,0*
miR-let-7a	↑	↑	1,3*
miR-199a-3p	↑	↑	1,2*
rno-miR-22	↓	↓	0,7*
rno-miR-296*	↓	↔	0,96*
rno-miR-191	↓	↓	0,90*
rno-miR-329	↓	↓	0,70*

*Valores expressos em *fold change* (SHR/WKY). n=pool de 3 por grupo p<0,01 vs WKY.

Figura 16: Diferenças na expressão de miRNAs selecionados pelos critérios de interesse do *array* de miRNAs. n= *pool* de 3 animais por grupo, *p<0,01 vs. S, #p<0,05 vs. P1.

A análise quantitativa do *array* indicou que: o miRNA-27a aumentou 26 % no P1 e 82% no P2 comparado ao S (S, 1760 ± 324; P1, 2225 ± 235; P2, 3218 ± 90 u.a.; p<0,01); o miRNA-27b aumentou 27% no P1 e 44% no P2 (S, 3409 ± 267; P1, 4341 ± 373; P2, 4939 ± 178 u.a., p<0,01); o miRNA-126 aumentou 65 % no P1 e 79% no P2 (S, 12646 ± 1171; P1, 20911 ± 1247; P2, 22679 ± 414 u.a.; p<0,05); o miRNA29c aumentou 51% no P1 e 119% no P2 (S, 744 ± 384; P1, 1125 ± 172; P2, 1624 ± 206 u.a.; p<0,01) comparados ao grupo S. Estes resultados estão representados pela figura 16.

Esses 4 miRNAs com padrão de mudança inverso entre o TF e a HA foram então selecionados para confirmação por real time-PCR, já que obedeciam aos critérios de interesse e foram assim considerados como alvos com potencial terapêutico para a HA.

7.9. Confirmação da Expressão Gênica de MicroRNAs

7.9.1 miRNAs modulados pelo TF:

Para confirmar os achados do *array* dos miRNAs modulados na HC fisiológica foi realizada a quantificação por real time-PCR dos seguintes miRNAs: 27a (S, $1 \pm 0,08$; P1, $1,52 \pm 0,06$; P2, $2,04 \pm 0,13$, $p < 0,01$, Fig 17A), 27b (S, $1 \pm 0,06$; P1, $1,30 \pm 0,05$; P2, $1,59 \pm 0,08$, $p < 0,01$, Fig 17C), e 126 (S, $1 \pm 0,07$; P1, $1,28 \pm 0,10$; P2, $1,43 \pm 0,20$, $p < 0,05$, Fig 17G), 29c (S, $1 \pm 0,07$; P1, $1,54 \pm 0,30$; P2, $2,23 \pm 0,16$, $p > 0,05$ Fig 17E). Observa-se, que a expressão de todos eles estavam aumentados com o TF e maior no grupo P2 comparado ao P1, sugerindo uma relação com o volume de treinamento. Esse resultado foi mais evidente com relação a expressão do miRNA-29c o qual aumento 52% no grupo P1 e 128% no grupo P2 comparado ao grupo S.

A expressão do miRNA-29c aumentou 52% para P1 e 128% to P2 comparado ao grupo S, o que confirma os resultados de microarray. Interessantemente a linearidade da mudança de expressão do miRNA-29c também foi demonstrada através da técnica de real time-PCR (Figura17G).

Figura 17: Confirmação da diferença de expressão de miRNAs determinantes para o fenótipo de HC fisiológica (induzida pelo TF) (A,C,E,G) e patológica (induzida pela hipertensão arterial) (B,D,F,H). miRNA27a (A,B), miRNA-27b (B,C) miRNA-126 (E,F) e miRNA-29c (G,H). PCR em tempo real. S, n=7; P1, n=6; P2, n=7 *p<0,01 vs. S, #p<0,05 vs. P1, **p<0,05 vs. S. †p<0,05 vs. WKY.

7.9.2. miRNAs modulados pela Hipertensão Arterial

Além da modificação de expressão dos miRNAs selecionados pelo treinamento, também foi realizada a confirmação da expressão dos mesmos miRNAs na HA.

O grupo SHR teve diminuição de 46% do miRNAs-27a (WKY, $1 \pm 0,17$; SHR, $0,54 \pm 0,11$, $p < 0,05$, Fig 17B) e de 45% do miRNA-27b (WKY, $1 \pm 0,16$; SHR, $0,55 \pm 0,14$, $p > 0,05$, Fig 17D). A expressão miRNA-29c também estava diminuída em 21% no grupo SHR (WKY, $1 \pm 0,07$; SHR, $0,79 \pm 0,13$, $p < 0,05$, Fig 17F), e o miRNA-126 diminuído em 19% (WKY, $1 \pm 0,19$; SHR, $0,81 \pm 0,13$, $p < 0,05$, Fig 17H). Portanto observa-se que a análise quantitativa por qRT-PCR confirmou o padrão de expressão inversa desses miRNAs, sendo a expressão destes miRNAs aumentada com o TF e diminuída no modelo de HA.

7.10. Expressão gênica e proteica de alvos do miRNA 29c

Os mRNAs do Colágeno do tipo I (COLIAI) e do tipo III (COLIIIAI) são os principais alvos do miRNA-29c no coração os quais são relacionados à fibrose cardíaca (Van Rooij, Thatcher et al., 2008). Assim, para avaliar a participação do colágeno, um dos alvos do miRNA-29c, na HC induzida pelo TF, foi quantificada a expressão gênica de COLIAI e COLIIIAI por real time-PCR. COLIAI diminuiu 61% no grupo P1 ($p < 0,05$) e 48% ($p < 0,05$) no grupo P2 comparados ao grupo S. Similarmente, a expressão de COLIIIAI estava 49 % ($p < 0,05$) e 40% ($p < 0,05$) menor nos grupos P1 e P2 em relação ao grupo S, respectivamente. Estes resultados estão mostrados na Figura 19 e evidenciam que o COLIAI e COLIIIAI, alvos validados do miRNAs-29c, estão diminuídos em ambos os grupos treinados quando comparados ao grupo S. A concentração de OH-prolina confirmou que o conteúdo de colágeno no VE estava 40% mais baixa em P1 (142 ± 29 mg/g, $p < 0,05$) and 27% menor (125 ± 34 mg/g, $p < 0,05$)

em P2 comparado ao grupo S (235 ± 45 mg/g). Em adição foi observada uma alta correlação negativa da expressão do miRNA-29c com a concentração de OH-prolina no VE ($r = 0,61$, $p < 0,05$) o que estabelece uma associação entre a menor expressão de colágeno cardíaco e o aumento da expressão do miRNA-29c. A figura 18 ilustra os sítios contidos no mRNA do COLIAI e COLAIIIAI o que poderia em parte, explicar essa correlação negativa.

Figura 18: Sítios no mRNA de diferentes tipos de colágeno cardíaco (COLIAI, COLIAII e COLAIIIAI) para os miRNAs-29.

Figura 19: Expressão de mRNA de colágeno tipo IAI e IIIAI (COLIAI e COLAIIIAI) por PCR em tempo real. * S, n=7; P1, n=6; P2, n=7, $p < 0,05$ vs. S.

Figura 20: Correlação negativa entre a concentração total de colágeno no ventrículo esquerdo e a expressão de miRNA-29c. A) Colágeno Cardíaco por hidroxiprolina, B) Expressão de MiRNA-29c por real time-PCR. C) Correlação negativa entre ambos (A e B) S, n=7; P1, n=6; P2, n=7 C) n=4 por grupo *p<0,05 vs. S.

7.11. Superexpressão *in vivo* do miRNA29c utilizando vetor lentiviral no coração de animais SHR jovens.

7.11.1. Titulação

A titulação foi feita com objetivo de quantificar o número de partículas virais por mL de sobrenadante das células produtoras HEK293T, para definir a quantidade de partículas virais a ser injetada *in vivo*. Foram quantificadas as partículas virais a partir da quantificação do antígeno específico para lentivírus, denominado p24, através de reação colorimétrica. A adição de solução substrato e de *stop solution* estão esquematizadas nas figuras 21. A curva padrão de concentrações de p24 está apresentada na figura 22 e apresentou linearidade excelente para a quantificação com valores de coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,99. A titulação obtida foi de $2,0 \times 10^8$ partículas virais/mL de sobrenadante para os plasmídeos PLV-ctrl e $2,25 \times 10^8$ partículas virais/mL para o plasmídeo PLV-miRNA-29c. As doses assumidas para teste foram 6×10^8 partículas virais por animal para baixa dose e 3×10^9 partículas virais por animal para alta dose.

Figura 21: Placa de titulação de partículas lentivirais. A) Adição de solução substrato - reação enzimática; B) Adição de stop solution; C) Placa pronta para titulação – quantificação de p24.

Figura 22: Curva padrão obtida no experimento de titulação das partículas virais contendo os plasmídeos do estudo

7.11.2. Expressão de *Green Fluorescent Protein* em fígado e coração de ratos SHR.

O vetor lentiviral utilizado nesse experimento para a expressão do pré-miRNA-29c também expressa de maneira independente ao miRNA a proteína fluorescente verde (GFP). Para demonstrarmos a eficiência da infecção *in vivo*, a análise da expressão protéica do GFP foi realizada por *western blott* tanto no coração quanto no fígado dos SHR tratados 7 e 14 dias após as injeções.

Conforme mostra a Figura 23 a expressão de GFP no coração foi encontrada no grupo SHR14B (580%) ($1,22 \pm 0,08$ u.a. $p < 0,05$) e SHR7B (578%) ($1,22 \pm 0,17$ u.a. $p < 0,05$), comparado aos grupos COS (controle soro) ($0,18 \pm 0,08$ U.A.). SHR14A ($0,38 \pm 0,11$) SHR7A ($0,39 \pm 0,35$) não apresentaram diferenças significativas do grupo controle. Esses resultados, sugerem que, de forma não esperada, as infecções com baixas doses tiveram melhor direcionamento cardíaco das partículas lentivirais de expressão do miRNA29c.

Figura 23: Expressão proteica de GFP (*Green Fluorescent Protein*) por *western blot* de coração e fígado de SHR tratados e não tratados. COS: Controle Soro, SHR14A (SHR tratado com alta dose do pré-miRNA-29c por 14 dias), SHR7A (SHR tratado com alta dose do pré-miRNA-29c por 7 dias), SHR14B (SHR tratado com baixa dose do pré-miRNA-29c por 14 dias) SHR7B (SHR tratado com baixa dose do pré-miRNA-29c por 14 dias). * $p < 0,05$ vs COS.

7.11.3. Expressão de miRNA-29c por real time-PCR no Ventrículo Esquerdo

Para avaliar a eficiência do tratamento com o vetor lentiviral foi realizada também a análise da expressão do miRNA-29c nos grupos experimentais.

Conforme a figura 24 mostra, tanto os grupos tratados após 7 dias (figura 24A), quanto os grupos tratados após 14 dias (figura 24B) apresentaram aumento de expressão em comparação aos seus controles. Os grupos SHR7B ($1,37 \pm 0,17 \ 2^{\Delta\Delta CT}$ $p < 0,05$) e

SHR7A ($1,31 \pm 0,10$, $2^{\Delta\Delta CT}$ $p < 0,05$) apresentaram 37% e 32% de aumento comparado aos seus controles ($1,00 \pm 0,12$ $2^{\Delta\Delta CT}$). Os grupos SHR14B ($1,69 \pm 0,08$, $2^{\Delta\Delta CT}$ $p < 0,05$) e SHR14A ($1,65 \pm 0,03$ $2^{\Delta\Delta CT}$ $p < 0,05$) apresentaram 69% e 65% de aumento comparado ao seus respectivos controles (CSI, $1,00 \pm 0,07$, $2^{\Delta\Delta CT}$). Além disso SHR14A apresentou aumento significativo apenas comparado ao SHR7A, quando comparado ao SHR7B e SHR14B esse resultado não foi significativo. Este resultado mostra evidência de que, conforme pretendido, o tratamento foi eficaz para aumentar a expressão do miRNA-29c em todos os grupos tratados.

Figura 24: Expressão do miRNA-29c realizada por reação de PCR em tempo real. A) SHR – ratos espontaneamente hipertensos; SHR7B – tratados com baixa dose após 7 dias (n=3); SHR7A – tratados com alta dose após 7 dias (n=3) CSI – controle sem inserto, B) SHR14B – tratados com baixa dose após 14 dias (n=3); SHR14A – tratados com alta dose após 14 dias (n=3); CSI – controle sem inserto (n=2) * $p < 0,05$ vs CSI.

7.11.4. Expressão gênica de Colágeno do tipo I e do tipo III no Ventrículo

Esquerdo

A expressão gênica do colágeno tipo I (COL1A1), um dos alvos do miRNA-29c com alta expressão no coração de SHR, diminuiu também para todos os grupos tratados. Como ilustra a figura 25, o grupo SHR7B figura 25A ($0,26 \pm 0,06$, $2^{\Delta\Delta CT}$ $p < 0,05$) apresentou diminuição de 77% e o grupo SHR7A (figura 25A, $0,30 \pm 0,10$, $2^{\Delta\Delta CT}$) 70% comparado aos controles (CSI, $1,00 \pm 0,05$, $2^{\Delta\Delta CT}$ $p < 0,05$). A figura 25B

mostra uma diminuição de 74% para SHR14B ($0,36 \pm 0,14$, $2^{\Delta\Delta CT}$ $p < 0,05$) e 57% para SHR14A ($0,43 \pm 0,17$, $2^{\Delta\Delta CT}$ $p < 0,05$), quando comparado aos seus controles (CSI: $1 \pm 0,04$ $2^{\Delta\Delta CT}$). Estes resultados em conjunto mostram evidência que este alvo do miRNA-29c foi diminuído no coração pelo tratamento com o vetor lentiviral.

A expressão do colágeno tipo III COL3A1 não apresentou diminuição significativa e relação aos seus controles, para nenhum grupo experimental (Figura 26C) (CSI, $1,02 \pm 0,03$, SHR7B, $0,97 \pm 0,02$, SHR7A, $0,95 \pm 0,01$). Figura 26D (CSI, $0,97 \pm 0,03$, SHR14B, $0,95 \pm 0,02$, SHR14A, $0,9 \pm 0,03$).

Figura 25: Expressão relativa do colágeno COL1A1 (A e B) e COL3A1 (C e D), alvos do miRNA-29c, realizado por PCR em tempo real. SHR – ratos espontaneamente hipertensos; A) SHR7B – tratados com baixa dose após 7 dias (n=3); SHR7A – tratados com alta dose após 7 dias (n=3); CSI – controle sem inserto, tratados com o plasmídeo sem o pré-miR-29c (n=2); B) SHR14B – tratados com baixa dose após 14 dias (n=3); SHR14A – tratados com alta dose após 14 dias (n=3); CSI – controle sem inserto, tratados com o plasmídeo sem o pré-miR-29c

(n=2) CSI – controle sem inserto, tratados com o plasmídeo sem o pré-miR-29c (n=2) * $p < 0,05$ vs CSI.

7.11.5.Fração volumétrica de colágeno por análise histológica

A análise do percentual de colágeno no ventrículo esquerdo foi realizada pelo método histológico com lâminas coradas com Picrossírius red, que marca as fibras de colágeno cardíaco com a cor vermelha. Novamente, todos os grupos tratados com partículas lentivirais para aumentar a expressão do miRNA-29c apresentaram diminuição da fração de colágeno no ventrículo esquerdo. Conforme ilustra a figura 26A, o grupo SHR7B apresentou diminuição de 29,2% e o grupo SHR7A de 33,4% comparado aos seus respectivos controles. A figura 26B mostra que após 14 dias de tratamento o percentual permaneceu diminuído 27,4% para SHR14B e 33 % para SHR14A, evidência de que o tratamento foi eficaz em diminuir o conteúdo de colágeno no ventrículo esquerdo.

Figura 26: Fração volumétrica de colágeno no ventrículo esquerdo por análise histológica em SHR tratados com pré-miRNA-29c. A) SHR7B – tratados com baixa dose após 7 dias (n=3); SHR7A – tratados com alta dose após 7 dias (n=3); CSI – controle sem inserto, tratados com o plasmídeo sem o pré-miR-29c (n=2) ; B) SHR14B – tratados com baixa dose após 14 dias (n=3); SHR14A – tratados com alta dose após 14 dias (n=3); CSI – controle sem inserto, tratados com o plasmídeo sem o pré-miR-29c (n=2) * $p < 0,05$ vs CSI. C) Cortes histológicos corados com Picrosírius nos animais experimentais ilustrando a queda da fração volumétrica do colágeno no VE (20X de aumento).

7.11.6. Concentração de Hidroxiprolina Cardíaca

Outro método indireto de mensuração do colágeno é a mensuração da Hidroxiprolina (OH- prolina) cardíaca. Nessa análise, não foram apresentadas diferença

significativa para os animais tratados em relação aos seus controles (Figura 27). (SHR7B, 195 ± 98 mg/g; SHR7A, 264 ± 71 mg/g; SHR14B: 56 ± 18 mg/g; CSI: $72 \pm 7,9$ mg/g). Os grupos SHR14B (56 ± 18 mg/g) e SHR14A ($77 \pm 8,7$ mg/g) também não foram diferentes de seus controles CSI ($65 \pm 4,33$ mg/g).

Figura 27: Conteúdo total de colágeno em cardiomiócitos avaliado pela quantificação da concentração da Hidroxiprolina (OH-Prolina -mg/g) em SHR tratados com pré-miRNA-29c. SHR – ratos espontaneamente hipertensos; A) SHR7B – tratados com baixa dose após 7 dias (n=3); SHR7A – tratados com alta dose após 7 dias (n=3); CSI – controle tratado com soro (n=2). B) SHR14B – tratados com baixa dose após 14 dias (n=3); SHR14A – tratados com alta dose após 14 dias (n=3); CSI – controle tratado com soro (n=2).

7.11.7. Hipertrofia Cardíaca

A HC foi analisada pelo peso do coração e do VE corrigidos pelo PC, e pelo diâmetro dos CMO. O PC dos animais não apresentou diferença ao final do tratamento para os grupos tratados após 7 dias: (SHR7B: $244,3 \pm 11$ g, SHR7A: 226 ± 12 ,; CSI: $237 \pm 1,3$ g) ou para os grupos tratados após 14 dias (SHR14B: 226 ± 12 g, SHR14A: $242 \pm 9,8$ g, CSI: $239 \pm 2,3$ g).

7.11.7.1. Peso do VE / peso corporal

Para as medidas de peso do VE corrigido pelo PC (VE/PC) os grupos SHR7B ($3,04 \pm 0,15$ mg/g) e SHR7A ($3,11 \pm 0,26$ mg/g) (figura 28 A) não apresentaram diferenças em relação aos seus controles CSI ($3,25 \pm 0,17$ mg/g). Para os grupos tratados após 14 dias o grupo SHR14B ($2,74 \pm 0,08$) apresentou diminuição significativa de 15,2% em relação a CSI ($3,29 \pm 0,17$ mg/g) e o grupo SHR14A ($3,05 \pm 0,19$ mg/g) não apresentou diferença significativa comparado a CSI (Figura 28B).

Figura 28: Hipertrofia cardíaca medida pelo peso do Ventrículo esquerdo corrigido pelo peso corporal em SHR tratados com pré-miRNA-29c em mg/g. SHR – Ratos espontaneamente hipertensos; A) SHR7B – tratados com baixa dose após 7 dias (n=3); SHR7A – tratados com alta dose após 7 dias (n=3); CSI – controle sem inserto (n=2). B) SHR14B – tratados com baixa dose após 14 dias (n=3); SHR14A – tratados com alta dose após 14 dias (n=3); CSI – controle sem inserto (n=2) * $p < 0,05$ vs CSI.

7.11.7.2. Peso do coração corrigido pelo peso corporal

Para o peso do coração corrigido pelo peso corporal dos animais os grupos SHR7B ($3,63 \pm 0,11$ mg/g) e SHR7A ($3,86 \pm 0,28$ mg/g) não apresentaram diferenças em relação aos seus controles CSI ($3,62 \pm 0,007$ mg/g). Entretanto, para os grupos tratados após 14 dias os grupos SHR14B ($3,49 \pm 0,10$ mg/g) e SHR14A ($3,62 \pm 0,09$ mg/g)

apresentaram diminuição significativa de 11% e 7% em relação a CSI ($3,89 \pm 0,007$ mg/g $p > 0,05$). Os resultados acima são ilustrados na figura 29A e B.

Figura 29: Hipertrofia cardíaca medida pelo peso do coração corrigido pelo peso corporal em SHR tratados com pré-miRNA-29c em mg/g. SHR – ratos espontaneamente hipertensos; A) SHR7B – tratados com baixa dose após 7 dias (n=3); SHR7A – tratados com alta dose após 7 dias (n=3); CSI – controle sem inserto (n=2). B) SHR14B – tratados com baixa dose após 14 dias (n=3); SHR14A – tratados com alta dose após 14 dias (n=3); CSI – controle sem inserto (n=2) * $p < 0,05$ vs CSI.

7.11.7.3. Diâmetro de cardiomiócitos

Conforme ilustra a figura 30, houve aumento no diâmetro dos CMO nos grupos tratados por 7 dias em comparação ao controle sem inserto. O grupo SHR7B (apresentou aumento de 39% e o grupo SHR7A de 28% comparados ao grupo CSI (figura 30A). Os grupos experimentais SHR14A e SHR14B (figura 30B) também apresentaram aumento no diâmetro de CMO na magnitude de 38% e 27% respectivamente, evidência de que em ambos os tempos de tratamento o tamanho das células musculares cardíacas se apresentava aumentado.

Figura 30: Hipertrofia cardíaca medida pelo diâmetro de cardiomiócitos em SHR tratados com pré-miRNA-29c em mg/g. SHR – ratos espontaneamente hipertensos; A) SHR7B – tratados com baixa dose após 7 dias (n=3); SHR7A – tratados com alta dose após 7 dias (n=3); CSI – controle sem inserto (n=2). B) SHR14B – tratados com baixa dose após 14 dias (n=3); SHR14A – tratados com alta dose após 14 dias (n=3); CSI – controle sem inserto (n=2) * $p < 0,05$ vs CSI.

7.11.8. Pressão arterial

A pressão arterial sistólica (PAS) foi mensurada nos diferentes grupos por petismografia de cauda. Observamos que antes das cirurgias para a injeção das partículas virais, não havia diferença significativa de PAS entre os grupos (préCSI, $154 \pm 2,3$ mmHG, préSHR7B: $132 \pm 10,67$, SHR7Apré: $141 \pm 7,57$ mmHg préSHR14B: $167 \pm 7,51$ mmHG, préSHR14A: 139 ± 1 mmHg).

Mesmo a avaliação seguinte tendo sido feita apenas 7 e 14 dias após a primeira, os animais CSI atingiram valor de PAS ainda maiores (CSI7D, $190 \pm 4,33$ mmHg, CSI14D, $193 \pm 2,60$ mmHg. Essa diferença também foi observada nos grupos que tiveram a expressão aumentada do miRNA por 7 dias (SHR7B, $178 \pm 8,84$ mmHg e SHR7A, $187 \pm 5,86$ mmHg, $p < 0,05$), porém o mesmo não foi observado nos grupos que foram tratados por 14 dias, principalmente no grupo SHR14A (SHR14B, $187 \pm 4,8$ mmHg SHR14A, 154 ± 21 mmHg).

Figura 31: Pressão arterial sistólica de SHR tratados com pré-miRNA-29c (mm/Hg) obtida por pletismografia de cauda. SHR – ratos espontaneamente hipertensos. SHR-pré – animais hipertensos pré-tratamento, CSIpré – Controle sem inserto pré-tratamento (n=2). CSI7D – Controle sem inserto 7 dias de tratamento, CSI14D – Controle sem inserto 14 dias de tratamento (n=2), préSHR7B – SHR7B pré-tratamento, SHR7B (n=2), SHR7B – tratados com baixa dose após 7 dias (n=3); préSHR7A – SHR7A pré-tratamento, SHR7A – tratados com alta dose após 7 dias (n=3); SHR14B – tratados com baixa dose após 14 dias (n=3); SHR14A – tratados com alta dose após 14 dias (n=3); CSI – controle sem inserto (n=2). Análise de variância para medidas repetidas. *p < 0,05 vs. préCSI, **p < 0,05 vs. préSHR7B, #p < 0,05 vs. Pré SHR7B.

A pressão arterial diastólica (PAD, Figura 32) não aumentou em ambos os grupos controle CSI com 7 dias ($137 \pm 12,5$ mmHg) e CSI 14 dias (134 ± 10 mmHg) de treinamento, quando comparados a si mesmos no pré-tratamento (préCSI - $117 \pm 0,6$ mmHg). Também não houve diferenças para os grupos SHR7B ($121 \pm 4,3$ mmHg), SHR14B ($127 \pm 14,7$ mmHg) e SHR14A (112 ± 14 mmHg) em relação a si mesmos nos pré tratamento (préSHR14B: 122 ± 14 mmHg, préSHR14A: $105 \pm 5,9$ mmHg). Houve aumento significativo apenas para o grupo SHR7A ($153 \pm 2,1$ mmHg p < 0,05) comparado a si mesmos no pré-tratamento (préSHR7A - $101 \pm 0,7$ mmHg).

Figura 32: Pressão arterial diastólica de SHR tratados com pré-miRNA-29c (mm/Hg) obtida por pletismografia de cauda. SHR – ratos espontaneamente hipertensos. SHR-pré – animais hipertensos pré-tratamento, CSIpré – Controle sem inserto pré-tratamento (n=2). CSI7D – Controle sem inserto 7 dias de tratamento, CSI14D – Controle sem inserto 14 dias de tratamento (n=2), préSHR7B – SHR7B pré-tratamento, SHR7B (n=2), SHR7B – tratados com baixa dose após 7 dias (n=3); préSHR7A – SHR7A pré-tratamento, SHR7A – tratados com alta dose após 7 dias (n=3); SHR14B – tratados com baixa dose após 14 dias (n=3); SHR14A – tratados com alta dose após 14 dias (n=3); CSI – controle sem inserto (n=2) Análise de variância para medidas repetidas. *p<0,05 vs. préSHR7B.

Os resultados de pressão média foram similares aos de pressão diastólica, não houve aumento para nenhum grupo experimental, com exceção do SHR7A ($162,3 \pm 3,5$ mmHg $p > 0,05$) comparado a ele mesmo no pré-protocolo préSHR7A (113 ± 5 mmHg). O restante dos grupos não apresentou aumento ou diminuição comparados a si mesmos antes do protocolo (préCSI, $128 \pm 3,4$ mmHg; CSI7D, $144,6 \pm 11,8$ mmHg; CSI14D $140,3 \pm 12,3$ mmHg; préSHR7B 124 ± 10 mmHg; SHR7B $137 \pm 7,5$ mmHg; préSHR14B, $122 \pm 14,5$ mmHg; SHR14B, $127 \pm 14,8$ mmHg; préSHR14A, $106 \pm 7,9$ mmHg; SHR14A, $130 \pm 15,2$ mmHg).

8. DISCUSSÃO

Os principais resultados desse estudo mostram que o TF induziu HC fisiológica que foi dependente do volume de treinamento e acompanhada pela mudança na expressão de 15 miRNAs. A mudança de expressão de 4 miRNAs selecionados foi antagônica à mudança na HA. Entre estes miRNAs o miRNA-29c, que é relacionado ao controle da fibrose, foi selecionado e foi superexpresso em SHR. O aumento a expressão do miRNA-29c em SHR jovens, preveniu o aumento da PA, diminuiu o conteúdo de colágeno cardíaco e induziu a um remodelamento benéfico no VE, resultados que sugerem que há potencial terapêutico na modulação *in vivo* do miRNA-29c.

8.1. Marcadores de Treinamento Físico

O TF aeróbio induz adaptações cardiovasculares, metabólicas e hemodinâmicas, responsáveis pela melhora do rendimento físico (Urhausen & Kindermann, 1999; Pluim, Zwinderman et al. 2000; Medeiros, Oliveira et al, 2004; Soci, Fernandes et al, 2011). Para determinar a eficiência em produzir adaptações aeróbias nos grupos de animais treinados, foram medidos os principais marcadores fisiológicos de TF: a melhora na capacidade de trabalho aeróbio representada pela maior tolerância à realização de esforço e o VO₂ pico, a bradicardia de repouso e a atividade da citrato sintase.

Os resultados mostram que o TF induziu bradicardia de repouso sem alterações na PA. Os resultados de bradicardia de repouso confirmam a eficiência do protocolo de treinamento utilizado em promover as adaptações já relatadas na literatura, sendo explicado principalmente por uma maior estimulação vagal pós-treinamento. Esta adaptação da FC perante o TF de natação normalmente é diferente da encontrada no

treinamento de corrida em esteira rolante, que induz a bradicardia principalmente pela diminuição na FC intrínseca ou uma redução da condução átrio-ventricular. Esta diferença de magnitude pode ser explicada pelo tipo de treinamento, já que a posição do animal difere do treinamento de corrida, pela posição do animal na água, pela pressão hidrostática e a termorregulação na água, que difere da termorregulação fora dela (Medeiros, Oliveira et al. 2004).

Estudos mostram que a resposta de PA permanece inalterada em animais normotensos submetidos ao TF (Medeiros, Oliveira et al, 2004, Soci Fernandes et al, 2011). No presente estudo, este resultado se reproduziu e não houve diferença significativa na PA entre os grupos S, P1 e P2, mostrando que o TF não modifica a PA em repouso de animais normotensos e que esse efeito não parece ser inerente ao tipo de TF empregado quando comparado à modalidade em esteira com a natação, nem espécie dependente. Entretanto, a mudança pode ser condicionada ao nível inicial de PA, uma vez que sujeitos hipertensos apresentam redução da PA com TF aeróbio (Melo, Martinho & Michelini et al., 2003).

O aumento na capacidade oxidativa muscular esquelética é uma adaptação metabólica bem estabelecida e um bom marcador para a eficiência de treinamento (Urhausen & Kindermann, 1999). A enzima Citrato Sintase é uma enzima regulatória do Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos que catalisa a conversão de Acetil-CoA e Oxalacetato, em Ácido Cítrico. Em nosso estudo foi encontrado a atividade da Citrato Sintase no músculo sóleo, aumentou 46% para P1 e 105% para P2.

No pós-treinamento o VO₂ pico, ou o consumo de O₂ foi aumentado em ambos os grupos treinados em relação a S. O aumento do consumo de oxigênio de pico com o TF aeróbio ocorre devido a diversos fatores: aumento da capilarização, aumento da diferença arteriovenosa e aumento do débito cardíaco durante o exercício (Este

resultado reforça a eficiência de ambos os protocolos de treinamento em promover adaptações metabólicas e hemodinâmicas relacionadas à melhora da capacidade aeróbia (Urhausen & Kindermann, 1999; Pluim, Zwinderman et al. 2000).

O teste de tolerância ao esforço foi outro parâmetro para comprovar a eficácia do TF. Os resultados do teste realizado pré e pós 10 semanas de protocolo mostraram que os grupos apresentavam o mesmo desempenho físico comparado ao início do TF; entretanto pós-TF houve uma melhora significativa de desempenho em P1 e P2 comparados a eles mesmos no pré-TF e aos animais controle tanto no pré quanto no pós-TF.

A bradicardia de repouso, juntamente a um aumento no consumo de O₂, do tempo do Teste de Esforço máximo e da atividade da Citrato Sintase muscular esquelética confirmam a efetividade de treinamento dos protocolos adotados sendo marcadores que denotam a melhora de capacidade aeróbia dos animais. (Medeiros, Oliveira et al. 2004, Oliveira, Sasaki et al. 2009).

8.2 Índices de Hipertrofia Cardíaca

Os resultados são consistentes mostrando que os protocolos de treinamento físico adotados foram eficientes para induzir um aumento de massa do VE, e que este aumento foi volume-dependente, ou seja, quando a frequência de treinamento foi aumentada, a HC em resposta ao treinamento também foi aumentada. Realmente, a HC induzida pelo TF é considerada fisiológica e desenvolvida de forma simétrica no coração, sendo que as mudanças estruturais são dependentes da natureza, duração, frequência e intensidade do exercício realizado (Urhausen & Kinderman, 1999; Pluim, Zwinderman et al, 2000). A HC é um mecanismo compensatório, caracterizado principalmente pelo aumento do comprimento e diâmetro dos CMO, responsável pela

manutenção da tensão na parede ventricular em níveis fisiológicos (Urhausen & Kinderman, 1999, Pluim, Zwinderman et al. 2000, McMullen & Jennings, 2007). Brandão, Wajngarten et al, (1993), mostraram que o TF aumenta a velocidade máxima de enchimento do VE, sugerindo que o indivíduo treinado possui uma capacidade de acomodar maior volume de sangue na mesma frequência cardíaca que o não treinado. Esses fatores tendem a melhorar a eficiência cardíaca nos atletas contribuindo para melhora do rendimento físico. De fato, os resultados aqui encontrados coincidem com os da literatura, em que o TF aeróbio promoveu HC com aumento do diâmetro dos CMO no grupo P1 (Medeiros, Oliveira et al, 2004). Além disso, observa-se que o grupo P2 promoveu uma hipertrofia de maior magnitude, sugerindo que esta resposta exacerbada frente ao aumento da frequência e do volume de TF pode refletir ainda mais a melhora da capacidade de trabalho aeróbio.

Neste sentido, um critério utilizado para diferenciar a HC fisiológica da patológica é a relação entre o tamanho do coração e o rendimento físico no teste ergométrico, ou mesmo a massa do VE com o VO₂ máximo. Neste estudo houve correlação positiva e significativa entre o aumento da massa cardíaca induzido pelo treinamento e o aumento do consumo de O₂, o que sugere que esta HC é fisiológica e relacionada com uma melhora do desempenho e de função cardíaca nos animais treinados (Iemitsu, Miauchi et al, 2001; McMullen & Jennings, 2007).

8.3. Função Cardíaca por Ecodopplercardiografia

Entre os métodos não invasivos a ecocardiografia tem se mostrado bastante útil para avaliar a função cardíaca na pesquisa experimental, por ter boa acurácia, ser de custo acessível, de fácil portabilidade, e exigir pouco consumo de tempo para a aquisição e interpretação das imagens (Graziosi, 1998). Nesse contexto, o método

Doppler é utilizado para analisar a curva de velocidade do fluxo sanguíneo de uma determinada região do coração ou de algum vaso. O Doppler é um método efetivo para avaliar a função cardíaca, tendo evoluído muito nos últimos 30 anos (DeMaria & Wisenbaugh 1987).

Nos resultados do presente estudo houve diminuição do TDE e do IPM para ambos os grupos treinados e do TRIV para P2. Adicionalmente a relação E/A foi aumentada no grupo P2, o que sugere que houve uma melhora de função diastólica, já que os parâmetros sistólicos não apresentaram diferença significativa.

A função primordial do coração é suprir oxigênio e substratos metabólicos aos tecidos periféricos. Para isso o órgão serve-se de diversos eventos mecânicos contidos no ciclo cardíaco, passíveis de serem avaliados pela análise ecodopplercardiográfica (Fukuta & Little 2008).

O ciclo cardíaco compreende a sístole e a diástole, ou o período de contração e relaxamento do coração. A sístole é definida como o período que vai do fechamento da válvula mitral, que separa as cavidades esquerdas do coração, até o fechamento da válvula aórtica, ou a contração isovolumétrica e a ejeção (Fukuta & Little, 2008).

A diástole, ou relaxamento cardíaco, corresponde ao restante do ciclo e compreende 4 fases: relaxamento isovolumétrico, enchimento diastólico inicial (pico de onda E), diástase e enchimento atrial (pico de onda A)(Fukuta & Little, 2008).

O relaxamento isovolumétrico representa uma medida de tempo na análise ecocardiográfica denominada TRIV (tempo de relaxamento isovolumétrico). Este período tem início no fechamento da válvula aórtica e termina na abertura da válvula mitral. A válvula aórtica se fecha após a finalização da ejeção sistólica quando a pressão do VE cai abaixo da pressão aórtica. Durante a fase de relaxamento isovolumétrico a pressão intraventricular continua a cair, e concomitantemente o volume do VE

permanece constante. Os eventos que acontecem nessa fase correspondem ao relaxamento miocárdico, processo que envolve a retirada de Cálcio intracelular e envolve gasto energético. No entanto, é um momento curtíssimo em que a miofibrila permanece em estado de “repouso” onde a cavidade ventricular tem sua geometria modificada, mas o seu volume permanece constante (Graziozi, 1998).

Esta medida de tempo é realizada no período da queda de pressão no VE até ser menor que a da pressão atrial para possibilitar a abertura da válvula mitral. Nos resultados do presente estudo o tempo de queda foi menor no grupo P2, fenômeno que pode ser explicado por uma menor rigidez ou uma maior rapidez para assumir a conformação relaxada o que sugere maior maleabilidade da cavidade ou melhora na complacência ventricular.

A fase seguinte, de enchimento rápido do VE, tem início com a abertura da válvula mitral, ocorrendo quando a pressão do VE cai abaixo da pressão do átrio esquerdo. Nesse instante a passagem do fluxo é feita passivamente, e mesmo com a permanência do VE e do átrio esquerdo em estado relaxado, o rápido enchimento do VE faz com que a pressão intraventricular aumente gradualmente. Em termos fisiológicos há uma complexa interação entre o fenômeno de “sucção ventricular” (“*elastic recoil*”) decorrente do relaxamento e da queda de pressão somados às propriedades viscoelásticas músculo cardíaco, que em conjunto, são conceituadas como complacência ventricular (Zile, 1992).

A medida do pico E é uma medida de velocidade de fluxo passivo, no momento em que o VE se enche de sangue e está em diástole, e corresponde ao enchimento diastólico inicial. Quanto maior for o valor de Pico E, mais rápido ocorre enchimento do VE, o que denota uma maior complacência ventricular, ou uma menor resistência à acomodação do volume de sangue que passa, antes da contração atrial, para

o VE.

Após o enchimento do VE se iniciar, o gradiente de pressão desde o átrio esquerdo em relação ao VE diminui e transitoriamente se reverte. Esta reversão desacelera e então cessa o fluxo rápido de sangue no VE durante a diástole. Essa fase chama-se diástase e corresponde ao momento em que a pressão entre o átrio esquerdo e VE se equilibra e o fluxo mitral cessa momentaneamente. (Fukuta & Little, 2008).

A fase subsequente é a de velocidade de enchimento lento do ventrículo (pico A). Nesse momento a pressão do átrio aumenta produzindo um 2º gradiente de pressão que novamente propela sangue para o interior do VE, causando o início do fechamento da válvula mitral. Quando a velocidade do Pico A aumenta, ocorre maior contração atrial para completar a passagem do fluxo de sangue.

O pico A corresponde à aproximadamente 15% do sangue remanescente que não se propagou passivamente pela fase anterior (Pico E). Quando a velocidade do pico A aumenta significa que a quantidade de sangue remanescente foi maior, ou que o fluxo gerado na fase passiva (pico E) foi menor, o que demanda maior exigência de contração atrial, para fazer passar o fluxo remanescente (Graziosi, 1998).

O aumento a relação E/A no grupo P2 denota que o enchimento do VE está ocorrendo mais às custas do relaxamento no pico E, que da contração Atrial (pico A) o que sugere também uma maior complacência do VE pela maior acomodação de fluxo no período passivo.

Outra medida de função diastólica é o Tempo de desaceleração da onda E - TDE. Se o TDE diminui, conforme mostram os resultados, é sugerida uma menor resistência ao volume de sangue nas paredes, e assim também mais rápido este volume se acomoda no VE em diástole, conforme mostram os resultados.

O IPM é o índice de função global do coração, e é uma medida que independe

de pré-carga. Esta medida ecocardiográfica tem sido bastante utilizada para a análise funcional do VE, pois mistura parâmetros sistólicos e diastólicos (Salgado, Albanesi Filho et al. , 2004).

O IPM consiste na soma do tempo de relaxamento isovolumétrico e do tempo de contração isovolumétrica, dividida pelo tempo de ejeção do VE, tendo duas medidas isovolumétricas no numerador da fórmula, que quando estão com função melhorada caem. Mesmo se o TEJ (tempo de ejeção), que é uma medida de sístole, não se modificar, significa uma função melhorada quando o valor diminui, já que ambos os tempos em que o VE permanece em um mesmo volume, tanto para contrair quanto para relaxar diminuem, o que denota tanto uma menor resistência para relaxar, a maior rapidez para contrair, processos que estão interligados (Salgado, Albanesi Filho et al, 2004).

Os resultados de TRIV, relação E/A e TDE para os grupos treinados consistem desta forma, em evidências de que o treinamento físico aeróbio, particularmente o de alto volume, induziu uma melhora na complacência ventricular e função diastólica dos animais.

Em nossos resultados foram obtidas diversas diferenças que sugerem juntas que o padrão de fluxo na entrada do VE foi melhorado, ou seja, que os protocolos de TF, particularmente o de alto volume melhorou a eficiência do enchimento ventricular, que correspondem à fase da diástole onde as diferenças foram apresentadas.

Realmente, os resultados do presente estudo são concordantes com estudos realizados com sujeitos que permaneceram com alto volume de treinamento durante a vida. Bhella (2014), em um recente estudo avaliou a função cardíaca de mulheres e homens com vários graus de comprometimento com o TF de diversas modalidades. O autor separou seus grupos experimentais de acordo a diversos graus de atividade no qual

permaneceram engajados pelos 25 anos anteriores de vida: atletas, ativos, praticantes casuais, e sedentários. A função cardiopulmonar desses sujeitos foi medida por Ressonância Magnética cardíaca, teste de estresse pulmonar, cateterização cardíaca e também por ecodopplercardiografia transtorácica. Os resultados mostram claramente o impacto do volume do TF na complacência e no volume sistólico. Os atletas, à semelhança do que foi encontrado em nossos resultados, apresentaram um grande decréscimo na rigidez ventricular induzida pelo envelhecimento, o que se refletiu numa melhora de função diastólica, de débito cardíaco, associada com HC, e uma melhora no consumo de O₂, embora os parâmetros sistólicos não tenham sido modificados pelo grau de treinamento ao longo da vida. Os mesmos resultados são apresentados e discutidos em outros estudos mostrando à semelhança de nossos resultados o TF é capaz de melhorar a função diastólica e que tem um impacto positivo na saúde cardiovascular durante o ciclo de vida de humanos e animais (Lew, 2014, Carrick-Ranson, Hastings et al, 2014; Soci, Fernandes et al; 2011; Fernandes, Hashimoto et al, 2011).

8.4. Expressão Gênica de Marcadores Moleculares de Hipertrofia Cardíaca

Os resultados do presente estudo mostram que o TF não induziu ao aumento dos marcadores de HC patológica. Além disso, o aumento do volume do treinamento induziu a uma melhora no padrão desses genes, já que aumentou a relação α/β -MHC e reduziu a expressão cardíaca de α -actina esquelética o que mostra que a HC, além de dependente da quantidade de estímulo é caracterizada como uma HC fisiológica.

O processo de HC é bastante complexo, envolvendo a geração de sinais na membrana celular que ativam vias de sinalização intracelular, as quais regulam a atividade gênica e sua tradução em proteínas, que viabiliza a hipertrofia do

cardiomiócito. O crescimento dos miócitos pode ocorrer em resposta a estímulos mecânicos, neurais e hormonais, e é efetivado pela síntese de novos sarcômeros, com aumento da espessura ou do comprimento das miofibrilas e também em seu número.

É conhecido também que ocorrem modificações nas proporções de isoformas de actina e miosina, expressas para adequar a velocidade e força de contração necessárias ao processo de adaptação frente ao estímulo de hipertrofia. (Iemitsu, Miauchi et al, 2001; McMullen & Jennings, 2007; Chien, Knowton et al., 1991, Izumo, Nadal Ginard et al., 1988).

Na HC patológica de pequenos roedores observa-se um padrão de expressão gênica característicos do período fetal, com aumentos da expressão da α -actina esquelética, β -MHC e ANF. Estudos relatam que a reexpressão desses genes fetais participam da gênese das transformações fenotípicas observadas na hipertrofia patológica, embora seu significado fisiológico no ventrículo permaneça desconhecido. O aumento na expressão da β -MHC determina mudança na capacidade contrátil do miocárdio, com diminuição na velocidade de encurtamento dos sarcômeros em patologias cardíacas (Chien, Knowton et al., 1991; Izumo, Nadal Ginard et al., 1988, Baraúna, Magalhães et al., 2008).

Por outro lado, a HC induzida pelo TF em animais experimentais tem mostrado um perfil de expressão desses genes diferente da patológica (Baraúna, Magalhães et al. 2008; Soci, Fernandes et al., 2011). Scheinowitz, Kessler Icekson et al, (2003), encontraram uma diminuição na expressão da β - MHC no coração de ratos submetidos a TF de natação por apenas duas semanas. Resultados similares foram observados com o TF realizado em esteira (Jin, Yang et al., 2000), que também foram semelhantes ao encontrado no presente estudo em que o grupo P1 não apresentou nenhuma alteração na expressão gênica desses mediadores patológicos. Entretanto, foi possível observar uma

melhora neste perfil gênico com o grupo P2, o evidência que o aumento do volume de TF promoveu adaptações moleculares importantes, relacionadas à melhora da condição aeróbia, pois a expressão do gene da α -MHC representa uma maior velocidade de encurtamento dos sarcômeros. Foi, também observada redução da expressão de β -MHC, indicando uma relação α/β -MHC aumentada, que pode ser responsável, em parte, pelo aumento das propriedades contráteis do miocárdio induzidas pelo TF.

Finalmente, este conjunto de resultados mostra que a HC induzida pelo treinamento apresenta um perfil molecular diferente do observado em patologias hipertróficas. Estas características moleculares em conjunção com a contratilidade preservada e com uma melhora da função diastólica (Ver Tabela 3), podem distinguir a HC fisiológica apresentada nesse estudo da HC patológica, a qual progressivamente apresenta prejuízo de função sistólica e diastólica devido à perda na propriedade de contratilidade e aumento na expressão proteica de colágeno e outros componentes da matriz extracelular (Heinecke & Molketin, 2006; McMullen, Shioi et al., 2003; McMullen & Jennings, 2007).

Os resultados mostram que a HC induzida pelos protocolos de treinamento não foi concomitante com a expressão de genes patológicos como ANF, α -actina muscular esquelética e β -MHC. Adicionalmente, a HC foi concomitante com um aumento na expressão de α -MHC, e também função sistólica preservada e a melhora da função diastólica foi evidente, o que pode ter influência direta da complacência ventricular e na capacidade de acomodar um maior volume de sangue (aumento de pré-carga) uma adaptação decorrente do TF aeróbio bastante conhecida (Izumo, Nadal Ginard et al., 1988).

8.5. Screening para escolha dos microRNAs

Realizamos o estudo de *screening*, com objetivo de selecionar os miRNAs passíveis de serem terapeuticamente modulados no coração de SHR, que regulassem fenômenos biológicos relevantes para a HC. Essa seleção foi feita através da observação do padrão de mudança na expressão desses miRNAs. Os miRNAs com potencial terapêutico foram selecionados por ter um padrão de mudança de expressão antagônico induzido pela sobrecarga de volume intermitente (induzida pelo TF) e na sobrecarga pressórica contínua (induzida pela HA hipertensão arterial). Essa *screening* buscou selecionar aqueles miRNAs que fizessem a sintonia fina entre a HC fisiológica e a HC patológica, uma vez que ambos os processos tem muitos miRNAs reguladores em comum. O primeiro estudo na literatura que modulou miRNAs regulatórios da HC fisiológica e patológica mostrou, em camundongos, que a superexpressão de AKT, a constrição transversa da aorta e o TF intervalado de alta intensidade, que haviam miRNAs com padrão de mudança comum aos dois tipos de HC, patológico e fisiológico (Carè, Catalucci et al, 2007). Realmente, resultados consistentes mostram que os miRNAs-1, 133a e 133b também tem papéis significantes no remodelamento, hipertrofia e funções cardíacas, parecendo fazer parte de um programa geral de hipertrofia, com função de estimular a síntese de proteínas (Carè et al., 2007; Catalucci et al., 2009; Latronico & Condorelli, 2009; Van Rooij et al., 2008; Van Rooij & Olson, 2007; Van Rooij et al., 2007).

O presente estudo considerou como miRNAs com grande potencial terapêutico na HA, aqueles que apresentavam em SHR, padrão de expressão antagônico ao da HC induzida pelo TF, uma vez que na sua regulação na HC fisiológica e patológica, pode estar a chave dos mecanismos de “sintonia fina” que diferenciam entre a HC fisiológica e a patológica.

Desta maneira, dos 15 miRNAs selecionados pelo grau, magnitude de diferença de expressão e com padrão de mudança similar ao fenótipo de HC foram analisados finalmente aqueles que apresentavam padrão de mudança diferente na HA : **miRNAs-126, 27a , 27b, e 29c.**

Estudos previamente publicados por nosso e outros grupos de pesquisa mostram uma relação destes miRNAs com outros processos biológicos relacionados com o TF. O miRNA-126 possui relação direta com a angiogênese, com os alvos já validados PI3KR2 e SPRED1, reguladores negativos das vias angiogênicas cardíacas ativadas por VEGF e também com a rarefação vascular na HA. (da Silva Jr, Fernandes et al., 2012) Os miRNAs-27a e 27b também apresentam relação com a HC, tendo sido mostrada uma forte relação com a enzima conversora de angiotensina I (ACE) alvo predito pelo sites de predição MiRanda, TargetScan e Diana e também possui alvos recentemente validados com os mRNA do fator de transcrição GATA2 na diferenciação hematopoiética e fator inflamatório IL10, envolvido na apoptose cardíaca, além da metaloproteinase 13 (MMP13) em articulações com osteoartrite (Fish, Santoro et al, 2008; Akhtar et al., 2010, Fernandes, Magalhães et al. 2012; da Silva, Fernandes et al., 2012, Fernandes, Hashimoto et al. 2011, Ahn, Higashi et al. 2013, Yeh, Aloia et al., 2012).

Outro importante alvo do miRNAs-27a e 27b, com relação mais estabelecida na hipertrofia muscular esquelética é a miostatina ou GDF8 (*growth and differentiation factor 8*) (Yang, Chen et al. 2014, Allen & Loh, 2011; Miretti, Martignani et al, 2013). Embora o papel da miostatina no coração permaneça controverso e pouco estudado, discute-se atualmente que sua inibição tem papel na ativação parácrina dos fibroblastos cardíacos, estando envolvida com a ocorrência de HC, de fibrose cardíaca e regulação metabólica cardíaca (Cohn, Liang et al, 2007; Jiao, Yuan et al., 2011; Biesemann,

Mendler et al., 2014).

A expressão do miRNA-29c aumentou 52% para P1 e 128% to P2 comparado ao grupo S, o que confirma os resultados de miRNAarray. Interessantemente a linearidade da mudança de expressão do miRNA-29c também foi demonstrada através da técnica de real time-PCR. Este resultado, além do fato do mRNA do COLIAI e COLIIIAI, determinantes para a HC patológica, serem alvos diretos do miRNA-29c foi decisivo para a seleção do miRNA-29c como alvo de escolha para ser modulado *in vivo*, já que houve linearidade de mudança de expressão em relação a ambos os protocolos se apresentou também quando a confirmação foi feita por real time-PCR. Isso sugere que o miRNA-29c é responsivo tanto a sobrecarga induzida pelo TF quanto à induzida pela HA, e o caracteriza como elegível para a modulação *in vivo*.

Diversos estudos têm demonstrado que a família dos miRNAs-29 (miRNA-29 a, b, e c) estão envolvidos na regulação da fibrose em doenças como nefropatia no diabetes, infarto do miocárdio, esclerose sistêmica e condropatias, enfim uma variedade de doenças fibróticas (Wang, Komers al. 2012; Ge, Chen et al., 2011, Maurer, Stanczyk et al., 2010, Van Rooij, Thatcher et al., 2008). Esta família apresenta alta expressão em fibroblastos cardíacos e tem envolvimento comprovado na regulação de colágeno e de outras proteínas da matriz extracelular cardíaca como fibrilina and elastina (Van Rooij et al. 2008).

Sendo a expressão de COLIIIAI e COLIIIAI determinante para diferenciar a HC fisiológica da patológica, foi feita a opção de realizar a modulação *in vivo* do miRNA-29c em SHR, modelo animal que notadamente apresenta HC patológica, induzida por sobrecarga pressórica crônica, com fibrose cardíaca e alta expressão de COLIAI e COLIIIAI (Monopoli & Ongini, 1994; Pei, Meng et al., 2010).

8.6. Expressão de Colágeno Cardíaco e sua relação com miRNA-29c em resposta ao treinamento físico aeróbio

O colágeno total cardíaco abrange isoformas dentre as quais o COLIAI e COLIAIII são as mais abundantes. O colágeno é a principal proteína na matriz extracelular e essas duas isoformas contribuem sobremaneira para a produção de matriz extracelular cardíaca: 85% do colágeno cardíaco é do tipo I e 11% do tipo III. Embora outros componentes desempenhem funções na constituição da matriz extracelular o colágeno do tipo I e do tipo III são importantes, já que compreendem um conjunto de proteínas estruturais bastante abundante, que desempenham um papel fundamental na intrincada organização tridimensional da matriz extracelular cardíaca, que por sua vez desempenha importante função na integridade funcional e estrutural cardíaca (Deb & Ubil, 2014).

A expressão de colágeno é um processo bastante complexo envolvendo vários passos enzimáticos: 1) produção do mRNA de colágeno de cada cadeia α , 2) síntese ribossômica de cadeias pró- α do colágeno com os peptídeos, 3) hidroxilação, 4) glicosilação, 5) formação de triplas hélices pró-colágeno. 6) secreção para o espaço extracelular, 7) conversão em moléculas menos solúveis, 8) montagem em fibrilas e 9) agregação dentro das fibras. No presente estudo o TF induziu HC e juntamente houve diminuição da expressão do colágeno cardíaco, tanto ao nível de mRNA, quanto no protéico. Esse aumento foi acompanhado de uma melhora na função diastólica dos animais treinados, o que reforça o efeito protetor do TF aeróbio para o coração.

Adicionalmente, apresentamos evidências que o TF aeróbio foi capaz de induzir

à HC fisiológica, que este remodelamento foi benéfico para a função cardíaca, e tem relação com a diminuição do conteúdo de colágeno cardíaco, que foi regulado, pela família de miRNAs a que pertence o miRNA de escolha para tratar os animais SHR: o miRNA-29c.(Soci, Fernandes et al.2011).

Em contraste, em condições fisiológicas, os CMO são circulados por uma fina rede de fibras de colágeno, que funciona como parte de um anteparo de tecido conjuntivo para sustentar as fibras musculares cardíacas e outros tipos de células. (Van Rooij, Thatcher et al., 2008; Van Rooij, Marshall & Olson, 2008).

As sessões de TF aeróbio consistem na aplicação de sobrecargas de volume intermitentes no coração e a resposta hipertrófica, neste caso, foi acompanhada por uma diminuição na expressão de colágeno, o que teve papel protetor sobre a complacência ventricular e se refletiu na melhora de função diastólica (Soci, Fernandes et al, 2011).O miRNA-29c foi desta forma selecionado, por obedecer os critérios no “*screening*” de miRNAs, por ser responsivo a ambos os estímulos, TF aeróbio e HA, de forma antagônica e por possuir um papel regulatório importante para o colágeno cardíaco. O mecanismo de regulação da fibrose pelo miRNA-29c pode fornecer uma base lógica terapêutica, tanto para os efeitos do treinamento físico, como também para a modulação terapêutica, podendo esclarecer adicionais mecanismos de causa e efeito em doenças cardiovasculares, como a HA.

8.7. Transfecção *in vivo* do vetor lentiviral de superexpressão do miRNA-29c no coração de SHR.

Em todas as doenças cardiovasculares hipertróficas há um aumento aberrante da expressão das isoformas de colágeno, principalmente do tipo I e do tipo III. A contenção da fibrose é um desafio terapêutico muito almejado, principalmente devido ao seu

prejuízo na função diastólica cardíaca (Jugdutt, 2003, Van Rooij, Thatcher et al, 2008; Van Rooij, Marshall & Olson, 2008).

A expressão de colágeno cardíaco aumenta em resposta a lesões ou sobrecargas contínuas de pressão e de volume sobre o coração (Van Rooij, Thatcher et al, 2008; Van Rooij, Marshall & Olson, 2008). Os fibroblastos cardíacos, em resposta ao estresse patológico, são ativados e expressam proteínas de matriz extracelular de forma desproporcional, produzindo fibrose, que causa rigidez mecânica e contribui para disfunção na diástole cardíaca e possui participação no remodelamento patológico, devido ser parcialmente responsável por aumentos no tamanho do coração (Jugdutt, 2003).

Para testar o potencial terapêutico antifibrótico do miRNA-29c, a transfecção do vetor contendo o pré-miRNA-29c foi realizada pela injeção intramuscular, no coração, dos animais SHR jovens, com 2,5 meses de idade. A presença de GFP e desta forma a eficiência da transfecção foi confirmada por *western blott* em coração e fígado dos animais, eutanasiados 7 e 14 dias após a cirurgia. Observamos que os grupos de baixa dose apresentaram maior expressão da proteína GFP que os grupos tratados com alta dose, o que nos fez definir a menor dose como a dose para próximas infusões.

Além disso, o tratamento apresentou um efeito benéfico para a PA para os animais jovens, pois no período de duas semanas os animais tratados não apresentaram aumento de PA, embora os controles tenham apresentado aumento significativo. O efeito sobre a PA nos animais tratados foi melhor quando os animais foram tratados por mais tempo, o que sugere que em próximas infusões de vetor lentiviral deve ser observado um maior período de tratamento. Assim optamos por prolongar o tratamento em intervenções futuras, utilizando a dose mais baixa de partículas virais, que foi mais eficiente em transduzir as células cardíacas. Este efeito ocorreu apenas ao comparar os

mesmos animais do grupo no pré e no pós-protocolo, o que sugere que foi um efeito dependente do tempo de tratamento.

Os principais resultados deste estudo mostram que o aumento da expressão do miRNA-29c em SHR induziu a um remodelamento diferente do encontrado do patológico, uma vez que houve aumento do diâmetro dos CMO, e uma diminuição do peso do VE e do coração corrigido pelo PC. Este remodelamento parece ter relação com a diminuição da expressão de colágeno do tipo I.

A diminuição da massa cardíaca, foi de 7% a 15,2% dependendo do grupo experimental e da medida e pode ter refletido a diminuição do colágeno I, da magnitude de 57 a 77% no VE. Relata-se que 85% do colágeno total cardíaco é do tipo I o qual é associado principalmente com fibras espessas que conferem força tensora e resistência a estiramento e deformação, enquanto 11% do colágeno total é do tipo III, que não se modificou e é associado com fibras mais finas e resilientes (Phillips & Wenstrup, 1992). Assim a diminuição da massa do coração dos animais tratados pode estar associada à do o colágeno do tipo I, alvo validado do miRNA-29c, o mais expresso em situações fisiológicas e também com o remodelamento está avançado, o que também ocorre na HA (Judgett, 2014). O aumento dos CMO dos animais tratados necessita ser mais investigado, para delinear melhor que tipo de componentes estão mais expressos, para causar o aumento do tamanho da célula cardíaca, e assim melhor caracterizar o tipo de HC produzida. É bem estabelecido que embora os CMO representem 25% do conteúdo celular cardíaco, eles correspondem a 90% da massa cardíaca, e a magnitude de aumento foi da magnitude de 27-38% entre os animais tratados comparados a seus controles. Aqui observamos que embora os CMO tenham aumentado de diâmetro houve uma diminuição da massa cardíaca, provavelmente relacionada com o menor conteúdo de colágeno no coração.

Observamos, de fato que o tratamento foi capaz de aumentar a expressão do miRNA-29c em todos os grupos tratados e que este aumento se refletiu em uma diminuição da expressão gênica do colágeno do tipo I no VE. Essa diminuição foi confirmada pela análise da fração volumétrica do colágeno no VE, mostrando que os animais tratados apresentavam um conteúdo total de colágeno menor no coração, devido à diminuição do colágeno do tipo I. É estabelecido que animais SHR apresentam HC, acompanhada de uma fibrose cardíaca pronunciada, que tanto o colágeno tipo I quanto tipo III aumentam de expressão, contribuindo sobremaneira para a disfunção e para a mortalidade (Monopoli & Ongini, 1994; Pei, Meng et al., 2010, Jugdutt, 2014). Os resultados mostram que o tratamento *in vivo* com o vetor lentiviral que aumentava a expressão do miRNA-29c foi capaz de reverter parte do processo fibrótico através do aumento da expressão do miRNA-29c em SHR, o que pode ter efeitos na função cardíaca.

Realmente, um estudo recente estudo mostrou que animais tratados com Angiotensina II, uma molécula chave para a vasoconstrição e a fibrose, induziu a um aumento da fibrose cardíaca, e que este aumento ocorria devido a estimulação da via de sinalização do TGF- β . O fator de transcrição ativado por esta via, SMAD3, é capaz de inibir a expressão do miRNA-29b (membro da família do miRNA-29c, com a região *seed* idêntica) induzindo assim a um aumento da expressão do colágeno cardíaco. O mesmo estudo mostrou a transfecção do vetor com o miRNA-29b em camundongos tratados com Angiotensina II diminuía a expressão de COL1A1 e ao contrário, aqueles que tinham o miRNA-29b inibido, apresentavam um aumento de fibrose (Zhang, Huang et al, 2014). O mecanismo apresentado no estudo citado já foi mostrado também na fibrose renal o que pode explicar em parte os resultados apresentados aqui, já que os

SHR apresentam a via do TGF β ativada em relação a seus controles (Sun, Jin et al. 2014).

Os miRNAs da família 29 são muito expressos por fibroblastos cardíacos, tipos celulares que tem um papel central na recuperação em lesões no músculo cardíaco, tanto na deposição de matriz extracelular quanto na formação cicatricial após infarto. É bem estabelecida que a diminuição da expressão dos miRNAs-29 fornece a base do mecanismo para a formação de fibrose no infarto (Van Rooij, Sutherland et al., 2008).

Outro estudo mostrou que o agonista dos PPAR γ (receptor ativado por proliferador peroxissomos), pioglitazone, além de reduzir a área de infarto aumentava a sobrevida dos animais. Porém ao contrário do que mostramos aqui, foi a diminuição do miRNA-29c, não seu aumento que induziu a este aumento de sobrevivência. A superexpressão do miRNA-29c bloqueou o efeito cardioprotetor da droga, e foi relacionada com o eixo de ativação de longo prazo de PPAR γ /Akt/PI3K via supressão de p85, o que associa fibrose cardíaca e hipertrofia, embora aumente a resposta de sobrevivência (Ye, Hu et al., 2010). O papel terapêutico dos miRNAs-29 também parece ser tecido específico, uma vez que seu aumento parece também dessensibilizar a aorta para aneurismas e sua inibição torna o vaso mais sensível à formação de aneurismas (Boon, Seeger et al 2011). Outra publicação recente de nosso laboratório, mostrou em animais infartados que o treinamento físico de natação foi capaz de restaurar a expressão do miRNAs 29a e 29c e prevenir a expressão dos genes do COLIAI e COLIAII em ratos infartados, normalizando-a tanto na região remanescente quanto na borda do infarto, o que vai de encontro com os resultados de estudos pregressos, já publicados em nosso laboratório e do presente estudo (Soci, Fernandes et al, 2011; Melo, Fernandes et al., 2014).

9. CONCLUSÃO:

Concluindo, os resultados do presente estudo mostram que o miRNA-29c além de ter papel regulatório nos genes do colágeno cardíaco e envolvimento na melhora da complacência ventricular e função diastólica de animais treinados, parece ter um importante papel regulatório na fibrose cardíaca, contribuindo para prevenir o aumento da PA e para reverter o remodelamento patológico na HA.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Abramam K.A. & R.A. Dzhuganyan (1969). Athlete heart measurements. Theor Pract of Phys Cult 12: 27-29.
2. Ahn E.E., T. Higashi et al. (2013). SON protein regulates GATA-2 through transcriptional control of the microRNA 23a~27a~24-2 cluster. J Biol Chem. **288** (8):5381-8.
3. Akhtar N., Z. Rasheed et al. (2010). MicroRNA-27b regulates the expression of matrix metalloproteinase 13 in human osteoarthritis chondrocytes. Arthritis Rheum **62**(5):1361-71.
4. Allen D.L. & A.S. Loh. (2011). Posttranscriptional mechanisms involving microRNA-27a and b contribute to fast-specific and glucocorticoid-mediated myostatin expression in skeletal muscle. Am J Physiol Cell Physiol. **300**(1):C124-37.
5. Anghel TM & S.M. Pogwizd (2007). Creating a cardiac pacemaker by gene therapy. Med Biol Eng Comput. **45** (2):145-55.
6. Anversa P. & B. Nadal-Ginard. (2002). Myocyte renewal and ventricular remodelling. Nature, **415** (6868): 240-243.
7. Anversa, P., A. Leri, et al. (2002). Myocyte growth and cardiac repair. J Mol Cell Cardiol; **34** (2): 91-105.
8. Aoki H., S. Izumo et al.(2001). Signal transduction of cardiac myocyte hypertrophy. In: Heart Physiology and Pathology. San Diego, Academic Press: 1065-1086.

9. Arruda V.R., J. Schuettrumpf et al. (2004). Safety and efficacy of factor IX gene transfer to skeletal muscle in murine and canine hemophilia B models by adeno-associated viral vector serotype 1. Blood **103**(1): 85–92.
10. Barth, A.S., E. Kizana, et al (2008). Lentiviral Vectors Bearing the Cardiac Promoter of the Na⁺-Ca²⁺ Exchanger Report Cardiogenic Differentiation in Stem Cells. Mol Ther. **16**(5): 957–964.
11. Biesemann N., L. Mendler et al. (2014). Myostatin regulates energy homeostasis in the heart and prevents heart failure. Circ Res. **115**(2):296-310.
12. Bhella P.S., J.L. Hastings et al (2014) Impact of lifelong exercise "dose" on left ventricular compliance and distensibility. J Am Coll Cardiol. **64**(12):1257-66.
13. Barauna V.G., F.C. Magalhaes, et al. (2008). AT1 receptor participates in the cardiac hypertrophy induced by resistance training in rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. **295**(2):R381-7.
14. Barauna V.G., K.T. Rosa KT, et al. (2007). Effects of resistance training on ventricular function and hypertrophy in a rat model. Clin Med Res. **5**(2):114-20.
15. Barauna V.G., M.L. Batista et al (2005). Cardiovascular adaptations in rats submitted to a resistance-training model. Clin Exp Pharmacol Physiol. **32**(4):249-54.
16. Barringhaus, KG & P.D. Zamore. (2009). MicroRNAs: regulating a change of heart.

Circulation; **119**(16): 2217-2224.

17. Bergman I & R. Loxley R. (1970) New spectrophotometric method for the determination of proline in tissue hydrolyzates. Anal Chem; **42**(7): 702-706.
18. Bernardo B., W.L. Weeks et al. (2010). Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies. Pharm & Ther **128** (1): 191-227.
19. Blankinship M.J., P. Gregorevic & J.S. Chamberlain (2006). Gene therapy strategies for Duchenne muscular dystrophy utilizing recombinant adeno-associated virus vectors. Mol Ther **13**(2): 241–249.
20. Bouzeghrane F., D.P. Reinhardt, et al. (2005). Enhanced expression of fibrillin-1, a constituent of the myocardial extracellular matrix in fibrosis. Am J.Physiol Heart Circ Physiol, **289**(3):.H982-991.
21. Bove K.E., D.T.Rowland & R.C. Scott.(1966) Observations on the assessment of cardiac hypertrophy using a chamber partition technique. Circulation; **33**(4): 558-68.
22. Bradford M.M (1976). A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, New York, **72**:248-54.
23. Brandão M.U.P., M. Wanjgarten, et al. (1993). Left ventricular function during dynamic exercise in untrained and moderately trained subjects. J App Physiol, **75**(5): 1989-95.

24. Brennecke J., A. Stark et al. (2005). Principles of MicroRNA-Target Recognition. PloS Biology, **3**(3):e85.

25. Cai Y. & J.G., Mikkelsen (2014) Driving DNA transposition by lentiviral protein transduction. Mob Genet Elements. 23;4:e29591.

26. Callis T.E., K. Pandya et al. (2009). MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. J Clin Invest; **119** (9):2772-86.

27. Carè A.,D. Catalucci, et al. (2007). MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. Nat Med; **13**(5):613-618.

28. Carneiro-Júnior M.A., J.F Quintão-Júnior et al. (2014). Effect of exercise training on Ca²⁺ release units of left ventricular myocytes of spontaneously hypertensive rats. Braz J Med Biol Res. **29**;0:0.

29. Carreño J.E., F. Apablaza, et al. (2006). Cardiac hypertrophy: molecular and cellular events. Rev Españ de Cardiol, **59**(5): 473-486.

30. Carrick-Ranson G., J.L.Hastings et al. (2014). The effect of lifelong exercise dose on cardiovascular function during exercise. J Appl Physiol **116**(7):736-45.

31. Chang C.P. & B.G. Bruneau (2012). Epigenetics and cardiovascular development. Annu Rev Physiol. **74** (1):41-68.

32. Chen H.I., C.T. Hu & K.C. Chang. (1996). Characterization of arterial hemodynamics in rats with established hypertension. Chin J Physiol. **39**(1): 49-55.

33. Cheng C.Z & H.F. Lodish (2005). MicroRNAs as regulators of mammalian hematopoiesis. Seminars in Immunology **17**(2):155-165.

34. Cheng Y., R. Ji et al. (2007). MicroRNAs Are Aberrantly Expressed in Hypertrophy Heart: Do They Play a Role in Cardiac Hypertrophy? Am J Pathol; **170**(6): 1831-1840.

35. Chien K.R., K.U. Knowlton, et al. (1991). Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. FASEB J, **5**(15): 3037-3046.

36. Chomczynski P & N. Sacchi (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem; **162**(1):156-9.

37. Chroboczek J., F. Bieber & B. Jacrot. (1992). The sequence of the genome of adenovirus type 5 and its comparison with the genome of adenovirus type 2. Virology **186**(1): 280–285.

38. Cicogna AC, K.G. Robinson, et al. (1997). Role of myocardial contractile status and relaxation in ventricular dysfunction during the transition of heart hypertrophy to failure. Arq Bras Cardiol. **69**(6): 381-4. Portuguese.

39. Cohn, J.N., M.R. Bristow, et al. (1997). Report of the national heart, lung, and blood institute special emphasis panel on heart failure research. Circulation, **95**(4):766-770.

40. Cohn R.D., H.Y. Liang et al. (2007). Myostatin does not regulate cardiac hypertrophy or fibrosis. Neuromuscul Disord. **17**(4):290-6.

41. Colan S.D. (1997). Mechanics of left ventricular systolic and diastolic function in

physiologic hypertrophy of the athlete's heart. Cardiol Clin, **15**(3):355-72. Review.

42. Conlon I & M. Raff (1999). Size control in animal development. Cell, **96**(2): 235-244.
43. Cooper G., R.L. Kent et al. (1985). Hemodynamic versus adrenergic control of cat right ventricular hypertrophy. J Clin Invest. **75**(5):1403-14.
44. Cordes K.R., D. Srivasta (2009). MicroRNA regulation of cardiovascular development. Circ Res; **104**:724-732.
45. Couzin J. (2002). Breakthrough of the year. Small RNAs make big splash. Science, **298**(5602):2296-7.
46. Czech B & G.J. Hannon (2011). "Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes." Nat Rev Genet; **12**(1): 19-31.
47. Das, S., D. Bedja et al.(2014). miR-181c regulates the mitochondrial genome, bioenergetics, and propensity for heart failure in vivo. PLoS One **9**(5):e96820.
48. DA Silva ND Jr, T. Fernandes et al. (2012) . Swimming training in rats increases cardiac MicroRNA-126 expression and angiogenesis. Med Sci Sports Exerc. **44**(8):1453-62.
49. Davis, J., M.V. Westfall, et al. (2008) Designing Heart Performance by Gene Transfer. Physiol Rev. **88**(4): 1567–1651.
50. de Figueiredo B.L., R.G. Jaldin (2008). Collagen is reduced and disrupted in human aneurysms and dissections of ascending aorta. **39**(3):437-43.

51. DeMaria N.A. & T. Wisenbaugh (1987). Identification and treatment of diastolic dysfunction: role of transmitral Doppler recordings (editorial). J Am Coll Cardiol **9**(1):1106.
52. De Palma M, E. Montini et al. (2005). Promoter trapping reveals significant differences in integration site selection between MLV and HIV vectors in primary hematopoietic cells. Blood **105**(6): 2307–2315, 2005.
53. Deb A. & E. Ubil. (2014). Cardiac fibroblast in development and wound healing. J Mol Cell Cardiol, **70**(1):47-55.
54. Dee S. & R.C. Getts (2001). MicroRNA expression analysis using the Affymetrix Platform. Methods. Mol Biol; **822**:117-29.
55. Dickhurt H.H., A. Nause, et al. (1983). Two dimensional echocardiographic measurement of left ventricular volume and stroke volume of endurance-trained athletes and untrained subjects. Int J of Sports Med. **4**(1):21-26.
56. Divakaran, V e D.L. Mann. (2008). The emerging role of microRNAs in cardiac remodeling and heart failure. Circ Res; **103** (10): 1072-1083.
57. Doench, J.G.. & P.A. Sharp (2004). "Specificity of microRNA target selection in translational repression." Genes Dev **18**(5): 504-11.
58. Dong H., H. Mosca, et al. (2013) Integrated wall stress: a new methodological approach

to assess ventricular workload and myocardial contractile reserve. C J Transl Med, **11**(1):183.

59. Eghbali, M., R. Deva, R. et al. (2005). Molecular and functional signature of heart hypertrophy during pregnancy. Circ Res, **96**(11): 1208-1216.

60. Eloy J.O., M. Claro de Souza et al.(2014). Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery. Colloids Surf B Biointerfaces. 2014 doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.09.029.(in press).

61. Estigoy C.B., F. Ponten et al. (2009). Intercalated discs: multiple proteins perform multiple functions in nonfailing and failing human hearts. Biophys Rev; 1: 43-49.

62. Fagard RH. (2005). Physical activity, physical fitness and incidence of hypertension. J Hypert; **23**(2): 265-267.

63. Fernandes T., F.C. Magalhães, et al. (2012). Exercise training prevents the microvascular rarefaction in hypertension balancing angiogenic and apoptotic factors: role of microRNAs-16, -21, and -126. Hypertension, **59**(2):513-20.

64. Fernandes T., N.Y. Hashimoto et al. (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):182-9.

65. Fernandes T., U.P. Soci, & E.M. Oliveira (2011). Eccentric and concentric cardiac hypertrophy induced by exercise training: microRNAs and molecular determinants. Braz J Med Biol Res; **44**(9):836-47. Review.

66. Ferrans V.J. (1984). Cardiac hypertrophy: morphological aspects. In: Growth of the Heart in Health and Disease; 187-239, New York: Raven Press.
67. Fish J.E., M.M. Santoro et al. (2008). miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. Dev Cell **15**(2):272-84.
68. Fleck S.J. (1988). Cardiovascular adaptations to resistance training. Med Sci Sports, **20** (5): S146-S151.
69. Forjaz C.L.M., P.C. Brum, et al. (1998). Exercício físico regular e seus benefícios para o coração. Amb Med Desport, **4** (1):30-38.
70. Foryst-Ludwig A., M.C. Kreissl MC et al. (2011). Sex differences in physiological cardiac hypertrophy are associated with exercise-mediated changes in energy substrate availability. Am J Physiol Heart Circ Physiol. **301** (1):H115-22.
71. Franchini K.G. (2001). Hipertrofia Cardíaca: mecanismos moleculares. Rev Bras Hipertens, 8: 125-42.
72. Freire G., C. Ocampo, et al. (2007). Overexpression of AP-1 reduces alpha myosin heavy chain expression and contributes to heart failure from chronic volume overload. J Mol Cell Cardiol, **43**(4): 465-78.
73. Frey N., H.A. Katus et al. (2004). Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? Circulation; **109** (3):1580-9.

74. Fukuta H, W.C. Little (2008). The cardiac cycle and the physiologic basis of left ventricular contraction, ejection, relaxation, and filling. Heart Fail Clin. **4**(1):1-11.
75. Galetto R. & M. Negroni M.(2005). Mechanistic features of recombination in HIV.AIDS Rev. **7**(2):92-102.
76. Grossman W, D. Jones et al. (1975). Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. J Clin Invest; **56**(1): 56-64.
77. Gunasinghe, S K & Spinale, FG. (2004). Myocardial basis for heart failure. In D. L. Mann (Ed.), Role of the Cardiac Interstitium Heart Failure; p. 57-70 Philadelphia: Saunders.
78. Gunja-Smith Z., J. Lin et al (1989). Changes in desmosine and 586 pyridinoline crosslinks during rapid synthesis and degradation of elastin and 587 collagen in the rat uterus. Matrix; **9**: 21-27.
79. Gaziosi, P. (1998), Análise ecocardiográfica da função diastólica doventrículo esquerdo na hipertensão arterial. Hiperat, **3**(1): 175-88.
80. Haas J., K.S. Frese et al (2013) Alterations in cardiac DNA methylation in human dilated cardiomyopathy.EMBO Mol Med.**5**(3):413-29.
81. Hacein-Bey-Abina S.,C. von Kalle, et al. (2003) A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. N Engl J Med. **348**(3): 255–256.

82. Hammond S.M. (2005). Dicing and slicing: The core machinery of the RNA interference pathway. FEBS J. **579**(26): 5822-9.
83. Han P., C.T. Hang et al. (2011). Chromatin remodeling in cardiovascular development and physiology. Circ Res. **108**(3):378-96.
84. Hashimoto N.H., T. Fernandes, et al. (2011). Determinantes Moleculares da HC Induzida por Diferentes Volumes de Treinamento Aeróbio. Rev Bras Cardiol; **24**(3):153-162.
85. He L. & G.J. Hannon. (2004). "MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation." Nat Rev Genet; **5**(7): 522-31.
86. Hill J.A. & E.N. Olson. (2008). Cardiac Plasticity. N Engl J Med, **358**(13): 1370-1380.
87. Huonker M., M. Halle & J. Keul. (1996). Structural and functional adaptations of the cardiovascular System by training. Int J of Sports Med, **17** (3):S164-S172.
88. Iemitsu M, T. Miyauchi et al. (2001). Physiological and pathological cardiac hypertrophy induce different molecular phenotypes in the rat. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **281**(6): R2029-2036.
89. Iemitsu M., S. Maeda et al. (2006) Activation pattern of MAPK signaling in the hearts of trained and untrained rats following a single bout of exercise. J Appl Physiol. **101**(1):151-631.
90. Izumo, S., Nadal-Ginard, B & Mahdavi V. (1988). Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. Proc Natl Acad Sci USA, **A85**(2): 339-343.

91. Janssen H.L., H.W. Reesink et al. (2013). Treatment of HCV infection by targeting microRNA. N Engl J Med. **368**(18):1685-94.
92. Jennings G., L. Nelson, et al. (1986). Antihypertensive and hemodynamic effects of one year's regular exercise. J Hypert; **4**(1): S659-S661.
93. Jiao J., T. Yuan et al. (2011) Analysis of myostatin and its related factors in various porcine tissues. J Anim Sci. **89**(10):3099-106.
94. Jin H., R.Yang et al (2000). Effects of exercise training on cardiac function, gene expression, and apoptosis in rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol. **279**(6):H2994-3002.
95. Jooss K., Y. Yang, et al. (1998). Transduction of dendritic cells by DNA viral vectors directs the immune response to transgene products in muscle fibers. J Virol **72**(5): 4212–4223.
96. Jugdutt, B.I.(2003) Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough? Circ, 108: 1395–1403.
97. Kannel W.B. Importance of hypertension as a major risk factor in cardiovascular disease. (1977). In.: Genest J, Koiw JE, Kuchel O, Hypertension- Pathophysiology and Treatment; McGaw-Hill, New York, .p 888-910.
98. Katz A.M. (2001). The heart as a muscular bomb. In: Physiology of the Heart, Lippincott Willians & Wilkins 16:398-450. Philadelphia.
99. Kawashima T & Shioi T. (2011). MicroRNA, emerging role as a biomarker of heart

failure. Circ J. **75**(2):268-9.

100. Khvorova, A, A. Reynolds et al. (2003) "Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias." Cell; **115**(2): 209-16.

101. Kim V.N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. Nat Rev Moll Cell Biol; **6**(5): 376-385.

102. Kim V.N., J. Han, M.C. Siomi. (2009) Biogenesis of small RNAs in animals. Nat Rev Mol Cell Biol; **10**(2):126-39.

103. Kim Y.K. & V.N. Kim. (2007) Processing of intronic microRNAs. EMBO J. **26**(3):775-83.

104. Kingwell K.(2011). Cardiovascular disease: microRNA protects the heart. Nat Rev Drug Discov. **10**(2):98.

105. Kohn D.B. & R.P. Hollis (2014) Envelope, please. And the award goes to....Blood. **124**(8):1203-4.

106. Koziris L.P., R.C Hickson et al. (1999). Serum levels of total and free IGF-I and IGFBP-3 are increased and maintained in long-term training. J Appl Physiol, **86**(4):1436-1442.

107. Kozomara A, Griffiths-Jones S. (2014). miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. Nucleic Acids Res. **42**(Database issue):D68-73.

108. Kulkarni, M., S. Ozgur & G. Stoecklin. (2010). "On track with P-bodies". Biochemical

Society transactions **38** (Pt 1): 242-251.

109. Lau, N.C., L.P. Lim et al. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. Science; **294**(5543): 858-62.

110. Laufs S., B. Gentner et al. (2003). Retroviral vector integration occurs in preferred genomic targets of human bone marrow-repopulating cells. Blood **101**(6): 2191–2198.

111. Leachman S.A., R.E. Tigelaar et al. (2000). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor priming plus papillomavirus E6 DNA vaccination: effects on papilloma formation and regression in the cottontail rabbit papillomavirus--rabbit model. J Virol. **74**(18):8700-8.

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

113. Lee Y.S. & A. Dutta. (2009). MicroRNAs in Cancer. The Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease; 4:199-227.

114. Levy D., R.J. Garrison et al. (1990). Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. N Engl J Med, **322**(22): 1561-1566.

115. Lew W.Y. Exercise: commitment to a young heart. J Am Coll Cardiol. **64**(12):1267-9.

116. Lewis B.P., C.B. Burge et al. (2005). "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets." Cell; **120**(1): 15-20.

117. Litwin SE, S.E. Katz et al. (1994). Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat. Circulation; **89**(1):345-54.
118. Lorenz C.H., E.S. Walker et al. (1999). Normal human right and left ventricular mass, systolic function, and gender differences by cine magnetic resonance imaging. J Cardiovasc Magn Res, **1**(1): 7-21.
119. Maron BJ. (1986). Structural features of the athlete heart as defined by echocardiography. J Am Coll Cardiol. **7**(1):190-203. Review.
120. Mathews D.K. & E.L. Fox. (1985). The Physiological Basis of Physical Education and Athletics, Philadelphia: W.B.Saunders Co., p. 28.
121. McKinsey, T.A., C.L. Zhang, CL & E.N. Olson. (2002). Signaling chromatin to make muscle. Curr Opin Cell Biol; **14**(6): 763-772.
122. McMullen J.R. & Jennings GL. (2007). Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. Clin Exp Pharmacol Physiol. **34**(4):255-62.
123. McMullen J.R., T. Shioi et al. (2004) The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) pathway. J Biol Chem, **279**(6): 4782-4793.

124. McMullen J.R., T. Shioi, et al. (2003). Phosphoinositide 3-kinase (p110alpha) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. Proc Natl Acad Sci USA, **100**(21): 12355-12360.
125. Medeiros A., E.M. Oliveira et al. (2004) Swimming training increases cardiac vagal activity and induces cardiac hypertrophy in rats. Braz J Med Biol Res. **37**(12):1909-17.
126. Melo RM, E. Martinho Jr & L.C. Michelini (2003). Training induced, pressure-lowering effect in SHR: wide effects on circulatory profile of exercised and nonexercised muscles. Hypertension. **42**(4):851-7.
127. Melo S.F., T. Fernandes et al. (2014). Expression of MicroRNA-29 and Collagen in Cardiac Muscle after Swimming Training in Myocardial-Infarcted Rats. Cell Physiol Biochem. **33**(3):657-69.
128. Miretti S., E. Martignani et al. (2007). Functional effect of mir-27b on myostatin expression: a relationship in Piedmontese cattle with double-musced phenotype. BMC Genomics 19;14:194.
129. Miyazaki H., N. Oka et al (2006). Comparison of gene expression profiling in pressure and volume overload-induced myocardial hypertrophies in rats. Hypertens Res. **29**(12):1029-45.
130. Montera M.W., C. Drumond, et al. (2009). Correlação do colágeno intersticial miocárdico do septo do ventrículo direito com a função ventricular em pacientes com cardiomiopatia isquêmica. Arq Bras Cardiol [online]. **92**(1): 54-62.

131. Monopoli A. & E. Ongini. (1994) Effects of antihypertensive drugs on cardiac hypertrophy. *Pharmacol Res.* **29**(3):197-215.
132. Monteys A.M., R.M. Spengler et al. (2010). Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *RNA*. **16**(3):495-505.
133. Montgomery R.L. & E. van Rooij. (2010). MicroRNA regulation as a therapeutic strategy for cardiovascular disease. *Curr Drug Targets*; **11**(8): 936-942.
134. Morceau F., S. Chateauvieux et al. (2013). Long and Short Non-Coding RNAs as Regulators of Hematopoietic Differentiation. *Int J Mol Sci*. **14**(7): 14744-14770.
135. Movassagh M, Choy MK, et al.(2011) Distinct epigenomic features in end-stage failing human hearts. *Circulation*.**124**(22):2411-22.
136. Mukherji S., M.S. Ebert et al (2011). "MicroRNAs can generate thresholds in target gene expression." *Nat Genet*; **43**(9): 854-9.
137. Myers J, M. Prakash et al. (2002). Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing. *N Engl J Med*. **346**(11):793-801.
138. Nag A.C. (1980). Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution. *Cytobios*; **28**(109): 41-61.
139. Nakagawa M., K. Hamaoka et al. (1988). Postnatal DNA synthesis in hearts of mice: autoradiographic and cytofluorometric investigations. *Cardiovasc Res*, **22**(8): 575-583.
140. Nakai H, E. Montini et al. (2003). AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into

active genes in mice. Nat Genet **34**(3): 297–302, 2003.

141. Nakai H, E. Montini et al. (2003). Helper-independent and AAV-ITR-independent chromosomal integration of double-stranded linear DNA vectors in mice. Mol Ther. **7**(1): 101–111.

142. Nakai H, X. Wu et al. (2005). Large-scale molecular characterization of adeno-associated virus vector integration in mouse liver. J Virol **79**(6): 3606–3614.

143. Negroni M & H. Buc (2001). Mechanisms of retroviral recombination. Annu Rev Genet. **35**(1): 275–302.

144. Neri Serneri G.G., M. Boddi et al. (2001). Increased cardiac sympathetic activity and insulin-like growth factor-I formation are associated with physiological hypertrophy in athletes. Circ Res; **89**(11): 977-982.

145. Neves V.J., T. Fernandes et al. (2014) Exercise training in hypertension: Role of microRNAs . WJC, **6**(8):713-27.

146. Nührenberg T., R. Gilsbach et al. (2014). Epigenetics in cardiac development, function, and disease. Cell Tissue Res. **356**(3):585-600.

147. O'Toole M.L., W.D.B. Hiller, et al. (1987). The ultraendurance triathlete: a physiological profile. Med Sci Sports Exerc. **19**(1):45-50.

148. Olena A.F. & J.G.Patton (2009). Genomic organization of microRNAs. J Cell Physiol. **222**(3): 540-5.

149. Oliveira E.M. & J.E. Krieger. (2002). HC e treinamento físico: Aspectos moleculares. Hipertensão; **2**(5) 5:73-78.
150. Oliveira E.M., G.B. Alves et al. (2005). Aspectos moleculares da HC dos Músculos Cardíaco e Esquelético após o Treinamento Físico. In: Cardiologia do Exercício, do Atleta ao Cardiopata; Manole; **3**: 53-75. Barueri.
151. Oliveira E.M., M.S. Sasaki, et al. (2009). Local renin-angiotensin system regulates LV hypertrophy induced by swimming training independent of circulating renin: a pharmacological study. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, **10**(1):15-23.
152. Pei, Z., R. Meng, et al (2010). Angiotensin-(1-7) ameliorates myocardial remodeling and interstitial fibrosis in spontaneous hypertension: role of MMPs/TIMPs. Toxicol Lett, **199**(2):173-81.
153. Pasquinelli A.E., B.J. Reinhart et al. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. Nature, 408: 86-89.
154. Pasumarthi K.B. & L.J. Field (2002). Cardiomyocyte enrichment in differentiating ES cell cultures: strategies and applications. Methods Mol Biol. 185:157-68. Review.
155. Perrino, C., J.N. Schroder, et al. (2007). Dynamic regulation of phosphoinositide 3-kinase-gamma activity and beta-adrenergic receptor trafficking in end-stage human heart failure. Circulation **116**(22): 2571-2579.
156. Phillips C & Wenstrup RJ. (1992). Biosynthetic and genetic disorders of collagen. In:

Wound Healing: Biochemical and Clinical Cohen IK, Diegelmann RF, Lindblad WJ, eds. Aspects. Philadelphia, Pa: WB Saunders Co; 152–176.

157. Pimenta, E. (2008). Estímulos para o desenvolvimento da HC ventricular esquerda. Rev Bras Hipertens, **15**(2):66-70, 2008.

158. Place, R.F., L.C. Li et al. (2008). MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. Proc Natl Acad Sci U S A. **105**(5):1608-13.

159. Pluim, B.M., A.H. Zwinderman et al.(2000) The athlete's heart. A meta-analysis of cardiac structure and function. Circulation, **101**(3), 336-344.

160. Prochnik, S.E., D.S. Rokhsar et al. (2007). Evidence for a microRNA expansion in the bilaterian ancestor. Dev Genes Evol; **217**(1): 73-7.

161. Reinhart B.J., F.J. Slack et al. (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. Nature. **403**(6772):901-6.

162. Rhoades, MW, B.J. Reinhart et al. (2002). Prediction of plant microRNA targets. Cell; **110**(4): 513-20.

163. Rimbaud S., H. Sanchez, et al. (2009). Stimulus specific changes of energy metabolism in hypertrophied heart. J Mol Cell Cardiol **46**(6):952-959.

164. Rupp H. (1981). The adaptive changes in the isoenzyme pattern of myosin from hypertrophied rat myocardium as a result of pressure overload and physical training. Basic Res Cardiol, **76**(1): 79-88.

165. Sadoshima J., & S. Izumo (1997). The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. Annu Rev Physiol, **59** (1): 551-571.
166. Sahn D.J., A. DeMaria, et al. (1978). Recommendations regarding M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. Circulation; 58: 1072-1083.
167. Salgado, A.A., F.M. Albanesi Filho, et al. (2004). Índice de Performance Miocárdica: Fim da Fração de Ejeção? Rev Bras Ecocard. **17**(3):69-74.
168. Schaible T.F. & J. Scheuer. (1984). Response of the heart to exercise training. In: Growth of the Heart in Health and Disease, 381-419, New York: Raven Press.
169. Scheinowitz M, G. Kessler-Icekson et al. (2003). Short- and long-term swimming exercise training increases myocardial insulin-like growth factor-I gene expression. Growth Horm IGF Res **13**(1): 19-25.
170. Schwarz D.S., G. Hutvagner et al. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. Cell; **115**(2): 199-208.
171. Schwarz, S. A.V. Grande et al. (2008). The microRNA regulated SBP-box genes SPL9 and SPL15 control shoot maturation in Arabidopsis. Plant Mol Biol; **67**(1-2): 183-95.
172. Senyo S.E., R.T. Lee & B. Kühn (2014). Cardiac regeneration based on mechanisms of cardiomyocyte proliferation and differentiation. Stem Cell Res. 2014 Sep 28. pii: S1873-5061(14)00105-6. doi: 10.1016/j.scr.2014.09.003.

173. Shabalina S.A. & E.V., Koonin (2008). Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. Trends Ecol Evol **23**(10): 578-587.
174. Sharma R.V., R.J.Tomanek & R.C. Bhalla (1985). Effect of swimming training on cardiac function and myosin ATPase activity in SHR. J Appl Physiol **59**(3):758-65.
175. Soci U.P., T. Fernandes, et al. (2011). MicroRNAs 29 are involved in the improvement of ventricular compliance promoted by aerobic exercise training in rats. Physiol Genomics; **43**(11):665-73.
176. Srere P.A. (1968). Studies on purified citrate-enzymes: metabolic interpretations. Biochem Soc Symp; 27: 11-21.
177. Stone M.H., S.J. Fleck et al. (1994). Health and performance related potential of resistance training. Sports Med **11**(4): 210-231.
178. Sun L.; H. Jin H et al. (2014) Hidrogen Sulfide Alleviates Myocardial Collagen Remodeling in Association with Inhibition of TGF- β /smad Signaling pathway in Spontaneously Hypertensive Rats. Mol Med. Doi:10.2119/molmed.2013.00096.
179. Thum T, D. Catalucci & J. Bauersachs. (2008) MicroRNAs: novel regulators in cardiac development and disease. Cardiov Res **79**(4): 562-570.
180. Tripton C.M. (1991). Exercise training and hypertension, an update. Ex Sport Sci Rev, 4: 447-505.
181. Trivedi C.M., Y. Luo et al. (2007). Hdac2 regulates the cardiac hypertrophic response by

modulating Gsk3 beta activity. Nat Med**13**(3), 324-331.

182. Urhausen A. & W. Kindermann W. (1999). Sports-specific adaptations and differentiation of the athlete's heart. Sports Med. **28**(4):237-44.

183. Valencia-Sanches M.A., J. Liu et al. (2006). Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. Genes & Develop. **20**(5): 515-524.

184. Van Rooij E. & E.N. Olson. (2007). MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. J Clin Invest; **117**(9): 2369-76.

185. Van Rooij E., J.E. Thatcher et al. (2008). Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. Proc Natl Acad Sci USA; 105:13027-13032.

186. Van Rooij E., L.B. Sutherland, et al. (2006). A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. Proc Natl Acad Sci USA, **103**(48): 18255-60.

187. Van Rooij E., L.B. Sutherland, et al. (2007). Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. Science, **316**(5824): 575-579.

188. Van Rooij E., W.S. Marshall & E.N. Olson. (2008). Toward MicroRNA-Based Therapeutics for Heart Disease. Circ Res; **103** (9): 919-928.

189. Vasques, L. R., C.G. Schoofand & E.L.S. Botelho et al. (2012) MicroRNAs: A New Paradigm for Gene Regulation, S. P. In: Gupta VK, Gaur RK, Gafni Y: 135-153.

190. Vasudevan, S, Y. Tong & J.A. Steitz (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. Science; **318**(5858): 1931-4.
191. Vella M.C., E.Y. Choi et al. (2004). The C. elegans microRNA let-7 binds to imperfect let-7 complementary sites from the lin-41 3'UTR. Genes Dev; 18: 132-137.
192. Vilella M. & A. Vilella (2014). Exercise and Cardiovascular Diseases. Kidney Blood Press Res. **39**(2-3):147-153.
193. Wang B, R. Komers et al. (2012). Suppression of microRNA-29 expression by TGF- β 1 promotes collagen expression and renal fibrosis. J Am Soc Nephrol. **23**(2):252-65.
194. Wang N. Z. Zhou et al. (2009). Role of microRNAs in cardiac hypertrophy and heart failure. IUBMB; **61**(6):566-71.
195. Weber K.T., C.G Brilla & J.S. Janicki (1993). Myocardial fibrosis: functional significance and regulatory factors. Cardiovasc Res, **27**(3): 341-348.
196. Wen Z W. Huang et al. (2014). MicroRNA-377 Regulates Mesenchymal Stem Cell-Induced Angiogenesis in Ischemic Hearts by Targeting VEGF. PLoS One. **9**(9):e104666.
197. Wikman-Coffelt J, W.W. Parmley & D.T. Mason. (1979). The cardiac hypertrophy process. Analyses of factors determining pathological vs. physiological development. Circ Res **45**(6): 697-707.
198. Yang T., X.L. Chen et al. (2014). MicroRNA-27a promotes porcine myoblast proliferation by downregulating myostatin expression. Animal **9**:1-6.

199. Ye Y., Z. Hu et al (2010). Downregulation of microRNA-29 by antisense inhibitors and a PPAR-gamma agonist protects against myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* **87**(3):535-44.
200. Yeh J.K., J.F. Aloia et al (1994). Effect of growth hormone administration and treadmill exercise on serum and skeletal IGF-I in rats. *Am J Physiol.* **266**(1 Pt 1):E129-35.
201. Zak, R. Growth of the heart in health and disease, 1984, New York, Raven Press: 1-24, 131-185, 381-420.
202. Zhang, X. B. & B. S. Chen. (2008). Perspective of microRNA in cardiovascular-associated diseases. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*; **36**(7):661-663.
203. Zhang Y. X.R. Huang et al. (2014). MiR-29b as a therapeutic agent for angiotensin II-induced cardiac fibrosis by targeting TGF- β /Smad3 signaling. *Mol Ther.* **22**(5):974-85.
204. Zile M.R. Hemodynamic determinants of echocardiographically derived indices of left ventricular filling. *ECG*, **9** (1):289.
205. Zhou Y, J. Wei et al (2013). Lentiviral-mediated p38 MAPK RNAi attenuates aldosterone-induced myocyte apoptosis. *Mol Med Rep.* **8**(2):493-8.