



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

Dissertação de Mestrado

**MicroRNAs Circulantes como Biomarcadores da
Insuficiência Cardíaca Descompensada**

Autora: Stéfanie Ingrid dos Reis Schneider

Orientadora: Profa. Dra. Kátia Gonçalves dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Luís Eduardo Paim Rohde

Porto Alegre

2014

**MicroRNAs Circulantes como Biomarcadores da
Insuficiência Cardíaca Descompensada**

AUTORA: Stéfanie Ingrid dos Reis Schneider

**Dissertação para obtenção do título de Mestre
apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e
Ciências Cardiovasculares.**

ORIENTADORA: Profa. Dra. Kátia Gonçalves dos Santos

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Luís Eduardo Paim Rohde

Porto Alegre

2014

Este trabalho foi desenvolvido no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com o auxílio financeiro do CNPq e FIPE-HCPA.

“Aprender é a única coisa que a mente não se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”.

Leonardo da Vinci

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Kátia Gonçalves dos Santos, pelo apoio, paciência e extrema competência na orientação científica.

Ao meu co-orientador, Dr. Luís Eduardo Paim Rohde, pelo auxílio, dedicação e pela idealização deste trabalho.

À professora Dra. Andreia Biolo, pelo profissionalismo, dedicação e auxílio que me forneceu durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos meus pais, Marisa Helena Schneider e Roque Schneider, pelo amor, educação e investimento que me proporcionaram durante esses anos.

Aos meus irmãos, Bárbara, Daniele, Jórdan e Gustavo, pela convivência diária, amizade, amor, apoio e carinho.

À minha sobrinha, Izadora, unicamente pelo fato de existir.

Ao meu amor, Giovanni, pelo apoio, carinho e atenção.

Aos meus colegas de laboratório, Amanda, Graziela, Carolina, Santiago, Michael, Arthur, Vanessa La Porta, Letícia, Juliana Thomé, Nidiane e Daiane, pela atenção e auxílio durante a realização do trabalho.

À toda equipe da emergência, ambulatório, bioquímica, CPC e CPE, andares do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo auxílio dado durante a execução deste trabalho.

À secretária do PPG da Cardiologia, Sirlei, pela sua eficiência, profissionalismo e amizade.

Ao secretário do Centro de Pesquisa Experimental, Everaldo e seu estagiário Roger, que foram essenciais para a metodologia deste trabalho, sempre com muita dedicação e profissionalismo.

Aos meus alunos, fonte de motivação, realização e desenvolvimento pessoal e profissional.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas: Português	7
Lista de Tabelas	8
Lista de Figuras	9
1. Fundamentação Teórica	10
1.1. Insuficiência Cardíaca	10
1.1.1. Epidemiologia da Insuficiência Cardíaca	10
1.1.2. Etiologia da Insuficiência Cardíaca	11
1.1.3. Patogênese da Insuficiência Cardíaca	13
1.1.4. Insuficiência Cardíaca Aguda	15
1.1.5. Biomarcadores de Insuficiência Cardíaca	17
1.2. MicroRNAs	20
1.2.1. Biogênese e Função dos MicroRNAs	20
1.2.2. MicroRNAs nas Doenças Cardíacas	22
1.2.3. MicroRNAs na Hipertrofia Ventricular	23
1.2.4. MicroRNAs no Infarto Agudo do Miocárdio	25
1.2.5. MicroRNAs na Insuficiência Cardíaca	26
2. Justificativa de Pesquisa	31
3. Hipóteses Conceituais	32
4. Objetivos	33
4.1. Objetivo Geral	33
4.2. Objetivos Específicos	33
5. Referências Bibliográficas	34
6. Artigo Original	42
7. Apêndice – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	73

LISTA DE ABREVIATURAS: PORTUGUÊS

ANG II	Angiotensina II
ANP	Peptídeo Natriurético do Tipo A
BNP	Peptídeo Natriurético do Tipo B
CNP	Peptídeo Natriurético do Tipo C
DAC	Doença Arterial Coronariana
FEVE	Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
IC	Insuficiência Cardíaca
NT-pró-BNP	Domínio Amino-Terminal do Pró-BNP
Pró-BNP	Precursor do Peptídeo Natriurético do Tipo B
qRT-PCR	Transcrição Reversa-Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa
RISC	Complexo de Silenciamento Induzido por RNA
TNF	Fator de Necrose Tumoral
VE	Ventrículo Esquerdo

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Classificação da IC Segundo a <i>New York Heart Association</i>	12
TABELA 2. Biomarcadores de Insuficiência Cardíaca	18
TABELA 3. MicroRNAs Circulantes (Plasma e Soro) na Insuficiência Cardíaca em Humanos	27

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Fração de ejeção do ventrículo esquerdo em 721 brasileiros admitidos por IC aguda em hospital terciário **17**

FIGURA 2. Mecanismos de liberação celular e sistema de transporte extracelular dos microRNAs **21**

FIGURA 3. Microarranjo de microRNAs em camundongos sedentários e exercitados **24**

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1. Insuficiência Cardíaca

1.1.1. Epidemiologia da Insuficiência Cardíaca

A insuficiência cardíaca (IC) é um problema de saúde pública considerada como uma das principais causas de internações por doenças cardiovasculares (BRAUNWALD, 2008; BROWN e GOTTLIEB, 2012; GIVERTZ et al., 2013; YANCY et al., 2013), além de possuir uma alta taxa de mortalidade e alto impacto econômico, devido ao custo das internações (ROHDE et al., 2005; BOCCHI et al., 2009; BROWN e GOTTLIEB, 2012). Estima-se que cerca de 6,4 milhões de brasileiros sofram de IC (BOCCHI et al., 2009), sendo que sua incidência aumenta com a idade (BOCCHI et al., 2013; YANCY et al., 2013). De acordo com os dados da III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica de 2009, durante o ano de 2007 a IC representou a terceira causa mais frequente de internações hospitalares no Sistema Único de Saúde (SUS), sendo mais prevalente na faixa etária acima de 60 anos (BOCCHI et al., 2009).

Estudos epidemiológicos sobre a IC descompensada mostram que na América Latina o tempo de internação (aproximadamente 6 dias) é maior quando comparado aos países asiáticos e aos Estados Unidos (cerca de 4 dias) (WEST et al., 2011). Também foram comparados os dados de mortalidade na qual o Brasil apresenta uma taxa de 8,5%, superior à do México (2,9%), Estados Unidos (2,7%) e Hong Kong (0,5%) (BOCCHI et al., 2013). Em um estudo comparativo entre hospitais terciários do Brasil e dos Estados Unidos, pacientes americanos com IC apresentaram idade mais avançada, maior prevalência de etiologia isquêmica e índices menores de hospitalizações comparados aos brasileiros. Nesse estudo também observou-se que o tempo de internação hospitalar foi menor nos pacientes americanos. Em contrapartida, os pacientes brasileiros apresentaram menos eventos clínicos no período de três meses após a alta (ROHDE et al., 2005).

No Brasil, pacientes com IC admitidos em hospitais públicos são mais jovens (aproximadamente 10 anos) quando comparados aos pacientes internados em

hospitais privados. As discrepâncias entre hospitais públicos e privados foram evidentes quando características sócio-econômicas foram avaliadas, tais como o percentual de afro-descendência (65% contra 20%), analfabetismo (56% contra 11%) e suspensão da medicação antes da internação hospitalar (51% contra 17%), respectivamente (TAVARES et al., 2004).

1.1.2. Etiologia da Insuficiência Cardíaca

A IC é caracterizada como a incapacidade de manter as necessidades metabólicas dos tecidos, quando o coração não consegue manter o débito cardíaco adequado, ou consegue fazê-lo à custa do aumento das pressões de enchimento do ventrículo esquerdo (BOCCHI et al., 2009; RATHI e DEEDWANIA, 2012; BRAUNWALD, 2013; YANCY et al., 2013). As causas da IC são variadas e incluem as cardiopatias de origem isquêmica, hipertensiva, valvular e congênita, as cardiomiopatias (dilatada, hipertrófica e restritiva), as doenças do pericárdio, as arritmias (taquicardiomiopatias), e o consumo de álcool, drogas e nutrientes (BOCCHI et al., 2009; YANCY et al., 2013). A causa mais comum de IC no mundo é a doença isquêmica, associada à necrose miocárdica, causando perda de tecido contrátil e disfunção ventricular sistólica esquerda. Nos pacientes idosos observa-se uma prevalência gradativamente maior de hipertensão arterial sistólica e hipertrofia ventricular esquerda, sendo fatores contribuintes para o desenvolvimento da disfunção cardíaca (REMME e SWEDBERG, 2001).

Na América Latina, as principais etiologias da IC são a cardiomiopatia dilatada idiopática (de 1,3% a 37%), chagásica (de 1,3% a 21%), isquêmica (de 17 a 68%), hipertensiva (de 14% a 76%), valvular (de 3% a 22%) e alcoólica (de 1,1% a 8%). No Brasil existe grande variação na etiologia da IC em diferentes regiões do país. A etiologia chagásica é altamente prevalente nas regiões Centro-Oeste e Sudeste, tem fisiopatologia, evolução clínica e prognóstico peculiares, além de tratamento controverso (BOCCHI et al., 2013).

O mecanismo responsável pelos sintomas e sinais clínicos da IC incluem a disfunção de um ou ambos os ventrículos (RATHI e DEEDWANIA, 2012). A maioria dos pacientes tem disfunção do ventrículo esquerdo (VE) em graus variáveis, que pode ser sistólica ou diastólica. A disfunção sistólica manifesta-se pela redução da

fração de ejeção do VE (FEVE < 45%), enquanto na disfunção diastólica isolada a contratilidade é normal, com alteração no enchimento ventricular e função sistólica preservada (CHATTERJEE, 2012; YANCY et al., 2013). Contudo, pacientes com disfunção sistólica do VE geralmente têm algum grau de disfunção diastólica. Embora a doença arterial coronariana (DAC), com infarto agudo do miocárdio (IAM) prévio, seja uma das principais causas de IC com disfunção sistólica (YANCY et al., 2013), muitos outros fatores de risco, como hipertensão e diabetes mellitus, podem levar à dilatação do VE e à IC com FEVE reduzida (NAGARAJAN e TANG, 2012).

Com base na tolerância à atividade física e na sintomatologia, a IC pode ser classificada em estágios ou classes funcionais, que são utilizados para avaliar a sua gravidade e monitorar a resposta ao tratamento (BOCCHI et al., 2009; YANCY et al., 2013). A classificação mais utilizada é a da *New York Heart Association* (NYHA; Tabela 1). Apesar de ser amplamente utilizada como marcador de prognóstico da IC, essa classificação é muito criticada por alguns autores já que nem sempre se pode correlacioná-la com o grau de disfunção ventricular ou com medidas da capacidade de exercício (JACKSON et al., 2000).

Tabela 1. Classificação da IC Segundo a *New York Heart Association*

Classe	Definição
Classe I	Assintomática. Sem limitação da atividade física apesar da presença de doença cardíaca. Pode ser suspeitada se houver história de doença cardíaca confirmada por investigações ecocardiográficas.
Classe II	Leve. Limitação leve de atividade física. As atividades mais exigentes causam falta de ar, como por exemplo, em declives íngremes e lances de escada. Os pacientes deste grupo podem continuar tendo uma vida quase normal.
Classe III	Moderado. Limitação mais acentuada da atividade física e que interfere no trabalho. Possui sintomas até ao caminhar em casa.
Classe IV	Grave. Incapacidade de realizar qualquer atividade física sem apresentar sintomas. Pacientes sem fôlego mesmo no repouso, com atividades limitadas em seu domicílio.

Fonte: Adaptado de JACKSON et al. (2000).

1.1.3. Patogênese da Insuficiência Cardíaca

A IC com disfunção sistólica ocorre devido a um dano na função ventricular esquerda, que desencadeia uma série de mecanismos compensatórios a fim de preservar o débito cardíaco. Os mecanismos compensatórios incluem a ativação do sistema nervoso simpático (sistema adrenérgico) e do sistema renina-angiotensina-aldosterona. A ativação desses sistemas leva à vasoconstrição, com o aumento do tônus simpático, angiotensina II (Ang II), endotelina e liberação prejudicada de óxido nítrico, além da retenção de fluidos e sódio, com o aumento da vasopressina e aldosterona (CHATTERJEE, 2012; RATHI e DEEDWANIA, 2012).

No curto prazo, esses mecanismos compensatórios, ativados após o declínio inicial na capacidade ejetora do coração, são capazes de manter a função do VE dentro do estado fisiológico, de tal forma que a capacidade funcional do paciente é preservada ou apenas levemente reduzida. A ativação do sistema adrenérgico, mediada principalmente pelos receptores beta-adrenérgicos, tem como efeitos benéficos o aumento na função contrátil e o aumento na frequência cardíaca. Porém, com o tempo, a ativação sustentada desses sistemas provoca danos no VE, com a piora do seu remodelamento e subsequente descompensação cardíaca (MANN e BRISTOW, 2005; CHATTERJEE, 2012; RATHI e DEEDWANIA, 2012).

O processo de remodelamento do VE compreende alterações na biologia do cardiomiócito, no volume do miócito e em outros componentes do miocárdio, bem como na geometria e arquitetura do VE, alterando o seu tamanho, forma e função de forma progressiva (CHATTERJEE, 2012; RATHI e DEEDWANIA, 2012; BURCHFIELD, XIE e HILL, 2013). O remodelamento ventricular tem início quando os miócitos cardíacos sofrem alterações funcionais e estruturais que levam à perda progressiva da função contrátil. Essas alterações incluem a ativação de vários genes que regulam a utilização do cálcio, a sarcomerogênese, a sinalização beta-adrenérgica e o citoesqueleto. Além disso, ocorre a perda progressiva dos miofilamentos nos miócitos cardíacos, alterações no acoplamento excitação-contração e a dessensibilização dos receptores beta-adrenérgicos. Embora várias dessas mudanças sejam, inicialmente, benéficas na proteção dos miócitos contra as consequências deletérias do excesso de ativação neuro-hormonal, essas alterações levam a um defeito na função contrátil do miócito bem como à perda de resposta dos

mecanismos de controle adrenérgicos (MANN e BRISTOW, 2005; BURCHFIELD, XIE e HILL, 2013).

A perda de miócitos, tanto por apoptose quanto por necrose, também contribui para a progressão da disfunção cardíaca e do remodelamento do VE. Essa perda pode ser desencadeada pela norepinefrina, pela Ang II, pelo fator de necrose tumoral (TNF) ou pela endotelina, entre outros. Além das mudanças no volume e composição dos miócitos cardíacos, várias alterações ocorrem dentro da matriz extracelular do miocárdio, incluindo a fibrose perivascular (deposição excessiva de colágeno fibrilar após a morte dos miócitos ao redor dos vasos sanguíneos intramiocárdicos) e a degradação da matriz extracelular. A fibrose pode ser desencadeada por Ang II, endotelina e aldosterona, enquanto a degradação da matriz extracelular é realizada pelas metaloproteinases de matriz, uma família de enzimas que degradam os componentes da matriz extracelular e que são ativadas no miocárdio insuficiente por citocinas e fatores de crescimento. A degradação progressiva da matriz extracelular leva ao realinhamento dos miócitos dentro da parede do VE, contribuindo para a dilatação e o afinamento da parede do VE, que ocorrem durante a progressão da IC (MANN e BRISTOW, 2005; CHATTERJEE, 2012; BURCHFIELD, XIE e HILL, 2013).

Entre as diversas alterações que ocorrem durante o processo de remodelamento do VE e que contribuem para o agravamento da IC, a principal mudança é o aumento no estresse da parede do VE (ROHDE et al., 1999; MANN e BRISTOW, 2005). O aumento no tamanho do VE e a mudança no formato do coração (para uma forma mais esférica) geram uma carga mecânica para o coração insuficiente. Como a carga do ventrículo na diástole final contribui para a pós-carga que o ventrículo enfrenta no início da sístole, a dilatação do VE por si só irá aumentar o seu trabalho, assim como a utilização de oxigênio. Além do aumento no volume diastólico final, também ocorre o afinamento da parede do VE. O aumento no afinamento da parede, junto com o aumento na pós-carga gerada pela dilatação do VE, contribui para uma redução no débito cardíaco. Além disso, o estresse na parede diastólica final pode levar à hipoperfusão do subendocárdio, com o agravamento da disfunção do VE, bem como ao aumento no estresse oxidativo, com a ativação de genes que são sensíveis à geração de radicais livres (como o TNF e a interleucina-1 beta) (MANN e BRISTOW, 2005).

As mudanças na estrutura e na função do VE fazem com que o sistema cardiovascular seja menos responsivo aos mecanismos de controle homeostáticos, mantendo um sistema de auto-amplificação, na qual a ativação neuro-hormonal agrava-se como uma resposta à incapacidade do VE remodelado de responder apropriadamente aos mecanismos compensatórios. Além disso, a disfunção sistólica e o remodelamento cardíaco interagem no desenvolvimento e na progressão da IC, de tal forma que o desenvolvimento de um contribui para o desenvolvimento do outro (MANN e BRISTOW, 2005).

No entanto, estudos clínicos e experimentais sugerem que a progressão da IC pode ocorrer independentemente do estado hemodinâmico, neuro-hormonal e cardiorrenal do paciente (MANN e BRISTOW, 2005). Recentemente, vários estudos têm identificado uma família de RNAs não-codificadores com funções regulatórias, conhecidos como microRNAs (miRNAs ou miRs), que controlam a estrutura e a função cardíaca. As evidências mostram que os microRNAs exercem um papel essencial na patogênese da IC por meio da sua capacidade de regular os níveis de expressão dos genes que atuam no processo do remodelamento cardíaco (CATALUCCI, LATRONICO e CONDORELLI, 2008; TOPKARA e MANN, 2011; BRAUNWALD, 2013; DUYGU, POELS e DA COSTA MARTINS, 2013), como será visto na seção 1.2.

1.1.4. Insuficiência Cardíaca Aguda

A IC aguda caracteriza-se por um início rápido ou uma mudança clínica nos sinais e sintomas, resultando na necessidade imediata de intervenção terapêutica. A IC aguda pode originar-se da piora da IC pré-existente (IC crônica descompensada) ou ocorrer em indivíduos sem diagnóstico prévio de IC (RUDIGER et al., 2005; BOCCHI et al., 2009; GIVERTZ et al., 2013). Os principais sintomas clínicos da IC congestiva incluem fadiga, letargia, dispnéia e edema (WATSON, GIBBS e GYH, 2000; BROWN e GOTTLIEB, 2012; SLIWA e MAYOSI, 2013), além de sinais físicos como taquicardia, estertores pulmonares, terceira bulha e pressão jugular venosa elevada (WATSON, GIBBS e GYH, 2000; SLIWA e MAYOSI, 2013). Muitas dessas manifestações são características da IC, mas de difícil interpretação, sobretudo em mulheres, idosos e obesos (REMME e SWEDBERG, 2001). Geralmente, o

diagnóstico é realizado pelo conjunto de informações derivadas da anamnese, do exame físico e de exames subsidiários, como o raio-X de tórax e a dosagem dos níveis de peptídeos natriuréticos (BNP, pró-BNP e NT-pró-BNP) (BOCCHI et al., 2009; GIVERTZ et al., 2013). Muitos estudos clínicos utilizam escores compostos para o diagnóstico da síndrome, como os escores de Framingham, Boston (RABELO et al., 2006; BOCCHI et al., 2009) e PRIDE (GIVERTZ et al., 2013).

Como mencionado anteriormente, a IC aguda descompensada é uma síndrome heterogênea que inclui os casos sem diagnóstico prévio desta doença assim como os casos resultantes da piora da IC crônica. Embora suas causas sejam diversas, a exacerbação aguda da IC resulta, em geral, da alimentação inadequada, não-aderência ao tratamento ou dosagem inadequada da medicação utilizada (RABELO et al., 2006; BROWN e GOTTLIEB, 2012; GIVERTZ et al., 2013). A taxa de mortalidade nos pacientes com IC descompensada aguda ainda é elevada (BROWN e GOTTLIEB, 2012; GIVERTZ et al., 2013; JOFFE et al., 2013; LUERS et al., 2013; SLIWA e MAYOSI, 2013; UEDA et al., no prelo) e estima-se que 1 em cada 4 norte-americanos com IC é readmitido em 30 dias após a alta hospitalar (BROWN e GOTTLIEB, 2012). Também foi demonstrado que a taxa de mortalidade é maior nos pacientes com IC crônica descompensada em comparação aos pacientes sem diagnóstico prévio de IC (76% contra 44% em 5 anos), sendo que a idade avançada, a disfunção renal e os níveis de BNP estão associados com o pior prognóstico em ambos os grupos de pacientes (LASSUS et al., 2013). Por isso, é essencial que na sala de emergência seja feita a identificação da etiologia da IC e da causa da descompensação (BROWN e GOTTLIEB, 2012; LASSUS et al., 2013).

Em uma amostra de pacientes brasileiros que procuraram o serviço de emergência, observou-se que aproximadamente 31% dos pacientes que se apresentam com IC aguda (crônica descompensada) não têm disfunção sistólica de VE evidente (Figura 1) (GOLDRAICH et al., 2010). Além disso, os pacientes com fração de ejeção preservada (FEVE > 50%) são predominantemente idosos (> 70 anos de idade), do sexo feminino, têm etiologia não-isquêmica, apresentam-se com fibrilação ou “flutter” atrial, anemia e pressão de pulso ampla (> 45 mmHg) (GOLDRAICH et al., 2010; BISHU et al., 2012). Estes achados sugerem que embora a sintomatologia da síndrome seja indistinguível, pacientes com ou sem disfunção sistólica de VE podem ter mecanismos patogênicos distintos. Nesse sentido,

diversos estudos clínicos, que testaram estratégias de tratamento comprovadamente eficazes em pacientes com IC por disfunção sistólica, falharam em demonstrar benefício clínico substancial em pacientes com IC com FEVE preservada (YUSUF et al., 2003; MASSIE et al., 2008; CHATTERJEE, 2012).

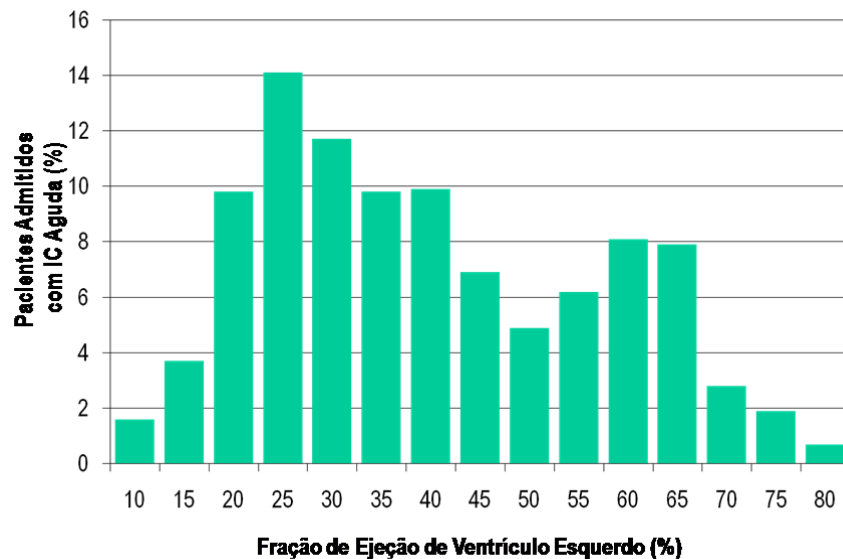


Figura 1. Fração de ejeção do ventrículo esquerdo em 721 brasileiros admitidos por IC aguda em hospital terciário (GOLDRAICH et al., 2010).

1.1.5. Biomarcadores de Insuficiência Cardíaca

Tradicionalmente, um paciente com suspeita de IC é avaliado pela história clínica e exame físico (GAGGIN e JANUZZI Jr., 2013), sendo que mais de cem preditores de risco e prognóstico foram relatados (ROHDE, 2005). Porém, como a IC é uma síndrome heterogênea, estes métodos apresentam limitações quanto a sua sensibilidade e/ou especificidade. Exames de imagem, como a ecocardiografia e o cateterismo, melhoram a capacidade de diagnóstico e monitoramento da IC, mas apresentam limitações (custo, tempo e interpretação subjetiva). Nesse cenário, há uma intensa busca por biomarcadores que sejam capazes de prever o desenvolvimento da IC, identificar a sua presença, estratificar o risco de pior prognóstico de um paciente e servir como um instrumento biológico para direcionar o tratamento da IC (GAGGIN E JANUZZI Jr., 2013; GIVERTZ et al., 2013; SCHMITTER, COTTER e VOORS, no prelo).

Vários marcadores não-invasivos têm sido sugeridos para a determinação do diagnóstico e do prognóstico da IC, refletindo diferentes etapas da sua patogênese. Além dos neuro-hormônios, os principais marcadores laboratoriais são aqueles relacionados à injúria cardíaca, remodelamento da matriz, disfunção endotelial, inflamação e estresse oxidativo (Tabela 2). Os marcadores de dano renal também podem oferecer valor prognóstico adicional, pois a disfunção renal pode estar envolvida na patogênese, progressão ou descompensação da IC (BROWN e GOTTLIEB, 2012; CHOWDHURY, CHOUDHARY e MAISEL, 2012; GIVERTZ et al., 2013; YANCY et al., 2013).

Tabela 2. Biomarcadores de Insuficiência Cardíaca

<i>Neuro-hormônios</i>
Peptídeos natriuréticos (ANP, BNP e CNP)
Marcadores de atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona
Catecolaminas, endotelinas, cortisol, leptina e adiponectina
<i>Injúria Cardíaca (Necrose, Apoptose)</i>
Troponinas (I ou T)
<i>Remodelamento da Matriz, Disfunção Endotelial e Inflamação</i>
Colágeno e metaloproteinases de matriz e seus inibidores fisiológicos
Proteína C reativa, moléculas de adesão e citocinas
<i>Estresse Oxidativo</i>
Lipoproteínas de baixa densidade oxidadas, níveis séricos de ácido úrico
<i>Comorbidades</i>
Hemoglobina, creatinina e taxa de filtração glomerular

Fonte: Adaptado de CHOWDHURY, CHOUDHARY e MAISEL (2012).

O potencial de cada um desses biomarcadores tem sido amplamente discutido (CHOWDHURY, CHOUDHARY e MAISEL, 2012; YANCY et al., 2013). Em especial, os peptídeos natriuréticos têm sido considerados como potenciais

biomarcadores da IC e são cada vez mais empregados para determinar a presença e gravidade desta doença. Eles também auxiliam no diagnóstico da descompensação cardíaca e na avaliação prognóstica da IC, por possuírem sensibilidade, especificidade e valores preditivos elevados (PALAZZUOLI et al., 2010; LUERS et al., 2013; PEREIRA-BARRETTO et al., 2013; SERONDE et al., 2013).

Em um estudo de coorte (PEREIRA-BARRETTO et al., 2013), pacientes com IC descompensada nas classes funcionais III e IV apresentaram níveis elevados de BNP e altas taxas de mortalidade durante o primeiro ano de seguimento. Também, nesse estudo, verificou-se que os níveis elevados de BNP estavam associados à FEVE reduzida, função renal deteriorada e necessidade de tratamento com inotrópicos, destacando-se como o melhor preditor de eventos prognósticos dentre as variáveis estudadas. Segundo as diretrizes norte-americanas, o BNP e o NT-pró-BNP são úteis para auxiliar no diagnóstico clínico da IC crônica em pacientes ambulatoriais e da IC descompensada aguda, principalmente quando a etiologia da dispnéia é incerta. Além disso, a mensuração dos níveis destes peptídeos também é considerada útil para estabelecer o prognóstico ou a gravidade da doença na IC descompensada aguda (YANCY et al., 2013).

Durante o tratamento da IC crônica, os níveis de BNP e NT-pró-BNP são reduzidos ao longo do tempo e, em geral, essa redução está correlacionada com a melhora nos desfechos clínicos. Por essa razão, a utilidade do tratamento da IC guiado pelos níveis de BNP ou de NT-pró-BNP também tem sido avaliada em comparação ao manejo padrão da doença (sem a dosagem de peptídeos natriuréticos). Embora os ensaios clínicos randomizados tenham observado resultados inconsistentes, duas meta-análises indicaram que a terapia guiada pelo BNP reduz a mortalidade por todas as causas nos pacientes com IC crônica (YANCY et al., 2013).

Porém, nem sempre os níveis de BNP e NT-pró-BNP são facilmente modificáveis. Se os níveis destes peptídeos natriuréticos não diminuem após uma intervenção agressiva, o risco de morte ou hospitalização por IC é significativo. Além disso, alguns pacientes com IC avançada têm níveis de BNP e NT-pró-BNP próximos ao normal ou falsamente reduzidos (YANCY et al., 2013). Embora os níveis baixos destes peptídeos excluam a presença de IC, enquanto os níveis

elevados apresentam um alto valor preditivo positivo no diagnóstico da IC, pelo menos vinte fatores clínicos influenciam na redução ou no aumento dos valores esperados, tais como a idade avançada, obesidade, anemia, insuficiência renal, sepse e doenças pulmonares (PALAZZUOLI et al., 2010; GAGGIN e JANUZZI Jr., 2013; YANCY et al., 2013). Nesse contexto, é reconhecido que a utilização de um painel de biomarcadores combinados pode apresentar uma capacidade maior de predição de pior prognóstico e benefício para orientar a terapia da IC do que um determinado marcador avaliado isoladamente (CHOWDHURY, CHOUDHARY e MAISEL, 2012; GAGGIN e JANUZZI Jr., 2013; YANCY et al., 2013).

1.2. MicroRNAs

1.2.1. Biogênese e Função dos MicroRNAs

Os microRNAs (miRNAs ou miRs) são pequenos RNAs endógenos (22-30 nucleotídeos), não-codificadores, que regulam a expressão gênica ao nível pós-transcricional pela degradação ou inibição dos seus mRNAs-alvos. Eles são encontrados em praticamente todos os eucariotos (ZAHA, 2012) e cerca de 2 mil genes foram identificados em humanos (KUMARSWAMY e THUM, 2013). Os microRNAs regulam a diferenciação de células estaminais, a neurogênese, a hematopoiese, a secreção de insulina, a resposta imune, e o desenvolvimento e a função do músculo cardíaco e esquelético. Alterações na expressão de microRNAs têm sido associadas com a desregulação no desenvolvimento de plantas, *Drosophila* (mosca-das-frutas), “zebrafish” (peixe conhecido popularmente como paulistinha), ratos e seres humanos (THUM, CATALUCCI e BAUERSACHS, 2008).

Nos animais, os microRNAs reconhecem os seus alvos por um pareamento imperfeito das bases da sua extremidade 5' com bases complementares na região 3' não-traduzida dos mRNAs-alvos. Assim, a variação no grau de complementariedade nas sequências permite que um único microRNA atinja vários mRNAs, regulando múltiplos genes (VALENCIA-SANCHEZ et al., 2006; HUTVAGNER e SIMARD, 2008; ROY et al., 2009; CORDES, SRIVASTANA e IVEY, 2010; ZAHA, 2012). Uma expressão aumentada dos microRNAs pode levar a uma menor expressão dos mRNAs-alvos, enquanto que uma diminuição da sua expressão pode aumentar os

níveis de mRNAs devido à perda da inibição dos microRNAs sobre seus alvos. Estima-se que os microRNAs regulem a expressão de 30% dos genes que compõem o genoma humano (LIM et al., 2005).

Os microRNAs são transcritos pela enzima RNA polimerase II e são chamados de pri-miRs (transcritos primários). Os pri-miRs são clivados no núcleo pela proteína “Drosha”, uma RNase do tipo III, que associada a uma proteína DGCR8 gera o pré-miR (precursor). O precursor do microRNA (pré-miR), que possui uma estrutura secundária na forma de grampo de cabelo de aproximadamente 65 nucleotídeos, é exportado para o citoplasma, por meio da exportina-5, e processado pela ribonuclease “Dicer”, tornando-se um microRNA maduro de fita dupla. Após, uma das fitas interage com a proteína Argonata (Ago), da família das endonucleases, para formar o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), essencial para direcionar o microRNA até o mRNA-alvo (Figura 2; rota 1). Esse processo é conhecido como silenciamento gênico e acarreta a depleção dos níveis proteicos (CATALUCCI, GALLO e CONDORELLI, 2009; CREEMERS, TIJSEN e PINTO, 2012; OLIVEIRA-CARVALHO et al., 2012; DUYGU, POELS e DA COSTA MARTINS, 2013; LEITE-MOREIRA et al., 2013).

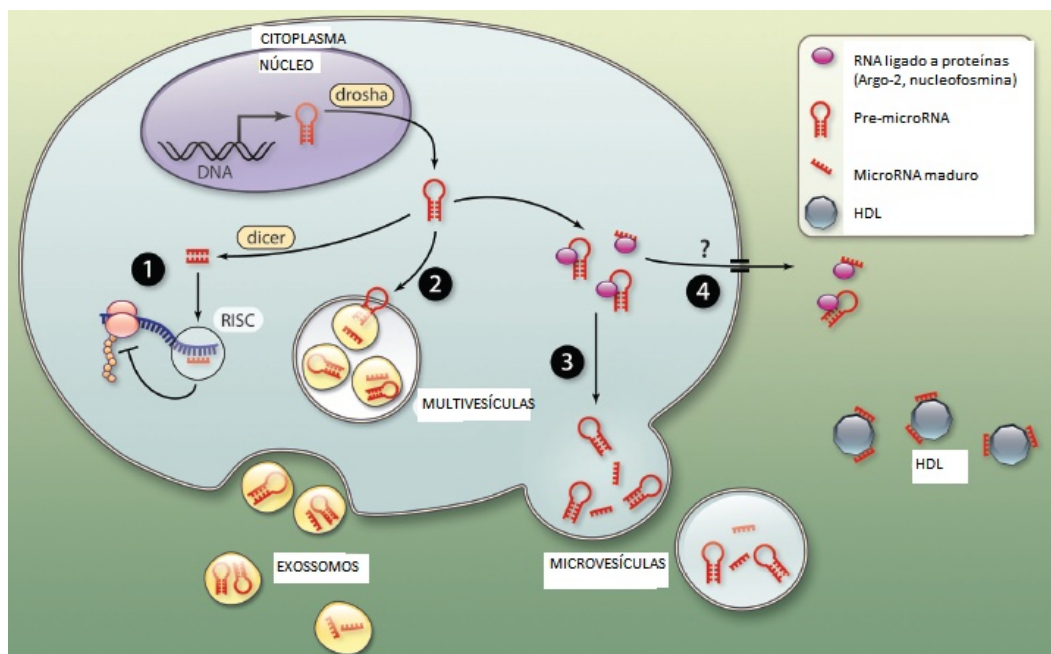


Figura 2. Mecanismos de liberação celular e sistema de transporte extracelular dos microRNAs. Adaptado de CREEMERS, TIJSEN e PINTO (2012).

A outra fita de RNA, que não foi direcionada para o RISC, pode ser degradada ou liberada da célula por meio de diferentes mecanismos de transporte extracelular (Figura 2; rotas 2 a 4). No citoplasma, os pré-miRs podem ser incorporados em pequenas vesículas (exossomos) e liberados das células quando corpúsculos multivesiculares se fundem com a membrana plasmática (Figura 2; rota 2). Alternativamente, os microRNAs citoplasmáticos (pré-miR ou microRNA maduro) podem ser liberados da célula por microvesículas que se formam a partir da membrana plasmática (Figura 2; rota 3). Os microRNAs também são encontrados na circulação na forma livre de micropartículas. Ou ainda, estes microRNAs podem estar associados com lipoproteínas de alta densidade (HDL) ou com proteínas de ligação ao RNA (Figura 2; rota 4). Ainda não se sabe como esses complexos formados por microRNA-proteína são liberados a partir da célula. Eles podem ser liberados de forma passiva, como subprodutos de células mortas, ou de forma ativa, através da interação com canais de membrana ou proteínas específicas. Embora os pré-miRs tenham sido detectados em exossomos e microvesículas, e os microRNAs maduros tenham sido encontrados em complexos com a argonata-2 e o HDL, a proporção exata de pré-miRs e microRNAs maduros existentes nos diferentes compartimentos extracelulares ainda é desconhecida (CREEMERS, TIJSEN e PINTO, 2012).

1.2.2. MicroRNAs nas Doenças Cardíacas

Os microRNAs regulam o tamanho e função dos cardiomiócitos, o potencial de ação, a angiogênese e o remodelamento cardíaco (VAN ROOIJ et al., 2006; VAN ROOIJ et al., 2007; CATALUCCI, LATRONICO e CONDORELLI, 2008; CATALUCCI, GALLO e CONDORELLI, 2009; OLIVEIRA-CARVALHO et al., 2012; LEITE-MOREIRA et al., 2013; OIKONOMOU et al., 2013; ZHOU et al., 2013). Vários microRNAs estão presentes especificamente em alguns tecidos ou células (OLIVEIRA-CARVALHO et al., 2012), tais como os microRNAs -let-7, -1, -26a, -30c e -126, que são altamente expressos no músculo cardíaco (DIVAKARAN e MANN, 2008). Os microRNAs são regulados durante o processo de estresse cardíaco agudo e também durante a resposta compensatória do coração a uma lesão crônica ou

sobrecarga hemodinâmica (VAN ROOIJ et al., 2007; OLIVEIRA-CARVALHO et al., 2012; ZHOU et al., 2013).

1.2.3. MicroRNAs na Hipertrofia Ventricular

A hipertrofia cardíaca pode ocorrer naturalmente e de forma reversível durante o crescimento, a gravidez e o exercício físico como um processo fisiológico, sem consequências deletérias. Ou, também, a hipertrofia pode ocorrer em resposta a estímulos patológicos sustentados, como a sobrecarga hemodinâmica ou a isquemia. Inicialmente, a hipertrofia cardíaca é um processo adaptativo que preserva a função miocárdica e normaliza a tensão da parede vascular sob estresse. Porém, com o tempo, este processo leva à morte celular, vascularização anormal, inflamação, fibrose e reativação de genes fetais, constituindo um fator de risco e preditor de pior prognóstico na IC (LEITE-MOREIRA et al., 2013). A hipertrofia fisiológica é caracterizada por alterações de expressão gênica distintas daquelas vistas na hipertrofia patológica e vários estudos mostraram que os microRNAs são diferencialmente e temporalmente regulados durante a hipertrofia cardíaca e a IC (FU et al., 2013; LEITE-MOREIRA et al., 2013; ZHOU et al., 2013).

O miR-21 tem sua expressão induzida pelo estresse cardíaco e age como um regulador do crescimento cardíaco e da ativação de genes fetais em cardiomiócitos primários *in vitro* e *in vivo* (ZHOU et al., 2013). Enquanto Tatsuguchi e colaboradores (2007) mostraram que o nocaute do miR-21 acentua a hipertrofia, Cheng et al. (2007) demonstraram que o nocaute do miR-21 é capaz de suprimir o crescimento do cardiomiócito bem como a expressão de genes fetais. Em modelos animais de hipertrofia cardíaca induzida por Ang II e fenilefrina, a hipertrofia dos miócitos foi acompanhada por um aumento de quatro a cinco vezes na expressão do miR-21. Além disso, quando realizado o nocaute deste microRNA, ocorreu uma inibição parcial do crescimento celular e síntese proteica mediados por Ang II e fenilefrina nos cardiomiócitos de ratos neonatos (CHENG et al., 2007).

Recentemente, nosso grupo avaliou o papel dos microRNAs no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca fisiológica, em um modelo animal com hipertrofia induzida pelo exercício físico voluntário. O perfil de expressão foi determinado pelo microarranjo de um “pool” de microRNAs de animais treinados e

animais sedentários. O grupo que se exercitou por 7 dias teve 35 microRNAs desregulados positiva ou negativamente, e o grupo que se exercitou por 35 dias teve 25 microRNAs desregulados em comparação aos respectivos grupos sedentários. Os microRNAs com as maiores modificações positivas no padrão de expressão foram os microRNAs -149*, -341*, -1224, -1892* e -3077*, enquanto os microRNAs com a maior redução de expressão foram o miR-21, miR-26b, miR-150 e miR-499 (Figura 3) (MARTINELLI et al., 2011). Posteriormente, vários destes microRNAs foram submetidos à validação pela técnica de qRT-PCR. Para as amostras correspondentes ao protocolo em 7 dias, observou-se que a expressão do miR-26b e do miR-143 estava diminuída no grupo exercitado em relação ao grupo sedentário, enquanto a expressão do miR-150 estava aumentada no grupo exercitado. Para as análises em 35 dias, verificou-se que a expressão do miR-27a estava diminuída, enquanto a expressão do miR-150 estava aumentada no grupo exercitado quando comparado ao grupo sedentário. Os microRNAs que foram diferencialmente expressos entre os animais exercitados e sedentários têm como alvos genes que atuam nas vias de adaptação metabólica, crescimento celular e apoptose (MARTINELLI et al., 2012).

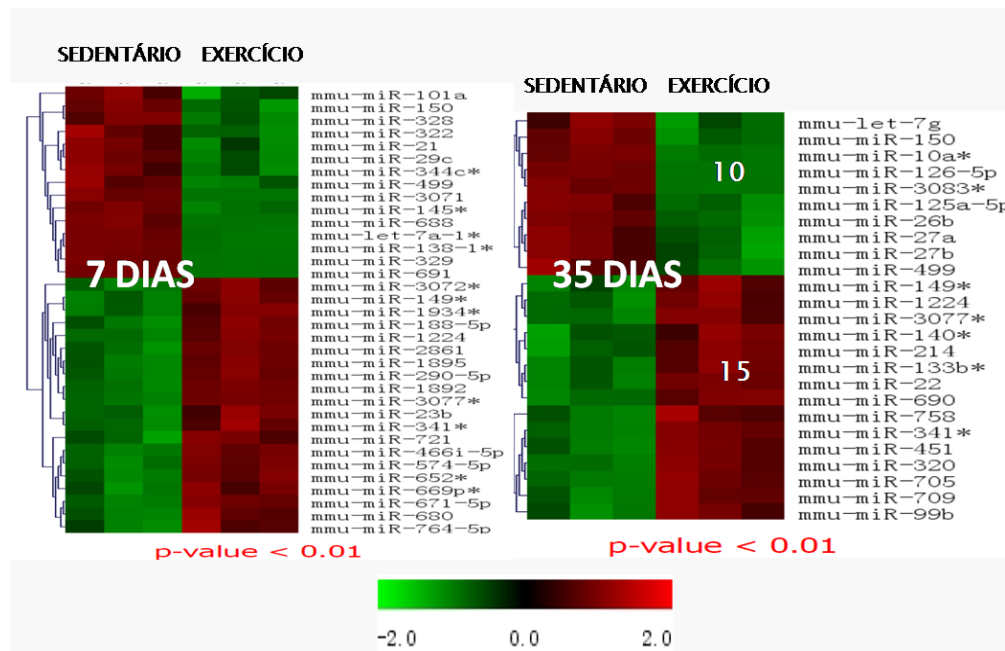


Figura 3. Microarranjo de microRNAs em camundongos sedentários e exercitados (7 dias [esquerda] e 35 dias [direita]) demonstrando aqueles com redução de expressão (cor verde) e incremento de expressão (cor vermelha) (MARTINELLI et al., 2011).

1.2.4. MicroRNAs no Infarto Agudo do Miocárdio

Diversos estudos têm demonstrado a importância dos níveis de microRNAs cardio-específicos como biomarcadores no IAM, tais como o miR-1, miR-133 e miR-499 (WANG et al., 2010; LI et al., 2012; SALIC e DE WINDT, 2012). Wang e colaboradores (2010) compararam os níveis de expressão de microRNAs em amostras de plasma e tecido de humanos e de ratos com IAM. No estudo foi evidenciado que a expressão do miR-208 estava aumentada no plasma de ratos após a indução do IAM, sugerindo a presença de microRNAs na circulação sanguínea quando há lesão no coração. Nos indivíduos saudáveis, os níveis plasmáticos do miR-208 foram indetectáveis, enquanto que nos pacientes com IAM estavam muito aumentados (WANG et al., 2010).

Recentemente, Gidlöf et al. (2013) avaliaram os microRNAs circulantes cardio-específicos miR-1, -208b e -499-5p em pacientes submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio em dois sítios: artéria periférica (após a cardioplegia) e seio coronário (antes e após a cirurgia). Os níveis do miR-208b estavam 3,5 vezes aumentados no seio coronário quando comparados aos níveis na artéria periférica pós-cardioplegia. Esses resultados mostram que o miR-208b é liberado do miocárdio em resposta à isquemia. Além disso, os microRNAs -208b e -499-5p foram indetectáveis no seio coronário antes da cardioplegia, mas tornaram-se detectáveis imediatamente após o procedimento.

Neste mesmo estudo também foram avaliados os níveis circulantes dos microRNAs -1, -208b e -499-5p em pacientes com suspeita de síndrome coronariana aguda divididos em 3 grupos, que incluíram os pacientes infartados com elevação do segmento ST, pacientes infartados sem elevação do segmento ST e grupo não-infartado. Os níveis do miR-208b e miR-499-5p foram mais elevados em ambos os grupos infartados em comparação aos pacientes sem IAM. Os níveis dos microRNAs -208b e -499-5p também foram maiores no grupo com elevação do segmento ST do que nos pacientes sem elevação do segmento ST. Ainda, os níveis do miR-1 foram ligeiramente maiores nos pacientes infartados sem elevação do segmento ST comparados com o grupo sem IAM (GIDLÖF et al., 2013).

1.2.5. MicroRNAs na Insuficiência Cardíaca

Diversos estudos em humanos e em modelos animais têm demonstrado que os microRNAs são diferencialmente expressos na IC e desempenham um papel crítico na patogênese desta doença, modulando vários aspectos do seu fenótipo (BAGNALL et al., 2012; OLIVEIRA-CARVALHO et al., 2012; DUYGU, POELS e DA COSTA MARTINS, 2013; OIKONOMOU et al., 2013; ZHOU et al., 2013; SCHMITTER, COTTER e VOORS, no prelo). Ikeda e colaboradores (2007) avaliaram o perfil de expressão de microRNAs em biópsias de VE de pacientes com cardiomiopatia dilatada, isquêmica ou com estenose aórtica e demonstraram que, nas doenças cardíacas, os microRNAs apresentam padrões de expressão alterados que variam conforme a etiologia da doença. Recentemente, uma análise em larga escala do miRNOMA mostrou que o coração humano expressa mais de 800 microRNAs, sendo que mais de 250 foram diferencialmente expressos de acordo com a etiologia da cardiomiopatia (dilatada ou hipertrófica) (LEPTIDIS et al., 2013).

Em um estudo prospectivo, Satoh et al. (2011) investigaram o nível de expressão do miR-let-7i, miR-126 e miR-155 em amostras de biópsia miocárdica de 103 japoneses com cardiomiopatia dilatada e 37 indivíduos sem disfunção do VE. Os níveis destes microRNAs foram menores nos pacientes do que nos controles. Os pacientes foram acompanhados por aproximadamente 1,5 ano e foram avaliados quanto à mortalidade por todas as causas e ao desenvolvimento de IC. Os autores verificaram que os pacientes com os menores níveis do miR-let-7i tiveram o pior prognóstico (SATOH et al., 2011).

Os microRNAs também podem ser exportados ou liberados pelas células na circulação em uma forma estável. Suas sequências são evolutivamente conservadas e, frequentemente, sua expressão é específica de um tecido ou doença, características que são úteis no desenvolvimento de ensaios sensíveis e específicos. Assim, a descoberta dos microRNAs circulantes sugeriu a possibilidade de utilização do padrão de expressão destas moléculas como biomarcadores, avaliados de forma não-invasiva, para prever o desenvolvimento, diagnosticar, classificar, avaliar o prognóstico e monitorar o tratamento da IC (GAGGIN e JANUZZI, 2013; LEITE-MOREIRA et al., 2013; OIKONOMOU et al., 2013;

SCHMITTER, COTTER e VOORS, no prelo). Nesse contexto, vários estudos têm determinado os níveis de microRNAs circulantes em pacientes com IC e avaliado o seu potencial como biomarcadores desta doença (ADACHI et al., 2010; CORSTEN et al., 2010; TIJSEN et al., 2010; FUKUSHIMA et al., 2011; GOLDRACH et al., 2012; GOREN et al., 2012; ENDO et al., 2013; FAN et al., 2013; GIDLÖF et al., 2013; QIANG et al., 2013) (Tabela 3).

Tabela 3. MicroRNAs Circulantes (Plasma e Soro) na Insuficiência Cardíaca em Humanos

Referência	População de Estudo	Principal Resultado	Amostra
Adachi et al. (2010)	15 pacientes 10 controles	Níveis indetectáveis do miR-499	Plasma
Corsten et al. (2010)	33 pacientes 34 controles	↑ Expressão do miR-499	Plasma
Tijssen et al. (2010)	30 pacientes com IC, 20 com dispnéia sem IC e 39 controles	↑ Expressão do miR-423-5p	Plasma
Fukushima et al. (2011)	10 pacientes 17 controles	↑ Expressão do miR-126	Plasma
Goldraich et al. (2012)	16 pacientes 10 controles	Gradiente transcoronariano para o miR-423-5p	Plasma
Goren et al. (2012)	30 pacientes 30 controles	↑ Expressão dos miRs -22, -92b, 320a e 423-5p	Soro
Endo et al. (2013)	52 pacientes 6 controles	↑ Expressão do miR-210	Plasma
Fan et al. (2013)	45 pacientes 39 controles	↑ Expressão do miR-423-5p	Plasma

O primeiro estudo que explorou a expressão diferencial de microRNAs plasmáticos na IC incluiu pacientes com IC e queixa de dispnéia e pacientes com dispnéia não relacionada com a IC, no cenário clínico que teve como objetivo simular a utilidade dos peptídeos natriuréticos na definição do diagnóstico (TIJSEN et al., 2010). Entre 16 microRNAs identificados no microarranjo, seis foram validados quantitativamente por qRT-PCR em pacientes com IC e sem IC com dispnéia (microRNAs -18b, -129-5p, -423-5p, -622, -675 e -1254). O miR-423-5p demonstrou uma excelente capacidade para diferenciar pacientes com IC de indivíduos saudáveis e de pacientes sem IC com dispnéia, independentemente de idade ou gênero. Os níveis destes microRNAs também foram correlacionados positivamente com os níveis de NT-pró-BNP e negativamente com a FEVE. O aumento dos níveis plasmáticos do miR-423-5p foi confirmado pelo aumento de três vezes na sua expressão no tecido cardíaco pós-morte de indivíduos que faleceram devido à cardiomiopatia dilatada em comparação aos indivíduos que morreram de causas não-cardíacas (TIJSEN et al., 2010).

Ainda em 2010, Corsten et al. isolaram microRNAs plasmáticos de pacientes com graus variados de dano cardíaco (IAM, miocardite viral, disfunção diastólica e IC aguda). Entre os 33 pacientes com IC aguda, seis microRNAs foram analisados, dentre os quais somente o miR-499 apresentou níveis elevados em comparação aos indivíduos saudáveis. No mesmo ano, Adachi e colaboradores mediram a concentração plasmática do miR-499 em 14 indivíduos com síndrome coronariana aguda, 15 pacientes com IC congestiva e 10 indivíduos sem doenças cardiovasculares. Os níveis do miR-499 encontravam-se aumentados nos pacientes com IAM, mas estavam abaixo do limite de detecção nos indivíduos com IC e nos controles (ADACHI et al., 2010).

Posteriormente, Fukushima et al. (2011) avaliaram três microRNAs em 10 pacientes com IC de etiologia isquêmica e 17 controles. Os níveis plasmáticos do miR-126 estavam aumentados nos pacientes e apresentavam correlação negativa com a idade, o BNP e a classe funcional. Já no estudo de Goren et al. (2012), 186 microRNAs foram avaliados em 30 pacientes com IC por disfunção sistólica e 30

indivíduos saudáveis. Um escore baseado nos níveis séricos de 4 microRNAs – miR-22, miR-92b, miR-320a e miR-423-5p – foi capaz de identificar os pacientes com IC e também estava correlacionado com os níveis elevados de BNP, maior amplitude do complexo QRS no eletrocardiograma e dilatação do VE, entre outros aspectos funcionais. Recentemente, Fan e cols. (2013) analisaram os níveis dos microRNAs -126, -146a, -155, -361-5p e -423-5p no plasma de chineses com cardiomiopatia dilatada. Os resultados mostraram o aumento da expressão do miR-423-5p nos pacientes com cardiomiopatia dilatada quando comparados aos indivíduos controles. Em paralelo, demonstrou-se que as concentrações plasmáticas deste microRNA correlacionavam-se positivamente com os níveis do NT-pró-BNP e apresentaram acurácia diagnóstica para distinguir os indivíduos controles dos pacientes com cardiomiopatia dilatada.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa avaliou a expressão do miR-133a e do miR-423-5p no plasma de 16 pacientes estáveis com IC sistólica e de 10 indivíduos sem história de doença cardiovascular. Amostras simultâneas foram obtidas de veia femoral, artéria femoral e seio coronário. O objetivo era verificar a presença de um gradiente transcárdico nos pacientes com IC, definido como a diferença de expressão entre seio coronário e artéria femoral. A expressão do miR-423-5p foi semelhante entre casos e controles nas amostras obtidas da artéria femoral, veia femoral e seio coronário. Também não houve diferença de expressão do miR-423-5p entre pacientes isquêmicos e não-isquêmicos. No entanto, o gradiente transcárdico do miR-423-5p foi positivo entre os pacientes, enquanto os controles demonstraram valores negativos, sugerindo a produção e/ou liberação miocárdica do miR-423-5p nessa condição (GOLDRAICH et al., 2012).

Em um estudo chinês, investigou-se a relação entre os níveis de microRNAs nas células progenitoras endoteliais obtidas de 106 pacientes com IC e a mortalidade cardiovascular, após um período de seguimento de 24 meses. Os autores observaram que 16 microRNAs foram diferencialmente expressos entre pacientes com IC de etiologia isquêmica e não-isquêmica. Porém, apenas o miR-126 e o miR-508-5p foram independentemente associados à mortalidade (QIANG et al., 2013).

Dois estudos publicados em 2013 avaliaram microRNAs circulantes quanto a sua capacidade de prever o desenvolvimento de IC em pacientes que sofreram

IAM. No estudo de Matsumoto et al. (2013), os pacientes que desenvolveram IC dentro de um ano após o IAM apresentavam níveis séricos mais elevados de três microRNAs responsivos à proteína p53 (miR-34a, miR-192 e miR-194) na fase convalescente do IAM (primeiras semanas após o evento). Da mesma forma, um estudo sueco com pacientes com síndrome coronariana aguda observou que o miR-208b e o miR-499-5p estavam associados com o aumento no risco de morte e desenvolvimento de IC trinta dias após o IAM (GIDLÖF et al., 2013).

Endo e colaboradores (2013) avaliaram os níveis de expressão do miR-210 em pacientes com IC nas classes funcionais II, III e IV e também em um modelo experimental de IC induzida por dieta rica em sal utilizando-se ratos sensíveis ao sal (Dahl). Nos animais, os níveis plasmáticos e a expressão do miR-210 nas células mononucleares e no músculo esquelético estavam aumentados. Além disso, os níveis de expressão do miR-210 nas células mononucleares foram mais elevados nos pacientes nas classes III e IV em comparação aos pacientes na classe II e nos indivíduos controles. Embora os níveis plasmáticos do miR-210 não estivessem correlacionados com os níveis de BNP, os pacientes que apresentaram redução nos níveis de BNP na consulta ambulatorial subsequente (três meses após a primeira coleta) também apresentaram níveis menores do miR-210 (ENDO et al., 2013).

Em um estudo baseado no modelo experimental de doença cardíaca induzida por hipertensão, também utilizando-se ratos sensíveis ao sal (Dahl), foi avaliado se os microRNAs plasmáticos podem ser utilizados como indicadores da progressão da doença ou eficácia terapêutica. Os autores observaram que os níveis circulantes do miR-16, miR-20b, miR-93, miR-106b, miR-223 e miR-423-5p estavam aumentados em resposta à IC induzida por hipertensão, ao passo que este efeito foi atenuado com o tratamento com o antimiR-208a bem como com um inibidor da enzima conversora de angiotensina. Os níveis destes microRNAs aumentaram durante a progressão da doença e estavam correlacionados aos níveis de BNP (DICKINSON et al., 2013).

2. JUSTIFICATIVA DE PESQUISA

A IC apresenta alta morbidade e mortalidade nos países em desenvolvimento. A fisiopatologia da síndrome é complexa, envolvendo diversos sistemas contrarregulatórios que regulam a viabilidade celular, apoptose, remodelamento da matriz extracelular, formação de cicatriz fibrótica e angiogênese. Os microRNAs têm um papel central na sua regulação e, recentemente, vários investigadores avaliaram a possibilidade de utilizar a mensuração plasmática de microRNAs como biomarcadores de determinadas patologias, fornecendo uma alternativa à análise tecidual. Porém, é reconhecido que a maioria desses estudos é limitada pela falta de protocolos laboratoriais padronizados, tamanho amostral pequeno e alto grau de variabilidade entre os grupos estudados. Assim, estudos adicionais são necessários para entender o papel dos microRNAs na patogênese da IC e selecionar aqueles com o maior potencial de se tornarem biomarcadores desta doença.

O estado congestivo, no cenário da IC aguda descompensada, é um momento de intenso metabolismo celular, com incremento de marcadores de lesão celular e de “turnover” de matriz extracelular, culminando com a progressão do remodelamento ventricular. Até o momento, nenhum estudo prospectivo avaliou o perfil de expressão de microRNAs em estados compensados e descompensados da IC. No presente estudo, avaliamos o perfil de expressão de três microRNAs plasmáticos em pacientes com IC em três momentos diferentes: no estado de descompensação (na admissão na emergência), após compensação clínica inicial (na alta hospitalar) e 3 meses após a alta hospitalar (na consulta ao ambulatório).

Os três microRNAs avaliados neste estudo (miR-21, miR-126 e miR-423-5p) foram selecionados como potenciais candidatos com base na importância sugerida nos estudos de IAM e IC em modelos animais e cultura celular assim como nos estudos clínicos em humanos. Também consideramos, nesta escolha, os microRNAs que fossem preferencialmente expressos em diferentes tipos celulares e que estivessem envolvidos em diferentes aspectos do metabolismo celular, como é o caso do miR-21 (expresso nos fibroblastos, induz fibrose) e do miR-126 (expresso nas células endoteliais, induz angiogênese). O miR-423-5p, com função ainda não esclarecida, tem sido consistentemente associado ao diagnóstico clínico do IAM e da IC, revelando-se, até o momento, como o melhor preditor destas doenças.

3. HIPÓTESES CONCEITUAIS

H1. A descompensação clínica e o estado congestivo estão associados à regulação positiva e negativa da expressão de microRNAs cardio-específicos em pacientes com IC.

H2. Os níveis plasmáticos de microRNAs nos pacientes com IC descompensada estão alterados quando comparados ao estado compensado (clinicamente estável), servindo potencialmente como biomarcadores não-invasivos para fins prognósticos na IC.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

O presente estudo tem por finalidade avaliar a expressão de três microRNAs em pacientes com IC nos estados descompensado, parcialmente compensado e compensado (cl clinicamente estável).

4.2. Objetivos Específicos

1. Verificar se existe diferença nos níveis plasmáticos dos microRNAs -21, -126 e -423-5p em pacientes com IC em três diferentes momentos: no estado descompensado (admissão na emergência), no estado parcialmente compensado (alta hospitalar) e compensado clinicamente (90 dias após a alta hospitalar).

2. Avaliar a correlação dos microRNAs -21, -126 e -423-5p com parâmetros clínicos, eletrocardiográficos e ecocardiográficos de função cardíaca (etiologia, complexo QRS, FEVE e diâmetro sistólico e diastólico do VE).

3. Avaliar a expressão dos microRNAs -21, -126 e -423-5p como potenciais biomarcadores de descompensação para a IC (em comparação ao BNP).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADACHI T, NAKANISHI M, OTSUKA Y, NISHIMURA K, HIROKAWA G, GOTO Y, NONOGI H, IWAI N. Plasma microRNA 499 as a biomarker of acute myocardial infarction. *Clin Chem*. 2010;56:1183-1185.
- BAGNALL RD, TSOUTSMAN T, SHEPHARD RE, RITCHIE W, SEMSARIAN C. Global microRNA profiling of the mouse ventricles during development of severe hypertrophic cardiomyopathy and heart failure. *PLoS One*. 2012;7:e44744.
- BISHU K, DESWAL A, CHEN HH, LEWINTER MM, LEWIS GD, SEMIGRAN MJ, BORLAUG BA, MCNULTY S, HERNANDEZ AF, BRAUNWALD E, REDFIELD MM. Biomarkers in acutely decompensated heart failure with preserved or reduced ejection fraction. *Am Heart J*. 2012;164:763-770.e3.
- BOCCHI EA, ARIAS A, VERDEJO H, DIEZ M, GÓMEZ E, CASTRO P; Interamerican Society of Cardiology. The reality of heart failure in Latin America. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62:949-958.
- BOCCHI EA, BRAGA FGM, FERREIRA SMA, ROHDE LEP, OLIVEIRA WA, ALMEIDA DR, MOREIRA MCV, ALMEIDA DR, BESTETTI RB, BORDIGNON S, AZEVEDO C, TINOCO EM, ROCHA RM, ISSA VS, FERRAZ A, CRUZ FD, VEIGA G, MONTERA VSP, ALBURQUERDE DC, BACAL F, SOUZA GEC, NETO JMR, CLAUSELL NO, MARTINS SM, SILICIANO A, NETO JDS, MOREIRA LF, TEIXEIRA AR, MOURA LZ, SILVA LB, RASSI S, AZEKA E, HOROWITZ E, RAMIRES F, SIMÕES MV, CASTRO RBP, SALEMI VMC, JUNIOR HV, VILA JH, SIMÕES R, ALBANESI F, MONTERA MW. III Diretriz da Sociedade Brasileira de Insuficiência Cardíaca Aguda. *Arq Bras Cardiol*. 2009;93(3 supl.3):1-65.
- BRAUNWALD E. Biomarkers in heart failure. *N Engl J Med*. 2008;358:2148-2159.
- BROWN JR, GOTTLIEB SS. Acute decompensated heart failure. *Cardiol Clin*. 2012;30:665-671.
- BRAUNWALD E. Research advances in heart failure: a compendium. *Circ Res*. 2013;113:633-645.
- BURCHFIELD JS, XIE M, HILL JA. Pathological ventricular remodeling – Mechanisms: Part 1 of 2. *Circulation*. 2013;128:388-400.
- CATALUCCI D, GALLO P, CONDORELLI G. MicroRNAs in cardiovascular biology and heart disease. *Circ Cardiovasc Genet*. 2009;2:402-408.
- CATALUCCI D, LATRONICO MV, CONDORELLI G. MicroRNAs control gene expression importance for cardiac development and pathophysiology. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1123:20-29.

- CHATTERJEE K. Pathophysiology of systolic and diastolic heart failure. *Med Clin N Am.* 2012;96:891-899.
- CHENG YH, JI RR, YUE JM, YANG J, LIU XJ, CHEN H, DEAN DB, ZHANG CX. MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart - do they play a role in cardiac hypertrophy? *Am J Pathol.* 2007;170:1831-1840.
- CHOWDHURY P, CHOUDHARY R, MAISEL A. The appropriate use of biomarkers in heart failure. *Med Clin North Am.* 2012;96:901-913.
- CORDES KR, SRIVASTAVA D, IVEY KN. MicroRNAs in cardiac development. *Pediatr Cardiol.* 2010;31:349-356.
- CORSTEN MF, DENNERT R, JOCHEMS S, KUZNETSOVA T, DEVAUX Y, HOFSTRA L, WAGNER DR, STAESSEN JA, HEYMANS S, SCHROEN B. Circulating microRNA-208b and microRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet.* 2010;3:499-506.
- CREEMERS EE, TIJSEN AJ, PINTO YM. Circulating microRNAs novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circ Res.* 2012;110:483-495.
- DICKINSON BA, SEMUS HM, MONTGOMERY RL, STACK C, LATIMER PA, LEWTON SM, LYNCH JM, HULLINGER TG, SETO AG, VAN ROOIJ E. Plasma microRNAs serve as biomarkers of therapeutic efficacy and disease progression in hypertension-induced heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2013;15:650-659.
- DIVAKARAN V, MANN DL. The emerging role of microRNAs in cardiac remodeling and heart failure. *Circ Res.* 2008;103:1072-1083.
- DUYGU B, POELS EM, DA COSTA MARTINS PA. Genetics and epigenetics of arrhythmia and heart failure. *Front Genet.* 2013;4:219. doi: 10.3389/fgene.2013.00219.
- ENDO K, NAITO Y, JI X, NAKANISHI M, NOGUCHI T, GOTO Y, NONOGI H, MA X, WENG H, HIROKAWA G, ASADA T, KAKINOKI S, YAMAOKA T, FUKUSHIMA Y, IWAI N. MicroRNA 210 as a biomarker for congestive heart failure. *Biol Pharm Bull.* 2013;36:48-54.
- FAN KL, ZHANG HF, SHEN J, ZHANG Q, LI XL. Circulating microRNAs levels in Chinese heart failure patients caused by dilated cardiomyopathy. *Indian Heart J.* 2013;65:12-16.
- FU S, ZHUO R, YAO M, ZHANG J, ZHOU H, XIAO J. MicroRNA basis of physiological hypertrophy. *Front Genet.* 2013;26:253. doi: 10.3389/fgene.2013.00253.
- FUKUSHIMA Y, NAKANISHI M, NONOGI H, GOTO Y, IWAI N. Assessment of plasma miRNAs in congestive heart failure. *Circ J.* 2011;75:336-340.

- GAGGIN HK, JANUZZI Jr JL. Biomarkers and diagnostics in heart failure. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832:2442-2450.
- GIDLÖF O, SMITH JG, MIYAZU K, GILJE P, SPENCER A, BLOMQUIST S, ERLINGE D. Circulating cardio-enriched microRNAs are associated with long-term prognosis following myocardial infarction. *BMC Cardiovasc Disord*. 2013;13:12.
- GIVERTZ MM, TEERLINK JR, ALBERT NM, WESTLAKE CANARY CA, COLLINS SP, COLVIN-ADAMS M, EZEKOWITZ JA, FANG JC, HERNANDEZ AF, KATZ SD, KRISHNAMANI R, STOUGH WG, WALSH MN, BUTLER J, CARSON PE, DIMARCO JP, HERSHBERGER RE, ROGERS JG, SPERTUS JA, STEVENSON WG, SWEITZER NK, TANG WH, STARLING RC. Acute decompensated heart failure: update on new and emerging evidence and directions for future research. *J Card Fail*. 2013;19:371-389.
- GOLDRAICH L, CLAUSELL N, BIOLO A, BECK-DA-SILVA L, ROHDE LE. Clinical predictors of preserved left ventricular ejection fraction in decompensated heart failure. *Arq Bras Cardiol*. 2010;94:364-71,385-93.
- GOLDRAICH L, MARTINELLI NC, COHEN CR, MATTE U, PIMENTEL M, CLAUSELL N, ROHDE LE. Gradiente transcárdaco de miR-423-5p sugere expressão alterada/desregulada em pacientes com insuficiência cardíaca. *Arq Bras Cardiol*. 2012;99(4 supl.3):6.
- 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;14:147-154.
- HUTVAGNER G, SIMARD MJ. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9:22-32.
- IKEDA S, KONG SW, LU J, BISPING E, ZHANG H, ALLEN PD, GOLUB TR, PIESKE B, PU WT. Altered microRNA expression in human heart disease. *Physiol Genomics*. 2007;31:367-373.
- JACKSON G, GIBBS CR, DAVIES MK, LIP GY. ABC of heart failure pathophysiology. *BMJ*. 2000;320:167-170.
- JOFFE SW, WEBSTER K, MCMANUS DD, KIERNAN MS, LESSARD D, YARZEBSKI J, DARLING C, GORE JM, GOLDBERG RJ. Improved survival after heart failure: a community-based perspective. *J Am Heart Assoc*. 2013;2:e000053. doi: 10.1161/JAHA.113.000053.
- KUMARSWAMY R, THUM T. Non-coding RNAs in cardiac remodeling and heart failure. *Circ Res*. 2013;113:676-689.

- LASSUS JP, SIIRILÄ-WARIS K, NIEMINEN MS, TOLONEN J, TARVASMÄKI T, PEUHKURINEN K, MELIN J, PULKKI K, HARJOLA VP; FINN-AKVA Study Group. Long-term survival after hospitalization for acute heart failure - differences in prognosis of acutely decompensated chronic and new-onset acute heart failure. *Int J Cardiol.* 2013;168:458-462.
- LEITE-MOREIRA AM, LOURENÇO AP, FALCÃO-PIRES I, LEITE-MOREIRA AF. Pivotal role of microRNAs in cardiac physiology and heart failure. *Drug Discov Today.* 2013;18:1243-1249.
- LEPTIDIS S, EL AZZOUZI H, LOK SI, DE WEGER R, OLIESLAGERS S, KISTERS N, SILVA GJ, HEYMANS S, CUPPEN E, BEREZIKOV E, DE WINDT LJ, DA COSTA MARTINS P. A deep sequencing approach to uncover the miRNOME in the human heart. *PLoS One.* 2013;8:e57800.
- LI C, PEI F, ZHU X, DUAN DD, ZENG C. Circulating microRNAs as novel and sensitive biomarkers of acute myocardial Infarction. *Clin Biochem.* 2012;45:727-732.
- LIM LP, LAU NC, GARRETT-ENGELE P, GRIMSON A, SCHELTER JM, CASTLE J, BARTEL DP, LINSLEY PS, JOHNSON JM. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature.* 2005;433:769-773.
- LUERS C, SUTCLIFFE A, BINDER L, IRLE S, PIESKE B. NT-proANP and NT-proBNP as prognostic markers in patients with acute decompensated heart failure of different etiologies. *Clin Biochem.* 2013;46:1013-1019.
- MANN DL, BRISTOW MR. Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond. *Circulation.* 2005;111:2837-2849.
- MARTINELLI NC, COHEN CR, SCHNEIDER SIR, FRICK LM, ANDRADES ME, SANTOS KG, CLAUSELL N, BIOLO A, ROHDE LE. A expressão de microRNAs no coração de camundongos é modificada pela hipertrofia cardíaca induzida pelo exercício físico voluntário. *Arq Bras Cardiol.* 2011;97(3 supl.1):37.
- MARTINELLI NC, COHEN CR, SCHNEIDER S, SANTOS K, ANDRADES ME, CLAUSELL N, BIOLO A, ROHDE LE. MicroRNAs modulation in a mice model of physiological left ventricular hypertrophy. *Circulation.* 2012;126:A19631.
- MASSIE BM, CARSON PE, MCMURRAY JJ, KOMAJDA M, MCKELVIE R, ZILE MR, ANDERSON S, DONOVAN M, IVERSON E, STAIGER C, PTASZYNSKA A; I-PRESERVE Investigators. Irbesartan in patients with heart failure and preserved ejection fraction. *N Engl J Med.* 2008;359:2456-2467.
- MATSUMOTO S, SAKATA Y, SUNA S, NAKATANI D, USAMI M, HARA M, KITAMURA T, HAMASAKI T, NANTO S, KAWAHARA Y, KOMURO I. Circulating p53-responsive microRNAs are predictive indicators of heart failure after acute myocardial infarction. *Circ Res.* 2013;113:322-326.

- NAGARAJAN V, TANG WH. Management of comorbid conditions in heart failure: a review. *Med Clin N Am*. 2012;96:975-985.
- OIKONOMOU E, SIASOS G, TOUSOULIS D, KOKKOU E, GENIMATA V, ZISIMOS K, LATSIOS G, STEFANADIS C. Diagnostic and therapeutic potentials of microRNAs in heart failure. *Curr Top Med Chem*. 2013;13:1548-1558.
- OLIVEIRA-CARVALHO V, CARVALHO VO, SILVA MM, GUIMARÃES GV, BOCCHI EA. MicroRNAs: a new paradigm in the treatment and diagnosis of heart failure? *Arq Bras Cardiol*. 2012;98:362-369.
- PALAZZUOLI A, GALLOTTA M, QUATRINI I, NUTI R. Natriuretic peptides (BNP and NT-proBNP): measurement and relevance in heart failure. *Vasc Health Risk Manag*. 2010;6:411-418.
- PEREIRA-BARRETTO AC, DEL CARLO CH; CARDOSO JN, OCHIAI ME; LIMA MV, CURIATI MC, SCIPIONI AR, RAMIRES JAF. Papel dos níveis de BNP no prognóstico da insuficiência cardíaca avançada descompensada. *Arq Bras Cardiol*. 2013;100:281-287.
- QIANG L, HONG L, NINGFU W, HUAIHONG C, JING W. Expression of miR-126 and miR-508-5p in endothelial progenitor cells is associated with the prognosis of chronic heart failure patients. *Int J Cardiol*. 2013;168:2082-2088.
- RABELO ER, ALITI GB, GOLDRAICH L, DOMINGUES FB, CLAUSELL N, ROHDE LE. Non-pharmacological management of patients hospitalized with heart failure at a teaching hospital. *Arq Bras Cardiol*. 2006;87:352-358.
- RATHI S, DEEDWANIA PC. The epidemiology and pathophysiology of heart failure. *Med Clin North Am*. 2012;96:881-890.
- REMME WJ, SWEDBERG K. Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure, European Society of Cardiology. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure. *Eur Heart J*. 2001;22:1527-1560.
- ROHDE LE. O prognóstico da insuficiência cardíaca no Brasil: a busca de dados confiáveis e representativos. *Arq Bras Cardiol*. 2005;84:281-282.
- ROHDE LE, AIKAWA M, CHENG GC, SUKHOVA G, SOLOMON SD, LIBBY P, PFEFFER J, PFEFFER MA, LEE RT. Echocardiography-derived left ventricular end-systolic regional wall stress and matrix remodeling after experimental myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 1999;33:835-842.
- ROHDE LE, CLAUSELL N, RIBEIRO JP, GOLDRAICH L, NETTO R, WILLIAM DEC TG, POLANCZYK CA. Health outcomes in decompensated congestive heart failure: a comparison of tertiary hospitals in Brazil and United States. *Int J Cardiol*. 2005;102:71-77.

- ROY S, KHANNA S, HUSSAIN SA, BISWAS S, AZAD A, RINK C, GNYAWALI S, SHILO S, NUOVO GJ, SEN CK. MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue. *Cardiovasc Res.* 2009;82:21-29.
- RUDIGER A, HARJOLA VP, MÜLLER A, MATTILA E, SÄILA P, NIEMINEN M, FOLLATH F. Acute heart failure: clinical presentation, one-year mortality and prognostic factors. *Eur J Heart Fail.* 2005;7:662-670.
- SALIC K, DE WINDT LJ. MicroRNAs as biomarkers for myocardial infarction. *Curr Atheroscler Rep.* 2012;14:193-200.
- SATOH M, MINAMI Y, TAKAHASHI Y, TABUCHI T, NAKAMURA M. A cellular microRNA, let-7i, is a novel biomarker for clinical outcome in patients with dilated cardiomyopathy. *J Card Fail.* 2011;17:923-929.
- SCHMITTER D, COTTER G, VOORS AA. Clinical use of novel biomarkers in heart failure: towards personalized medicine. *Heart Fail Rev.* (no prelo) doi: 10.1007/s10741-013-9396-5.
- SERONDE MF, GAYAT E, LOGEART D, LASSUS J, LARIBI S, BOUKEF R, SIBELLAS F, LAUNAY JM, MANIVET P, SADOUNE M, NOUIRA S, SOLAL AC, MEBAZAA A; Great network. Comparison of the diagnostic and prognostic values of B-type and atrial-type natriuretic peptides in acute heart failure. *Int J Cardiol.* 2013;168:3404-3411.
- SLIWA K, MAYOSI BM. Recent advances in the epidemiology, pathogenesis and prognosis of acute heart failure and cardiomyopathy in Africa. *Heart.* 2013;99:1317-1322.
- TATSUGUCHI M, SEOK HY, CALLIS TE, THO MSON JM, CHEN JF, NEWMAN M, ROJAS M, HAMMOND SM, WANG DZ. Expression of microRNAs is dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 2007;42:1137-1141.
- TAVARES LR, VICTER H, LINHARES JM, DE BARROS CM, OLIVEIRA MV, PACHECO LC, VIANA CH, PEREIRA SB, DA SILVA GP, MESQUITA ET. Epidemiology of decompensated heart failure in the city of Niterói: EPICA–Niterói Project. *Arq Bras Cardiol.* 2004;82:121-124.
- THUM T, CATALUCCI D, BAUERSACHS J. MicroRNAs: novel regulators in cardiac development and disease. *Cardiovasc Res.* 2008;79:562-570.
- TIJSEN 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;106:1035-1039.
- TOPKARA VK, MANN DL. Role of microRNAs in cardiac remodeling and heart failure. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2011; 25:171-182.

- UEDA T, KAWAKAMI R, HORII M, SUGAWARA Y, MATSUMOTO T, OKADA S, NISHIDA T, SOEDA T, OKAYAMA S, SOMEKAWA S, TAKEDA Y, WATANABE M, KAWATA H, UEMURA S, SAITO Y. Non-cardiovascular death, especially infection, is a significant cause of death in elderly patients with acutely decompensated heart failure. *J Card Fail.* (no prelo) doi: 10.1016/j.cardfail.2013.12.007.
- VALENCIA-SANCHEZ MA, LIU J, HANNON GJ, PARKER R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev.* 2006;20:515-524.
- VAN ROOIJ E, SUTHERLAND LB, LIU N, WILLIAMS AH, MCANALLY J, GERARD RD, RICHARDSON JA, OLSON EN. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:18255-18260.
- VAN ROOIJ E, SUTHERLAND LB, QI X, RICHARDSON JA, HILL J, OLSON EN. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science.* 2007;316:575-579.
- WANG GK, ZHU JQ, ZHANG JT, LI Q, LI Y, HE J, QIN YW, JING Q. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J.* 2010;31:659-666.
- WATSON RDS, GIBBS CR, LIP GYH. ABC of heart failure: clinical features and complications. *BMJ.* 2000;320:236-239.
- WEST R, LIANG L, FONAROW G, KOCIOL R, MILLS RM, O'CONNOR CM, HERNANDEZ AF. Characterization of heart failure patients with preserved ejection fraction: a comparison between ADHERE-US registry and ADHERE-International registry. *Eur J Heart Fail.* 2011;13:945-952.
- YANCY CW, JESSUP M, BOZKURT B, MASOUDI FA, BUTLER J, MCBRIDE PE, CASEY DE JR, MCMURRAY JJ, DRAZNER MH, MITCHELL JE, FONAROW GC, PETERSON PN, GERACI SA, HORWICH T, JANUZZI JL, JOHNSON MR, KASPER EK, LEVY WC, RIEGEL B, SAM F, STEVENSON LW, TANG WH, TSAI EJ, WILKOFF BL. ACCF/AHA Task Force Members. 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of Heart Failure: A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62:147-239.
- YUSUF S, PFEFFER MA, SWEDBERG K, GRANGER CB, HELD P, MCMURRAY JJ, MICHELSON EL, OLOFSSON B, OSTERGREN J. CHARM INVESTIGATORS AND COMMITTEES. Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and preserved left-ventricular ejection fraction: the CHARM-Preserved Trial. *Lancet.* 2003;362:777-781.

ZAHA A. Controle da expressão gênica em eucariotos. In: ZAHA A, FERREIRA HB e PASSAGLIA LMP (Orgs). *Biologia Molecular Básica*. 4a ed. Artmed: Porto Alegre, p.302-318, 2012.

ZHOU S, LIU Y, PRATER K, ZHENG Y, CAI L. Roles of microRNAs in pressure overload- and ischemia-related myocardial remodeling. *Life Sci*. 2013;93:855-862.

6. ARTIGO ORIGINAL

Plasma MicroRNA Levels Change during Clinical Improvement in Acute Decompensated Heart Failure

Manuscrito em preparação para ser submetido para publicação no periódico
Journal of Cardiac Failure

Plasma MicroRNA Levels Change during Clinical Improvement in Acute Decompensated Heart Failure

STÉFANIE I. R. SCHNEIDER,¹ LUÍS E. ROHDE, MD, PhD,^{1,2,3} NIDIANE C. MARTINELLI, MSc,¹ DAIANE SILVELLO, MSc,¹ ARTHUR GARBIN, MS,¹ ANDRÉIA BIOLO, MD, PhD,^{1,2,3} AND KÁTIA G. SANTOS, PhD^{1,4}

From the ¹Cardiovascular Experimental and Molecular Laboratory, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre; ²Heart Failure and Cardiac Transplant Unit, Cardiology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre; ³Department of Internal Medicine, Medical School, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre and ⁴Laboratory of Human Molecular Genetics, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, Brazil.

Short Title: MicroRNAs in Acute Decompensated Heart Failure

Reprint requests: Kátia G. Santos, PhD, Cardiovascular Experimental and Molecular Laboratory, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Sala 12201, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil. Tel/Fax: +55 51 3359-8844. E-mail: kgsantos2010@gmail.com

Funding: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasília, Brazil and Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do HCPA (FIPE-HCPA), Porto Alegre, Brazil.

ABSTRACT

Background: Circulating microRNA levels are altered in cardiovascular disorders and accumulating evidence suggests that they could be used as specific biomarkers for myocardial damage and chronic heart failure (HF). In this study, we investigated whether plasma levels of microRNAs -21, -126 and -423-5p change according to the (de)compensated state of HF patients admitted to the emergency service for an episode of acute decompensation (ADHF) and could predict short-term clinical outcomes (in-hospital length of stay and all-cause mortality).

Methods and Results: In 63 patients admitted with ADHF, blood samples were collected to measure microRNA and BNP levels within 24 hours of hospital admission, at the time of hospital discharge, and several weeks after discharge in patients who had returned to a chronic stable compensated state. Levels of miR-21 increased from admission to discharge (1.8-fold change; $P = .010$), whereas miR-126 levels did not significantly change ($P = .309$). MiR-423-5p expression exhibited a similar pattern to miR-126, increasing from admission to discharge (3.9-fold change; $P < .001$). Although all microRNAs were modestly correlated with functional cardiac parameters and comorbidities, none of them was correlated with BNP ($P > .10$). Moreover, plasma microRNA levels were not associated with clinical outcomes.

Conclusions: Plasma levels of microRNAs change during clinical improvement of patients admitted with ADHF, particularly from the time of admission to discharge. Further investigations regarding the prognostic value of miR-21, miR-126 and miR-423-5p are required.

Key Words: MicroRNA, acute decompensated heart failure, biomarker, prognosis.

Natriuretic peptides, mainly BNP and amino-terminal proBNP (NT-proBNP), are recommended for diagnostic evaluation and prediction of adverse events in patients with acute decompensated heart failure (ADHF), providing information regarding presence and severity of HF. However, a number of demographic and clinical conditions, such as age, sex, obesity and comorbidities, may affect levels of natriuretic peptides, limiting their application.^{1,2} In this scenario, novel blood-based biomarkers have been investigated in HF patients.¹⁻³

MicroRNAs (miRs) are small endogenous non-coding RNA molecules that regulate gene expression at post-transcriptional level. MicroRNAs regulate cell growth, differentiation, proliferation and apoptosis, and are essential for cardiovascular development and function.⁴⁻⁶ Studies in humans, animal models and cell culture show that the dysregulated expression of specific microRNAs lead to the reactivation of fetal genes,⁷ left ventricular (LV) remodeling⁸ and cardiac hypertrophy^{9,10} in the failing heart. Recent studies demonstrate that microRNAs circulate with the blood in a stable form and reflect myocardial damage and ventricular remodeling, thus indicating that they could be useful as reliable and simple biomarkers for cardiovascular disorders, including in the HF scenario.^{11,12}

In the last four years, several studies have explored the potential of circulating microRNA levels as biomarkers of HF in humans with promising results.¹³⁻²³ Whereas these studies focused on the potential application of circulating microRNA levels in the clinical diagnosis of HF, their prognostic value was evaluated in one study of chronic stable HF outpatients.²² Moreover, except for the report by Fukushima et al.,¹⁶ previous studies did not measure microRNA levels serially.

To date, no study has characterized the profile of circulating microRNAs in patients admitted with ADHF during the states of decompensation and after clinical

recompensation. Therefore, the aim of this study was to measure the levels of microRNAs -21, -126 and -423-5p in the plasma of ADHF patients at the time of hospital admission and verify whether they change during clinical improvement (at the time of hospital discharge and after clinical recompensation). We also investigated whether levels of these three microRNAs at admission could predict in-hospital length of stay and all-cause mortality.

The microRNAs evaluated in this study were selected taking into account the circulating microRNAs shown to be dysregulated in previous studies in patients with myocardial infarction (MI) or HF.^{11–17,19,22,23} We also considered that episodes of ADHF are associated with transient increases in the blood levels of markers of cardiac myocyte injury, extracellular matrix turnover and inflammation, possibly reflecting an acceleration of pathological myocardial remodeling during the decompensation.^{24–26} In this context, we tried to select as candidate microRNAs for ADHF those that are preferentially expressed in different cell types and are involved in the regulation of the above-mentioned processes.^{4,5,27}

Methods

Study Population

Sixty-three adult patients (≥ 18 years of age) with ADHF admitted to the emergency service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) were prospectively recruited within 24 hours of admission. Other inclusion criteria were a previous diagnosis of HF and impaired left ventricular systolic function with a LVEF $\leq 45\%$, defined by echocardiography, irrespective of etiology. The diagnosis of ADHF

with volume overload was defined clinically by the presence of worsening symptoms of dyspnea, paroxysmal nocturnal dyspnea, and/or orthopnea in conjunction with clinical signs of circulatory congestion (elevated jugular venous pressure, hepatojugular reflux, hepatomegaly, and/or peripheral edema). Exclusion criteria were the following: pregnancy, dialysis, aortic stenosis, treated malignancy, significant renal (creatinine > 3 mg/dL) or hepatic (cirrhosis or active hepatitis) dysfunction, and rheumatologic diseases. Patients with concomitant acute coronary syndromes within the previous 3 months or severe hemodynamic instability requiring intravenous vasoactive drugs were also excluded. The Institutional Review Board at HCPA approved the research protocol and all patients provided written informed consent.

Data and Sample Collection

After enrollment, demographics, clinical history, comorbidities, echocardiographic, electrocardiographic and laboratory data were collected. To measure plasma levels of BNP and microRNAs, blood samples were collected within the first 24 hours of admission at emergency, at the time of hospital discharge and several weeks after discharge. After discharge, the sample was collected during an outpatient visit as part of routine clinical care in those who had returned to a chronic stable compensated state (clinical recompensation). The criteria for chronic stable compensation were no evidence of volume overload by clinical examination, no current need for diuretic adjustment and no hospital admission for ADHF within the previous 2 months.

Of the 63 patients admitted to emergency service and included in the study, 45 had the second sample collected at the time of hospital discharge and 46 had the third sample collected several weeks after discharge, in the chronic recompensation state (a mean of 4 ± 2 months after discharge). In total, 37 patients had the blood samples collected at the three moments. The reasons for the missing patients during the follow-up were death, new episodes of HF decompensation, logistic problems to collect blood sample at discharge and lack of returning to regular ambulatory visit.

Blood Sample Preparation and Measurement of BNP Levels

All laboratory analyses were performed with investigators blinded to clinical data. Blood samples were collected in EDTA-containing tubes (Terumo, Tokyo, Japan) and plasma was isolated by centrifugation at 1,500 rpm for 15 min at 4°C within one hour from collection. Plasma samples were frozen at -70°C until the assays were performed and subjected to freeze-thawing once. Plasma levels of BNP were measured using a commercially available immunoassay kit (Advia Centaur BNP System, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Erlangen, Germany). The minimum detection limit of this assay is 2 pg/mL and the total coefficient of variation is below 10%.

Measurement of Plasma microRNA Levels

MicroRNAs were isolated from 495 μL of plasma using the *mirVana* PARIS kit according to the manufacturer's protocol (Ambion, Austin, TX). After protein denaturation, 50 pM of synthetic miR-39 from *Caenorhabditis elegans* (cel-miR-39)

(Qiagen, Valencia, CA) was spiked-in (fixed volume of 5 μ L) into plasma samples to control for potential technical variations throughout the extraction and measurement procedures.²⁸ Cel-miR-39 was simultaneously assessed in the final eluted microRNA, providing a standard control for the concentration of studied microRNAs obtained from subjects' samples.

The concentration of microRNAs was determined by spectrophotometric analysis (NanoDrop 1000, Thermo Scientific, Wilmington, DE). Reverse transcription reactions were performed using miRs Reverse Transcription Kit® according to manufacturer's instructions (Life Technologies, Carlsbad, CA) and the plasma levels of miR -21, -126 and -423-5p were measured by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) on the 7500 Real Time PCR System (Life Technologies). PCR amplification reactions were run in triplicate using the TaqMan® miRs Expression Assays probes (Life Technologies). Data from qRT-PCR were normalized to the reference control microRNA, cel-miR-39, using the dCT method. The relative expression levels for each individual microRNA were calculated using the following mathematical formula: $dCt = Ct_{\text{sample}} - Ct_{\text{cel-miR-39}}$. These values were transformed into quantities using the formula 2^{-dCt} and are presented as fold-change relative to the internal control.²⁹

Study End Points

First, we assessed if the levels of three microRNAs (miR-21, -126 and -423-5p) differ according to the (de)compensated state of HF patients. Second, we evaluated the correlation between plasma microRNAs levels with each other, as well as with BNP levels. Third, we investigated the potential prognostic value of the

selected microRNAs at admission in the prediction of all-cause mortality and hospital length of stay (longer than 6 days versus ≤ 6 days). Mortality was prospectively tracked by outpatient clinic follow-up, telephone contact or chart review.

Statistical Analysis

Continuous variables are expressed as mean \pm SD if normally distributed and as median [interquartile range] if non-normally distributed. Categorical variables are reported as absolute number and percentages. Normality was verified by the Kolmogorov–Smirnov test. The plasma levels of BNP at admission were converted to square root and the length of hospital stay was log-transformed for the correlation analyses. Plasma levels of BNP and microRNAs at admission, at discharge and after chronic recompensation were compared by the general linear model for repeated measures and *P* values were corrected for multiple hypothesis testing by Bonferroni correction. Differences between continuous variables across binary clinical categories were assessed using the Student *t*-test. Correlation between plasma levels of microRNAs and BNP, clinical, electrocardiographic, echocardiographic and laboratory variables were determined with the use of Pearson correlation analysis and/or linear regression analysis. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis was used to compare plasma levels of BNP and microRNAs as predictors of all-cause mortality and in-hospital length of stay. All statistical analyses were performed with the use of SPSS statistical package (version 18.0) for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL) and a two-tailed *P* value of $< .05$ was considered statistically significant.

Results

Baseline Characteristics of Study Population

Table 1 shows the baseline clinical characteristics of the 63 patients with ADHF enrolled in this study. The majority of patients were middle-aged male with severe LV dysfunction and non-ischemic etiology. On admission for ADHF, all patients had New York Heart Association (NYHA) class III or IV. The main causes of acute decompensation episodes were infection (58%) and poor adherence to treatment (29%). The presence of comorbidities, such as hypertension, ischemic heart disease and diabetes mellitus, were also prevalent. At discharge, most patients were taking beta-blockers, angiotensin-converting enzyme inhibitors, diuretics and digoxin (Table 1).

Plasma Levels of BNP and MicroRNAs

Figure 1 illustrates the plasma levels of BNP, miR-21, miR-126 and miR-423-5p in patients with ADHF at the time of admission, discharge and after chronic recompensation. BNP levels decreased from 789 [471-1,585] pg/mL at admission to 485 [283-971] pg/mL at discharge ($P < .001$) and to 324 [92-641] pg/mL after recompensation ($P = .017$) (Fig. 1A). The levels of miR-21 almost doubled from the time of admission to discharge (1.8-fold change; $P = .010$) (Fig. 1B), whereas the miR-126 levels did not significantly change ($P = .309$) (Fig. 1C). MiR-423-5p expression exhibited a similar pattern to miR-126, increasing from admission to discharge (3.9-fold change; $P < .001$). However, the difference in the levels of miR-

423-5p between the recompensation and admission (9-fold change), as well as between the recompensation and discharge (2.3-fold change) was not statistically significant ($P = .767$ and $P > .999$, respectively) (Fig. 1D).

As shown in Figure 2, there was no correlation between the plasma levels of BNP and microRNAs at the time of admission, discharge and after compensation ($P > .10$ for all comparisons). However, at admission, miR-21 levels were strongly correlated with miR-423-5p levels ($r = 0.77$; $P < .001$). Moreover, miR-21 expression at discharge and after recompensation was correlated with miR-126 levels at discharge ($r = 0.72$; $P < .001$) and after compensation ($r = 0.69$; $P < .001$), respectively.

Correlation of MicroRNA Levels with Clinical Parameters

The plasma levels of microRNAs -21, -126 and -423-5p at admission, discharge or after chronic recompensation were not associated with gender, HF etiology, LVEF, hypertension, smoking history, medication use, in-hospital length of stay or all-cause mortality ($P > 0.05$ for all). After chronic recompensation, miR-21 levels were lower in patients with atrial fibrillation (0.5-fold; $P = .028$) and arrhythmia (0.6-fold; $P = .048$) and higher in those with diabetes mellitus (1.8-fold; $P = .029$) and chronic obstructive pulmonary disease (1.9-fold; $P = .041$). In relation to miR-126 at admission, patients with chronic renal insufficiency had lower levels than patients without renal dysfunction (0.4-fold; $P < .001$). At admission, White subjects had higher levels of miR-423-5p than non-White patients (2-fold; $P < .001$) and miR-423-5p levels were correlated with QRS duration ($r = 0.29$; $P = .030$). After

recompensation, miR-423-5p expression was correlated with age ($r = 0.36$; $P = .023$) and LV diastolic diameter ($r = -0.33$; $P = .043$).

MicroRNAs as Predictors of Clinical Outcomes

Next, we tested whether miR-21, miR-126 or miR-423-5p could predict the in-hospital length of stay and all-cause mortality in patients with ADHF. Patients were hospitalized for a median of 6 days (ranging from 1 to 47 days) and 14 subjects died (4 during the hospitalization and 10 after discharge). Comparing all plasma microRNAs and BNP levels at admission, none had adequate sensitivity/specificity to predict mortality or in-hospital length of stay (Fig. 3).

Discussion

Previous studies found that circulating microRNA levels in both chronic outpatients and acute decompensated patients with HF differ from those in controls, supporting the concept that they could be used as biomarkers for clinical diagnosis of HF.^{13–19,22,23} Some authors have already suggested that circulating microRNAs could reflect disease severity or could be used as prognostic biomarkers, predicting clinical outcomes in HF patients.^{15,17,18,22} However, this suggestion was predominantly based on the observed correlations of the circulating microRNA levels with BNP/NT-proBNP and/or other prognostic clinical parameters, such as NYHA functional class and LVEF.^{15,17,18} Although these previous reports indicate that circulating levels of specific microRNAs correlated with different forms of cardiovascular disease, they do not describe whether plasma microRNA levels correspond to a worsening of or

improvement in heart disease. With the exception of one report,¹⁶ microRNA levels were measured only at one time point and no study reported serial measurements from the acutely decompensated to the chronic compensated phase of HF.

To our knowledge, here we report for the first time that plasma concentration of microRNAs -21 and -423-5p change during the clinical improvement of HF patients admitted for an episode of acute decompensation, increasing from the time of admission to hospital discharge. Levels of miR-21 almost doubled from the time of admission to discharge, whereas miR-423-5p levels increased by almost four times at the same period. From the time of discharge to clinical recompensation (several weeks after discharge), their levels changed less and did not reach statistical significance. As expected, BNP levels reduced over time. However, the most marked reduction occurred in the period between the time of hospital admission and discharge. Levels of microRNAs -21, -126 and -423-5p were also correlated among themselves and with some cardiac parameters and comorbidities, though they were not associated with BNP and short-term clinical outcomes (in-hospital length of stay and all-cause mortality).

The augmentation observed for the levels of miR-21 and miR-423-5p from the hospital admission to the discharge seem to contrast with the findings of the previous studies on clinical diagnosis of HF, in which the levels of miR-21¹⁷ and miR-423-5p^{15,17,19} were higher in HF patients than in controls. Based on this pattern, we would expect that the microRNA levels were reduced during clinical recovery of ADHF patients. However, our results are in line with what is known to date about the pathophysiology of ADHF²⁴⁻²⁶ and with experimental evidence on pathways regulated by microRNAs^{4,5,8,11,12}. During the progression of HF, phases of chronic compensation and acute decompensation alternate and the clinical status worsens

during the acute phase.²⁴ The microRNAs evaluated in our study are related to cardiac myocyte injury, extracellular matrix turnover and inflammation^{4,5,27} and had their expression altered during the phase of initial recompensation.

In the failing human heart, miR-21 is upregulated in response to stress/injury in cardiac fibroblast where it stimulates mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling. It leads to fibroblast proliferation and fibrosis, which impairs ventricular function and predisposes the heart to arrhythmias.⁹ In accordance with this assumption, Goren et al.,¹⁷ who measured the levels of 186 microRNAs in the serum of stable chronic systolic HF and controls, showed that the miR-21 levels were higher in the HF group than in controls (1.3-fold). However, two studies did not find differences between patients admitted for ADHF and healthy controls,¹⁵ as well as between patients with diastolic dysfunction and hypertensive or normotensive control subjects.¹⁴

On the other hand, miR-21 has emerged as a major inhibitor of cell apoptosis in myocytes as well as in other cell types. It is acutely downregulated during myocardial ischemia, within the ischemia zone, where replenishing it reduces the infarct size and retards the development of HF. These results were corroborated by experiments conducted in isolated cardiac myocytes, in which miR-21 was proven to inhibit hypoxia-induced apoptosis.³⁰ As the LV remodeling process involves myocyte loss by apoptosis,⁸ it is tempting to speculate whether during the initial clinical recovery (from the admission to the time of hospital discharge) the increased levels of miR-21 observed in our study contributed to protect the patients from myocyte loss.

The endothelial-cell-specific miR-126 maintains endothelial cell homeostasis and vascular integrity by modulating angiogenesis via the stimulation of vascular

endothelial growth factor signaling.^{4,12} In HF patients, impaired angiogenesis lead to alterations in extracellular matrix that contribute for LV remodeling process.⁸ As miR-126 is essential for ischemia-induced angiogenesis,¹¹ HF patients would be expected to have lower circulating miR-126 levels. Indeed, Fukushima et al.¹⁶ assessed the plasma concentrations of miR-126 in patients with ischemic heart diseases and asymptomatic controls. The levels of miR-126 were lower in the patients groups as compared to controls. In 10 patients with HF, the plasma concentrations were assessed twice (when they were at functional class IV and later when they improved to class III). As the clinical condition improved, plasma concentrations of miR-126 were upregulated. In another study, serum levels of miR-126 were lower in stable chronic systolic HF patients than in control subjects (1.2-fold).¹⁷ One recent study of rats with hypertension-induced HF showed that plasma miR-126 expression was increased (1.27-fold) in response to therapeutic treatment.³¹ In our study, miR-126 showed a trend toward increased levels from the time of admission to clinical recompensation without reaching statistical significance.

Expression of miR-423-5p is upregulated in human failing myocardium^{7,15} and a possible mechanism suggested for this is that miR-423-5p is upregulated by atrial natriuretic peptide.³² However, the function of miR-423-5p remains elusive. The pioneer study by Tijssen et al.¹⁵ demonstrated that plasma miR-423-5p was able to distinguish HF patients from patients with non-HF forms of dyspnea and healthy controls. Similar results were found in two recent studies in which circulating miR-423-5p levels were higher in chronic HF patients than in healthy subjects (1.5- and 1.3-fold).^{17,19} In these studies, miR-423-5p was the most consistently associated with the clinical diagnosis of HF and had a prominent increased expression in patients as compared to controls.

In our study, plasma levels of miR-423-5p increased almost four-fold from the time of admission to discharge. They also increased from discharge to clinical recompensation several weeks after, but this change did not reach statistical significance. Recently, our group measured the plasma levels of miR-423-5p in samples obtained from the coronary sinus, femoral artery and femoral vein in HF outpatients with severe systolic dysfunction and subjects without structural cardiac disease. Although there were no significant differences in these sites between patients and controls, we observed that the transc coronary gradient was significantly positive in HF patients while it was negative among controls (p value for comparison of gradients = 0.03), suggesting that miR-423-5p has a cardiac origin (Goldraich, in press).³³

Studies focused on acute MI indicated that circulating levels of microRNAs reflect myocardial tissue damage.^{14,20,34} However, in the studies of HF patients, the origin and the biological meaning of circulating microRNAs are still under debate.^{14-17,31} Some authors observed a lack of correspondence in the microRNA expression between tissue and plasma,^{15,18,31} and it is also discussed whether circulating microRNAs are only by-products of cell injury or they are actively secreted by the cells exerting a paracrine effect.^{11,14,20,22,31} As pointed out by Goren et al.,¹⁷ the beneficial or deleterious cardiac effects of specific microRNAs on HF pathogenesis are still unclear.

Meanwhile, some authors have evaluated the usefulness of circulating microRNAs as potential diagnostic indicators of HF by their correlation with BNP/NT-proBNP^{15-17,31} or their capacity of discriminating patients from controls in ROC curve analysis.^{15,17,19,23} In our study, though there was a continuous reduction of plasma BNP levels from the time of admission to discharge and after clinical

recompensation, none of the three microRNAs was correlated with BNP levels at any time point. In patients with ischemic heart diseases, plasma concentrations of miR-126 were negatively correlated with BNP,¹⁶ whereas miR-21 and miR-126 were not correlated with NT-proBNP in patients with diastolic dysfunction.¹⁴ Circulating levels of miR-423-5p were positively correlated with BNP or NT-proBNP levels in humans and rats with hypertension-induced HF.^{15,17,19} However, all of these correlations were weak to moderate (r values ≤ 0.51). Moreover, some authors only observed an increased capacity as a predictor after defining a score composed of 4 or 8 microRNAs in the ROC curve analysis.^{17,23}

In relation to HF prognosis, Qiang et al.²² followed-up chronic HF patients for 24 months using cardiovascular mortality (from acute MI, HF or sudden death) as end point. Low levels of miR-126 were shown to be independently associated with an increased risk of cardiovascular death and decreased survival time in patients with ischemic etiology. In the present study, none of the microRNAs evaluated could predict in-hospital length of stay or all-cause mortality. Of note, BNP did not perform better than microRNAs. Probably, this is due to the low frequency of events and short time of follow-up.

One very important factor that could explain the contrasting results among the studies of HF is the high heterogeneous profile of the enrolled subjects regarding demographic characteristics and clinical conditions, such as underlying etiology, severity of ventricular dysfunction, and presence of comorbidities. Circulating microRNA levels were initially considered as relatively unaffected by clinical parameters, but recently, the importance of clinical confounders for plasma microRNA levels started to be explored. Technical issues regarding the time of blood

collection,^{13,14,20} sample handling and measurement of circulating microRNAs are also reported as limiting factors.^{3,11,12,16}

Although some studies have shown that the microRNA profile can vary according to the stage and the etiology of the cardiomyopathy,^{14,15,22} we did not observe any correlation of plasma microRNA levels with gender, HF etiology, NYHA functional class, and LVEF, as previously reported for miR-423-5p in chronic stable HF patients.^{17,19} However, miR-423-5p levels were correlated with QRS duration and LV diastolic diameter, as previously described.¹⁷ In addition, miR-21 was correlated with some comorbidities, such as arrhythmia and diabetes, after clinical recompensation. As microRNAs are involved in arrhythmogenesis^{4,30} and diabetes,^{11,12,27} these correlations could reflect underlying clinical changes in ADHF patients. Remarkably, miR-126 was associated with renal dysfunction at admission. Some authors observed that circulating microRNAs are not renally cleared,¹⁴ while others found that microRNAs are selectively dependent on renal elimination.³⁴ Therefore, these findings deserve further investigation for evaluating diagnostic and prognostic applicability of circulating microRNAs in clinical settings, where comorbidities are common.

It is still unclear whether circulating microRNAs track with disease progression or whether changes in circulating microRNAs are indicative of therapeutic efficacy. In rats with hypertension-induced HF, plasma levels of microRNAs were found to change during disease progression and to respond to different therapeutic interventions.³¹ Circulating levels of miR-423-5p gradually increased over time, triplicating their levels in 8 weeks, and this effect was blunted in response to treatment with an anti-miR as well as an ACE inhibitor. As there are almost no data in the literature regarding changes in microRNA expression as a result of therapeutic

interventions in humans,³⁵ the possible interference of medication on the plasma levels of microRNAs in our cohort of ADHF patients receiving intensive care cannot be excluded.

Another factor that likely contributes to the discrepancy among studies is the ethnicity. Previous studies were carried out on Japanese,^{13,16,18} Chinese,^{19,22} European (from The Netherlands),^{14,15} Arabic, Ashkenazi, Sfaradi and mixed Israeli Jewish.¹⁷ It is worthwhile to note that Huang et al.³⁶ evaluated the baseline expression of microRNAs in cell lines derived from Utah residents with northern and western European ancestry and Yoruba people from Nigeria. The authors found that 16% of all microRNAs evaluated differ significantly between these two ethnic groups and the microRNAs response to chemotherapeutic agents varies according to the ethnic group. In addition, a large number of gene polymorphisms were identified and were shown to affect the expression of these microRNAs. Our study is in line with this finding, as White subjects had higher miR-423-5p levels (on admission) compared to non-Whites (2-fold).

Our results should be interpreted in the light of some study limitations. Although the sample size is similar to that of previous reports, the high variability in the microRNA levels at the time of clinical recompensation (several weeks after discharge) reduced the study power to detect relevant differences among the different clinical phases. This is likely the main reason by which the levels of miR-126 and specially miR-423-5p were not statistically different between the time of discharge and clinical recompensation, despite the marked increase in their levels. Another aspect to be considered is that we did not measure the microRNA levels in subjects without HF. Although our focus is the ADHF progression, a control group could serve as a reference to the expression profile of microRNAs in our population.

On the other hand, to reduce the effect of potential confounders, our cohort included only patients with reduced LVEF who already had previous diagnosis of HF on admission.

Conclusion

In this prospective cohort study of patients admitted with ADHF, plasma levels of miR-21 and miR-423-5p changed over time with clinical improvement. MicroRNAs -21, -126 and -423-5p were modestly correlated with cardiac functional parameters and comorbidities. The current analysis is novel in the context of assessing the relationship between circulating microRNAs and prognosis of ADHF. Our initial findings confirm and expand the results from previous reports in the ADHF setting, supporting the concept that plasma levels of microRNAs change with HF progression. These results await further clinical investigations.

Disclosures

None.

Acknowledgments

We thank MSc. Fernanda Donner Alves and MSc. Leticia Orlandin for helping with sample and data collection.

References

1. Givertz MM, Teerlink JR, Albert NM, Westlake Canary CA, Collins SP, Colvin-Adams M, et al. Acute decompensated heart failure: update on new and emerging evidence and directions for future research. *J Card Fail* 2013;19:371–89.
2. Gaggin HK, Januzzi Jr. JL. Biomarkers and diagnostics in heart failure. *Biochim Biophys Acta* 2013;1832:2442–50.
3. Schmitter D, Cotter G, Voors AA. Clinical use of novel biomarkers in heart failure: towards personalized medicine. *Heart Fail Rev* (in press) doi: 10.1007/s10741-013-9396-5.
4. Small EM, Olson EN. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature* 2011;469:336–42.
5. Santovito D, Mezzetti A, Cipollone F. MicroRNAs and atherosclerosis: new actors for an old movie. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2012;22:937–43.
6. Brás-Rosário I, Matsuda A, Pinheiro AI, Gardner R, Lopes T, Amaral A, et al. Expression profile of microRNAs regulating proliferation and differentiation in mouse adult cardiac stem cells. *PLoS One* 2013;8:e63041.
7. Thum T, Galuppo P, Wolf C, Fiedler J, Kneitz S, van Laake LW, et al. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation* 2007;116:258–67.
8. Topkara VK, Mann DL. Clinical applications of miRNAs in cardiac remodeling and heart failure. *Per Med* 2010;7:531–48.
9. van Rooij E, Olson EN. Searching for miR-acles in cardiac fibrosis. *Circ Res* 2009; 104:138–40.

10. Bagnall RD, Tsoutsman T, Shephard RE, Ritchie W, Semsarian C. Global microRNA profiling of the mouse ventricles during development of severe hypertrophic cardiomyopathy and heart failure. *PLoS One* 2012;7:e44744.
11. Fichtlscherer S, Zeiher AM, Dimmeler S. Circulating microRNAs: biomarkers or mediators of cardiovascular diseases? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31:2383–90.
12. Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circ Res* 2012;110:483–95.
13. Adachi T, Nakanishi M, Otsuka Y, Nishimura K, Hirokawa G, Goto Y, et al. Plasma microRNA 499 as a biomarker of acute myocardial infarction. *Clin Chem* 2010;56:1183–5.
14. Corsten MF, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, et al. Circulating microRNA-208b and microRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet* 2010;3:499–506.
15. Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, de Windt LJ, van der Wal AC, Kok WE, et al. miR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. *Circ Res* 2010;106:1035–9.
16. Fukushima Y, Nakanishi M, Nonogi H, Goto Y, Iwai N. Assessment of plasma miRNAs in congestive heart failure. *Circ J* 2011;75:336–40.
17. Goren Y, Kushnir M, Zafir B, Tabak S, Lewis BS, Amir O. Serum levels of microRNAs in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail* 2012;14:147–54.

18. Endo K, Naito Y, Ji X, Nakanishi M, Noguchi T, Goto Y, et al. MicroRNA 210 as a biomarker for congestive heart failure. *Biol Pharm Bull* 2013;36:48–54.
19. Fan KL, Zhang HF, Shen J, Zhang Q, Li XL. Circulating microRNAs levels in Chinese heart failure patients caused by dilated cardiomyopathy. *Indian Heart J* 2013;65:12–6.
20. Gidlöf O, Smith JG, Miyazu K, Gilje P, Spencer A, Blomquist S, et al. Circulating cardio-enriched microRNAs are associated with long-term prognosis following myocardial infarction. *BMC Cardiovasc Disord* 2013;13:12.
21. Matsumoto S, Sakata Y, Suna S, Nakatani D, Usami M, Hara M, et al. Circulating p53-responsive microRNAs are predictive indicators of heart failure after acute myocardial infarction. *Circ Res* 2013;113:322–6.
22. Qiang L, Hong L, Ningfu W, Huaihong C, Jing W. Expression of miR-126 and miR-508-5p in endothelial progenitor cells is associated with the prognosis of chronic heart failure patients. *Int J Cardiol* 2013;168:2082–8.
23. Vogel B, Keller A, Frese KS, Leidinger P, Sedaghat-Hamedani F, Kayvanpour E, et al. Multivariate miRNA signatures as biomarkers for non-ischaemic systolic heart failure. *Eur Heart J* 2013;34:2812-22.
24. Sato Y, Kuwabara Y, Taniguchi R, Nishio Y, Miyamoto T, Fujiwara H, et al. Malignant link between chronic heart failure and acute cardiac decompensation in patients with persistently increased serum concentrations of cardiac troponin. *Int J Cardiol* 2008;126:171–6.

25. Biolo A, Fisch M, Balog J, Chao T, Schulze PC, Ooi H, et al. Episodes of acute heart failure syndrome are associated with increased levels of troponin and extracellular matrix markers. *Circ Heart Fail* 2010;3:44–50.
26. Schulze PC, Biolo A, Gopal D, Shahzad K, Balog J, Fish M, et al. Dynamics in insulin resistance and plasma levels of adipokines in patients with acute decompensated and chronic stable heart failure. *J Cardiac Fail* 2011;17:1004–11.
27. Olivieri F, Rippo MR, Procopio AD, Fazioli F. Circulating *inflammamiRs* in aging and age-related diseases. *Front Genet* 2013;4. doi: 10.3389/fgene.2013.00121.
28. Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods* 2010;50:298–301.
29. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 2001;25:402–8.
30. Abdellatif M. Differential expression of microRNAs in different disease states. *Circ Res* 2012;110:638–50.
31. Dickinson BA, Semus HM, Montgomery RL, Stack C, Latimer PA, Lewton SM, et al. Plasma microRNAs serve as biomarkers of therapeutic efficacy and disease progression in hypertension-induced heart failure. *Eur J Heart Fail* 2013;15:650–9.
32. Kotlo KU, Hesabi B, Danziger RS. Implication of microRNAs in atrial natriuretic peptide and nitric oxide signaling in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011;301:C929-37.

33. Goldraich LA, Martinelli NC, Matte U, Cohen C, Andrades M, Pimentel M, et al. Transcoronary gradient of plasma microRNA 423-5p in heart failure: evidence of altered myocardial expression. *Biomarkers* (in press).
34. Gidlöf O, Andersson P, van der Pals J, Götberg M, Erlinge D. Cardiospecific microRNA plasma levels correlate with troponin and cardiac function in patients with ST elevation myocardial infarction, are selectively dependent on renal elimination, and can be detected in urine samples. *Cardiology* 2011;118:217–26.
35. Matkovich SJ, Van Booven DJ, Youker KA, Torre-Amione G, Diwan A, Eschenbacher WH, et al. Reciprocal regulation of myocardial microRNAs and messenger RNA in human cardiomyopathy and reversal of the microRNA signature by biomechanical support. *Circulation* 2009;119:1263–71.
36. Huang RS, Gamazon ER, Ziliak D, Wen Y, Im HK, Zhang W, et al. Population differences in microRNA expression and biological implications. *RNA Biol* 2011;8:692–701.

Table 1. Baseline Characteristics of the Study Population (n = 63)

Characteristics	
Age (years)	63 ± 13
Male, n (%)	42 (67%)
White, n (%)	53 (84%)
Heart failure etiology, n (%)	
Ischemic	26 (41%)
Hypertensive	20 (32%)
Alcoholic	11 (17%)
NYHA functional class, n (%)	
	III: 19 (30%)
	IV: 44 (70%)
Vital signs at admission	
Heart rate (bpm)	93 ± 19
Systolic blood pressure (mmHg)	131 ± 28
Diastolic blood pressure (mmHg)	84 ± 18
Comorbidities	
Hypertension, n (%)	50 (79%)
Ischemic heart disease, n (%)	32 (51%)
Previous myocardial infarction, n (%)	24 (38%)
Arrhythmia, n (%)	27 (43%)
Chronic renal insufficiency, n (%)	16 (25%)
Diabetes mellitus, n (%)	31 (49%)
Previous stroke or transient ischemic attack, n (%)	13 (21%)
Chronic obstructive pulmonary disease, n (%)	20 (32%)
Smoking history, n (%)	46 (73%)

Echocardiography indices	
LV ejection fraction (%)	26 ± 8
LV diastolic diameter (cm)	6.5 ± 1.0
LV systolic diameter (cm)	5.8 ± 1.0
Left atrium dimension (cm)	5.1 ± 0.7
Electrocardiogram indices	
Atrial fibrillation, n (%)	23 (37%)
Interventricular block, n (%)	27 (43%)
QRS duration (ms)	124 ± 29
Laboratory data	
BNP (pg/mL)	789 [471-1,585]
Creatinine (mg/dL)	1.3 ± 0.4
Urea (mg/dL)	62 ± 28
Sodium (mEq/L)	139 ± 4
Potassium (mEq/L)	4.3 ± 0.6
Admission and discharge medications	
Beta-blockers, n (%)	49 (78%)
Angiotensin-converting enzyme inhibitors, n (%)	50 (79%)
Loop or thiazide diuretics, n (%)	63 (100%)
Digoxin, n (%)	53 (84%)
Vasodilators, n (%)	31 (49%)

NYHA, New York Heart Association; LV, left ventricular; BNP, B-type natriuretic peptide.

Figure Legends

Fig. 1. Plasma levels of BNP (A), miR-21 (B), miR-126 (C) and miR-423-5p (D) in patients with ADHF at the time of admission, discharge, and after chronic recompensation. BNP levels are shown as median [interquartile range] and microRNA levels as mean \pm standard deviation. MicroRNA levels are relative to cel-miR-39, transformed into quantities using the formula $2^{-\Delta\text{Ct}}$. *P* values were computed by the general linear model for repeated measures (* = *P* < .05 versus admission). BNP, B-type natriuretic peptide.

Fig. 2. Scatterplots of the miR-21, miR-126, miR-423-5p and BNP levels in patients with ADHF at the time of admission, discharge, and after chronic recompensation. MicroRNA levels are relative to cel-miR-39, transformed into quantities using the formula $2^{-\Delta\text{Ct}}$. BNP, B-type natriuretic peptide.

Fig. 3. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis for plasma microRNAs and BNP levels at admission to predict death and in-hospital length of stay (> 6 days versus \leq 6 days). MicroRNA levels are relative to cel-miR-39, transformed into quantities using the formula $2^{-\Delta\text{Ct}}$. BNP, B-type natriuretic peptide; AUC, area under the ROC curve.

Figure 1

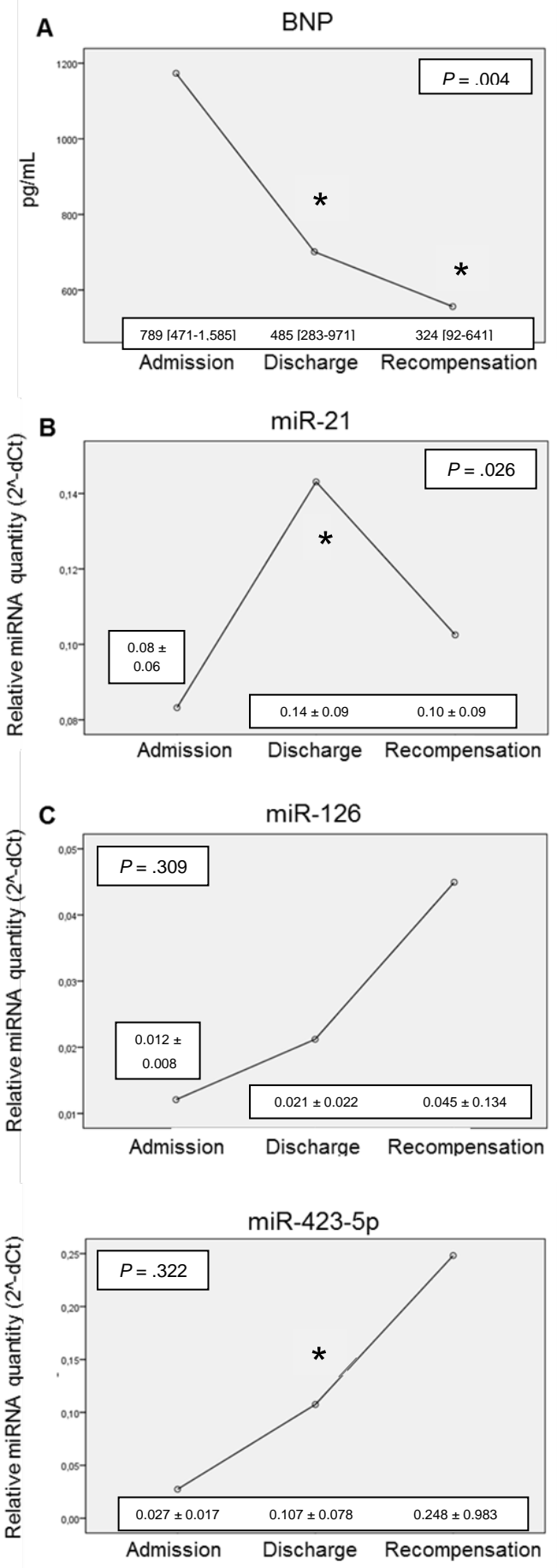


Figure 2

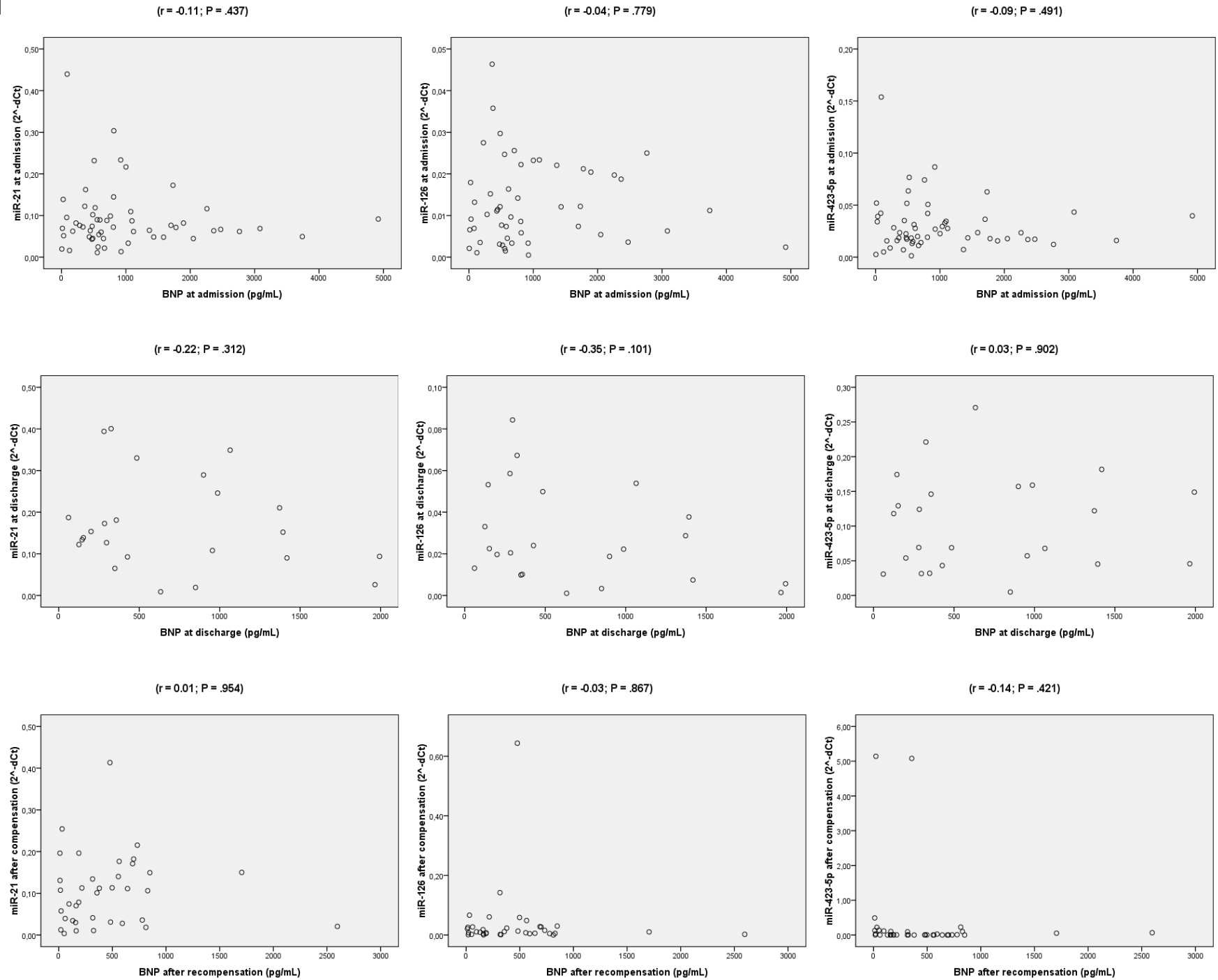
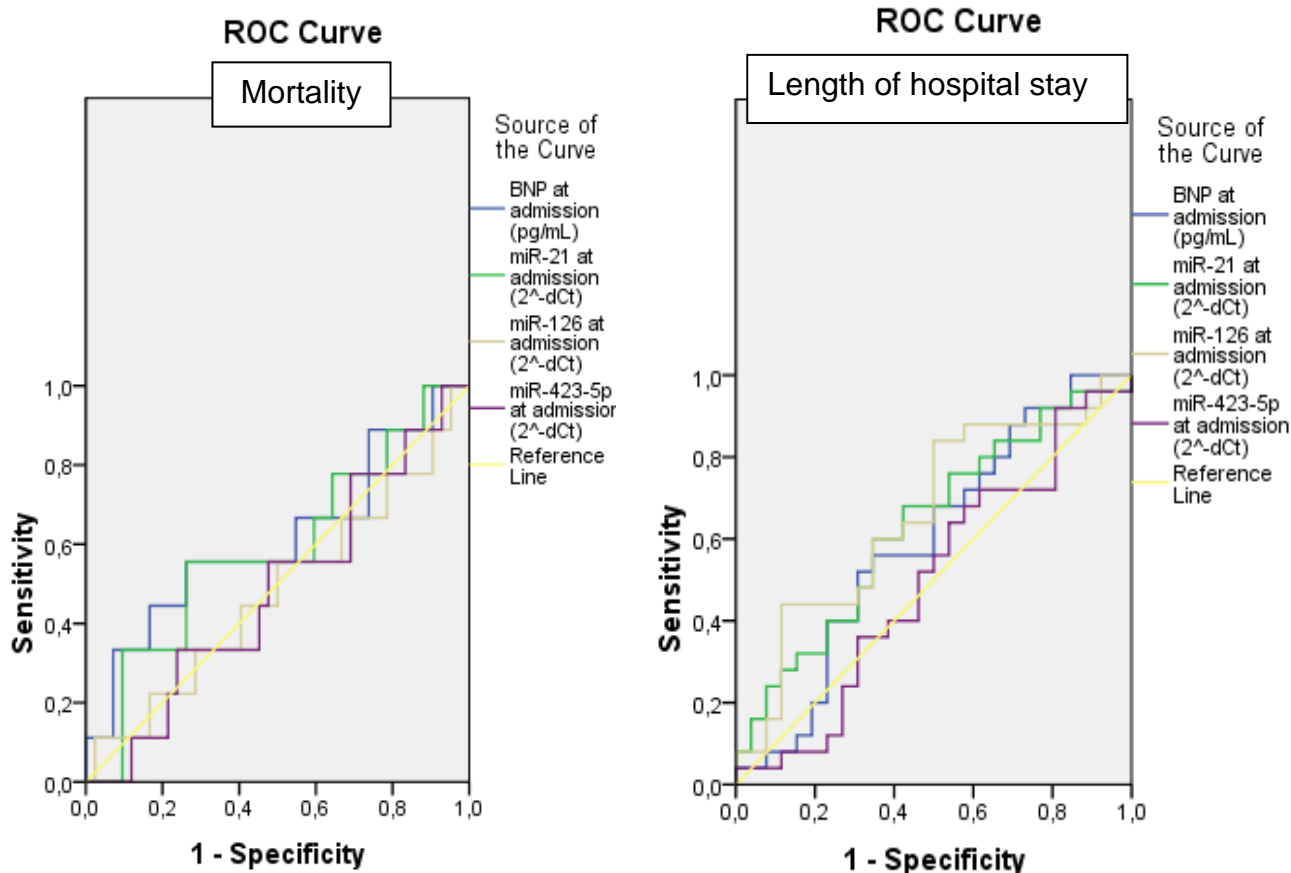


Figure 3



Mortality

BNP	AUC = 0.611 (0.385-0.837)	<i>P</i> = .299
miR-21	AUC = 0.587 (0.374-0.801)	<i>P</i> = .415
miR-126	AUC = 0.479 (0.259-0.699)	<i>P</i> = .843
miR-423-5p	AUC = 0.484 (0.282-0.687)	<i>P</i> = .882

Length of hospital stay

BNP	AUC = 0.592 (0.434-0.750)	<i>P</i> = .258
miR-21	AUC = 0.632 (0.479-0.786)	<i>P</i> = .105
miR-126	AUC = 0.658 (0.506-0.811)	<i>P</i> = .052
miR-423-5p	AUC = 0.498 (0.337-0.660)	<i>P</i> = .985

7. APÊNDICE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Pacientes

Prezado(a) Sr(a):

Nosso estudo tem por objetivo avaliar um painel de pequenos RNAs que são materiais genéticos e a partir de técnicas de biologia molecular identificar os principais pequenos RNAs que podem estar envolvidos no desenvolvimento de uma doença do coração chamada de insuficiência cardíaca. Como o(a) Sr(a) tem insuficiência cardíaca, gostaríamos que o(a) Sr(a) participasse. Caso aceite, realizaremos uma coleta de uma amostra de sangue venoso (10 mL) junto com informações do seu prontuário, como idade, sexo, cor, etiologia da insuficiência cardíaca, sintomatologia clínica, perfil hemodinâmico, resultado do exame de Rx de tórax, ecocardiografia e bioquímicos, como creatinina e glicemia, medicamentos utilizados e comorbidades associadas a esta doença. A coleta de sangue do braço pode ocasionar desconforto ou dor. Se o(a) Sr(a) concordar, sua amostra de sangue será processada e esses pequenos RNAs serão extraídos do plasma e terão a possibilidade de ser enviados ao exterior para que seja feita a análise do painel de expressão de pequenos RNAs. Os resultados desse estudo futuramente auxiliarão no melhor entendimento do desenvolvimento e progressão da sua doença para obter melhoras no tratamento; no entanto, os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos para o(a) Sr(a).

O(A) Sr(a) é livre para decidir em participar ou não do estudo, e sua recusa não implicará em nenhum prejuízo em seu atendimento neste Hospital. O(A) Sr(a) tem a liberdade de se recusar a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao cuidado médico que o(a) Sr(a) está recebendo. A sua participação neste estudo é isenta de remuneração ou ônus. Todas as informações obtidas estarão à sua disposição se assim desejar. Caso o(a) Sr(a) venha a sofrer qualquer tipo de dano decorrente de sua participação na pesquisa, o(a) Sr(a) terá direito à assistência integral e à indenização. Todos os resultados referentes à pesquisa serão utilizados para fins exclusivos de pesquisa, sendo resguardada sua total confidencialidade. Salientamos que o(a) Sr(a) não terá quaisquer custos para participar da pesquisa.

Eu _____, fui informado(a) dos objetivos e da justificativa da pesquisa de forma clara e detalhada, bem como do procedimento de coleta de sangue o qual serei submetido e das determinações de expressão dos níveis dos microRNAs que serão realizadas. Foi garantido todo o

direito de resposta, caso haja dúvidas ou esclarecimentos relacionados à pesquisa e da segurança da confiabilidade dos dados obtidos.

Os pesquisadores responsáveis por este projeto são a Profa. Dra. Kátia Gonçalves dos Santos, o Prof. Dr. Luís Eduardo Rohde e a pesquisadora Stéfanie Schneider (telefone para contato com os pesquisadores: 33598844 ou 98748228). Endereço: Laboratório de Pesquisa Cardiovascular - Centro de Pesquisa Experimental do HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2.350, 2º andar. Este projeto foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta instituição (telefone para contato: 33598000).

Pesquisador: _____

Nome do paciente: _____

Assinatura: _____

Na impossibilidade do próprio paciente autorizar, este TCLE poderá ser assinado pelo seu responsável legal.

Nome: _____

Grau de parentesco: _____

Assinatura do responsável legal do paciente: _____

Data ____/____/____

***Documento fornecido em duas vias, ficando uma com o participante e outra com o pesquisador.**