



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



EXPRESSÃO DE MICRORNAS CARDÍACOS INDUZIDA POR TREINAMENTO FÍSICO DURANTE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

JOÃO PAULO QUEIROZ CARDOSO DA CUNHA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, como requisito para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia Celular, Estrutural e Funcional*.

Prof. Dr. Robson Francisco Carvalho

Botucatu – SP

2013



unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU- IBB

EXPRESSÃO DE MICRORNAS CARDÍACOS INDUZIDA POR
TREINAMENTO FÍSICO DURANTE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

JOÃO PAULO QUEIROZ CARDOSO DA CUNHA

PROF. DR. ROBSON FRANCISCO CARVALHO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, como requisito para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia Celular, Estrutural e Funcional*.

Prof. Dr. Robson Francisco Carvalho

Botucatu – SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Cunha, João Paulo.

Expressão de microRNAs cardíacos induzida por treinamento físico durante insuficiência cardíaca / João Paulo Cunha. - Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Robson Francisco Carvalho

Capes: 20100000

1. Coração - Hipertrofia. 2. Expressão gênica. 3. Insuficiência cardíaca Tratamento. 4. Exercícios físicos.

Palavras-chave: Hipertrofia cardíaca; Insuficiência cardíaca; Treinamento físico; microRNAs.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao meu orientador Professor Dr. Robson Francisco Carvalho, por ter acreditado na minha capacidade, e deu todo apoio para execução desse trabalho. Além do ensinamentos no âmbito científico e profissional se tornou um grande amigo.

Agradeço imensamente aos meus pais João Cardoso da Cunha Jr. e Fatima Q. C da Cunha que sempre estiveram comigo, me ensinando e apoiando em cada decisão. Amo muito vocês.

Meu grande amigo Leonardo Nazário de Moraes, que sempre esteve disposto a me ajudar, e me ensinou e ajudou muito na realização desse projeto. Obrigado pelo companheirismo e por todas as vezes que me ajudou com os experimentos.

Minhas amigas Mariana Antunes Ribeiro e Tassiana Gutierrez de Paula, companheiras de conversas, obrigado por seus conselhos, amizade, e risadas.

Meu amigo Jason Javier Fernandez, obrigado por todo apoio, ensinamento e ajuda com experimentos. E também pelos momentos de descontração e risos.

Ao meu amigo Warlen P. Piedade, obrigado pelo companheirismo, amizade, auxílio no laboratório e momentos de descontração.

Meus amigos Ivan José Vechetti Júnior, Fernanda R. Carani, Rodrigo Souza e Raquel S. Bertaglia, obrigado pelo companheirismo, por todo apoio na realização e refinamento do meu projeto. Em especial agradeço a Paula Aiello e Rodrigo Souza pelo auxílio com os experimentos e coleta de amostras

Agradeço meus amigos do Laboratório de Biologia do Músculo Esquelético (LBME): Bruno Duran, Cassiane Martins, Carlos Alves, Edson Mareco, Flávia Fernandes, Henrique Borgatto, Luana Soares, Paula P. Freire, Rondinelle Salomão e Ana Carolina Omoto pelo convívio agradável, compartilhamento de conhecimento e constante apoio. Em especial a professora Dra. Maeli Dal Pai por todo apoio e contribuições científicas que foram fundamentais para bom andamento desse trabalho.

Aos professores Dr. Wagner Favaro, Dr(a) Flávia Delella, Dr. Wellerson R. Scarano, Dr(a) Patrícia Reis e Dr. Danilo Pinhal, pelo apoio, dicas e todos os ensinamentos que foram fundamentais para conclusão do mestrado.

Aos funcionários e professores do departamento de Morfologia-IBB-UNESP-Botucatu e Clínica Médica-FMB-UNESP-Botucatu.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação pelo profissionalismo e pela disposição ajudar.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por financiar este trabalho e concessão de bolsa de mestrado.

RESUMO

Os microRNAs (miRNAs) representam uma classe de pequenos RNAs não codificantes reconhecidos como importantes reguladores pós-transcricionais da expressão de genes durante o desenvolvimento e em doenças como a insuficiência cardíaca (IC). Embora não haja um consenso de que terapias adjuvantes para as doença cardiovasculares sejam capazes de aumentar a qualidade de vida e as taxas de sobrevivência; uma terapia não-farmacológica, como o treinamento físico (TF) pode reduzir a uma série de fatores de risco cardiovasculares e tem sido reconhecida como uma estratégia segura para a prevenção e tratamento da IC. Portanto, avaliamos o efeito do TF prescrito durante a transição da hipertrofia cardíaca para IC no perfil global de miRNAs cardíacos. A hipertrofia ventricular e a IC foi induzida a partir da bandagem da aorta (estenose aórtica-EA) por um grampo de aço inoxidável (n=10). Os animais utilizados como Controle (CT) foram operados sem a colocação do clip (n = 5). Dezoito semanas após a cirurgia, quando os animais com EA apresentavam disfunção ventricular, detectada por ecocardiograma, os ratos foram aleatoriamente separados em dois grupos: 10 semanas de treinamento físico supervisionado (IC-TF, n = 5) ou grupo sedentário controle (IC-S, n = 5). Por fim a IC, foi confirmada pelos dados clínicos e da remodelação cardíaca por dados morfológicos e funcionais obtidos por ecocardiograma. Os níveis de expressão de 373 miRNAs do ventrículo esquerdo foram avaliados por PCR quantitativa em tempo real usando TLDA (TaqMan Rodent microRNA Array - cartões de A + B) no Sistema ABI ViiA7 (Life Technologies, EUA) e a quantidade relativa média (RQ) foi calculada utilizando-se do método do Ct comparativo. Os miRNAs diferencialmente expressos entre os grupos foram os que apresentaram alteração > 1,5 vezes e $P < 0,05$ (teste t de Student). No final do experimento (28 semanas), o TF atenuou os sinais clínicos e patológicos da IC, e a remodelação cardíaca a partir da manutenção da função sistólica e diastólica. Além disso, a análise da expressão gênica revelou trinta e cinco miRNAs desregulados em IC-S e setenta e nove em IC-TF, com vinte e três miRNAs comuns desregulados em ambos os grupos. Notavelmente, verificamos que o TF durante transição de hipertrofia cardíaca para IC promoveu um aumento da expressão dos miRNAs rno-miR-132 (1,9 vezes) e rno-miR-212 (4 vezes), relatados como importantes reguladores da hipertrofia cardíaca. Em conjunto, nossos resultados revelam a contribuição potencial do treinamento físico na atenuação da disfunção cardíaca durante IC alterando a expressão de miRNAs que regulam redes de genes envolvidos na manutenção da estrutura e função cardíaca e reforçam a importância do TF como uma ferramenta não-farmacológica para o tratamento da insuficiência cardíaca.

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) are a class of small noncoding RNAs that have gained status as important regulators of post-transcriptional gene expression during development and in certain diseases such as heart failure (HF). Although there is no consensus that adjuvant therapies for cardiovascular disease are able to increase patients' quality of life and survival rates a non-pharmacological therapy, exercise training (ET) can reduce a number of cardiovascular risk factors and has been recognized as an important and safe strategy for preventing and treating heart failure. Therefore, we evaluate the effects of ET prescribed during the transition from cardiac hypertrophy to heart failure on cardiac micro-RNA profile. We employed ascending aortic stenosis (AS) to induce heart failure in *Wistar* male rats (n=10) by a stainless-steel clip. Sham-operated animals (n=5) were used as controls. Eighteen weeks after surgery, when AS animals presented ventricular dysfunction, detected by echocardiogram, rats were randomized to 10 weeks of supervised exercise training (HF-ET, n=5) or to a control sedentary group (HF-S, n=5). At the end of the experiment, heart failure was evaluated by clinical data and the cardiac remodeling by morphologic and functional data obtained by echocardiogram. The expression levels of 373 miRNAs from left ventricles were measured by real-time quantitative PCR using TaqMan Rodent microRNA Array (cards A + B) on an ABI ViiA7 Sequence Detection System and the mean relative quantity (RQ) was calculated and miRNAs differentially expressed between groups were defined as those with >1.5-fold change and $P < 0.05$ (two sample, two tailed Student's t-test). At the end of the experiment (28th wks), exercise training attenuated the clinical and pathological signs of HF. It also attenuated cardiac remodeling with maintenance of systolic and diastolic function. Moreover, miRNAs analysis revealed that thirty-five miRNAs were deregulated in HF-S group and seventy-nine in HF-ET group with twenty-three miRNAs similarly deregulated in both groups. Notably, we detected that ET during the transition from cardiac hypertrophy to heart failure promoted an increased expression of the miRNAs rno-miR-132 (1.9-fold) and rno-miR-212 (4-fold), reported as important regulators of the cardiac hypertrophy. Taken together, our findings uncover the potential contribution of exercise training in attenuate cardiac dysfunction during HF through miRNAs that regulates gene networks related to the maintenance of cardiac structure and function, and reinforces the importance of this intervention as a non-pharmacological tool for HF therapy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
1.1 Músculo Cardíaco.....	5
1.2. Hipertrofia cardíaca.....	7
1.3. Insuficiência Cardíaca.....	12
1.4. Modelo de Estenose Aórtica	15
1.5. RNAs não codificantes	16
1.6. Pequenos ncRNAs (small ncRNAs).....	16
1.7. MicroRNAs	17
1.8. Regulação da Expressão Gênica	18
1.9. MicroRNAs na Insuficiência Cardíaca.....	20
1.10. Exercício, Micro-RNAs e Insuficiência Cardíaca.....	21
2. CONCLUSÃO.....	23
REFERÊNCIAS – INTRODUÇÃO.....	24

1. INTRODUÇÃO

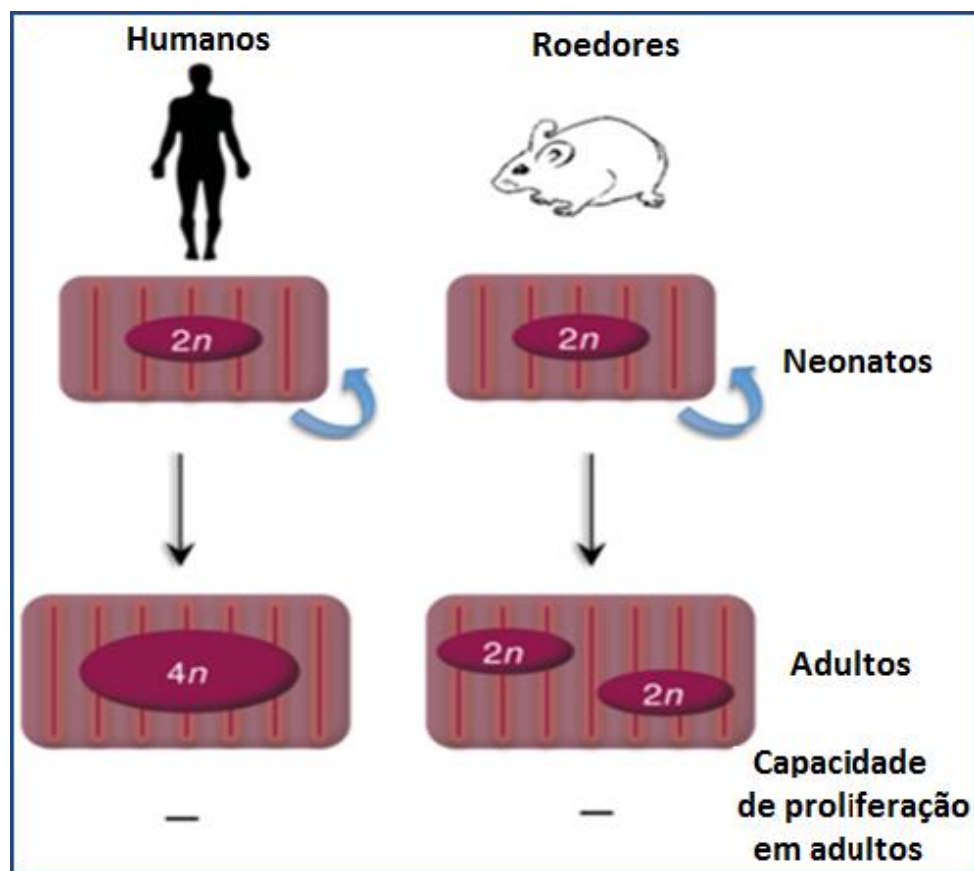
1.1 Músculo Cardíaco

O coração dos mamíferos é um órgão cuja função fundamental é bombear o sangue através do sistema circulatório para fornecer oxigênio e nutrientes para os órgãos e para o transporte de dióxido de carbono para os pulmões ¹. É um órgão dinâmico que realiza contrações rítmicas para manter a circulação sanguínea; seu principal componente é a parede muscular composta de células contráteis, os cardiomiócitos, envoltos por tecido conjuntivo, vascularizada e innervada, denominada de miocárdio². O interior dessa parede é envolto por uma camada fina de tecido, o endocárdio, e o exterior por uma camada de células mesoteliais, o epicárdio. Os cardiomiócitos representam 85% da massa do coração; são as células contráteis do coração e seu citoplasma encontra-se preenchido por feixes de miofibrilas constituídas por miofilamentos organizados em uma série de unidades básicas contráteis denominados de sarcômeros ²⁻³.

Os cardiomiócitos tornam-se terminalmente diferenciados logo após o nascimento e a maior parte dessas células perde a sua capacidade de proliferação². Embora ocorra um baixo *turnover* de cardiomiócitos ao longo da vida, outros tipos celulares que compõem o coração, como células endoteliais, fibroblastos, células imunes e progenitoras, mantêm sua capacidade de proliferação ^{2,4,5}.

No coração neonatal de roedores e humanos, o crescimento ocorre com a proliferação de cardiomiócitos mononucleados com núcleos diplóides (2n) ⁶. Nos cardiomiócitos de roedores, a replicação do DNA é seguida de cariocinese sem citocinese e gera células binucleadas diplóides (2n) ⁷. Em humanos a replicação do DNA ocorre sem cariocinese ou citocinese e resulta em células mononucleadas tetraplóides (4n) ^{8,9} (**Figura 1**). A diferenciação terminal em cardiomiócito também contribui para o crescimento normal do coração em humanos, pois mesmo que não se divida quando diferenciado em cardiomiócito o crescimento ocorre ainda assim pela duplicação do material genético ¹⁰. Em roedores essa binucleação e diferenciação terminal ocorrem nos primeiros dias após o nascimento ¹⁰.

Figura 1. Dinâmica nuclear e a capacidade de proliferação de cardiomiócitos durante o crescimento.



Adaptado de Kikuchi & Poss, 2012¹¹.

Durante a vida fetal, as forças hemodinâmicas e os fatores da circulação regulam a proliferação de cardiomiócitos. Dentre essas forças e fatores que estimulam a proliferação estão a pressão arterial ¹², a angiotensina II ¹³, o cortisol ¹⁴ e o IGF-1 (*Insuline Growth Factor 1*) ¹⁵. Dentre as forças e fatores que reprimem a proliferação estão o hormônio da tireoide - triiodo-L-tironina (T3) ¹⁶, o peptídeo natriurético atrial (ANP) ¹⁷ e uma redução da carga sistólica ¹⁸.

Na fase perinatal, o crescimento muscular cardíaco normal é limitado pela supressão permanente da atividade mitótica de cardiomiócitos e, assim, o músculo sofre deterioração mecânica e perda de cardiomiócitos ao longo da vida, principalmente se novos cardiomiócitos não forem gerados para suprir essa perda¹⁰. Na infância, o coração em desenvolvimento cresce em tamanho para atender as demandas de oxigênio do corpo, sem a capacidade de gerar muitas novas células⁴.

As células-tronco e progenitoras que permanecem no miocárdio de roedores e de humanos adulto têm limitado potencial para gerar cardiomiócitos *in vitro* e *in vivo*,

podendo gerar também células musculares lisas e endoteliais de vasos sanguíneos ^{5,19}. Em roedores, as células precursoras podem participar na formação de novos cardiomiócitos em resposta a lesões até após aproximadamente um ano de vida ²⁰. Para humanos, que possuem um tempo de vida maior que dos roedores, há uma exigência diferente para a renovação dos cardiomiócitos; cerca de 50% dos cardiomiócitos são renovados durante toda a vida ^{6,21}. A renovação de cardiomiócitos é muito limitada em humanos adultos e não está claro se essa renovação se dá pelos próprios cardiomiócitos ou por outras populações de células cardíacas; ou quais são os mecanismos que sustentam o aumento ou diminuição no número de cardiomiócitos tanto no nascimento quanto ao longo da vida ^{4,10}.

Sabe-se, entretanto, que em situações de uma sobrecarga cardiovascular, o coração é capaz de aumentar de tamanho e, dependendo do estímulo, pode resultar em hipertrofia fisiológica ou patológica, que reduz o estresse na parede ventricular pelo aumento das dimensões da parede (revisado em Maillet *et al.*, 2013 ¹). Embora a massa cardíaca possa ser aumentada pela proliferação dos fibroblastos, pela atividade de células progenitoras dos miócitos e por renovação de alguns cardiomiócitos, o aumento da massa cardíaca ocorre principalmente através da hipertrofia individual dos cardiomiócitos ^{1,22}.

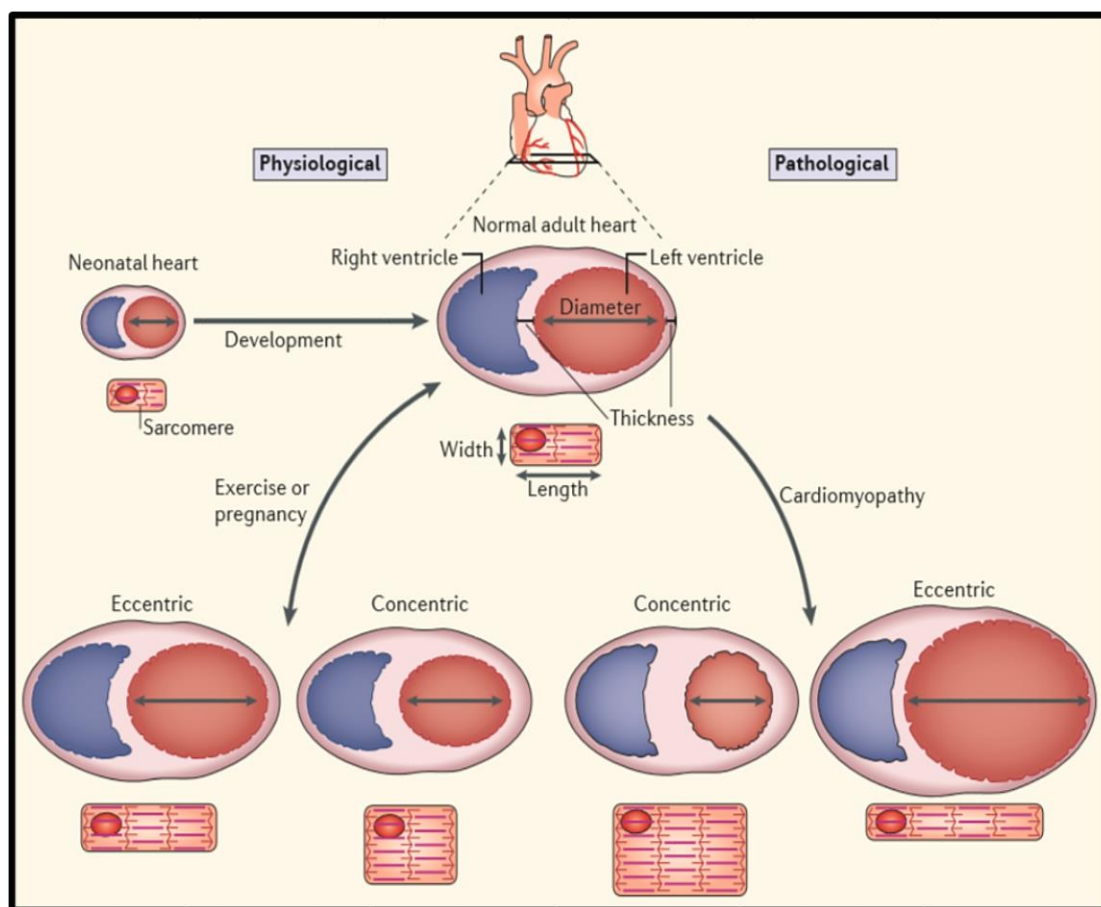
1.2. Hipertrofia cardíaca

a) Definição de hipertrofia

É um mecanismo adaptativo fundamental em resposta ao aumento de carga hemodinâmica iniciado por vias de transdução de sinal ^{23,24} que permite o coração manter suas funções cardíacas básicas ²⁵. O coração é capaz de remodelação celular e da câmara ventricular em resposta a estímulos patológicos e fisiológicos os quais desencadeiam alterações moleculares, celulares e intersticiais ²⁶. Essas alterações incluem fatores mecânicos, neuro-hormonais e, possivelmente genéticos, alterando tamanho, forma e função do coração após uma lesão ou estresse ²⁷.

As características que definem a hipertrofia cardíaca incluem o aumento no tamanho do cardiomiócito, elevada síntese proteica, melhor organização do sarcômero ²⁶⁻²⁹ e alterações na matriz extracelular ³⁰, com aumento do tecido conjuntivo e mudanças na composição de colágeno ³¹.

Figura 2. Geometria da hipertrofia cardíaca.



A hipertrofia cardíaca pode ser classificada como excêntrica ou concêntrica com base nas geometrias dos cardiomiócitos. A **hipertrofia excêntrica** refere-se a um aumento da massa cardíaca, com aumento de volume da câmara, apresentando cavidades dilatadas caracterizado por um padrão em série de adição do sarcômero². A hipertrofia **fisiológica excêntrica** é caracterizada por um aumento no volume do ventrículo esquerdo com crescimento coordenado da parede, os cardiomiócitos individuais crescem tanto em comprimento como em largura. No entanto, a **hipertrofia patológica excêntrica**, em resposta ao infarto do miocárdio ou na cardiomiopatia dilatada pode conduzir à dilatação da parede com preferencial aumento do comprimento de cardiomiócitos. Estímulos fisiológicos, como gravidez ou exercício, induzem a uma forma menos pronunciada de hipertrofia excêntrica. A **hipertrofia concêntrica** refere-se a um aumento da espessura relativa da parede livre e da espessura septal, aumento da massa cardíaca, redução com uma pequena ou nenhuma mudança no volume da câmara, e é caracterizado por um padrão paralelo de adição do sarcômero; os cardiomiócitos individuais aumentam mais em largura que em comprimento². A hipertrofia concêntrica geralmente surge em condições patológicas tais como hipertensão arterial sistêmica crônica ou estenose valvular). Treinamento físico, como o levantamento de peso, induz a uma forma mais branda da hipertrofia cardíaca concêntrica não patológica. O coração pode ir de um estado normal para um estado de hipertrofia fisiológica e voltar ao normal, porém, a hipertrofia patológica pode evoluir para insuficiência cardíaca e esse processo pode ser irreversível (Maillet *et al.*, 2013¹).

O crescimento hipertrófico patológico ou fisiológico é subdividido em dois tipos baseado em mudanças na sua forma: o concêntrico e o excêntrico (**Figura 2**). E tanto o crescimento cardíaco fisiológico quanto o patológico estão associados a um aumento no tamanho do coração ³². Além dos aumentos comparáveis no tamanho do coração, características estruturais, funcionais, metabólicas, bioquímicas e moleculares distintas estão associadas a hipertrofia patológica e fisiológica ².

b) Hipertrofia Cardíaca Fisiológica

A hipertrofia cardíaca fisiológica promove o crescimento normal do coração desde o nascimento até o período pós natal, e do coração em atletas bem condicionados como resultado de exercício extremo e/ou repetitivo^{1,33} (**Figura 2**). Nesses casos, o miocárdio cresce de maneira mais uniforme, com aumento no tamanho da câmara, da espessura da parede e do comprimento e largura do cardiomiócito ²⁹.

A hipertrofia fisiológica excêntrica é caracterizada por um aumento no volume do ventrículo esquerdo, com crescimento coordenado da parede e das espessuras septais, onde cardiomiócitos individuais crescem tanto em comprimento como em largura ^{22,34}. Entretanto, a hipertrofia fisiológica concêntrica é caracterizada por uma redução da dimensão da câmara ventricular esquerda e um aumento da parede livre e da espessura septal, onde cardiomiócitos individuais aumentam mais em espessura que em comprimento ^{1,22,32}. A hipertrofia fisiológica induz uma forma mais branda de hipertrofia concêntrica e excêntrica ^{1,22,35}.

A hipertrofia fisiológica parece ser iniciada por diferentes tipos de ligantes que incluem VEGFs (*vascular endothelial growth factors*) ^{36,37}, o hormônio da tireoide (triiodo-tironina-T3), a insulina, o IGF1 (*Insuline Growth Factor 1*) ^{1,2,34}. A via de sinalização que regula a hipertrofia fisiológica mais importante e melhor descrita até o momento é a iniciada pelo IGF1^{1,2}, o qual é sintetizado e secretado pelo fígado em resposta ao hormônio do crescimento e tem como alvo tecidos nos quais promove o crescimento ^{1,38}. O IGF1 também pode ser produzido por tecidos alvos, onde atua diretamente de forma autócrina e parácrina ³⁹. O IGF1 liga-se a um receptor da superfície celular, o IGF1R (*insulin-like growth factor 1 receptor*) ³⁸, e ativa a via de sinalização PI3K-AKT-PDK1-GSK3 β (*phosphoinositide – dependente protein kinase 1 – glycogen synthase kinase 3 β*) ^{1,2,40–43}. Tem sido demonstrado também que essas vias ou ligantes podem antagonizar a morte celular no coração ou estimular a renovação de

cardiomiócitos, sugerindo que a estimulação do crescimento fisiológico por essas vias pode ter um efeito cardioprotetor, mesmo causando um leve aumento do coração ²⁹. Outro aspecto importante relacionado à hipertrofia fisiológica é a não indução da expressão do programa de genes cardíacos fetais que incluem o ANF (*atrial natriuretic fator*), BNP (*brain natriuretic peptide*), α -actina e β -MHC (*β -myosin heavy chain*) ^{1,2}.

c) Hipertrofia Cardíaca Patológica

A hipertrofia patológica ocorre em diferentes condições tais como estenose aórtica ²⁴, isquemia cardíaca- insuficiência coronariana, infarto do miocárdio ^{44,45}, hipertensão arterial sistêmica e doença cardíaca valvular ⁴⁶. Muitas vezes está associada com uma deficiência na vascularização do miocárdio, alterações na composição da matriz extracelular e fibrose ²⁴. A hipertrofia patológica do miocárdio temporariamente preserva a função da bomba e reduz o estresse da parede ventricular, porém, quando prolongada, induz arritmias cardíacas, cardiomiopatia dilatada, insuficiência cardíaca (IC) e morte súbita ⁴⁷⁻⁴⁹.

Um estímulo patológico causando sobrecarga de pressão, como a estenose aórtica, produz um aumento na pressão sistólica da parede ventricular que resulta em hipertrofia concêntrica ²³. Em contraste, o estímulo causado pela sobrecarga de volume como na insuficiência aórtica produz um aumento da tensão diastólica da parede ventricular e resulta em hipertrofia excêntrica patológica ²³. Essa hipertrofia excêntrica representa um maior risco em relação a hipertrofia cardíaca concêntrica patológica ²⁵.

Em resposta a um estímulo patológico, fatores hormonais e vasoativos tais como a angiotensina II (Ang II), endotelina 1 (ET-1) e noradrenalina são liberados e induzem crescimento cardíaco ^{2,50,51}. A AngII e a ET-1 se ligam e regulam positivamente subunidades da proteína GPCR (*G protein-coupled receptors*) desenvolvendo a hipertrofia cardíaca associada à disfunção cardíaca ^{52,53}. A Ang II é a principal substância vasoativa do sistema renina-angiotensina, com uma variedade de ações patológicas e fisiológicas no sistema cardiovascular através de efeitos sistêmicos e locais, incluindo vasoconstrição, liberação de aldosterona e crescimento celular ^{2,54,55}. Está bem estabelecido que o bloqueio da formação de Ang II por ACEI (*angiotensin converting enzyme inhibitors*), atenua a hipertrofia induzida por sobrecarga de pressão em modelos animais e em humanos ^{2,56}.

Além do ACEI, outro agente com propriedades anti-hipertróficas é o bloqueador dos receptores β -adrenérgicos (β -bloqueadores) que também influencia positivamente o coração na remodelação ventricular⁵⁷. A estimulação β -adrenérgica ativa a via PI3K/AKT que induz hipertrofia do miocárdio, fibrose intersticial e disfunção cardíaca; é diretamente mediada por duas proteínas-alvo, a mTOR (*mammalian target of rapamycin*) e a GSK3 β (*glycogen synthase kinase 3*)^{43,58}. O Ca^{2+} também participa do processo de hipertrofia patológica a partir da via Ca^{2+} /CaMKII (*calmodulin-dependent kinase II*) como um regulador de sinalização para a remodelação cardíaca e IC⁵⁹.

Outras importantes vias no processo de hipertrofia patológica são as de sinalização MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*) que envolvem a ERKs (*extracellular signal-regulated kinases*), JNKs (*c-Jun amino-terminal kinase*) e p38-MAPKs, classicamente iniciadas pela ativação de proteínas G em cardiomiócitos^{60,61}; todos os três tipos de MAPKs são ativadas em resposta aos agonistas GPCR e ao estresse mecânico^{2,61-63}.

Apesar da eficácia global de agentes como bloqueadores de AngII, β -bloqueadores e bloqueadores do canal Ca^{2+} ser relativamente limitada⁶⁴, eles afetam positivamente o coração e reduzem a hipertrofia, limitando a sinalização através de um circuito neuroendócrino e vias intracelulares de transdução que sustentam o crescimento dos cardiomiócitos⁶⁵.

Outro aspecto muito importante relacionado à hipertrofia patológica é a expressão do programa de genes fetais como ANP (*atrial natriuretic peptide*), BNP (*brain natriuretic peptide*) e α -actina e β -MHC (*β -myosin heavy chain*), comumente utilizados como marcadores moleculares desse processo^{2,66-68}.

d) Hipertrofia Cardíaca e Insuficiência Cardíaca

Além de ser um fator de risco para o infarto do miocárdio, arritmias e morte súbita, a hipertrofia cardíaca também está associada a quase todas as formas de insuficiência cardíaca⁴⁸. Em resposta a um aumento crônico de carga, há um crescimento compensatório caracterizado por um aumento inicial da massa do coração para normalizar o estresse da parede e permitir o funcionamento normal da função cardiovascular em repouso. No entanto, se o aumento do estresse na parede não for reduzido, o coração hipertrofiado pode dilatar, diminuir sua função contrátil e entrar em insuficiência².

1.3. Insuficiência Cardíaca.

a) Epidemiologia

A IC é a via final comum da maioria das doenças que acometem o coração e suas manifestações são de difícil diagnóstico ⁶⁹. A identificação da doença cardíaca subjacente é crucial para fins terapêuticos e determina o tratamento específico a ser utilizado ⁷⁰, tornando a IC um dos mais importantes desafios clínicos atuais na área da saúde, principalmente por ser um problema epidêmico em progressão ⁷¹. Os dados de incidência e prevalência da IC na maioria dos países são raros ou insuficientes para uma avaliação precisa ⁶⁹. Cerca de 1-2% da população adulta em países desenvolvidos tem IC, com o aumento de 2 a 3%, em indivíduos com menos de 75 anos ^{72,73} e aumento na prevalência é de $\geq 10\%$ entre pessoas com mais de 70 anos de idade ⁷⁴. Nos Estados Unidos da América, a IC afeta 5,7 milhões de pessoas e é responsável por uma em cada nove mortes por ano ^{75,76}. Na Europa, existem pelo menos 15 milhões de pacientes com IC ⁷³. Os dados epidemiológicos da síndrome no Brasil são semelhantes aos encontrados nos países desenvolvidos; conforme dados publicados pelo Ministério da Saúde, a IC encontra-se entre as principais causas de internação do Sistema Único de Saúde ⁷⁷. No ano de 2007 no Brasil, as doenças cardiovasculares representaram a terceira causa de internações no SUS e a IC é considerada a causa mais frequente de internação por doença cardiovascular ⁷¹ e também é a causa mais comum de hospitalização em pacientes com mais de 65 anos de idade ⁷².

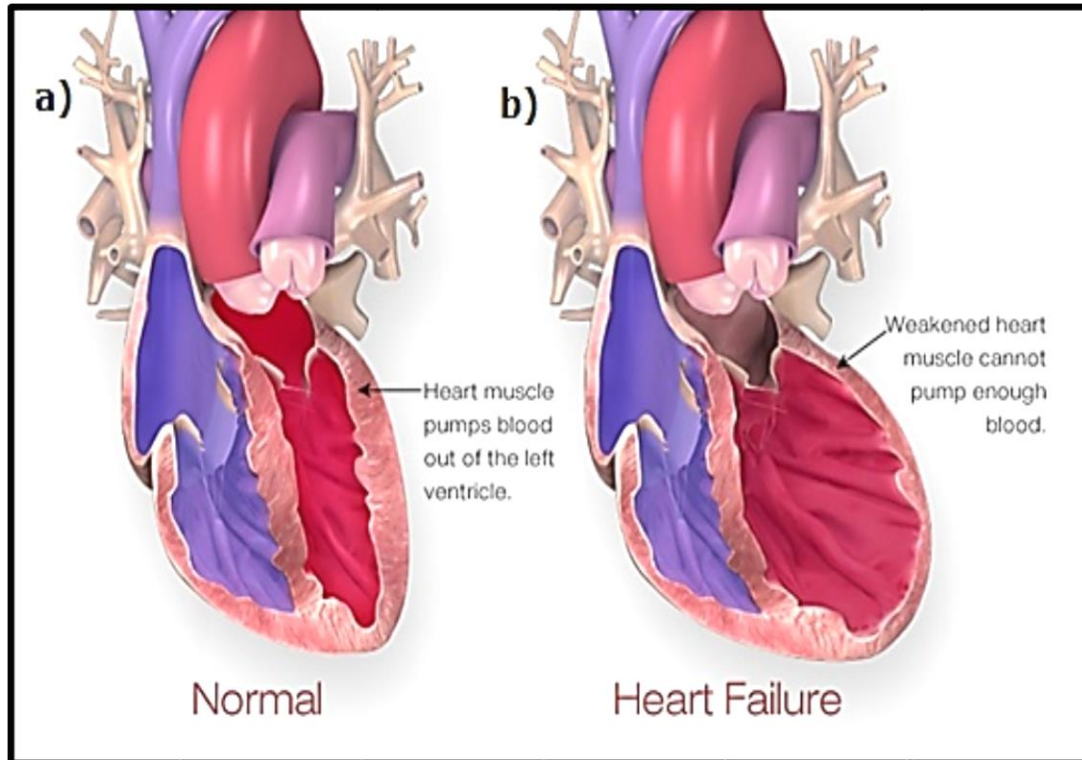
Nas últimas décadas, a prevalência de IC aumentou mais de 150% e o número de pacientes continua a subir ³⁰, refletindo a melhoria no tratamento e na gestão de doenças cardiovasculares e da IC, proporcionando o envelhecimento da população acometida ⁶⁹. Os mecanismos moleculares, celulares e genéticos que envolvem a insuficiência cardíaca ainda não foram completamente esclarecidos devido à complexidade do processo da doença ^{30,78}.

b) Descrição.

A insuficiência cardíaca é definida como disfunção cardíaca que ocasiona inadequado suprimento sanguíneo para atender às demandas metabólicas do corpo ^{71,76} (**Figura 3**), ou seja, é uma anormalidade cardíaca na estrutura ou função que conduz à

insuficiência do coração ao fornecer oxigênio a uma velocidade compatível a requisitada pelos tecidos ⁷³.

Figura 3. Insuficiência Cardíaca.



a) Coração normal com paredes preservadas e bombeamento normal do sangue pelo ventrículo esquerdo. **b)** Coração insuficiente com diminuição na espessura da parede ventricular e bombeamento insuficiente de sangue. (http://www.heart.org/HEARTORG/Conditions/HeartFailure/AboutHeartFailure/About-Heart-Failure_UCM_002044_Article.jsp ⁷⁹).

A IC é uma condição patológica complexa e progressiva com envolvimento de fatores hereditários, ambientais e comportamentais, é caracterizada por dispnéia e fadiga em repouso ou com esforço ³⁰, sinais de retenção de líquidos, taquicardia, taquipnéia, estertores pulmonares, derrame pleural, aumento da pressão venosa jugular, edema periférico, hepatomegalia, e a evidência objetiva de uma anormalidade estrutural ou funcional do coração em repouso ⁷⁰. Além disso, leva a um comprometimento nas atividades de vida diárias por limitações da atividade física devido a dispnéia e fadiga, ocasionando piora da qualidade de vida desses indivíduos ³⁰. É classificada de acordo com a progressão da doença: (A) fatores de risco para insuficiência cardíaca ⁷⁶ como doença isquêmica do coração, hipertensão arterial sistêmica, tabagismo, obesidade e diabetes mellitus ⁶⁹; (B) doença cardíaca estrutural assintomática; (C) insuficiência

cardíaca sintomática e (D) terapia médica ineficaz que requer consideração para transplante, apoio mecânico, ou hospitalização ⁷⁶.

Independentemente da anormalidade cardíaca, a síndrome de insuficiência cardíaca avançada apresenta um quadro complexo, que inclui as perturbações da função do miocárdio, superexpressão de citocinas, remodelação ventricular, alteração hemodinâmica, ativação neuro-humoral, bem como disfunção vascular e endotelial ⁸⁰, interagindo com diversas etiologias cardiovasculares ⁷⁰. Além de ativar uma cascata de mecanismos neuro-hormonais compensatórias que envolvem o sistema nervoso adrenérgico, o sistema renina-angiotensina, citocinas e outros mediadores, os quais são ativados para manutenção da homeostase cardiovascular ³⁰.

Estudos recentes identificaram a importância de citocinas como mediadores dos mecanismos da progressão da doença ⁸⁰, e mostraram um aumento nos níveis plasmáticos do ANP ⁸¹ e das citocinas TNF- α (*tumor necrosis factor-alpha*) e IL-6 (*interleukin 6*) ^{24,82} em condições de IC ⁸⁰. As alterações hemodinâmicas em pacientes com insuficiência cardíaca avançada envolvem a elevação da pressão de enchimento, redução do débito cardíaco e pulmonar, e aumento resistência vascular sistêmica ⁸⁰. Nas últimas décadas, o uso de modelos de ratos geneticamente modificados sugeriu a participação de fatores reguladores moleculares que medeiam a remodelação ventricular e a transição para a insuficiência cardíaca ³².

c) Tipos e Classes.

Segundo a classificação funcional do *New York Heart Association* (NYHA), a insuficiência cardíaca pode ser dividida em três tipos principais: esquerda, direita e congestiva ⁷⁹ podendo ser subdividida em sistólica ou diastólica, aguda ou crônica. A terminologia designada para descrever a IC pode ser baseada em três aspectos principais: (A) medida da fração de ejeção (EF); (B) tempo de curso de insuficiência cardíaca e (C) severidade da IC em relação à tolerância ao exercício físico e divididas na classes: I (nula), II (leve), III (moderada) e IV (grave) ⁷⁰; descritas no **Quadro 1**.

Quadro 1. Classificação da capacidade funcional do paciente com IC em relação a severidade e ao exercício físico segundo NYHA (*New York Heart Association*) e ESC (*European Society of Cardiology*).

Classes	Limitação da atividade física
Classe I	Pacientes com doença cardíaca, sem limitação de atividade física. Atividade física comum não causa fadiga, palpitação, dispneia ou dor anginosa
Classe II	Pacientes com doença cardíaca com leve limitação da atividade física. Atividades físicas comuns resultam em fadiga, palpitação, dispneia ou dor.
Classe III	Pacientes com doença cardíaca com acentuada limitação da atividade física. Pouca atividade física provoca fadiga, palpitação, dispneia ou dor anginosa.
Classe IV	Pacientes com doença cardíaca com incapacidade de realizar atividade física sem desconforto. Os sintomas de insuficiência cardíaca ou a síndrome de angina podem estar presentes mesmo em repouso. Qualquer atividade física aumenta o desconforto.

http://www.heart.org/HEARTORG/Conditions/HeartFailure/AboutHeartFailure/Classes-of-Heart-Failure_UCM_306328_Article.jsp⁸³

1.4. Modelo de Estenose Aórtica

A indução gradual da hipertrofia ventricular e posterior IC através do modelo de estenose da aorta ascendente por bandagem da aorta tem sido relatada em modelos animais como camundongos⁸⁴, ratos e cobaias⁸⁰. Os animais ainda jovens são submetidos à toracotomia mediana para fixação de um clipe ao redor da aorta, então com o crescimento do animal e a manutenção do diâmetro do vaso, há o aparecimento progressivo da estenose aórtica⁸⁴⁻⁸⁶, devido à dificuldade na abertura da válvula aórtica, redução na fração de ejeção e acúmulo anormal de sangue no ventrículo esquerdo^{84,85}.

A estenose aórtica geralmente é diagnosticada pela primeira vez a partir de um sopro na auscultação, porém, existem várias abordagens para avaliação como o ecocardiograma que; a partir de imagens, tem-se o nível de obstrução, calcificação e

anatomia da válvula; e a resposta do ventrículo esquerdo à sobrecarga de pressão por velocidade da aorta e área da válvula ⁸⁶.

Essa indução da IC induzida por anormalidades cardiovasculares, como a estenose aórtica induz alterações na expressão de genes, vias de sinalização, e mecanismos regulatórios celulares e moleculares ³⁰. E esses processos envolvidos com doenças cardíacas podem colaborar com a identificação por alvos promissores para estratégias anti-hipertróficas e opções para tratamento e prevenção da insuficiência cardíaca ²⁸.

1.5. RNAs não codificantes

As sequências mais estudadas no genoma humano são as de genes codificantes de proteínas constituídas por éxons codificantes equivalentes a 1,5% do genoma, aumentando para 2% quando as regiões não traduzidas (UTRs) são consideradas ⁸⁷. Porém, nos últimos anos, tornou-se cada vez mais evidente que a porção do genoma não codificadora de proteínas é de fundamental importância funcional para o desenvolvimento normal, fisiologia, e diversas doenças ⁸⁸.

Os RNAs não codificantes (ncRNAs) são divididos em três classes baseadas no seu tamanho, incluindo; pequenos ncRNAs que variam de 17 a 50 nucleotídeos; médios ncRNAs, que tem aproximadamente até 200 nucleotídeos; e os longos ncRNAs que possuem acima de 200 nucleotídeos ⁸⁹. A relevância funcional da porção não-codificadora de proteínas do genoma tornou-se evidente principalmente devido a uma classe de pequenos ncRNAs, os microRNAs (miRNAs) ⁹⁰.

1.6. Pequenos ncRNAs (small ncRNAs)

Através de análises do genoma e transcriptoma, os pequenos RNAs não codificantes foram descritos pelo envolvimento em quase todos os processos biológicos, incluindo o tempo de desenvolvimento, diferenciação e proliferação celular, a apoptose, controle metabólico, silenciamento gênico e defesa antiviral ⁹¹. Esses pequenos RNAs tem como função exercer a regulação da expressão gênica a nível transcricional, por afetar a estrutura da cromatina ou, pós-transcricionalmente, afetando a estabilidade do RNA mensageiro (mRNA) e/ou a tradução de proteínas ⁹². São classificados em diferentes grupos baseados em sua origem ou nos componentes moleculares aos quais estão associados; dentre os grupos estão os miRNAs (*microRNAs*), snoRNAs (*small nucleolar*

RNAs), snRNAs (*small nuclear RNAs*), tRFs (*tRNA-derived fragments*), piRNAs (*piwi-interacting RNAs*), tiRNAs (*tRNA-derived stress-induced fragments*), endosiRNAs (*endogenous small interfering RNAs*), rasiRNAs (*repeat associated small interfering RNAs*), piRNA-like (*piRNA-like small RNAs*) e exosiRNAs (*exogenous small interfering RNAs*)^{89,93,94}.

Dentre os pequenos ncRNAs, os microRNAs representam a classe mais bem descrita e estudada no coração até o momento, devido ao papel importante que desempenham na regulação da resposta cardíaca ao estresse, por causarem mudanças na expressão de genes, atuando como reguladores-chaves do crescimento e da função cardíaca, e por constituírem potenciais alvos terapêuticos para doenças cardiovasculares⁹⁵.

1.7. MicroRNAs

a) Descrição

Os miRNAs representam uma classe de pequenos RNAs com aproximadamente 17-25 nucleotídeos, gerados a partir transcritos em forma de *hairpin*, que reprimem pós-transcricionalmente a expressão gênica por pareamento de bases em locais complementares na região 3' não traduzida (3' UTR), a região *seed*, de seus RNAs mensageiros alvos inibindo-o ou degradando-o. Destacam-se atualmente na literatura mais de 25141 microRNAs de 193 espécies registrados no banco de dados miRBase (<http://www.mirbase.org>), com 2042 microRNAs maduros já descritos em humanos (miRBase v. 19.0).

b) Biogênese

A biogênese dos microRNAs começa no núcleo com a síntese de longos transcritos primários, os pri-microRNAs, pela RNA polimerase II^{91,92,96}; esses transcritos mantêm características tais como a estrutura de *cap* na sua região 5' e cauda de poli (A) na sua região 3'⁹⁶⁻⁹⁸. Ainda no núcleo, os pri-microRNAs são clivados pelo complexo enzimático Drosha(RNase III)-DGCR8 (*DiGeorge Syndrome critical region gene 8*), originando moléculas com estrutura em forma de *hairpin*, os pré-microRNAs, com aproximadamente 70 pb^{91,93,99-101}. Os pré-microRNAs são exportados para o citoplasma

por um membro da família de receptores de transporte nuclear, a proteína exportina-5 (EXP5) ^{102,103}. No citoplasma, os pré-microRNAs serão clivados pela Dicer e processados em uma molécula dupla fita de RNA maduro e funcional com aproximadamente 22 nucleotídeos que associa-se à proteína Argonauta para formar o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) ^{91,104,105}. Uma das fitas permanece na proteína Argonauta como o microRNA maduro (fita guia), enquanto a outra fita é degradada ¹⁰⁶. A interação entre o RNA mensageiro alvo e o complexo miRNA-RISC ocorre devido à complementaridade total ou parcial de uma sequência de 5-8 nucleotídeos do microRNA e do RNA mensageiro alvo ^{93,107,108}. O complexo miRNA-RISC interage com sítios ligantes da região 3' UTR do RNA mensageiro alvo inibindo a expressão de genes ou degradando o RNA mensageiro alvo ^{92,93,107,109-111}.

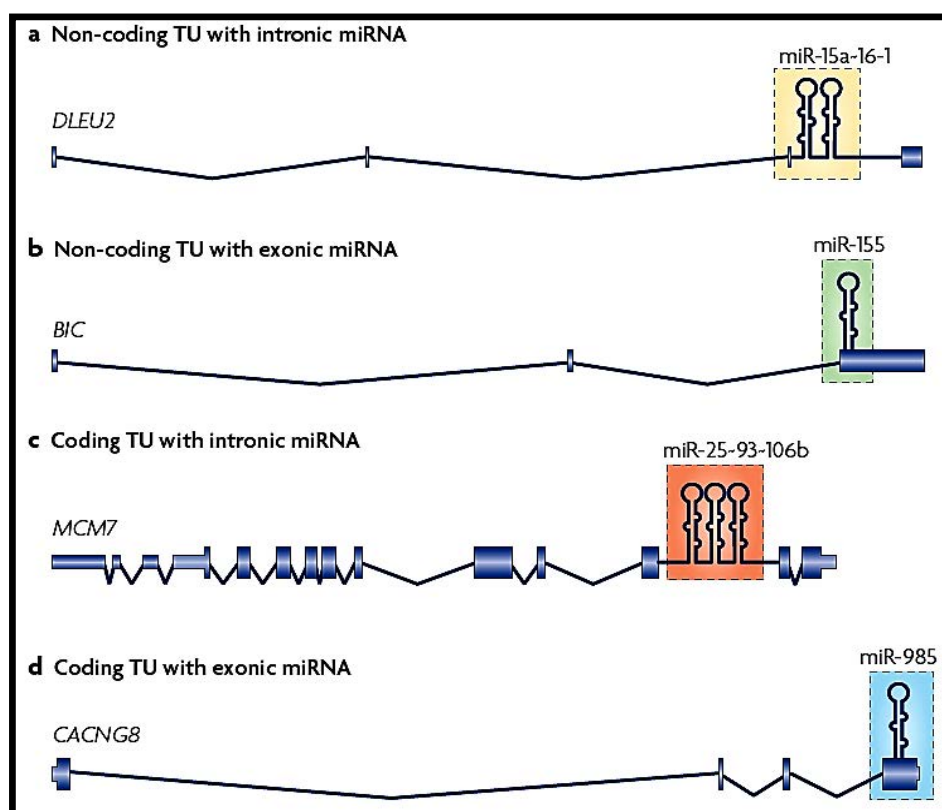
1.8. Regulação da Expressão Gênica

Essa repressão da tradução mediada por microRNAs pode ocorrer de maneiras distintas ¹¹²⁻¹¹⁵: (a) inibição da tradução na fase inicial, ocorre interferindo a ligação dos fatores de início de tradução de eucariotos (eIFs, *eukaryotic translation initiation factors*) e/ou impedindo a montagem do ribossomo competente na tradução; (b) inibição da tradução na fase de pós-iniciação com inibição do alongamento da tradução ¹¹⁶; e (c) repressão da tradução induzida por deadenilação e/ou degradação subsequente do mRNA alvo.

Os microRNAs exercem um papel-chave em diversas vias regulatórias, pois os microRNAs e seus alvos formam redes reguladoras extremamente complexas ⁹¹. Por exemplo, cada RNA mensageiro alvo pode ser regulado por mais de um microRNA e cada microRNA é capaz de regular uma variedade de mRNAs alvos ^{101,117}.

Cerca de 40% dos *loci* de microRNAs estão localizados na região intrônica de transcritos não-codificantes, enquanto 10% na região exônica de unidade transcricionais policistrônicas (UT) não-codificantes; os microRNAs em UTs que codificam proteínas são encontrados em regiões intrônicas e representam aproximadamente 40% de todos os *loci* de microRNAs ⁹¹ (**Figura 4**).

Figura 4. Localização genômica de microRNAs.



Os microRNAs podem ser classificados em quatro grupos de acordo com suas localizações genômicas em relação as posições de éxons e íntrons. **a)** Cluster dos microRNAs *miR-15a* e *miR-16-1* no íntron de um gene não codificante *DLEU2*. **b)** *miR-155* localizado no éxon do transcritos não codificante *BIC*. **c)** Cluster do *miR-25*, *miR93* e *196b* localizado no íntron do transcrito codificador do fator transcricional *MCM7*. **d)** *miR-985*, localizado no éxon de transcrito codificador da proteína *CACNG8*. As caixas azuis indicam regiões de éxons. (Kim *et al.*, 2009⁹¹)

Em mamíferos, aproximadamente 60% de todos os genes codificadores de proteínas são regulados por microRNAs¹¹⁸ e são conhecidos por regular inúmeros processos celulares¹¹⁹, incluindo o controle do tempo do desenvolvimento, diferenciação de células hematopoiéticas, apoptose, proliferação celular e desenvolvimento de órgãos.

Portanto, a partir da predição de alvos, dados de expressão gênica e conhecimento biológico, os RNAs mensageiros candidatos para tais processos podem ser identificados e estudados ajudando melhorar a compreensão na complexidade das redes e de como esses genes são regulados por microRNAs¹²⁰. Essas características tornam os microRNAs ferramentas eficientes para determinação de vias específicas envolvidas em doenças ou processos biológicos.

1.9. MicroRNAs na Insuficiência Cardíaca

O crescimento hipertrófico que acompanha muitas doenças que afligem o coração é caracterizado por um aumento na síntese de proteínas, montagem de sarcômeros adicionais, aumento da fibrose, re-expressão de genes fetais cardíacos e aumento do tamanho dos cardiomiócitos sem alterar seu número ^{35,121–125}; e a ativação de várias vias de sinalização intracelulares e mediadores de transcrição dos cardiomiócitos ^{95,123}. Esses processos são regulados por diferentes vias celulares, incluindo as que envolvem a ação de microRNAs.

Quatro famílias de microRNAs são altamente expressas no coração: miR-1, miR-133, miR-208 e miR-499 ^{122,126}. A família miR-1 representa 40% de todo o microRNA expresso no coração, enquanto os miR-208a, miR-208b e miR-499 são específicos do cardiomiócito ¹²⁶ e geralmente estão superexpressos em doenças cardíacas. O silenciamento do miR-208a em ratos Dahl, um modelo de hipertensão arterial, previne a remodelação cardíaca patológica ^{127,128}. Os miR-1 e miR-133 pertencem à mesma unidade transcricional e tem sua expressão diminuída em modelos murinos e em humanos com hipertrofia cardíaca ¹²⁹. Porém, há a necessidade de estudos adicionais para esclarecer e definir o papel desses miRNAs como biomarcadores moleculares e sua influência na hipertrofia cardíaca e IC.

Destacam-se atualmente na literatura estudos que utilizaram plataformas de *microarrays* para avaliação do perfil global de expressão de microRNAs sob condições clínicas ou experimentais de hipertrofia cardíaca e insuficiência cardíaca ^{95,126,130,131}. van Rooij e colaboradores ⁹⁵ utilizaram dois modelos animais de hipertrofia cardíaca patológica e IC: camundongos com bandagem da aorta torácica e camundongos transgênicos para superexpressão do gene calcineurina. Os seus resultados mostram que alguns microRNAs apresentam um perfil semelhante de expressão na hipertrofia ventricular nos dois modelos: há um aumento na expressão dos micro-RNAs miR-21, miR-23, miR-24, miR-125b, miR-195, miR-199a e miR-214, e diminuição na expressão do miR-29c, miR-93, miR-150 e miR-181b ⁹⁵. Entretanto, ainda no mesmo estudo, os animais que evoluíram para IC apresentaram um aumento na expressão do miR-24, miR-125b, miR-195, miR-199a e miR-214 e nenhuma alteração na expressão do miR-21, miR-27, miR-29c, miR-93, miR-150 e miR-181b ⁹⁵. Dentre os microRNAs regulados positivamente, o miR-195 foi capaz de induzir inicialmente hipertrofia cardíaca e depois

evolui para um fenótipo dilatado com diminuição da espessura das paredes, aumento do diâmetro ventricular e déficit na função cardíaca ⁹⁵.

O estudo recente de Prasad e colaboradores ¹³¹ comparou a expressão global de microRNAs em tecidos cardíacos humanos de corações insuficientes e controle. Esse trabalho demonstrou que oito microRNAs estão significativamente alterados em cardiomiopatia dilatada em relação aos controles. Dentre os microRNAs alterados, houve uma redução na expressão do miR-1, miR-29b, miR-7 e miR-378 e aumento da expressão do miR-214, miR-342, miR-145, miR-125b e miR-181b ¹³¹

Ikeda e colaboradores ¹³⁰ avaliaram indivíduos com cardiomiopatia dilatada, cardiomiopatia isquêmica e estenose aórtica; cada condição apresentou perfil específico conforme a etiologia e, uma assinatura de microRNAs foi capaz de predizer o diagnóstico dessas diferentes condições com um precisão de 70% ¹³⁰.

Embora esses estudos tenham relatado alguns importantes microRNAs na hipertrofia ventricular e IC estratégias que interferem em como a hipertrofia prolongada evolui para insuficiência cardíaca ainda são pouco compreendidas; e ainda é necessário identificar os eventos moleculares envolvidos nesse processo ¹²⁴, em especial, o efeito de terapias não farmacológicas, como o exercício físico.

1.10. Exercício, Micro-RNAs e Insuficiência Cardíaca.

Apesar de todos os conhecidos efeitos benéficos do exercício físico, atualmente este veio se tornar parte da gestão de rotina de insuficiência cardíaca crônica ¹³²⁻¹³⁵. Os dados definitivos dos efeitos do treinamento físico sobre o prognóstico da IC ainda não estão disponíveis ¹³⁶.

Há um consenso de que as terapias coadjuvantes para a doenças cardiovasculares aumentam a qualidade de vida e as taxas de sobrevida dos pacientes ¹³². Agindo como uma terapia não-farmacológica, o treinamento físico reduz a uma série de fatores de risco cardiovasculares ^{133,137} e é reconhecido como uma estratégia importante e segura para a prevenção e tratamento insuficiência cardíaca ^{134,135,138}.

Apesar de estudos questionarem o impacto do exercício na IC ¹³⁹, outros estudos abordando a eficácia e os benefícios do treinamento físico como uma intervenção terapêutica na população com IC sugerem uma melhora modesta da qualidade de vida porém estaticamente significativa ¹⁴⁰⁻¹⁴². Além de diminuir a resistência vascular sistêmica, o exercício físico aumenta a função cardíaca, a capacidade sistólica ¹⁴³, e a

absorção máxima de oxigênio (VO_2)¹³⁹. Outros estudos indicam que o exercício físico é um tratamento viável em modelos animais e em humano com IC, demonstrado pela melhora da sobrevida e início tardio de IC descompensada, invertida ou atenuada remodelação patológica do ventrículo esquerdo, e melhora da qualidade de vida^{132,135,144,145}.

Uma área de grande interesse atual busca aspectos relacionados à resposta do organismo ao exercício ao nível molecular e sugere que os micro-RNAs exerçam um papel fundamental nos mecanismos envolvidos. A expressão alterada de microRNAs na hipertrofia miocárdica, no infarto do miocárdio e na insuficiência cardíaca, demonstram que os microRNAs são promissores no diagnóstico e prognóstico, e potenciais para novas descobertas terapêuticas na Insuficiência Cardíaca¹²⁶. As vias de sinalização que levam a hipertrofia a partir de um estímulo fisiológico, como exercício, são diferentes das que provocam a hipertrofia patológica e, portanto, desencadeiam diferentes respostas na expressão dos miRNAs¹⁴⁶.

O exercício físico é um estímulo externo, que modula a expressão dos genes mediante mecanismos distintos¹²⁶, entre eles o silenciamento gênico via pequenos RNAs⁹¹. A possibilidade de mimetizar microRNAs com sua expressão reduzida, ou de antagonizar aqueles que apresentam sua expressão aumentada em determinada doença, representam um potencial terapêutico e um novo paradigma no manejo das doenças cardíacas¹²⁶. O estudo do comportamento dessas moléculas no exercício físico representa, portanto, um grande potencial de novas descobertas dessa modalidade terapêutica na IC¹²⁶. Entretanto ainda não há estudos que tenham avaliado o comportamento dos miRNAs especificamente no coração em um modelo experimental de hipertrofia ventricular e IC em resposta ao treinamento físico¹²⁶.

2. CONCLUSÃO

Verificou-se que o treinamento físico durante a transição de hipertrofia cardíaca para insuficiência cardíaca promoveu a desregulação dos microRNAs miR-132,-146b, 155, -208b, -212, -223 e -21, relatados na literatura como importantes reguladores da remodelamento cardíaco hipertrófico. Em conjunto, nossos resultados revelaram a contribuição potencial do treinamento físico atenuando a disfunção cardíaca durante a IC provavelmente através de miRNAs que regulam redes de genes envolvidos nesta síndrome e reforça a importância desta intervenção como uma ferramenta não-farmacológica para o tratamento da insuficiência cardíaca.

REFERÊNCIAS – INTRODUÇÃO

1. Maillet, M., van Berlo, J. H. & Molkenin, J. D. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nature reviews. Molecular Cell Biology* **14**, 38–48 (2013).
2. Bernardo, B. C., Weeks, K. L., Pretorius, L. & McMullen, J. R. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacology & Therapeutics* **128**, 191–227 (2010).
3. Popescu, L. M. *et al.* Insights into the interstitium of ventricular myocardium: interstitial Cajal-like cells (ICLC). *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **10**, 429–58 (2006).
4. Bergmann, O. *et al.* Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* **324**, 98–102 (2010).
5. Hosoda, T. *et al.* Clonality of mouse and human cardiomyogenesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 17169–74 (2009).
6. Laflamme, M. a & Murry, C. E. Heart regeneration. *Nature* **473**, 326–35 (2011).
7. Li, F., Wang, X., Capasso, J. M. & Gerdes, a M. Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **28**, 1737–46 (1996).
8. Olivetti, G. *et al.* Aging, cardiac hypertrophy and ischemic cardiomyopathy do not affect the proportion of mononucleated and multinucleated myocytes in the human heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **28**, 1463–77 (1996).
9. Adler, C. P. & Costabel, U. Cell number in human heart in atrophy, hypertrophy, and under the influence of cytostatics. *Recent Advances in Studies on Cardiac Structure and Metabolism* **6**, 343–55 (1975).
10. Thornburg, K. *et al.* Regulation of the cardiomyocyte population in the developing heart. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **106**, 289–99 (2011).
11. Kikuchi, K. & Poss, K. D. Cardiac Regenerative Capacity and Mechanisms. *Annu Rev Cell Dev Biol* 719–741 (2012).
12. Giraud, G. D., Faber, J. J., Jonker, S., Davis, L. & Anderson, D. F. Intravascular infusions of plasma into fetal sheep cause arterial and venous hypertension. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)* **99**, 884–9 (2005).
13. Sundgren, N. C., Giraud, G. D., Stork, P. J. S., Maylie, J. G. & Thornburg, K. L. Angiotensin II stimulates hyperplasia but not hypertrophy in immature ovine cardiomyocytes. *The Journal of Physiology* **548**, 881–91 (2003).

14. Giraud, G. D., Louey, S., Jonker, S., Schultz, J. & Thornburg, K. L. Cortisol stimulates cell cycle activity in the cardiomyocyte of the sheep fetus. *Endocrinology* **147**, 3643–9 (2006).
15. Sundgren, N. C. *et al.* Extracellular signal-regulated kinase and phosphoinositol-3 kinase mediate IGF-1 induced proliferation of fetal sheep cardiomyocytes. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative physiology* **285**, R1481–9 (2003).
16. Chattergoon, N. N. *et al.* Thyroid hormone drives fetal cardiomyocyte maturation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **26**, 397–408 (2012).
17. O'Tierney, P. F., Chattergoon, N. N., Louey, S., Giraud, G. D. & Thornburg, K. L. Atrial natriuretic peptide inhibits angiotensin II-stimulated proliferation in fetal cardiomyocytes. *The Journal of Physiology* **588**, 2879–89 (2010).
18. O'Tierney, P. F. *et al.* Reduced systolic pressure load decreases cell-cycle activity in the fetal sheep heart. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **299**, R573–8 (2010).
19. Martin-Puig, S., Wang, Z. & Chien, K. R. Lives of a heart cell: tracing the origins of cardiac progenitors. *Cell Stem Cell* **2**, 320–31 (2008).
20. Hsieh, P. C. H. *et al.* Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nat Med.* **13**, 970–974 (2009).
21. Kajstura, J. *et al.* Myocyte turnover in the aging human heart. *Circulation Research* **107**, 1374–86 (2010).
22. Dorn, G. W. The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy. *Hypertension* **49**, 962–70 (2007).
23. Grossman, W., Jones, D. & McLaurin, L. P. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *The Journal of Clinical Investigation* **56**, 56–64 (1975).
24. Rohini, A., Agrawal, N., Koyani, C. N. & Singh, R. Molecular targets and regulators of cardiac hypertrophy. *Pharmacological Research : the Official Journal of the Italian Pharmacological Society* **61**, 269–80 (2010).
25. Berenji, K., Drazner, M. H., Rothermel, B. a & Hill, J. a. Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure? *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* **289**, H8–H16 (2005).
26. Cohn, J. N., Ferrari, R. & Sharpe, N. Cardiac remodeling—concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *Journal of the American College of Cardiology* **35**, 569–582 (2000).

27. Jessup, M. & Brozena, S. Heart Failure. *The New England Journal of Medicine* **348**, 2007–2018 (2003).
28. Frey, N. & Olson, E. N. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annual Review of Physiology* **65**, 45–79 (2003).
29. van Berlo, J. H., Maillet, M. & Molkentin, J. D. Signaling effectors underlying pathologic growth and remodeling of the heart. *The Journal of Clinical Investigation* **123**, 37–45 (2013).
30. Liew, C.C. & Dzau, V. J. Molecular genetics and genomics of heart failure. *Nature Reviews. Genetics* **5**, 811–25 (2004).
31. Marijjanowski, M. M., Teeling, P., Mann, J. & Becker, a E. Dilated cardiomyopathy is associated with an increase in the type I/type III collagen ratio: a quantitative assessment. *Journal of the American College of Cardiology* **25**, 1263–72 (1995).
32. Kehat, I. & Molkentin, J. D. Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiologic stimulation. *Circulation* **122**, 2727–2735 (2010).
33. Beckner, G. & Angeles, L. Hypertrophy of the Heart: Electrocardiographic Distinction Between Physiologic and Pathologic Enlargement. *Official Journal of the California Medical Association* **82**, 151–158 (1955).
34. Heineke, J. & Molkentin, J. D. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **7**, 589–600 (2006).
35. Dorn, G. W., Robbins, J. & Sugden, P. H. Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. *Circulation Research* **92**, 1171–5 (2003).
36. Bellomo, D. *et al.* Mice Lacking the Vascular Endothelial Growth Factor-B Gene (Vegfb) Have Smaller Hearts, Dysfunctional Coronary Vasculature, and Impaired Recovery From Cardiac Ischemia. *Circulation Research* **86**, e29–e35 (2000).
37. Karpanen, T. *et al.* Overexpression of VEGF-B in mouse heart alters cardiac lipid metabolism and induces myocardial hypertrophy. *Circulation Research*. **103**, 1018–1026 (2008).
38. Adams, T. E., Epa, V. C., Garrett, T. P. J. & Ward, C. W. Structure and function of the type 1 insulin-like growth. *CLMS Cellular and Molecular Life Sciences* **57**, 1050–1093 (2000).
39. Efstratiadis, A. Genetics of mouse growth. *The International Journal of Developmental Biology* **42**, 955–76 (1998).
40. McMullen, J. R. *et al.* Phosphoinositide 3-kinase(p110 α) plays a critical role for the induction of physiological , but not pathological , cardiac hypertrophy. *PNAS* **100**, 12355–12360 (2003).

41. McMullen, J. R. *et al.* The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase(p110alpha) pathway. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 4782–93 (2004).
42. DeBosch, B. *et al.* Akt1 is required for physiological cardiac growth. *Circulation* **113**, 2097–104 (2006).
43. Zhai, P. *et al.* Glycogen synthase kinase-3alpha reduces cardiac growth and pressure overload-induced cardiac hypertrophy by inhibition of extracellular signal-regulated kinases. *The Journal of Biological Chemistry* **282**, 33181–91 (2007).
44. Chen, Y.-F. *et al.* Improvement of left ventricular remodeling after myocardial infarction with eight weeks L-thyroxine treatment in rats. *Journal of Translational Medicine* **11**, 40 (2013).
45. Anzai, T. Post-Infarction Inflammation and Left Ventricular Remodeling. *Circulation Journal* **77**, 580–587 (2013).
46. Sutton, M. G. S. J. & Sharpe, N. Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction : Pathophysiology and Therapy. *Circulation* **101**, 2981–2988 (2000).
47. Drazner, M. H. *et al.* Increased left ventricular mass is a risk factor for the development of a depressed left ventricular ejection fraction within five years: the Cardiovascular Health Study. *Journal of the American College of Cardiology* **43**, 2207–15 (2004).
48. Levy, D., Garrison, R. J., Savage, D. D., Kannel, W. B. & Castelli, W. P. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *The New England Journal of Medicine* **322**, 1561–1566 (1990).
49. De Simone, G., Gottdiener, J. S., Chinali, M. & Maurer, M. S. Left ventricular mass predicts heart failure not related to previous myocardial infarction: the Cardiovascular Health Study. *European Heart Journal* **29**, 741–7 (2008).
50. Schunkert, H., Weinberg, E. O., Bruckschlegel, G., Riegger, a J. & Lorell, B. H. Alteration of growth responses in established cardiac pressure overload hypertrophy in rats with aortic banding. *The Journal of Clinical Investigation* **96**, 2768–74 (1995).
51. Yayama, K. *et al.* Up-Regulation of Angiotensin II Type 2 Receptor in Rat Thoracic Aorta by Pressure-Overload. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **308**, 736–743 (2004).
52. Gutkind, J. S. The Pathways Connecting G Protein-coupled Receptors to the Nucleus through Divergent Mitogen-activated Protein Kinase Cascades. *The Journal of Biological Chemistry* **273**, 1839–1842 (1998).

53. D'Angelo, D. D. *et al.* Transgenic Galphaq overexpression induces cardiac contractile failure in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 8121–6 (1997).
54. Zimmerman, B. G. & Dunham, E. W. Tissue renin-angiotensin system: a site of drug action? *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **37**, 53–69 (1997).
55. De Gasparo, M., Catt, K. J., Inagami, T. & Wright, J. W. International Union of Pharmacology. XXIII. The Angiotensin II Receptors. *Pharmacological Reviews* **52**, 415–472 (2000).
56. Yamazaki, T., Komuro, I., Shiojima, I. & Yazaki, Y. The renin-angiotensin system and cardiac hypertrophy. *Heart* **76**, 33–35 (1996).
57. Feron, O., Salomone, S. & Godfraind, T. Action of the calcium channel blocker lacidipine on cardiac hypertrophy and endothelin-1 gene expression in stroke-prone hypertensive rats. *British Journal of Pharmacology* **118**, 659–64 (1996).
58. McMullen, J. R. *et al.* Inhibition of mTOR signaling with rapamycin regresses established cardiac hypertrophy induced by pressure overload. *Circulation* **109**, 3050–5 (2004).
59. Anderson, M. E., Brown, J. H. & Bers, D. M. CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* **51**, 468–473 (2012).
60. Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B. & Johnson, G. L. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiological Reviews* **79**, 143–80 (1999).
61. Pearson, G. *et al.* Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews* **22**, 153–83 (2001).
62. Yamazaki, T. *et al.* Mechanical loading activates mitogen-activated protein kinase and S6 peptide kinase in cultured rat cardiac myocytes. *The Journal of Biological Chemistry* **268**, 12069–76 (1993).
63. Esposito, G. *et al.* Cardiac overexpression of a G(q) inhibitor blocks induction of extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH(2)-terminal kinase activity in in vivo pressure overload. *Circulation* **103**, 1453–8 (2001).
64. Calhoun, D. a *et al.* Resistant hypertension: diagnosis, evaluation, and treatment. A scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Hypertension* **51**, 1403–19 (2008).
65. Sekiguchi, K. *et al.* Cross-regulation between the renin-angiotensin system and inflammatory mediators in cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovascular Research* **63**, 433–42 (2004).

66. Izumo, S., Nadal-Ginard, B. & Mahdavi, V. Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 339–43 (1988).
67. MacLellan, W. R. & Schneider, M. D. Genetic dissection of cardiac growth control pathways. *Annual Review of Physiology* **62**, 289–319 (2000).
68. Kuwahara, K., Nishikimi, T. & Nakao, K. Transcriptional Regulation of the Fetal Cardiac Gene Program. *Journal of Pharmacological Sciences* **119**, 198–203 (2012).
69. Bui, A. L., Horwich, T. B. & Fonarow, G. C. Epidemiology and risk profile of heart failure. *Nature Reviews. Cardiology* **8**, 30–41 (2011).
70. McMurray, J. J. V *et al.* ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart. *European Journal of Heart Failure* **14**, 803–69 (2012).
71. Bocchi, E. A. *et al.* III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica. *III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica* **93**, 1–71 (2009).
72. Lam, C. S. P., Donal, E., Kraigher-Krainer, E. & Vasan, R. S. Epidemiology and clinical course of heart failure with preserved ejection fraction. *European Journal of Heart Failure* **13**(1), 18–28 (2010).
73. Dickstein, K. *et al.* ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart. *European Heart Journal* **29**, 2388–442 (2008).
74. Mosterd, A. & Hoes, A. W. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart (British Cardiac Society)* **93**, 1137–46 (2007).
75. Roger, V. L. *et al.* Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* **123**, e18–e209 (2011).
76. Liu, S. S., Monti, J., Kargbo, H. M., Athar, M. W. & Parakh, K. Frontiers of Therapy for Patients With Heart Failure Candesartan in Heart Failure. *The American Journal of Medicine* **6 – 12** (2013).
77. Albanesi Filho, F. M. [What is the current scenario for heart failure in Brazil?]. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* **85**, 155–6 (2005).
78. Chen, J. & Chien, K. R. Complexity in simplicity: monogenic disorders and complex cardiomyopathies. *The Journal of Clinical Investigation* **103**, 1483–5 (1999).

79. (AHA) American Heart Association - Heart Failure. at
<http://www.heart.org/HEARTORG/Conditions/HeartFailure/AboutHeartFailure/About-Heart-Failure_UCM_002044_Article.jsp>
80. Hasenfuss, G. Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovascular Research* **39**, 60–76 (1998).
81. Francis, G. S. *et al.* Comparison of neuroendocrine activation in patients with left ventricular dysfunction with and without congestive heart failure. A substudy of the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *Circulation* **82**, 1724–1729 (1990).
82. Torre-Amione, G. *et al.* Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *Journal of the American College of Cardiology* **27**, 1201–6 (1996).
83. AHA (American Heart Association) - Classes of Heart Failure. at
<http://www.heart.org/HEARTORG/Conditions/HeartFailure/AboutHeartFailure/Classes-of-Heart-Failure_UCM_306328_Article.jsp>
84. Weinberg, E. O. *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibition prolongs survival and modifies the transition to heart failure in rats with pressure overload hypertrophy due to ascending aortic stenosis. *Circulation* **90**, 1410–1422 (1994).
85. Hu, P. *et al.* Minimally invasive aortic banding in mice: effects of altered cardiomyocyte insulin signaling during pressure overload. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **285**, H1261–9 (2003).
86. Otto, C. M. Valvular aortic stenosis: disease severity and timing of intervention. *Journal of the American College of Cardiology* **47**, 2141–51 (2006).
87. Alexander, R. P., Fang, G., Rozowsky, J., Snyder, M. & Gerstein, M. B. Annotating non-coding regions of the genome. *Nature Reviews. Genetics* **11**, 559–71 (2010).
88. Mercer, T. R., Dinger, M. E. & Mattick, J. S. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nature Reviews. Genetics* **10**, 155–9 (2009).
89. Esteller, M. Non-coding RNAs in human disease. *Nature Reviews. Genetics* **12**, 861–74 (2011).
90. He, L. & Hannon, G. J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews. Genetics* **5**, 522–31 (2004).
91. Kim, V. N., Han, J. & Siomi, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature reviews. Molecular Cell Biology* **10**, 126–39 (2009).
92. Ambros, V. & Chen, X. The regulation of genes and genomes by small RNAs. *Development (Cambridge, England)* **134**, 1635–41 (2007).

93. Chu, C. & Rana, T. M. Small RNAs: regulators and guardians of the genome. *Journal of Cellular Physiology* **213**, 412–9 (2007).
94. Dey, B. K., Mueller, A. C. & Dutta, A. Non-micro-short RNAs: the new kids on the block. *Molecular Biology of the Cell* **23**, 4664–7 (2012).
95. van Rooij, E. *et al.* A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 18255–60 (2006).
96. Lee, Y. *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal* **23**, 4051–60 (2004).
97. Lee, Y. S. & Dutta, A. MicroRNAs in cancer. *Annual Review of Pathology* **4**, 199–227 (2009).
98. Kim, V. N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* **6**, 376–85 (2005).
99. Lee, Y. *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**, 415–9 (2003).
100. Han, J. *et al.* The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & Development* **18**, 3016–27 (2004).
101. Pritchard, C. C., Cheng, H. H. & Tewari, M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nature Reviews. Genetics* **13**, 358–69 (2012).
102. Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G. & Cullen, B. R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & Development* **17**, 3011–6 (2003).
103. Bohnsack, M. T., Czaplinski, K. & Gorlich, D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA Journal* **10**, 185–191 (2004).
104. Hutvagner, G. *et al.* A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science (New York, N.Y.)* **293**, 834–8 (2001).
105. Sen, G. L. & Blau, H. M. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nature Cell Biology* **7**, 633–6 (2005).
106. Rand, T. A., Petersen, S., Du, F. & Wang, X. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* **123**, 621–9 (2005).
107. Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281–97 (2004).

108. Garzon, R., Calin, G. a & Croce, C. M. MicroRNAs in Cancer. *Annual Review of Medicine* **60**, 167–79 (2009).
109. Lim, L. P. *et al.* Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* **433**, 769–73 (2005).
110. Tili, E., Michaille, J.-J., Costinean, S. & Croce, C. M. MicroRNAs, the immune system and rheumatic disease. *Nature Clinical Practice. Rheumatology* **4**, 534–41 (2008).
111. Williams, A. E. Functional aspects of animal microRNAs. *CMLS Cellular and Molecular Life Science* **65**, 545–62 (2008).
112. Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N. & Sonenberg, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature Reviews. Genetics* **9**, 102–14 (2008).
113. Eulalio, A., Huntzinger, E. & Izaurralde, E. Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* **132**, 9–14 (2008).
114. Chekulaeva, M. & Filipowicz, W. Mechanisms of miRNA-mediated post-transcriptional regulation in animal cells. *Current Opinion in Cell Biology* **21**, 452–60 (2009).
115. Huntzinger, E. & Izaurralde, E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews. Genetics* **12**, 99–110 (2011).
116. Maroney, P. a, Yu, Y., Fisher, J. & Nilsen, T. W. Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nature Structural & Molecular Biology* **13**, 1102–7 (2006).
117. Lewis, B. P., Shih, I., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P. & Burge, C. B. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* **115**, 787–98 (2003).
118. Friedman, R. C., Farh, K. K.-H., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research* **19**, 92–105 (2009).
119. Bushati, N. & Cohen, S. M. microRNA functions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **23**, 175–205 (2007).
120. Bartel, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**, 215–33 (2009).
121. Chien, K. R. Stress Pathways and Heart Failure. *Cell Minireview* **98**, 555–558 (1999).
122. Wang, N., Zhou, Z., Liao, X. & Zhang, T. Role of microRNAs in cardiac hypertrophy and heart failure. *IUBMB Life* **61**, 566–71 (2009).

123. Arad, M., Seidman, J. G. & Seidman, C. E. Phenotypic diversity in hypertrophic cardiomyopathy. *Human Molecular Genetics* **11**, 2499–506 (2002).
124. Frey, N., Katus, H. a, Olson, E. N. & Hill, J. a. Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation* **109**, 1580–9 (2004).
125. Seto, A. G. & van Rooij, E. Circulating microRNAs to identify human heart failure. *European Journal of Heart Failure* **14**, 118–9 (2012).
126. Fernandes-Silva, M. M., Carvalho, V. O., Bocchi, E. A., Guimarães, G. V. & Bacal, F. Physical Exercise and MicroRNAs: New Frontiers in Heart Failure. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* **98**, 459–466 (2012).
127. Callis, T. E. *et al.* MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *The Journal of Clinical Investigation* **119**, 2772–86 (2009).
128. Montgomery, R. L. *et al.* Therapeutic Inhibition of miR-208a Improves Cardiac Function and Survival During Heart Failure. *Circulation* **124**, 1537–47 (2011).
129. Carè, A. *et al.* MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nature Medicine* **13**, 613–8 (2007).
130. Ikeda, S. *et al.* Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiological Genomics* **31**, 367–73 (2007).
131. Prasad, S. V. N. *et al.* Unique microRNA profile in end-stage heart failure indicates alterations in specific cardiovascular signaling networks. *The Journal of Biological Chemistry* **284**, 27487–99 (2009).
132. Emter, C. A., McCune, S. A., Sparagna, G. C., Radin, M. J. & Moore, R. L. Low-intensity exercise training delays onset of decompensated heart failure in spontaneously hypertensive heart failure rats. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* **289**, H2030–8 (2005).
133. Jónsdóttir, S., Andersen, K. K., Sigurosson, A. F. & Sigurosson, S. B. The effect of physical training in chronic heart failure. *European Journal of Heart Failure* **8**, 97–101 (2006).
134. Roveda, F. *et al.* The effects of exercise training on sympathetic neural activation in advanced heart failure. *Journal of the American College of Cardiology* **42**, 854–860 (2003).
135. Wisløff, U. *et al.* Superior cardiovascular effect of aerobic interval training versus moderate continuous training in heart failure patients: a randomized study. *Circulation* **115**, 3086–94 (2007).
136. Niebauer, J., Clark, A. L., Webb-Peploe, K. M. & Coats, A. J. S. Exercise training in chronic heart failure: effects on pro-inflammatory markers. *European Journal of Heart Failure* **7**, 189–93 (2005).

137. Powers, S. K., Quindry, J. C. & Kavazis, A. N. Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radical Biology & Medicine* **44**, 193–201 (2008).
138. Downing, J. & Balady, G. J. The role of exercise training in heart failure. *Journal of the American College of Cardiology* **58**, 561–9 (2011).
139. O'Connor, C. M. *et al.* Efficacy and Safety of Exercise Training in Patients With Chronic Heart Failure: HF-ACTION Randomized Controlled Trial. *JAMA* **301**, 1439–1450 (2010).
140. Flynn, K. E. *et al.* Effects of Exercise Training on Health Status in Patients With Chronic Heart Failure: Findings From the HF-ACTION Randomized Controlled Trial. *JAMA* **301**, 1451–1459 (2009).
141. Russell, S. D. *et al.* New York Heart Association functional class predicts exercise parameters in the current era. *Am Heart Journal*. **158**, 1–12 (2010).
142. Horwich, T. B. *et al.* The Relationship Between Body Mass Index and Cardiopulmonary Exercise Testing in Chronic Systolic Heart Failure. *Am Heart Journal*. **158**, 1–15 (2009).
143. Jin, H. *et al.* Effects of exercise training on cardiac function , gene expression , and apoptosis in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **279**, H2994–H3002 (2000).
144. Emter, C. A. & Baines, C. P. Low-intensity aerobic interval training attenuates pathological left ventricular remodeling and mitochondrial dysfunction in aortic-banded miniature swine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **299**, H1348–1356 (2010).
145. Chicco, A. J. *et al.* Low-intensity exercise training delays heart failure and improves survival in female hypertensive heart failure rats. *Hypertension* **51**, 1096–102 (2008).
146. Hill, J. A. & Olson, E. N. Cardiac plasticity. *The New England Journal of Medicine* **358**, 1370–80 (2008).