

MAPEAMENTO DO SÍTIO DE PRODUÇÃO DO microRNA-423-5P  
EM MODELO ANIMAL DE REMODELAMENTO CARDÍACO APÓS  
INSULTO ISQUÊMICO

Tese

Niara da Silva Medeiros

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

**MAPEAMENTO DO SÍTIO DE PRODUÇÃO DO microRNA-423-5P  
EM MODELO ANIMAL DE REMODELAMENTO CARDÍACO  
APÓS INSULTO ISQUÊMICO**

Autor: Niara da Silva Medeiros

Orientador: Luís Eduardo P. Rohde

Co-orientador: Michael Everton Andrades

Tese submetida como requisito para obtenção do grau de Doutor ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Área de Concentração: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre

2018

### CIP - Catalogação na Publicação

da Silva Medeiros, Niara

Mapeamento do sítio de produção do miRNA-423-5p em modelo animal de remodelamento cardíaco / Niara da Silva Medeiros. -- 2018.

61 f.

Orientador: Luís P. Rohde.

Coorientador: Michael Andrades.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Insuficiência cardíaca. 2. Infarto agudo do miocárdio. 3. MicroRNA. 4. Modelo experimental. I. P. Rohde, Luís, orient. II. Andrades, Michael, coorient. III. Título.

## **Agradecimentos**

Agradeço imensamente aos pais, Ruy Cezar Medeiros e Gláucia Medeiros pois são os pilares da minha vida e possuem papel fundamental na minha caminhada, obrigada pelo apoio e amor incondicional

Agradeço ao meu namorado, Adriano Ribas, pela disposição em compartilhar cada momento, cada conquista no decorrer deste processo, pelo incentivo e energia positiva.

Aos professores do Laboratório de Pesquisa Cardiovascular (CardioLab), em especial aos meus orientadores Dr. Luis Rohde e Dr. Michael Andrades, pela confiança que depositou em mim para excussão deste trabalho e pelo aprendizado que me foi proporcionado.

Aos colegas do CardioLab, a ajuda de todos foi fundamental para que este trabalho pudesse ser realizado.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma fizeram contribuições a este trabalho, pois com certeza não teria o mesmo resultado sem a ajuda de vocês.

A todos o meu muito obrigada!

"O valor das metas futuras não reside na imagem do futuro que se cria na mente, mas sim na mudança que elas provocam no presente"

David Allen

## SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT .....	9
1 INTRODUÇÃO .....	10
1 INTRODUÇÃO .....	10
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	12
2.1 Insuficiência cardíaca.....	12
2.1.1 Epidemiologia .....	12
2.1.2 Patogênese da Insuficiência cardíaca .....	13
2.2 MicroRNAs.....	15
2.2.1 MicroRNAs e insuficiência cardíaca.....	17
2.2.2 miRNA 423-5p e insuficiência cardíaca. ....	22
3 JUSTIFICATIVA .....	26
4 OBJETIVOS .....	27
4.1 Objetivo geral.....	27
4.2 Objetivos específicos .....	27
5 REFERENCIAS DA REVISÃO DE LITERATURA.....	28
6 ARTIGO ORIGINAL .....	35
7 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	61

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

BNP: peptídeo natriurético do tipo B

DCV: doença cardiovascular

IC: Insuficiência cardíaca

miRNA: microRNA

ncRNAs: RNA não codificantes

RNA: ácido ribonucleico

## RESUMO

O objetivo desta tese é avaliar a expressão do miRNA-423-5p, em diferentes sítios, em modelo experimental de remodelamento cardíaco após insulto isquêmico em ratos. Os animais foram randomizados em grupos SHAM (cirurgia sem oclusão da artéria coronária descendente anterior esquerda) ou IAM (cirurgia com ligadura da artéria coronária descendente anterior esquerda) e acompanhados por 1, 7, 28 e 90 dias. Após o tempo de seguimento, os animais foram submetidos ao ecocardiograma e eutanasiados. Foi retirado sangue do plexo retroorbital, sangue venoso e arterial e coletado tecido do músculo gastrocnêmio e do ventrículo esquerdo separando as áreas remota (REM), infartada (INF) e peri-infartada (PERI). A partir da homogeneização dos tecidos, foi realizada a extração de miRNA e sua expressão quantificada pelo método de PCR em tempo real. Também foi mensurado os níveis plasmáticos do peptídeo natriurético cerebral (BNP). Os dados foram analisados pela teste de ANOVA de uma e duas vias e correlações através do programa estatístico SPSS 21.0. Quanto a caracterização do modelo utilizado, podemos verificar que a fração de ejeção do ventrículo esquerdo dos ratos IAM foram menores que os do grupo SHAM e os percentuais de área acinética foram iguais em todos os grupos IAM, como esperado. Também observamos que o miRNA-423-5p é expresso no coração, nos diferentes segmentos analisados, apresentando variação significativa nos tempos avaliados, correlacionado-se positivamente com o tamanho do infarto e negativamente com a fração de ejeção do ventrículo esquerdo. Diante deste cenário, nossos achados solidificam o conceito de que a expressão do miRNA-423-p se altera ao longo do tempo após insulto isquêmico e pode ter papel relevante no remodelamento cardíaco de origem isquêmica.

**Palavras chave:** Infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca, biomarcador



## **ABSTRACT**

The objective of this project was to evaluate the expression of miRNA-423-5p in an experimental model of cardiac remodeling after ischemic injury in rats. Animals were randomized to SHAM group (surgery without occlusion of the left anterior descending coronary artery) or acute myocardial infarction (AMI) group (surgery with ligation of the left anterior descending coronary artery) and followed for 1, 7, 28 and 90 days. After the follow-up period, the animals were submitted to echocardiography and euthanized. Blood from the retroorbital plexus, venous and arterial blood was collected; and gastrocnemius and left ventricle tissue was collected, separating the remote (REM), infarcted (INF) and peri-infarcted (PERI) areas. From the homogenization of tissues, miRNA was extracted and its expression quantified by real-time PCR. Plasma levels of brain natriuretic peptide (BNP) were also measured by ELISA. Data were analyzed by one-way and two-way ANOVA and coefficient correlations were calculated using the statistical package SPSS 21.0. Regarding the experimental model, we could verify that the left ventricular ejection fraction of the AMI rats were reduced compared to the SHAM group and the percentages of akinetic area were the same in all AMI groups, as expected. We also observed that miRNA-423-5p is expressed in the heart in the different segments analyzed, showing significant variation in the different periods that were evaluated, is positively correlated with infarct size and negatively with left ventricular ejection fraction. In this scenario, our findings solidify the concept that miRNA-423-p expression changes over time after an ischemic insult and may play a relevant role in the cardiac remodeling of ischemic origin.

**Keywords:** myocardium infarction, heart failure, biomarker

## 1 INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca (IC) é uma doença complexa de caráter sistêmico, onde ocorre a redução do aporte sanguíneo nos tecidos pela incapacidade do coração atender as demandas metabólicas (Johnson 2014). Dentre as suas principais origens estão a hipertensão e o infarto agudo do miocárdio, ambas levando a uma série de sinalizações celulares que culminam com remodelamento tecidual, inflamação, fibrose e diminuição contrátil. Nos últimos anos, uma nova classe de sinalizadores tem sido bastante explorada no cenário da IC, conhecidos como microRNA (miRNA) (Goren, Kushnir et al. 2012; Duygu, de Windt et al. 2016).

Os miRNAs são ácidos ribonucleicos (RNAs) pequenos, com 19 à 25 nucleotídeos de extensão, que não codificam proteínas. A sua principal função é a inibição da expressão gênica, que é feita pela ligação complementar de um miRNA com um RNA mensageiro (mRNA). Após o pareamento, o mRNA em questão é levado à degradação (Lee, Kim et al. 2004). Os miRNAs possuem papel importante na patogênese da IC (Duygu, de Windt et al. 2016) e podem auxiliar no seu diagnóstico e prognóstico (Goren, Kushnir et al. 2012; Bauters, Kumarswamy et al. 2013). Neste cenário, o miRNA-423-5p destaca-se por estar com níveis plasmáticos aumentados em pacientes com IC quando comparado a indivíduos saudáveis, além de estar positivamente associado com níveis aumentados de BNP (Tijssen, Creemers et al. 2010; Bauters, Kumarswamy et al. 2013; Luo, He et al. 2015).

Os níveis plasmáticos do miRNA-423-5p já foram mensurados no contexto de IC aguda, crônica, durante o processo de remodelamento cardíaco e em outras doenças cardíacas e há uma indicação consistente de que este miRNA pode estar envolvido na gênese e na progressão destes cenários, isoladamente ou em conjunto com outros miRNAs (Tijssen, Creemers et al. 2010; Kumarswamy and Thum 2013; Schneider, Silvello et al. 2018). Recentemente, estudos vem demonstrando a função do miR-423-5p no contexto de doenças cardíacas. Um experimento com transfecção demonstrou que a superexpressão deste miRNA inibe a proliferação celular e induz a apoptose em cardiomioblastos, além disso em outros estudos pode-se verificar

que o miR-423-5p induz a apoptose através da produção de espécies reativas como o peróxido de hidrogênio e pelo aumento da expressão da p53 e caspase-3, que são moléculas fundamentais no processo apoptótico (Luo, He et al. 2015; Li, Yu et al. 2016; Luo and Zhang 2016).

O nosso grupo demonstrou a existência de um gradiente transcoronário positivo do miRNA-423-5p em pacientes ambulatoriais com IC estável, enquanto que houve um gradiente negativo em indivíduos sem disfunção ventricular esquerda. Este dado sugere uma origem cardíaca para o miRNA-423-5p circulante na IC (Goldraich, Martinelli et al. 2014). Além disso, Tijssen e colaboradores em 2010, sugerem este miRNA como um possível biomarcador circulatório para IC (Tijssen, Creemers et al. 2010).

Apesar da relevância molecular já descrita para o miR-423-5p e de dados sugestivos sobre a origem cardíaca na IC, a definição da sua origem é difícil de ser definida a partir de pacientes com IC. Há impossibilidades operacionais e éticas em relação à realização de múltiplas biópsias de diferentes sítios cardíacos e periféricos. Desta forma, o emprego de modelos animais se faz necessário e justificável, permitindo avaliações sucessivas ao longo do desenvolvimento da disfunção do ventrículo esquerdo e aumentando a compreensão do papel do miR-423-5p no estabelecimento da IC.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Insuficiência cardíaca

#### 2.1.1 Epidemiologia

As doenças cardiovasculares (DCVs) são contribuintes significativos para a morbidade e mortalidade em nível mundial e são consideradas a maior causa de morte no mundo, além de ser uma das principais causas de internações promovendo um alto impacto econômico (Brown and Gottlieb 2012; Givertz, Teerlink et al. 2013). Nos últimos dados levantados pela Organização Mundial da Saúde, estimou-se que 17,7 milhões de pessoas morreram de doenças cardiovasculares, representando 31% de todas as mortes globais (WHO 2017).

No Brasil, segundo dados do DATASUS, sistema de dados mantido pelo Ministério da Saúde, morrem anualmente cerca de 90.000 pessoas vítimas de ataque cardíaco, representando cerca de 7% das mortes anuais, sendo a faixa etária mais acometida acima de 40 anos (Datasus 2016). Tanto no Brasil como nos Estados Unidos, cerca de 32% das mortes são causadas por DCVs, que afetam principalmente os idosos e pessoas com baixa renda (Taylor 2010; Malta, Neto et al. 2011; Go, Mozaffarian et al. 2013) .

Dentre as doenças cardiovasculares destacam-se a doença arterial coronariana, as cardiomiopatias, as arritmias cardíacas, a doença arterial periférica e a insuficiência cardíaca (IC), entre outras. Apesar de existirem poucos estudos sobre a epidemiologia da IC na América Latina, estima-se que a incidência desta doença seja de 199 casos para 100.000 pessoas/ano (Ciapponi, Alcaraz et al. 2016) e prevalência de mais de 23 milhões de indivíduos em todo o mundo (Lloyd-Jones, Adams et al. 2010).

Dados de uma revisão sistemática com meta-análise incluindo 143 estudos realizados na América Latina demonstraram que a incidência de IC no Brasil é de 199 casos para 100.000 pessoas, além disso verifica-se que a taxa de re-hospitalização em 1 ano é de 32%, com duração entre 7 a 11 dias de internação e que a mortalidade no hospital é de 11,67% principalmente em pacientes com fração de ejeção reduzida (Ciapponi, Alcaraz et al. 2016).

### 2.1.2 Patogênese da Insuficiência cardíaca

A IC representa um somatório de alterações anatômicas, funcionais e biológicas que interagem juntas de maneira complexa e com diferentes origens genéticas e ambientais. Assim, clínicos e investigadores têm usado uma variedade de modelos complexos na tentativa de esclarecer os mecanismos envolvidos na IC (Mann 1999).

A IC pode ser definida como uma disfunção cardíaca que ocasiona inadequado suprimento sanguíneo para atender as demandas metabólicas do corpo, ou seja, é uma anormalidade cardíaca na estrutura ou função que conduz à incapacidade do coração ao fornecer nutrientes e oxigênio a uma velocidade compatível a requisitada pelos tecidos (Dickstein, Cohen-Solal et al. 2008; Bocchi, Braga et al. 2009).

As causas da IC podem ser variadas, incluindo as cardiopatias de origem isquêmica, hipertensiva, valvular e congênita, as cardiomiopatias (dilatada, hipertrófica e restritiva), as doenças do pericárdio, arritmias e o consumo de álcool e drogas. A causa mais comum de IC é a doença isquêmica, associada à necrose miocárdica, que causa perda do tecido contrátil e disfunção ventricular sistólica esquerda (Tanai and Frantz 2015).

Na IC isquêmica ocorre alterações estruturais após infarto do miocárdio devido à lesão permanente e remodelamento cardíaco. A fibrose formada após insulto isquêmico leva à elevação da pressão intracardíaca e tensão miocárdica levando ao remodelamento cardíaco (Johnson 2014).

Podemos considerar que a IC é uma condição patológica complexa e progressiva que envolve fatores hereditários, ambientais e comportamentais, podendo ser caracterizada clinicamente por dispneia e fadiga em repouso ou com esforço, sinais de retenção de líquidos, taquicardia, taquipneia, estertores pulmonares, derrame pleural, aumento da pressão venosa jugular, edema periférico, hepatomegalia, e a evidência objetiva de uma anormalidade estrutural ou funcional do coração em repouso (Liew and Dzau 2004; McMurray, Adamopoulos et al. 2012).

Além disso, a IC avançada apresenta um quadro que inclui perturbações da função do miocárdio, super-expressão de citocinas, remodelamento ventricular, alteração hemodinâmica, ativação neuro-humoral, bem como

disfunção vascular e endotelial, interagindo com diversos processos cardiovasculares (Hasenfuss 1998; McMurray, Adamopoulos et al. 2012). Além de ativar uma cascata de mecanismos neuro-hormonais compensatórias que envolvem o sistema nervoso adrenérgico, o sistema renina-angiotensina-aldosterona, citocinas e outros mediadores, os quais são ativados para manutenção da homeostase cardiovascular (Liew and Dzau 2004). Estes mecanismos são ativados a fim de preservar o débito cardíaco que está prejudicado. A ativação do sistema nervoso adrenérgico e do sistema renina-angiotensina-aldosterona, leva a uma vasoconstrição, aumento do tônus simpático, dos níveis de angiotensina II, endotelina e redução da liberação de óxido nítrico, além da retenção de fluidos e sódio, com aumento da vasopressina e aldosterona (Chatterjee 2012; Rathi and Deedwania 2012).

Esses mecanismos compensatórios ativados após o declínio inicial na capacidade ejetora do coração são capazes de manter a função do ventrículo esquerdo no estado fisiológico, de modo que a capacidade funcional do paciente é preservada ou apenas levemente reduzida. A ativação do sistema adrenérgico, mediada principalmente pelos receptores beta-adrenérgicos, possuem efeitos de aumento na função contrátil e aumento na frequência cardíaca. Porém, com o tempo, a ativação sustentada desses sistemas provoca efeitos deletérios, que contribuem para os sintomas clínicos da IC, incluindo declínio da capacidade funcional, descompensação cardíaca, instabilidade elétrica miocárdica e morte prematura (Mann 1999; McMurray 2010; Chatterjee 2012; Rathi and Deedwania 2012).

O processo de remodelamento do ventrículo esquerdo compreende alterações celulares (cardiomiócitos) e na matriz extracelular, morte celular por necrose ou apoptose, no volume do miócito e em outros componentes do miocárdio, além de mudanças na geometria e arquitetura da cavidade ventricular, alterando o tamanho, forma e função de forma progressiva, que pode desencadear e perpetuar uma perda na função contrátil (Chatterjee 2012; Rathi and Deedwania 2012; Burchfield, Xie et al. 2013).

A avaliação e o diagnóstico de IC são baseados principalmente na anamnese, exame físico, exames laboratoriais e de imagem e testes funcionais (Bonow, Mann et al. 2012). Existem biomarcadores que foram definidos para diagnóstico e prognóstico de IC, entre eles podem-se destacar algumas

enzimas, hormônios, marcadores de estresse miocárdico, de injúria e de disfunção, como por exemplo, peptídeos natriuréticos, troponinas, proteína C reativa, norepinefrina, endotelina, entre outros biomarcadores (Braunwald 2008; Chowdhury, Kehl et al. 2013; Zhou, Zhang et al. 2018).

O BNP (*Brain Natriuretic Peptide*) e o NT proBNP são hormônios secretados diretamente pelo miocárdio do ventrículo esquerdo em resposta ao estresse da parede ventricular pela sobrecarga de volume e pressão. Já o ANP (*Atrial Natriuretic Peptide*) se eleva nas fases iniciais do desenvolvimento da IC. Ambos são hormônios que atuam na vasodilatação e natriurese (Magnussen and Blankenberg 2018), reduzindo o enchimento atrial/ventricular e desacelerando o remodelamento cardíaco e são utilizados como marcador para diagnóstico de disfunção ventricular esquerda assintomática e sintomática (Tanai and Frantz 2015).

Para complementar o diagnóstico e prognóstico de pacientes com IC, estudos vêm identificando e avaliando a função de moléculas regulatórias na patogênese da IC, como os miRNA, pequenos RNAs não codificantes com extrema importância no controle da expressão gênica (Tijssen, Creemers et al. 2010; Creemers, Tijssen et al. 2012; Magnussen and Blankenberg 2018).

## 2.2 MicroRNAs

As sequências mais estudadas no genoma humano são as de genes codificantes de proteínas constituídas por éxons codificantes equivalentes a 1,5% do genoma, aumentando para 2% quando as regiões não traduzidas (UTRs) são consideradas (Alexander, Fang et al. 2010). Porém, nos últimos anos, tornou-se cada vez mais evidente que a porção do genoma não codificadora de proteínas é de fundamental importância funcional para o desenvolvimento normal, fisiológico, além de influenciar na patogênese de diversas doenças (Mercer, Dinger et al. 2009).

Os RNAs não codificantes (ncRNAs) são divididos em três classes baseadas no seu tamanho, incluindo pequenos ncRNAs que variam de 17 a 50 nucleotídeos; médios ncRNAs, que tem aproximadamente até 200 nucleotídeos; e os longos ncRNAs que possuem acima de 200 nucleotídeos

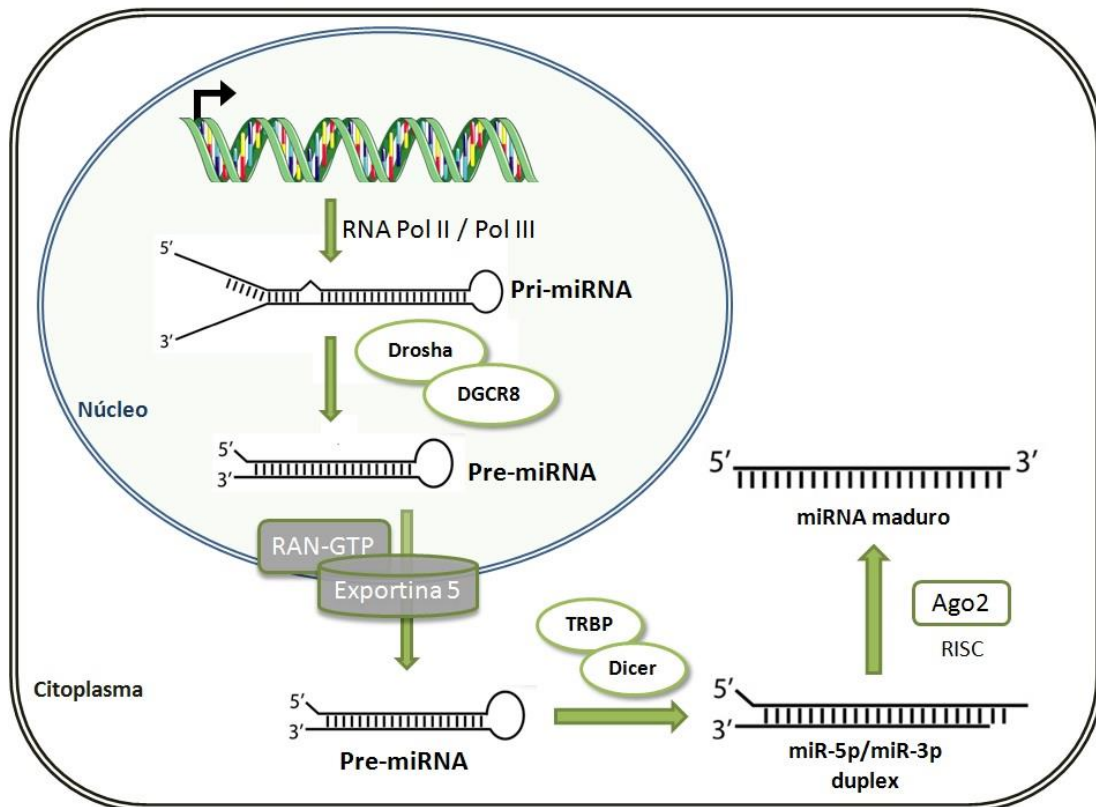
(Esteller 2011). A relevância funcional da porção não-codificadora de proteínas do genoma tornou-se evidente principalmente devido a uma classe de pequenos ncRNAs, os miRNAs (He and Hannon 2004).

Os miRNAs são uma classe de pequenos ncRNAs de fita simples, com tamanho de 18 a 25 nucleotídeos, resultantes de uma sequência de clivagens enzimáticas a partir de uma molécula precursora. Na maioria dos casos, a transcrição dos genes codificadores de miRNAs é mediada pela RNA polimerase II (Figura 1). Embora alguns miRNAs de origem animal sejam produzidos individualmente, a partir de unidades de transcrição separadas, muitos miRNAs são produzidos a partir de unidades de transcrição que geram mais de um produto, ou seja, uma única unidade de transcrição pode conter agrupamentos de diferentes miRNAs, ou até mesmo pode codificar um miRNA e uma proteína (Bartel 2004).

Em mamíferos, aproximadamente 60% dos genes codificadores de proteínas são regulados por miRNAs e são conhecidos por regular inúmeros processos celulares, incluindo o controle do tempo do desenvolvimento, diferenciação de células hematopoiéticas, apoptose, proliferação celular e desenvolvimento de órgãos (Bushati and Cohen 2007; Friedman, Farh et al. 2009).

Cerca de 2.600 miRNAs maduros foram identificados no genoma humano (miRBase 2018) e este número deve crescer ainda mais devido ao desenvolvimento recente de tecnologias de sequenciamento e métodos de predição computacional. Vários estudos têm mostrado que miRNAs modulam uma ampla variedade de funções cardíacas, não só no desenvolvimento do coração, mas também na patogenicidade, tais como insuficiência cardíaca (IC) (Beuvink, Kolb et al. 2007; Oliveira-Carvalho, da Silva et al. 2013; Yan, Ma et al. 2017; Schneider, Silvello et al. 2018). Portanto, essas características tornam os microRNAs ferramentas eficientes para determinação de vias específicas envolvidas em doenças ou processos biológicos.





**Figura 1: Biogênese do miRNA.** O processamento do miRNA inicia com a transcrição do pri-miRNA pela RNA polimerase II ou III, seguido pela clivagem desta transcrição primária em um pré-miRNA por um complexo formado por Droscha e DGCR8 que permite a exportação nuclear do pré-miRNA. No citoplasma, a RNase Dicer e a proteína TRBP de ligação de RNA de cadeia dupla clivam o pré-miRNA, criando um duplex imperfeito de cerca de 22 nucleotídeos de comprimento com dois nucleotídeos 3' salientes. O Argonouta 2 (Ago2), selecionará a cadeia apropriada, levando à indução da formação do do complexo silenciador (RISC) e regulação de RNA mensageiros específicos. Adaptado de: (Tetreault and De Guire 2013).

### 2.2.1 MicroRNAs e insuficiência cardíaca.

Apesar de amplamente estudados, os miRNAs e suas ações biológicas ainda não são completamente conhecidos. Estudos mostraram que alguns miRNAs estão presentes especificamente em determinados tipos de tecidos ou células, incluindo o coração (Kloosterman, Steiner et al. 2006; Beuvink, Kolb et al. 2007; Duygu, de Windt et al. 2016; de Gonzalo-Calvo, Iglesias-Gutierrez et al. 2017). Além disso, alguns miRNAs possuem papéis distintos dependendo do tecido onde se encontram e o estímulo fornecido. É o exemplo do miRNA-1 que pode ser encontrado no músculo esquelético e no coração. Durante a

embriogênese a superexpressão deste miRNA promove a diferenciação miogênica e após este período tem papel relacionado a hipertrofia do músculo esquelético.- Já no coração, este miRNA, em modelo animal, está relacionado com a redução da proliferação de cardiomiócitos ventriculares, levando a IC e pode estar envolvido no desenvolvimento de arritmias (Townley-Tilson, Callis et al. 2010).

Com isso, se torna importante entender o papel dos miRNAs em diferentes contextos e células que compõem o sistema cardiovascular, tais como fibroblastos, células endoteliais e células musculares lisas, os quais não podem ser ignoradas quando se estuda a fisiologia do sistema cardiovascular ou sua resposta ao estresse (Duygu, de Windt et al. 2016).

O crescimento hipertrófico que acompanha muitas doenças que afligem o coração é caracterizado por um aumento na síntese de proteínas, montagem de sarcômeros adicionais, aumento da fibrose, re-expressão de genes fetais cardíacos e aumento do tamanho dos cardiomiócitos sem alterar o número e a ativação de vias de sinalização intracelulares e mediadores de transcrição dos cardiomiócitos. Esses processos são regulados por diferentes vias celulares, como por exemplo, a ação dos microRNAs (van Rooij, Sutherland et al. 2006; Wang, Zhou et al. 2009; Seto and van Rooij 2012).

Parece haver aproximadamente 150-200 miRNAs expressos no sistema cardiovascular. Muitos desses miRNAs são dinamicamente regulados em resposta ao estresse cardíaco agudo, e em alguns casos, em longo prazo durante a resposta compensatória do coração a uma lesão crônica ou sobrecarga hemodinâmica (Sayed, Hong et al. 2007; Matkovich, Wang et al. 2010).

Observou-se que alguns microRNAs são altamente expressos no coração, como o miRNA-1, -133, -208 e -499 (Wang, Zhou et al. 2009; Yan, Ma et al. 2017). O miRNA-1 representa 40% de todo o microRNA expresso no coração, enquanto os miRNA-208a, -208b e -499 são específicos dos cardiomiócitos e geralmente estão superexpressos em doenças cardíacas (Wang, Zhou et al. 2009). Foi observado que o silenciamento do miRNA-208a em ratos Dahl, em um modelo de hipertensão arterial, previne o remodelamento cardíaco patológico (Callis, Pandya et al. 2009; Montgomery, Hullinger et al. 2011). Além disso, o miRNA-208 desempenha um papel

importante na manutenção do desenvolvimento e da função cardíaca. Outros estudos demonstraram que em eventos como lesões ao coração esse miRNA pode extravasar para a corrente sanguínea e ser detectado em sangue periférico (Kloosterman, Steiner et al. 2006; Callis, Pandya et al. 2009; Wang, Zhu et al. 2010). Este microRNA tem sido considerado um potente alvo terapêutico a fim modular a função e remodelamento cardíaco durante a progressão da doença.

Já os miRNA-1 e -133 pertencem à mesma unidade transcricional e tem sua expressão reduzida em modelos de murinos e em humanos com hipertrofia cardíaca (Care, Catalucci et al. 2007). Porém, há a necessidade de estudos adicionais para esclarecer e definir claramente o papel desses miRNAs como biomarcadores moleculares e suas influências na hipertrofia cardíaca e IC.

Diversos estudos utilizaram plataformas de micrarranjo para avaliação do perfil global de expressão de microRNAs sob condições clínicas ou experimentais de hipertrofia cardíaca e insuficiência cardíaca (van Rooij, Sutherland et al. 2006; Naga Prasad, Duan et al. 2009). Um destes utilizou dois modelos de hipertrofia cardíaca patológica e IC: camundongos com bandagem da aorta torácica e camundongos transgênicos para superexpressão do gene calcineurina. Os seus resultados mostraram que alguns microRNAs apresentam um perfil semelhante de expressão na hipertrofia ventricular nos dois modelos. Observaram que há um aumento na expressão de miRNA-21, -23, -24, -125b, -195, -199a e -214, e redução na expressão do miRNA-29c, -93, -150 e -181b (van Rooij, Sutherland et al. 2006). Entretanto, ainda no mesmo estudo, os animais que evoluíram para IC apresentaram um aumento na expressão do miRNA-24, -125b, -195, -199a e -214 e nenhuma alteração na expressão do miRNA-21, -27, -29c, -93, -150 e -181b (van Rooij, Sutherland et al. 2006). Com este estudo, foi observado que os miRNAs regulados positivamente, como o miRNA-195, foi capaz de induzir inicialmente hipertrofia cardíaca e depois evoluir para um fenótipo dilatado com diminuição da espessura das paredes, aumento do diâmetro ventricular e déficit na função cardíaca (van Rooij, Sutherland et al. 2006).

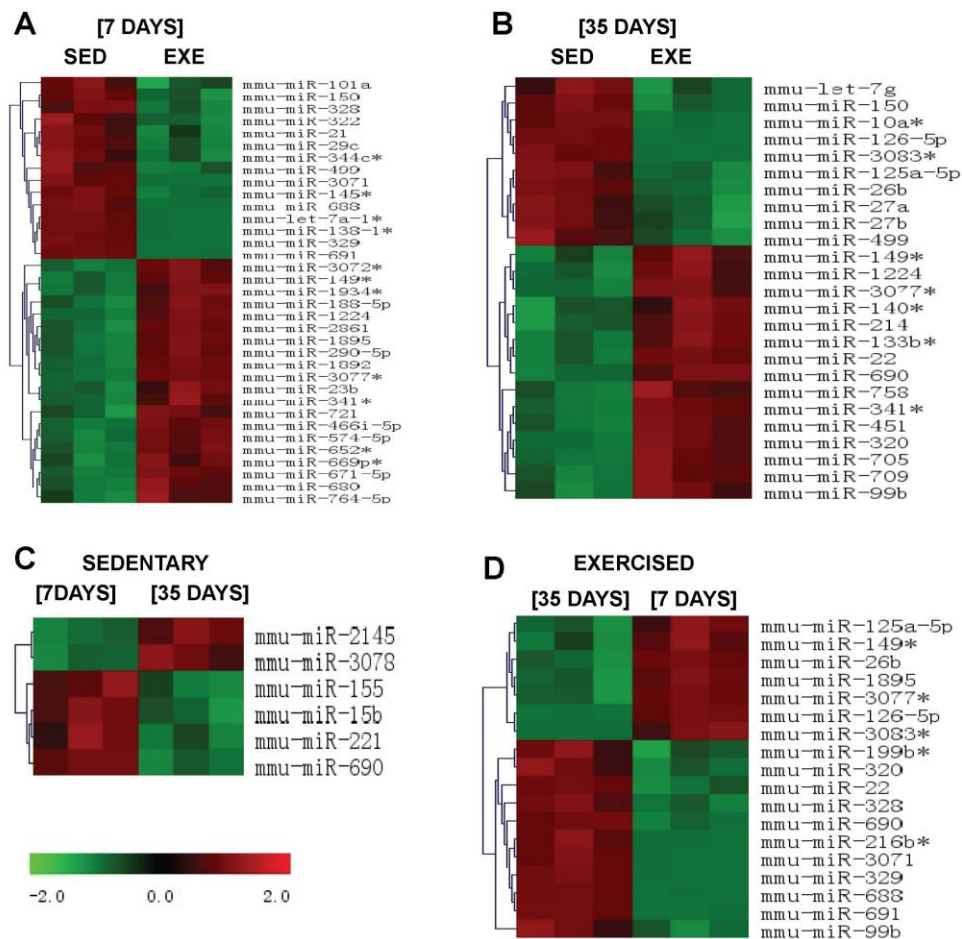
Um estudo do nosso grupo avaliou hipertrofia ventricular esquerda fisiológica em modelo experimental de exercício agudo através da análise de microarranjo. Foi visto que após 7 dias de treinamento, 35 miRNAs estavam

diferentemente expressos nos grupos exercitado e sedentário (Figura 2A), já aos 35 dias havia 25 miRNAs diferentemente expressos (Figura 2B). Vale ressaltar que no grupo exercitado, 7 miRNAs estavam sub expressos após 7 dias e 11 miRNAs super expressos após 35 dias (Figura 2D). Ao validar estes achados por PCR em Tempo Real, verificou-se que os miRNAs -26b, -27a e -143 estavam sub expressos no grupo exercício aos 7 dias e o miRNA-150 super expresso aos 35 dias. Porém ao avaliar os miRNAs -328, -341\*, -680, -1224, miR-21, -195 e -499 não foi observado diferença dos níveis entre os grupos exercitado e sedentário (Martinelli, Cohen et al. 2014).

Além disso, neste mesmo estudo, através de dados de bioinformática (*TargetScan*) verificou-se que principalmente o miRNAs-26b, sub expresso 7 dias após o início dos exercícios, está relacionado a genes de sobrevivência, como o fator de crescimento tipo insulina 1 (IGF-1) e vias gama de subunidades reguladoras PI3K, ambas importantes para a hipertrofia induzida por sobrecarga de pressão. Este estudo elucida a importância de se estudar a expressão dos miRNAs em diferentes momentos do desenvolvimento da hipertrofia fisiológica, não descartando o envolvimento das vias regulatórias da hipertrofia patológica neste processo (Martinelli, Cohen et al. 2014).

A importância dos miRNAs na resposta aos insultos cardíacos fica evidenciada pela sua manipulação em modelos *in vitro* e *in vivo*. A exposição de cardiomiócitos à hipóxia *in vitro* reduz a expressão do miRNA-145. No mesmo sentido, a superexpressão deste miRNA em modelo experimental de infarto do miocárdio protege contra a apoptose do cardiomiócito, diminui tamanho do infarto e melhora a função cardíaca (Xu, Cao et al. 2017).

Outro estudo comparou a expressão global de miRNAs em tecidos cardíacos humanos de corações insuficientes e controle. Esse trabalho demonstrou que oito miRNAs estão significativamente alterados em cardiomiopatia dilatada em relação aos controles. Dentre os mRNAs alterados, houve uma redução na expressão do miRNA-1, -29b, -7 e -378 e aumento da expressão do miRNA-214, -342, -145, -125b e -181b (Naga Prasad, Duan et al. 2009).



**Figura 2:** Análise de microarranjo de miRNAs em camundongos exercitados e sedentários após 7 e 35 dias. Os blocos verdes representam miRNAs sub-expressos e os blocos vermelhos miRNAs super-expressos. (A): comparação grupo sedentário e exercitado aos 7 dias. (B) Comparação sedentários e exercitados aos 35 dias. (C): comparação dos animais sedentários aos 7 dias e 35 dias. (D): comparação dos exercitados aos 7 dias e 35 dias. Todas as comparações,  $p=0,01$ . Fonte: (Martinelli, Cohen et al. 2014).

Estudos mostram que a desregulação dos miRNAs tem um papel importante na insuficiência cardíaca. Sendo que estes podem ser potenciais biomarcadores de diagnóstico e prognóstico de insuficiência cardíaca. Em razão de muitos miRNAs serem tecido específicos, a maioria dos estudos clínicos tem se baseado na mensuração dos níveis de expressão de miRNAs em amostras do tecido de origem. Porém, alguns miRNAs são encontrados na corrente sanguínea e são denominados como miRNAs circulantes ou c-miRNA. Os mecanismos envolvidos na liberação dos miRNAs no sangue permanecem ainda pouco elucidados. O fato de que esses c-miRNAs podem ser detectados em sangue periférico os tornam potencialmente úteis como testes rápidos e

fáceis, auxiliando o diagnóstico ou guiando terapias (Seronde, Vausort et al. 2015; Wong, Armugam et al. 2015).

Um estudo avaliou 12 miRNAs potenciais biomarcadores circulantes de prognóstico em pacientes com IC em duas coortes independentes. Verificaram que o miRNA-1254 e o miRNA-1306-5p em níveis plasmáticos aumentados foram significativamente associados com o risco de morte e hospitalização, e os miRNA-1254, -133b, -633 e o 208a-3p se apresentaram associados com a mortalidade por todas as causas, demonstrando que estes miRNAs podem ser relevantes para elucidar a progressão de IC (Bayes-Genis, Lanfear et al. 2018)

Já o miRNA-132 em níveis plasmáticos reduzidos não está associado com a redução da mortalidade, mas está associado com a gravidade da doença e redução na readmissão hospitalar, este fato foi verificado em 953 pacientes com IC crônica (Masson, Batkai et al. 2018).

Estudo em camundongos mostrou que o nível plasmático de miRNA-208 (miRNA cardio específico) está relacionado com a lesão do miocárdio, sendo detectável após a indução dessa lesão (Ji, Takahashi et al. 2009). Em humanos, os miRNA-1, -133, -208a e -499 foram propostos como bons biomarcadores de infarto agudo do miocárdio, apresentando níveis plasmáticos significativamente mais elevados quando comparados a pacientes sem a condição (Adachi, Nakanishi et al. 2010; Ai, Zhang et al. 2010; Cheng, Tan et al. 2010; D'Alessandra, Devanna et al. 2010; Wang, Zhu et al. 2010).

Os perfis de miRNAs no miocárdio são expressos diferencialmente na dependência da etiologia da insuficiência cardíaca, sugerindo que cada forma etiológica é caracterizada por um perfil de expressão de miRNA distinto (Cheng, Tan et al. 2010). Porém, a necessidade de um procedimento invasivo para obtenção de amostras do miocárdio torna a aplicação clínica dessa abordagem muito limitada. No entanto, uma recente evidência demonstrou que o c-miRNA miRNA-423-5p apresenta uma expressão aumentada durante a insuficiência cardíaca e pode ser usado como um biomarcador (Tijsen, Creemers et al. 2010).

### 2.2.2 miRNA 423-5p e insuficiência cardíaca.

Nos últimos anos, foi observado que muitos miRNAs encontravam-se desregulados em tecidos específicos desempenhando papéis críticos na patogênese e progressão da IC. Durante a hipertrofia cardíaca, parece haver uma troca genética programada que leva a uma reativação de genes cardíacos normalmente expressos em coração fetal durante o desenvolvimento embrionário. Em 2007, observou-se uma semelhança interessante entre o padrão de expressão dos miRNAs de corações de adultos com IC e corações de fetos em 12-14 semanas de gestação. Cerca de 80% dos miRNAs analisados foram encontrados regulados da mesma forma em ambos os corações. As mudanças mais notáveis foram associados a um aumento da expressão de miRNA-21, -29b, -129, -210, -211, -212, -423, e redução da expressão de miRNA-30, -182 e -526 (Thum, Galuppo et al. 2007).

Em 2009, um estudo avaliou o perfil da expressão de miRNAs em pacientes com IC antes e após o tratamento com dispositivos de assistência ventricular esquerda. Observou-se que 71,4% dos miRNAs que estavam alterados na IC foram normalizados após tratamento (Matkovich, Van Booven et al. 2009). Estes resultados sugerem que os miRNAs podem ser úteis como marcadores de recuperação do miocárdio em pacientes com IC avançada.

Além disso, podemos destacar o miRNA-423-5p, que encontra-se em níveis plasmáticos elevados em pacientes com IC quando comparado a indivíduos saudáveis (Goren, Kushnir et al. 2012). Outro estudo também identificou um aumento de seis miRNAs, entre eles o miRNA-423-5p, e sugere que este pode estar associado com o diagnóstico clínico de IC, também por estar associado positivamente com os níveis de BNP plasmático (Tijssen, Creemers et al. 2010), o que também foi observado em pacientes com IC por cardiomiopatia dilatada (Fan, Zhang et al. 2013).

No contexto da IC aguda descompensada, os níveis miRNA-423-5p aumentam entre a admissão hospitalar e a alta do paciente e reduzem após a compensação clínica. Ainda, os pacientes que aumentaram os níveis deste miRNA entre a admissão e a compensação clínica sofreram menos readmissões hospitalares no período de 24 meses. No entanto, níveis reduzidos de miRNA-423-5p pode estar associado à gravidade da IC e com resultados desfavoráveis, como morte, suportando a hipótese de que este

miRNA é um potencial biomarcador de prognóstico da IC aguda descompensada (Schneider, Silvello et al. 2018).

Ainda no contexto agudo, um estudo com 3 coortes independentes, verificou que o miRNA-423-5p, se apresentou em níveis reduzidos em pacientes com IC aguda em comparação com IC crônica. Adicionalmente, através de um painel, incluindo os miRNA-423-5p, let-7i-5p, -18a-5p, -18b-5p, -223-3p, -301a-3p, -652-3p, verificaram que este perfil, em níveis reduzidos, se mostrou preditivo para mortalidade em 180 dias (Ovchinnikova, Schmitter et al. 2016).

Adicionalmente, um estudo verificou se há influência nos níveis de miRNAs pela obesidade em pacientes com IC. Foi visto que a IC independente se o indivíduo é obeso ou não, os níveis de miRNA-423-5p estavam super expressos. Já o miRNA-130b se apresentou reduzido em pacientes magros com IC em comparação aos indivíduos obesos e grupos controle. E o miRNA-221 mostrou tendência a super expressão em indivíduos obesos versus pacientes magros, ambos com IC. Portanto, este estudo reforça o papel do miRNA-423-5p em distinguir pacientes com IC sem influência da obesidade (Thome, Mendoza et al. 2015) .

Em um estudo clínico de nosso laboratório, observamos a presença de um gradiente plasmático transcronário positivo do miRNA-423-5p em paciente com IC, quando em pacientes controle encontramos um gradiente negativo, caracterizando possível origem cardíaca deste biomarcador. Além disso, foi observado que o miRNA-423-5p está correlacionado com os níveis de BNP. Estes achados sugerem que há uma relação da síntese cardíaca deste miRNA com o desenvolvimento da IC (Goldraich, Martinelli et al. 2014).

Esta origem cardíaca também foi sugerida por um estudo que mensurou o miR-423-5p em soro e no fluido pericárdio de pacientes submetidos a cirurgia de revascularização miocárdica (*coronary artery bypass graft*), observando que o miR-423-5p estava mais expresso no fluido pericárdio quando comparado ao soro destes pacientes e que este miR estava elevado no soro apenas em pacientes com angina instável (Miyamoto, Usami et al. 2015). Porém, nenhum estudo experimental até o momento verificou a nível tecidual a expressão do miRNA- 423-5p e ainda qual o período, fase aguda ou crônica, que este é sintetizado após a injúria miocárdica



Entretanto, um estudo ao verificar a influência deste miRNA no remodelamento ventricular esquerdo após infarto agudo do miocárdio, demonstrou que durante um ano de acompanhamento desses indivíduos, o miRNA-423-5p apresentou aumento significativo em 1, 3 e 12 meses após o infarto. Porém, não houve associação dos níveis deste miRNA com o remodelamento do ventrículo esquerdo (diâmetro diastólico final) e correlação com os níveis plasmáticos de BNP (Bauters, Kumarswamy et al. 2013).

Sabe-se que o miRNA-423-5p está associado com alguns processos do metabolismo celular que explicaria o envolvimento dele nos processos patológicos no miocárdio. Um estudo realizado em 2015, demonstrou que o miRNA-423-5p, além de se apresentar em níveis aumentados em pacientes com IC congestiva, induziu a apoptose em cardiomiócitos. O miRNA-423-5p possuiu papel de inibir a expressão de OGT ( $\beta$ -O-linkage of N-acetylglucosamine transferase) que por sua vez reduz p-AMPK e aumenta a atividade de 26S, p53 e caspase-3 que são moléculas participantes do processo apoptótico (Luo, He et al. 2015). Além disso, os mesmos investigadores demonstraram que a expressão do miRNA-423-5p é induzida pela produção de peróxido de hidrogênio e que quando há o silenciamento deste miRNA há inibição da apoptose destes cardiomiócitos e redução da produção peróxido de hidrogênio, sugerindo um potencial alvo terapêutico para doenças associadas com apoptose (Luo and Zhang 2016).

O processo de apoptose induzido pela super expressão do miR-423-5p também foi demonstrado em cardiomioblastos, em modelo *in vitro*, ao adicionar o miR as células perderam a capacidade de proliferação após 48 e 72h e induziu a apoptose. Neste estudo também foi demonstrado o aumento da expressão do miR423-5p plasmático em pacientes com cardiomiopatia dilatada comparado a indivíduos saudáveis (Li, Yu et al. 2016).

Com os estudos apresentados, pode-se observar que há evidências de que o miRNA-423-5p plasmático está em níveis aumentados durante a IC. Seu papel na patogênese da IC, entretanto, ainda é controverso e pouco esclarecido. Com isso, se faz necessário elucidar os mecanismos e os sítios envolvidos no aumento da expressão dos níveis de miRNA-423-5p na patogênese da IC.

### 3 JUSTIFICATIVA

Apesar da evolução da avaliação e manejo dos pacientes com doenças cardiovasculares, os mecanismos relacionados a diferenças individuais na apresentação clínica e nos aspectos fisiopatológicos ainda são pouco compreendidos. Os avanços em genética molecular têm propiciado um crescimento no conhecimento de mecanismos e interações entre genes, ambiente e tecidos. Estas interações podem estar envolvidas na patogênese de condições complexas com a insuficiência cardíaca. No entanto, se faz necessário novas estratégias genéticas para compreender os mecanismos envolvidos na insuficiência cardíaca, a fim de contribuir no desenvolvimento de novas estratégias de prevenção, diagnóstico, tratamento e prognóstico.

Neste contexto, os miRNAs vêm se tornando uma ferramenta genética promissora. O microRNA-423-5p se destaca entre os microRNAs observados, por apresentar níveis plasmáticos elevados de forma consistente no contexto da IC, achado demonstrado por diversos pesquisadores (Goren, Kushnir et al. 2012); (Tijsen, Creemers et al. 2010; Fan, Zhang et al. 2013) (Ovchinnikova, Schmitter et al. 2016) e por nosso grupo de investigação (Goldraich, Martinelli et al. 2014) (Thome, Mendoza et al. 2015); (Schneider, Silvello et al. 2018). A compreensão dos mecanismos envolvidos na expressão deste microRNA, a localização de sua síntese e seu papel no desenvolvimento da doença, podem auxiliar no entendimento da patogênese da insuficiência cardíaca. Até o presente momento, entretanto, nenhum estudo experimental se propôs a avaliar a expressão tecidual e plasmática do miRNA-423-5p no contexto da lesão isquêmica miocárdica.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão do miRNA-423-5p em ratos Wistar submetidos ao modelo de remodelamento cardíaco após insulto isquêmico.

### 4.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão do miRNA-423-5p antes, 1 dia, 7 dias, 28 dias e 90 dias após cirurgia de modelo de insuficiência cardíaca em ratos Wistar.
- Identificar o sítio de produção do miRNA-423-5p através da análise da circulante em sangue venoso, arterial e análises no ventrículo esquerdo e músculo gastrocnêmio.
- Avaliar a correlação do miRNA-423-5p com parâmetros de remodelamento cardíaco obtidos por ultrassom e níveis plasmáticos de peptídeo natriurético cerebral (BNP).

## 5 REFERENCIAS DA REVISÃO DE LITERATURA

Adachi, T., M. Nakanishi, et al. (2010). "Plasma microRNA 499 as a biomarker of acute myocardial infarction." Clin Chem 56(7): 1183-1185.

Ai, J., R. Zhang, et al. (2010). "Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction." Biochem Biophys Res Commun 391(1): 73-77.

Alexander, R. P., G. Fang, et al. (2010). "Annotating non-coding regions of the genome." Nat Rev Genet 11(8): 559-571.

Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." Cell 116(2): 281-297.

Bauters, C., R. Kumarswamy, et al. (2013). "Circulating miR-133a and miR-423-5p fail as biomarkers for left ventricular remodeling after myocardial infarction." Int J Cardiol 168(3): 1837-1840.

Bayes-Genis, A., D. E. Lanfear, et al. (2018). "Prognostic value of circulating microRNAs on heart failure-related morbidity and mortality in two large diverse cohorts of general heart failure patients." Eur J Heart Fail 20(1): 67-75.

Beuvink, I., F. A. Kolb, et al. (2007). "A novel microarray approach reveals new tissue-specific signatures of known and predicted mammalian microRNAs." Nucleic Acids Res 35(7): e52.

Bocchi, E. A., F. G. Braga, et al. (2009). "[III Brazilian Guidelines on Chronic Heart Failure]." Arq Bras Cardiol 93(1 Suppl 1): 3-70.

Bonow, R. O., D. L. Mann, et al., Eds. (2012). Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine, Elsevier Saunders.

Braunwald, E. (2008). "Biomarkers in heart failure." N Engl J Med 358(20): 2148-2159.

Brown, J. R. and S. S. Gottlieb (2012). "Acute decompensated heart failure." Cardiol Clin 30(4): 665-671.

Burchfield, J. S., M. Xie, et al. (2013). "Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2." Circulation 128(4): 388-400.

Bushati, N. and S. M. Cohen (2007). "microRNA functions." Annu Rev Cell Dev Biol 23: 175-205.

Callis, T. E., K. Pandya, et al. (2009). "MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice." J Clin Invest 119(9): 2772-2786.

Care, A., D. Catalucci, et al. (2007). "MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy." Nat Med 13(5): 613-618.

Chatterjee, K. (2012). "Pathophysiology of systolic and diastolic heart failure." Med Clin North Am 96(5): 891-899.

Cheng, Y., N. Tan, et al. (2010). "A translational study of circulating cell-free microRNA-1 in acute myocardial infarction." Clin Sci (Lond) 119(2): 87-95.

Chowdhury, P., D. Kehl, et al. (2013). "The use of biomarkers in the patient with heart failure." Curr Cardiol Rep 15(6): 372.

Ciapponi, A., A. Alcaraz, et al. (2016). "Burden of Heart Failure in Latin America: A Systematic Review and Meta-analysis." Rev Esp Cardiol (Engl Ed) 69(11): 1051-1060.

Creemers, E. E., A. J. Tijssen, et al. (2012). "Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease?" Circ Res 110(3): 483-495.

D'Alessandra, Y., P. Devanna, et al. (2010). "Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction." Eur Heart J 31(22): 2765-2773.

Datasus. (2016). "Informações de Saúde - Tabnet." Retrieved Junho, 2018, from <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sim/cnv/obt10uf.def>.

de Gonzalo-Calvo, D., E. Iglesias-Gutierrez, et al. (2017). "Epigenetic Biomarkers and Cardiovascular Disease: Circulating MicroRNAs." Rev Esp Cardiol (Engl Ed) 70(9): 763-769.

Dickstein, K., A. Cohen-Solal, et al. (2008). "ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM)." Eur Heart J 29(19): 2388-2442.

Duygu, B., L. J. de Windt, et al. (2016). "Targeting microRNAs in heart failure." Trends Cardiovasc Med 26(2): 99-110.

Esteller, M. (2011). "Non-coding RNAs in human disease." Nat Rev Genet 12(12): 861-874.

Fan, K. L., H. F. Zhang, et al. (2013). "Circulating microRNAs levels in Chinese heart failure patients caused by dilated cardiomyopathy." Indian Heart J 65(1): 12-16.

Friedman, R. C., K. K. Farh, et al. (2009). "Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs." Genome Res 19(1): 92-105.

Givertz, M. M., J. R. Teerlink, et al. (2013). "Acute decompensated heart failure: update on new and emerging evidence and directions for future research." J Card Fail 19(6): 371-389.

Go, A. S., D. Mozaffarian, et al. (2013). Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. Circulation. 127: e6-e245.

Goldraich, L. A., N. C. Martinelli, et al. (2014). "Transcoronary gradient of plasma microRNA 423-5p in heart failure: evidence of altered myocardial expression." Biomarkers 19(2): 135-141.

Goren, Y., M. Kushnir, et al. (2012). "Serum levels of microRNAs in patients with heart failure." Eur J Heart Fail 14(2): 147-154.

Hasenfuss, G. (1998). "Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy." Cardiovasc Res 39(1): 60-76.

He, L. and G. J. Hannon (2004). "MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation." Nat Rev Genet 5(7): 522-531.

Ji, X., R. Takahashi, et al. (2009). "Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury." Clin Chem 55(11): 1944-1949.

Johnson, F. L. (2014). "Pathophysiology and etiology of heart failure." Cardiol Clin 32(1): 9-19, vii.

Kloosterman, W. P., F. A. Steiner, et al. (2006). "Cloning and expression of new microRNAs from zebrafish." Nucleic Acids Res 34(9): 2558-2569.

Kumarswamy, R. and T. Thum (2013). "Non-coding RNAs in cardiac remodeling and heart failure." Circ Res 113(6): 676-689.

Lee, Y., M. Kim, et al. (2004). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." EMBO J 23(20): 4051-4060.

Li, Q., Q. Yu, et al. (2016). "MiR-423-5p inhibits human cardiomyoblast proliferation and induces cell apoptosis by targeting Gab 1." International Journal of Clinical and Experimental Pathology 9(9): 8953-8962.

Liew, C. C. and V. J. Dzau (2004). "Molecular genetics and genomics of heart failure." Nat Rev Genet 5(11): 811-825.

Lloyd-Jones, D., R. J. Adams, et al. (2010). "Heart disease and stroke statistics-2010 update: a report from the American Heart Association." Circulation 121(7): e46-e215.

Luo, P., T. He, et al. (2015). "MicroRNA-423-5p targets O-GlcNAc transferase to induce apoptosis in cardiomyocytes." Mol Med Rep 12(1): 1163-1168.

Luo, P. and W. Zhang (2016). "MicroRNA4235p mediates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>induced apoptosis in cardiomyocytes through OGlcNAc transferase." Mol Med Rep 14(1): 857-864.

Magnussen, C. and S. Blankenberg (2018). "Biomarkers for heart failure: small molecules with high clinical relevance." J Intern Med.

Malta, D. C., O. L. M. Neto, et al. (2011). "Presentation of the Strategic Action Plan for Coping with Chronic Diseases in Brazil from 2011 to 2022." Epidemiol. Serv. Saúde 20(4): 14.

Mann, D. L. (1999). "Mechanisms and models in heart failure: A combinatorial approach." Circulation 100(9): 999-1008.

Martinelli, N. C., C. R. Cohen, et al. (2014). "An analysis of the global expression of microRNAs in an experimental model of physiological left ventricular hypertrophy." PLoS One 9(4): e93271.

Masson, S., S. Batkai, et al. (2018). "Circulating microRNA-132 levels improve risk prediction for heart failure hospitalization in patients with chronic heart failure." Eur J Heart Fail 20(1): 78-85.

Matkovich, S. J., D. J. Van Booven, et al. (2009). "Reciprocal regulation of myocardial microRNAs and messenger RNA in human cardiomyopathy and reversal of the microRNA signature by biomechanical support." Circulation 119(9): 1263-1271.

Matkovich, S. J., W. Wang, et al. (2010). "MicroRNA-133a protects against myocardial fibrosis and modulates electrical repolarization without affecting hypertrophy in pressure-overloaded adult hearts." Circ Res 106(1): 166-175.

McMurray, J. J. (2010). "Clinical practice. Systolic heart failure." N Engl J Med 362(3): 228-238.

McMurray, J. J., S. Adamopoulos, et al. (2012). "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 14(8): 803-869.

Mercer, T. R., M. E. Dinger, et al. (2009). "Long non-coding RNAs: insights into functions." Nat Rev Genet 10(3): 155-159.

miRBase. (2018). "miRBase: the microRNA database." from <http://www.mirbase.org/cgi-bin/browse.pl?org=hsa>.

Miyamoto, S., S. Usami, et al. (2015). "Expression Patterns of miRNA-423-5p in the Serum and Pericardial Fluid in Patients Undergoing Cardiac Surgery." PLoS One 10(11): e0142904.

Montgomery, R. L., T. G. Hullinger, et al. (2011). "Therapeutic inhibition of miR-208a improves cardiac function and survival during heart failure." Circulation 124(14): 1537-1547.

Naga Prasad, S. V., Z. H. Duan, et al. (2009). "Unique microRNA profile in end-stage heart failure indicates alterations in specific cardiovascular signaling networks." J Biol Chem 284(40): 27487-27499.

Oliveira-Carvalho, V., M. M. da Silva, et al. (2013). "MicroRNAs: new players in heart failure." Mol Biol Rep 40(3): 2663-2670.

Ovchinnikova, E. S., D. Schmitter, et al. (2016). "Signature of circulating microRNAs in patients with acute heart failure." Eur J Heart Fail 18(4): 414-423.

Rathi, S. and P. C. Deedwania (2012). "The epidemiology and pathophysiology of heart failure." Med Clin North Am 96(5): 881-890.

Sayed, D., C. Hong, et al. (2007). "MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy." Circ Res 100(3): 416-424.

Schneider, S., D. Silvello, et al. (2018). "Plasma levels of microRNA-21, -126 and -423-5p alter during clinical improvement and are associated with the prognosis of acute heart failure." Mol Med Rep.

Schneider, S., D. Silvello, et al. (2018). "Plasma levels of microRNA-21, -126 and -423-5p alter during clinical improvement and are associated with the prognosis of acute heart failure." Mol Med Rep 17(3): 4736-4746.

Seronde, M. F., M. Vausort, et al. (2015). "Circulating microRNAs and Outcome in Patients with Acute Heart Failure." PLoS One 10(11): e0142237.

Seto, A. G. and E. van Rooij (2012). "Circulating microRNAs to identify human heart failure." Eur J Heart Fail 14(2): 118-119.



- Tanai, E. and S. Frantz (2015). "Pathophysiology of Heart Failure." Compr Physiol 6(1): 187-214.
- Taylor, J. (2010). "Cardiology in Brazil: a country in development." Eur Heart J 31(13): 1541-1542.
- Tetreault, N. and V. De Guire (2013). "miRNAs: their discovery, biogenesis and mechanism of action." Clin Biochem 46(10-11): 842-845.
- Thomé, J. G. (2014). Relação entre microRNAs e obesidade em pacientes com insuficiência cardíaca crônica. Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Mestrado: 62.
- Thome, J. G., M. R. Mendoza, et al. (2015). "Circulating microRNAs in obese and lean heart failure patients: A case-control study with computational target prediction analysis." Gene 574(1): 1-10.
- Thum, T., P. Galuppo, et al. (2007). "MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure." Circulation 116(3): 258-267.
- Tijssen, A. J., E. E. Creemers, et al. (2010). "MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure." Circ Res 106(6): 1035-1039.
- Townley-Tilson, W. H., T. E. Callis, et al. (2010). "MicroRNAs 1, 133, and 206: critical factors of skeletal and cardiac muscle development, function, and disease." Int J Biochem Cell Biol 42(8): 1252-1255.
- van Rooij, E., L. B. Sutherland, et al. (2006). "A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure." Proc Natl Acad Sci U S A 103(48): 18255-18260.
- Wang, G. K., J. Q. Zhu, et al. (2010). "Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans." Eur Heart J 31(6): 659-666.
- Wang, N., Z. Zhou, et al. (2009). "Role of microRNAs in cardiac hypertrophy and heart failure." IUBMB Life 61(6): 566-571.
- WHO. (2017). "World Health Organization - Cardiovascular diseases (CVDs)." Retrieved 03.23, 2018.
- Wong, L. L., A. Armugam, et al. (2015). "Circulating microRNAs in heart failure with reduced and preserved left ventricular ejection fraction." Eur J Heart Fail 17(4): 393-404.

Xu, H., H. Cao, et al. (2017). "Overexpression of microRNA-145 protects against rat myocardial infarction through targeting PDCD4." Am J Transl Res 9(11): 5003-5011.

Yan, H., F. Ma, et al. (2017). "miRNAs as biomarkers for diagnosis of heart failure: A systematic review and meta-analysis." Medicine (Baltimore) 96(22): e6825.

Zhou, S. L., J. Zhang, et al. (2018). "Diagnostic accuracy of natriuretic peptides for acute heart failure: a review." Eur Rev Med Pharmacol Sci 22(8): 2415-2420.

## 6 ARTIGO ORIGINAL

### Original Article

#### **Temporal Profile of MicroRNA 423-5p in an Experimental Model of Acute Myocardial Infarction**

Niara da Silva Medeiros<sup>1,3</sup>, Juliana Ranjel<sup>1,3</sup>, Alessandra G. Machado<sup>1,3</sup>,  
Daniel Sturza<sup>1</sup>, Fernanda Curuja<sup>1</sup>, Michael Andrades<sup>1,3</sup>, Luis Eduardo  
Rohde<sup>1,2,3</sup>

From the (1) Cardiovascular Research Laboratory, Experimental Research Center, (2) Cardiovascular Division from Hospital de Clinicas de Porto Alegre, and (3) the Post-Graduate Program in Cardiovascular Science and Cardiology, Medical School, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

#### **Address for correspondence:**

Luis E. Rohde

Cardiovascular Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350, 2nd floor, room 2060

## ABSTRACT

**Background.** Previous studies have demonstrated that microRNAs (miRs) participated in the pathogenesis of several heart diseases. In particular, levels of miR-423-5p are consistently increased in heart failure outpatients. No study, however, evaluated the cardiac expression of miR-423-5p in experimental models of left ventricular remodeling. **Methods and Results.** 12-week-old male Wistar rats underwent surgical ligation of the anterior descending artery or a sham procedure. Follow-up was at days 1, 7, 28 and 90 with 2-dimensional echocardiography and tissue harvesting for subsequent miRNA isolation and quantitative real time PCR. Analysis was performed at the remote (REM), peri-infarcted (PERI) and infarcted (INF) segments of the left ventricle (LV) and in the gastrocnemius muscle (GM). Mean infarcted area in AMI groups ranged from 31.5 to 39.7%. miR-423-5p expression was initially down-regulated after an AMI, depicting a progressive increase of expression after days 1 and 7. At the REM area, miR-423-5p expression increased in the AMI group from day 7 to day 28 ( $p=0.023$ ), with a significant group\*time interaction ( $p=0.007$ ). At the INF segment, we also observed a recovery of miR-423-5p expression from day 7 to day 90 ( $p \leq 0.01$ ) and a significant positive correlation between miR-423-5p levels with the percentage of akinetic/hypokinetic LV area. The larger the size of the infarct area, the greater the amount of miR-423-5p was expressed ( $r=0.754$ ;  $p=0.031$ ). In addition, there was a weak to moderate inverse association of the amount of miR-423-5p and LV ejection fraction. **Conclusion.** There are significant temporal variations of cardiac tissue expression of miR-423-5p in an experimental model of AMI that might be in part related to the magnitude of the infarct area.

## INTRODUCTION

Left ventricular (LV) remodeling is a complex and intricate process that involves the cardiomyocyte and the extracellular compartment usually triggered by an injury to the heart (1, 2). Ischemic events such as acute myocardial infarctions (AMI) are the most common type of such injury and if not properly treated might evolve to heart failure (HF), a prevalent clinical syndrome worldwide that has a morbid prognosis (3). In this scenario, biomarkers represent essential clinical tools that might help diagnosis, prognostication and treatment planning of the LV remodeling process and, ultimately, of the HF syndrome. Brain natriuretic peptides (BNP) are the most commonly used biomarkers for this purpose, as they have been extensively validated in prospective studies (4, 5). However, there is growing interest in the investigation of other biomarkers for HF. MicroRNAs (miRNAs) have emerged recently as new marker of disease pathogenesis that might potentially add novel clinical value and discrimination to traditional biomarkers (1).

MiRNAs are small non-coding ribonucleic acids (RNAs) that have a length of 19 to 25 nucleotides, act as molecular switches of gene expression and are known to regulate complex diseases signaling (6). Studies investigating the role of miRNAs in the development of HF (6-8) suggest that serum levels of the miR-21, -22, -92b, -126, -208b, -320a, -423-5p and miR-499 are elevated in HF patients and correlate with prognostic parameters (7, 8).

Previous studies have consistently demonstrated that serum levels of miR-423-5p are increased in HF patients and positively correlated with natriuretic peptide levels (9, 10). Tijssen et al suggested that levels of miR-423-5p might be used as a marker to differentiate HF patients from healthy controls

(9). We have previously demonstrated that the difference in transcortical gradients between HF outpatients and controls suggests that miR-423-5p has a cardiac origin (11). No study, however, have demonstrated in experimental models of LV remodeling the tissue production of miR-423-5p and its temporal profile. The aim of the present study was to define and evaluate the expression of miR-423-5p in rats submitted to a myocardial infarction (MI) model in different time-points and to identify the location of its synthesis.

## METHODS

### Animals

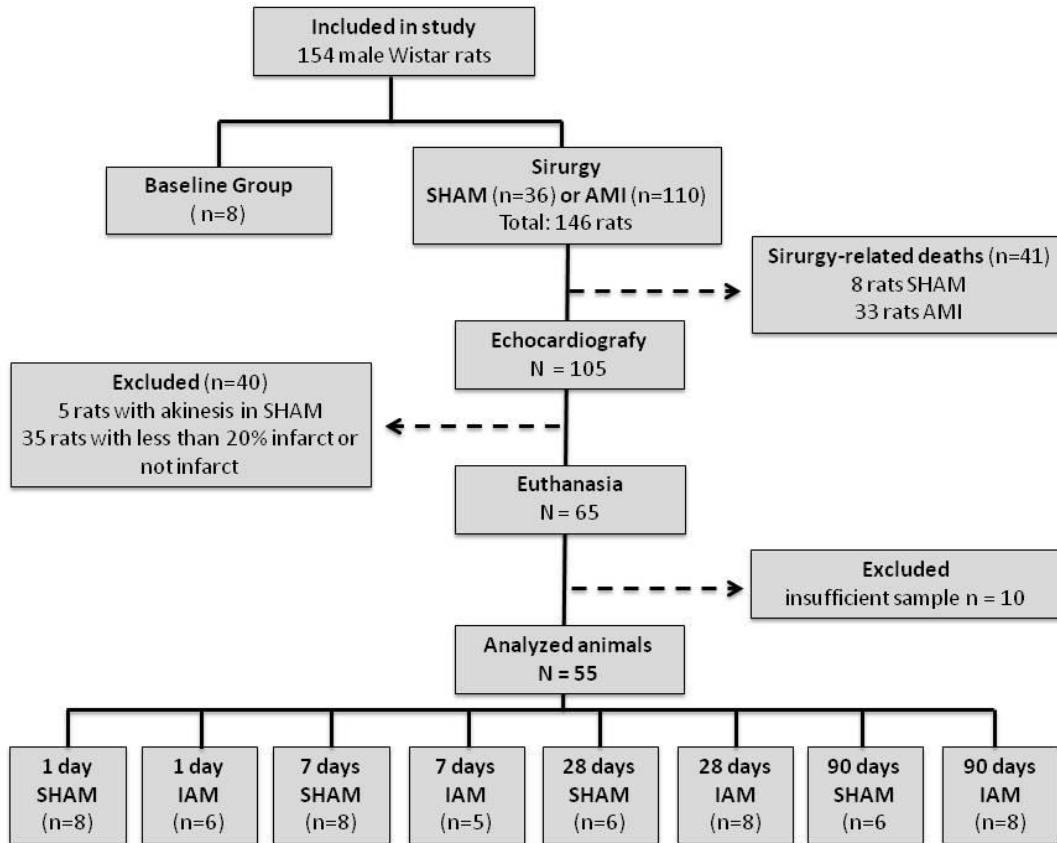
This study involved 12-week-old male Wistar rats (n=154). Animals were divided in 9 groups according to the follow-up time after surgery (baseline, days 1,7,28 and 90) and type of surgery (acute myocardial infarction [AMI] or SHAM surgery). Thus, animals were randomized (Winpepi Program for Windows) to 1-day SHAM, 1-day AMI, 7-days SHAM, 7-days AMI, 28-days SHAM, 28-days AMI, 90-days SHAM, 90-days AMI and baseline group (Figure 1). Randomization was performed creating an aleatory list of numbers and the respective group definition for each animal.

All animals were kept in a vivarium with food and water *ad libitum* and light/dark cycles of 12:12h, at 22±2°C, in the Experimentation Animal Unit at Hospital de Clínicas de Porto Alegre. This study was approved by Ethics Committee on Animal Research of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (protocol number 15-0220) and followed the ARRIVE protocol (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) (12). All research procedures

(echocardiogram, tissue/blood and qPCR analysis) and operators/technicians were blinded to group assignment.

### **Surgical Procedures**

After randomization, the animals were weighed and anesthetized intraperitoneally with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). After attesting the adequate effect of anesthesia, animals were placed in dorsal decubitus and intubated for mechanical ventilation (Harvard Inspira Advanced Safety Ventilador Manual, 55-7058) with 88 breaths/minutes, 2 mL of volume, and supplemented O<sub>2</sub>. A small surgical incision was then made in the chest and the pectoral muscles were deviated using a retractor between the ribs to allow a better visualization of the heart. The pericardium was broken away; the left atrium appendix was deviated to visualize the left anterior descending coronary artery, which was occluded with a mononylon 6.0 thread. After ligation of the coronary artery, the thoracic incision was closed using a mononylon 5.0 thread; residual pneumothorax was drained through air suction with a 10-mL syringe. Analgesic was given (bupivacaine 1 mg/kg, intramuscular), and animals were removed from mechanical ventilation and placed in a heated environment with enriched O<sub>2</sub> for recovery (13). Intraperitoneal Tramal® 5mg/kg every 12 hours was administered for 2 days. The procedure has a trans- and postsurgical mortality of approximately 25% in our laboratory. Control animals (SHAM) underwent the same surgical procedure without artery occlusion.



**Figure 1:** Flow diagram of the study protocol. AMI: acute myocardium infarction; SHAM: Animals without AMI.

## Echocardiogram

Echocardiographic images were collected at basal group, 1, 7, 28 and 90 days after AMI by an operator blinded to group assignment. Animals were anesthetized with 1.5–2.5% of isoflurane, shaved and placed in the left lateral position (45° angle). We used a commercially available echocardiography equipment (Philips Systems - HD-7, Andover, MA, USA) with a 12-3 MHz transducer and a depth of 2 cm in the longitudinal and transverse axis. The linear measurements taken from images obtained by M-mode were left ventricular (LV) diameters at end-diastole (LVDD) and end-systole (LVSD). The ejection fraction (EF) was calculated by the cube method ( $LVEF = \frac{\text{diastolic}}{\text{systolic}}$ )



ventricular volume)<sup>3</sup> –(systolic ventricular volume)<sup>3</sup> /(diastolic ventricular volume)<sup>3</sup> ×100), and the LV fractional shortening (FS) was calculated as (diastolic ventricular diameter–systolic ventricular diameter)/diastolic ventricular diameter (14). The extent of the myocardium infarction (%MI) was evaluated by measuring the length of the akinetic and/or hypokinetic regions (AHR) of the ventricular walls in 3 transverse sections of the LV (edge of the mitral valve leaflets, papillary muscles and apical section) and expressed as the percentage of the total endocardial contour (EC), using the formula: %MI = (AHR / EC) × 100 (15).

### **Blood samples and tissues collection**

After echocardiogram, all the animals were anesthetized by ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10mg/kg). We collected heparinized (25 U/mL) bloods samples (2 mL) from the retro-orbital plexus by capillary puncture, while the abdominal aorta artery and the right atrium samples by syringe puncture. Blood samples were centrifuged at 1000xg for 10 min and the plasma was collected and stored at -80°C for subsequent qPCR analyzes; the retro-orbital plasma was used for brain natriuretic peptide (BNP) analyses.

After bloods collection, the chest was opened with a scalpel for cardiac tissue sampling, and the animals were euthanized by cardiac exsanguination. The heart was removed and immediately placed in ice-cold saline (NaCl 0.9%) for cleaning. The right and left atriums and the right ventricle were separated, and the left ventricle was divided in 3 sections: remote area (interventricular septum) (REM), peri-infarct area (area around the infarcted segment) (PERI) and infarcted area (INF). We also collected tissue from the gastrocnemius muscle (GM) as a peripheral control. Tissue samples were kept with a RNA

Later® solution (Qiagen, USA, Lot. 151042295), 10 µL per 1 mg tissue, for 24 hours under refrigeration (4°C). After this time, the solution was removed and the tissues were stored at -80°C.

### **Brain Natriuretic Peptide (BNP) plasma detection**

BNP was measured in the venous plasma (retro-orbital plexus) in all groups in duplicate by Rat BNP (Brain Natriuretic Peptide) ELISA Kit (Elabscience®, Cat. E-EL-R0126) and read in SpectraMax® M3 Multi-Mode Microplate Reader Instrument at 450nm.

### **miRNA isolation and Quantitative Real Time PCR (qPCR)**

Tissue and plasma miRNA extraction was performed using the ReliaPrep™ miRNA cell and tissue Mini Prep System (Promega, USA, Lot. 19533), according to manufacturer's instructions (for extraction in plasma, we did not use cell lysis buffer). The concentration of RNA was determined by a NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Nano-Drop Tech., DE, Thermo Scientific™). The reverse transcription (RT) reactions were run in a Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Inc., USA) according to manufacturer instructions of GoScript™ Reverse Transcription Mix (Promega, USA, Lot. 250355). miRNA qPCR reactions were run in duplicate with a QuantStudio™3 Real-Time PCR Systems (Thermo Fisher) using the protocol GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega, USA, Lot. 226789). The specific primers used were rno-miR-423\* (Assay ID: 465126\_mat), U6 snRNA (Assay ID: 001973) and cel-miR-39 (Assay ID: 00200) from TaqMan™ microRNA Assays (Applied Biosystems) following to the manufacturers' protocol. All analyses were normalized for an endogenous control (U6 snRNA) for tissue samples. Following protein denaturation, 50 pM synthetic miR-39 from

*Caenorhabditis elegans* (cel-miR-39; Qiagen, Inc., Valencia, CA, USA) was spiked in (fixed volume of 5µL) to plasma samples to control for technical variations throughout the RNA isolation and quantitative procedures. Plasma samples were treated with heparinase (0.1 U/µg of RNA) prior to microRNA extraction to limit interference with the qPCR reaction (16, 17). The expression levels for the miR-423-5p was estimated using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method (18) and expressed by fold-change.

### **Statistical analysis**

All variables were tested for normality and homogeneity by the Shapiro-Wilk Test and Levine Test, respectively. For variables with normal distribution data were analyzed using Pearson correlation coefficients, one-way and two-way ANOVA. For variables with non-normal distribution, we used logarithm (Log) transformation. If the variables remained non-normal or non-homogeneous, we used non-parametric tests, such as the Spearman correlation coefficient and the Kruskal-Wallis test. Variables were expressed as mean  $\pm$  standard deviation or median and interquartile range. All the analyses were performed using SPSS version 21.0 for Windows and p value lower than 0.05 was considered statistically significant.

## **RESULTS**

### **Echocardiogram analysis**

As expected, we observed that the end-systolic and end-diastolic diameters increased at days 1, 7, 28 and 90 in the animals that underwent experimental AMI, compared to the baseline group and the respective SHAM groups (Table 1). Left ventricular ejection fraction and fractional shortening in all AMI groups were decreased when compared to baseline and SHAM groups. In

Table 1 we can also observe that there was no significant difference in the mean infarcted area in AMI groups. The homogeneity in infarct size is important to compare miR-423-5p expression and behavior in different time groups.

**Table 1:** Echocardiogram data at baseline, 1, 7, 28 and 90 days after AMI or SHAM surgery.

Groups	LVSD (cm)	LVDD (cm)	LV Ejection Fraction (%)	Fractional shorting	Infarcted Area (%)
Baseline	0.34 (0.28-0.40)	0.71 (0.64-0.76)	86.5 (84.9-90.5)	51.8±6.33	0
1 day SHAM	0.34 (0.33-0.35)	0.75 (0.65-0.77)	89.6 (86.7-91.0)	53.2±4.2	0
1 day AMI	0.64 (0.47-0.66)*	0.78 (0.67-0.82)	51.3 (41.9-67.0)*	22.6±7.8*	36.7±11.4
7 days SHAM	0.41 (0.30-0.44)	0.79 (0.68-0.83)	85.4 (83.6-90.3)	50.0±6.3	0
7 days AMI	0.63 (0.58-0.70)*	0.85 (0.75-0.88) *	53.5 (46.2-59.8)*	21.4±6.2*	39.7±7.6
28 days SHAM	0.39 (0.34-0.44)	0.77 (0.72-0.81)	86.7 (82.8-90.5)	50.3±7.3	0
28 days AMI	0.80 (0.51-0.83)*	0.93 (0.78-1.01) *	55.2 (44.8-75.7)*	26.7±9.9*	31.5±15.7
90 days SHAM	0.42 (0.39-0.46)	0.81 (0.76-0.85)	84.1 (81.7-87.0)	46.6±3.3	0
90 days AMI	0.71 (0.64-0.81)*	0.94 (0.92-0.98) *	55.0 (46.1-67.1)*	25.5±8.7*	34.3±10.7

Values expressed as median (25th-75th percentiles) or mean ± standard deviation.

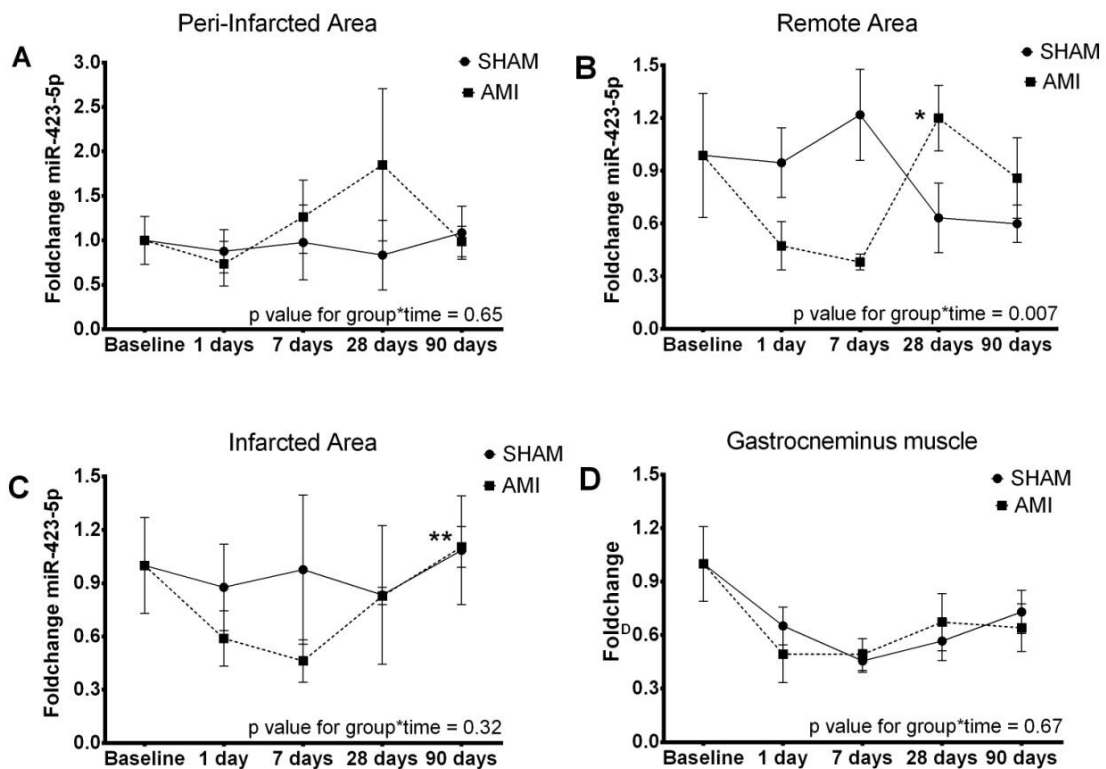
LVSD: diameter at end-systole; LVDD: diameter at end-diastole; AMI: Acute myocardium infarction.

\* p value < 0.05 compared to baseline values and SHAM group

### Tissue miR- 423-5p levels

According to our protocol, miR-423-5p expression was evaluated in the cardiac tissue in the peri-infarcted (PERI), infarcted (INF) and remote (REM) areas and in a peripheral tissue (gastrocnemius muscle). Overall, we can observe that miR-423-5p expression was initially down-regulated after an AMI, depicting a progressive increase of expression after days 1 and 7. At the PERI area (figure 2A), there was a non-significant trend to increase from day 1 to day 28 in miR-423-5p expression in the infarcted animals, but no difference between

groups or interaction between time and groups. At the REM area (figure 2B), we observed that miR-423-5p expression increased in the AMI group from day 7 to day 28 ( $p=0.023$ ), with a significant group and time interaction ( $p=0.007$ ). At the INF segment, we also observed a recovery of miR-423-5p expression from day 7 to day 90 ( $p \leq 0.01$ ), but no significant interaction between time and groups (figure 2C). There was no significant differences in the levels of miR-423-5p in the gastrocnemius muscle between groups over time (figure 2D).



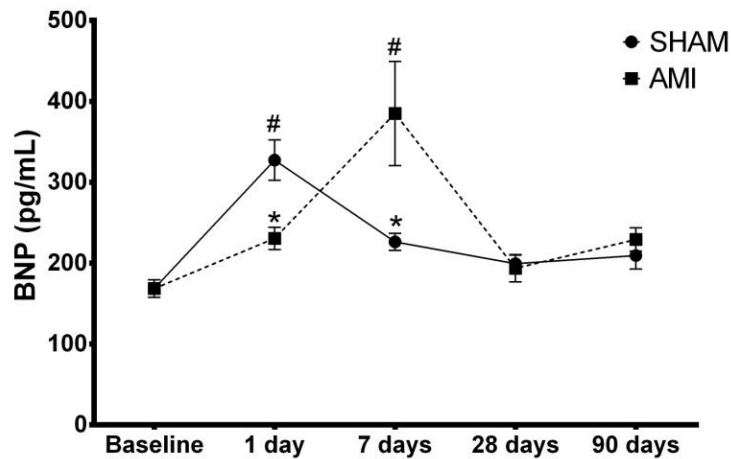
**Figure 2:** Expression levels of miR-423-5p in the cardiac tissues and gastrocnemius muscle in rats submitted to experimental myocardial infarction (AMI) or sham procedure (SHAM) at different time points.

\*  $p = 0.013$  from day 7 to day 28 in the AMI group.

\*\*  $p < 0.002$  from day 7 to day 90 in the AMI group.

### Brain natriuretic peptide (BNP) in plasma

Figure 3 illustrate BNP levels at different time points in both groups. SHAM procedure induced a transient increase in BNP levels only at day 1, probably related to injury caused by the heart manipulation. BNP levels progressively increased up to day 7 in the AMI group and decreased later, suggesting that animals that survived the procedure do not develop long-standing heart failure.



**Figure 3:** Plasmatic brain peptide natriuretic (BNP) in rats submitted to experimental myocardial infarction (AMI) or sham procedure (SHAM) at different time points.

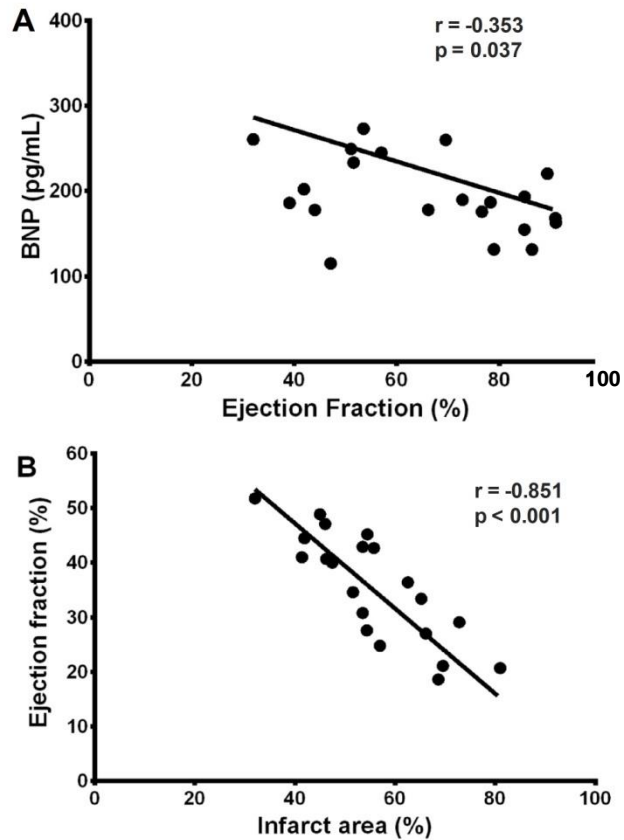
\*  $p < 0.001$  between the sham and IAM groups.

#  $p = 0.003$  difference from baseline within the group.

### Correlations among LV remodeling, miR-423-5p and BNP levels

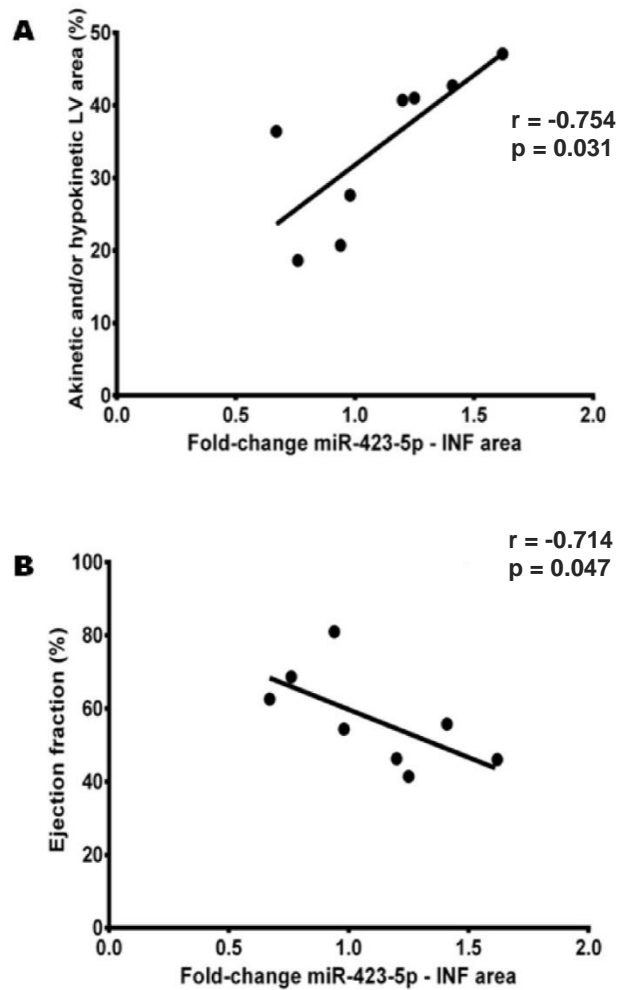
As expected, LV ejection fraction was negatively correlated to LV systolic dimension ( $r = -0.89$ ;  $P < 0.001$ ) and to the percentage of the akinetic area defined by echocardiography ( $r = -0.85$ ;  $P < 0.001$ ; Figure 4B). We also observed a significant negative association between BNP levels and LV ejection fraction ( $r = -0.35$ ;  $p = 0.037$ ; Figure 4A). In AMI groups, we observed a negative correlation between BNP and miR-423-5p levels in the REM area ( $r = -0.386$ ,

p=0.04), but no significant association in other areas (PERI  $r=0.33$ ,  $p=0.052$ , INF ( $r=-0.02$ ,  $p=0.91$ ) and gastrocnemius muscle ( $r=0.19$ ,  $p=0.09$ )) (Suppl. 2).



**Figure 4:** Correlations between echocardiogram data and BNP levels in the AMI group.

Figure 5 illustrates the association of miR-423-5p levels and LV remodeling parameters at the final time point (90 days after coronary ligation). At the INF area we observed a significant positive correlation between miR-423-5p levels with the percentage of akinetic/hypokinetic LV area (Figure 5A). The larger the size of the infarct area, the greater the amount of miR-423-5p was expressed ( $r=0.754$ ;  $p=0.031$ ). In addition, there was an inverse association of the amount of miR-423-5p and LV ejection fraction (Figure 5B).



**Figure 5:** Correlations between echocardiogram data and miR-423-5p levels in cardiac tissues 90 days after the surgery. INF: infarct area.

### Plasmatic miR-423-5p levels

We were unable to detect levels of circulating miRNA 423-5p both at arterial and venous plasma. This data suggest that there is no or very little miR-423-5p circulating levels after an experimental AMI in rats. We can highlight that all positive controls of the qPCR technique were performed and amplified adequately, reducing the possibility of a methodological problem.

## DISCUSSION



MiRNAs are key regulator in cellular pathways implicated in the development, diagnosis and progression of HF (1, 7, 19, 20). In this scenario, several clinical reports suggest that circulating miR-423-5p might be a relevant biomarker of these processes (8, 9, 11, 21). In this experimental protocol, we demonstrated that miR-423-5p expression is modulated after an AMI in rodents, reinforcing the concept that it is directly produced by the heart, and might be influenced by left ventricular remodeling.

Elucidating the direct target of specific miRNAs and the associated intracellular pathways in the cardiomyocytes are essential aspects for understanding the association between miR-423-5p and heart disease. However, the mechanism by which miR-423-5p interferes in gene expression has only been explored recently. Luo et al suggested that miR-423-5p plays an important role in the apoptosis process in cardiomyocytes by inhibiting OGT (N-acetylglucosamine transferase) (10). Inhibition of OGT by miR-423-5p significantly decreased the expression of p-AMPK and upregulated the activity of the 26S proteasome and the protein expression levels of pro-apoptotic p53 and caspase-3. TUNEL analysis also revealed increased apoptosis in the cardiomyocytes following transfection with miR-423-5p (10). The same group of investigators subsequently demonstrated that oxidative stress significantly induced miR-423-5p expression in a time- and concentration-dependent manner in cardiomyocytes, and that its silencing protected against apoptosis induced by hydrogen peroxide (22). It seems that similar processes are also operative outside the heart, as it has been demonstrated that miR-423-5p facilitates hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in renal proximal tubular epithelial cells by glutathione-S-transferase M1 after acute kidney injury (23).

Our research group has been interested in the role of circulating miR-423-5p as a potential biomarker of HF in the clinical arena. In a case-control study, we compared plasma levels of several miRNAs (miR-21, -130b, -221, -423-5p) in HF patients and healthy controls stratified by body surface area. miR-423-5p was the only microRNA with plasmatic levels that were increased in both lean and obese HF patients, without differences between HF groups (24). In a prospective cohort design, we investigated whether plasma levels of miRNAs were modulated according to the (de)compensated state in 48 HF patients admitted to the emergency room for an episode of acute decompensation. Blood samples were collected to measure microRNAs and BNP levels within 24h of hospital admission, at the time of hospital discharge, and at the outpatient clinic several weeks post discharge (chronic stable compensated state). In this analysis, miR-423-5p expression exhibited the most prominent changes, increasing between admission and discharge (4.1-fold change;  $P < 0.001$ ), and decreasing following clinical compensation. Interestingly, patients whose levels of miR-423-5p increased between admission and clinical compensation experienced fewer hospital readmissions in the 24 months following the time of clinical compensation compared with those who had decreased levels (8). Finally, we also identified differences in miR-423-5p transcronary gradients between 17 stable HF outpatients and controls, indicating that this particular miRNA has a cardiac origin. BNP also correlated moderately with the transcronary gradients of miR-133a and miR-423-5p (11). Results observed in the current experimental protocol are in full agreement with data from clinical studies and are also indicative that miR-423-5p is indeed produced by the heart.

Several other reports suggest that circulating levels of miR-423-5p might be related to cardiac injury in HF. A provocative study addressed plasma and right atrial expression of 4 miRNAs in patients undergoing coronary artery bypass graft (CABG). All plasma miRNAs increased significantly after surgery while only the cardiac tissue expression of miR-133a (1.4-fold;  $p=0.003$ ) and miR-423-5p (1.3 fold;  $p=0.025$ ) increased as well (25). Another study in patients undergoing CABG evaluated miRNAs expression profiles and their sources in the pericardial fluid. Interestingly, miR-423-5p levels were significantly higher in the pericardial fluid than in serum, while levels of muscle-enriched miR-133a and vascular-enriched miR-126 were significantly higher in serum than in the pericardial fluid (21). Frères et al evaluated traditional and novel circulating cardiac biomarkers, including 10 circulating miRNAs, during and after anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. Under chemotherapy, they observed an elevation of troponins and NT-proBNP levels, but also the upregulation of soluble ST2 and of 4 CHF-related miRNAs (miR-126-3p, miR-199a-3p, miR-423-5p, miR-34a-5p), suggesting that these markers might be potential predictors of chemotherapy-related cardiac dysfunction (26).

A recent analysis of TRIUMPH study (an observational prospective study enrolling patients admitted with acute HF in 14 hospitals in the Netherlands) identified that higher values of repeatedly measured miR-423-5p were associated with adverse clinical outcomes (HR 1.45, 95% CI 1.10–1.92), although circulating miR-1306-5p was a better predictor of risk (27). Conversely, Seronde et al also evaluated the temporal profile of several miRNAs in patients with acute and chronic HF (28). They observed that levels of miR-126 and miR-

423-5p were lower in acute HF patients compared to stable CHF patients (both  $p < 0.001$ ). Interestingly, admission levels of miR-423-5p were lower in patients who were re-admitted to the hospital in the year following the index hospitalization compared to patients who were not, similarly to what our group have also observed (8). Although the origin and the function of circulating miRNAs are not completely understood, an increasing number of studies have demonstrated that miRNAs are more than by-products of cellular injury, being actively secreted by cells and exerting paracrine effects (29). However, it is important to understand that levels of plasma miRNAs fluctuate according to HF clinical status (stable chronic HF, acute decompensated HF at admission, acute decompensated HF at discharge and early compensated period), a concept that has not been considered in previous studies. In the current protocol, we demonstrated for the first time in an experimental model variations of tissue expression of miR-423-5p in different time points after an AMI induced by coronary ligation. We also observed a moderate to strong positive association of miR-423-5p expression and the size of the infarct area, suggesting that this miRNA might indeed be involved in cellular processes related to LV remodeling. In the clinical arena, time-dependent changes in the levels of circulating miR-133a and miR-423-5p were also observed after an AMI, although they fail as biomarkers for left ventricular remodeling parameters (30).

Some aspects of the current protocol deserve consideration. We were unable to identify circulating levels of miR-423-5p in our experimental protocol, a surprising finding since there was significant qPCR amplification in cardiac tissue. Although we cannot completely exclude that technical issues might have influenced the sensitivity of the analysis, it is plausible to consider that

circulating levels were indeed to low or absent in experimental AMI in rodents. For this study we opted to analyze only miR-423-5p, because it has been the miRNA with greater consistency in clinical reports addressing HF and LV remodeling. We acknowledge that several other miRNAs are important modulators of these processes and also deserve investigation in experimental models.

In conclusion, we demonstrated for the first time temporal variations of cardiac tissue expression of miR-423-5p in an experimental model of AMI. Our findings also suggest that miR-423-5p expression is related to the magnitude of the infarct area. These results reinforce that miR-423-5p might be a key regulator of LV remodeling after an AMI. However, the clinical role of miRNAs as biomarkers in HF will only be clearly defined after a better understanding on how circulating levels of these biomarkers respond and fluctuate after episodes of cardiac injury.

### **Sources of Funding**

This study was partially supported by “*Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior*” (Capes), “*Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico*” (CNPq) and “*Fundo de Incentivo a Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA)*”.

### **References**

1. Duygu B, de Windt LJ, da Costa Martins PA. Targeting microRNAs in heart failure. *Trends Cardiovasc Med.* 2016 Feb;26(2):99-110.
2. Frantz S, Bauersachs J, Ertl G. Post-infarct remodelling: contribution of wound healing and inflammation. *Cardiovasc Res.* 2009 Feb 15;81(3):474-81.

3. Johnson FL. Pathophysiology and etiology of heart failure. *Cardiol Clin*. 2014 Feb;32(1):9-19, vii.
4. Dao Q, Krishnaswamy P, Kazanegra R, Harrison A, Amirnovin R, Lenert L, Clopton P, Alberto J, Hlavin P, Maisel AS. Utility of B-type natriuretic peptide in the diagnosis of congestive heart failure in an urgent-care setting. *J Am Coll Cardiol*. 2001 Feb;37(2):379-85.
5. Inamdar AA, Inamdar AC. Heart Failure: Diagnosis, Management and Utilization. *J Clin Med*. 2016 Jun 29;5(7).
6. de Gonzalo-Calvo D, Iglesias-Gutierrez E, Llorente-Cortes V. Epigenetic Biomarkers and Cardiovascular Disease: Circulating MicroRNAs. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2017 Sep;70(9):763-9.
7. Goren Y, Kushnir M, Zafrir B, Tabak S, Lewis BS, Amir O. Serum levels of microRNAs in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2012 Feb;14(2):147-54.
8. Schneider S, Silvello D, Martinelli NC, Garbin A, Biolo A, Clausell N, Andrades M, Dos Santos KG, Rohde LE. Plasma levels of microRNA-21, -126 and -423-5p alter during clinical improvement and are associated with the prognosis of acute heart failure. *Mol Med Rep*. 2018 Mar;17(3):4736-46.
9. Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, de Windt LJ, van der Wal AC, Kok WE, Pinto YM. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. *Circ Res*. 2010 Apr 2;106(6):1035-9.
10. Luo P, He T, Jiang R, Li G. MicroRNA-423-5p targets O-GlcNAc transferase to induce apoptosis in cardiomyocytes. *Mol Med Rep*. 2015 Jul;12(1):1163-8.

11. Goldraich LA, Martinelli NC, Matte U, Cohen C, Andrades M, Pimentel M, Biolo A, Clausell N, Rohde LE. Transcoronary gradient of plasma microRNA 423-5p in heart failure: evidence of altered myocardial expression. *Biomarkers*. 2014 Mar;19(2):135-41.
12. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*. 2010 Jun 29;8(6):e1000412.
13. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res*. 1979 Apr;44(4):503-12.
14. Vandebossche JL, Kramer BL, Massie BM, Morris DL, Karliner JS. Two-dimensional echocardiographic evaluation of the size, function and shape of the left ventricle in chronic aortic regurgitation: comparison with radionuclide angiography. *J Am Coll Cardiol*. 1984 Dec;4(6):1195-206.
15. Peron AP, Saraiva RM, Antonio EL, Tucci PJ. [Mechanical function is normal in remanent myocardium during the healing period of myocardial infarction--despite congestive heart failure]. *Arq Bras Cardiol*. 2006 Feb;86(2):105-12.
16. Izraeli S, Pfliegerer C, Lion T. Detection of gene expression by PCR amplification of RNA derived from frozen heparinized whole blood. *Nucleic Acids Res*. 1991 Nov 11;19(21):6051.
17. Kondratov K, Kurapeev D, Popov M, Sidorova M, Minasian S, Galagudza M, Kostareva A, Fedorov A. Heparinase treatment of heparin-contaminated plasma from coronary artery bypass grafting patients enables reliable quantification of microRNAs. *Biomol Detect Quantif*. 2016 Jun;8:9-14.

18. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.
19. Vegter EL, van der Meer P, de Windt LJ, Pinto YM, Voors AA. MicroRNAs in heart failure: from biomarker to target for therapy. *Eur J Heart Fail*. 2016 May;18(5):457-68.
20. Ovchinnikova ES, Schmitter D, Vegter EL, Ter Maaten JM, Valente MA, Liu LC, van der Harst P, Pinto YM, de Boer RA, Meyer S, Teerlink JR, O'Connor CM, Metra M, Davison BA, Bloomfield DM, Cotter G, Cleland JG, Mebazaa A, Laribi S, Givertz MM, Ponikowski P, van der Meer P, van Veldhuisen DJ, Voors AA, Berezikov E. Signature of circulating microRNAs in patients with acute heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2016 Apr;18(4):414-23.
21. Miyamoto S, Usami S, Kuwabara Y, Horie T, Baba O, Hakuno D, Nakashima Y, Nishiga M, Izuhara M, Nakao T, Nishino T, Ide Y, Nakazeki F, Wang J, Ueyama K, Kimura T, Ono K. Expression Patterns of miRNA-423-5p in the Serum and Pericardial Fluid in Patients Undergoing Cardiac Surgery. *PLoS One*. 2015;10(11):e0142904.
22. Luo P, Zhang W. MicroRNA4235p mediates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>induced apoptosis in cardiomyocytes through OGlcNAc transferase. *Mol Med Rep*. 2016 Jul;14(1):857-64.
23. Yuan XP, Liu LS, Chen CB, Zhou J, Zheng YT, Wang XP, Han M, Wang CX. MicroRNA-423-5p facilitates hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in renal proximal tubular epithelial cells by targeting GSTM1 via endoplasmic reticulum stress. *Oncotarget*. 2017 Oct 10;8(47):82064-77.



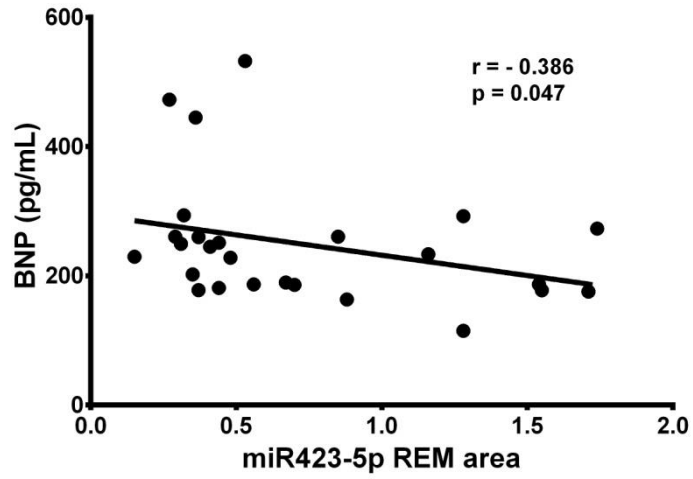
24. Thome JG, Mendoza MR, Cheuiche AV, La Porta VL, Silvello D, Dos Santos KG, Andrades ME, Clausell N, Rohde LE, Biolo A. Circulating microRNAs in obese and lean heart failure patients: A case-control study with computational target prediction analysis. *Gene*. 2015 Dec 10;574(1):1-10.
25. Engler A, Dreja F, Koberle S, Thielmann M, Peters J, Frey UH. Establishment of an easy and straight forward heparinase protocol to analyse circulating and myocardial tissue micro-RNA during coronary artery-bypass-graft surgery. *Sci Rep*. 2018 Jan 22;8(1):1361.
26. Freres P, Bouznad N, Servais L, Josse C, Wenric S, Poncin A, Thiry J, Moonen M, Oury C, Lancellotti P, Bours V, Jerusalem G. Variations of circulating cardiac biomarkers during and after anthracycline-containing chemotherapy in breast cancer patients. *BMC Cancer*. 2018 Jan 29;18(1):102.
27. van Boven N, Kardys I, van Vark LC, Akkerhuis KM, de Ronde MWJ, Khan MAF, Merkus D, Liu Z, Voors AA, Asselbergs FW, van den Bos EJ, Boersma E, Hillege H, Duncker DJ, Pinto YM, Postmus D. Serially measured circulating microRNAs and adverse clinical outcomes in patients with acute heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2018 Jan;20(1):89-96.
28. Seronde MF, Vausort M, Gayat E, Goretti E, Ng LL, Squire IB, Vodovar N, Sadoune M, Samuel JL, Thum T, Solal AC, Laribi S, Plaisance P, Wagner DR, Mebazaa A, Devaux Y. Circulating microRNAs and Outcome in Patients with Acute Heart Failure. *PLoS One*. 2015;10(11):e0142237.
29. Viereck J, Bang C, Foinquinos A, Thum T. Regulatory RNAs and paracrine networks in the heart. *Cardiovasc Res*. 2014 May 1;102(2):290-301.
30. Bauters C, Kumarswamy R, Holzmann A, Bretthauer J, Anker SD, Pinet F, Thum T. Circulating miR-133a and miR-423-5p fail as biomarkers for left

ventricular remodeling after myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2013 Oct 3;168(3):1837-40.

**Suppl. 1:** Correlations between miR-423-5p in different cardiac areas vs. echocardiogram datas in wistar rats submitted acute myocardium infarct

Groups		LVSD (cm)		LVDD (cm)		Ejection Fraction (%)		Fractional shorting (%)		Infarct Area (%)	
		R	p	R	p	R	p	R	P	R	p
1 day AMI	miR-423-5p levels in PERI area	-0.086	0.872	0.257	0.623	-0.029	0.957	-0.279	0.593	0.206	0.695
7 days AMI		0.100	0.873	-0,200	0.747	-0.600	0.285	-0.757	0,139	0.475	0.418
28 days AMI		0.405	0.320	0.310	0.456	-0.357	0.385	-0.294	0,479	0.280	0.502
90 days AMI		0.143	0.736	-0.048	0.910	-0.310	0.456	-0.376	0,359	0.727	0.041 <sup>#</sup>
1 day AMI	miR-423-5p levels in REM area	-0.829	0.042 <sup>*</sup>	-0.314	0.544	0.063	0.960	0.019	0,972	-0.172	0.744
7 days AMI		0.700	0.188	0.900	0.037	-0.300	0.624	0.092	0,883	0.200	0.748
28 days AMI		0.024	0.955	0.452	0.260	0.071	0.867	0.214	0,611	-0.004	0.993
90 days AMI		0.333	0.420	0.060	0.888	-0.476	0.233	-0.400	0,327	0.165	0.696
1 day AMI	miR-423-5p levels in INF area	0.314	0.544	-0.429	0.397	-0.486	0.329	-0.609	0,199	0.645	0.167
7 days AMI		-0.100	0.873	-0.200	0.747	-0.100	0.873	-0.094	0,881	-0.170	0.785
28 days AMI		0.167	0.693	-0.190	0.651	-0.238	0.570	-0.166	0,695	0.021	0.960
90 days AMI		0.405	0.320	0.108	0.799	-0.714	0.047 <sup>*</sup>	-0.606	0,111	0,754	0.031 <sup>#</sup>
1 day AMI	miR-423-5p levels in GM area	-0.257	0.623	0.257	0.623	0.314	0.544	0.326	0,528	-0,453	0.367
7 days AMI		0.600	0.285	0.700	0.188	-0.400	0.505	0.210	0,734	0,296	0.629
28 days AMI		0.571	0.139	0.071	0.867	-0.690	0.058	-0.738	0,037 <sup>#</sup>	0,532	0.175
90 days AMI		-0.048	0.911	-0.359	0.382	-0.095	0.823	-0.158	0,709	0,410	0.313

\*Spearman correlation, p<005. #Pearson correlation, p<0,05. LVSD: left ventricle systolic diameter; LVDD: left ventricle diastolic diameter. AMI: acute myocardium infarction. PERI: peripheral cardiac area; REM: remote cardiac area; INF: infarcted cardiac area and GM: gastrocnemius muscle.



**Suppl.2:** Correlation between plasmatic Brain Natriuretic Peptides (BNP) and miR-423-5p levels in cardiac tissue in the infarct groups. REM: remote area.

## 7 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Alguns estudos demonstram a associação dos níveis elevados no miRNA-423-5p com a gênese, prognóstico e diagnóstico de pacientes com insuficiência cardíaca. No entanto, nenhum estudo até o momento, havia caracterizado a origem da produção deste miRNA. No presente estudo, foi avaliada a expressão do miRNA-423-5p no tecido cardíaco em modelo experimental de remodelamento cardíaco após insulto isquêmico e também avaliado seu comportamento ao longo do tempo. De acordo com o esperado, o modelo experimental levou a queda da fração de ejeção ventricular esquerda dos ratos infartados, quando comparado ao grupo SHAM. Os percentuais da área acinética foram estatisticamente iguais para todos os animais infartados, mostrando grupos homogêneos.

Nosso estudo pode demonstrar que ocorre modulação da expressão do miRNA-423-5p após lesão isquêmica e que esta expressão está associada diretamente com tamanho da área de infarto. Além disso, há um aumento nos níveis do miRNA em 28 e 90 dias na área infartada, no entanto não detectamos níveis plasmáticos deste miRNA. O miRNA 423-5p pode ser um regulador chave no remodelamento do ventrículo esquerdo.

Ao demonstrarmos a origem cardíaca do miRNA-423-5p em modelo experimental, serão necessários estudos adicionais a fim de elucidar o papel específico deste miRNA nas vias moleculares que levam ao remodelamento ventricular e ao desenvolvimento de IC. O conhecimento mais aprofundado dos alvos genéticos deste miRNA no contexto da doenças cardíacas poderá auxiliar na entendimento da complexa inter-relação entre a lesão e a falência miocárdica, além de abrir novas fronteiras como potencial alvo terapêutico.