

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO

MicroRNA COMO BIOMARCADOR NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

RAPHAEL COSTA MARINHO

São Luís
2017

RAPHAEL COSTA MARINHO

MicroRNA COMO BIOMARCADOR NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Jose Albuquerque de Figueiredo Neto

São Luís
2017

Costa Marinho, Raphael.

MicroRNA COMO BIOMARCADOR NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA /
Raphael Costa Marinho. - 2017.

45 f.

Orientador(a): Jose Albuquerque de Figueiredo Neto.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
Sao Luis, 2017.

1. Biomarcadores. 2. Insuficiência Cardíaca. 3.
MicroRNA. I. Albuquerque de Figueiredo Neto, Jose. II.
Título.

MicroRNA COMO BIOMARCADOR NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Dr. Jose Albuquerque de Figueiredo Neto

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

1º Examinador(a)

2º Examinador(a)

3º Examinador(a)

Prof. Dr. José Albuquerque Figueiredo Neto

RESUMO

Introdução: A Insuficiência Cardíaca (IC) é caracterizada como a incapacidade de manter as necessidades metabólicas dos tecidos, quando o coração não consegue manter o débito cardíaco adequado. No sistema cardiovascular são expressos aproximadamente 150 a 200 microRNAs, regulados em resposta ao estresse cardíaco e parte dele podem ser encontrados na corrente sanguínea sendo denominados como miRNAs circulantes.

Objetivo: Avaliar os perfis de miRNAs circulantes em pacientes com insuficiência cardíaca crônica com fração de ejeção reduzida. **Metodologia:** Estudo transversal com 10 pacientes: 05 portadores de IC com FE < 50% e 05 do grupo controle. Foram coletados 10 ml de sangue para análise dos miRNAs, centrifugado à 4°C por 10 min e depois armazenado a -80°C até o momento do isolamento. Para purificação do RNA total foi utilizado o Kit MiRNeasy Serum / Plasma (Qiagen, Hilden, Alemanha), contendo o reagente QIAzol para extração do RNA total e MiRNeasy Serum / Plasma Spike-In Control para normalização da purificação de microRNA do soro. A expressão dos microRNAs foi determinado pela técnica de microarranjo utilizando a matriz GeneChip™ miRNA 4.0 Affymetrix® e a análise e quantificação foram realizadas pelo Software Affymetrix® GeneChip® Command Console® (Affymetrix miARN 4.0).

Resultados: A média de fração de ejeção nos paciente com IC foi de 39,6%. Na análise dos miRNAs obteve-se expressão aumentada para o mir-1207-5P (P=0,005), mir-6887 (p= 0,007), mir-548a-3p (p=0,03), mir-4530 (p= 0,02), e expressão reduzida para o mir-3157-3p (p= 0,02) e mir-1234-3p (0,04). **Conclusão:** Neste estudo, foram identificados possíveis novos miRNAs circulantes em pacientes portadores de insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida, a serem confirmados em novos estudos.

Palavras-chave: Insuficiência Cardíaca. MicroRNA. Biomarcadores.

ABSTRACT

Introduction: Heart Failure (HF) is characterized as the inability to maintain the metabolic needs of tissues when the heart fails to maintain adequate cardiac output. In the cardiovascular system approximately 150 to 200 microRNAs are expressed, regulated in response to cardiac stress and part of it can be found in the bloodstream being termed as circulating miRNAs. **Objective:** To evaluate the profiles of circulating miRNAs in patients with chronic heart failure with reduced ejection fraction. **Methods:** Cross-sectional study with 10 patients: 05 patients with HF with EF <50% and 05 of the control group. 10 ml of blood was collected for miRNAs analysis, centrifuged at 4 ° C for 10 min and then stored at -80 ° C until isolation. The MiRNeasy Serum / Plasma Kit (Qiagen, Hilden, Germany) containing the QIAzol reagent for the extraction of total RNA and MiRNeasy Serum / Plasma Spike-In Control for standardization of serum microRNA purification was used to purify the total RNA. Expression of the microRNAs was determined by the microarray technique using the GeneChip™ miRNA 4.0 Affymetrix® template and the analysis and quantification were performed by Affymetrix® GeneChip® Command Console® (Affymetrix miRNA 4.0). **Results:** A mean ejection fraction in patients with HF was 39.6%. The expression of miRNAs was increased for mir-1207-5P (P = 0.005), mir-6887 (p = 0.007), mir-548a-3p (p = 0.03), mir-4530 P = 0.02), and reduced expression for mir-3157-3p (p = 0.02) and mir-1234-3p (0.04). **Conclusion:** In this study, new circulating miRNAs were identified in patients with heart failure with reduced ejection fraction, to be confirmed in new studies.

Key words: Heart Failure. MicroRNA. Biomarkers..

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEPEC	Centro de Pesquisas Clínicas
FA	Fibrilação Atrial
FEVE	Fração de ejeção do ventrículo esquerdo
HCPA	Hospital das Clínicas de Porto Alegre
HUUFMA	Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão
IC	Insuficiência Cardíaca
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	REVISÃO DA LITERATURA	8
2.1	Insuficiência Cardíaca.....	8
2.2	MicroRNAs	10
3	OBJETIVO	13
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1	Tipo de Estudo	13
3.2	Definição da amostra	13
3.3	Coleta de informações	14
3.3.1	Coleta de sangue, separação e armazenamento do soro das amostras	14
3.4	Extração e análise dos microRNAs	15
3.4.1	Protocolo de purificação e extração de microRNAs	15
3.4.2	Microarranjo	16
3.5	Aspectos Éticos	17
3.6	Análise estatística	17
4	RESULTADOS	18
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
	REFERÊNCIAS	36
	ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	41
	ANEXO B – Comprovante de submissão do artigo	44
	APENDICE A - Formulário de coleta de dados	45

1 INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca (IC) é uma doença cardiovascular comum, alto custo e potencialmente mortal em todo o mundo. Apesar dos grandes avanços no manejo e tratamento da IC, as taxas de hospitalização inicial e recorrente ainda são muito elevadas (FALK, et al, 2012). O diagnóstico da IC é baseado na história clínica e exame físico, entretanto as provas adicionais que apoiam o julgamento clínico melhoraram a precisão diagnóstica e facilitam o prognóstico e manejo do paciente (VAN KIMMENADE & JANUZZI JR., 2012).

O diagnóstico de IC com base unicamente na clínica é frequentemente difícil de interpretar em pacientes pluripatológicos (MANZANO et al, 2012). Escalas e critérios de classificação, como de Framingham são configurados exclusivamente para pacientes relativamente jovens sem comorbidades. Portanto, diagnóstico deve, além de clínico, ser estabelecido por biomarcadores e exame de imagem, como a ecocardiografia (ORTEGA et al, 2014).

Neste contexto, existe uma gama de biomarcadores circulantes que refletem diferentes aspectos da fisiopatologia, facilita o diagnóstico, a estratificação de risco e manejo da IC (VAN KIMMENADE & JANUZZI JR., 2012; RICHARDS, 2010). Os biomarcadores-chave recomendados pelas diretrizes internacionais de cardiologia na IC são os peptídeos natriuréticos tipo B (BNP e NT-proBNP) na prática clínica (FALK, et al, 2012; RICHARDS, 2010).

Evidências da literatura apontam BNP como um preditor poderoso de mortalidade e eventos cardíacos maiores em pacientes com doença arterial coronariana, síndrome coronariana aguda e insuficiência cardíaca (ORTEGA et al, 2014; DE LEMOS et al, 2001; Bettencourt et al, 2004) . Atualmente o BNP é o mais útil e estudado no diagnóstico e no manejo de quadros de descompensação cardíaca (WEBER, 2007; DANIEL & MAISEL, 1998)

Por outro lado, há uma forte demanda de utilização de biomarcadores de prognóstico e diagnóstico para o manejo clínico de IC. Vários estudos recentes têm sugerido que os microRNAs (ou miRNAs) circulantes também como biomarcadores de diagnóstico para IC, dentre os quais: miR-423-5p, miR-18b, miR-129-5p, miR-1254, miR-675 e miR-622, destacou-se miR-423-5p como um biomarcador específico de diagnóstico clínico para IC (TIJSEN et al, 2010). Muitos outros miRNAs circulantes

(como miR-499, miR-320a, miR-22 e mi-R126) foram relatados para estar estreitamente relacionado com IC (LIEBETRAU et al, 2013; GOREN et al, 2012; . FUKUSHIMA et al, 2011). Os níveis plasmáticos de miRNAs circulantes são sensíveis para intervenções terapêuticas e mudam durante a progressão da IC (DICKINSON et al, 2013).

Os peptídeos natriuréticos tipo B (BNP e NT-proBNP) contribuem no diagnóstico de IC e também mostram desvantagens em relação ao que seria um biomarcador ideal. Embora individualmente seja útil na predição de IC, a combinação de níveis de miRNA com peptídeos natriuréticos tipo B pode ter valor diagnóstico (ELLIS et al, 2013).

Assim, a presente estudo se propõe a identificar microRNAs circulantes em pacientes com insuficiência cardíaca crônica com fração de ejeção reduzida

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Insuficiência Cardíaca

A Insuficiência Cardíaca (IC) é caracterizada como a incapacidade do coração em manter as necessidades metabólicas dos tecidos, isto é, quando o coração não consegue manter o débito cardíaco adequado, ou só consegue fazê-lo à custa do aumento das pressões de enchimento do ventrículo esquerdo (BOCCHI et al., 2009; RATHI e DEEDWANIA, 2012; NOGUEIRA, 2010; YANCY et al., 2013). No Brasil, a principal etiologia da IC é a cardiopatia isquêmica crônica associada à hipertensão arterial. Em determinadas regiões geográficas do país e em áreas de baixas condições sócio-econômicas, ainda existem formas de IC associadas à doença de Chagas, endomiocardiofibrose e a cardiopatia valvular reumática crônica, que são situações especiais de IC em nosso meio. (BOCCHI et al., 2009; BOCCHI et al, 2012)

As alterações hemodinâmicas comumente encontradas na IC envolvem resposta inadequada do débito cardíaco e elevação das pressões pulmonar e venosa sistêmica e o mecanismo responsável pelos sintomas e sinais clínicos pode ser decorrente da disfunção sistólica, diastólica ou de ambas, acometendo um ou ambos os ventrículos. Geralmente o paciente pode apresentar como sintomas dispnéia, ortopnéia,

síncope, dor torácica e serem observados alterações de pulso e pressão arterial, edema, ascite, crepitações, derrame pleural, presença de 3º e/ou 4º bulha, dentre outros (BOCCHI et al., 2009; BOCCHI et al, 2012).

A IC é a via final comum da maioria das cardiopatias e representa um importante problema de saúde pública, considerando-se a prevalência crescente e os índices de hospitalização associados à alta morbimortalidade (BRAUNWALD, 2008; BROWN e GOTTLIEB, 2012). O custo socioeconômico desta síndrome é elevado, envolvendo dispêndio de medicamentos, internações repetidas, perda de produtividade, aposentadorias precoces, eventuais cirurgias e ocasionalmente, transplante cardíaco (BOCCHI et al., 2009). Entre os anos de 2008 e 2011 o custo médio das internações por IC foi de R\$12.652,7 por pessoa com média de 29,5 dias de internação. (DATASUS, 2017).

De acordo com os dados da III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica de 2009, durante o ano de 2007 a IC representou a terceira causa mais frequente de internações hospitalares no Sistema Único de Saúde (SUS), sendo mais prevalente na faixa etária acima de 60 anos. Estima-se que em 2025 o Brasil possua a sexta maior população de idosos do mundo, aproximadamente 30.000.000 pessoas, ou 15% da população total, e que a insuficiência cardíaca será a primeira causa de morte por doença cardiovascular no mundo (LESSA, 2001).

A IC crônica tem sido classicamente categorizada com base na intensidade de sintomas em 4 classes propostas pela New York Heart Association. Estas classes estratificam o grau de limitação imposto pela doença para atividades cotidianas do indivíduo; vale dizer, portanto, que esta classificação é também uma maneira de avaliar a qualidade de vida do paciente frente a sua doença. As quatro classes propostas são: Classe I - ausência de sintomas (dispnéia) durante atividades cotidianas; Classe II – sintomas desencadeados por atividades cotidianas; Classe III - sintomas desencadeados em atividades menos intensas que as cotidianas ou pequenos esforços; Classe IV - sintomas em repouso (BOCCHI et al., 2009).

A avaliação inicial do paciente com IC tem como objetivos: confirmar o diagnóstico, identificar a etiologia e possíveis fatores precipitantes, definir modelo fisiopatológico (disfunção sistólica versus função sistólica preservada), definir modelo

hemodinâmico, estimar prognóstico e identificar pacientes que possam se beneficiar de intervenções terapêuticas específicas. (como dispositivos e procedimentos cirúrgicos) (OLIVEIRA-CARVALHO et al, 2012).

A utilização de marcadores como BNP (Peptídeo Natriurético do tipo B) e NT-proBNP (Fração N-Terminal do pró hormônio BNP) é recomendado com nível de evidência A tanto na dúvida diagnóstica quanto na estratificação prognóstica e complemento do exame físico para guiar tratamento em pacientes com IC. Estes peptídeos são produzidos mediante ativação do gene do BNP nos miócitos por estímulos de dilatação cardíaca, isquemia miocárdica ou por meio da ativação simpática e do sistema renina-angiotensina-aldosterona somados a estímulos de sobrecarga de pressão ou volume, resultado na produção do precursor do BNP, chamado de proBNP e também na liberação do fragmento NT-proBNP e do biologicamente ativo BNP (SILVA, 2014; BOCCHI, 2012).

Recomenda-se também o ecodopplercardiogramana como exame de imagem na avaliação inicial de todo paciente com IC (classe de recomendação grau I). Permite detecção de alterações estruturais ou funcionais do coração e avaliação das medidas e a mobilidade das válvulas cardíacas e das paredes das diferentes cavidades do coração, além de características do fluxo sanguíneo. A fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) é considerado normal quando $\geq 50\%$, no entanto há controvérsia sobre qual FEVE deveria ser adotada como ponto de corte entre fração de ejeção preservada e disfunção sistólica (BOCCHI et al., 2009).

2.2 MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs) são um grupo recém-descoberto de pequenos RNAs, não codificantes, com aproximadamente 19-25 nucleotídeos de extensão, que tem se destacado por sua singular habilidade de modular uma enorme e complexa rede regulatória da expressão dos genes. Estes exercem seus efeitos regulatórios através da ligação de seus nucleotídeos aos do RNA mensageiro (RNAm)-alvo em um processo chamado de pareamento. Essa ligação impossibilita que os ribossomos consigam traduzir a informação genética contida no RNAm, acarretando na diminuição da síntese proteica do gene-alvo sem impactar nos níveis correspondentes de RNAm (AMBROS, 2004)

Os miRNAs são resultantes da clivagem de um RNA maior não codificante, chamado de pri-miRNA (primitive-miRNA), que possui uma estrutura secundária em forma de grampo. No núcleo os pri-miRNAs são processados em um precursor (pre-miRNAs) de aproximadamente 65 nucleotídeos, pela proteína Drosha, uma RNase do tipo III, associada a outra proteína-DGCR8. Os pre-miRNAs são exportados para fora do núcleo por associação à exportina-5 e uma vez no citoplasma os pre-miRNAs serão clivados em miRNA maduro de fita dupla pela ribonuclease “Dicer”, posteriormente uma das fitas, que atuará como miRNA funcional, interage com a proteína Argonauta (Ago), para formar o Complexo de Silenciamento induzido por RISC, importante no direcionamento do miRNA até o mRNA-alvo. (LEITE-MOREIRA, 2013; SCHNEIDER, 2014)

Sabe-se que no sistema cardiovascular são expressos aproximadamente 150 a 200 miRNAs, regulados em resposta ao estresse cardíaco agudo, em longo prazo a resposta compensatória do coração a uma lesão crônica ou sobrecarga hemodinâmica. Alguns miRNAs como miR-128, miR-302, miR-367 e miR-499 são potencialmente cardio específicos, porém, mais estudos são necessários para confirmação. Somente o miR-208 é conhecido como sendo cardio específico e desempenha um papel importante na manutenção do desenvolvimento e função cardíaca. Estudos em camundongos sugerem a redução da expressão do miR1 e do miR133 na hipertrofia cardíaca. Na Insuficiência Cardíaca o miR-21 é um dos poucos miRNAs que demonstram um padrão regular de super expressão. No entanto, seu papel exato desenvolvimento da hipertrofia cardíaca permanece controverso (SAYED et al, 2007; MATKOVICH et al, 2010; KLOOSTERMAN et al, 2006; CALLIS et al, 2009; DA COSTA et al, 2010; CARÈ et al, 2007; TIJSEN et al, 2010)

A maioria dos estudos clínicos tem se baseado na mensuração dos níveis de expressão de miRNAs em amostras do tecido de origem. Entretanto, recentemente alguns miRNAs também foram encontrados na corrente sanguínea sendo denominados como miRNAs circulantes ou c-miRNA e os mecanismos envolvidos na liberação destes miRNAs no sangue permanecem não bem compreendidos. Isto os torna potencialmente utilizáveis para testes rápidos, contribuindo para diagnóstico e manejo clínico da IC, já que poderão ser mensurados por via periférica. Um estudo recente demonstrou que o c-miRNA miR-423-5p apresenta uma expressão aumentada durante a

insuficiência cardíaca e pode ser usado como um biomarcador. (TIJSEN et al, 2010; OLIVEIRA et al, 2012)

Um outro estudo de Wei et al (2015) com 103 pacientes foi investigada a expressão mirRNA-126 (miR-126) em pacientes com fibrilação atrial (FA) e / ou insuficiência cardíaca (IC). Dividiu-se em 4 grupos: um primeiro grupo de pacientes com FA; um segundo grupo de pacientes com IC; um terceiro grupo de pacientes com FA e IC; e um quarto grupo controle de pacientes saudáveis em ritmo sinusal. Observou-se que nos 3 grupos de pacientes (IC; FA e IC e FA) o miR 126 foi reprimido e também se teve menor FEVE em comparação com o grupo controle. Na análise de correlação de Pearson mostrou que a expressão relativa miR-126 foi positivamente associado com a FEVE e os autores colocam o miR-126 como um potencial biomarcador para avaliar a gravidade da FA e IC

No entanto, quando se avalia os estudos percebe-se muita variabilidade entre os miRNAs. Um estudo realizado por Wong (2016) avaliou 21 artigos publicados entre os anos de 2008 a 2015 observando que os os micrnas podem diferenciar indivíduos com insuficiência cardíaca (miR-1233, 183-3p, 190a, 193b-3p, 193b-5p, 211-5p, 494 e 671-5p) dos que não tem insuficiência cardíaca e ainda diferenciar os indivíduos com IC de fração de ejeção preservada (miR 1233, 183-3p, 190a, 193b-3p, 193b-5p e 545-5p) dos que tem fração de ejeção diminuída (miR-125a-5p, 183-3p, 193b-3p, 211-5p, 494, 638, e 671-5p). As variações no perfil de microRNAs podem ser explicadas pela variabilidade no fenótipo, gravidade da IC e suas complicações, adequação dos controles e amostras de pequenas dimensões

Assim, a descoberta dos microRNAs circulantes sugeriu a possibilidade de utilização do padrão de expressão destas moléculas como biomarcadores, avaliados de forma não invasiva, para predizer o desenvolvimento, diagnosticar, classificar, avaliar o prognóstico e monitorar o tratamento da IC. (GAGGIN e JANUZZI, 2013; LEITE-MOREIRA et al., 2013; OIKONOMOU et al.; 2013; CARVALHO et al., 2012). Neste contexto, vários estudos tem determinado os níveis de microRNAs circulantes em pacientes com IC e avaliado o seu potencial como biomarcadores desta doença (ADACHI et al., 2010; CORSTEN et al., 2010).

3 OBJETIVO

- Identificar microRNAs circulantes em pacientes com insuficiência cardíaca crônica com fração de ejeção reduzida.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Tipo de Estudo

Trata-se de um estudo transversal

4.2 Definição da Amostra

A seleção dos pacientes seu de forma aleatória. Foram inseridos no estudo 10 pacientes divididos em 2 grupos: O GRUPO I temos 05 pacientes portadores de insuficiência cardíaca classe funcional II a IV da New York Heart Association com fração de ejeção reduzida (<50%) e no GRUPO II os casos-controles com 05 pacientes sem diagnóstico de insuficiência cardíaca. Ambos os grupos tem-se idade acima de 18 anos, de ambos os sexos, em acompanhamento no ambulatório de Cardiologia localizado no Hospital Materno Infantil - UFMA no período de Março a Junho de 2016.

Critérios de inclusão do GRUPO 1

- Pacientes adultos portadores de insuficiência cardíaca classe funcional II a IV em acompanhamento no ambulatório de Insuficiência Cardíaca,

Critérios de inclusão do GRUPO 2

- Pacientes adultos sem diagnósticos de insuficiência cardíaca ou qualquer afecção cardíaca que foram atendidos no Ambulatório de Cardiologia para realização de Risco Cirúrgico.

Critérios de não – inclusão

- Pacientes menores de 18 anos
- Pacientes portadores de insuficiência cardíaca classe funcional I.

- Paciente com IC e F.E. >50 %

4.3 Coleta de Informações do Paciente

Após a concordância do indivíduo em participar da pesquisa e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), realizou-se a coleta de dados, por intermédio de uma Ficha-Protocolo (APÊNDICE A). Sendo realizado o levantamento de dados socioeconômicos e de saúde, dos quais constaram dados de identificação, antecedentes pessoais e familiares, informações quanto aos hábitos sociais e de vida. Em seguida, os pacientes foram submetidos a coleta de sangue, aferição da pressão arterial, coletados dados antropométricos. Todos os pacientes com IC realizaram Ecodopplercardiograma.

4.3.1 Coleta de sangue, separação e armazenamento do soro das amostras

Foram coletadas amostras de 10mL de sangue periférico, à vácuo, em tubos estéreis contendo EDTA (BD Vacutainer® Venous Blood Collection) para as análises moleculares para ambos os grupos.

Os tubos foram mantidos por 20 minutos em temperatura ambiente (18 a 24° C, média de 22° C) nos locais de coleta e processados por 10 min a 1900 x g (3000 rpm) em centrífuga refrigerada a 4 ° C. Normalmente até 4-5 ml de soro foram obtidos a partir de 10 ml de sangue total. O volume foi transferido cuidadosamente do sobrenadante limpo (soro), distribuído em alíquotas nos novos tubos ependorf de 1,5 mL e congelados em freezer a -80° C, para um armazenamento mais longo no Centro de Pesquisa Clínica – CEPEC.

Posteriormente as amostras foram acondicionadas de maneira adequada (caixa térmica para transporte a 4°C) e enviadas ao Laboratório Cardiovascular do Hospital das Clínicas de Porto Alegre – HCPA para extração e análise dos microRNAs.

4.4 Extração e análise de MicroRNAs

4.4.1 Protocolo de purificação e extração de miRNAs (Kit miRNeasy Serum/Plasma)

Para purificação do RNA total foi utilizado o Kit MiRNeasy Serum / Plasma (Qiagen, Hilden, Alemanha), contendo o reagente QIAzol para extração do RNA total e MiRNeasy Serum / Plasma Spike-In Control para normalização da purificação de microRNA do soro.

O protocolo de extração e purificação seguido e validado está descrito abaixo:

1. Para processamento dos tubos congelados, incubamos a 25°C em banho-maria por 25 minutos ou até que estivessem completamente descongelados e os sais dissolvidos.
2. Adicionado 250 µl de Reagente de Lise QIAzol (5 volumes) para 50 µl de soro.
3. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente (25°C) por 5 minutos;
4. Adicionado 3,5 µl de de soro de miRNeasy / Plasma Spike-In Control (1,6 x 10⁸ Cópias / µl de solução de trabalho) e misturados.
5. Adicionado clorofórmio em volume igual ao à amostra inicial, fechado e agitado vigorosamente no Vórtex por 5 segundos;
6. Colocados os tubos novamente em temperatura ambiente (25°C) por 2-3 minutos;
7. Tubos centrifugados a 12000xg a 4°C e divididos em 3 fases: fase aquosa superior contendo RNA, interfase branca e a fase vermelha orgânica;
8. Transferido a fase aquosa superior de cada tubo para outros tubos novos, evitando a transferência do material interfásico. Adicionado 1,5 volumes de álcool a 100% ao volume contido no tubo;
9. Transferido 700 µl da amostra com o precipitado formado e inserido para colunas Rneasy MinElute de 2mL contida em novos tubos coletores, fechados cuidadosamente e centrifugados a 8000xg (10000rpm) por 15 segundos a temperatura de 15 - 25°C. Descartado o fluxo;

10. Reutilizando o tubo da etapa 10, repete-se a etapa 9. Descartado o fluxo e reutilizou-se novamente o tubo coletor;

11. Adicionado novamente 700 µl da amostra as colunas Rneasy MinElute de 2mL e centrifugados a 8000xg (10000rpm) por 15 segundos para lavagem da coluna. Descartado o fluxo e reutilizou-se novamente o tubo coletor;

12. Pipetado 500 µl da amostra as colunas Rneasy MinElute de 2mL e centrifugados a 8000xg (10000rpm) por 15 segundos para lavagem da coluna. Descartado o fluxo e reutilizou-se novamente o tubo coletor;

13. Adicionado 500 µl de etanol a 80% as colunas Rneasy MinElute de 2mL, fechados e centrifugados a 8000xg (10000rpm) por 2 minutos para lavagem da membrana da coluna. O etanol a 80% foi preparado com etanol a 96-100% e água livre de RNase. Descartado o tubo coletor;

14. Após centrifugação, as colunas Rneasy MinElute de 2mL foram colocadas em novos tubos de 2 mL cuidadosamente e descartados na próxima etapa;

15. Novamente as colunas Rneasy MinElute de 2mL foram colocadas em novos tubos de 1,5 mL cuidadosamente, adicionado 14 µl de água livre de RNase no centro das colunas. Os tubos foram fechados, mantidos por 10 minutos em bancada. Foi pipetado a amostra do fundo do tubo coletor, inserido na coluna novamente (repetido novamente) e posteriormente centrifugadas por 1 minuto na velocidade máxima;

16. Pipetar a amostra do fundo do tubo e inserir nas colunas Rneasy MinElute pela 3 vez;

17. Centrifugadas por 1 minuto na velocidade máxima;

18. Pipetar a amostra final (14 µl) e descartar as colunas;

19. Congelamento a -80°C as amostras finais.

4.4.2 Microarranjo

O painel de expressão dos microRNAs foi determinado por meio da técnica de microarranjo de microRNAs utilizando a matriz GeneChip™ miRNA 4.0 Affymetrix® de acordo com o protocolo do fabricante e comparados com mais de 500 microRNAs maduros descritos no banco de dados *miRbase*.

O software Affymetrix® GeneChip® Command Console® (Affymetrix miARN 4.0) foi utilizado para quantificar e analisar a expressão de microRNA entre os grupos casos e controles.

4.5 Aspectos Éticos

Este trabalho foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da UFMA (CEP-HUUFMA), com parecer consubstanciado número **1.427.475** e vinculado a um projeto maior intitulado “PROGRAMA DE ASSISTÊNCIA AO PORTADOR DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA: AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES E EDUCAÇÃO DA COMUNIDADE” que obteve financiamento aprovado pela Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) junto ao Edital N° 017/2014 - AEXT

Todos os pacientes que concordaram em participar do trabalho assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para utilização dos dados obtidos. Conforme Resolução n° 466/12 do Conselho Nacional de Saúde que trata de Pesquisas envolvendo Seres Humanos.

4.6 Análise Estatística

Para assegurar a validade na entrada dos dados, os mesmos foram digitados duas vezes, por pessoas diferentes e comparados. Posteriormente foi realizado a análise descritiva das variáveis, quando qualitativas por frequências e percentagens. E as quantitativas foram apresentadas por meio de média $\pm$ desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil, conforme a normalidade testada com Shapiro Wilk.

Na análise dos miRNAs para normalidade dos dados foram utilizadas transformações logarítmicas (log2) e ANOVA para comparação dos grupos. O nível de significância adotado foi de 5% e os dados foram analisados no programa estatístico Data Analysis and Statistical Software - STATA 14.0.

5 - RESULTADOS

Artigo Original

MicroRNA COMO BIOMARCADOR NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

RESUMO

Introdução: A Insuficiência Cardíaca (IC) é caracterizada como a incapacidade de manter as necessidades metabólicas dos tecidos, quando o coração não consegue manter o débito cardíaco adequado. No sistema cardiovascular são expressos aproximadamente 150 a 200 microRNAs, regulados em resposta ao estresse cardíaco e parte dele podem ser encontrados na corrente sanguínea sendo denominados como miRNAs circulantes.

Objetivo: Avaliar os perfis de miRNAs circulantes em pacientes com insuficiência cardíaca crônica com fração de ejeção reduzida. **Metodologia:** Estudo transversal com 10 pacientes: 05 portadores de IC com FE < 50% e 05 do grupo controle. Foram coletados 10 ml de sangue para análise dos miRNAs, centrifugado à 4°C por 10 min e depois armazenado a -80°C até o momento do isolamento. Para purificação do RNA total foi utilizado o Kit MiRNeasy Serum / Plasma (Qiagen, Hilden, Alemanha), segundo recomendação do fabricante. **Resultados:** A média de fração de ejeção nos paciente com IC foi de 39,6%. Na análise dos miRNAs obteve-se expressão aumentada para o mir1207-5P (P=0,005), mir6887 (p= 0,007), mir548a-3p (p=0,03), mir 4530 (p= 0,02), e expressão reduzida para o mir 3157-3p (p= 0,02) e mir1234-3p (0,04).

Resultados: Obteve-se expressão aumentada para o mir-1207-5P (P=0,005), mir-6887 (p= 0,007), mir-548a-3p (p=0,03), mir-4530 (p= 0,02), e expressão reduzida para o mir-3157-3p (p= 0,02) e mir-1234-3p (0,04). **Conclusão:** Neste estudo, foram identificados possíveis novos miRNAs circulantes em pacientes portadores de insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida, a serem confirmados em novos estudos.

Palavras-chave: Insuficiência Cardíaca. MicroRNA. Biomarcadores.

SUMMARY

Introduction: Heart Failure (HF) is characterized as an inability to maintain the tissues' metabolic needs when the heart fails to maintain adequate cardiac output. In the cardiovascular system approximately 150 to 200 microRNAs, regulated in response to cardiac stress, are expressed and part of it can be found in the bloodstream being termed as circulating miRNAs. **Objective:** To evaluate the profiles of circulating miRNAs in patients with chronic heart failure with reduced ejection fraction. **Methods:** Cross-sectional study with 10 patients: 05 patients with HF with EF <50% and 05 of the control group. 10 ml of miRNAs were collected, centrifuged at 4 ° C for 10 min and then stored at -80 ° C until isolation. For purification of the total RNA for use the MiRNeasy Serum / Plasma Kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's manual. **Results:** A mean ejection fraction in patients with HF was 39.6%. The expression of miRNAs was increased for mir1207-5P (P = 0.005), mir6887 (p = 0.007), mir548a-3p (p = 0.03), mir 4530 (p = 0.02), and reduced expression for mir 3157-3p (p = 0.02) and mir1234-3p (0.04). Results: Increased induction was obtained for mir-1207-5P (P = 0.005), mir-6887 (p = 0.007), mir-548a-3p (p = 0.03), mir-4530 (p = 0.02), and reduced expression for mir-3157-3p (p = 0.02) and mir-1234-3p (0.04). **Conclusion:** In this study, new miRNAs circulating in patients with heart failure with reduced ejection fraction were identified and confirmed in new studies.

Key words: Heart Failure. MicroRNA. Biomarkers.

1 INTRODUÇÃO

A Insuficiência Cardíaca (IC) é caracterizada como a incapacidade de manter as necessidades metabólicas dos tecidos, quando o coração não consegue manter o débito cardíaco adequado, ou consegue fazê-lo à custa do aumento das pressões de enchimento do ventrículo esquerdo¹⁻⁴

MicroRNAs (miRNAs) são um grupo recém-descoberto de pequenos RNAs, não codificantes, com aproximadamente 19-25 nucleotídeos de extensão, que tem se

destacado por sua singular habilidade de modular uma enorme e complexa rede regulatória da expressão dos genes ⁵⁻⁶.

Os miRNAs são resultantes da clivagem de um RNA maior não codificante, chamado de pri-miRNA (primitive-miRNA), que possui uma estrutura secundária em forma de grampo. No núcleo os pri-miRNAs são processados em um precursor (pre-miRNAs) de aproximadamente 65 nucleotídeos, pela proteína Drosha, uma RNase do tipo III, associada a outra proteína-DGCR8. Os pre-miRNAs são exportados para fora do núcleo por associação à exportina-5 e uma vez no citoplasma os pre-miRNAs serão clivados em miRNA maduro de fita dupla pela ribonuclease “Dicer”, posteriormente uma das fitas, que atuará como miRNA funcional, interage com a proteína Argonauto (Ago), para formar o Complexo de Silenciamento induzido por RISC, importante no direcionamento do miRNA até o mRNA-alvo. ⁷⁻⁸

Sabe-se que no sistema cardiovascular são expressos aproximadamente 150 a 200 miRNAs, regulados em resposta ao estresse cardíaco agudo, em longo prazo a resposta compensatória do coração a uma lesão crônica ou sobrecarga hemodinâmica.⁶ A maioria dos estudos clínicos tem se baseado na mensuração dos níveis de expressão de miRNAs em amostras do tecido de origem. Entretanto, recentemente alguns miRNAs também foram encontrados na corrente sanguínea sendo denominados como miRNAs circulantes ou c-miRNA. Isto os torna potencialmente utilizáveis para testes rápidos, contribuindo para diagnóstico e manejo clínico da IC, já que poderão ser mensurados por via periférica. ⁹⁻¹⁰

Assim, a descoberta dos microRNAs circulantes sugeriu a possibilidade de utilização do padrão de expressão destas moléculas como biomarcadores, avaliados de forma não invasiva, para prever o desenvolvimento, diagnosticar, classificar, avaliar o prognóstico e monitorar o tratamento da IC. ¹⁰⁻¹¹

Portanto, o objetivo deste estudo é identificar miRNAs circulantes em pacientes com insuficiência cardíaca crônica com fração de ejeção reduzida.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Definição da Amostra

Estudo transversal realizado com 10 pacientes divididos em 2 grupos: O GRUPO I com 05 pacientes portadores de insuficiência cardíaca classe funcional II a IV da New York Heart Association com fração de ejeção reduzida (<50%) e o GRUPO II com 05 pacientes sem diagnóstico de insuficiência cardíaca. Ambos os grupos com idade acima de 18 anos, de ambos os sexos, em acompanhamento no ambulatório de Cardiologia localizado no Hospital Materno Infantil - UFMA no período de Março a Junho de 2016.

2.2 Coleta de Informações do Paciente

Após a concordância do indivíduo em participar da pesquisa e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), realizou-se a coleta de dados, por intermédio de uma Ficha-Protocolo. Sendo realizado o levantamento de dados socioeconômicos e de saúde, dos quais constaram dados de identificação, antecedentes pessoais e familiares, informações quanto aos hábitos sociais e de vida. Em seguida, os pacientes foram submetidos a coleta de sangue, aferição da pressão arterial, coletados dados antropométricos. Todos os pacientes com IC realizaram Ecodopplercardiograma.

2.3.1 Coleta de sangue, separação e armazenamento do soro das amostras

Foram coletadas amostras de 10mL de sangue periférico, à vácuo, em tubos estéreis contendo EDTA (BD Vacutainer® Venous Blood Collection) para as análises moleculares para ambos os grupos.

Os tubos foram mantidos por 20 minutos em temperatura ambiente (18 a 24° C, média de 22° C) nos locais de coleta e processados por 10 min a 1900 x g (3000 rpm) em centrífuga refrigerada a 4 ° C. Normalmente até 4-5 ml de soro foram obtidos a partir de 10 ml de sangue total. O volume foi transferido cuidadosamente do sobrenadante limpo (soro), distribuído em alíquotas nos novos tubos ependorf de 1,5 mL e congelados em freezer a -80° C, para um armazenamento mais longo no Centro de Pesquisa Clínica – CEPEC.

Posteriormente as amostras foram acondicionadas de maneira adequada e enviadas ao Laboratório Cardiovascular do Hospital das Clínicas de Porto Alegre – HCPA para extração e análise dos microRNAs.

2.4 Extração e análise de MicroRNAs

2.4.1 Protocolo de purificação e extração de miRNAs (Kit miRNeasy Serum/Plasma)

Para purificação do RNA total foi utilizado o Kit MiRNeasy Serum / Plasma (Qiagen, Hilden, Alemanha), contendo o reagente QIAzol para extração do RNA total e MiRNeasy Serum / Plasma Spike-In Control para normalização da purificação de microRNA do soro. O protocolo de extração e purificação foi realizado conforme orientação do fabricante.

2.4.2 Microarranjo

O painel de expressão dos microRNAs foi determinado por meio da técnica de microarranjo de microRNAs utilizando a matriz GeneChip™ miRNA 4.0 Affymetrix® de acordo com o protocolo do fabricante e comparados com mais de 500 microRNAs maduros descritos no banco de dados *miRbase*.

O software Affymetrix® GeneChip® Command Console® (Affymetrix miARN 4.0) foi utilizado para quantificar e analisar a expressão de microRNA entre os grupos casos e controles.

2.5 Análise Estatística

Para assegurar a validade na entrada dos dados, os mesmos foram digitados duas vezes, por pessoas diferentes, e comparados. Realizamos a análise descritiva das variáveis, quando qualitativas por frequências e percentagens e as quantitativas são apresentadas por meio de média $\pm$ desvio padrão conforme a normalidade testada com Shapiro Wilk. Na análise dos miRNAs para normalidade dos dados foram utilizadas transformações logarítmicas (log2) e ANOVA para comparação dos grupos. O nível de significância adotado foi de 5%. Os dados foram analisados no programa estatístico Data Analysis and Statistical Software - STATA 14.0.

2.6 Aspectos Éticos

Todos os pacientes que concordaram em participar do trabalho assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para utilização dos dados obtidos. Conforme Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde que trata de Pesquisas envolvendo Seres Humanos. Este trabalho foi aprovado no Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Presidente Dutra (HUPD) em consoante à Declaração de Helsinki com parecer consubstanciado nº 1.427.475 e realizado com fomento da Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão - FAPEMA

3 - RESULTADOS

Os dados sociodemográficos e clínicos estão expressos na tabela 1. Os pacientes apresentavam-se em classe funcional II (03 pacientes), classe funcional III (01 paciente) e classe funcional IV (01 paciente), com uma média de FE de 39,6%.

Pela técnica do microarranjo, avaliou-se os miRNAs comparando os grupos dos indivíduos com IC e indivíduos sem IC. Na análise, foram identificados mais de 6000 miRNAs.

No quadro 1, estão expressos os miRNAs já descritos em pacientes com IC em outros estudos, porém sem significância estatística e os achados desta pesquisa ($P < 0,05$). Os miRNAs com expressão aumentada foram os miR-1207-5P ($P=0,005$), miR-6887 ($p= 0,007$), miR-548a-3p ($p=0,03$), e miR-4530 ($p= 0,02$), e os de expressão reduzida foram o miR-3157-3p ($p= 0,02$) e miR-1234-3p ($0,04$).

No mapa de calor (figura 1), observa-se pela diferença de cores, em vermelho, maior a quantidade de miRNAs circulante e em azul a menor quantidade de miRNAs circulantes. Visualmente os mir1207-5P ($P=0,005$), mir6887 ($p= 0,007$) e o 3157-3p ($p= 0,02$) são os que melhor representam essa diferença. Tal diferença pode ser melhor entendida quando observada na figura 2, mostrando de forma quantitativa e visual a diferença dos miRNAs no grupo com e sem IC.

5- DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou a presença de miRNAs circulantes, ainda que sem significância estatística, já detectados em outros estudos realizados com pacientes com IC, e foram detectados novos miRNAs, não descritos anteriormente em pacientes com IC.

No Brasil temos evidências de estudo realizado no Sul do país ⁸ relacionando outros miRNAs como o miR-21, miR-126 e miR-423-5p. Tal estudo realizado com 63 paciente com IC classe funcional III e IV, a maioria sendo de etiologia isquêmica e hipertensiva com média de idade de 63 anos e fração de ejeção de 26%. Os pacientes foram avaliados em três momentos: na descompensação, após compensação clínica inicial e 3 meses após. O estudo evidenciou 423-5p aumentando na descompensação até a avaliação pós alta e o mir-21 e mir-126 diminuem durante a melhora clínica dos pacientes com insuficiência cardíaca.

O mir-423-5p permite diferenciar também pacientes com IC daqueles sem IC que apresentam quadro de dispneia. Um estudo realizado em Amsterdam com 12 pacientes com IC e 12 controles selecionaram 16 miRNAs para um segundo estudo clínico com 39 controles saudáveis e 50 casos com dispnéia, dos quais 30 foram diagnosticados com IC e 20 foram diagnosticados com dispnéia atribuível a causas não relacionadas à IC, sugerindo fortemente a relação entre o mir-423-5p e IC. ⁹

Um estudo de revisão realizado no Brasil cita o conhecimento de cerca de 150 a 200 mirRNA expressados no sistema cardiovascular regulados pelo stress cardíaco ou/e a longo prazo durante a resposta compensatória do coração a uma lesão crônica ou sobrecarga hemodinâmica, dentre eles o mir-423-5p e o mir-21. O primeiro embora já conhecido como um possível biomarcador para IC, sua função no sistema cardiovascular permanece controverso; o segundo atua na indução de células endoteliais pelo shear stress, modula a apoptose e regula a função das células do músculo liso vascular, no entanto sua ação na hipertrofia cardíaca é controversa. ¹⁰

Outro estudo de revisão mais recente, realizada em Singapura, abordou 21 estudos apresentando uma variedade importante entre os miRNAs estudados, tais quais tamanho de amostras, variando entre 11 e 135 pacientes e material estudado (soro, plasma e biópsia de tecido cardíaco).¹³ Entre os miRNAs descritos nesta revisão foram presentes em nosso trabalho os mir-183-3p, mir-190a, mir-211-5p, mir-494 e o miR-423-5p, miR-21, no entanto sem significância estatística.

Outros miRNAs encontrados em nosso estudo, não são descritos em outros trabalhos como cardioespecíficos e observam-se poucas citações sobre sua relação com a insuficiência cardíaca. É importante ressaltar que alguns miRNAs como o mir-21, possui um padrão regular de super expressão na insuficiência cardíaca e em outras condições como em algumas neoplasias ¹⁴, da mesma maneira, alguns dos miRNAs detectados neste estudo, tiveram expressões em outras situações clínicas, como também no câncer, sugerindo que miRNAs possam ter comportamento comum em resposta ao estresse e ao crescimento patológico de células.

Um estudo americano recente no qual acompanhou 43 pacientes tratado com β -bloqueador e média de fração de ejeção de 24% por 12 meses apontou o mir-1207-5p como up-regulated ($p=0,02$) e que mudanças dinâmicas na expressão de miRNAs pode ser preditivo remodelamento cardíaco reverso ¹⁵. O remodelamento é uma alteração na estrutura cardíaca no qual pode resultar em alterações funcionais do coração e ocorre em resposta a alterações patológicas tais como a hipertensão e a obesidade. O remodelamento reverso é a melhora da função cardíaca associado a um tratamento otimizado ¹⁶. Em nosso estudo ,todos os pacientes com IC eram hipertensos e 60% deles com alteração de peso.

O mir-1207-5p foi observado em outro trabalho ¹⁷, no qual se estudou o perfil dos miRNAs associado aos níveis de lipídios séricos e o metabolismo da glicose e resistência à insulina no risco cardiovascular de jovens finlandeses associados ao risco cardiovascular, neste o mir-1207-5p foi correlacionado com os níveis de hemoglobina glicosilada, e regulados para baixo; em outro estudo sobre risco cardiovascular, no qual as artérias coronárias humana foram tratadas com LDL minimamente oxidado (moxLDL), mostraram que mirRNAs dentre eles o mir-1207-5p tem relação com a diferenciação do fenótipo do musculo liso vascular contrátil, no entanto o estudo não cita claramente como tal mirRNA foi regulado ¹⁸.

O mir-1207-5p foi citado em outros trabalhos,¹⁹ na área de oncologia, no qual apresentou-se de forma suprimida relacionado a modulação da expressão de oxigenasse-1(codificada por HMOX1), um microssoma hepático indutível que desempenha um papel importante na maquinaria citoprotectora, já em outro estudo relacionou-o com acionamento do gatilho genético na gravidade de nefropatias. ²⁰

O mir-548a-3p é outro miRNA pouco estudado e de conhecimento limitado tanto sobre sua expressão, quanto sobre alterações sistêmicas decorrentes. No campo da cardiologia um estudo eslovêno realizado com biópsia de tecido cardíaco 24h pós óbito de 37 pacientes infartados, com idade entre 57-94 anos identificou 77 miRNAs que estavam abaixo do sinal de detecção, dentre eles o mir-548a-3p²¹.

Em nosso estudo o mir-548-3p circulante apresentou expressão aumentada. Fora do campo da cardiologia outro estudo faz referência ao mir-548-3p²². Este avaliou 10 grupos de dados de diferentes tipos de câncer e observou o mir-548-3p presentes em 8 dos 10 grupos evidenciando diferentes características metabólicas e vias reguladoras. Um único miRNA pode regular vários genes alvos distintos, assim também um único gene pode ser regulado por diversos miRNAs. Na insuficiência cardíaca é a primeira vez que o mir-548a-3p ($p=0,03$) é encontrado. É possível que mesmo estando presente em pacientes com neoplasias, possa estar expresso em pacientes com IC.

O mir-4530 não foi descrito em estudos com pacientes com insuficiência cardíaca, tem-se poucos estudos inclusive tratando de outras afecções. Nas afecções cardiológicas foi observado um estudo com amostra de tecido cardíaco de 18 pacientes, retirados durante cirurgia de troca valvar, que avaliou os miRNAs por microarray nos tecidos de átrios direito e esquerdo de pacientes com fibrilação atrial e doença de válvula mitral reumática, 42 miRNAs foram observados no átrio direito, dentre eles o mir-4530²³. Embora os miRNAs tenham sido isolados em tecidos, sabe-se que na lesão cardíaca pode haver extravasamento de miRNA para o meio circulante e sua provável identificação por sangue periférico.¹⁰

Fora do contexto da IC há um estudo no qual um ensaio de microarrays foi realizada para estudar o padrão de expressão de miRNAs em células de rabdomiossarcoma humano infectadas com EV7, um tipo de vírus, no qual observou-se o miR-4530 como up-regulated, atuando como ponto chave nas complicadas interações patógeno-hospedeiro.²⁴ Tem-se evidência do mir-430 também na expressão de células T CD8+ em brucelose crônica e colangiocarcinoma intra-hepático, este último a análise realizada diretamente do tecido peritumoral^{25, 26}

O mir-3157-3p não foi descrito em estudos com pacientes com insuficiência cardíaca. No entanto num estudo chinês, coletou-se amostras de sangue periférico em 10 pacientes coronariopatas antes da realizar angiografia coronariana e demonstrou que alguns miRNAs, dentre eles o mir-3157-3p, há relação com a doença coronariana, e

podem estar envolvidos na via do sinal MAPK, na proliferação e apoptose de células, na proteína do esqueleto da actina e outros processos biológicos podendo ainda afetar a reação imune²⁷, contudo a via MAPK está presente também na hipertrofia miocárdica no paciente com IC como mediador da sinalização hipertrófica das células miocárdicas, induzindo a transcrição de genes associados à hipertrofia²⁸.

Não encontramos estudos relacionando o miR-6887, com pacientes com IC. Num banco de dados pesquisável e integrador que fornece informações abrangentes e de fácil utilização sobre os genes humanos anotados e previstos, descreve suas vias relacionadas ao transporte de canais de íons e a condução cardíaca envolvendo diversos genes envolvidos principalmente o CACNG3, CACNA1S envolvidos na regulação do canais de cálcio; KCNK5, KCNE5 envolvidos na regulação do canais de potássio, inclusive este relacionado com a fibrilação ventricular idiopática; e o ATP2A1, ATP2A2 que regulam a contração e relaxamento muscular, inclusive do musculo cardíaco.^{29,30}

O 1234-3p tem relação com o câncer gástrico, no qual sua expressão é reduzida quando há interferência do gene da p-catenina.³¹ Nesse mesmo estudo o mir-423 -5p também foi observado. O mir-423-5p já tinha sido proposto como um potencial biomarcador em IC.^{9,10} Como um único miRNA é capaz de regular diversos genes-alvo, é possível que diversos miRNAs estejam regulando oncogenes e também genes relacionados a IC.

Acreditamos que talvez o número de indivíduos estudados tenha comprometido a relação de miRNAs já descritos na literatura e sua significância estatística neste estudo ou que a expressão dos miRNAs possa ter relação com a variabilidade genética dos indivíduos de cada região, pois é sabido que as variações no perfil de miRNAs podem ser explicadas pela variabilidade no fenótipo, gravidade da IC e suas complicações, tão quanto a adequação dos controles e amostras de pequenas dimensões.¹⁴

6- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora os miRNAs observados no estudo tenha relação também com outras patogêneses, foi descrito pela primeira vez sugerindo uma associação com IC. Contudo, este estudo é limitado pelo número relativamente pequeno de pacientes. Entretanto, ele

permite propor que os miRNAs circulantes miR-1207-5P , miR-6887, miR-548a-3p, miR-4530, miR-3157-3p e miR-1234-3p podem ser de importância clínica na IC, porém estudos maiores são necessários para confirmar a capacidade de diagnóstico dos miRNAs identificados e esclarecer a influência de variabilidade genética das populações na expressão de miRNAs relacionado a Insuficiência Cardíaca.

REFERÊNCIAS

1. BOCCHI, E.A.; Braga, G.M.; Ferreira, S.M.A, Rohde, L.E.P.; Oliveira, W.A.; Almeida, D.R. **III Diretriz da Sociedade Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica**. Arq Bras Cardiol., v.93, n.3, p.1-65. 2012.
2. Rathi, S., Deedwania, P.C. The epidemiology and pathophysiology of heart failure. Med Clin North Am, v.96, p. 881-890, 2012
3. Nogueira, P.R. et al. Heart failure: epidemiology and management. **Arq Bras Cardiol**. 2010; V. 95, n.3, p. 392-398
4. Yancy, C. W.; Jessup, M.; Bozkurt, B.; Masoudi, F. A.; Butler, J.; McBride, P.E. Accf/Aha Task Force Members. 2013 ACCF/AHA **Guideline for the Management of Heart Failure**: A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart
5. Ambros, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**.,v.431, P.350-355, 2004
6. Fan, X; Weng, X; Zhao, Y; Chen,W; Gan,T and Xu, D. **Circular RNAs in Cardiovascular Disease: An Overview** BioMed Research International, 2017
7. Leite-Moreira, A.M., Lourenço, A.P., Falcão, P.I., Leite-Moreira, A.F. Pivotal role of microRNAs in cardiac physiology and heart failure. **Drug Discov Today**. v.18. n. 23. p.1243-9, dec. 2013
8. Schneider, S.I.R., MicroRNAs circulantes como biomarcadores da insuficiência cardíaca descompensada. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares). Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rio Grande do Sul, 2014

9. Tijssen, A.J.; Creemers, E.E.; Moerland, P.D; De Windt, L.J.; Van Der Wal, A.C.; Kok, W.E. et al. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. **Circ Res.** 2010;106(6):1035-9.
10. Oliveira-Carvalho, V., Carvalho, V.O., Silva, M.M., Guimarães, G.V., Bocchi, E.A. MicroRNAs: a new paradigm in the treatment and diagnosis of heart failure? **Arq Bras Cardiol**, v. 98, p.362-369, 2012.
11. Gaggin, H.K., Januzzi Jr, J.L. Biomarkers and diagnostics in heart failure. **Biochin Biophys Acta** v.1832. p. 2442 – 24450, 2013
12. Oikonomou, E., et al., Diagnostic and therapeutic potentials of microRNAs in heart failure. **Curr Top Med Chem.** v. 11. P. 1548-58, 2013
13. Wong et al. MicroRNA and Heart Failure. **Int. J. Mol. Sci.** 2016, 17, 502
14. Da Costa Martins, P.A.; De Windt, L.J. miR-21: a miRaculous Socratic paradox. **Cardiovasc Res.** 2010;87(3):397-400
15. Sucharov, CC; kao, DP; Port, JD; Fard, AK; Quaife, AR; Minobe, W; et al. Myocardial microRNAs associated with reverse remodeling in human heart failure. **JCI insight**, August 2, 2017.
16. Huang, Z. P.; Wang, D. Z. MiR-22 in cardiac remodeling and disease. **Trends Cardiovasc. Med.**, v.24, n. 7, p. 267-272, 2014.
17. Raitoharju, E. et al. Blood microRNA profile associates with the levels of serum lipids and metabolites associated with glucose metabolism and insulin resistance and pinpoints pathways underlying metabolic syndrome. The cardiovascular risk in Young Finns Study. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 2014 Jun 25;391(1-2):41-9
18. Karagiannis, G.S., Weile, J., Bader, G.D., Minta, J. Integrative pathway dissection of molecular mechanisms of moxLDL-induced vascular smooth muscle phenotype transformation. **BMC Cardiovascular Disorders**, 2013, 13:4

19. Shin, C.H., Ryu, S., Kim, H.H. hnRNPK-regulated PTOV1-AS1 modulates heme OXIGENASE- 1 expression via miR-1207-5p. hnRNPK-regulated PTOV1-AS1 modulates heme OXIGENASE- 1 expression via miR-1207-5p. **BMB Reports**, 2017
20. Papagregoriou, G. MicroRNAs in Disease. **Genomic Elements in Health, Disease and Evolution**, DOI 10.1007/978-1-4939-3070-8_2, 2015
21. Bostjancic E, Zidar, N; Glavac, D. MicroRNA microarray expression profiling in human myocardial infarction. **Disease Markers** 27 (2009) 255–268
22. Backes, C; Meese, E; Lenhof, HP and Keller, A. A dictionary on microRNAs and their putative target pathways. **Nucleic Acids Research**, Vol. 38, No. 13, 2010
23. Liu, H; Qin, H; Chen, G.X, Liang, M; Rong, J; Yao, J.P et al. Comparative expression profiles of microRNA in left and right atrial appendages from patients with rheumatic mitral valve disease exhibiting sinus rhythm or atrial fibrillation *Journal of Translational Medicine* 2014, 12:90
24. Xun, M., Ma, C.F., Du, Q.L., Ji, Y.H., Xu, J.R. Differential expression of miRNAs in enterovirus 71-infected cells **Virology Journal** (2015) 12:56
25. Budak, F; Bal, SH; Tezcan, G; Guvenc, F; Akalin, H; Goral, G et al. MicroRNA Expression Patterns of CD8+ T Cells in Acute and Chronic Brucellosis. *PLOS ONE*. November 8, 2016
26. Wang,S. et al Upregulated circulating miR-150 is associated with the risk of intrahepatic cholangiocarcinoma. **oncology reports** 33: 819-825, 2015
27. Science Definition. Study on the Expression Profiles of ncRNAs in Coronary Heart Disease with Blood Stasis and Toxin Syndrome and Intervention Mechanism of Active Ingredients of Red Peony Root and Fructus Aurantii. Published date: 2015.11. Disponível em: <<https://www.science-definition.com/whatis/Study on the Expression Profiles of ncRNAs in Coronary Heart Disease with Blood Stasis and Toxin Syndrome and Intervention Mechanism of Active Ingredients of Red Peony Root and Fructus Aurantii>> Acessado em 6 de julho de 2017
28. Garcia, JAD; Incerpi, EK. Fatores e Mecanismos Envolvidos na Hipertrofia Ventricular Esquerda e o Papel Anti-Hipertrófico do Óxido Nítrico. *Arq Bras Cardiol* 2008; 90(6): 443-450

29. Cardiac Conduction. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/biosystems/1339115?Sel=geneid:102466205#show=genes> . Acessado em 20 e julho de 2017
30. Human Gene Data Base. <<https://www.genecards.org/Search?term=%22hsa-mir-3157-5p%22>>. Acessado em 2 março de 2017.
31. Dong, L. et al. Interference with the β -catenin gene in gastric cancer induces changes to the miRNA expression profile. **Tumor Biol.** Abril

Tabela 1. Pacientes segundo aspectos socioeconômicos e dados clínicos. São Luís, 2016

	GRUPO I			GRUPO II		
	n	%	média	n	%	média
IDADE (anos)	-	-	55,8±10,0	-	-	57,2±7,9
SEXO						
masculino	2	40		3	60	
feminino	3	60		2	40	
ESTADO CIVIL						
solteiro	2	40		1	20	
Casado	2	40		3	60	
Viúvo	1	20		1	20	
divorciado	-	-		-	-	
RENDA						
< 1 salário	1	20		1	20	
1 salário	3	60		3	60	
2 salários	1	20		1	20	
≥ 3 salários	-	-		-	-	
ESCOLARIDADE						
analfabetos	1	20		1	20	
ensino fundamental	2	40		2	40	
ensino médio	2	40		2	40	
ensino superior	-	-		-	-	
ETILISTA						
Sim	-	-		2	40	
Não	5	100		3	60	
TABAGISTA						
Sim	-	-		-	-	
Não	5	100		2	40	

DIABÉTICO

Sim	2	40	3	60
Não	3	60	2	40

HIPERTENSO

sim	5	100	4	80
Não	-	-	1	20

ATIVIDADE FÍSICA

1x semana	-	-	2	40
2x semana	1	20	2	40
3x semana	1	20	-	-
> 3x semana	-	-	-	-
não realiza	3	60	1	20

CARDIOPATIA NA FAMÍLIA

sim	3	60	3	60
não	2	40	2	40

IMC

baixo peso	0	0	1	20
peso normal	1	20	2	40
pré - obesidade	2	40	2	40
obesidade grau I	1	20	0	0
obesidade grau II	1	20	0	0

CIRC. ABDOMINAL

homem (> 102cm)	1	50	2	66,7
mulher (> 88cm)	2	66,7	2	100

FREQUENCIA CARDÍACA

78±16,3

83,8±18,1

PRESSÃO ARTERIAL

Normal	3	60	1	20
pré-hipertensão	1	20	2	40
hip. estágio I	1	20	1	20
hip. estágio II	-	-	1	20
hip. estágio III	-	-	-	-

CLASSE FUNCIONAL

II	3	60
III	1	20
IV	1	20

FRAÇÃO DE EJEÇÃO

- - 39,6±7,5

TOTAL	5	100%	5	100%
--------------	----------	-------------	----------	-------------

QUADRO 1. miRNAs relacionados com IC comparado com o grupo controle. São Luís, 2016

Transcript ID (Array Design)	Saudavel Bi-weight Avg Signal (log2)	Insuficiencia cardiaca Bi- weight Avg Signal (log2)	Saudavel Standard Deviation	Insuficiencia cardiaca Standard Deviation	Fold Change (linear) (Saudavel vs. Insuficiencia cardiaca)	ANOVA p-value (Saudavel vs. Insuficiencia cardiaca)	FDR p-value (Saudavel vs. Insuficiencia cardiaca)
hsa-miR-423-5p	1,54	1,74	0,17	0,75	-1,15	0,161123	0,976164
hsa-mir-210	1,31	1,38	0,1	0,18	-1,05	0,332048	0,98228
hsa-mir-367	1,16	1,23	0,2	0,09	-1,05	0,335916	0,98228
hsa-mir-22	1,19	1,21	0,29	0,29	-1,01	0,62874	0,99258
hsa-mir-21	1,26	1,23	0,07	0,16	1,02	0,883079	0,996692
hsa-mir-92b	1,37	1,28	0,61	0,12	1,06	0,382583	0,98228
hsa-mir-126	1,63	1,47	0,12	0,23	1,11	0,468558	0,98228
hsa-miR-320a	5,69	5,11	1,88	1,25	1,5	0,568245	0,99197
hsa-miR-211-5p	1,39	1,19	0,23	0,31	1,15	0,179442	0,976164
hsa-mir-190a	1,18	1,07	0,1	0,22	1,08	0,862158	0,996692
hsa-miR-183-3p	1,3	1,28	0,29	0,22	1,01	0,793031	0,996692
hsa-mir-494	1,24	1,03	0,14	0,13	1,15	0,077121	0,976164
hsa-miR-1207-5p	1,31	2,33	0,12	0,53	-2,02	0,0052	0,890938
hsa-mir-6887	1,14	1,75	0,15	0,25	-1,53	0,007207	0,948091
hsa-miR-548a-3p	1,6	2,5	0,36	0,54	-1,86	0,035537	499
hsa-miR-4530	1,49	2,17	0,27	0,59	-1,61	0,022233	0,949812
hsa-miR-3157-3p	3,29	2,11	0,93	0,22	2,26	0,020266	0,949812
hsa-miR-1234-3p	2,41	1,67	0,37	0,32	1,67	0,043146	0,976164

FIGURA 1. Mapa de calor de miRNAs diferencialmente expressos na IC, São Luís, 2016

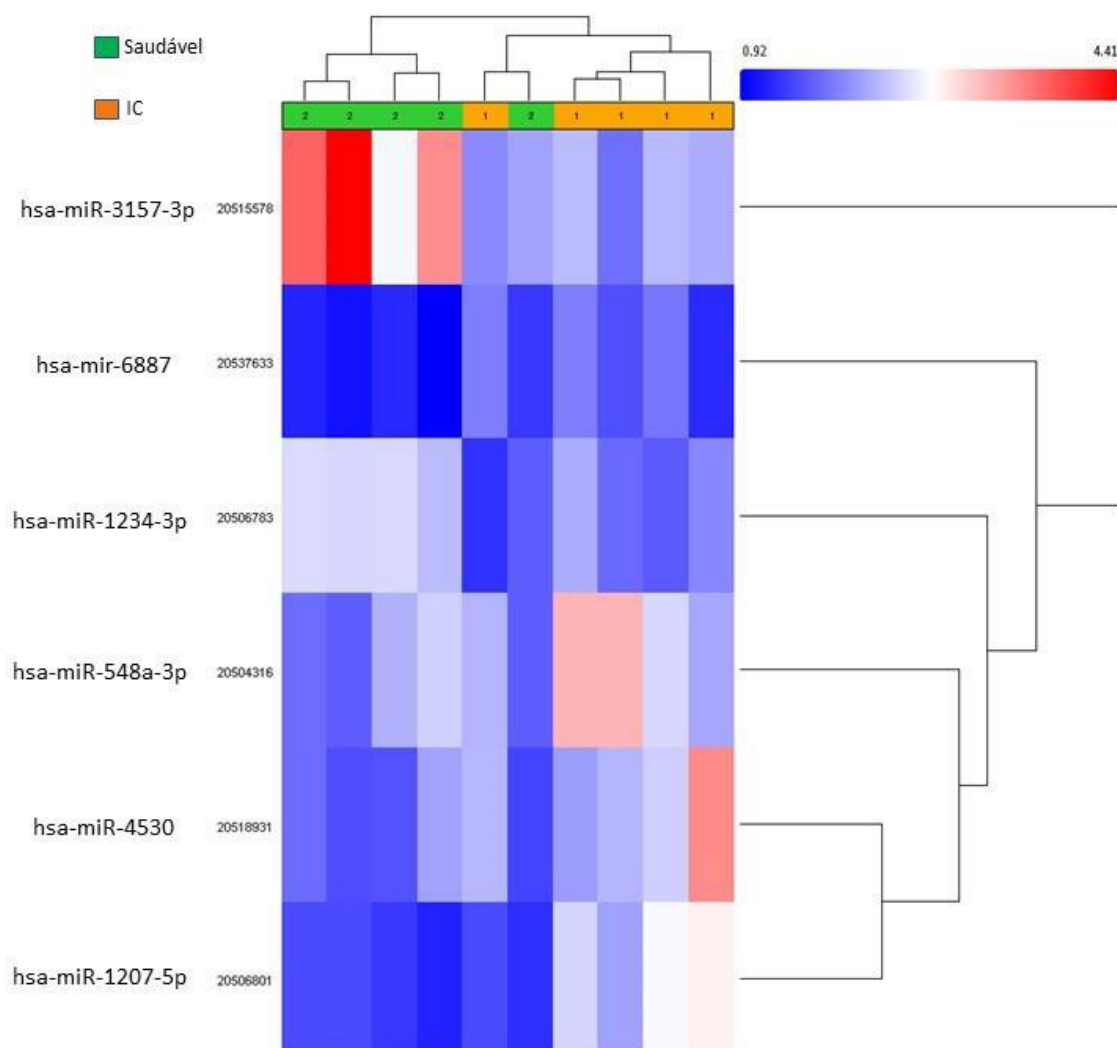
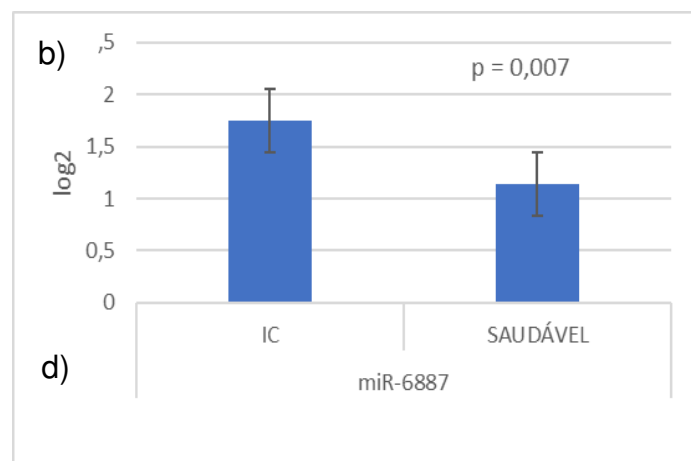
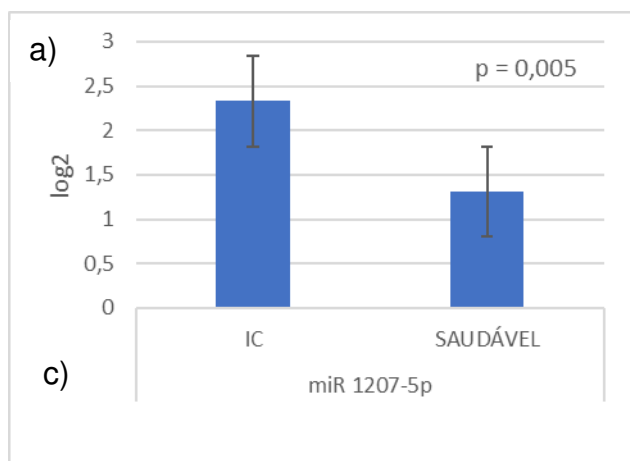
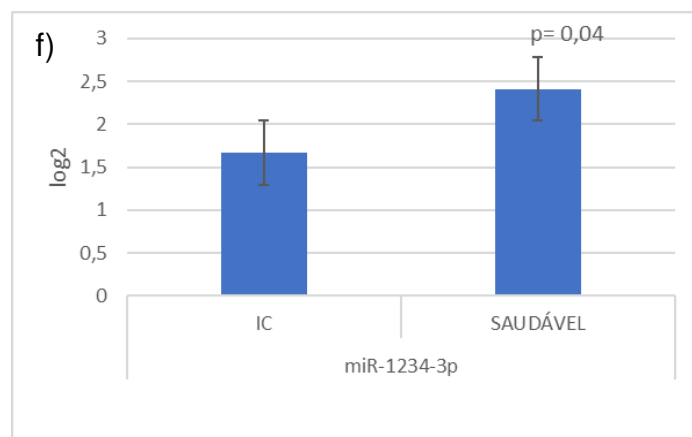
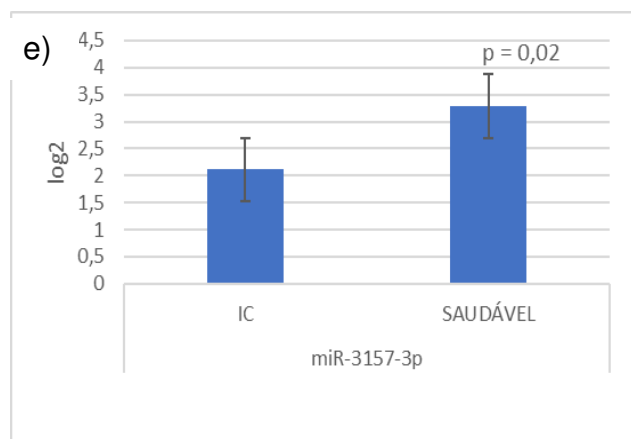
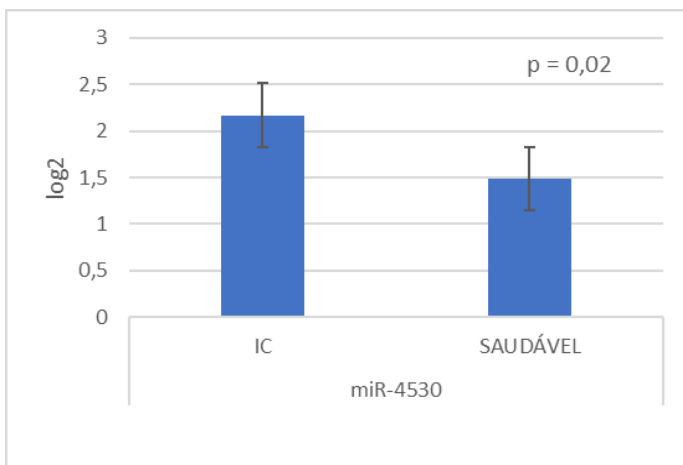
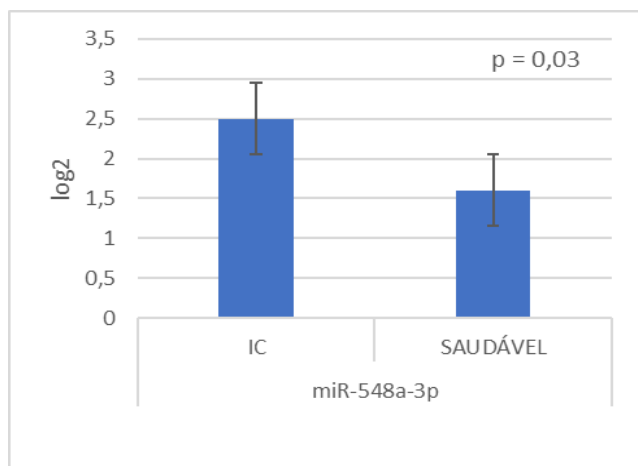


FIGURA 2. Comparação da expressão dos miR 1207-5p (a), 6887 (b), 548a-3p (c), 4530 (d), 3157-3p (e) e 1234-3p (f) nos indivíduos com IC e saudáveis. São Luís, 2016





6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A doença cardiovascular pode surgir de perturbações na sinalização intracelular em vários tipos de células, incluindo músculo liso vascular e células endoteliais, miócitos cardíacos e fibroblastos, bem como hepatócitos, células b pancreáticas e outros (Neppl & Wang, 2014). Este estudo é limitado pelo número relativamente pequeno de pacientes. Por outro lado, sua relevância clínica deve-se ao fato de termos poucos estudos sobre o tema no Brasil. Além de termos demonstrado a expressão de miRNAs já detectados em outros estudos com paciente com IC, detectamos outros miRNAs, descritos pela primeira vez com expressão aumentada e diminuída em pacientes com IC, porém são necessários maiores estudos para confirmar os miRNAs aqui identificados e esclarecer a sua influência de variabilidade genética das populações na expressão de miRNAs relacionado a Insuficiência Cardíaca.

REFERÊNCIAS

ADACHI, T., et al. Plasma microRNA 499 as a biomarker of acute myocardial infarction. **Clin Chem.** v.56. n.7. p.1183-5, Jul 2010

AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature.**;v.431, P.350-355, 2004

BACKES, C., MEESE, E.; LENHOF, H.; KELLER, A. A dictionary on microRNAs and their putative target pathways. **Nucleic Acids Research**, 2010, Vol. 38, No. 13

BETTENCOURT, P.; AZEVEDO, A.; PIMENTA, J.; FRIOES, F.; FERREIRA, S.; FERREIRA, A. N-terminal-pro-brain natriuretic peptide predicts outcome after hospital discharge in heart failure patients. **Circulation.** 2004 Oct 12;110(15):2168-74.

BOCCHI, E.A.; BRAGA, G.M.; FERREIRA, S.M.A, ROHDE, L.E.P.; OLIVEIRA, W.A.; ALMEIDA, D.R. **III Diretriz da Sociedade Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica.** Arq Bras Cardiol., v.93, n.3, p.1-65. 2009.

BOCCHI, E.A., MARCONDES-BRAGA, F.G., BACAL, F., FERRAZ, A.S., ALBUQUERQUE, D., RODRIGUES, D., et al. **Sociedade Brasileira de Cardiologia.** Atualização da Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica - 2012. Arq Bras Cardiol 2012; 98(1 supl. 1): 1-33

BRAUNWALD, E. Biomarkers in heart failure. **N Engl J Med**, v.358, p.2148-2159. 2008

BROWN, J.R.; GOTTLIEB, S.S. Acute decompensated heart failure. **Cardiol Clin**, v.30, p. 665-671, 2012.

CALLIS, T.E., PANDYA, K.; SEOK, H.Y; TANG, R.H; TATSUGUSHI, M.; HUANG, ZP, et al. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. **J Clin Invest.** 2009;119(9):2772-86

CARVALHO VO., et al. MicroRNAs: Um Novo Paradigma no Tratamento e Diagnóstico da Insuficiência Cardíaca?. **Arq Bras Cardiol.** V.98. n.4. p.362-370, 2012

CARÈ, A.; CATALUCCI, D.; FELICETTI, F.; BONCI, D.; ADDARIO, A.; GALLO, P. et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. **Nat Med.** 2007;13(5):613-8.

CORSTEN, M.F., et al. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. **Circ Cardiovasc Genet.** V.3. n.6. p.499-506, Dec. 2010

DA COSTA MARTINS, P.A.; DE WINDT, L.J. miR-21: a miRaculous Socratic paradox. **Cardiovasc Res.** 2010;87(3):397-400

DANIELS, L.B.; MAISEL, A.S.; Natriuretic peptides. **N Engl J Med.** 1998 Jul 30;339(5):321-8

DATASUS. Disponível em <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=02>. Acesso em 18 junho 2017

DE LEMOS, J.A.; MORROW, D.A.; BENTLEY, J.H.; OMLAND, T.; SABATINE, M.S.; MCCABE, C.H. et al. The prognostic value of B-type natriuretic peptide in patients with acute coronary syndromes. **N Engl J Med.** 2001 Oct 4;345(14):1014-21

DICKINSON, B.A.; SEMUS, H.M.; MONTGOMERY, R.L.; STACK, C.; LATIMER, P.A.; LEWTON, S.M. et al. Plasma microRNAs serve as biomarkers of therapeutic efficacy and disease progression in hypertension-induced heart failure. **Eur J Heart Fail** 2013;15:650–9.

ELLIS, K.L.; CAMERON, V.A.; TROUGHTON, R.W.; FRAMPTON, C.M.; ELLMERS, L.J.; RICHARDS, A.M. Circulating microRNAs as candidate markers to distinguish heart failure in breathless patients. **Eur J Heart Fail** 2013;15: 1138–47.

FALK, V.; FILIPPATOS, G.; FONSECA, C.; GOMEZ-SANCHEZ MA.; JAARSMA T.; KOBER L. 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 Failure Association (HFA) of the ESC. **Eur J Heart Fail** 2012;14:803–69.

FUKUSHIMA, Y.; NAKANISHI, M.; NONOGI, H.; GOTO, Y.; IWAI, N. Assessment of Plasma miRNAs in Congestive Heart Failure. **Circ J** 2011;75:336–40.

GAGGIN, H.K., JANUZZI Jr, J.L. Biomarkers and diagnostics in heart failure. **Biochim Biophys Acta** v.1832. p. 2442 – 24450, 2013

GOREN, Y.; KUSHNIR, M.; ZAFRIR, B.; TABAK, S.; LEWIS, B.S.; AMIR, O. Serum levels of microRNAs in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail* 2012;14: 147–54.

KARAGIANNIS et al. Integrative pathway dissection of molecular mechanisms of moxLDL-induced vascular smooth muscle phenotype transformation *BMC Cardiovascular Disorders* 2013, 13:4

KLOOSTERMAN, W.P; STEINER, F.A; BEREZIKOV, E.; DE BRUIJN, E.; VAN DE BELT, J.; VERHEUL, M. et al. Cloning and expression of new microRNAs from zebrafish. **Nucleic Acids Res.** 2006;34(9):2558-69.

KRAGELUND, C.; GRONNING, B.; KOBER, L.; HILDEBRANDT, P.; STEFFESSEN, R. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and long-term mortality in stable coronary heart disease. **N Engl J Med.** 2005 Feb 17;352(7):666-75

LEITE-MOREIRA, A.M., LOURENÇO, A.P., FALCÃO, P.I., LEITE-MOREIRA, A.F. Pivotal role of microRNAs in cardiac physiology and heart failure. **Drug Discov Today**. v.18. n. 23. p.1243-9, dec. 2013

LESSA, I. Epidemiologia da hipertensão arterial sistêmica e da insuficiência cardíaca no Brasil. **Ver Brás Hipertes** v. 8, n. 4, p. 383-92, 2001.

LIEBETRAU, C.; MO'LLMANN, H.; DO, R.R.; SZARDIEN, S.; TROIDL, C.; WILLMER, M. et al. Release Kinetics of Circulating Muscle-Enriched MicroRNAs in Patients Undergoing Transcatheter Ablation of Septal Hypertrophy. **J Am Coll Cardiol** 2013;62:992–8.

MANZANO, L.; ESCOBAR C.; CLELAND JG.; FLATHER, M. Diagnosis of elderly patients with heart failure. **Eur J Heart Fail.** 2012;14:1097-103.

MATKOVICH, S.J., WANG, W., ESCHENBACHER, W.H., DORN, L.E. CONDORELLI, G. et al. MicroRNA-133a protects against myocardial fibrosis and

modulates electrical repolarization without affecting hypertrophy in pressure-overloaded adult hearts. **Circ Res.** 2010;106(1):166-75

NEPPL, R.L.; WANG, D.Z. The myriad essential roles of microRNAs in cardiovascular homeostasis and disease. *Genes & Diseases* (2014) 1, 18-39

NOGUEIRA, P.R. et al. Heart failure: epidemiology and management. **Arq Bras Cardiol.** 2010; V. 95, n.3, p. 392-398

OLIVEIRA-CARVALHO, V., CARVALHO, V.O., SILVA, M.M., GUIMARÃES, G.V., BOCCHI, E.A. MicroRNAs: a new paradigm in the treatment and diagnosis of heart failure? **Arq Bras Cardiol**, v. 98, p.362-369, 2012.

OIKONOMOU, E., et al., Diagnostic and therapeutic potentials of microRNAs in heart failure. **Curr Top Med Chem.** v. 11. P. 1548-58, 2013

ORTEGA, R.A.R.; MANZANO, L.; MONTERO-PÉREZ-BARQUERO, M. Diagnóstico de la insuficiencia cardíaca aguda y relevancia de los biomarcadores en pacientes de edad avanzada. **Med Clin (Barc).** 2014;**142**(Supl 1):20-25

PAPAGREGORIOU, G. MicroRNAs in Disease. **Genomic Elements in Health, Disease and Evolution**, DOI 10.1007/978-1-4939-3070-8_2, 2015

RATHI, S., DEEDWANIA, P.C. The epidemiology and pathophysiology of heart failure. *Med Clin North Am*, v.96, p. 881-890, 2012

RICHARDS, A.M. Nuevos biomarcadores en la insuficiencia cardiaca: aplicaciones en el diagnóstico, pronóstico y pautas de tratamiento. **Rev Esp Cardiol.** 2010;63(6):635-9

SCHNEIDER, S.I.R., MicroRNAs circulantes como biomarcadores da insuficiência cardíaca descompensada. Rio Grande do Sul, 2014

SAYED, D; HONG, C; CHEIN, IY; LYPOWY, J; ABDELLATIF, M; MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. **Circ Res.** 2007;100(3):416-24.

SILVA, R.M.F.L. Biomarcadores BNP e NT-proBNP na insuficiência cardíaca: revisão de literatura. Labome. The worlds of laboratories, 2014. Disponível em: <<http://www.labome.com.br/method/BNP-and-NT-proBNP-in-Heart-Failure-A-Literature-Review.html>>. Acessado em 10 de setembro de 2016.

TIJSEN, A.J.; CREEMERS, E.E.; MOERLAND, P.D; DE WINDT, L.J.; VAN DER WAL, A.C.; KOK, W.E. et al. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. **Circ Res.** 2010;106(6):1035-9.

VAN KIMMENADE, RR.; JANUZZI JR, JL. Emerging biomarkers in heart failure. **ClinChem.** 2012;58:127–38.

WEI, X.J. et al. Biological significance of miR-126 expression in atrial fibrillation and heart failure. **Braz J Med Biol Res** 00(00) 2015

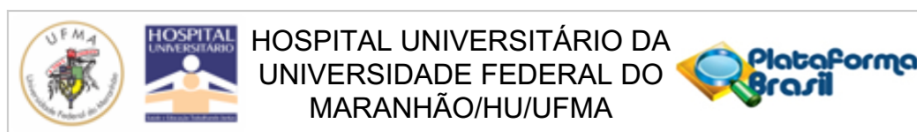
YANCY, C. W.; JESSUP, M.; BOZKURT, B.; MASOUDI, F. A.; BUTLER, J.; MCBRIDE, P.E. ACCF/AHA Task Force Members. 2013 ACCF/AHA **Guideline for the Management of Heart Failure**: A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart

WANG,S. et al Upregulated circulating miR-150 is associated with the risk of intrahepatic cholangiocarcinoma. **oncology reports** 33: 819-825, 2015

WEBER, M.; HAMN, C. Role of B-type natriuretic peptides. **J Am Coll Cardiol.** 2007 Dec 18; 50(25):2357-68

WONG et al. MicroRNA and Heart Failure. **Int. J. Mol. Sci.** 2016, 17, 50

ANEXO A – Parecer do comitê de ética em pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE microRNAs EM PORTADORES DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

Pesquisador: Jose Albuquerque de Figueiredo Neto

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 49456914.2.0000.5086

Instituição Proponente: Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão/HU/UFMA

Patrocinador Principal: FUND DE AMPARO A PESQUISA AO DESEN CIENTIFICO E TECNOLÓGICO DO MARANHÃO - FAPEMA

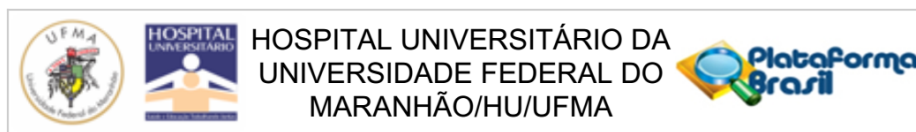
DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.427.475

Apresentação do Projeto:

A Insuficiência Cardíaca (IC) é uma síndrome clínica de caráter sistêmico, definida com disfunção cardíaca que ocasiona inadequado suprimento sanguíneo para atender necessidades metabólicas tissulares, na presença de retorno venoso normal, ou fazê-lo somente com elevadas pressões de enchimento. Caracteriza-se por ser uma síndrome eminentemente clínica, sendo os sintomas a melhor forma para diagnosticá-la. A IC é a via final comum da maioria das cardiopatias. Representa um importante problema de saúde pública, considerando-se a prevalência crescente e os índices de hospitalização associados à alta morbimortalidade. O custo socioeconômico desta síndrome é elevado, envolvendo dispêndio de medicamentos, internações repetidas, perda de produtividade, aposentadorias precoces, eventuais cirurgias e, ocasionalmente, transplante cardíaco. De acordo com os dados da III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica de 2009, durante o ano de 2007 a IC representou a terceira causa mais frequente de internações hospitalares no Sistema Único de Saúde (SUS), sendo mais prevalente na faixa etária acima de 60 anos. A IC crônica tem sido classicamente categorizada com base na intensidade de sintomas em 4 classes propostas pela New York Heart Association. Estas classes estratificam o grau de limitação imposto pela doença para atividades cotidianas do indivíduo; vale dizer, portanto, que esta classificação é

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227
Bairro: CENTRO **CEP:** 65.020-070
UF: MA **Município:** SÃO LUIS
Telefone: (98)2109-1250 **Fax:** (98)2109-1223 **E-mail:** cep@huufma.br



Continuação do Parecer: 1.427.475

melhor o tratamento e avaliação da insuficiência cardíaca, podendo com isso diminuir o tempo de internação hospitalar e piores desfechos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo é justificável, pela importância do cuidado ao portador de insuficiência cardíaca, representando ainda importante na avaliação de biomarcadores na insuficiência cardíaca.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O protocolo apresenta documentos referente aos "Termos de Apresentação Obrigatória": Folha de rosto, Declaração de compromisso em anexar os resultados na plataforma Brasil garantindo o sigilo, Orçamento financeiro detalhado, Cronograma com etapas detalhada, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), Autorização do Gestor responsável do local para a realização da coleta de dados e Projeto de Pesquisa Original na íntegra em Word. Atende à Norma Operacional no 001/2013 (item 3/ 3.3).

Recomendações:

Após o término da pesquisa o CEP-HUUFMA sugere que os resultados do estudo sejam devolvidos aos participantes da pesquisa ou a instituição que autorizou a coleta de dados de forma anonimizada.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O PROTOCOLO atende aos requisitos fundamentais da Resolução CNS/MS nº 466/12 e suas complementares.

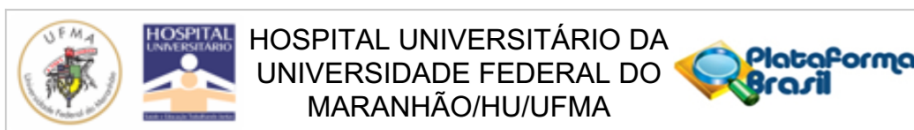
Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa–CEP-HUUFMA, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº.466/2012 e Norma Operacional nº. 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela APROVAÇÃO do projeto de pesquisa proposto.

Eventuais modificações ao protocolo devem ser inseridas à plataforma por meio de emendas de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente após a coleta de dados e ao término do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227	CEP: 65.020-070
Bairro: CENTRO	
UF: MA	Município: SAO LUIS
Telefone: (98)2109-1250	Fax: (98)2109-1223
	E-mail: cep@huufma.br



Continuação do Parecer: 1.427.475

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_433038.pdf	29/01/2016 17:52:09		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ajustado.pdf	29/01/2016 17:51:25	Jose Albuquerque de Figueiredo Neto	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	cartacep.jpg	27/01/2016 15:22:26	Jose Albuquerque de Figueiredo Neto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_MICRORNA.pdf	25/01/2016 20:51:31	Jose Albuquerque de Figueiredo Neto	Aceito
Declaração do Patrocinador	Termo_Outorga_fapema.pdf	25/01/2016 13:48:50	Jose Albuquerque de Figueiredo Neto	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto_MicroRNA_nova.pdf	07/12/2015 11:07:14	Jose Albuquerque de Figueiredo Neto	Aceito
Outros	termoOutorgaAEXT.pdf	15/10/2015 12:58:35	Jose Albuquerque de Figueiredo Neto	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	ParecerCOMICMICRORNA.pdf	16/09/2015 13:56:55	Jose Albuquerque de Figueiredo Neto	Aceito
Outros	TERMODECOMPROMISSO.doc	26/08/2015 17:25:34	Jose Albuquerque de Figueiredo Neto	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TERMODEANUENCIA.doc	26/08/2015 17:25:19	Jose Albuquerque de Figueiredo Neto	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO LUIS, 27 de Fevereiro de 2016

Assinado por:
Dorlene Maria Cardoso de Aquino
(Coordenador)

Endereço: Rua Barão de Itapary nº 227
Bairro: CENTRO CEP: 65.020-070
UF: MA Município: SAO LUIS
Telefone: (98)2109-1250 Fax: (98)2109-1223 E-mail: cep@huufma.br

ANEXO B – Comprovante de submissão de artigo científico



SOCIEDADE
BRASILEIRA DE
CARDIOLOGIA



Home

Envio de Artigos

Artigos

Caixa de Mensagens

Alteração Cadastral

Contato

Formulários

Bem-vindo Raphael Costa MArinho
[Autor] 

Dados do Artigo

Data de Envio: 07-16-2017 15:42:13 **Nº do Artigo:** 9276

Enviado por: Raphael Costa MArinho

Tipo de estudo: Outros

Classificação: Artigo Original

Assunto: Insuficiência Cardíaca

Nome do comitê de ética em pesquisa: Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário Presidente Dutra (HUFMA)

Nº da aprovação: 1.427.475

Data: 02-27-2016 00:00:00

Arquivos

Versão nº 1 do artigo

[Baixar a versão nº 1](#)

[Baixar a versão nº 1 completa \(PDF\)](#)

[Baixar o anexo nº 1](#)

Figuras/Vídeos da versão nº 1

APÊNDICE A - FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS
AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES NO PORTADOR DE INSUFICIÊNCIA
CARDÍACA

() Grupo IC

() Grupo controle

1- Nome.....

2- Idade..... 3- Sexo 1- (M) 2- (F);

4- Estado civil: (1) solteiro; (2) casado; (3) viúvo (4) divorciado

5- Renda Familiar: 1- () < 1 salário; 2- () 1 salário; 3- () 2 salários; 4- () > ou igual a 3 salários.

6- Escolaridade: (1) analfabeto; (2) Ensino fundamental; (3) Ensino Médio; (4) Ensino superior

7- Etilista? (1) sim (2) não

8- Tabagista ? (1) sim (2) não

9- Diabetes Melittus ? (1) sim (2) não 9- Hipertenso ? (1) sim (2) não

10- Pratica atividade física ? (1) 1x na semana; (2) 2x na semana; (3) 3x na semana; (4) ≥3x semana; (5) não pratica

11 – Alguém na família é cardiopata ? (1) sim, quem? (2) não

12 – Peso 13 – Altura 14- IMC 15- P.A.....

16- Circunferência Abdominal 17- F.C.....

18- Cirurgia Cardíaca anterior ? (1) sim (não)

19- EXAMES DE IMAGEM

ECOCARDIOGRAMA

Fração de Ejeção:

.....

