

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

**Tese**

**Perfil de Expressão de MicroRNAs e Biomarcadores na  
Insuficiência Cardíaca:  
Estudos do Impacto da Compensação Clínica e da Função  
Sistólica**

**Daiane Silvello**

**Perfil de Expressão de MicroRNAs e Biomarcadores na  
Insuficiência Cardíaca:  
Estudos do Impacto da Compensação Clínica e da Função  
Sistólica**

Autor: Daiane Silvello

Orientador: Andréia Biolo

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

Porto Alegre

2016

**Dedico à realização deste trabalho**

Ao meu filho Pietro, por ter visto, em sua prematuridade, a busca desta conquista como um tema de casa e o desafio da defesa como uma prova final.

“Pietro tu és o meu melhor projeto”

## **AGRADECIMENTOS**

A conclusão deste trabalho só foi possível com o apoio de todos a quem expresso minha gratidão.

À Andréia Biolo por ter aceito o desafio de me orientar nesse trabalho. Agradeço pela sua força e personalidade que foram fatores implacáveis para a conclusão deste projeto. Chegar até aqui não foi fácil, mas ela tornou isso realmente possível. Eu fraquejei diversas vezes, tive dúvidas, desmotivação, passei por muitas situações complicadas tanto na vida pessoal quanto dentro do laboratório, mas ela sempre de uma maneira ou de outra deu um jeito em me puxar. Sua orientação foi além do desenvolvimento deste projeto, pois muitas de suas palavras fizeram com que eu tomasse atitudes decisivas em minha vida. Talvez ela nem tenha percebido isso, mas entre os puxões de orelha e elogios quando eu duvidava de minha capacidade ela me ajudou a ser mais forte e confiante.

Ao professor Luis Eduardo Rohde e Nadine Clausell por servirem como exemplos de pesquisadores e mestres. Eles mesmo com tantas atribuições sempre foram capazes de colaborar para realização deste trabalho.

Aos meus queridos alunos de iniciação científica Fernanda Curuja e Arthur Garbin que participaram de forma intensa para conclusão deste projeto. “Meus pequenos” me deram todo o suporte e apoio necessários para execução desse trabalho

À Mariana Mendoza pelo apoio, motivação, colaboração e principalmente pela amizade que nasceu com desenvolver desse projeto.

Aos colegas do laboratório de pesquisa cardiovascular que me ajudaram a crescer como pesquisadora, aprendi muito com cada um deles. Acredito que a troca de conhecimento foi fundamental para minha formação. Com certeza eles tornaram o caminho até aqui mais divertido e cafeinado.

À equipe de pesquisadores do laboratório de psiquiatria pela colaboração com equipamentos para desenvolvimento deste projeto.

Aos meu pais pelo amor dedicado a mim e a minha família. Pelo tempo destinado a cuidar do meu filho para que eu pudesse realizar essa conquista.

Ao meu marido, melhor amigo e amor Marcos Thomé por ter acreditado em mim mais que eu mesma e sempre ver o lado positivo de tudo. E neste momento, principalmente por não gerar expectativa quanto a próxima etapa após a conclusão deste doutorado, a não ser ficar feliz pelo título conquistado.

Ao Santo Antônio, quem minha nonna ensinou-me a recorrer nos momentos difíceis.

## **LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

### **REVISÃO DE LITERATURA**

FIGURA 1: Fração de ejeção de ventrículo esquerdo em pacientes admitidos por IC aguda.....	8
FIGURA 2: Patogênese da IC.....	11
FIGURA 3: Biogênese dos microRNAs.....	22
FIGURA 4: MicroRNAs nas doenças cardíacas.....	24
FIGURA 5: MicroRNAs e matriz extracelular.....	27
FIGURA 6: Hipótese conceitual.....	34

### **ARTIGO ORIGINAL 1**

FIGURE 1: Biomarkers levels in patients whit HFrEF and HFpEF in different compensation stages.....	68
FIGURE 2: Survival curves of time free-events after outpatient.....	69

### **ARTIGO ORIGINAL 2**

FIGURE 1: Biomarkers levels in patients with HFpEF and HFrEF at acute decompensated HF .....	93
FIGURE 2: Change in cytokines levels.....	94
FIGURE 3: Biomarkers networks at acute decompensated HF.....	95

## **LISTA DE TABELAS**

### **ARTIGO ORIGINAL 1**

TABLE 1: Clinical and demographic characteristics.....	70
TABLE 2: Laboratory and echocardiographic data in admission.....	71
TABLE 3: Comparing of MMP-9, miR-21 and miR-150 levels between groups in different time evaluation.....	72

### **ARTIGO ORIGINAL 2**

TABLE 1: Clinical and demographic characteristics .....	96
TABLE 2: Laboratory and echocardiographic data in admission.....	97

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ANP: Peptídeo Natriurético Atrial

BNP: Peptídeo Natriurético Cerebral

DC: Débito Cardíaco

ECG: Eletrocardiograma

eNOS: Óxido Nítrico-Sintase Endotelial

FC: Frequência Cardíaca

FE: Fração de Ejeção

FEVE: Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo

IAM: Infarto Agudo do Miocárdio

IC: Insuficiência Cardíaca

ICFEP: Insuficiência Cardíaca com Fração de Ejeção Preservada

ICFER: Insuficiência Cardíaca com Fração de Ejeção Reduzida

IL: Interleucina

MEC: Matriz Extracelular

miR: MicroRNA

MMP: Metaloproteinase de Matriz

mRNA: RNA mensageiro

NYHA: New York Heart Association

PCR: Proteína C Reativa

RNA: Ácido Ribonucleico

SNS: Sistema Nervoso Simpático

SRAA: Sistema Renina-Angiotensina Aldosterona

SUS: Sistema Único de Saúde

TAC: Constrição Aórtica

TIMP: Inibidore Endógeno Tissular de Metaloproteinase

TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral Alpha

VE: Ventrículo Esquerdo

VS: Volume Sistólico

## SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	
LISTA DE TABELAS.....	
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	
RESUMO.....	
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
Epidemiologia da Insuficiência Cardíaca.....	3
Insuficiência Cardíaca com Fração de Ejeção Reduzida vs. Insuficiência Cardíaca com Fração de Ejeção Preservada.....	4
Insuficiência Cardíaca Agudamente Descompensada.....	6
Fisiopatologia da Insuficiência Cardíaca.....	8
Remodelamento Cardíaco e o Papel da Matriz Extracelular.....	11
Metaloproteinases e Insuficiência Cardíaca.....	13
Perfil Inflamatório na Insuficiência Cardíaca.....	16
Citocinas Inflamatórias na Insuficiência Cardíaca.....	17
MicroRNAs.....	20
MicroRNAs nas Doenças Cardíacas.....	22
MicroRNAs na Insuficiência Cardíaca.....	24
MicroRNAs e Matriz Extracelular.....	26
miR-21.....	28
miR-150.....	29
3. JUSTIFICATIVA.....	31
4. OBJETIVOS.....	33

5. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA.....	34
6. ARTIGO 1.....	51
7. ARTIGO 2.....	78
8. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	103
Apêndice A TCLE-Pacientes.....	
Outras Colaborações.....	

## **RESUMO**

Dada a possível diferença fisiopatológica entre insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada (ICFEP) e reduzida (ICFER) associada à falta de biomarcadores capazes de diferencia-las, objetivamos comparar níveis de metaloproteinase-9, microRNAs e marcadores inflamatórios entre pacientes com ICFEP e ICFER durante e após episódios de IC descompensada. Os biomarcadores foram avaliados na admissão hospitalar, alta e em uma consulta ambulatorial. Os pacientes com ICFER apresentaram maiores níveis de MMP-9 e miR-150 após terapia aguda. MMP-9 e miR-150 reduziram e miR-21 aumentou após a alta comparado à admissão, porém, essas alterações foram transitórias nos dois grupos. Ainda, MMP-9 elevada e miR-21 reduzidos na consulta ambulatorial foram preditores de readmissão hospitalar. Os níveis de IL-18 no grupo ICFEP foram maiores, reduziram após a alta e se correlacionaram com troponina I. Concluímos que marcadores de remodelamento cardíaco estão mais alterados na ICFER e que a IL-18 pode atuar de forma distinta na ICFEP.

## 1. INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca (IC) apresenta elevada morbidade e mortalidade, representando um problema de saúde pública. A fisiopatologia da síndrome é complexa, envolvendo diversos sistemas neuro-humorais e autonômicos, além de ativação de vias intracelulares que regulam a viabilidade celular, a apoptose, o remodelamento da matriz extracelular (MEC), a formação de cicatriz fibrótica e angiogênese.

Além da ativação neuro-humoral, tanto em nível sistêmico quanto tecidual, ocorre o acionamento do processo inflamatório com alteração nos níveis de mediadores inflamatórios e liberação de citocinas anti e pró-inflamatórias. A inflamação é um componente central da resposta ao estresse tecidual e lesões no coração, promovendo remodelamento e cicatrização através de alterações da matriz extracelular, proliferação celular, da hipertrofia de cardiomiócitos, afetando também a capacidade contrátil do coração. Os mediadores inflamatórios podem contribuir para a progressão da alteração estrutural e funcional cardíaca, causando disfunção ventricular e fibrose do miocárdio. Sugere-se que a ativação inflamatória na IC contribua para a progressão da doença e piora da capacidade funcional.

Em especial, o papel da matriz extracelular e fibrose parecem cruciais para o remodelamento cardíaco e progressão da IC. Os genes responsáveis por estas funções estão profusamente ativados e evidências recentes indicam que os microRNAs têm papel central na sua regulação e dessa forma, podem representar uma peça chave na regulação das vias intracelulares envolvidas na fisiopatologia do remodelamento ventricular característico da IC.

Além disso, diversos estudos buscam avaliar as diferenças clínicas e fisiopatológicas na IC com fração de ejeção reduzida (ICFER) e IC com fração de ejeção preservada (ICFEP), bem como encontrar biomarcadores específicos em distintos estágios da doença, com o objetivo de diferenciar e identificar a causa da disfunção cardíaca. No cenário da IC aguda descompensada, o estado congestivo é sabidamente um momento de grande metabolismo celular, com incremento de marcadores inflamatórios, bem como marcadores de lesão celular e de “turnover” de matriz extracelular, culminando com a progressão do remodelamento ventricular patológico.

No entanto até o momento, nenhum estudo prospectivo se propôs a avaliar o perfil de expressão de microRNAs em estados compensados e descompensados de IC ou correlacioná-los com marcadores de atividade de matriz extracelular nestes pacientes. Sendo assim, no presente trabalho, buscamos avaliar os níveis de metaloproteinase 9 (MMP-9) e o perfil de expressão de microRNAs plasmáticos associados ao processo de fibrose cardíaca e inflamação (miR-21 e miR-150 respectivamente). Igualmente, avaliamos o perfil inflamatório destes pacientes nos diferentes estágios de compensação clínica e analisamos os diferentes cenários da IC, comparando pacientes com ICFER *versus* pacientes com ICFEP. Os resultados destas análises permitiram uma melhor compreensão dos mecanismos regulatórios e do impacto da descompensação na progressão da IC aguda.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### Epidemiologia da Insuficiência Cardíaca

A insuficiência cardíaca é uma das principais causas de internações por doenças cardiovasculares, possui alta taxa de mortalidade [1] e está associada a um alto impacto econômico devido aos custos das internações [2-4]. Sendo assim, representa um emergente problema de saúde pública [5]. Estudos epidemiológicos estimam que cerca de 6,4 milhões de brasileiros sofram de IC, de acordo com os dados da III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica de 2009.

No Brasil, segundo os registros do Sistema Único de Saúde (SUS), que atende cerca de 80% da população, as doenças do aparelho circulatório representam a terceira maior causa de hospitalização pelo SUS, com mais de um milhão de internações no ano de 2010, sendo mais frequente na faixa etária acima de 60 anos [1], conforme o esperado, visto que sua prevalência aumenta com a idade [6, 7]. Embora a síndrome se mantenha como causa mais frequente de internação por doença cardiovascular, o número de internações hospitalares por insuficiência cardíaca vem reduzindo progressivamente ao longo da última década, passando de 398.489 internações em 2000 para 264.727 internações em 2010. Somente na região Sul, a IC representa mais de 57 mil internações no mesmo ano. No entanto, o gasto total com internações por este quadro aumenta progressivamente e passou de cerca de 204 milhões de reais em 2000 para mais de 304 milhões de reais no ano de 2010. Os últimos dados do Ministério da Saúde indicam também que o número de óbitos por IC no país foi superior a 23.000 no ano de 2010 (DATASUS, 2010 ([www.datasus.gov.br](http://www.datasus.gov.br))).

## **IC com Fração de Ejeção Reduzida vs. IC com Fração de Ejeção Preservada**

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 de aumento das pressões de enchimento do ventrículo esquerdo. As causas da IC incluem as cardiopatias de origem isquêmica, hipertensiva, valvular e congênita, as cardiomiopatias (dilatada, hipertrófica e restritiva), as arritmias (taquicardiomiopatias), o uso de álcool e drogas, e as doenças do pericárdio [8].

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, que são fatores contribuintes para o desenvolvimento da disfunção cardíaca [7]. Neste cenário, atribui-se a maior parte do desarranjo hemodinâmico a disfunção diastólica dos ventrículos, com graus variáveis de deficiência de relaxamento e alteração da complacência tecidual. Muitas vezes, após intensa investigação clínica e laboratorial nenhuma causa evidente da síndrome consegue ser claramente identificada, então a etiologia é classificada como idiopática [1].

Ainda, os pacientes com IC são classificados quanto à presença de disfunção sistólica: quando possuem fração de ejeção (FE) do ventrículo esquerdo (VE) reduzida (ICFER), ou FE preservada (ICFEP). Na disfunção sistólica miocárdica ocorre um dano na função ventricular esquerda, levando a IC e desencadeando uma série de mecanismos compensatórios a fim de preservar o débito cardíaco. [9, 10]. Em curto prazo, esses mecanismos compensatórios,

ativados após o declínio inicial na capacidade ejetora do coração, são capazes de manter a função do ventrículo esquerdo dentro do estado fisiológico, de tal forma que a capacidade funcional do paciente é preservada ou levemente reduzida. Porém, com o tempo, a ativação sustentada desses sistemas provoca danos no ventrículo, com a piora do remodelamento do VE e subsequente descompensação cardíaca [10].

Já na ICFEP predomina a disfunção diastólica com o relaxamento do miocárdio prejudicado, há um aumento da rigidez da parede ventricular e uma diminuição do comprimento ventricular esquerdo, levando ao comprometimento do enchimento ventricular [10]. Na disfunção diastólica é comum a ocorrência de dados ecocardiográficos de função sistólica normal ou levemente alterada. Aproximadamente a metade dos pacientes com IC apresentam FE normal ou pouco alterada. O prognóstico dos pacientes que possuem fração de ejeção ventricular preservada não parece ser muito diferente dos pacientes com fração de ejeção reduzida, isto vem sugerindo que ocorram mecanismos patofisiológicos similares entre os grupos. Por outro lado, alguns estudos indicam que pacientes com FE preservada constituem um grupo de indivíduos diferente e mais heterogêneo [11]. Similarmente, alguns trabalhos tenham demonstrado diferenças em fatores prognósticos e desfechos clínicos entre os pacientes com ICFER e ICFEP, no entanto os resultados ainda são contraditórios no que diz respeito à efetiva diferenciação fisiopatológica entre os grupos [12-14]. Além disso, tem sido demonstrado que ICFER e ICFEP não podem ser facilmente diferenciadas na prática clínica, requerendo avaliação por exames de imagem. Esta barreira dificulta o diagnóstico efetivo da IC, uma vez que esta diferenciação pode ser crucial no tratamento e prognóstico dos pacientes com IC [15].

Assim, diversos estudos buscam avaliar as diferenças clínicas e fisiopatológicas nos pacientes com ICFER e ICFEP, bem como encontrar biomarcadores específicos em distintos estágios da doença, com o objetivo de diferenciar e identificar a causa da disfunção cardíaca. Além de um diagnóstico mais preciso e consequentemente um melhor prognóstico e tratamento [11, 16, 17].

### **Insuficiência Cardíaca Agudamente Descompensada**

Além das diferentes etiologias e formas de apresentação a IC possui duas classificações principais relacionadas ao quadro clínico dos pacientes. A primeira relaciona-se à progressão da doença e caracteriza-se por quatro estágios. O estágio A inclui indivíduos sob o risco de desenvolver IC, mas ainda sem alteração estrutural e sem sintomas atribuíveis à doença. O estágio B refere-se àqueles que adquiriram lesão estrutural cardíaca, mas ainda sem sintomas. O estágio C engloba os indivíduos com lesão estrutural cardíaca e sintomas da IC. O estágio D inclui os que apresentam sintomas refratários ao tratamento. Esta categorização permite definir o tipo de abordagem a ser realizada, seja ela preventiva (estágios A e B), terapêutica (estágio C) ou paliativa (estágio D). A segunda classificação foi proposta pela *New York Heart Association* (NYHA) e divide a IC conforme classes funcionais assim descritas: classe I - sem sintomas com limitação semelhante a indivíduos sem a doença, classe II - sintomas em atividades cotidianas, classe III - sintomas em esforços menores que os habituais e classe IV - sintomas em mínimos esforços ou no repouso [1, 5].

Os pacientes com IC apresentam uma variedade de manifestações clínicas, porém nenhuma é específica da síndrome. Os principais sintomas clínicos da IC

congestiva incluem fadiga, letargia, dispneia e edema, além de sinais físicos como taquicardia, estertores pulmonares, terceira bulha e pressão jugular venosa elevada [18]. A IC aguda caracteriza-se por um início rápido ou uma mudança clínica nesses sinais e sintomas, resultando na necessidade rápida de terapia. A IC aguda pode ainda ser nova ou devido à piora de uma IC pré-existente (IC crônica descompensada) [1]. Muitas dessas manifestações embora características na IC são de difícil interpretação, sobretudo em mulheres, idosos e obesos [7]. Habitualmente, o diagnóstico definitivo é relativamente simples e estabelecido pelo conjunto de informações derivadas da anamnese, do exame físico e de exames subsidiários, como o raio-X de tórax e a dosagem de peptídeos natriuréticos (BNP e pro-BNP). Muitos estudos clínicos utilizam escores compostos validados para o diagnóstico da síndrome, como o escore de Framingham e escore de Boston [1].

Na sala de emergência é essencial a identificação da etiologia da IC, da causa da descompensação e do grau de disfunção sistólica associada à síndrome. Aproximadamente 30-40% dos pacientes que se apresentam com IC aguda (crônica descompensada) não tem disfunção sistólica de ventrículo esquerdo evidente (Figura 1). Em amostra de pacientes brasileiros que procuram serviço de emergência, nosso grupo recentemente demonstrou que pacientes com IC e fração de ejeção preservada são mais frequentes em idosos ( $> 70$  anos de idade), do sexo feminino, tem etiologia não isquêmica, se apresentam com fibrilação ou flutter atrial, anemia, pressão de pulso ampla ( $> 45$  mm Hg) e não tem alterações de condução no eletrocardiograma (ECG) [19]. Um escore clínico, baseado nestas variáveis, é capaz de predizer com acurácia razoável (área sobcurva ROC de 0,76) o risco de disfunção sistólica. Estes achados sugerem que embora a sintomatologia da síndrome seja indistinguível, pacientes com ou sem disfunção sistólica de

ventrículo esquerdo 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 fração de ejeção preservada [20, 21].

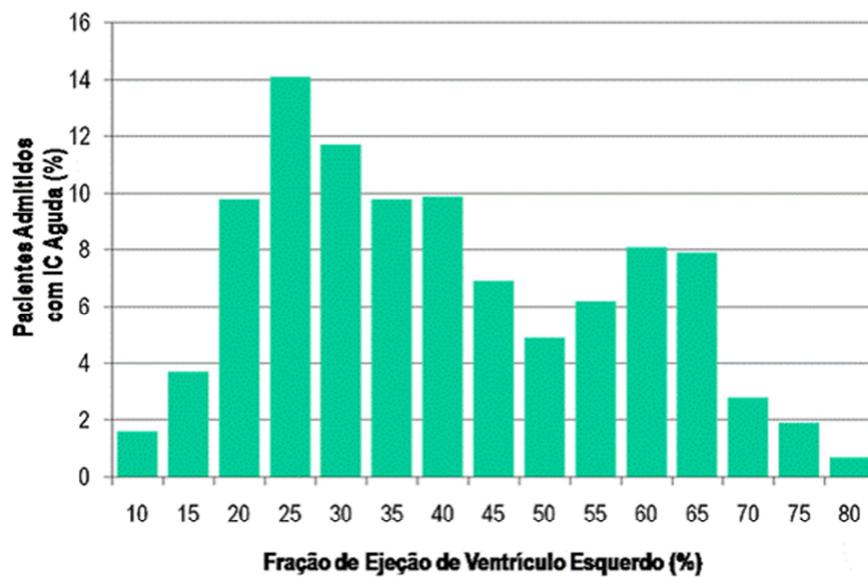


Figura 1. Fração de Ejeção de Ventrículo Esquerdo em 721 pacientes admitidos por IC aguda em hospital terciário[19].

### **Fisiopatologia da Insuficiência Cardíaca**

A IC se inicia após uma injúria miocárdica, onde mudanças adaptativas ocorrem nos miócitos sobrevidentes e na matriz extracelular levando ao remodelamento patológico do ventrículo esquerdo, com dilatação e prejuízo na contratilidade. O processo de remodelamento ventricular ocasiona hipertrofia e alterações na biologia dos cardiomiócitos, morte celular por necrose ou apoptose,

alterações na matriz extracelular, bem como alterações na geometria e arquitetura da cavidade ventricular [10].

Estas adaptações fisiopatológicas ocorrem por presença de defeito da contração miocárdica, de sobrecarga hemodinâmica excessiva ao ventrículo, ou por ambos. O coração possui três principais mecanismos compensatórios para manutenção de sua função de bomba: 1) o mecanismo de *Frank Starling*, no qual há aumento da pré-carga, com alongamento dos sarcômeros para fornecer superposição ótima entre os miofilamentos melhorando o desempenho contrátil; 2) o aumento da liberação de catecolaminas por nervos adrenérgicos e pela medula adrenal, produzindo efeito inotrópico positivo, aumentando a contratilidade miocárdica; 3) a hipertrofia miocárdica, com ou sem dilatação das câmaras cardíacas, na qual a massa de tecido contrátil está aumentada [5].

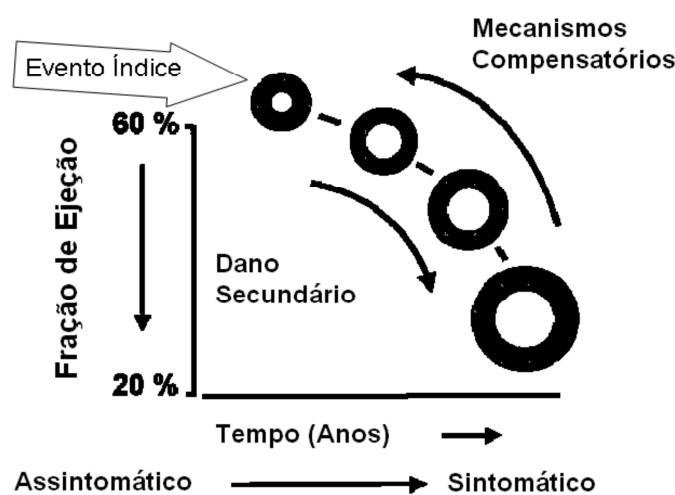
Dentre os mecanismos compensatórios acionados na IC estão: ativação do sistema renina-angiotensina aldosterona (SRAA) e do sistema nervoso simpático (SNS); aumento das concentrações de proteína C reativa (PCR), baixa resposta vasodilatadora da parede endotelial, menor expressão da proteína de óxido nítrico-sintase endotelial (eNOS) e aumento na expressão gênica pela produção de citocinas pró-inflamatórias e linfócitos, como o TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-18, PCR e interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) [22-27].

Inicialmente, esses sistemas compensatórios são capazes de restaurar a função cardiovascular, porém, ao longo do tempo, a ativação sustentada destas vias ocasiona efeitos sistêmicos deletérios [28] (figura 2), contribuindo para as manifestações clínicas da síndrome de IC, incluindo o desenvolvimento de sintomas, declínio na capacidade funcional, episódios de descompensação, instabilidade elétrica miocárdica e morte prematura, usualmente devido a falência

de bomba ou arritmias ventriculares [22]. Algumas mudanças que ocorrem no fenótipo dos miócitos durante o processo de remodelamento patológico são secundárias à reativação de um programa gênico que normalmente não é expresso no período pós-natal, bem como à redução da expressão de um número de genes normalmente expressos no coração adulto [5].

Resumidamente, em situações nas quais há redução do débito cardíaco, mecanismos neuro-humorais são ativados com o objetivo de preservar a homeostase circulatória. Apesar de primeiramente ser vista como uma resposta compensatória benéfica, a liberação endógena de neuro-hormônios vasoconstritores exerce papel deletério no desenvolvimento da IC. Assim, a progressão da insuficiência pré-existente se dá à custa da ativação do sistema nervoso simpático e renina-angiotensina-aldosterona, aumentando a sobrecarga de volume e a pós-carga do ventrículo esquerdo. Deste modo, a síndrome clínica da IC ocorre em consequência às limitações ou falha definitiva desses mecanismos compensatórios [5]. Essas alterações do controle autônomo do coração e da circulação periférica variam com o modelo e a etiologia da IC, bem como com a natureza e intensidade do estímulo provocador. Em geral, nos estágios iniciais da IC, a ativação do sistema nervoso autônomo atua para manter o débito cardíaco, aumentando a contratilidade miocárdica e elevando a frequência cardíaca; na IC grave, a vasoconstrição mediada pelo sistema nervoso simpático e pela angiotensina II circulante, tende a manter a pressão arterial e, desviar o fluxo sanguíneo dos leitos cutâneo, esplâncnico e renal para preservar a perfusão dos leitos coronários e cerebral. Em pacientes com IC moderada, estas alterações ocorrem primariamente durante o esforço, enquanto nos pacientes com IC grave, elas estão presentes mesmo em repouso [5].

Como resposta, para portadores de IC a perda da capacidade funcional é consequência destas alterações centrais e periféricas. Sob a ótica central, ocorre incapacidade em se aumentar adequadamente o volume sistólico (VS) e a frequência cardíaca (FC), resultando em menor débito cardíaco (DC) [29]. Portanto, a complexa interação dos fatores hemodinâmicos, ativação neuro-hormonal sistêmica e local além de alterações circulatórias e tissulares periféricas, caracterizam a IC como síndrome progressiva, não homogênea e de múltiplas causas [29].



**Figura 2.** Patogênese da IC. Adaptado de Mann DL. *Mechanisms and Models in Heart Failure: A Combinatorial Approach*. Circulation 1999;100:999-1008.

### Remodelamento Cardíaco e o Papel da Matriz Extracelular

Além das mudanças fisiopatológicas que alteram o volume e composição dos miócitos cardíacos, várias alterações ocorrem dentro da matriz extracelular do miocárdio, incluindo a fibrose perivasicular e a degradação da matriz extracelular. A fibrose pode ser desencadeada por angiotensina II, endotelina e aldosterona, que promovem a deposição excessiva de colágeno fibrilar após a morte dos miócitos ao

redor dos vasos sanguíneos no interior do miocárdio. Já 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 [10]. A degradação da matriz extracelular é realizada pelas metaloproteinases de matriz (MMPs) que podem ser ativadas no miocárdio insuficiente por citocinas e fatores de crescimento.

As metaloproteinases de matriz formam uma família de aproximadamente 30 enzimas proteolíticas zinco-dependentes capazes de degradar diferentes componentes da matriz extracelular, como colágeno, elastina e proteoglicanos [30]. As MMPs atuam em diversos processos fisiológicos, como o desenvolvimento embrionário, crescimento tecidual e morfogênese. Estas proteases são identificadas e classificadas de acordo com o substrato específico em que atuam, e incluem, entre outras, as colagenases intersticiais como a MMP-1, estromelisinas como a MMP-3 e gelatinases como a MMP-2 e MMP-9 [31].

A MMP-1 cliva o colágeno tipo I, II e III da matriz extracelular, podendo atuar também sobre outros componentes da matriz, bem como sobre outras moléculas. A MMP-3, secretada por macrófagos, cliva diversos tipos de substratos como proteoglicanos, colágenos tipo IV e IX, fibronectina e laminina e, ainda, pode ativar a MMP-1. Já a MMP-9 tem a capacidade de degradar colágenos tipo I, III, IV e V, gelatinas, proteoglicanos e elastina [31].

A atividade das MMPs pode ser regulada em múltiplos níveis, tais como: transcrição, ativação de precursores zimogênicos, interação com outros componentes específicos da matriz extracelular e inibição pelos inibidores endógenos tissulares das MMPs (TIMPs) [30]. Alterações em qualquer desses mecanismos podem levar a modificações na expressão ou atividade das MMPs.

Tais modificações vêm sendo demonstradas em diferentes condições patológicas, como nos processos inflamatórios, artrite, metástase tumoral, doenças respiratórias, aneurisma vascular, remodelamento e doenças cardiovasculares [30, 32].

### **Metaloproteinases e Insuficiência Cardíaca**

Tendo em vista a importância do remodelamento da matriz no desenvolvimento e progressão da IC, diversos estudos têm procurado analisar o perfil de biomarcadores de remodelamento de matriz nos diferentes cenários da IC. Como um estudo que demonstrou que os níveis de MMP-2 estão elevados em pacientes agudamente descompensados quando comparados a pacientes estáveis e indivíduos saudáveis. Ainda, o estudo evidenciou que os níveis de MMP-2 reduzem na alta hospitalar e no período de recompensa clínica [33]. Similarmente, um painel de biomarcadores associados a mudanças na homeostase da matriz que foi capaz de diferenciar pacientes com hipertrofia ventricular esquerda daqueles pacientes com IC diastólica [34]. Ainda, pacientes com cardiomiopatia induzida por estres e apresentação clínica aguda, possuem um perfil de MMPs e TIMPs similar ao de pacientes com IC hipertensiva e diastólica, mas diferente dos pacientes com infarto agudo do miocárdio [35]. Além disso, pacientes com amiloidose cardíaca apresentam perfis diferentes de MMPs e TIMPs em seus subtipos [36].

Níveis elevados de MMP-2 estão associados com redução da função sistólica em pacientes com cardiomiopatia hipertrófica e fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) preservada [37]. Além disso; pacientes com IC

diagnosticada precocemente e fração de ejeção preservada apresentam níveis maiores de MMP-2 em comparação aos indivíduos saudáveis [38]. Igualmente, pacientes com ICFEP apresentaram níveis mais elevados de MMP-2 em comparação com pacientes com ICFER e indivíduos saudáveis. Ainda, MMP-2 e TIMP-1 demonstraram correlação com disfunção diastólica e valor prognóstico em pacientes com IC [39]. Do mesmo modo, um estudo avaliando o prognóstico de pacientes com IC sistólica crônica demonstrou que níveis elevados de MMP-2 estão associados a um pior desfecho clínico [40]. Ainda, pacientes com terapia de resincronização apresentaram associação entre FEVE  $\leq$  35% e níveis séricos reduzidos de MMP-1, assim como redução nos níveis de MMP-2 após implante da terapia [41, 42]. Entretanto, Kato e colaboradores observaram níveis elevados de MMP-2 em relação aos controles, mas nenhuma diferença após implante de assistente ventricular [43].

Além disso, foi observado que níveis de NT-proBNP, MMPs 2 e 9, TIMP e Colágeno são diferentes entre pacientes com ICFEP e ICFER, sugerindo heterogeneidade entre os grupos [11]. Ainda, pacientes com cardiomiopatia dilatada e IC isquêmica, assim como pacientes chagásicos apresentam níveis elevados de MMPs 2 e 9 [42, 44].

Adicionalmente, maiores níveis séricos de MMP-2 ativa foram preditores de remodelamento, ao passo que níveis elevados de MMP-9 inativa foram associados com preservação do volume ventricular pós infarto agudo do miocárdio (IAM) [45]. Similarmente, níveis de MMP-2 e 9 ativa estão elevados em pacientes na fase aguda do IAM com elevação de ST, reduzindo após intervenção percutânea coronária e pacientes com menor fração de ejeção apresentavam maiores níveis de MMP-9 após a terapia [46].

Níveis elevados de MMP-9 estão associados com severa disfunção diastólica em pacientes com doença arterial coronariana e fração de ejeção preservada [47]. Igualmente, maiores níveis de MMP-9 estão associados com redução do tamanho do ventrículo esquerdo e diminuição da hipertrofia cardíaca em pacientes com cardiomiopatia hipertrófica e FEVE preservada [37]. Ainda níveis elevados de MMP-9 estão associados a uma maior mortalidade e menor tempo livre de eventos em pacientes com cardiomiopatia isquêmica [48]. Do mesmo modo, maiores níveis de MMP-9 e TIMP-1 são preditores de pior prognóstico da IC, por redução da sobrevida e maior risco de transplante e morte [49]. Além disso, a razão MMP-9/TIMP-1 está elevada em biopsias de pacientes com cardiomiopatia dilatada, assim como correlacionada a apoptose, mostrando o envolvimento das MMPs nos processos de morte celular e degradação da matriz extracelular [50]. Portanto, MMP-9 vem sendo considerada um possível biomarcador de remodelamento cardíaco e inflamação [51].

No entanto, MMP-9 foi significantemente menor no gradiente transcardiaco de pacientes com IC avançada, demonstrando que níveis periféricos dessa enzima, podem não refletir o turnover de remodelamento cardíaco [52].

Assim, tendo em vista a ação das MMPs em múltiplos cenários das doenças cardiovasculares, alguns trabalhos têm avaliado a ação de diversos medicamentos, que atuam em diferentes vias, sob o perfil de expressão e atividade destas enzimas. Sendo assim, as MMPs atualmente são vistas como um possível alvo terapêutico [53].

## **Perfil Inflamatório na Insuficiência Cardíaca**

A progressão da IC não depende exclusivamente das alterações hemodinâmicas, neurohumorais e endócrinas, pois a ativação inflamatória local e sistêmica inicialmente contribui para compensar a perda da capacidade de bombeamento cardíaco [54, 55].

A inflamação é um componente central da resposta ao estresse tecidual e lesões no coração, promovendo remodelamento e cicatrização através de alterações da matriz extracelular, proliferação celular, da hipertrofia de cardiomiócitos, afetando também a capacidade contrátil desses [56]. Os mediadores inflamatórios podem contribuir para a progressão da alteração estrutural e funcional cardíaca, causando disfunção ventricular e fibrose do miocárdio, indução da morte celular por apoptose e ou necrose [57], como também manifestações periféricas com modificações funcionais e perda de massa muscular esquelética [58, 59].

As citocinas são moléculas que interligam, amplificam e propagam a resposta imune, recrutando células para áreas de inflamação, estimulando sua divisão, proliferação e diferenciação. Além das células imunológicas, fibroblastos, plaquetas, endotélio, músculo liso vascular e o próprio cardiomiócito são capazes de produzir amplo espectro desses peptídeos biológicos, principalmente sob o estímulo de hipóxia, estresse mecânico e de endotoxinas. As citocinas promovem inflamação, disfunção endotelial, coagulação, desacoplamento do estímulo beta-adrenérgico, geração de radicais livres, perda gradativa de massa muscular e intolerância ao esforço, entre outros efeitos [60-63].

## Citocinas Inflamatórias na Insuficiência Cardíaca

Dentre os efeitos observados pelas citocinas pró-inflamatórias na IC, destacam-se aqueles vinculados à função ventricular esquerda: inotropismo negativo, alterações no metabolismo cardíaco e remodelamento ventricular, gerando hipertrofia dos cardiomiócitos, necrose, apoptose e alterações na matriz extracelular do miocárdio [61, 62, 64].

As citocinas pró-inflamatórias mais estudadas na IC são o TNF- $\alpha$  e interleucinas IL-1  $\beta$ , IL-1 e IL-6 tanto em níveis plasmáticos quanto teciduais [65]. Níveis elevados de citocinas são detectados em estágios precoces da IC, mesmo antes da ativação neuro-humoral [66].

As IL-6 e IL-18 são consideradas citocinas pró-inflamatórias que podem ser produzidas por células nucleadas cardíacas [54]. Ainda, estas citocinas podem ser liberadas para a corrente sanguínea através da secreção de monócitos e macrófagos presentes no miocárdio lesado [67].

Ainda, a IL-6 pode ser induzida pela angiotensina II, via final da ativação do sistema renina-angiotensina na IC, em diferentes tipos celulares, como cardiomiócitos, fibroblastos, células endoteliais e musculares lisas dos vasos [68]. Também, a IL-6 pode ser secretada por macrófagos, ceratinócitos, osteoblastos, células T, neutrófilos, eosinófilos, células musculares esqueléticas e até mesmo tecido adiposo [69]. Portanto, sua ação pró-inflamatória está relacionada à sua hiperprodução crônica, e pode promover efeitos adversos sobre contratilidade miocárdica como deposição anormal de colágeno e redução de proteínas locais levando a hipertrofia patológica [70].

Além disso, o aumento sistêmico da IL-6 favorece a atrofia muscular esquelética com perda de proteína e um maior risco de trombose devido à ação estimulante na produção de fibrinogênio [71]. Ainda, os efeitos deletérios da IL-6 sobre o miocárdio são mais presentes e se destacam na progressão da IC. O aumento nos níveis plasmáticos de IL-6 em pacientes com IC vem sendo associado com disfunção ventricular, gravidade da doença, pior prognóstico e mortalidade [24, 72-76]. Do mesmo modo, pacientes idosos (> 65 anos) com ICFEP apresentam níveis maiores de IL-6 e estes estão associados com maior índice de readmissão hospitalar [77]. Adicionalmente, maiores níveis de IL-6 foram associados à disfunção diastólica em pacientes com hipertensão e fração de ejeção preservada [78]. Por outro lado, a ação anti-inflamatória e protetora cardiovascular dessa citocina está associada à manutenção da homeostase das células cardíacas pela inibição da apoptose e prevenção da hipertrofia cardíaca nos estágios iniciais da doença [66, 79]. Sendo assim, a IL-6 vem sendo amplamente discutida na literatura devido seu papel ambíguo, pois pode atuar como uma citocina pró-inflamatória ou anti-inflamatória.

A IL-18 pertence à família da IL-1 e pode estimular especificamente células T-helper, assim como induzir à secreção de TNF- $\alpha$  e IL-6 nos macrófagos. Ainda, um estudo demonstrou que a IL-18 pode induzir a expressão de mRNA do Peptídeo Natriurético Atrial (ANP) que é um estabelecido marcador de IC [80]. Além disso, foi demonstrado que níveis séricos elevados de IL-18 podem ser encontrados mesmo em estágios estáveis da IC congestiva [81]. Do mesmo modo, maiores níveis dessa citocina estão associados à depressão da contratilidade miocárdica e significativa redução da fração de ejeção [70, 82]. Um estudo avaliando o perfil inflamatório em modelo experimental de IC observou aumento de

IL-18 uma semana após lesão promovida pelo infarto. Além disso, no período em que a IC foi considerada estabelecida, outros marcadores inflamatórios presentaram seus níveis elevados, demonstrando a ação das citocinas no desenvolvimento e progressão da IC [83].

Níveis plasmáticos elevados de TNF- $\alpha$  estão associados com o desenvolvimento de IC em pacientes idosos [80]. Além disso, níveis elevados desta citocina demonstraram, por meio de modelo multivariado, um papel preditor de mortalidade em pacientes com IC avançada [73]. Do mesmo modo, maiores níveis de TNF-  $\alpha$  são preditores de readmissão hospitalar em pacientes idosos [77]. Ainda pacientes com ICFEP apresentaram níveis mais elevados de TNF- $\alpha$  quando comparados com pacientes com ICFER e indivíduos saudáveis, e seus níveis se correlacionaram com diversas características clínicas, sugerindo que esta citocina pode ser utilizada como um importante marcador de comorbidades induzidas pela resposta inflamatória [84]. Adicionalmente, maiores níveis de TNF-  $\alpha$  estão correlacionados com disfunção diastólica em pacientes hipertensos com fração de ejeção preservada [78].

Outra citocina, porém, que demonstra propriedades anti-inflamatórias, inibindo a produção de várias outras citocinas, como o próprio TNF- $\alpha$  é a interleucina 10 (IL-10) [85]. Ainda, foi demonstrado que a queda na razão IL-10/TNF- $\alpha$  está fortemente correlacionada com a progressão da IC pós infarto agudo do miocárdio [86]. Entretanto, até o momento existem poucos estudos avaliando o potencial papel prognóstico e diagnóstico da IL-10 nos diferentes cenários da IC.

## MicroRNAs

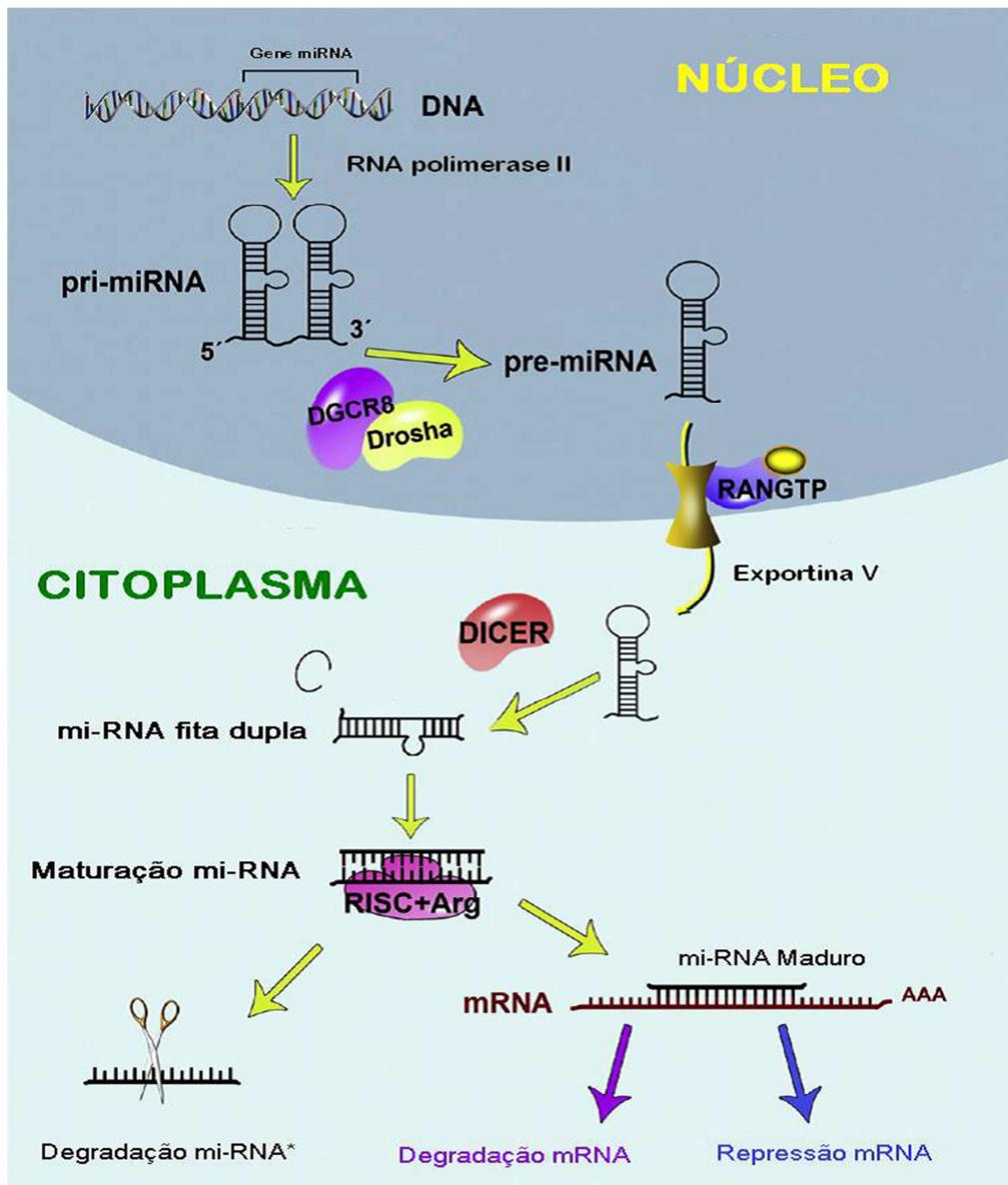
MicroRNAs ou miRs são pequenos RNAs não-codificantes que regulam a expressão gênica ao nível pós-transcricional pela degradação ou inibição de genes alvos. A variação significativa no grau de complementariedade nas sequências permite que um único microRNA atinja vários mRNAs, regulando múltiplos genes. Os microRNAs são predominantemente estudados no câncer, embora ainda seja desconhecido seu padrão de expressão ou o seu papel nesta patologia bem como em outras doenças, especialmente nos distúrbios cardiovasculares [87-89].

Em 2006, aproximadamente 650 microRNAs já haviam sido identificados no genoma humano [87]; hoje já existem mais de 1000 microRNAs descritos. Esses microRNAs exercem um papel relevante na modulação de algumas funções celulares e sua desregulação está associada a diversas condições patológicas [90]. Os microRNAs regulam a diferenciação de células estaminais, a neurogênese, a hematopoiese, a secreção de insulina, a resposta imune, o desenvolvimento e a função do músculo cardíaco e esquelético. Alterações na expressão dos microRNAs têm sido associadas com a desregulação no desenvolvimento de diversas espécies como por exemplo em plantas, *Drosophila* (mosca-das-frutas), zebrafish (peixe conhecido popularmente como paulistinha), roedores e seres humanos.

Os microRNAs são transcritos primeiramente pela RNA polimerase II e são chamados de pri-MIRs (primários). Esses pri-MIRs são clivados no núcleo pela Drosha, uma RNase do tipo III, que associada a uma proteína DGCR8 gera o pre-MIR (precursor). O pre-MIR possui uma estrutura secundária (stem-loop) de aproximadamente 65 nucleotídeos. Posteriormente, esse pre-MIR é exportado para

o citoplasma, através da exportina-5 e processado pela ribonuclease Dicer (proteína altamente conservada) e seus cofatores que ativam a proteína ativadora de cinase (PKR), tornando-se um microRNA maduro. Após, a proteína argonauta (eIF2C2 ou Ago2a em humanos), da família das endonucleases, interage para formar o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), essencial para direcionar o microRNA até o RNA mensageiro (mRNA) alvo. O reconhecimento dos alvos pelo microRNA ocorre na região 3' do mRNA-alvo, principalmente devido a complementariedade com a sequência seed (2°-8° nucleotídeos do microRNA; Figura 3) [87, 91]. Uma expressão aumentada dos miRNAs pode levar a uma menor expressão dos mRNAs-alvo, enquanto que uma diminuição da expressão dos mesmos pode aumentar os níveis de mRNAs devido a perda da inibição dos miRNAs sobre seus alvos. Estima-se que os miRNAs regulem a expressão de 30% dos genes que compõem o genoma humano [92].

A abordagem utilizada para o estudo dos microRNAs tem como elemento fundamental sua especificidade em relação ao seu alvo correlacionado a doença. Baseado neste critério, a análise do perfil de expressão de microRNAs revela que o miR-1, let-7, miR-26a, miR-30 e miR-126-3p são altamente expressos no músculo cardíaco de camundongos normais [93].



**Figura 3.** Biogênese dos microRNAs. (Adaptado de Orenes-Piñero E, Montoro-García S, Patel JV, Valdés M, Marín F, Lip GY. Role of microRNAs in cardiac remodelling: New insights and future perspectives. *Int J Cardiol.* 2013; 167:1651-1659)

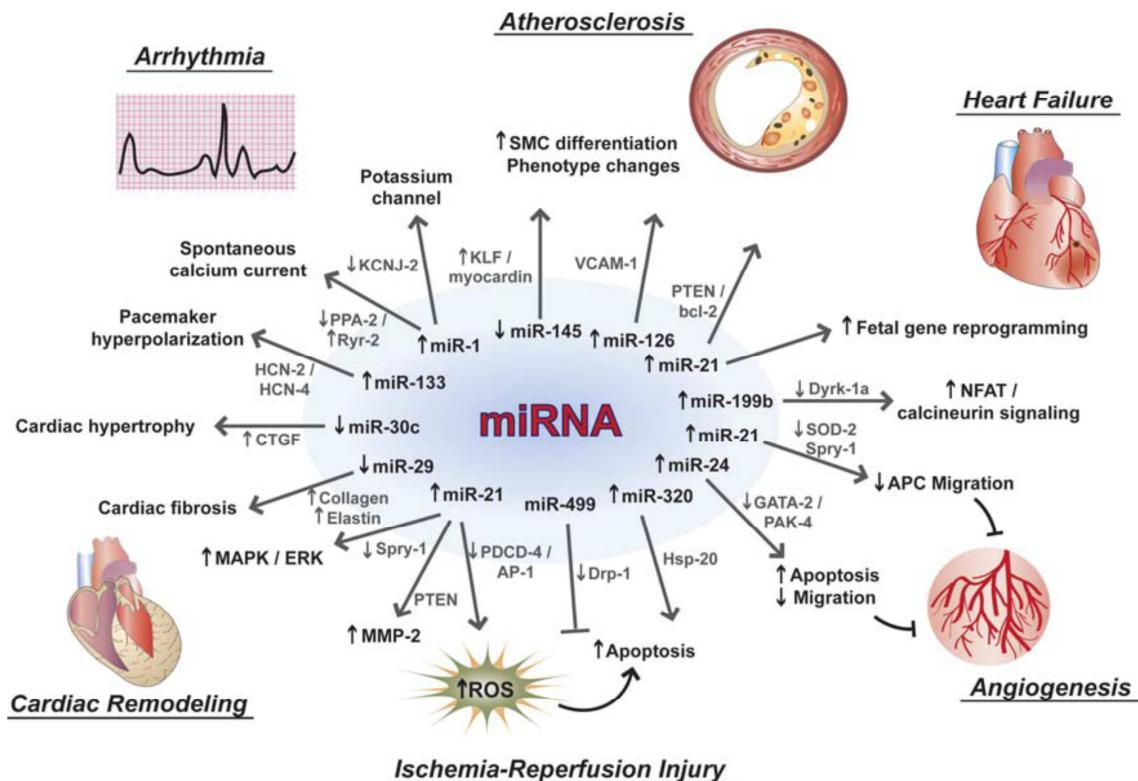
### MicroRNAs nas Doenças Cardíacas

Diversos estudos têm revelado o importante papel dos miRNAs em doenças cardiovasculares, diabetes e câncer. Os miRNAs mais abundantes no músculo cardíaco são o miR-1, let-7, miR-133, miR-126, miR-30c e miR-26a. Além disso, os

miRNAs parecem ter papel importante no controle do crescimento celular por hipertrofia e remodelamento das câmaras; sendo assim, os miRNAs surgem como potenciais alvos terapêuticos [94, 95].

Além disso, estudos tem demonstrado a importância dos níveis de microRNAs cardio-específicos como biomarcadores plasmáticos no infarto agudo do miocárdio, tais como o miR-1, miR-133 e miR-499 [94, 96]. Em um estudo recente, Wang e colaboradores (2010) avaliaram os níveis de expressão de microRNAs como potenciais biomarcadores em amostras de plasma e tecido de humanos e de ratos com IAM. No estudo foi evidenciado que a expressão do miR-208 no plasma de ratos estava aumentada após a indução do IAM, sugerindo que pode ocorrer a presença e possível alteração nos níveis de microRNAs na circulação sanguínea quando há lesão no coração. Na análise de plasma humano verificaram que em indivíduos saudáveis, os níveis plasmáticos de miR-208 foram indetectáveis, enquanto que nos pacientes com IAM estavam muito aumentados [94]. Ji e colaboradores (2009) também demonstraram que as concentrações plasmáticas do miR-208 estavam elevadas em um modelo experimental de ratos utilizando isoproterenol para induzir o dano miocárdio, indicando ser um importante marcador de lesão cardíaca [97].

As mudanças no perfil de expressão de microRNAs em doenças específicas, assim como na insuficiência cardíaca, têm sido estudadas utilizando o método de microarranjo que é capaz de demonstrar os microRNAs que tem sua expressão alterada em diversas condições, podendo apresentar sua expressão aumentada ou diminuída em resposta a diferentes lesões teciduais (Figura 4).



**Figura 4.** Alvos de miRNAs na fisiopatologia cardiovascular (S. Dangwal *et al*, 2012).

## MicroRNAs na Insuficiência Cardíaca

Diversos estudos sugerem que os microRNAs são diferencialmente regulados na insuficiência cardíaca desempenhando um papel critico na patogênese e progressão da doença. Na insuficiência cardíaca a resposta inicial compensatória é acompanhada por modificações que levam a reexpressão de genes fetais. O perfil de expressão de microRNAs e RNAs mensageiros de genes fetais foram correlacionados em amostras de miocárdio fetal e transplantes [98].

O perfil de expressão de diversos microRNAs como let-7c, miR-1, miR-15b, miR-100, miR-195, miR-342, miR-191, miR-23 e miR-499 foi diferente em amostras de biopsias de ventrículo esquerdo de pacientes com IC e cardiomiopatia dilatada, isquêmica ou com estenose aórtica. Esses resultados demonstraram que os

microRNAs em doenças cardíacas apresentam padrões de expressão alterados que diferem conforme a etiologia da doença [99].

Níveis plasmáticos elevados de miR-423-5p apresentaram excelente acurácia para diagnosticar dispneia por IC. Além de uma correlação com níveis de NT-proBNP e menor fração de ejeção ventricular. Ainda, avaliando tecido cardíaco pós-morte, maiores níveis deste microRNA estavam correlacionados com morte por progressão da doença [100]. Além disso, foi demonstrado que alguns microRNAs apresentam perfil de expressão diferente entre pacientes em relação ao grupo controle e estes apresentavam correlação com parâmetros clínicos prognósticos [101, 102]. Do mesmo modo, diversos microRNAs apresentaram perfil de expressão diferente entre pacientes com IC preservada e indivíduos saudáveis, ainda estes microRNAs demonstraram correlação com severidade da doença [103]. Igualmente, foi observado um perfil de expressão diferenciado em pacientes com disfunção diastólica em comparação a pacientes com cardiomiopatia mais disfunção sistólica [104].

Ainda, alguns trabalhos comparando microRNAs circulantes em pacientes com ICFER e ICFEP, demonstraram que perfis de expressão de diferentes microRNAs são capazes de diferenciar pacientes com IC dos controles saudáveis, bem como distinguir os tipos de IC [105, 106]. No entanto, um estudo avaliando microRNAs no fluido pericárdico de pacientes com diferentes patologias cardíacas e estágios da doença verificou que não foi possível detectar nenhum perfil de expressão capaz de diferenciar as patologias cardiovasculares ou condição clínica [107].

Portanto, pequenos estudos clínicos têm buscado determinar perfis de expressão de microRNAs em pacientes com diferentes cenários de IC. Entretanto,

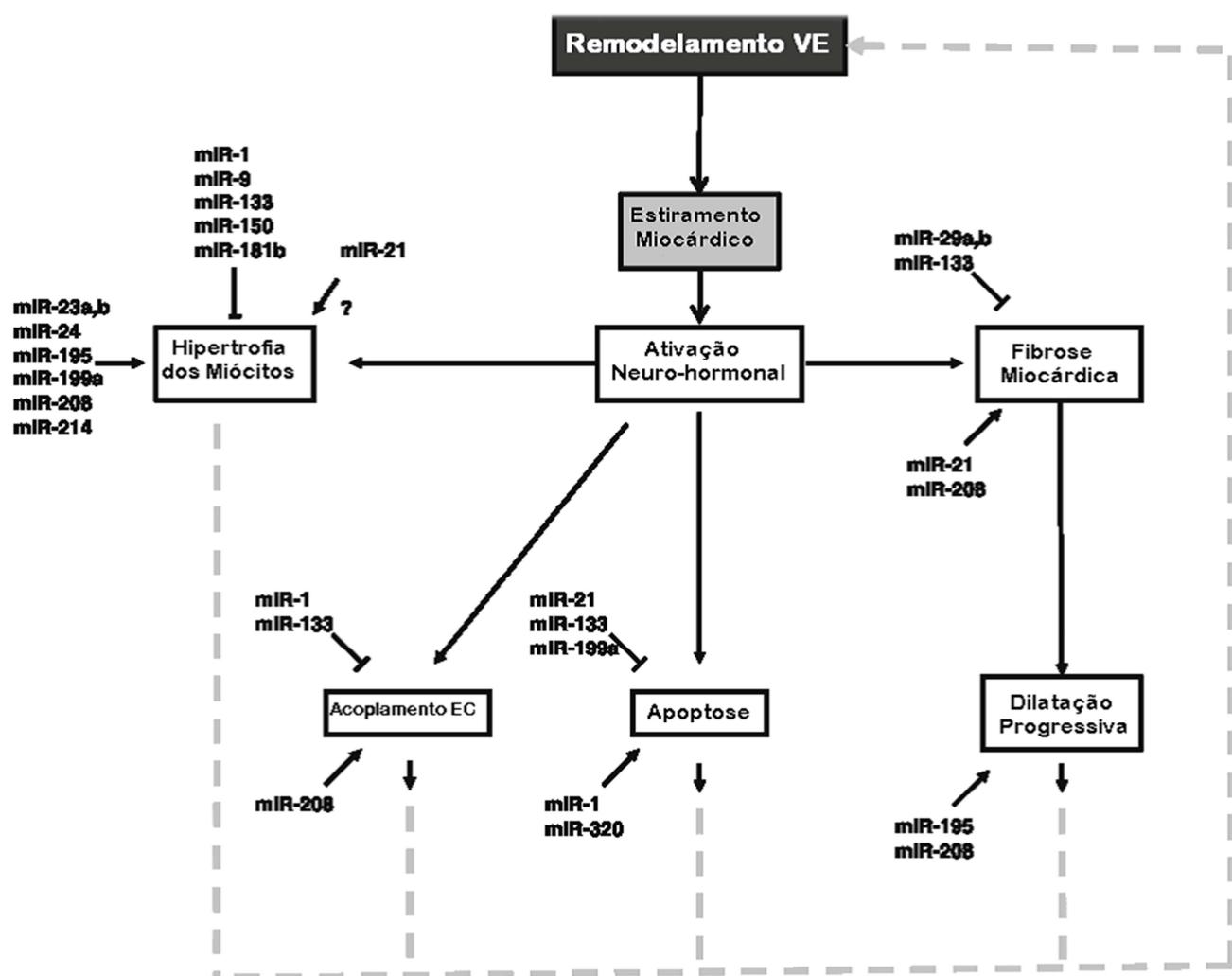
seus resultados são controversos, possivelmente devido à limitação por falta de protocolos padronizados, pequeno tamanho amostral e alto grau de variabilidade entre os grupos [108]. Contudo, os microRNAs são emergentes biomarcadores para distinguir ICFER de ICFEP, e futuramente facilitar o diagnóstico tratamento de forma mais precisa [109, 110].

### **MicroRNAs e matriz extracelular**

A atividade da matriz extracelular está intimamente relacionada ao desenvolvimento de fibrose miocárdica, sendo uma marca na hipertrofia e IC [100]. No momento existem 4 microRNAs descritos que podem estar envolvidos na regulação de fibrose cardíaca: miR-21, miR-29, miR-30 e miR-133. Estes microRNAs estão envolvidos em rotas de degradação e síntese de componentes da matriz, tendo com genes alvos MMPs, colágeno ou sinalizantes de sua ação [100]. O papel destes microRNAs e seus mRNAs alvos na regulação da fibrose cardíaca e durante o processo de hipertrofia já foi demonstrado em modelo animal [111].

Os microRNAs -1 e -133 são preferencialmente expressos no músculo cardíaco e esquelético apresentando um papel importante no remodelamento do coração durante o processo de cardiogênese [112]. Estes microRNAs estão localizados no mesmo lócus cromossômico e são transcritos simultaneamente no tecido durante o desenvolvimento. Ainda, um estudo em modelo animal e *in vitro* demonstrou que os microRNAs -1 e 133 apresentam papéis distintos na modulação da proliferação do músculo esquelético e sua diferenciação, com baixos níveis de expressão no coração em desenvolvimento comparado ao encontrado em

camundongos adultos [113]. Estudos experimentais, envolvendo modelos com ganho ou perda de função cardíaca, tem demonstrado que os microRNAs modulam vários aspectos do fenótipo da insuficiência cardíaca [100, 101]. Ainda, níveis circulantes de miR-133 e miR-423-5p estão alterados em pacientes com IAM, no entanto estes microRNAs não apresentaram associação com remodelamento cardíaco pós IAM [114].



**Figura 5:** O papel de diferentes miRNAs no processo de remodelamento cardíaco. VE, ventrículo esquerdo. EC, excitação-contração. (Adaptado de Topkara VK et al, 2011).

## miR-21

O miR-21 é um dos miRs mais estudados em condições fisiológicas e em muitas doenças como as cardiovasculares e o câncer [115-117]. Isso se deve ao fato de o miR-21 estar envolvido em muitos processos biológicos importantes como angiogênese, apoptose, inflamação e crescimento celular. Em relação a apoptose, a maioria dos estudos têm demonstrado o papel protetor do miR-21 [88, 115, 117]. A inibição da apoptose é de particular importância nas doenças cardiovasculares. Estudos em modelos de isquemia/reperfusão e IAM demonstraram redução na área de infarto e melhora na função cardíaca, assim como, menor apoptose e deposição de colágeno associados à expressão elevada de miR-21 [116, 118-120]. Além disso, foi sugerido que o miR-21 também participa do processo inflamatório, sendo induzido por interleucina 6 e TNF- $\alpha$ , demonstrando assim um potencial efeito anti-inflamatório [121-123]. Ainda, estudos experimentais demonstram que o miR-21 parece ter um papel importante na angiogênese [124].

Na insuficiência cardíaca o papel do miR-21 permanece controverso. O miR-21 está envolvido com o desenvolvimento cardíaco fetal e progressão da IC em células humanas. Esses dois processos têm muitas similaridades na expressão de genes e miRs [98]. Níveis de expressão elevados de miR-21 foram observados em fibroblastos isolados de pacientes com IC, assim como em modelo animal de IC induzida por constrição aórtica (TAC). Ainda, no modelo de TAC em camundongos, foi observado associação do miR-21 com fibrose, hipertrofia e disfunção cardíaca [98]. Outro estudo, demonstrou que altos níveis de miR-21 foram acompanhados de alargamento do VE, hipo-contratilidade e fibrose em ratos com IC pós-IAM [125]. A superexpressão de miR-21 foi detectada no coração de animais submetidos ao

modelo de TAC [126, 127]. Além disso, o nocaute gênico do miR-21 (miR-21/-) foi suficiente para reduzir a hipertrofia cardíaca *in vitro* [128]. Entretanto, Tatsuguchi e cols. sugeriram que o miR-21 regula negativamente a hipertrofia cardíaca patológica em uma abordagem de perda e ganho de função no modelo TAC em camundongos [129].

No entanto, camundongos nocaute para miR-21 (miR-21/-), submetidos a diferentes estresses cardíacos, apresentam todo o fenótipo de hipertrofia cardíaca, demonstrando que o miR-21 não é essencial para o remodelamento cardíaco patológico [130].

Tendo em vista o papel dos microRNAs na progressão da IC, alguns estudos buscaram avaliar o perfil de expressão dos microRNAs em diferentes cenários da IC. Como um estudo que avaliou pacientes com estágio final de IC antes e após implante de assistentes ventriculares e observou redução nos níveis de expressão do miR-21, entre outros, em 1, 3 e 6 meses após implante [131].

## **miR-150**

O miR-150 é altamente expresso nos gânglios linfáticos, timo, baço, cérebro, coração, e está envolvido na regulação da imunidade inata. Este miR foi encontrado reduzido em pacientes com IAM e IC, assim como em modelos animais dessas doenças [98, 126, 127, 132]. A superexpressão do miR-150 reduziu a migração de monócitos e produção de citocinas pró-inflamatórias e isso resultou na melhora da função cardíaca, com redução da área infarto, da apoptose e dos níveis inflamatórios após o IAM. Níveis elevados de miR-150 foram associados ao desenvolvimento cardíaco em fetos e a pacientes com prognóstico favorável,

demonstrando um papel protetor no desenvolvimento do coração [98, 127, 133, 134]. Esse papel protetor foi demonstrado por Liu e cols. utilizando um modelo transgênico de miR-150 seguido por cirurgia TAC em camundongos [132]. Esses animais tiveram uma taxa de sobrevida 25% maior comparados aos animais selvagens, 8 semanas após a cirurgia. Além disso, a superexpressão miR-150 atenuou a fibrose, hipertrofia e disfunção cardíaca. Em uma abordagem de perda e ganho de função foi demonstrado que o miR-150 regula negativamente os níveis de proteína SRF no coração [132]. Da mesma forma, outro estudo com abordagem de perda de função do miR-150 demonstrou o aumento da apoptose cardíaca, fibrose, disfunção cardíaca e menor sobrevida após IAM em camundongos [135]. Foi identificado que o miR-150 inibe diretamente os genes pró-apoptóticos EGR2 e P2X7R, sugerindo que miR-150 protege o coração contra o estresse isquêmico, em parte, pela repressão desses genes [135]. Outros estudos identificaram ZEB1, NOTCH3, c-Myb como alvos do miR-150, demonstrando um possível efeito desse miR sobre a proliferação celular, angiogênese, apoptose e sobrevivência [136-138].

No entanto, ainda faltam estudos que avaliem o perfil de expressão destes microRNAs e sua correlação com marcadores de atividade da matriz extracelular em pacientes com IC.

### **3.JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

#### **Justificativa**

Diversas evidencias recentes sugerem que microRNAs podem representar uma peça chave na regulação das vias intra-celulares envolvidas na fisiopatologia do remodelamento ventricular característico da insuficiência cardíaca. No presente estudo pretendemos avaliar o papel de microRNAs na fase de compensação clínica de pacientes com insuficiência cardíaca aguda, momento de grande ativação celular, com incremento de marcadores de lesão celular e de “turnover” de matriz extracelular. Desta forma, os resultados do presente estudo permitirão uma melhor compreensão dos mecanismos regulatórios e do impacto da descompensação na progressão da síndrome da insuficiência cardíaca, além de possibilitar auxilio na avaliação do estado congestivo e potencial proposição de estratégias de tratamento específicas para o manejo da IC aguda. De forma similar, poderemos entender de forma mais aprofundada as diferenças em mecanismos regulatórios que ocorrem entre IC com disfunção sistólica e IC com fração de ejeção preservada.

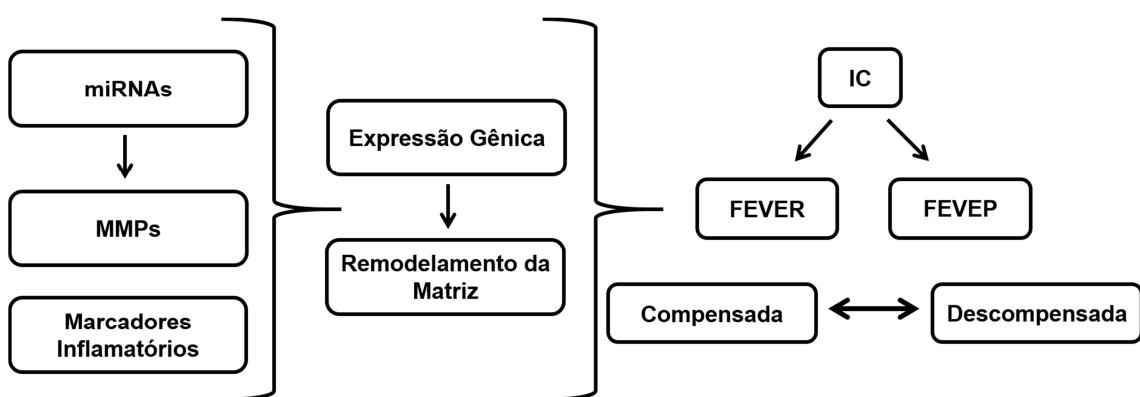
## Hipóteses

H1. A descompensação clínica e o estado congestivo estão associados a alterações na expressão de microRNAs e marcadores da atividade da MEC em pacientes com IC.

H2. O perfil de expressão de microRNAs e marcadores da atividade da MEC na IC estão associados a função sistólica do ventrículo esquerdo, sendo diferenciada para pacientes com IC e FEVER, em comparação aos pacientes com IC e FEVEP.

H3. Existe correlação entre expressão de microRNAs e marcadores de atividade da MEC com desfechos clínicos em pacientes com IC.

H4. Alterações nos marcadores inflamatórios estão associadas à descompensação clínica e função sistólica do ventrículo esquerdo, sendo distinta entre pacientes com ICFEP e ICFER.



**Figura 6:** Hipótese conceitual

#### **4. Objetivo Geral**

Analisar o perfil de expressão dos microRNAs e biomarcadores plasmáticos associados a atividade da MEC e inflamação em pacientes com IC com e sem disfunção sistólica, em estados descompensados e compensados.

#### **Objetivos Específicos**

1. Verificar se existe diferença nos níveis plasmáticos dos MMP-9 em diferentes estados de compensação e entre pacientes com IC-FER e IC-FEP.
2. Analisar se existe diferença na expressão de mir-21 e mir-150 em diferentes estados de compensação clínica e entre pacientes com IC-FER e IC-FEP.
3. Verificar se existe associação entre a expressão dos microRNAs 21 e 150 com MMP-9.
4. Analisar o valor prognóstico dos microRNAs 21 e 150 e da MMP-9 nos pacientes com IC-FER e IC-FEP.
5. Analisar se existe diferença nos níveis de marcadores inflamatórios em diferentes estados de compensação e entre pacientes com IC-FER e IC-FEP.

## 5. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Bocchi, E.A., et al., [III Brazilian Guidelines on Chronic Heart Failure]. Arq Bras Cardiol, 2009. **93**(1 Suppl 1): p. 3-70.
2. O'Connell, J.B. and M.R. Bristow, *Economic impact of heart failure in the United States: time for a different approach*. J Heart Lung Transplant, 1994. **13**(4): p. S107-12.
3. Senni, M., et al., *Congestive heart failure in the community: trends in incidence and survival in a 10-year period*. Arch Intern Med, 1999. **159**(1): p. 29-34.
4. Rudiger, A., et al., *Acute heart failure: clinical presentation, one-year mortality and prognostic factors*. Eur J Heart Fail, 2005. **7**(4): p. 662-70.
5. Braunwald, E., *Biomarkers in heart failure*. N Engl J Med, 2008. **358**(20): p. 2148-59.
6. McKee, P.A., et al., *The natural history of congestive heart failure: the Framingham study*. N Engl J Med, 1971. **285**(26): p. 1441-6.
7. Remme, W.J., et al., *Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure*. Eur Heart J, 2001. **22**(17): p. 1527-60.
8. Lip, G.Y., C.R. Gibbs, and D.G. Beevers, *ABC of heart failure: aetiology*. BMJ, 2000. **320**(7227): p. 104-7.
9. Jackson, G., et al., *ABC of heart failure. Pathophysiology*. BMJ, 2000. **320**(7228): p. 167-70.
10. Mann, D.L. and M.R. Bristow, *Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond*. Circulation, 2005. **111**(21): p. 2837-49.

11. de Denus, S., et al., *Differences in biomarkers in patients with heart failure with a reduced vs a preserved left ventricular ejection fraction*. Can J Cardiol, 2012. **28**(1): p. 62-8.
12. Quiroz, R., et al., *Comparison of characteristics and outcomes of patients with heart failure preserved ejection fraction versus reduced left ventricular ejection fraction in an urban cohort*. Am J Cardiol, 2014. **113**(4): p. 691-6.
13. Ho, J.E., et al., *Predictors of new-onset heart failure: differences in preserved versus reduced ejection fraction*. Circ Heart Fail, 2013. **6**(2): p. 279-86.
14. Mangla, A., et al., *Comparison of predictors of heart failure-related hospitalization or death in patients with versus without preserved left ventricular ejection fraction*. Am J Cardiol, 2013. **112**(12): p. 1907-12.
15. McMurray, J.J., et al., *ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC*. Eur J Heart Fail, 2012. **14**(8): p. 803-69.
16. De Keulenaer, G.W. and D.L. Brutsaert, *Systolic and diastolic heart failure: different phenotypes of the same disease?* Eur J Heart Fail, 2007. **9**(2): p. 136-43.
17. Sanders-van Wijk, S., et al., *Circulating biomarkers of distinct pathophysiological pathways in heart failure with preserved vs. reduced left ventricular ejection fraction*. Eur J Heart Fail, 2015. **17**(10): p. 1006-14.
18. Watson, R.D., C.R. Gibbs, and G.Y. Lip, *ABC of heart failure. Clinical features and complications*. BMJ, 2000. **320**(7229): p. 236-9.

19. Goldraich, L., et al., *Clinical predictors of preserved left ventricular ejection fraction in decompensated heart failure*. Arq Bras Cardiol, 2010. **94**(3): p. 364-71, 385-93.
20. McMurray, J.J., et al., *Heart failure with preserved ejection fraction: clinical characteristics of 4133 patients enrolled in the I-PRESERVE trial*. Eur J Heart Fail, 2008. **10**(2): p. 149-56.
21. Yusuf, S., et al., *Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and preserved left-ventricular ejection fraction: the CHARM-Preserved Trial*. Lancet, 2003. **362**(9386): p. 777-81.
22. Hunter, J.J. and K.R. Chien, *Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure*. N Engl J Med, 1999. **341**(17): p. 1276-83.
23. Anker, S.D. and F.O. Al-Nasser, *Chronic heart failure as a metabolic disorder*. Heart Fail Monit, 2000. **1**(2): p. 42-9.
24. Petretta, M., et al., *Circulating levels of cytokines and their site of production in patients with mild to severe chronic heart failure*. Am Heart J, 2000. **140**(6): p. E28.
25. Sharma, R., et al., *Elevated circulating levels of inflammatory cytokines and bacterial endotoxin in adults with congenital heart disease*. Am J Cardiol, 2003. **92**(2): p. 188-93.
26. Lainscak, M., et al., *Biomarkers for chronic heart failure : diagnostic, prognostic, and therapeutic challenges*. Herz, 2009. **34**(8): p. 589-93.
27. Lainscak, M. and S.D. Anker, *Prognostic factors in chronic heart failure. A review of serum biomarkers, metabolic changes, symptoms, and scoring systems*. Herz, 2009. **34**(2): p. 141-7.

28. Mann, D.L., *Mechanisms and models in heart failure: A combinatorial approach*. Circulation, 1999. **100**(9): p. 999-1008.
29. Herdy, A.H., et al., *South American guidelines for cardiovascular disease prevention and rehabilitation*. Arq Bras Cardiol, 2014. **103**(2 Suppl 1): p. 1-31.
30. Nagase, H., R. Visse, and G. Murphy, *Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs*. Cardiovasc Res, 2006. **69**(3): p. 562-73.
31. Vu, T.H. and Z. Werb, *Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology*. Genes Dev, 2000. **14**(17): p. 2123-33.
32. Blankenberg, S., et al., *Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease*. Circulation, 2003. **107**(12): p. 1579-85.
33. Biolo, A., et al., *Episodes of acute heart failure syndrome are associated with increased levels of troponin and extracellular matrix markers*. Circ Heart Fail, 2010. **3**(1): p. 44-50.
34. Zile, M.R., et al., *Relationship between the temporal profile of plasma microRNA and left ventricular remodeling in patients after myocardial infarction*. Circ Cardiovasc Genet, 2011. **4**(6): p. 614-9.
35. Essa, E.M., et al., *Changes in plasma profiles of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in stress-induced cardiomyopathy*. J Card Fail, 2012. **18**(6): p. 487-92.
36. Tanaka, K., et al., *Circulating matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in cardiac amyloidosis*. J Am Heart Assoc, 2013. **2**(2): p. e005868.

37. Kitaoka, H., et al., *Plasma metalloproteinase levels and left ventricular remodeling in hypertrophic cardiomyopathy in patients with an identical mutation*. J Cardiol, 2011. **58**(3): p. 261-5.
38. Meluzin, J., et al., *Can markers of collagen turnover or other biomarkers contribute to the diagnostics of heart failure with normal left ventricular ejection fraction?* Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2013. **157**(4): p. 331-9.
39. Sanchis, L., et al., *Prognosis of new-onset heart failure outpatients and collagen biomarkers*. Eur J Clin Invest, 2015. **45**(8): p. 842-9.
40. Chang, Y.Y., et al., *Comparison the prognostic value of galectin-3 and serum markers of cardiac extracellular matrix turnover in patients with chronic systolic heart failure*. Int J Med Sci, 2014. **11**(11): p. 1098-106.
41. Stanciu, A.E., et al., *Cardiac resynchronization therapy in patients with chronic heart failure is associated with anti-inflammatory and anti-remodeling effects*. Clin Biochem, 2013. **46**(3): p. 230-4.
42. Lopez-Andres, N., et al., *Association of galectin-3 and fibrosis markers with long-term cardiovascular outcomes in patients with heart failure, left ventricular dysfunction, and dyssynchrony: insights from the CARE-HF (Cardiac Resynchronization in Heart Failure) trial*. Eur J Heart Fail, 2012. **14**(1): p. 74-81.
43. Kato, T.S., et al., *Markers of extracellular matrix turnover and the development of right ventricular failure after ventricular assist device implantation in patients with advanced heart failure*. J Heart Lung Transplant, 2012. **31**(1): p. 37-45.

44. Toprak, G., et al., *Fibrosis in heart failure subtypes*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2013. **17**(17): p. 2302-9.
45. Cogni, A.L., et al., *Metalloproteinases-2 and -9 predict left ventricular remodeling after myocardial infarction*. Arq Bras Cardiol, 2013. **100**(4): p. 315-21.
46. Kuliczkowski, W., et al., *Matrix metalloproteinases and the activity of their tissue inhibitors in patients with ST-elevation myocardial infarction treated with primary angioplasty*. Kardiol Pol, 2013. **71**(5): p. 453-63.
47. Chu, J.W., et al., *Plasma active matrix metalloproteinase 9 and indices of diastolic function in patients with preserved systolic function*. Int J Cardiol, 2013. **167**(4): p. 1242-6.
48. Bajraktari, G., et al., *Plasma metalloproteinase-9 and restrictive filling pattern as major predictors of outcome in patients with ischemic cardiomyopathy*. Eur J Intern Med, 2012. **23**(7): p. 616-20.
49. Franz, M., et al., *Matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, B(+) tenascin-C and ED-A(+) fibronectin in dilated cardiomyopathy: potential impact on disease progression and patients' prognosis*. Int J Cardiol, 2013. **168**(6): p. 5344-51.
50. Bironaite, D., et al., *Molecular mechanisms behind progressing chronic inflammatory dilated cardiomyopathy*. BMC Cardiovasc Disord, 2015. **15**: p. 26.
51. Halade, G.V., Y.F. Jin, and M.L. Lindsey, *Matrix metalloproteinase (MMP)-9: a proximal biomarker for cardiac remodeling and a distal biomarker for inflammation*. Pharmacol Ther, 2013. **139**(1): p. 32-40.

52. Kaye, D.M., et al., *Relationship of circulating matrix biomarkers to myocardial matrix metabolism in advanced heart failure*. Eur J Heart Fail, 2013. **15**(3): p. 292-8.
53. Hopps, E. and G. Caimi, *Matrix metalloproteases as a pharmacological target in cardiovascular diseases*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015. **19**(14): p. 2583-9.
54. Anker, S.D. and S. von Haehling, *Inflammatory mediators in chronic heart failure: an overview*. Heart, 2004. **90**(4): p. 464-70.
55. Yndestad, A., et al., *Systemic inflammation in heart failure--the whys and wherefores*. Heart Fail Rev, 2006. **11**(1): p. 83-92.
56. Seropian, I.M., et al., *Anti-inflammatory strategies for ventricular remodeling following ST-segment elevation acute myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2014. **63**(16): p. 1593-603.
57. Frangogiannis, N.G., C.W. Smith, and M.L. Entman, *The inflammatory response in myocardial infarction*. Cardiovasc Res, 2002. **53**(1): p. 31-47.
58. Gielen, S., et al., *Exercise training in chronic heart failure: correlation between reduced local inflammation and improved oxidative capacity in the skeletal muscle*. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil, 2005. **12**(4): p. 393-400.
59. Toth, M.J., et al., *Immune activation is associated with reduced skeletal muscle mass and physical function in chronic heart failure*. Int J Cardiol, 2006. **109**(2): p. 179-87.
60. Adamopoulos, S., J.T. Parissis, and D.T. Kremastinos, *A glossary of circulating cytokines in chronic heart failure*. Eur J Heart Fail, 2001. **3**(5): p. 517-26.

61. Mann, D.L., *Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future*. Circ Res, 2002. **91**(11): p. 988-98.
62. Torre-Amione, G., *Immune activation in chronic heart failure*. Am J Cardiol, 2005. **95**(11A): p. 3C-8C; discussion 38C-40C.
63. Candia, A.M., H. Villacorta, Jr., and E.T. Mesquita, *Immune-inflammatory activation in heart failure*. Arq Bras Cardiol, 2007. **89**(3): p. 183-90, 201-8.
64. Hunt, S.A., C. American College of, and G. American Heart Association Task Force on Practice, *ACC/AHA 2005 guideline update for the diagnosis and management of chronic heart failure in the adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure)*. J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(6): p. e1-82.
65. Shan, K., et al., *The role of cytokines in disease progression in heart failure*. Curr Opin Cardiol, 1997. **12**(3): p. 218-23.
66. Torre-Amione, G., et al., *Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD)*. J Am Coll Cardiol, 1996. **27**(5): p. 1201-6.
67. Lee, D.S. and R.S. Vasan, *Novel markers for heart failure diagnosis and prognosis*. Curr Opin Cardiol, 2005. **20**(3): p. 201-10.
68. Wollert, K.C. and H. Drexler, *The role of interleukin-6 in the failing heart*. Heart Fail Rev, 2001. **6**(2): p. 95-103.
69. Febbraio, M.A. and B.K. Pedersen, *Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles*. FASEB J, 2002. **16**(11): p. 1335-47.

70. Long, C.S., *The role of interleukin-1 in the failing heart*. Heart Fail Rev, 2001. **6**(2): p. 81-94.
71. Haddad, F., et al., *IL-6-induced skeletal muscle atrophy*. J Appl Physiol (1985), 2005. **98**(3): p. 911-7.
72. Rauchhaus, M., et al., *Plasma cytokine parameters and mortality in patients with chronic heart failure*. Circulation, 2000. **102**(25): p. 3060-7.
73. Deswal, A., et al., *Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone trial (VEST)*. Circulation, 2001. **103**(16): p. 2055-9.
74. Raymond, R.J., et al., *Elevated interleukin-6 levels in patients with asymptomatic left ventricular systolic dysfunction*. Am Heart J, 2001. **141**(3): p. 435-8.
75. Kell, R., et al., *Do cytokines enable risk stratification to be improved in NYHA functional class III patients? Comparison with other potential predictors of prognosis*. Eur Heart J, 2002. **23**(1): p. 70-8.
76. Kanda, T. and T. Takahashi, *Interleukin-6 and cardiovascular diseases*. Jpn Heart J, 2004. **45**(2): p. 183-93.
77. Mavrea, A.M., et al., *Causes and predictors of hospital readmissions in patients older than 65 years hospitalized for heart failure with preserved left ventricular ejection fraction in western Romania*. Clin Interv Aging, 2015. **10**: p. 979-90.
78. Szelenyi, Z., et al., *Inflammation and oxidative stress caused by nitric oxide synthase uncoupling might lead to left ventricular diastolic and systolic dysfunction in patients with hypertension*. J Geriatr Cardiol, 2015. **12**(1): p. 1-10.

79. Negoro, S., et al., *Activation of signal transducer and activator of transcription 3 protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress through the upregulation of manganese superoxide dismutase*. Circulation, 2001. **104**(9): p. 979-81.
80. Gwechenberger, M., et al., *Comparison of soluble glycoprotein 130 and cardiac natriuretic peptides as long-term predictors of heart failure progression*. J Heart Lung Transplant, 2005. **24**(12): p. 2190-5.
81. Naito, Y., et al., *Increased circulating interleukin-18 in patients with congestive heart failure*. Heart, 2002. **88**(3): p. 296-7.
82. Mallat, Z., et al., *Evidence for altered interleukin 18 (IL)-18 pathway in human heart failure*. FASEB J, 2004. **18**(14): p. 1752-4.
83. Vistnes, M., et al., *Circulating cytokine levels in mice with heart failure are etiology dependent*. J Appl Physiol (1985), 2010. **108**(5): p. 1357-64.
84. Putko, B.N., et al., *Circulating levels of tumor necrosis factor-alpha receptor 2 are increased in heart failure with preserved ejection fraction relative to heart failure with reduced ejection fraction: evidence for a divergence in pathophysiology*. PLoS One, 2014. **9**(6): p. e99495.
85. Bolger, A.P., et al., *Effect of interleukin-10 on the production of tumor necrosis factor-alpha by peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic heart failure*. Am J Cardiol, 2002. **90**(4): p. 384-9.
86. Kaur, K., A.K. Sharma, and P.K. Singal, *Significance of changes in TNF-alpha and IL-10 levels in the progression of heart failure subsequent to myocardial infarction*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(1): p. H106-13.

87. Valencia-Sanchez, M.A., et al., *Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs*. Genes Dev, 2006. **20**(5): p. 515-24.
88. Roy, S., et al., *MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue*. Cardiovasc Res, 2009. **82**(1): p. 21-9.
89. Cordes, K.R., D. Srivastava, and K.N. Ivey, *MicroRNAs in cardiac development*. Pediatr Cardiol, 2010. **31**(3): p. 349-56.
90. Catalucci, D., P. Gallo, and G. Condorelli, *MicroRNAs in cardiovascular biology and heart disease*. Circ Cardiovasc Genet, 2009. **2**(4): p. 402-8.
91. Hutvagner, G. and M.J. Simard, *Argonaute proteins: key players in RNA silencing*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(1): p. 22-32.
92. Lim, L.P., et al., *Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs*. Nature, 2005. **433**(7027): p. 769-73.
93. Divakaran, V. and D.L. Mann, *The emerging role of microRNAs in cardiac remodeling and heart failure*. Circ Res, 2008. **103**(10): p. 1072-83.
94. Wang, G.K., et al., *Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans*. Eur Heart J, 2010. **31**(6): p. 659-66.
95. Zhang, C., *MicroRNAs: role in cardiovascular biology and disease*. Clin Sci (Lond), 2008. **114**(12): p. 699-706.
96. D'Alessandra, Y., et al., *Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction*. Eur Heart J, 2010. **31**(22): p. 2765-73.
97. Ji, X., et al., *Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury*. Clin Chem, 2009. **55**(11): p. 1944-9.

98. Thum, T., D. Catalucci, and J. Bauersachs, *MicroRNAs: novel regulators in cardiac development and disease*. Cardiovasc Res, 2008. **79**(4): p. 562-70.
99. Ikeda, S., et al., *Altered microRNA expression in human heart disease*. Physiol Genomics, 2007. **31**(3): p. 367-73.
100. Tijsen, A.J., et al., *MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure*. Circ Res, 2010. **106**(6): p. 1035-9.
101. Fukushima, Y., et al., *Assessment of plasma miRNAs in congestive heart failure*. Circ J, 2011. **75**(2): p. 336-40.
102. Goren, Y., et al., *Serum levels of microRNAs in patients with heart failure*. Eur J Heart Fail, 2012. **14**(2): p. 147-54.
103. Vogel, B., et al., *Multivariate miRNA signatures as biomarkers for non-ischaemic systolic heart failure*. Eur Heart J, 2013. **34**(36): p. 2812-22.
104. Nair, N., et al., *Circulating miRNA as novel markers for diastolic dysfunction*. Mol Cell Biochem, 2013. **376**(1-2): p. 33-40.
105. Wong, L.L., et al., *Circulating microRNAs in heart failure with reduced and preserved left ventricular ejection fraction*. Eur J Heart Fail, 2015. **17**(4): p. 393-404.
106. Watson, C.J., et al., *MicroRNA signatures differentiate preserved from reduced ejection fraction heart failure*. Eur J Heart Fail, 2015. **17**(4): p. 405-15.
107. Kuosmanen, S.M., et al., *MicroRNA profiling of pericardial fluid samples from patients with heart failure*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0119646.
108. Schmitter, D., A.A. Voors, and P. van der Harst, *HFpEF vs. HFrEF: can microRNAs advance the diagnosis?* Eur J Heart Fail, 2015. **17**(4): p. 351-4.

109. Nair, N. and E. Gongora, *MicroRNAs as therapeutic targets in cardiomyopathies: myth or reality?* Biomol Concepts, 2014. **5**(6): p. 439-48.
110. Schulte, C., et al., *Diagnostic and prognostic value of circulating microRNAs in heart failure with preserved and reduced ejection fraction.* World J Cardiol, 2015. **7**(12): p. 843-60.
111. Abdellatif, M., *Differential expression of microRNAs in different disease states.* Circ Res, 2012. **110**(4): p. 638-50.
112. Zhao, Y., E. Samal, and D. Srivastava, *Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis.* Nature, 2005. **436**(7048): p. 214-20.
113. Chen, J.F., et al., *The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation.* Nat Genet, 2006. **38**(2): p. 228-33.
114. Bauters, C., et al., *Circulating miR-133a and miR-423-5p fail as biomarkers for left ventricular remodeling after myocardial infarction.* Int J Cardiol, 2013. **168**(3): p. 1837-40.
115. Asangani, I.A., et al., *MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer.* Oncogene, 2008. **27**(15): p. 2128-36.
116. Cheng, Y. and C. Zhang, *MicroRNA-21 in cardiovascular disease.* J Cardiovasc Transl Res, 2010. **3**(3): p. 251-5.
117. Meng, F., et al., *MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer.* Gastroenterology, 2007. **133**(2): p. 647-58.

118. Yin, C., X. Wang, and R.C. Kukreja, *Endogenous microRNAs induced by heat-shock reduce myocardial infarction following ischemia-reperfusion in mice*. FEBS Lett, 2008. **582**(30): p. 4137-42.
119. Dong, S., et al., *microRNA-21 promotes cardiac fibrosis and development of heart failure with preserved left ventricular ejection fraction by up-regulating Bcl-2*. Int J Clin Exp Pathol, 2014. **7**(2): p. 565-74.
120. Gu, G.L., et al., *Cardioprotective Effect of MicroRNA-21 in Murine Myocardial Infarction*. Cardiovasc Ther, 2015. **33**(3): p. 109-17.
121. Greco, S., C. Gaetano, and F. Martelli, *HypoxamiR regulation and function in ischemic cardiovascular diseases*. Antioxid Redox Signal, 2014. **21**(8): p. 1202-19.
122. Loffler, D., et al., *Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer*. Blood, 2007. **110**(4): p. 1330-3.
123. Roy, S. and C.K. Sen, *miRNA in wound inflammation and angiogenesis*. Microcirculation, 2012. **19**(3): p. 224-32.
124. Liu, L.Z., et al., *MiR-21 induced angiogenesis through AKT and ERK activation and HIF-1alpha expression*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e19139.
125. Cardin, S., et al., *Role for MicroRNA-21 in atrial profibrillatory fibrotic remodeling associated with experimental postinfarction heart failure*. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2012. **5**(5): p. 1027-35.
126. Sayed, D., et al., *MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy*. Circ Res, 2007. **100**(3): p. 416-24.

127. van Rooij, E., et al., *A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(48): p. 18255-60.
128. Cheng, Y., et al., *MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: do they play a role in cardiac hypertrophy?* Am J Pathol, 2007. **170**(6): p. 1831-40.
129. Tatsuguchi, M., et al., *Expression of microRNAs is dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy.* J Mol Cell Cardiol, 2007. **42**(6): p. 1137-41.
130. Patrick, D.M., et al., *Stress-dependent cardiac remodeling occurs in the absence of microRNA-21 in mice.* J Clin Invest, 2010. **120**(11): p. 3912-6.
131. Lok, S.I., et al., *MicroRNA Expression in Myocardial Tissue and Plasma of Patients with End-Stage Heart Failure during LVAD Support: Comparison of Continuous and Pulsatile Devices.* PLoS One, 2015. **10**(10): p. e0136404.
132. Liu, W., et al., *MicroRNA-150 Protects Against Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy.* J Cell Biochem, 2015. **116**(10): p. 2166-76.
133. Devaux, Y., et al., *MicroRNA-150: a novel marker of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction.* Circ Cardiovasc Genet, 2013. **6**(3): p. 290-8.
134. Zidar, N., et al., *MicroRNAs, innate immunity and ventricular rupture in human myocardial infarction.* Dis Markers, 2011. **31**(5): p. 259-65.
135. Tang, Y., et al., *MicroRNA-150 protects the mouse heart from ischaemic injury by regulating cell death.* Cardiovasc Res, 2015. **106**(3): p. 387-97.

136. Li, X., et al., *MicroRNA-150 aggravates H2O<sub>2</sub>-induced cardiac myocyte injury by down-regulating c-myb gene*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2013. **45**(9): p. 734-41.
137. Luo, Z., et al., *MicroRNA-200C and -150 play an important role in endothelial cell differentiation and vasculogenesis by targeting transcription repressor ZEB1*. Stem Cells, 2013. **31**(9): p. 1749-62.
138. Zhang, Y., et al., *Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration*. Mol Cell, 2010. **39**(1): p. 133-44.

## **ARTIGOS**

## 6. ARTIGO 1

**Circulating miR-21 and miR-150 and matrix metalloproteinase-9 in episodes of decompensation: comparison between patients with heart failure with reduced or preserved ejection fraction**



**Circulating miR-21 and miR-150 and matrix metalloproteinase-9 in episodes of decompensation: comparison between patients with heart failure with reduced or preserved ejection fraction**

Daiane Silvello<sup>1,2</sup>, Letícia Orlandin<sup>1,2</sup>, Mariana Recamonde-Mendoza<sup>1,3</sup>, Fernanda Coruja<sup>1</sup>, Arthur Garbin<sup>1</sup>, Nadine Clausell<sup>1,2</sup>, Luis E. Rohde<sup>1,2</sup>, Andréia Biolo<sup>1,2</sup>

1 Heart Failure and Transplant Unit, Cardiology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil,

2 Post-Graduate Program in Cardiology and Cardiovascular Science, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil,

3 Institute of Informatics, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Address for correspondence:

Andréia Biolo MD

Heart Failure and Transplant Unit

Cardiology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350, Sala 2060

Porto Alegre, RS, Brazil 90035-003

Phone/Fax 55 51 33598844

E-mail address: [biolo.andreia@gmail.com](mailto:biolo.andreia@gmail.com)

## ABSTRACT

**Aims:** Little is known about the differences in pathophysiology of heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF) or reduced ejection fraction (HFrEF). Biomarkers linked to extracellular matrix and related microRNAs could help to we aimed to compare the circulating MMP-9, miR-21, and miR-150 between both groups of patients during and post-acute decompensated heart failure episodes.

**Methods and results:** MMP-9, miR-21 and miR-150 expression profiling were evaluated on plasma samples of patients with HFrEF and HFpEF at hospital admission, discharge and outpatient follow-up. MMP-9 levels were higher in patients with HFrEF at discharge. Moreover, miR-150 was higher in patients with HFrEF after acute therapy, whereas miR-21 was similar between groups during decompensation and in chronic stable HF. Comparing different stages of compensation, the biomarkers had transient changes in both HF groups. The MMP-9 and miR-150 reduced in acute therapy, but miR-21 increased, demonstrating opposite expression profiles. Additionally, the MMP-9 higher levels ( $> 59.85 \text{ ng/mL}$ ) and miR-21 down-expression ( $< 0.002 \text{ arbitrary units}$ ) in the outpatient follow-up predicted readmission in a short period.

**Conclusions:** We showed that the biomarkers of extracellular remodeling appeared to be more actively disarranged in patients with HFrEF compared to patients with HFpEF, although in both groups the remodeling had a transient attenuation in acute therapy in contrast to baseline values, with a reactivation of the process 120 days after discharge. Furthermore, high levels of MMP-9 and low expression of miR-21 in chronic stable HF were predictors of poor prognosis. This finding may indicate that HF cardiac remodeling is a dynamic process requiring constant monitoring.

**Keywords:** MMP-9, MicroRNA, Heart Failure, Ejection Fraction, Biomarker, Prognosis

## INTRODUCTION

Though heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF) and heart failure with reduced ejection fraction (HFrEF) have similar morbidity and mortality incidence, both forms of heart failure (HF) need specific disease management due to their distinct pathophysiology [1]. Furthermore, the diagnosis of HFpEF is complex and requires evidence of diastolic dysfunction by means of imaging, generally by echocardiography [2]. Therefore, different studies try to find biomarkers able to diagnose and distinguish these two forms of HF [3, 4].

Patients with chronic HF frequently experience episodes of acute decompensated HF that are characterized by interstitial fluid overload, elevated cardiac filling pressures, depressed cardiac output, and the associated symptoms [5]. It is not known whether processes central to pathological myocardial remodeling, such as myocyte injury/loss and ECM turnover, are activated by episodes of decompensation. Therefore, it is possible that these mechanisms are altered during episodes of acute decompensation.

The matrix metalloproteases (MMPs) act in the matrix remodeling by collagen turnover, and are associated with ventricular fibrosis, hypertrophy and diastolic dysfunction [6-9]. Moreover, MMPs have been demonstrated to be of significant diagnostic and prognostic value in HF [10-14].

Recently, microRNAs (miRNAs) have emerged as potential biomarkers and therapeutic targets in various diseases, including cardiovascular complications [15, 16]. MiRNAs are a class of small non-coding RNAs that control the gene expression by translational repression or mRNA degradation [17]. MiRNAs are involved in cardiac development and changes in their expression levels are associated with

pathogenesis and progression of HF [18, 19]. Additionally, studies suggest the potential prognosis role of miRNAs in HF [20-22], as well as their ability to distinguish HFrEF from HFpEF [23, 24].

In the present study, we evaluated the circulating MMP-9, miR-21, and miR-150 in patients with HFrEF and HFpEF during and post-acute decompensated heart failure episodes.

## METHODS

### Patient recruitment

In the present study, 100 patients with acute decompensate heart failure were recruited from the emergency of Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA). All patients underwent detailed clinical examination, and left ventricular ejection fraction (LVEF) was assesed by two-dimensional echocardiography during the decompensation episode index or ut to 3 months prior to admission. Patients with confirmed HF and LVEF  $\leq 45\%$  were classified as HFrEF, whereas those with LVEF  $> 45\%$  were categorized as HFpEF.

Diagnosis of decompensated HF was clinically defined as the presence of worsening dyspnea, paroxysmal nocturnal dyspnea, and/or orthopnea, together with clinical signs of circulatory congestion (increase of venous jugular pressure, hepatojugular reflux, hepatomegaly and/or peripheral edema), and/or radiological signs of congestion on chest X-ray. All patients included in this study had Boston score  $> 8$  points [25]

Patients with chronic obstructive pulmonary disease, primary pulmonary hypertension, pericardial disease, active respiratory infection, pulmonary embolism, severe hemodynamic instability requiring vasoactive drugs, severe aortic stenosis, renal dysfunction with creatinine > 3 mg / dL or significant liver disease (cirrhosis or active hepatitis), rheumatic diseases and cancer were excluded from this study.

### **Follow-up**

Patients were evaluated at three time-points: 1) at hospital admission (up to 36 hours), 2) at the time of hospital discharge, and 3) in an outpatient visit scheduled at least 2 months after hospital discharge in the HF Clinic at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. If patients were not compensated at the time of consultation, a new visit was rescheduled. Patients in functional class I and II of the NYHA and with clinical score of congestion lower than 5 were considered compensated [25].

### **Ethical considerations**

The study protocol was conducted according to the principles outlined in the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee in Research of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Written informed consent was obtained from all subjects prior to inclusion in the study.

### **Plasma sample collection**

Peripheral venous blood samples from all subjects were collected into ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-coated tubes. Blood samples were centrifuged for 15 min at 4°C and 1500 rpm within one hour from collection. Plasma was separated and aliquoted into 1.5 mL microtubes and stored at -80°C for posterior combined analysis.

### **MMP-9 Levels**

The MMP-9 dosages were performed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (Invitrogen Corporarion, Camarillo, CA, USA) in plasma samples. All analyses were performed in duplicate, using commercial assays and in accordance with the specifications of their respective manufacturers.

### **MicroRNAs expression**

In a subgroup of 20 patients with HFrEF and 22 with HFpEF, microRNAs expression profiles were assessed by means of isolation kit commercially available miRvana PARIS miRNA (Ambion, Austin, TX, USA) using 495 ml of plasma. After protein denaturation, 50pM (fixed volume of 5 µL) of synthetic, non-human *Caenorhabditis elegans* miR (cel-miR-39) (Qiagen, Valencia, CA, USA) was spiked into plasma samples to control for potential technical variations throughout the extraction and measurement procedures [26]. Cel-miR-39 was simultaneously analyzed in the final miR eluate, providing a standard control for the concentration of studied miRs obtained from subject samples.

The concentration of microRNAs was determined by spectrophotometric analysis

(NanoDrop 1000, Thermo Scientific, Wilmington, DE). Reverse Transcription (RT) reactions were performed according to manufacturer's instructions, using miRs Reverse Transcription Kit® (Life Technologies, Carlsbad, CA). MicroRNAs of interest (miR-21 and -150) were measured by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) using TaqMan® miRs Expression Assays probes (Life Technologies) on the 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). All of the miR qRT-PCR reactions were run in triplicate, and the relative expression values were determined using the  $\Delta CT$  method [27]. In brief, data from qRT-PCR were normalized to the reference control microRNA, cel-miR-39, using the  $\Delta CT$  method. The relative expression levels for each individual microRNA were calculated using the following mathematical formula:  $\Delta CT = CT_{sample} - CT_{cel\text{-}miR\text{-}39}$ . These values were transformed into quantities using the formula  $2^{-\Delta CT}$  and are presented as fold-change relative to the internal control [27]. Data are reported as fold regulation, where fold regulation is equal to the fold change for fold change values  $> 1$  (up-regulation) or is the negative inverse of the fold change for fold change values  $< 1$  (down-regulation).

### **Statistical analysis**

Continuous variables with normal distribution are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Categorical variables are reported as absolute number and percentage. miR expression values are reported as relative fold change. Differences between continuous variables were assessed using the Student *t*-test or Mann-Whitney for variables not normally distributed. The Chi-square test (or the exact Fisher test) was used to compare categorical variables.

Plasma levels of miRs have a non-Gaussian distribution. Hence, their correlation with other variables were evaluate by the Spearman correlation test. To compare the difference of miRs expression between groups of patients at the different compensation stages, we used the general linear model with Fisher's least significant difference (Bonferroni) post hoc test. Comparison of survival free-events curves were performed by Kaplan Meier with Log-rank (Mantel Cox) test. All statistical analyses were performed with the SPSS statistical package (version 18.0) for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL), and a two-tailed *P* value < 0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

### Clinical characteristics

We included 100 patients admitted at the time of clinical decompensation and grouped according to the left-ventricular ejection fraction: 61 patients with HFrEF and 39 patient with HFpEF. Their clinical characteristics and demographics are summarized in Table 1. Patients were predominantly white and used conventional medication in the treatment of HF. The patients with HFpEF were older (*p* = 0.001) and with higher frequency of female sex (*p* = 0.013).

As expected, HFrEF patients have higher levels of BNP at admission, and the cardiac structural remodeling was distinct between the groups, with higher diastolic and systolic diameters of the left ventricle in the HFrEF group. In addition, patients with HFrEF had a lower systolic blood pressure and higher hemoglobin levels. However, other laboratory data showed no difference between groups (Table 2).

Patients in acute therapy remained hospitalized for  $11 \pm 13$  days, and 10 died during this period. Moreover, other 10 patients died before the outpatient follow-up had been performed. Therefore, 60 patients with chronic stable HF were reassessed in approximately 120 days after discharge and followed up for  $27.1 \pm 1.4$  months.

### **MMP-9 Levels**

MMP-9 plasmatic levels were higher in HFrEF patients in all stages of compensation, ( $p = 0.007$ ) (Figure 1A). Furthermore, the MMP-9 levels showed the same expression patterns over time in both groups, demonstrating a decrease with acute therapy ( $p = 0.007$  for HFrEF and  $p = 0.005$  for HFpEF). However, MMP-9 expression returned to levels similar to those of admission by the time of outpatient follow-up. Moreover, no correlation was found between the MMP-9 plasmatic levels and clinical variables, laboratory tests and echocardiographic parameters in neither stages of compensation (data not shown).

### **miR-21 expression levels**

As depicted in Figure 1B, the expression levels of circulating miR-21 did not differ in patients with HFrEF and HFpEF in clinical decompensation and chronic stable HF ( $p > 0.05$  for all comparisons). Also, miR-21 expression profile over time is similar between groups ( $p$  interaction = 0.528). Furthermore, we verified that patients with HFrEF and HFpEF have higher levels at the time of hospital discharge, compared with admission ( $p = 0.003$ ) (Figure 1B), and these levels return to admission levels at the outpatient follow-up.

MiR-21 levels demonstrated no correlation with others biomarkers, clinical variable, and any echocardiographic dates of morphology and function ( $p > 0.05$  for all comparison) (data not show).

### **miR-150 expression levels**

When comparing the miR-150 expression levels in patients with HFrEF and HFpEF at admission, no differences were observed between groups (Figure 1C). Nevertheless, after acute therapy miR-150 levels were higher in patients with HFrEF than in patients with HFpEF, and this difference it is even greater in outpatient follow-up (Table 3).

For the analysis of patients with HFrEF and HFpEF in different stages of compensation, we observed a reduction in the miR-150 levels at the time of hospital discharge, compared with admission and outpatient follow-up ( $p = 0.002$ ).

Additionally, in patients with HFrEF, the miR-150 levels were higher at the outpatient follow-up when compared to admission and discharge (Figure 1C).

Similarly to other biomarkers, no correlation was found between miR-150 levels and any clinical variable, laboratory tests and echocardiographic dates of morphology and function ( $p > 0.05$  for all comparison) (data not show).

### **Prognostic value of biomarkers**

Since we observed increasing values of the biomarkers at the follow-up visit, we further evaluated their prognostic role for readmissions. Higher levels of MMP-9 and

lower levels of miR-21 at a time of outpatient follow-up were associated to readmission within 30 days after that follow-up (Figure 2). Moreover, none of the biomarkers, as well as LVEF at the time of discharge, were able to predict readmission or death (data not shown).

## DISCUSSION

The present study compared patients with HFrEF and HFpEF during episodes of decompensation and later when they returned to chronic stable HF. MMP-9 are higher in patients with HFrEF both during decompensation and after acute and chronic compensation, and miR-150 was higher in patients with HFrEF after acute therapy, while miR-21 levels were similar between HFrEF and HFpEF groups. Second, with acute therapy, we observed opposite and transient changes in MMP-9 and miR-150 (reduced) and miR-21 (increased) in both HF groups. In addition, miR-150 levels increased only in HFrEF group at chronic stable HF. Finally, we demonstrated that higher MMP-9 and lower miR-21 levels at the outpatient visit were predictors of short-term readmission.

We observed that MMP-9 levels were higher in patients with HFrEF. Similarly, Kliczkowski et al found that patients with higher MMP-9 levels had a lower ejection fraction after coronary intervention therapy [28]. However, other studies comparing patients with HREF and HFpEF did not detect differences in MMP-9 levels between groups [10, 12, 29]. Nevertheless, two of these studies have demonstrated high levels of MMP-2 in patients with HFpEF [10, 12].

Likewise, we found a higher expression of miR-150 in patients with HFrEF after acute therapy. Recent investigation in animal models and clinical studies showed that overexpression of miR-150 is associated with reduced infarct area, apoptosis and inflammatory levels after AMI, resulting in improved cardiac function and prognosis [19, 30-32]. Moreover, studies in experimental TAC demonstrated that higher levels of miR-150 are associated with reduction of fibrosis, cardiac hypertrophy and dysfunction [33, 34]. These data show that MMP-9 and miR-150 play an important role in cardiac remodeling process and can act differently in distinct HF phenotypes. Nonetheless, other studies comparing the same groups of patients did not report any difference concerning the expression of this microRNA [23, 24].

There was no difference in miR-21 expression levels between groups. Similarly, Watson et al examined the expression of 5 microRNAs in patients with HF compared to the control group and found that only miR-328 and miR 375 were differently expressed between patients with HFrEF and HFpEF [24]. Equally, Wang et al observed 12 microRNAs with potential diagnosis of HF in one or both phenotypes and showed that only the miR-125-5p, -190a, -550a-5p and -638 presented different expression profile between groups [23]. In the same manner, other studies have demonstrated that several microRNAs altered expression levels in patients with HFrEF, itemizing cases of controls [21, 22]. Still, Nair and collaborators evaluated patients with different heart diseases, showed different expression profiles of miR-454, -500, -1246 and -142-3p in patients with diastolic dysfunction [35]. However, confirming our findings, these studies found no difference in miR-21 expression levels between groups [21-24, 35].

Another findings of the present study regards changes in MMP-9 levels and evaluated microRNAs in different stages of clinical compensation, demonstrating a decrease of MMP-9 and miR-150, and increased of miR-21 during acute therapy. Similarly, Biolo and collaborators have demonstrated that MMP-2 levels are elevated in acute decompensated patients when compared to stable patients and healthy individuals. Also, the study showed that MMP-2 levels are reduced at discharge and clinical recompensation period [36]. In the same way, a study that evaluated patients with AMI during the acute phase noted that levels of active MMP-2 and MMP-9 reduced after percutaneous coronary intervention [28]. Furthermore, Fukushima and collaborators assessed the expression profiles of plasma microRNAs in patients with congestive HF and demonstrated a reduction in levels of miR-126 with the increase of the NYHA functional class, suggesting association of microRNAs with improved clinical status [20]. However, Nair and collaborators compared patients with dilated cardiomyopathy compensated and decompensated and found no difference in microRNA expression levels in the different states of congestion [35].

The miR-21 may be involved in regulating cardiac fibrosis, degradation routes and synthesis of matrix components, targeting MMPs, collagen or markers of their action [37, 38]. In addition, bioinformatics analysis has shown that miR-21 is a potential regulator of MMP-9 gene (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw>, last accessed on May 23rd, 2016).

Interestingly, MMP-9 and miR-21 changes with acute therapy were not maintained at the follow-up visit. We speculate one possible explanation would be that those patients were about to have a new episode of decompensation. In fact, patients with higher MMP-9 levels and lower levels of miR-21 have greater rates of readmission shortly after the outpatient follow-up. Similarly, other studies have demonstrated that elevated levels of MMP-9 are associated with increased mortality and lower event-free time in patients with HF [39, 40]. In addition, a study assessing the prognosis of patients with chronic systolic HF

demonstrated that increased levels of MMP-2 are associated with a worse clinical outcome [11]. However, contrary to our findings, a study analyzing differences in expression of microRNAs after implantation of ventricular assistants in patients with end-stage heart failure, demonstrated that miR-21 levels reduced after implantation, indicating that the decrease from microRNA may be associated with clinical improvement [16]. Although some studies have shown an association between microRNAs, prognostic clinical parameters and treatment [16, 20, 21, 41], until the moment there are few studies evaluating the role of microRNAs as clinical outcome predictors.

A limitation of our study was the losses in follow-up, reducing the number of assessments both at discharge and at outpatient follow-up. In addition, we analyzed microRNAs in only a subset of our sample, which may have limited the results of the correlations of microRNAs with MMP-9, and LVEF.

In conclusion, patients with HFrEF have higher MMP-9 levels compared with HFpEF at all time-points, with a transient reduction with acute therapy. Despite no differences miR21 and 150 at admission, there were also transient changes in these markers with acute therapy. Furthermore, high levels of MMP-9 and low expression of miR-21 in chronic stable HF were predictors of short-term readmission. These findings may indicate that HF-associated cardiac remodeling is a dynamic process requiring constant monitoring and tailoring therapies in order to avoid/limit disease progression. The role of these markers in HF differentiation and prognostication should be further assessed.

## FUNDING

This work was supported in part by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Conselho de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPERHCPA).

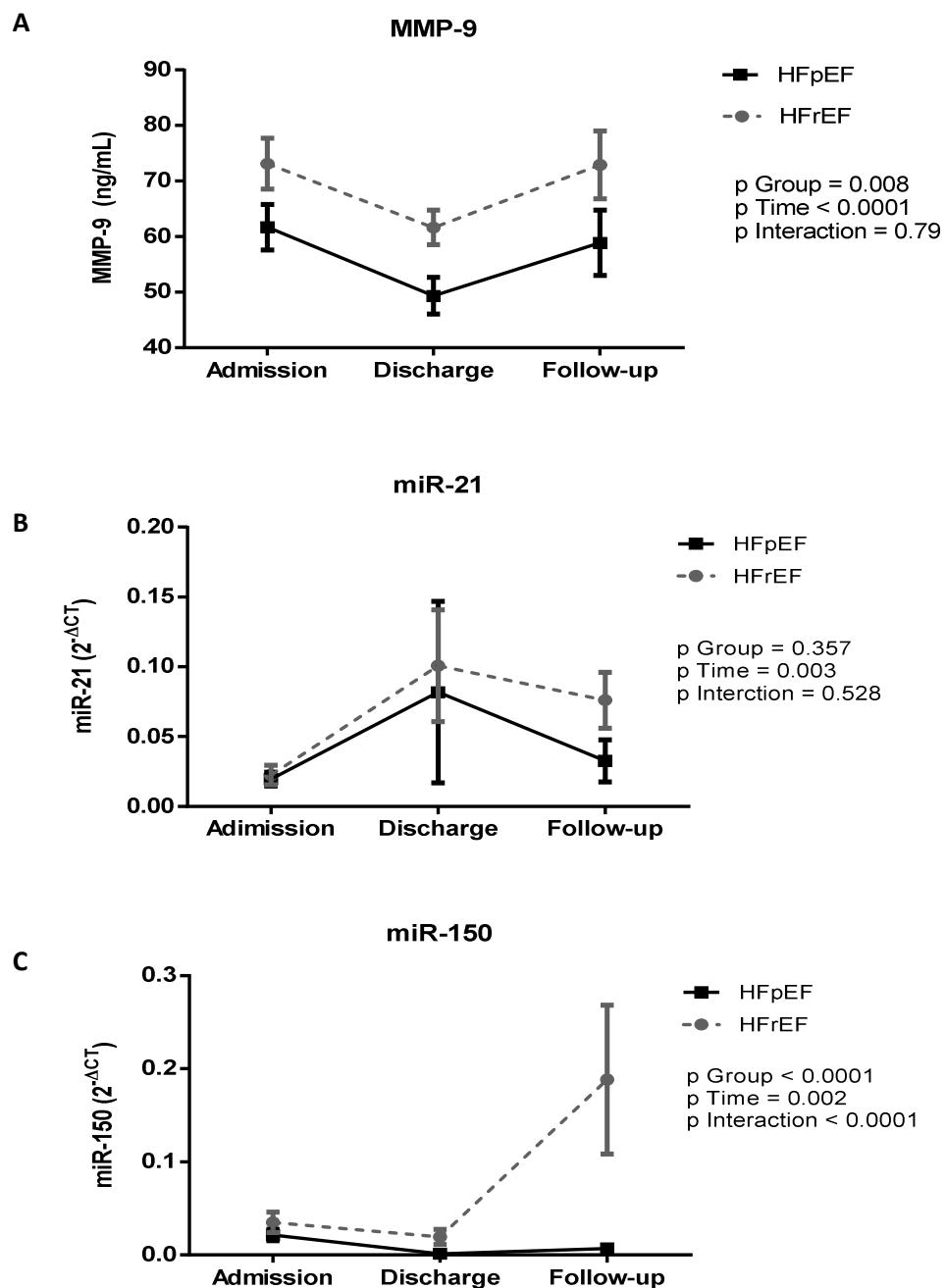
### **CONFLICTS OF INTEREST**

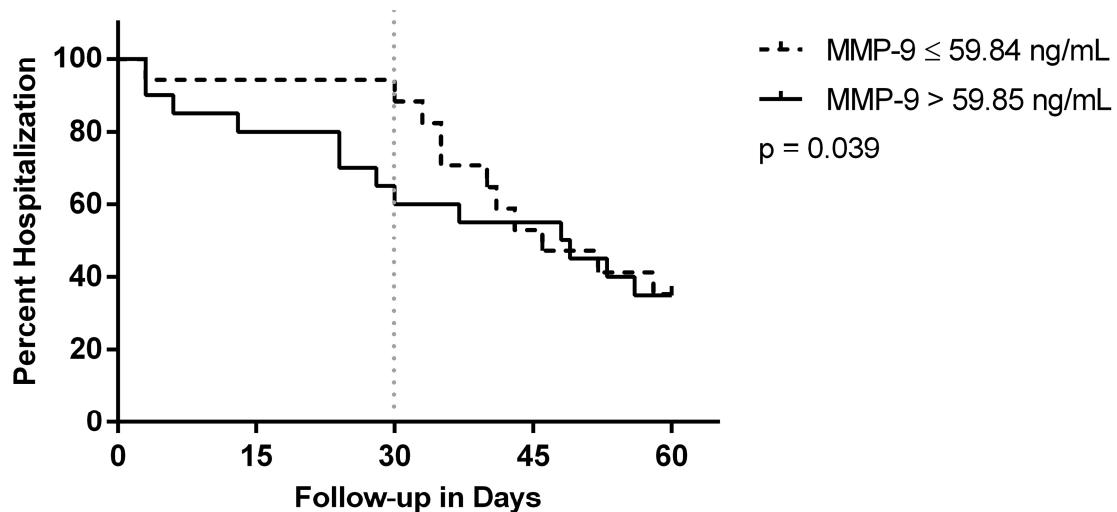
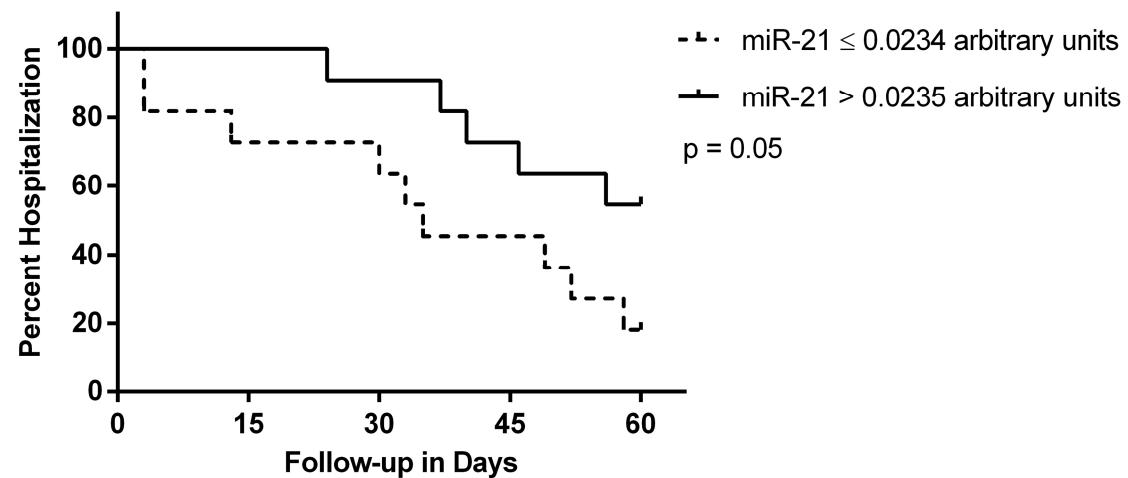
Conflict of interest: none declared.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1:** MMP-9, miR-21 and miR-150 expression levels in patients with HFrEF and HFpEF in different compensation stages. Statistical analysis performed by GEE with Bonferroni post-hoc Test.

**Figure 2:** Survival curves of time free-events after outpatient consultation according to the median of each biomarker.

**FIGURE 1**

**FIGURE 2****A****After outpatient****B****After outpatient**

**TABLE 1.** Clinical and demographic characteristics.

	HFrEF (n=61)	HFpEF) (n=39)	P-value
Age (years)	61.5 ± 12.4	68.3 ± 11.0	0.06
Male sex, n (%)	41 (67)	18 (41)	0.013
Whites, n (%)	49 (80)	32 (82)	0.79
Comorbidity, n (%)			
Hypertension	46 (75)	33 (85)	0.322
Diabetes	30 (49)	15 (38)	0.311
COPD	15 (24)	5 (13)	0.200
Obesity	14 (23)	8 (20)	0.810
Smoking	33 (54)	11 (28)	0.014
Ischemic heart disease	27 (44)	18 (47)	0.837
Previous AMI	17 (28)	8 (20)	0.482
Previous stroke	10 (16)	6 (15)	1.000
Previous MRS	9 (15)	10 (18)	0.781
Atrial fibrillation	28 (46)	18 (46)	1.000
HF Etiology, n (%)			
Ischemic	28 (46)	13 (33)	0.297
Hypertensive	30 (49)	14 (36)	0.220
NYHA functional class, n (%)			
II	5 (8)	5 (13)	0.753
III	26 (43)	16 (41)	0.757
IV	30 (49)	18 (46)	0.574
Medications, n (%)			
Beta blocker	47 (77)	26 (67)	0.356
ACE-I	52 (85)	27 (69)	0.078
Furosemide	58 (95)	32 (82)	0.044
Digoxin	49 (80)	9 (23)	<0.001
Spironolactone	25 (41)	12 (32)	0.397
Anticoagulants	21 (34)	12 (31)	0.828

ACE-I, angiotensin-converting enzyme inhibitor; AMI, acute myocardial infarction; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; HFpEF, heart failure with preserved ejection fraction; HFrEF, heart failure with reduced ejection fraction; LVEDD, left-ventricular end diastolic diameter; LVESD, left-ventricular end systolic diameter; LVEF, left-ventricular ejection fraction; MRS, myocardial revascularization surgery; NYHA, New York Heart Association

**TABLE 2.** Laboratory and echocardiographic data in admission.

	<b>HFrEF (n=61)</b>	<b>HFpEF (n=39)</b>	<b>P-value</b>
<b>Laboratory tests</b>			
Hemoglobin (g/dL)	12.8 ± 1.9	11.31 ± 2.8	0.005
Sodium (mmol/L)	140 ± 4	141 ± 3	0.051
Potassium (mmol/L)	4.4 ± 0.6	4.4 ± 0.7	0.997
Creatinine (µmol/L)	1.25 ± 0.47	1.26 ± 0.55	0.725
Troponin I (ng/L)	0.59 ± 0.64	0.12 ± 0.34	0.544
BNP (pg/mL)	1,518.61 ± 1,298.23	414.96 ± 513.97	0.001
Systolic BP, mmHg	128.7 ± 26	143.4 ± 30	0.029
Diastolic BP, mmHg	84.6 ± 19	78.1 ± 19	0.182
<b>Echocardiographic data</b>			
AE	5.05 ± 0.78	5.08 ± 0.99	0.687
LVEDD (mm)	6.59 ± 1.11	5.37 ± 0.81	<0.001
LVESD (mm)	5.66 ± 1.18	3.53 ± 0.76	<0.001
LVEF (%)	28.2 ± 7.94	63.72 ± 8.31	<0.001
Mass (g)	331.28 ± 123.06	263.9 ± 108.96	0.005

LVEDD, left-ventricular end diastolic diameter; LVESD, left-ventricular end systolic diameter;

LVEF, left-ventricular ejection fraction; ventricular left, VE.

**TABLE 3.** Comparing of MMP-9, miR-21 and miR-150 levels between groups in different time evaluation.

	<b>Admission</b>	<b>Discharge</b>	<b>Follow-up</b>
<b>miR-21</b>			
HFrEF	0.0224 ± 0.007	0.1007 ± 0.04	0.0760 ± 0.02
HFpEF	0.0195 ± 0.005	0.0818 ± 0.06	0.0326 ± 0.01
p-value	0.748	0.810	0.100
<b>miR-150</b>			
HFrEF	0.0350 ± 0.01	0.0193 ± 0.008	0.1884 ± 0.08
HFpEF	0.0214 ± 0.006	0.0014 ± 0.001	0.0071 ± 0.003
p-value	0.308	0.037	0.041
<b>MMP-9</b>			
HFrEF	73.12 ± 4.5	61.62 ± 3.1	72.90 ± 6.1
HFpEF	61.68 ± 4.1	49.33 ± 3.3	58.87 ± 5.9
p-value	0.063	0.007	0.099

Statistical analysis by GEE with Bonferroni post-hoc test.

## References

1. McMurray, J.J., et al., *ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC.* Eur J Heart Fail, 2012. **14**(8): p. 803-69.
2. From, A.M. and B.A. Borlaug, *Heart failure with preserved ejection fraction: pathophysiology and emerging therapies.* Cardiovasc Ther, 2011. **29**(4): p. e6-21.
3. Quiroz, R., et al., *Comparison of characteristics and outcomes of patients with heart failure preserved ejection fraction versus reduced left ventricular ejection fraction in an urban cohort.* Am J Cardiol, 2014. **113**(4): p. 691-6.
4. Mangla, A., et al., *Comparison of predictors of heart failure-related hospitalization or death in patients with versus without preserved left ventricular ejection fraction.* Am J Cardiol, 2013. **112**(12): p. 1907-12.
5. Onwuanyi, A. and M. Taylor, *Acute decompensated heart failure: pathophysiology and treatment.* Am J Cardiol, 2007. **99**(6B): p. 25D-30D.
6. Spinale, F.G., et al., *A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure.* Circulation, 2000. **102**(16): p. 1944-9.
7. Zile, M.R., et al., *Relationship between the temporal profile of plasma microRNA and left ventricular remodeling in patients after myocardial infarction.* Circ Cardiovasc Genet, 2011. **4**(6): p. 614-9.

8. Chu, J.W., et al., *Plasma active matrix metalloproteinase 9 and indices of diastolic function in patients with preserved systolic function*. Int J Cardiol, 2013. **167**(4): p. 1242-6.
9. Essa, E.M., et al., *Changes in plasma profiles of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in stress-induced cardiomyopathy*. J Card Fail, 2012. **18**(6): p. 487-92.
10. Meluzin, J., et al., *Can markers of collagen turnover or other biomarkers contribute to the diagnostics of heart failure with normal left ventricular ejection fraction?* Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2013. **157**(4): p. 331-9.
11. Chang, Y.Y., et al., *Comparison the prognostic value of galectin-3 and serum markers of cardiac extracellular matrix turnover in patients with chronic systolic heart failure*. Int J Med Sci, 2014. **11**(11): p. 1098-106.
12. Sanchis, L., et al., *Prognosis of new-onset heart failure outpatients and collagen biomarkers*. Eur J Clin Invest, 2015. **45**(8): p. 842-9.
13. Bironaite, D., et al., *Molecular mechanisms behind progressing chronic inflammatory dilated cardiomyopathy*. BMC Cardiovasc Disord, 2015. **15**: p. 26.
14. Velho, F.M., et al., *Polymorphisms of matrix metalloproteinases in systolic heart failure: role on disease susceptibility, phenotypic characteristics, and prognosis*. J Card Fail, 2011. **17**(2): p. 115-21.
15. Schulte, C., et al., *Diagnostic and prognostic value of circulating microRNAs in heart failure with preserved and reduced ejection fraction*. World J Cardiol, 2015. **7**(12): p. 843-60.

16. Lok, S.I., et al., *MicroRNA Expression in Myocardial Tissue and Plasma of Patients with End-Stage Heart Failure during LVAD Support: Comparison of Continuous and Pulsatile Devices*. PLoS One, 2015. **10**(10): p. e0136404.
17. Valencia-Sanchez, M.A., et al., *Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs*. Genes Dev, 2006. **20**(5): p. 515-24.
18. Ikeda, S., et al., *Altered microRNA expression in human heart disease*. Physiol Genomics, 2007. **31**(3): p. 367-73.
19. Thum, T., D. Catalucci, and J. Bauersachs, *MicroRNAs: novel regulators in cardiac development and disease*. Cardiovasc Res, 2008. **79**(4): p. 562-70.
20. Fukushima, Y., et al., *Assessment of plasma miRNAs in congestive heart failure*. Circ J, 2011. **75**(2): p. 336-40.
21. Goren, Y., et al., *Serum levels of microRNAs in patients with heart failure*. Eur J Heart Fail, 2012. **14**(2): p. 147-54.
22. Vogel, B., et al., *Multivariate miRNA signatures as biomarkers for non-ischaemic systolic heart failure*. Eur Heart J, 2013. **34**(36): p. 2812-22.
23. Wong, L.L., et al., *Circulating microRNAs in heart failure with reduced and preserved left ventricular ejection fraction*. Eur J Heart Fail, 2015. **17**(4): p. 393-404.
24. Watson, C.J., et al., *MicroRNA signatures differentiate preserved from reduced ejection fraction heart failure*. Eur J Heart Fail, 2015. **17**(4): p. 405-15.
25. Rohde, L.E., et al., *Reliability and prognostic value of traditional signs and symptoms in outpatients with congestive heart failure*. Can J Cardiol, 2004. **20**(7): p. 697-702.

26. Kroh, E.M., et al., *Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR)*. Methods, 2010. **50**(4): p. 298-301.
27. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
28. Kuliczkowski, W., et al., *Matrix metalloproteinases and the activity of their tissue inhibitors in patients with ST-elevation myocardial infarction treated with primary angioplasty*. Kardiol Pol, 2013. **71**(5): p. 453-63.
29. de Denus, S., et al., *Differences in biomarkers in patients with heart failure with a reduced vs a preserved left ventricular ejection fraction*. Can J Cardiol, 2012. **28**(1): p. 62-8.
30. Devaux, Y., et al., *MicroRNA-150: a novel marker of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction*. Circ Cardiovasc Genet, 2013. **6**(3): p. 290-8.
31. van Rooij, E., et al., *A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(48): p. 18255-60.
32. Zidar, N., et al., *MicroRNAs, innate immunity and ventricular rupture in human myocardial infarction*. Dis Markers, 2011. **31**(5): p. 259-65.
33. Liu, W., et al., *MicroRNA-150 Protects Against Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy*. J Cell Biochem, 2015. **116**(10): p. 2166-76.
34. Tang, Y., et al., *MicroRNA-150 protects the mouse heart from ischaemic injury by regulating cell death*. Cardiovasc Res, 2015. **106**(3): p. 387-97.

35. Nair, N., et al., *Circulating miRNA as novel markers for diastolic dysfunction.* Mol Cell Biochem, 2013. **376**(1-2): p. 33-40.
36. Biolo, A., et al., *Episodes of acute heart failure syndrome are associated with increased levels of troponin and extracellular matrix markers.* Circ Heart Fail, 2010. **3**(1): p. 44-50.
37. Tijssen, A.J., Y.M. Pinto, and E.E. Creemers, *Non-cardiomyocyte microRNAs in heart failure.* Cardiovasc Res, 2012. **93**(4): p. 573-82.
38. Abdellatif, M., *Differential expression of microRNAs in different disease states.* Circ Res, 2012. **110**(4): p. 638-50.
39. Bajraktari, G., et al., *Plasma metalloproteinase-9 and restrictive filling pattern as major predictors of outcome in patients with ischemic cardiomyopathy.* Eur J Intern Med, 2012. **23**(7): p. 616-20.
40. Franz, M., et al., *Matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, B(+) tenascin-C and ED-A(+) fibronectin in dilated cardiomyopathy: potential impact on disease progression and patients' prognosis.* Int J Cardiol, 2013. **168**(6): p. 5344-51.
41. Bauters, C., et al., *Circulating miR-133a and miR-423-5p fail as biomarkers for left ventricular remodeling after myocardial infarction.* Int J Cardiol, 2013. **168**(3): p. 1837-40.

## 7. ARTIGO 2

**Inflammatory profile in patients with heart failure with reduced or preserved ejection fraction in different stages of compensation**

**Inflammatory profile in patients with heart failure with reduced or preserved  
ejection fraction in different stages of compensation**

Daiane Silvello<sup>1,2</sup>, Mariana Recamonde-Mendoza<sup>1,3</sup>, Fernanda Curuja<sup>1</sup>, Arthur  
Garbin<sup>1</sup>, Nadine Clausell<sup>1,2</sup>, Luis E. Rohde<sup>1,2</sup>, Andréia Biolo<sup>1,2</sup>

1 Transplant Unit from the Cardiology Division, Hospital de Clínicas de Porto  
Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

2 Post-Graduate Program in Cardiology and Cardiovascular Science, Federal  
University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

3 Institute of Informatics, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS,  
Brazil

Address for correspondence:

Andréia Biolo MD

Heart Failure and Transplant Unit

Cardiology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350, Sala 2060

Porto Alegre, RS, Brazil 90035-003

Phone/Fax 55 51 33598844

E-mail address: [biolo.andreia@gmail.com](mailto:biolo.andreia@gmail.com)

## ABSTRACT

Inflammatory markers play an important role in heart failure (HF). We examined whether cytokine levels are different between heart failure patients with left ventricular preserved ejection fraction (HFpEF) and patients with reduced ejection fraction (HFrEF), as well as in distinct stages of HF clinical compensation.

We studied 70 HF patients who were admitted to our hospital with acute decompensation. They were divided into two groups according to left ventricle ejection fraction (LVEF): HFrEF (LVEF  $\leq$  45%) and HFpEF (LVEF > 45%).

Interleukin-6 (IL-6), IL-10, IL-18 and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) were measured at acute decompensation HF, after acute therapy and at chronic compensated HF. Plasma brain natriuretic peptide (BNP) and troponin levels were also measured at the acute stage. IL-18 levels were higher in HFpEF on acute decompensated HF, decreased in chronic compensation, and correlated with troponin I levels in acute decompensated HF patients. There was no difference in other cytokines levels between HFpEF and HFrEF, and they did not change after acute therapy in either group. However, decreased IL-10 levels were observed after acute therapy only in the HFrEF group. We found significant correlations between troponin and IL-18 and IL-10 only in HFpEF network.

In conclusion, the IL-18 levels in HFpEF patients were elevated at admission, decreased after chronic compensation HF, and correlate with troponin I. These findings suggest that activation of IL-18 pathway may play a specific role in HFpEF.

**Keywords:** Heart failure, HFpEF, HFrEF, inflammatory cytokines, and clinical compensation.

## INTRODUCTION

Among patients with clinical syndrome of heart failure (HF), approximately 50% present normal left ventricle ejection fraction (LVEF), known as HF with preserved EF (HFpEF), whose prognostic factors and clinical outcomes may be distinct from patients with reduced LVEF (HFrEF). Moreover, HFrEF and HFpEF are not easily distinguishable in clinical practice, requiring assessment by imaging, and this differentiation can be critical in the treatment and prognosis of patients with HF [1]. However, evidences are still contradictory with regard to the pathophysiological effective differentiation between groups [2-4]. Therefore, several studies seek to find specific circulating biomarkers in patients with HFrEF and HFpEF that may improve our understanding about the pathophysiological pathways of the disease [5-7].

Inflammation is a significant element of the response to tissue stress and injury in the heart, coordinating remodeling and healing by promoting extracellular matrix remodeling, cell proliferation, cardiomyocyte hypertrophy and affecting cardiomyocyte contractility [8]. In addition, some studies showed changes in pro-inflammatory cytokines in HF patients after acute therapy [9, 10].

This study aims to test the hypothesis that inflammatory marker levels can act distinctly between HFpEF and HFrEF, and in different stages of HF clinical compensation.

## METHODS

### **Patients recruitment**

In the present study, 70 patients with acute decompensated heart failure were included, recruited from the emergency of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). All patients underwent detailed clinical examination and left ventricular ejection fraction was assessed by two-dimensional echocardiography during the decompensation episode or within the 3 months prior to admission. Patients with confirmed HF and LVEF  $\leq 45\%$  were classified as HFrEF, whereas those with LVEF  $> 45\%$  were categorized as HFpEF.

Diagnosis of decompensated HF was clinically defined as the presence of worsening dyspnea, paroxysmal nocturnal dyspnea, and/or orthopnea together with clinical signs of circulatory congestion (increase of venous jugular pressure hepatojugular reflux hepatomegaly and/or peripheral edema), and/or radiological signs of congestion on chest X-ray. To be included in the study, the patient should present Boston score  $> 8$  points [11].

Patients with chronic obstructive pulmonary disease, primary pulmonary hypertension, pericardial disease, active respiratory infection, pulmonary embolism, severe hemodynamic instability requiring vasoactive drugs, aortic stenosis, renal dysfunction (creatinine  $> 3$  mg/dL), cirrhosis or active hepatitis, rheumatic diseases and cancer were excluded from this study.

## **Follow-up**

Patients were evaluated at three time-points: 1) at acute decompensated HF (up to 36 hours after hospital admission), 2) after acute therapy (discharge), and 3) at chronic compensated HF (outpatient visit) scheduled at least 2 months after hospital discharge in the HF Clinic at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. If patients were not compensated at the time of consultation, a new visit was rescheduled. Patients in functional class I and II of the NYHA and with clinical score of congestion lower than 5 were considered compensated [11].

## **Ethical considerations**

The study protocol was conducted according to the principles outlined in the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee in Research of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Written informed consent was obtained from all subjects prior to inclusion in the study.

## **Plasma sample collection**

Peripheral venous blood samples from all subjects were collected into ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) -coated tubes. Blood samples were centrifuged for 15 min at 4°C and 1500 rpm within one hour from collection. Plasma was separated and aliquoted into 1.5 mL microtubes and stored at -80°C for posterior combined analysis.

## Biomarkers levels

Plasma levels of inflammatory cytokines IL-6, IL-10, and TNF- $\alpha$  were measured by Multiplex Bead Immunoassay, using Human Magnetic Custom Luminex Kit by the Luminex system 200 (Invitrogen by Life Technologies, MD). The IL-18 dosages were performed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (Invitrogen Corporation, Camarillo, CA, USA). All analyzes were performed in duplicate, using commercial assays and in accordance with the specifications of their respective manufacturers.

The concentrations of troponin I (cTnI) were analyzed using automated methodology electrochemiluminescence immunoassay (ADVIA Centaur CP, Ultra Troponin I <sup>TM</sup>; Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, NY, USA).

BNP levels were measured using automated methodology electrochemiluminescence immunoassay (ADVIA Centaur BNP, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Tarrytown, NY, USA).

## Statistical analysis

Continuous variables with normal distribution were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Categorical variables were reported as absolute number and percentage. The Chi-square test (or the exact Fisher test) was used to compare categorical variables and T test to numerical variables with Gaussian distribution. 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  $< 0.05$  was considered statistically significant.

### **Network-based analysis of correlations**

Correlations between expression levels of distinct biomarkers were assessed adopting the Spearman's Rank correlation coefficient with the R environment (R Development Core Team, 2008) [12]. P values were computed using the asymptotic t approximation as implemented in the cor.test function in order to test if a detected association was statistically significant. Network-based analysis of correlations among biomarkers was conducted with Cytoscape v3.4.0 software.

## **RESULTS**

### **Clinical characteristics**

Seventy patients admitted to the hospital emergency during episode of clinical decompensation were included in the study. Forty-four patients were allocated in HFrEF group and 26 patients in HFpEF. Their clinical and demographics characteristics are summarized in Table 1. Patients were predominantly white, hypertensive and used conventional medication in the treatment of HF. There was no difference between the groups regarding demographic and clinical characteristics. However, as expected, the groups have distinct profiles regarding echocardiographic cardiac function and morphology. Patients with HFrEF have

higher diastolic and systolic diameters of the left ventricle and greater BNP levels than patients with HFpEF (Table 2).

### **Biomarkers in Acute decompensated HF**

BNP levels, as expected, were more elevated in patients with HFrEF than in patient whit HFpEF ( $1,300 \pm 740$  pg/mL vs  $441.36 \pm 570$ ,  $p = 0.02$ ) in acute decompensated HF (Figure 1 A). Troponin I levels in acute decompensation HF were similar between the two groups ( $0.05 \pm 0.06$  vs.  $0.15 \pm 0.41$ ,  $p = 0.30$ ) (Figure 1 B).

Moreover, the plasma levels of interleukin-18 (IL-18) were higher in patients with HFpEF in comparison with patients with HFrEF in acute decompensation HF ( $p = 0.027$ ) (Figure 1 D). However, no differences were found in other pro-inflammatory interleukins (IL-6 and TNF $\alpha$ ) between patients with HFpEF and patients with HFrEF. Likewise, we did not observe distinct anti-inflammatory IL-10 levels between both HF groups (Figure 1 C, E, F). Additionally, none of the inflammatory biomarkers had correlation with clinical characteristics, echocardiographic dates of morphology and function, and comorbidities in acute decompensated HF (Data not shown).

### **Follow-up**

Figure 2 shows the changes observed in the biomarker levels at discharge (acute therapy) and outpatient visit (chronic compensation) as compared to admission (acute decompensated HF).

IL-18 levels did not differ between acute decompensated HF and acute therapy in the two HF groups ( $p > 0.05$  for both comparisons). However, circulating levels of IL-18 showed contrasting profiles between both groups in chronic compensate HF, demonstrating opposite direction of expression changes: it decreased in patients with HFpEF while it increased in patients with HFrEF ( $p = 0.022$ ) (Figure 2 B).

Additionally, IL-10 levels appear to have a different magnitude of expression changes between the two groups after acute therapy. The IL-10 levels decreased in patients with HFrEF more than in HFpEF group, both with acute therapy ( $p = 0.001$ ) and in chronic compensate HF ( $p = 0.033$ ) (Figure 2 D).

With respect to IL-6, there was no significant changes for both stages and HF groups ( $p > 0.05$  for all comparisons) (Figure 2 C). Likewise, levels of TNF- $\alpha$  did not change with acute therapy and chronic compensation HF in comparison with acute decompensated HF in both groups of HF patients ( $p > 0.05$  for all comparisons) (Figure 2 A).

### **Correlation networks**

We have conducted a network-based correlation analysis to investigate the association between inflammatory biomarkers and markers known in the clinical practice of HF (BNP and Troponin) in acute decompensated HF for all patients. Additionally, we created independent correlation networks for HFpEF and HfrEF groups (Figure 3). Edge thickness is proportional to correlation strength and positive and negative correlations are represented by solid and dashed lines, respectively. Edges corresponding to significant correlations ( $p < 0.05$ ) are highlighted in red. In addition, node color denotes either absolute expression levels for HFpEF and

HFrEF networks, or fold changes for HFrEF vs HFrEF network, with red (blue) indicating increased (decreased) expression levels. In both cases, color intensity is proportional to expression or fold change magnitude.

The network of all HF patients demonstrated a strong negative correlation between IL-18 and BNP levels ( $r = -0.6$ ,  $p = 0.006$ ). In addition, a weak and positive correlation was observed between IL-18 and TNF- $\alpha$  ( $r = 0.3$ ,  $p = 0.03$ ), IL-10 and IL-6 ( $r = 0.4$ ,  $p = 0.0001$ ), and between troponin and IL-10 ( $r = 0.3$ ,  $p = 0.005$ ) (Figure 3 A).

When verified, the troponin I remained positively correlated with IL-10 ( $r = 0.46$ ,  $p = 0.024$ ) and IL-18 ( $r = 0.45$ ,  $p = 0.02$ ) only in the HFpEF network, as well as, IL-10 and IL-6 ( $r=0.6$ ,  $p=.00006$ ). No other significant correlations were observed in this network (Figure 3 B).

In the HFrEF network, a significant association was found solely between IL-6 and troponin I, which presented a weak negative correlation ( $r = -0.3$ ,  $p = 0.33$ ) (Figure 3 C). Although not significant, a strong negative correlation was observed between IL-6 and BNP for HFrEF patients ( $r=-0.7$ ,  $p=0.057$ ).

## DISCUSSION

In this study, we evaluated whether the inflammatory biomarkers can act distinctly between HFpEF and HFrEF, and in different stages of HF clinical compensation. We observed higher levels of IL-18 in patients with HFpEF compared to patients with HFrEF in acute decompensated HF. In addition, we verified that the IL-18 levels decreased in chronic stable HF only in HFpEF patients. Interestingly, its expression levels were increased in patients with HFrEF at this stage. Additionally,

we demonstrated that IL-10 levels had a greater decrease in HFrEF patients than in HFpEF patients both with acute therapy and after chronic compensation. Moreover, by exploring the network connections between inflammatory biomarkers and markers known in the clinical practice HF, we demonstrated that these correlations change depending on the HF phenotype. We found significant correlations between troponin and IL-18 and IL-10 in HFpEF network, but these correlations are non-significant in the network related to the HFrEF group.

We showed that IL-18 levels were significantly higher in HFpEF group compared to HFrEF at acute decompensated HF. Similarly, previous studies verified high levels of IL-18 in patients with congestive heart failure (CHF) [13], acute coronary syndromes [14], and in both ischemic and dilated HF [15, 16]. Moreover, an experimental model of MI in mouse showed increased production of cardiac IL-18 mRNA and pro-IL-18, as well as circulating IL-18 post MI. In addition, they demonstrated that IL-18 higher levels also reduced myocardial contractility [17]. Additionally, other studies in murine models of left ventricular pressure and volume overload demonstrated that higher IL-18 expression are associated with interstitial fibrosis and diastolic dysfunction [18, 19], and hypertrophy [20]. Also, trials in cell culture showed the damaging role of IL-18 in different ways of remodeling and extracellular matrix degradation [21-23]. Therefore, IL-18 may be associated with HFpEF due to its involvement in the pathogenesis of contractile dysfunction, and prohypertrophic and profibrotic effects.

However, there was no significant differences in IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  level between HF groups in acute decompensated HF. Similarly, previous studies did not show variation in IL-6 levels between HFpEF and HFrEF in acute phase [7, 24, 25] or between TNF- $\alpha$  levels [9].

In addition, in the present study IL-18 reduced in chronic compensated HF only in the HFpEF group, and that IL-10 levels had a more accentuated decrease in HFrEF group in relation to the HFpEF group both for acute therapy and after compensation. Similarly, other studies showed reduction of pro-inflammatory cytokines in HF patients after acute therapy. Matsumoto et al. demonstrate that IL-6 levels decreased after discharge [9] and Schulze et al. showed reduction in TNF- $\alpha$  levels after clinical compensation [10].

Interestingly, there was an association between IL-18 and troponin when analyzing the HFpEF correlation network on admission. Similarly, previous studies in patients with IAM also found correlation between these markers [26, 27]. Although several experiments *in vitro* and *in vivo* have showed IL-18 association with cell hypertrophy, cell death due to pyroptosis [28], until now, there are few studies evaluating the direct association between IL-18 and troponin. Nonetheless, a recent assay indicated that neutralization of IL-18 with anti-IL-18 antibody or IL-18-binding protein (IL-18BP) decreased expression of inflammatory cytokines including IL-1 $\beta$ , IL-23, IL-18, and IL-17, and induced the reduction in mononuclear cells infiltration and production of troponin T (TnT) [29].

The main limitation of this study was the small number of patients included in each group of HF patients. In addition, we did not evaluate a control group of healthy subjects, which could give us a better direction about the differences between groups, as well as during the follow-up.

In conclusion, analyzing the IL-18 levels for HFpEF patients in relation to the HFrEF group, we observed differential characteristics such as elevated levels at admission, a decrease in expression after chronic compensation HF, and a significant positive correlation with troponin I solely for HFpEF subjects. These findings may suggest

that IL-18 act differently in HFpEF and HFrEF. However, more studies are necessary to understand the pathophysiological mechanisms that regulate the individual phenotypes of HF.

## **FUNDING**

This work was supported in part by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Conselho de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPERHCPA).

## **CONFLICT OF INTEREST**

Conflict of interest: none declared.

FIGURE 1.

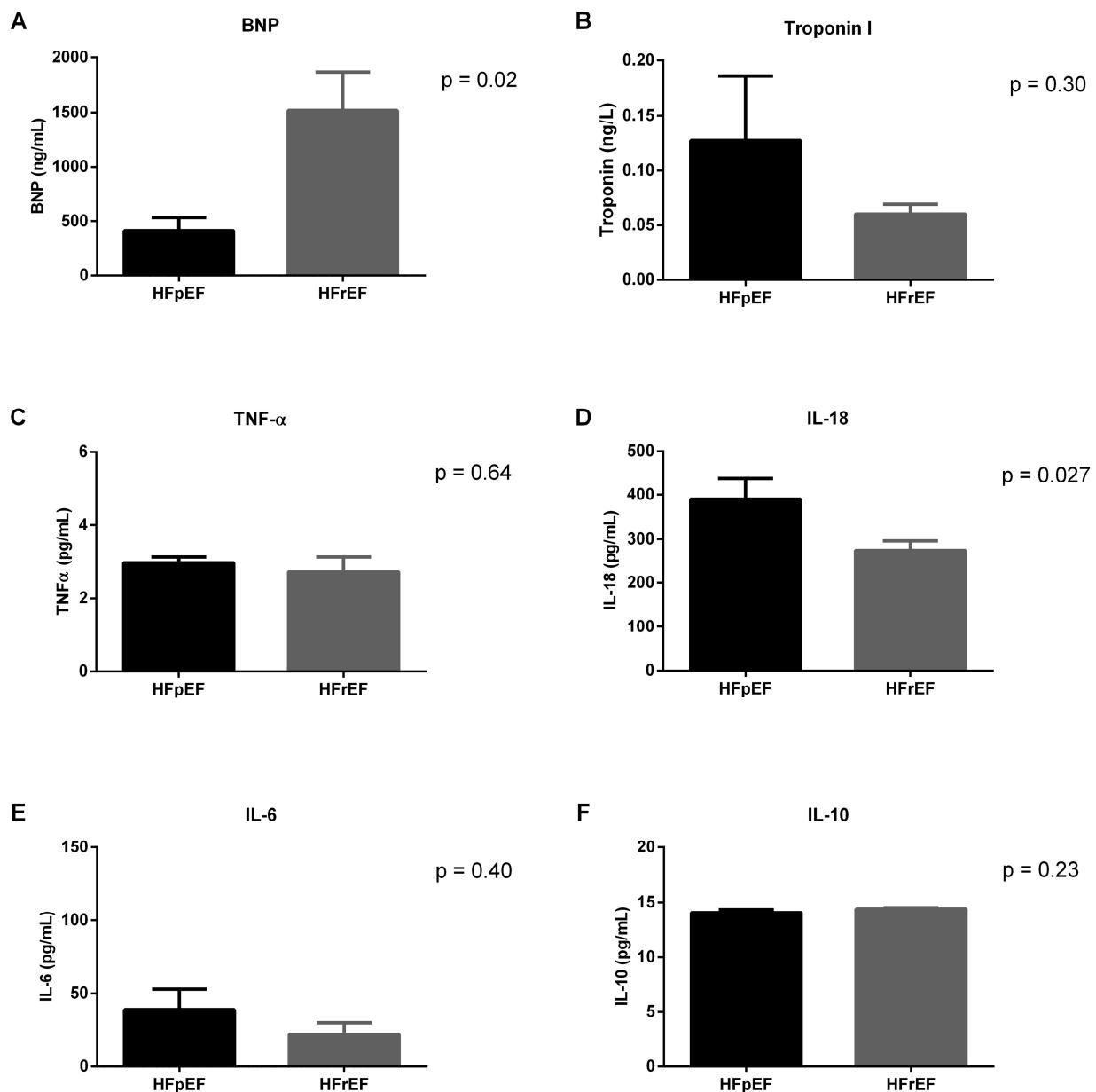


FIGURE 2.

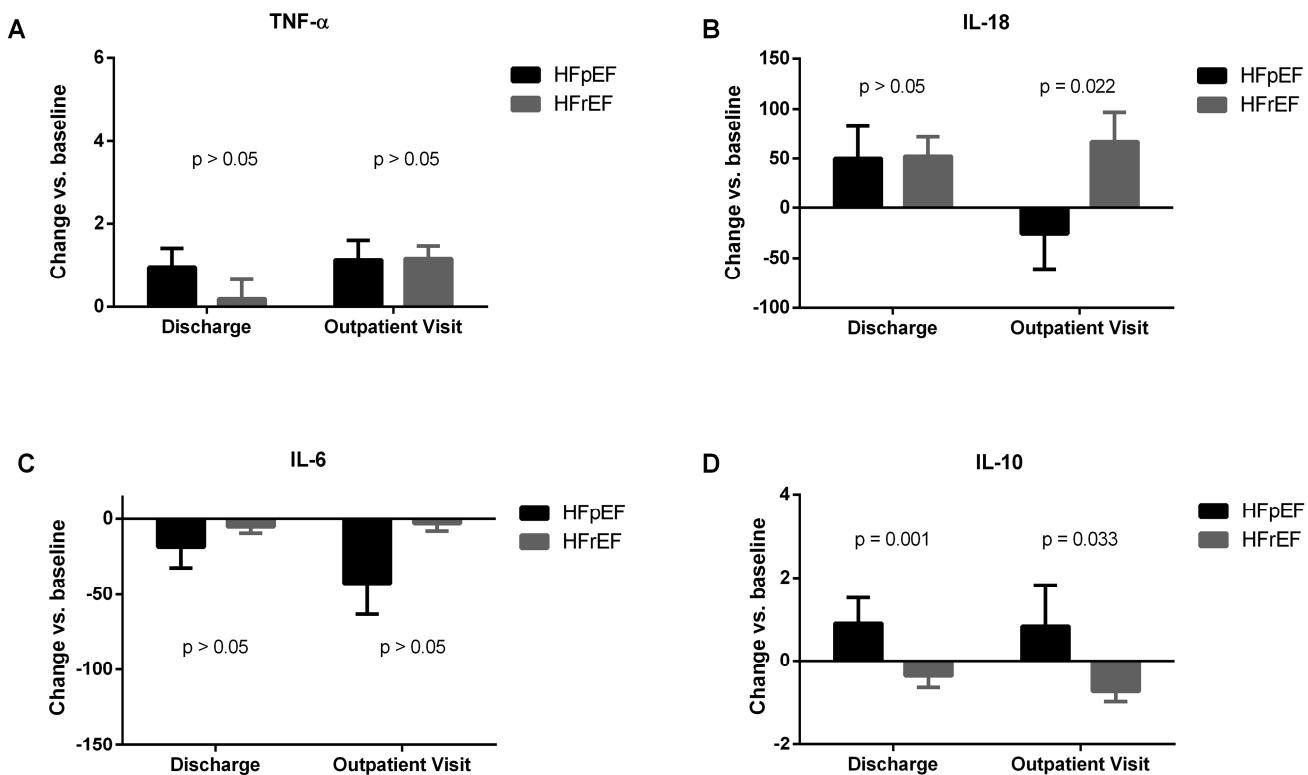


FIGURE 3.

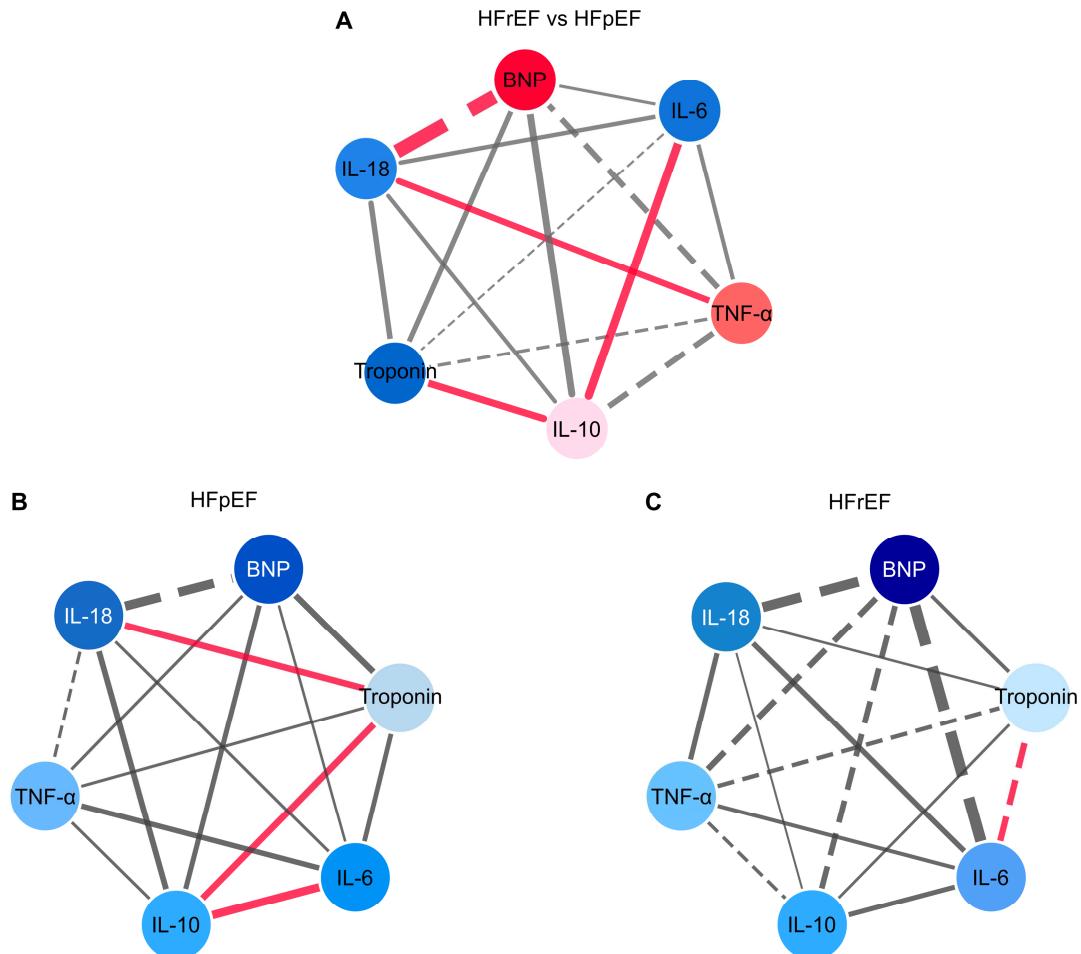


TABLE 1. Clinical and demographic characteristics.

	HFrEF (n=44)	HFpEF (n=26)	P-value
Age (years)	61.7 ± 13.4	66.4 ± 11.9	0.12
Male sex, n (%)	28 (64)	11 (42)	0.08
Whites, n (%)	36 (82)	22 (85)	0.88
Comorbidity, n (%)			
Hypertension	31 (70)	21 (81)	0.40
Diabetes	23 (52)	8 (31)	0.08
COPD	12 (27)	3 (11)	0.12
Obesity	10 (23)	7 (27)	0.69
Smoking	25 (57)	7 (27)	0.02
Ischemic heart disease	17 (39)	12 (46)	0.62
Previous AMI	11 (25)	6 (23)	1.00
Previous stroke	6 (14)	4 (16)	1.00
Previous MRS	8 (18)	5 (19)	1.00
Atrial fibrillation	20 (46)	11 (42)	1.00
HF Etiology, n (%)			
Ischemic	19 (43)	9 (32)	0.61
Hypertensive	19 (43)	10 (33)	0.80
Alcoholic	6 (14)	1 (4)	0.24
NYHA functional class, n (%)			
II	4 (9)	4 (16)	0.67
III	22 (50)	11 (42)	0.68
IV	18 (41)	11 (42)	0.76
Medications, n (%)			
Beta blocker	35 (79)	17 (65)	0.26
ACE-I	37 (84)	17 (65)	0.08
Furosemide	41 (93)	21 (81)	0.14
Digoxin	35 (79)	6 (23)	<0.001
Spironolactone	21 (48)	8 (31)	0.31
Anticoagulants	16 (36)	8 (31)	0.79

ACE-I, angiotensin-converting enzyme inhibitor; AMI, acute myocardial infarction; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; HFpEF, heart failure with preserved ejection fraction; HFrEF, heart failure with reduced ejection fraction; LVEDD, left-ventricular end diastolic diameter; LVESD, left-

ventricular end systolic diameter; LVEF, left-ventricular ejection fraction; MRS, myocardial revascularization surgery; NYHA, New York Heart Association.

TABLE 2. Laboratory and echocardiographic data in admission.

	HFrEF (n=44)	HFpEF (n=26)	P-value
<b>Laboratory tests</b>			
Hemoglobin (g/dL)	12.9 ± 1.9	11.31 ± 2.7	0.01
Na (mmol/L)	140 ± 4	141 ± 3	0.23
K (mmol/L)	4.4 ± 0.6	4.4 ± 0.7	0.93
Creatinine (µmol/L)	1.20 ± 0.40	1.30 ± 0.54	0.37
Systolic BP, mmHg	127.7 ± 25	139.9 ± 26	0.06
Diastolic BP, mmHg	82.8 ± 18	79.2 ± 19	0.43
<b>Echocardiographic data</b>			
AE	5.0 ± 0.7	5.0 ± 0.8	1.00
LVEDD (mm)	6.48 ± 1.08	5.44 ± 0.65	<0.001
LVESD (mm)	5.61 ± 1.14	3.60 ± 0.64	<0.001
LVEF (%)	27.4 ± 7.68	63.88 ± 8.82	<0.001
VE Mass (g)	318.14 ± 113.6	270.7 ± 101.5	0.08

Na, sodium; K, potassium; LVEDD, left-ventricular end diastolic diameter; LVESD, left-ventricular end systolic diameter; LVEF, left-ventricular ejection fraction; ventricular left, VE.

## Legends

**Figure 1:** Biomarkers levels in patients with HFpEF and HFrEF at acute decompensated HF (admission).

**Figure 2:** Change in cytokines levels between acute decompensated HF and after acute therapy (discharge) and after chronic compensation HF (outpatient visit).

**Figure 3:** Biomarkers networks at acute decompensated HF for A) the comparison between HFrEF and HFpEF groups, B) HFpEF patients and C) HFrEF patients. In all networks, edge thickness is proportional to correlation strength, and positive and negative correlations are represented by solid and dashed lines, respectively. Edges corresponding to significant correlations ( $p < 0.05$ ) are highlighted in red. In network A, node color denotes the fold change in expression for HFrEF vs. HFpEF, with red representing increased expression and blue decreased expression. In networks B and C, node color denotes biomarkers absolute expression levels. In both cases, color intensity is proportional to expression or fold change magnitude.

## References

1. McMurray, J.J., et al., *ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC*. Eur J Heart Fail, 2012. **14**(8): p. 803-69.
2. Quiroz, R., et al., *Comparison of characteristics and outcomes of patients with heart failure preserved ejection fraction versus reduced left ventricular ejection fraction in an urban cohort*. Am J Cardiol, 2014. **113**(4): p. 691-6.
3. Ho, J.E., et al., *Predictors of new-onset heart failure: differences in preserved versus reduced ejection fraction*. Circ Heart Fail, 2013. **6**(2): p. 279-86.
4. Mangla, A., et al., *Comparison of predictors of heart failure-related hospitalization or death in patients with versus without preserved left ventricular ejection fraction*. Am J Cardiol, 2013. **112**(12): p. 1907-12.
5. De Keulenaer, G.W. and D.L. Brutsaert, *Systolic and diastolic heart failure: different phenotypes of the same disease?* Eur J Heart Fail, 2007. **9**(2): p. 136-43.
6. de Denus, S., et al., *Differences in biomarkers in patients with heart failure with a reduced vs a preserved left ventricular ejection fraction*. Can J Cardiol, 2012. **28**(1): p. 62-8.
7. Sanders-van Wijk, S., et al., *Circulating biomarkers of distinct pathophysiological pathways in heart failure with preserved vs. reduced left ventricular ejection fraction*. Eur J Heart Fail, 2015. **17**(10): p. 1006-14.

8. Seropian, I.M., et al., *Anti-inflammatory strategies for ventricular remodeling following ST-segment elevation acute myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2014. **63**(16): p. 1593-603.
9. Matsumoto, M., et al., *Serum interleukin-6 and C-reactive protein are markedly elevated in acute decompensated heart failure patients with left ventricular systolic dysfunction*. Cytokine, 2010. **49**(3): p. 264-8.
10. Schulze, P.C., et al., *Dynamics in insulin resistance and plasma levels of adipokines in patients with acute decompensated and chronic stable heart failure*. J Card Fail, 2011. **17**(12): p. 1004-11.
11. Rohde, L.E., et al., *Reliability and prognostic value of traditional signs and symptoms in outpatients with congestive heart failure*. Can J Cardiol, 2004. **20**(7): p. 697-702.
12. Team, R.D.C. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2008; Available from: <http://www.R-project.org>.
13. Naito, Y., et al., *Increased circulating interleukin-18 in patients with congestive heart failure*. Heart, 2002. **88**(3): p. 296-7.
14. Mallat, Z., et al., *Increased plasma concentrations of interleukin-18 in acute coronary syndromes*. Heart, 2002. **88**(5): p. 467-9.
15. Mallat, Z., et al., *Evidence for altered interleukin 18 (IL)-18 pathway in human heart failure*. FASEB J, 2004. **18**(14): p. 1752-4.
16. Di Somma, S., et al., *IL-18 stimulates B-type natriuretic peptide synthesis by cardiomyocytes in vitro and its plasma levels correlate with B-type natriuretic peptide in non-overloaded acute heart failure patients*. Eur Heart J Acute Cardiovasc Care, 2013.

17. Woldbaek, P.R., et al., *Increased cardiac IL-18 mRNA, pro-IL-18 and plasma IL-18 after myocardial infarction in the mouse; a potential role in cardiac dysfunction*. *Cardiovasc Res*, 2003. **59**(1): p. 122-31.
18. Yu, Q., et al., *IL-18 induction of osteopontin mediates cardiac fibrosis and diastolic dysfunction in mice*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009. **297**(1): p. H76-85.
19. Toldo, S., et al., *Interleukin-18 mediates interleukin-1-induced cardiac dysfunction*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014. **306**(7): p. H1025-31.
20. Yoshida, T., et al., *Pressure overload induces IL-18 and IL-18R expression, but markedly suppresses IL-18BP expression in a rabbit model. IL-18 potentiates TNF-alpha-induced cardiomyocyte death*. *J Mol Cell Cardiol*, 2014. **75**: p. 141-51.
21. Reddy, V.S., et al., *Interleukin-18 induces EMMPRIN expression in primary cardiomyocytes via JNK/Sp1 signaling and MMP-9 in part via EMMPRIN and through AP-1 and NF-kappaB activation*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010. **299**(4): p. H1242-54.
22. Fix, C., K. Bingham, and W. Carver, *Effects of interleukin-18 on cardiac fibroblast function and gene expression*. *Cytokine*, 2011. **53**(1): p. 19-28.
23. Reddy, V.S., et al., *Interleukin-18 stimulates fibronectin expression in primary human cardiac fibroblasts via PI3K-Akt-dependent NF-kappaB activation*. *J Cell Physiol*, 2008. **215**(3): p. 697-707.
24. Sanchez-Lazaro, I.J., et al., *Are there differences in acute phase inflammation markers regarding the type of heart failure?* *Heart Int*, 2011. **6**(2): p. e17.

25. Putko, B.N., et al., *Circulating levels of tumor necrosis factor-alpha receptor 2 are increased in heart failure with preserved ejection fraction relative to heart failure with reduced ejection fraction: evidence for a divergence in pathophysiology*. PLoS One, 2014. **9**(6): p. e99495.
26. Gao, Y., et al., *Interleukin-18 levels on admission are associated with mid-term adverse clinical events in patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction undergoing percutaneous coronary intervention*. Int Heart J, 2010. **51**(2): p. 75-81.
27. Brunetti, N.D., et al., *Inflammatory cytokines imbalance in the very early phase of acute coronary syndrome: correlations with angiographic findings and in-hospital events*. Inflammation, 2011. **34**(1): p. 58-66.
28. Toldo, S., et al., *The inflammasome in myocardial injury and cardiac remodeling*. Antioxid Redox Signal, 2015. **22**(13): p. 1146-61.
29. Gu, G.L., et al., *Cardioprotective Effect of MicroRNA-21 in Murine Myocardial Infarction*. Cardiovasc Ther, 2015. **33**(3): p. 109-17.