

Protective Effect of High-Intensity Interval Training on Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity by Reducing MiR-499 Expression in Male Rats

Siroos Choobineh¹, Khadijeh Ebrahimi², Rahman Soori³, Reza Badalzadeh⁴

1. Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences and Health, University of Tehran, Tehran, Iran. E-mail: choobineh@ut.ac.ir
2. Corresponding Author, Department of Physical Education and Sport Sciences, Marand Branch, Islamic Azad University, Marand, Iran. E-mail: kh_ebrahimi@marandiau.ac.ir
3. Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences and Health, University of Tehran, Tehran, Iran. E-mail: soori.@ut.ac.ir
4. Molecular Medicine Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. E-mail: badalzadehr@tbzmed.ac.ir

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received:

1 August 2018

Received in revised form:

17 November 2018

Accepted:

22 November 2018

Published online:

22 September 2022

Keywords:

cardiotoxicity,
doxorubicin,
interval training,
MiR-499.

ABSTRACT

Introduction: Doxorubicin (DOX) is an effective chemotherapy treatment for various cancers, but its use has been restricted due to cardiotoxicity effects. Studies about the protective effect of High-Intensity Interval Training (HIIT) against DOX-induced cardiotoxicity and its mechanisms are rare. This study aimed to investigate the protective effect of HIIT against the DOX-induced cardiotoxicity on the level of miR-499 expression which is widely expressed under the physiological conditions in the cardiomyocytes.

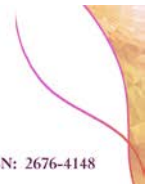
Methods: Twenty-four male Wistar rats were randomly assigned into four groups (n=6/group) including DOX (20 mg/kg body weight), HIIT (eight weeks, and seven 4-minutes sets of intervals at 80%–90% of VO₂max interspersed with 3 minutes periods at 65%–75% of VO₂max), HIIT+DOX and Control groups. The mRNA expression level was determined using the RT-PCR method. One-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc test was used for statistical analysis of data ($\alpha < 0.05$).

Results: The results showed that DOX-induction significantly increased the MIR-499 expression in the left ventricular tissue of the rats' heart ($P < 0.05$). Also, the expression level of MIR-499 was increased after exercise, but this difference was not statistically significant. Exercise before the DOX-induction also led to a significant reduction of MIR-499 expression in the HIIT+ DOX group compared with the DOX group ($P < 0.05$).

Conclusion: Therefore, performing HIIT before DOX induction can reduce the changes in MIR-499 expression caused by DOX. Therefore, HIIT could be a proper strategy for protecting the heart against DOX-induced cardiotoxicity by reducing MIR-499 expression.

Cite this article: Saberi Y., Tolouei Azar J., Razi M., Tofighi A. Protective Effect of High-Intensity Interval Training on Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity by Reducing MiR-499 Expression in Male Rats. *Journal of Sport Biosciences*. 2022; 14 (2): 5-16. DOI: <http://doi.10.22059/JSB.2021.263165.1303>.





Extended Abstract

Introduction

Doxorubicin (DOX) is an effective chemotherapy treatment for various cancers, but its use has been restricted due to cardiotoxicity effects. In recent years, extensive attention has been paid to the role of physical training, especially common endurance training, as a suitable non-pharmacological strategy for reducing the cardiotoxicity caused by DOX. Despite the greater cardiovascular adaptations of High-Intensity Interval Training (HIIT) compared with conventional endurance training, Studies on the protective effect of HIIT against DOX-induced cardiotoxicity and its molecular mechanisms are rare. This study aimed to investigate the protective effect of HIIT against the DOX-induced cardiotoxicity on the expression level of MIR-499 which is widely expressed under the physiological conditions in the cardiomyocytes.

Methods

One week after buying twenty-four male Wistar rats, all animals were initially familiarized with the rodent's treadmill (15 minutes, 10 m/min, three sessions/week). Then, the rats were randomly divided into 4 groups (n=6/groups) including: DOX (20 mg/kg of body weight, intraperitoneally), HIIT, HIIT + DOX and Control groups. The mRNA levels were determined using the RT-PCR method. HIIT training was performed for 60 minutes during 8 weeks, which included three stages: 1) 10 minutes of warm-up with the intensity of 50-55% of VO₂max; 2) seven sets of 4-minute HIIT with the intensity of 80-90% of VO₂max interspersed with 3 minutes periods with the intensity of 65%-75% of VO₂max; 3) one minutes of recovery with the intensity of 50-55% of VO₂max. Also, 72 hours after DOX injection, the animals were anesthetized and then killed, and left ventricle tissue samples were quickly taken. The mRNA levels were determined using the RT-PCR method. Statistical analysis of data was done using the one-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc test for multiple comparisons ($\alpha < 0.05$).

Results

The results showed that DOX treatment significantly increased the MIR-499 expression in the left ventricular tissue of rats' hearts ($P < 0.05$). Also, the expression of MIR-499 was increased after training, but this difference was not statistically significant. Training before the DOX-induction also significantly reduced the expression of MIR-499 in the HIIT+DOX group compared with the DOX group ($P < 0.05$). Therefore, HIIT could be a proper strategy for protecting the heart against DOX-induced cardiotoxicity by reducing MIR-499 expression.

Conclusion

The results of this study showed that the expression level of MIR-499 in cardiac cells increased after DOX treatment. Therefore, probably MIR-499 can be a suitable clinical marker in the early diagnosis of DOX-induced heart damage. Nevertheless, HIIT before DOX injection can prevent the pathological increase of MIR-499 expression in the heart and thereby could reduce cardiotoxicity. Therefore, HIIT can be a suitable preventive strategy for protecting the heart against

DOX-induced cardiotoxicity by reducing the expression of MIR-499.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines: This paper is derived from a Ph.D. Thesis. The present study was conducted following ethical principles.

Funding: The research was done without using financial resources.

Authors' contribution: The authors have contributed equally. The paper was written by Khadijeh Ebrahimi under the supervision and advice of Dr. Choobineh as a supervisor and Dr. Soori and Dr. Badalzadeh as advisors.

Conflict of interest: The authors have no conflicts of interest

Acknowledgments: I would like to express my deep gratitude to my distinguished research supervisors and advisors, for their patient guidance, enthusiastic encouragement, and useful critiques of this research work.

تأثیر محافظتی تمرین تناوبی شدید بر سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین به واسطه کاهش بیان miR-499 در رت‌های نر

سیروس چوبینه^۱، خدیجه ابراهیمی^۲، رحمان سوری^۳، رضا بدلزاده^۴

۱. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزش و تندرستی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. رایانامه: choobineh@ut.ac.ir

۲. نویسنده مسؤول، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، واحد مرند، دانشگاه آزاد اسلامی، مرند، ایران. رایانامه: kh_abraimi@marandiau.ac.ir

۳. گروه فیزیولوژی ورزشی، دانشکده علوم ورزش و تندرستی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. رایانامه: soori@ut.ac.ir

۴. مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران. رایانامه: badalzadehr@tbzmed.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله پژوهشی	مقدمه: دوکسوروبیسین داروی مؤثری در درمان انواع سرطان است، ولی کاربرد آن به دلیل سمیت قلبی محدود شده است. درباره تأثیر محافظتی تمرین تناوبی شدید در مقابل سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین و مکانیسم‌های آن تحقیقات نادری وجود دارد. هدف این تحقیق بررسی تأثیر تمرین تناوبی شدید پیش از القای دوکسوروبیسین بر میزان بیان miR-499، که به طور گسترده‌ای در شرایط فیزیولوژیکی در قلب بیان می‌شود، در سلول‌های قلبی است.
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۵/۱۰	روش پژوهش: ۲۴ سر رت نر ویستار به طور تصادفی به چهار گروه (n=۶) تقسیم شدند: ۱- کنترل-سالین (Control)؛ درمان با دوکسوروبیسین (۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن) (DOX)؛ ۲- تمرینات تناوبی شدید (HIIT) (هشت هفته، ۷ ست ۴ دقیقه‌ای ۸۰-۹۰ درصد VO ₂ max مجزاشده با دوره‌های سه دقیقه‌ای ۶۵-۷۵ درصد VO ₂ max) و درمان با دوکسوروبیسین پس از اتمام آخرین جلسه تمرینات تناوبی شدید (HIIT+DOX). بررسی میزان بیان miR-499 با روش RT-PCR انجام گرفت. از تجزیه و تحلیل واریانس یکطرفه و سپس آزمون تعقیبی توکی برای بررسی آماری داده‌ها استفاده شد ($\alpha < 0.05$).
تاریخ بازنگری: ۱۳۹۷/۰۸/۲۶	یافته‌ها: نتایج نشان داد القای دوکسوروبیسین بیان miR-499 را به طور معناداری در بافت بطن چپ قلب افزایش می‌دهد ($P < 0.05$). همچنین میزان بیان miR-499 پس از تمرین افزایش یافت، ولی این تفاوت از نظر آماری معنادار نبود. تمرین پیش از القای دوکسوروبیسین نیز موجب کاهش معنادار میزان بیان miR-499 در گروه HIIT+DOX نسبت به گروه DOX شد ($P < 0.05$). بنابراین انجام تمرین تناوبی شدید پیش از القای دوکسوروبیسین می‌تواند تغییرات بیان miR-499 ناشی از دوکسوروبیسین را کاهش دهد.
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۹/۰۱	نتیجه‌گیری: نتیجه اینکه تمرین تناوبی شدید می‌تواند روش مناسبی در محافظت قلب در برابر سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین از طریق کاهش میزان بیان miR-499 باشد.
تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۰۶/۳۱	

کلیدواژه‌ها:
تمرین تناوبی،
دوکسوروبیسین،
سمیت قلبی،
MiR-499

استناد: ابراهیمی، خدیجه؛ چوبینه، سیروس؛ سوری، رحمان؛ و بدلزاده، رضا. تأثیر محافظتی تمرین تناوبی شدید بر سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین به واسطه کاهش بیان miR-499 در رت‌های نر. نشریه علوم زیستی ورزشی. ۱۴۰۱؛ ۱۴(۲): ۱۶-۵.

DOI: <http://doi.10.22059/JSB.2021.263165.1303>



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه تهران، دانشکده علوم ورزشی و تندرستی.

مقدمه

دوکسوروبیسین به عنوان یک داروی شیمی-درمانی مؤثر برای درمان انواع سرطان از سال ۱۹۶۹ به طور گسترده‌ای به کار می‌رود (۲،۱). با وجود این، کاربرد آن در درمان سرطان به دلیل سمیت قلبی (آسیب قلبی تجمعی برگشت‌ناپذیر وابسته به دوز دارو) طی درمان یا حتی بعدها که اغلب با اختلال عملکرد بطن چپ و نارسایی قلبی همراه است، محدود شده است (۴،۳). سازوکارهای مولکولی سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین به طور کامل درک نشده است، با وجود این، افزایش تولید گونه‌های اکسیداتیو واکنش‌پذیر^۱ و متعاقب آن اختلال عملکرد میتوکندری از سازوکارهای احتمالی پذیرفته‌شده عمومی‌اند (۳).

ریزآران‌ای‌ها^۲ مولکول‌های کوچک آران‌ای^۳ غیرکدکننده با طول ۲۱-۲۳ نوکلئوتید هستند که اغلب از طریق اتصال به ناحیه 3' UTR^۴ در آران‌ای پیک هدف^۵ و سپس تخریب و سرکوب ترجمه آنها، بیان ژن را کاهش می‌دهند (۵). آنها تقریباً عملکرد اساسی انواع سلول‌های مرتبط با سیستم قلبی-عروقی (مانند سلول‌های اندوتلیال، عضلات قلبی، عضلات صاف، سلول‌های التهابی و فیبروبلاست‌ها) را کنترل می‌کنند (۶). در شرایط پاتولوژیکی، کاهش یا افزایش یک ریزآران‌ای مشخص می‌تواند بیماری‌زا باشد که می‌توان با بازگرداندن سطح طبیعی بیان ریزآران‌ای این وضعیت را تصحیح کرد. بنابراین به دلیل نقش آنها در پاتوفیزیولوژی بسیاری از بیماری‌های قلبی-عروقی، برای استفاده در تشخیص، پیش‌آگهی و درمان مطالعه و بررسی شده‌اند (۶). همچنین احتمالاً ریزآران‌ای‌ها به سبب دارا بودن پایداری بالا در هر شرایطی، حضور در مایعات مختلف بدن و خاصیت بیان‌پذیری در همه بافت‌ها؛ نشانگرهای بالینی مناسبی در تشخیص زود هنگام آسیب قلبی ناشی از دوکسوروبیسین هستند (۷).

amiR-499 یکی از ریزآران‌ای‌های اختصاصی عضله، تنظیم‌کننده اصلی تکثیر، بقا و تمایز پیش‌سازهای قلب است که به طور گسترده‌ای در شرایط فیزیولوژیکی در قلب بیان می‌شود (۸). لیو و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که miR-499 به طور مستقیم ژن کدگذاری‌کننده پروتئین ۱ متصل به فولیکولین (Fnip1)، را که به طور منفی AMPK را تنظیم می‌کند، هدف قرار می‌دهد (۹). از سوی دیگر، miR-499 موجب مهار آپوپتوز سلول‌های قلبی می‌شود، زیرا miR-499 پروتئین^۸ DRP1 و شکافت میتوکندری را غیرفعال می‌کند (۱۰). گزارش شده است که سطح بیان miR-499 در پلاسمای بیماران مبتلا به انفارکتوس قلبی حاد سریع‌تر از سایر نشانگرها مانند cTnI، cTnT، CK-MB، CK و LDH افزایش می‌یابد (۱۱). همچنین متعاقب هایپرتروفی پاتولوژیک قلب، میزان بیان miR-499 در سلول‌های قلبی افزایش می‌یابد (۱۲). جالب توجه اینکه فشار اکسیداتیو سبب افزایش بیان miR-499 در سلول‌های قلبی (به عنوان بخشی از واکنش ناشی از استرس) می‌شود (۱۳). در تحقیق لیگر و همکاران (۲۰۱۷) بیان شده است که miR-499 پلازما به طور چشمگیری پس از مصرف آنتراسیکلین‌ها از جمله دوکسوروبیسین افزایش می‌یابد، که پاسخ این مایومیر با مقدار دارو و نشانگرهای آسیب قلبی ارتباط مثبتی دارد (۱۴). بنابراین ارزیابی بیشتر miR-499 می‌تواند بینشی را در مورد سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین و شاخص‌های زیستی به وجود آورد تا مداخلات زود هنگام برای کاهش سمیت قلبی را تسهیل کند (۱۴).

طی سال‌های اخیر، توجه گسترده‌ای به نقش فعالیت ورزشی به به‌ویژه استقامتی رایج به عنوان راهبرد غیردارویی مناسب در کاهش سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین معطوف شده است (۱۵،۱). شایان ذکر است که تمرینات استقامتی بیان miR-499 را در بافت بطن چپ رت‌ها افزایش می‌دهد که افزایش بیان این مایومیر می‌تواند با هایپرتروفی قلبی ناشی از فعالیت ورزشی مرتبط باشد (۱۶). از سوی

1. Reactive oxygen species (ROS)

2. MicroRNAs (miRNAs)

3. RNA

4. 3'-untranslated region of mRNA

5. Target mRNA

6. Tissue specificity

7. Folliculin interacting protein 1

8. Dynamin related protein 1

دیگر، بیان شده است که تمرین تناوبی شدید (HIIT) نسبت به تمرینات ورزشی رایج استقامتی موجب توسعه بیشتر VO_2max و عملکرد قلبی می‌شود (۱۷). برخلاف تمرینات ورزشی رایج استقامتی، تمرینات تناوبی شدید به بیماران نارسایی قلب اجازه می‌دهد تا تمرین با شدت بیشتر، اما دوره کاری کمتر را به‌طور کامل اجرا کنند (۱۵). در تحقیقی گزارش شده است که تمرینات تناوبی شدید قبل و طی استفاده از دوکسوروبیسین سطوح آنتی‌اکسیدانته را حفظ می‌کند و از طریق افزایش مقادیر آنتی‌اکسیدانته در سلول‌های قلبی از عوارض جانبی قلبی دوکسوروبیسین می‌کاهد (۱۸). با وجود سازگاری‌های قلبی-عروقی بیشتر تمرینات تناوبی شدید نسبت به فعالیت ورزشی استقامتی رایج، تحقیقات کمی به نقش این نوع فعالیت ورزشی در زمینه جلوگیری از سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین و مکانیسم‌های مولکولی آن پرداخته‌اند. بنابراین هدف این تحقیق بررسی تأثیر پیشگیرانه تمرینات تناوبی شدید در برابر سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین از طریق اندازه‌گیری میزان بیان miR-499 در سلول‌های قلبی است. ما فرض کردیم تمرینات تناوبی شدید می‌تواند از تغییرات miR-499 ناشی از دوکسوروبیسین جلوگیری کند و از این طریق سمیت قلبی را کاهش دهد.

روش تحقیق

حیوانات

۲۴ سر رت نر نژاد ویستار سه‌هفته‌ای نابالغ از مرکز تحقیقات حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی تبریز خریداری و به‌منظور سازگاری با محیط جدید، در دمای محیط کنترل شده $2 \pm 21^\circ C$ در چرخه ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، با دسترسی آزاد به غذا و آب به مدت یک هفته نگهداری شدند. حیوانات به‌منظور آشنایی با فعالیت ورزشی در نوار گردان به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه طی سه جلسه در هفته تمرین کردند. سپس به‌طور تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند (هر گروه = ۶): کنترل-سالی (Control)؛ درمان با دوکسوروبیسین (DOX)؛ هشت هفته تمرینات تناوبی شدید (HIIT) و درمان با دوکسوروبیسین پس از اتمام آخرین جلسه فعالیت ورزشی (HIIT+DOX). تمامی روش‌های حیوانی در کمیته اخلاق تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات علوم ورزشی بررسی و براساس انطباق با استانداردهای اخلاقی در وزارت علوم، تحقیقات و فناوری، با کد IR.SSRI.REC.1397.311 تأیید شده است.

برنامه تمرینات تناوبی شدید

برنامه تمرینات تناوبی شدید براساس تحقیقات قبلی روی نوار گردان تنظیم شده است (۱۹)، بدین‌صورت که حیوانات روی نوار گردان به مدت پنج روز در هفته به مدت ۶۰ دقیقه و به مدت هشت هفته تمرین کردند که شامل سه مرحله بود (جدول ۱).

جدول ۱. برنامه تمرینات تناوبی شدید

گرم کردن	۱۰ دقیقه گرم کردن با شدت ۵۰-۵۵ درصد VO_2max
بدنه اصلی	۷ ست پی‌درپی ۴ دقیقه با ۸۰-۹۰ درصد VO_2max که با دوره‌های ۳ دقیقه‌ای با شدت ۶۵-۷۵ درصد VO_2max از هم جدا شده‌اند
ریکاوری	۱ دقیقه سرد کردن با شدت ۵۰-۵۵ درصد VO_2max

با توجه به دسترسی نداشتن به ابزار مستقیم تخمین VO_2max و با توجه به پژوهش اخیر (هویدال و همکاران، ۲۰۰۷) مبنی بر وجود ارتباط قوی بین سرعت حرکت دویدن روی نوار گردان و VO_2max (۲۰)، به‌طور غیرمستقیم شدت فعالیت ورزشی حیوانات براساس سرعت حرکت در ابتدای هر دو هفته به شرح زیر برآورد شد: بدین‌صورت که پس از ۱۰ دقیقه گرم کردن با سرعت ۱۰ متر بر دقیقه، سرعت نوار گردان هر دو دقیقه یک بار به میزان ۰/۳ متر بر ثانیه (۱/۸ تا ۲ متر/دقیقه) افزایش می‌یافت تا حیوانات دیگر قادر به دویدن نباشند.

^۱ . High-intensity interval training

معیار ارزیابی VO_2max ناتوانی حیوانات در ادامه دادن دویدن با افزایش سرعت نوار گردان بود. سرعت مشاهده شده در این مرحله به عنوان سرعت معادل VO_2max ثبت شد (۲۰).

تزریق دوکسوروبیسین و بافت برداری

بلافاصله پس از آخرین جلسه تمرینات تناوبی شدید، حیوانات دوز تجمعی هیدروکلوراید دوکسوروبیسین (۲۰ میلی گرم/کیلوگرم وزن بدن، داخل صفاقی) دریافت کردند. ۷۲ ساعت پس از تزریق دوکسوروبیسین و ناشتایی شبانه حیوانات با ترکیبی از کتامین و زایلانین (به ترتیب ۹۰ و ۱۰ کیلوگرم/میلی گرم) بی هوش و سپس کشته شدند و قلب به سرعت برداشته شد. بلافاصله پس از برداشت قلب، نمونه کوچکی از بافت بطن چپ حیوانات به سرعت به محلول مهارکننده RNase (Qiagen, Cat No. 76104) منتقل و تا زمان استخراج RNA در دمای $-80^{\circ}C$ درجه سانتیگراد ذخیره شد (۲۱). گروه‌های بدون القای دوکسوروبیسین نیز مقدار مشابهی از سالیان را دریافت کردند.

جداسازی RNA

برای استخراج کل RNA از بافت‌ها، از محلول تریزول Reagent isolation Tripe (محصول شرکت روش Roche) براساس دستورالعمل شرکت تولیدکننده استفاده شد. عملکرد و خلوص RNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری نانودراپ در $260/280$ نانومتر (ND-) (2000C, Thermo Fisher Scientific, USA) تعیین شد. علاوه بر این، به منظور کیفیت‌سنجی، نمونه‌ها با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد. پس از آن، نمونه‌های RNA تا زمان انجام سنتز cDNA در دمای $-80^{\circ}C$ درجه سانتیگراد نگهداری شدند (۲۱).

سنتز cDNA و Real time PCR

در این تحقیق، به منظور اندازه‌گیری کمی سطح بیان miR-499، Real time PCR دومرحله‌ای استفاده شد. در مرحله اول، کیت سنتز cDNA یونیورسال (Exiqon Cat No. 40023301) استفاده شد. پس از آن، Real time PCR کمی توسط مسترمیکس سایبرگرین اکسلنت (Exiqon, Cat No. 400203421) و ست پرایمر ویژه miR-499 (Exiqon, Cat No. 400204481) انجام گرفت (۲۱). برای نرمال‌سازی سطح بیان ژن هدف، سطح بیان U6 به عنوان ژن مرجع استفاده شد. سپس میانگین مقادیر Ct کپی‌شده محاسبه و سطح بیان نسبی ژن هدف با استفاده از روش Ct نسبی تعیین شد (۲۲).

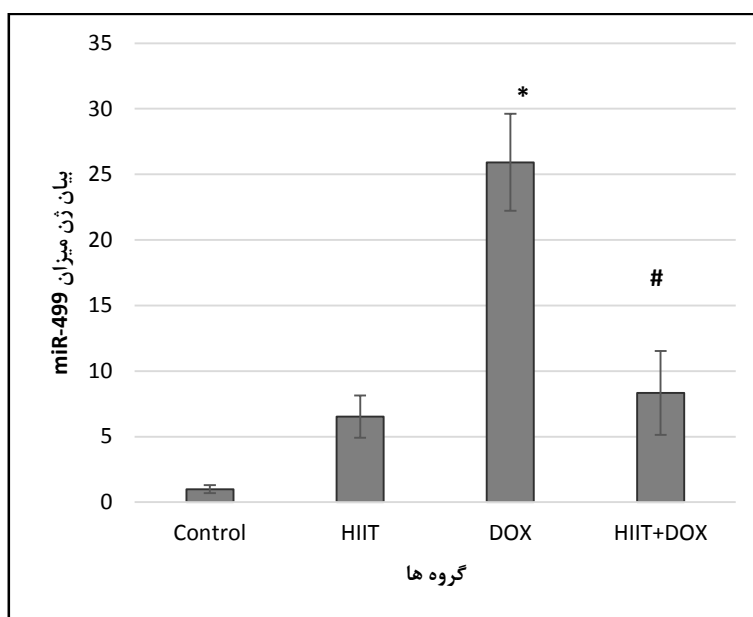
تحلیل آماری

همه داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده‌اند. تجزیه و تحلیل آماری با نرم‌افزار IBM SPSS نسخه ۲۳ انجام گرفت. از آزمون شاپیروویلیک برای بررسی طبیعی بودن داده‌ها استفاده شد. همچنین از تجزیه و تحلیل واریانس یکطرفه برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد، سپس برای تعیین هرگونه تفاوت بین گروه‌ها، آزمون تعقیبی توکی استفاده شد ($\alpha < 0.05$).

¹ . Duplicated Ct

نتایج

القای دوکسوروبیسین به رت‌ها به افزایش معنادار بیان miR-499 در گروه DOX در مقایسه با گروه Control منجر شد ($P < 0.05$). با وجود افزایش میزان بیان miR-499 پس از تمرینات تناوبی شدید در مقایسه با گروه کنترل این تفاوت از نظر آماری معنادار نبود. همچنین میزان بیان miR-499 در گروه HIIT+DOX کمتر از گروه DOX بود ($P < 0.05$). بنابراین انجام تمرینات تناوبی شدید پیش از تزریق دوکسوروبیسین می‌تواند تغییرات بیان miR-499 ناشی از دوکسوروبیسین را کاهش دهد (شکل ۱).



شکل ۱. میزان بیان miR-499 در قلب موش‌های صحرایی در گروه‌های مختلف ($\alpha < 0.05$). #: نسبت به گروه Control. #: نسبت به گروه DOX.

بحث

در این تحقیق دریافتیم که دوکسوروبیسین به افزایش بیان miR-499 در سلول‌های قلبی رت‌ها پس از ۷۲ ساعت منجر می‌شود. با وجود این، انجام تمرینات تناوبی شدید پیش از تزریق دوکسوروبیسین می‌تواند از افزایش بیان miR-499 ناشی از تزریق دوکسوروبیسین بکاهد. شایان ذکر است که تمرینات تناوبی شدید به‌تنهایی بیان miR-499 را در بطن چپ حیوانات افزایش داد، ولی این تغییرات از نظر آماری معنادار نبود.

در شرایط پاتولوژیکی، کاهش یا افزایش یک ریزآران‌ای مشخص می‌تواند بیماری‌زا باشد، که می‌توان با بازگرداندن سطح بیان طبیعی ریزآران‌ای این وضعیت را تصحیح کرد. miR-499 تنظیم‌کننده اصلی تکثیر، بقا و تمایز پیش‌سازهای قلب است. به همین دلیل، miR-499 هدف درمانی جذابی را در بیماری‌های قلبی-عروقی ارائه می‌کند. تحقیقات مختلفی به بررسی نقش miR-499 در بیماران قلبی پرداخته است. برای مثال استولو و همکاران (۲۰۱۸) به مطالعه نقش تشخیصی miR-499 پلازما، به‌دلیل نقش مهمش در بهبودی سلول‌های قلبی، در بیماران انفارکتوس قلبی حاد AMI در سن ۳۰-۶۰ سال پرداخته‌اند (۲۳). مطالعه آنها سطح شایان توجهی از miR-499 در سرم بیماران AMI در مقایسه با افراد سالم را نشان داد. آنها نشان دادند که miR-499 در مقایسه با دیگر نشانگرهای رایج

¹ . Acute myocardial infarction

حساسیت بیشتری دارد و می‌تواند به‌عنوان نشانگر تشخیص زودرس AMI بهتر عمل کند. سطح miR-499 با CK-MB ارتباط مثبتی داشت. به‌طور مشابهی، دالساندرا و همکاران (۲۰۱۰) به بررسی ارتباط بین سطوح miR-499-5b پلاسمای انسانی و موش به‌عنوان نشانگرهای زیستی AMI پرداختند (۲۴). آنها نشان دادند که AMI به افزایش سطوح پلاسمایی miR-499-5p در انسان و حیوان منجر می‌شود. به‌طوری‌که miR-499-5b می‌تواند نشانگر زیستی جدیدی از آسیب قلبی باشد. یائو و همکاران (۲۰۱۴) نیز به بررسی توانایی miR-499 پلازما برای پیش‌بینی اولیه انفارکتوس میوکارد در بیماران با عمل جراحی پیوند عروق کرونر (CABG) پرداختند (۲۵). تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که miR-499 دارای حساسیت و ویژگی بالاتری نسبت به cTnI^۲ است. همچنین نتایج آنها نشان می‌دهد که miR-499 پلازما نشانگر زیستی سریع جدیدی برای شناسایی انفارکتوس میوکارد طی عمل جراحی قلب است (۲۵). شایان ذکر است که کارستان و همکاران (۲۰۱۰) نیز به نتایج مشابهی دست یافتند (۲۶). آنها ارتباط سطوح پلاسمایی ریزاران‌ای‌های انتخابی مرتبط با قلب (miR-499، miR-208b) با آسیب میوکاردی را بررسی کردند (۲۷). miR-499 و miR-208b در پلاسمای بیماران AMI در مقایسه با گروه کنترل به‌طور چشمگیری افزایش یافت (به ترتیب ۱۶۰۰ و ۱۰۰ برابر). هر دو مایومیر با cTnT پلازما همبستگی داشتند که نشان‌دهنده انتشار miR-208b و miR-499 از سلول‌های قلبی آسیب‌دیده به گردش خون است. با توجه به این تحقیقات، بیان miR-499 در پلازما به‌واسطه افزایش بیان آن در بافت قلب متعاقب آسیب قلبی افزایش یافته است که با نتایج تحقیق ما مبنی بر افزایش بیان miR-499 در بافت بطن چپ قلب متعاقب سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین همخوانی دارد. موافق با نتایج قلبی، بیان شده است که متعاقب بیماری عضله قلبی، میزان بیان miR-499 در سلول‌های قلبی انسان و موش افزایش می‌یابد (۱۲).

هولمگرن و همکاران (۲۰۱۶) تأثیرات اولیه و تأخیری دوکسوروبیسین را بر بیان ریزاران‌ای‌های مختلف در سلول‌های قلبی مشتق از سلول‌های قلبی بنیادی پلورپوتنت^۳ انسانی بررسی کردند (۷). آنها گزارش کردند که بیان miR-34، miR-187، miR-199، miR-214 و miR-424 پس از درمان با دوکسوروبیسین افزایش می‌یابد.

طبق نتایج تحقیق هولمگرن و همکاران (۲۰۱۶)، این ریزاران‌ای‌ها نشانگرهای بالقوه مناسبی در تشخیص زودهنگام سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین هستند (۷). نتایج تحقیق حاضر نیز بیانگر افزایش میزان بیان miR-499 در سلول‌های قلبی رت‌هاست. بنابراین miR-499 نیز می‌تواند نشانگر بالقوه در تشخیص زودهنگام سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین باشد. لگر و همکاران (۲۰۱۷) نیز به بررسی ریزاران‌ای‌ها به‌عنوان نشانگرهای بالقوه سمیت قلبی ناشی از القای دوکسوروبیسین در کودکان و نوجوانان سرطانی پرداختند (۱۵). به‌طور مشابه با نتایج تحقیق حاضر، نتایج آنها نشان داد که میزان بیان miR-499 و miR-29b پلازما به‌طور قابل توجهی پس از مصرف دوکسوروبیسین افزایش می‌یابد، که پاسخ این مایومیرها با مقدار دوکسوروبیسین و cTnT ارتباط مثبتی دارد. میزان cTnT در گروه درمان‌شده با دوکسوروبیسین بالاتر از افراد درمان‌نشده با دوکسوروبیسین بود.

اوکاموتا و همکاران (۲۰۱۶) بیان کردند که miR-499 موجب مهار مسیر کلسینرون و مسیر سیگنالی Wnt و متعاقب آن فعال شدن مسیر آنژیوژنز می‌شود، بنابراین آنها به بررسی تأثیر ترکیب درمانی دوکسوروبیسین با miR-499 در درمان سرطان پرداختند (۱۹). آنها دریافتند که ترکیب درمانی دوکسوروبیسین با miR-499 موجب افزایش سرکوب تومور و تجمع بیشتر دوکسوروبیسین در بافت تومور از طریق مهار آنژیوژنز می‌شود، که نتایج آنها در تناقض با نتایج تحقیقات قلبی مبنی بر افزایش پاتولوژیک بیان miR-499 در نتیجه درمان با دوکسوروبیسین است (۱۹).

شواهد فزاینده‌ای وجود دارد که تمرینات ورزشی استقامتی رایج پیش از درمان با دوکسوروبیسین موجب محافظت قلب در برابر سمیت قلبی از طریق افزایش فعالیت مسیر سیگنالی AMPK^۴، افزایش همجوشی میتوکندری، کاهش شکافت میتوکندری (۲۸)، کاهش میزان

1. Coronary artery bypass graft (CABG)

2. Cardiac troponin I (cTnI)

3. Pluripotent stem cells

4. AMP-activated protein kinase (AMPK)

ROS، افزایش محتوای آنتی‌اکسیدانتی (۲۹) می‌شود. تمرینات تناوبی شدید نیز می‌تواند موجب افزایش عملکرد قلبی در بیماران قلبی شود (۳۱،۳۰) و حتی نسبت به تمرینات رایج استقامتی می‌تواند موجب توسعه بیشتر عملکرد قلبی شود (۱۷).

گزارش شده است که تمرینات تناوبی شدید می‌تواند از قلب در برابر آسیب ایسکمی ریپرفیوژن (IR) به‌واسطه کاهش فعالیت پلاسمایی LDH و CK-MB^۲ و نیز اندازه انفارکتوس قلبی محافظت کند (۳۰). شایان توجه است که تمرینات تناوبی شدید سبب سازگاری‌های قلبی-عروقی مشابه یا حتی برتر در مقایسه با انواع دیگر فعالیت ورزشی مانند قدرتی و استقامتی هم در افراد سالم و هم بیماران قلبی عروقی می‌شود (۳۲،۲۶،۳۴-۱۷)، با وجود این، نقش محافظتی تمرینات تناوبی شدید پیش از درمان با دوکسوروبیسین کمتر بررسی شده است. براساس اطلاعات ما، تنها یک مطالعه توسط جارت و همکاران (۲۰۱۶) در این زمینه انجام گرفته است که نشان می‌دهد تمرینات تناوبی شدید قبل و در طی تزریق دوکسوروبیسین به رت‌ها سطوح آنتی‌اکسیدانتی را حفظ کرده و از طریق افزایش مقادیر^۳ SOD1 و SOD2 و کاتالاز (CAT)^۴ در سلول‌های قلبی از عوارض جانبی دوکسوروبیسین می‌کاهد (۱۸). نتایج تحقیق حاضر نیز بیانگر نقش محافظتی قلبی تمرینات تناوبی شدید در برابر سمیت قلبی ناشی از دوکسوروبیسین از طریق کاهش تغییرات miR-499 است.

اخیراً در تحقیق فتحی و همکاران (۲۰۱۶) بیان شد که چهارده هفته تمرینات ورزشی استقامتی می‌تواند بیان miR-499 را در بطن چپ نمونه‌های سالم افزایش دهد که با هایپرتروفی فیزیولوژیک قلبی مرتبط است (۱۶). شایان توجه اینکه در شرایط فیزیولوژیک، miR-499 می‌تواند موجب مهار آپوپتوز و شکافت میتوکندری (۱۰) و فعال شدن آنژیوزنز سلول‌های قلبی شود (۱۹). نتیجه تحقیق حاضر نیز نشان داد که تمرینات تناوبی شدید به‌تنهایی بیان miR-499 را در بطن چپ حیوانات افزایش می‌دهد، ولی این تغییرات از نظر آماری معنادار نبود. متعاقب هایپرتروفی پاتولوژیک قلبی نیز میزان بیان miR-499 افزایش و فعالیت ریزاران‌ای‌های هدف یعنی Akt و CaMKII کاهش می‌یابد (۱۲). بنابراین احتمالاً در شرایط پاتولوژیک افزایش بیان miR-499 نمی‌تواند به نفع عضله قلبی باشد. با توجه به نتایج این تحقیق و تحقیقات قبلی می‌توان گفت اگرچه فعالیت ورزشی در شرایط فیزیولوژیک می‌تواند بیان mir-499 را افزایش دهد، در شرایط پاتولوژیک می‌تواند از افزایش بیان miR-499 ناشی از ایجاد سمیت قلبی توسط القای دوکسوروبیسین جلوگیری کند.

جیانگ و همکاران (۲۰۱۴) نیز بیان کردند که تمرینات تناوبی شدید پس از ایجاد AMI می‌تواند به‌واسطه مهار شکافت (DRP1)، افزایش همجوشی میتوکندری (mfn2 و OPA1)، غیرفعال کردن مسیر سیگنالی ERK1/2-JNK-P53 و افزایش بیان PGC-1 α عملکرد قلبی را بهبود بخشد (۳۱). آنها بیان کردند که تمرینات تناوبی شدید پس از AMI می‌تواند از طریق افزایش میزان محتوای آنتی‌اکسیدانتی، بیوزنز میتوکندری، Nrf2^۵، فسفوریلاسیون AMPK، فعال کردن SIRT3^۶ و مسیر سیگنالی PI3-K/Akt^۷ از اختلال عملکرد قلبی جلوگیری کند (۳۱). از سوی دیگر، بیان شده است که متعاقب درمان با دوکسوروبیسین میزان ROS افزایش و میزان آنتی‌اکسیدانت‌ها و تولید ATP کاهش می‌یابد (۳۵،۳۶). جالب توجه اینکه فشار اکسیداتیو سبب افزایش بیان miR-499 در سلول‌های قلبی (به‌عنوان بخشی از واکنش ناشی از استرس) می‌شود (۱۳). همچنین نشان داده شده است که miR-499 تنظیم‌کننده منفی AMPK و PGC-1 α است (۹)، بنابراین احتمالاً مسیر سیگنالی AMPK و پروتئین‌های مسئول پویایی و بیوزنز میتوکندری از مکانیسم‌های مولکولی تمرینات تناوبی شدید در کاهش میزان بیان miR-499 پس از تزریق دوکسوروبیسین در تحقیق حاضر می‌تواند باشد که نیازمند بررسی بیشتر است.

1. Ischemia reperfusion (IR)

2. Plasma lactate dehydrogenase (LDH), Creatine kinase (CK)

3. Superoxide dismutase

4. Catalase (CAT)

5. Nuclear factor-erythroid 2-related factor (Nrf2)

6. Anti-oxidative gene sirtuin 3 (SIRT3)

7. Phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-K)-protein kinase B (Akt) signaling

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد میزان بیان miR-499 در سلول‌های قلبی متعاقب درمان با دوکسوروبیسین افزایش می‌یابد. پس، miR-499 می‌تواند نشانگر بالینی مناسبی در تشخیص زودهنگام آسیب قلبی ناشی از دوکسوروبیسین باشد. با وجود این، تمرینات تناوبی شدید پیش از تزریق دوکسوروبیسین می‌تواند از افزایش پاتولوژیک بیان miR-499 در قلب جلوگیری کند و بدین‌وسیله از سمیت قلبی بکاهد. بنابراین تمرینات تناوبی شدید می‌تواند راهبرد پیشگیرانه مناسبی در محافظت قلب در برابر سمیت قلبی ناشی از القای دوکسوروبیسین باشد.

تقدیر و تشکر

این تحقیق حاصل بخشی از رساله دکتری در پردیس بین‌المللی ارس دانشگاه تهران است. نویسندگان به پاس زحمات و لطف همکاران محترم دانشگاه علوم پزشکی تبریز جهت کمک در انجام سنجش‌های این پژوهش نهایت تشکر و قدردانی را ابراز می‌دارند.

References

1. Dolinsky VW, Rogan KJ, Sung MM, Zordoky BN, Haykowsky MJ, Young ME, et al. Both aerobic exercise and resveratrol supplementation attenuate doxorubicin-induced cardiac injury in mice. *Am J Physiol Metab* [Internet]. 2013 Jul 15;305(2):E243–53. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpendo.00044.2013>
2. Bartlett JJ, Trivedi PC, Yeung P, Kienesberger PC, Pulinilkunnil T. Doxorubicin impairs cardiomyocyte viability by suppressing transcription factor EB expression and disrupting autophagy. *Biochem J* [Internet]. 2016 Nov 1;473(21):3769–89. Available from: <https://portlandpress.com/biochemj/article/473/21/3769/49664/Doxorubicin-impairs-cardiomyocyte-viability-by>
3. Chen JJ, Wu P-T, Middlekauff HR, Nguyen K-L. Aerobic exercise in anthracycline-induced cardiotoxicity: a systematic review of current evidence and future directions. *Am J Physiol Circ Physiol* [Internet]. 2017 Feb 1;312(2):H213–22. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpheart.00646.2016>
4. Koleini N, Kardami E. Autophagy and mitophagy in the context of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Jul 11;8(28):46663–80. Available from: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.16944>
5. MacFarlane L-A, R. Murphy P. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr Genomics* [Internet]. 2010 Nov 1;11(7):537–61. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-2029&volume=11&issue=7&spage=537>
6. Condorelli G, Latronico MVG, Cavarretta E. microRNAs in cardiovascular diseases: current knowledge and the road ahead. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2014 Jun;63(21):2177–87. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0735109714011085>
7. Holmgren G, Synnergren J, Andersson CX, Lindahl A, Sartipy P. MicroRNAs as potential biomarkers for doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Toxicol Vitro* [Internet]. 2016 Aug;34:26–34. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233316300479>
8. Schroen B, Heymans S. MicroRNAs and beyond: The heart reveals its treasures. *Hypertension* [Internet]. 2009 Dec;54(6):1189–94. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.133942>
9. Liu J, Liang X, Zhou D, Lai L, Xiao L, Liu L, et al. Coupling of mitochondrial function and skeletal muscle fiber type by a miR-499/Fnrip1/ <sc>AMPK</sc> circuit. *EMBO Mol Med* [Internet].

- 2016 Oct 9;8(10):1212–28. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.15252/emmm.201606372>
10. Wang J-X, Jiao J-Q, Li Q, Long B, Wang K, Liu J-P, et al. miR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1. *Nat Med* [Internet]. 2011 Jan 26;17(1):71–8. Available from: <http://www.nature.com/articles/nm.2282>
11. Olivieri F, Antonicelli R, Spazzafumo L, Santini G, Rippon MR, Galeazzi R, et al. Admission levels of circulating miR-499-5p and risk of death in elderly patients after acute non-ST elevation myocardial infarction. *Int J Cardiol* [Internet]. 2014 Mar;172(2):e276–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167527314000631>
12. Matkovich SJ, Hu Y, Eschenbacher WH, Dorn LE, Dorn GW. Direct and Indirect Involvement of MicroRNA-499 in Clinical and Experimental Cardiomyopathy. *Circ Res* [Internet]. 2012 Aug 17;111(5):521–31. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.112.265736>
13. Wang J, Jia Z, Zhang C, Sun M, Wang W, Chen P, et al. miR-499 protects cardiomyocytes from H₂O₂-induced apoptosis via its effects on Pcd4 and Pacs2. *RNA Biol* [Internet]. 2014 Apr 27;11(4):339–50. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/rna.28300>
14. Leger KJ, Leonard D, Nielson D, de Lemos JA, Mammen PPA, Winick NJ. Circulating microRNAs: Potential Markers of Cardiotoxicity in Children and Young Adults Treated With Anthracycline Chemotherapy. *J Am Heart Assoc* [Internet]. 2017 Apr 5;6(4). Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/JAHA.116.004653>
15. Kavazis AN, Smuder AJ, Powers SK. Effects of short-term endurance exercise training on acute doxorubicin-induced FoxO transcription in cardiac and skeletal muscle. *J Appl Physiol* [Internet]. 2014 Aug 1;117(3):223–30. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/jappphysiol.00210.2014>
16. Fathi Mohammad, Saeid Abroun. The effect of 14 weeks of endurance training on miR-499 expression of left ventricle in wistar male rat. *J Sport Biosci*. 2016;7(28). (In Persian).
17. Villelaebitia-Jaureguizar K, Vicente-Campos D, Senen AB, Jiménez VH, Garrido-Lestache MEB, Chicharro JL. Effects of high-intensity interval versus continuous exercise training on post-exercise heart rate recovery in coronary heart-disease patients. *Int J Cardiol* [Internet]. 2017 Oct;244:17–23. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016752731732346X>
18. Jarrett CL, D’Lugos AC, Mahmood TN, Gonzales RJ, Hale TM, Carroll CC, et al. Effect of High Intensity Exercise Preconditioning and Training on Antioxidant Enzymes in Cardiomyocytes During Doxorubicin Treatment. *FASEB J*. 2016;30(1).
19. Okamoto A, Asai T, Ryu S, Ando H, Maeda N, Dewa T, et al. Enhanced Efficacy of Doxorubicin by microRNA-499-Mediated Improvement of Tumor Blood Flow. *J Clin Med* [Internet]. 2016 Jan 19;5(1):10. Available from: <http://www.mdpi.com/2077-0383/5/1/10>
20. Høydal MA, Wisløff U, Kemi OJ, Ellingsen Ø. Running speed and maximal oxygen uptake in rats and mice: Practical implications for exercise training. *Eur J Prev Cardiol*. 2007;14(6):753–60.
21. Asadi M, Shanebandi D, Mohammadpour H, Hashemzadeh S, Sepehri B. Expression Level of miR-34a in Tumor Tissue from Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *J Gastrointest Cancer* [Internet]. 2019 Jun 15;50(2):304–7. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s12029-018-0060-0>
22. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2001 May 1;29(9):45e – 45. Available from: <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/29.9.e45>
23. Vengatopathy KV, Ramesh R, Rajappa M, Kulkarni S, Hanifa M. Role of serum microRNA-499 as a diagnostic marker in acute myocardial infarction. *Cor Vasa* [Internet]. 2019 Jun 21;61(3):e272–6. Available from: <http://e-corevasa.cz/doi/10.1016/j.crvasa.2018.03.008.html>
24. D’Alessandra Y, Devanna P, Limana F, Straino S, Di Carlo A, Brambilla PG, et al. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur Heart J* [Internet]. 2010 Nov;31(22):2765–73. Available from: <https://academic.oup.com/eurheartj/article->

- [lookup/doi/10.1093/eurheartj/ehq167](https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehq167)
25. Yang Y, Zhang H, Li X, Yang T, Jiang Q. Effects of PPAR α /PGC-1 α on the myocardial energy metabolism during heart failure in the doxorubicin induced dilated cardiomyopathy in mice. *Int J Clin Exp Med*. 2014;7(9):2435–42.
 26. Helgerud J, Høydal K, Wang E, Karlsen T, Berg P, Bjerkass M, et al. Aerobic High-Intensity Intervals Improve V \dot{O}_2 max More Than Moderate Training. *Med Sci Sport Exerc* [Internet]. 2007 Apr;39(4):665–71. Available from: <https://journals.lww.com/00005768-200704000-00012>
 27. Corsten MF, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, et al. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010;3(6):499–506.
 28. Marques-Aleixo I, Santos-Alves E, Torrella JR, Oliveira PJ, Magalhães J, Ascensão A. Exercise and Doxorubicin Treatment Modulate Cardiac Mitochondrial Quality Control Signaling. *Cardiovasc Toxicol* [Internet]. 2018 Feb 23;18(1):43–55. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s12012-017-9412-4>
 29. Ascensão A, Magalhães J, Soares JMC, Ferreira R, Neuparth MJ, Marques F, et al. Moderate endurance training prevents doxorubicin-induced in vivo mitochondriopathy and reduces the development of cardiac apoptosis. *Am J Physiol Circ Physiol* [Internet]. 2005 Aug;289(2):H722–31. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpheart.01249.2004>
 30. Rahimi M, Shekarforoush S, Asgari AR, Khoshbaten A, Rajabi H, Bazgir B, et al. The effect of high intensity interval training on cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in wistar rats. *EXCLI J*. 2015;14:237–46.
 31. Jiang H-K, Wang Y-H, Sun L, He X, Zhao M, Feng Z-H, et al. Aerobic Interval Training Attenuates Mitochondrial Dysfunction in Rats Post-Myocardial Infarction: Roles of Mitochondrial Network Dynamics. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2014 Mar 26;15(4):5304–22. Available from: <http://www.mdpi.com/1422-0067/15/4/5304>
 32. Wisløff U, Støylen A, Loennechen JP, Bruvold M, Rognum Ø, Haram PM, et al. Superior Cardiovascular Effect of Aerobic Interval Training Versus Moderate Continuous Training in Heart Failure Patients. *Circulation* [Internet]. 2007 Jun 19;115(24):3086–94. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.675041>
 33. Fu T, Wang C-H, Lin P-S, Hsu C-C, Cherng W-J, Huang S-C, et al. Aerobic interval training improves oxygen uptake efficiency by enhancing cerebral and muscular hemodynamics in patients with heart failure. *Int J Cardiol* [Internet]. 2013 Jul;167(1):41–50. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167527311021437>
 34. Tjønnå AE, Lee SJ, Rognum Ø, Stølen TO, Bye A, Haram PM, et al. Aerobic Interval Training Versus Continuous Moderate Exercise as a Treatment for the Metabolic Syndrome. *Circulation* [Internet]. 2008 Jul 22;118(4):346–54. Available from: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.772822>
 35. Carvalho FS, Burgeiro A, Garcia R, Moreno AJ, Carvalho RA, Oliveira PJ. Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: From Bioenergetic Failure and Cell Death to Cardiomyopathy. *Med Res Rev* [Internet]. 2014 Jan;34(1):106–35. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/med.21280>
 36. Singal PK, Li T, Kumar D, Danelisen I, Iliskovic N. Adriamycin-induced heart failure: Mechanism and modulation. *Mol Cell Biochem*. 2000;207(1–2):77–86.