

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

Juliana Gil Thomé

**RELAÇÃO ENTRE MICRORNAS E OBESIDADE EM PACIENTES COM
INSUFICIÊNCIA CARDÍACA CRÔNICA**

Porto Alegre, março de 2014.

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

RELAÇÃO ENTRE MICRORNAS E OBESIDADE EM PACIENTES COM
INSUFICIÊNCIA CARDÍACA CRÔNICA

Juliana Gil Thomé

*Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde: Cardiologia e
Ciências Cardiovasculares para
obtenção do título de Mestre em
Ciências Cardiovasculares.*

Orientadora:

Profa. Dra. Andréia Biolo

Porto Alegre, março de 2014.

FICHA CATALOGRÁFICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em 14 de março de 2014, pela Comissão Examinadora, constituída por:

- Dra. Cristiane Bauermann Leitão
- Dra. Úrsula da Silveira Matte
- Dr. Luis Eduardo Paim Rohde

CIP - Catalogação na Publicação

Thomé, Juliana Gil
Relação entre MicroRNAs e Obesidade em Pacientes
com Insuficiência Cardíaca Crônica / Juliana Gil
Thomé. -- 2014.
63 f.

Orientadora: Andreia Biolo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Insuficiência Cardíaca. 2. Obesidade. 3. Adiposidade. 4. MicroRNAs. I. Biolo, Andreia, orient. II. Título.

*Dedico este trabalho ao meu filho,
Rodrigo, que já nos traz tanta felicidade.
Tua família te aguarda com muito amor.*

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade de aprendizado.

À minha orientadora, professora Andréia Biolo, pela amizade, competência, profissionalismo e apoio. És um exemplo de dedicação e ética. Obrigada por acreditar no meu potencial, pela oportunidade oferecida e pelo incentivo para que eu realizasse a pós-graduação.

Ao Grupo de Insuficiência Cardíaca e Transplante do HCPA pelo aprendizado e por oportunizarem o meu crescimento profissional em diferentes etapas da minha formação médica e acadêmica. Aos professores Luís Eduardo Rohde, Nadine Clausell e Luís Beck da Silva pelo exemplo como médicos e pesquisadores.

Às enfermeiras e nutricionistas do Grupo de Insuficiência Cardíaca, especialmente enfermeira Letícia Orlandin e nutricionista Karina D'Almeida, pelo aprendizado, convivência e apoio no desenvolvimento do trabalho.

Às colegas do laboratório de Pesquisa Cardiovascular, especialmente, Daiane Silvello, Amanda Paleante, Stéfanie Schneider e Graziela Pinto, pela convivência e por compartilharem os conhecimentos específicos da bancada do laboratório.

Às bolsistas da graduação Amanda Veiga Cheuiche, Vanessa Laubert Laporta e Vanessa Duarte Ortiz, que ajudaram no recrutamento dos pacientes.

Aos pacientes e controles que se propuseram a contribuir para a construção do conhecimento.

Ao meu pai, André, pelo apoio, pelo exemplo e pelo amor. À minha mãe, Débora, *in memoriam*, pelo amor e exemplo que permanecem vivos. Às minhas irmãs, Melina e Marília, por apoiarem minhas escolhas e sempre torcerem por mim.

Ao meu esposo, Leandro, pelo companheirismo, amor, paciência e carinho. Por me apoiar em todos os momentos.

Esta dissertação de mestrado segue o formato proposto pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Cardiologia e Ciências Cardiovasculares da Universidade Federal de Rio Grande do Sul – UFRGS, sendo apresentada na forma de revisão de literatura e manuscrito sobre o tema de dissertação:

1 – Contextualização do tema.

2 - Artigo original referente ao trabalho de pesquisa propriamente dito que será submetido para publicação em periódico científico, conforme normas do mesmo.

LISTA DE ABREVIATURAS

IC – Insuficiência Cardíaca

EUA – Estados Unidos da América

RNA – Ácido ribonucleico

RNA_m – RNA mensageiro

miRNAs ou miRs – microRNAs

IMC – Índice de Massa Corporal

BIA – Análise de Bioimpedância Elétrica

PPAR γ – receptores ativados por proliferador de peroxissomo-gama

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral- alfa

IL – Interleucina

RISC – Complexo de Silenciamento Induzido por RNA

HDL – Lipoproteína de Alta Densidade

BNP – Peptídeo Natriurético do Tipo B

LISTA DE FIGURAS

Revisão da literatura:

Figura 1 – Patogênese da IC	15
Figura 2 – Curvas de incidência cumulativa para mortalidade de acordo com categorias de IMC da avaliação basal.....	17
Figura 3 – Biogênese do microRNA	21
Figura 4 – O papel de diferentes miRNAs no processo de remodelamento cardíaco	22

LISTA DE TABELAS

Revisão da literatura:

Tabela 1 - Estudos com miRs circulantes relacionados à insuficiência cardíaca em humanos 24

Tabela 2 - Estudos com miRs circulantes relacionados à obesidade em humanos.
.....27

SUMÁRIO

1 REVISÃO DA LITERATURA	13
1.1 Insuficiência cardíaca	13
1.2 Insuficiência cardíaca e obesidade	16
1.3 MicroRNAs e insuficiência cardíaca	20
1.4 MicroRNAs e obesidade.....	25
1.5 Insuficiência cardíaca, obesidade e microRNAs.....	28
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
3 JUSTIFICATIVA.....	35
4 HIPÓTESE CONCEITUAL.....	36
5 OBJETIVOS	37
5.1 Objetivo principal	37
5.2 Objetivos específicos	37
6 ARTIGO ORIGINAL	38
APÊNDICE 1- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	60

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Insuficiência Cardíaca

A insuficiência cardíaca (IC) é uma doença que afeta mais de 5.8 milhões de pessoas nos Estados Unidos da América (EUA) e mais de 23 milhões de pessoas no mundo e, apesar dos avanços terapêuticos, ainda apresenta elevada morbidade e mortalidade¹. No Brasil, dados de 2007 mostraram que 39.4% das internações hospitalares ocorreram pelo diagnóstico de insuficiência cardíaca descompensada, sendo esta a principal causa de hospitalizações na população idosa². Em 2006, a IC ou etiologias associadas com IC foram responsáveis por 6,3% dos óbitos no Estado de São Paulo³.

A IC é definida como uma anormalidade da estrutura ou função cardíaca que prejudica a capacidade do coração de atender às demandas metabólicas dos tecidos em pressões de enchimento normais, ou permite fazê-lo apenas às custas de pressões de enchimento elevadas⁴. Clinicamente, a IC é caracterizada como uma síndrome composta por sintomas como dispnéia aos esforços, ortopnéia, edema de membros inferiores e fadiga., e sinais ao exame físico como pressão venosa jugular elevada, crepitações pulmonares e desvio do ictus cardíaco⁵.

A doença arterial coronariana é a causa de aproximadamente dois terços dos casos de IC com fração de ejeção reduzida, apesar de hipertensão e diabetes provavelmente serem fatores contribuintes em muitos casos. A miocardiopatia dilatada pode também resultar de hipertensão, valvulopatias, causas genéticas, infecção viral prévia, abuso de álcool, agentes quimioterápicos, entre outros⁶.

Na América Latina, as principais etiologias são a miocardiopatia dilatada idiopática (de 1.3 a 37%), chagásica (de 1.3 a 21%), isquêmica (de 68 a 17%), hipertensiva (de 14 a 76%), valvular (de 2 a 22%) e alcoólica (de 1.1 a 8%)². No Brasil existe grande variação na etiologia da IC em diferentes regiões do país. A etiologia chagásica é altamente prevalente nas regiões Centro-Oeste e Sudeste, tem

fisiopatologia, evolução clínica e prognóstico peculiares, além de tratamento controverso³.

Quanto à fisiopatogênese da IC, após uma injúria miocárdica, as mudanças adaptativas que ocorrem nos miócitos sobreviventes e na matriz extracelular levam ao remodelamento patológico do ventrículo esquerdo, com dilatação e prejuízo na contratilidade. O processo de remodelamento ventricular ocasiona hipertrofia e alterações na biologia do cardiomiócito, morte celular por necrose ou apoptose, alterações na matriz extracelular, bem como alterações na geometria e arquitetura da cavidade ventricular⁷. Sem um tratamento, essas mudanças progridem ao longo do tempo, exacerbadas por injúria adicional (ex., infarto do miocárdio) e por respostas sistêmicas como a ativação do sistema nervoso simpático e do sistema renina-angiotensina-aldosterona⁶. 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 (figura 1), 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^{6,7}. 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 adulto⁵.

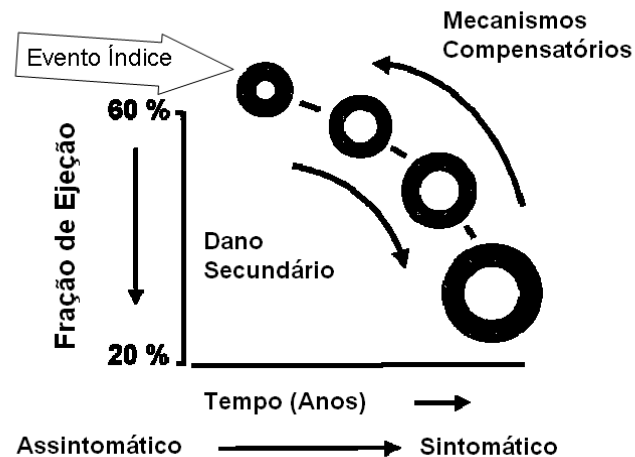


Figura 1. Patogênese da IC. Adaptado de Mann DL. *Mechanisms and Models in Heart Failure: A Combinatorial Approach*. *Circulation* 1999;100:999-1008.

O diagnóstico e adequada avaliação da IC baseiam-se principalmente na anamnese e exame físico, mas também em exames laboratoriais, de imagem cardíaca e testes funcionais⁵. Vários biomarcadores foram estudados na IC, mostrando valor diagnóstico e prognóstico. Algumas enzimas, hormônios, marcadores de estresse miocárdico, de disfunção e de injúria miocárdica são atualmente utilizados com este propósito. Entre os biomarcadores estudados estão os peptídeos natriuréticos e as troponinas, bastante em uso na prática clínica, além de proteína C reativa, norepinefrina, metaloproteinases de matriz, endotelina, entre outros^{8,9}. Recentemente, estudos têm identificado uma família de RNAs não-codificadores com funções regulatórias, conhecidos como microRNAs (miRNAs ou miRs), e têm avaliado o seu desempenho como biomarcadores na IC^{10,11}, como será discutido na seção 1.3.

1.2 Insuficiência Cardíaca e Obesidade

A obesidade, classificada por um índice de massa corporal (IMC, peso dividido por altura ao quadrado) maior ou igual a 30 kg/m^2 , é um problema de saúde pública que afeta mais de 33% dos adultos nos EUA. Este número ocasiona grande preocupação, uma vez que existe clara associação entre o excesso de adiposidade e consequências adversas à saúde¹². Uma análise de estudos prospectivos envolvendo 894 576 participantes, durante um tempo de seguimento médio de 8 anos, evidenciou que cada acréscimo de 5 kg/m^2 no IMC acima de 25 kg/m^2 foi associado a um aumento de 30% na mortalidade¹³.

O desenvolvimento e progressão da IC estão intimamente relacionados ao estado nutricional. Obesidade é fator de risco para doença cardiovascular e mortalidade na população, e IMC elevado se associa ao desenvolvimento de disfunção ventricular. Em uma análise do estudo de Framingham onde cerca de 6000 pacientes sem IC foram acompanhados por 14 anos, 8% deles desenvolveram a doença, e o risco foi duplicado nos pacientes obesos, com um aumento no risco de IC de 5% para homens e 7% para mulheres a cada incremento de 1 kg/m^2 no IMC¹⁴.

Entretanto, ao contrário da população em geral, os pacientes com miocardiopatia com valores de IMC mais elevados têm melhores taxas de sobrevivência em comparação aos pacientes eutróficos e desnutridos¹⁵⁻¹⁷. O estudo de Horwich et al.¹⁵ avaliou 1203 pacientes com IC avançada de múltiplas etiologias, e evidenciou que a obesidade conferiu um prognóstico mais favorável, resultado que foi confirmado em outro estudo prospectivo¹⁶ com 7599 pacientes com IC, demonstrando uma maior mortalidade em valores de IMC abaixo de 30 kg/m^2 , conforme demonstrado na Figura 2. Uma metanálise concluiu que o sobrepeso e a obesidade estavam associados a menores taxas de mortalidade em pacientes com IC e que não estavam associados a maior mortalidade em nenhum estudo avaliado¹⁷.

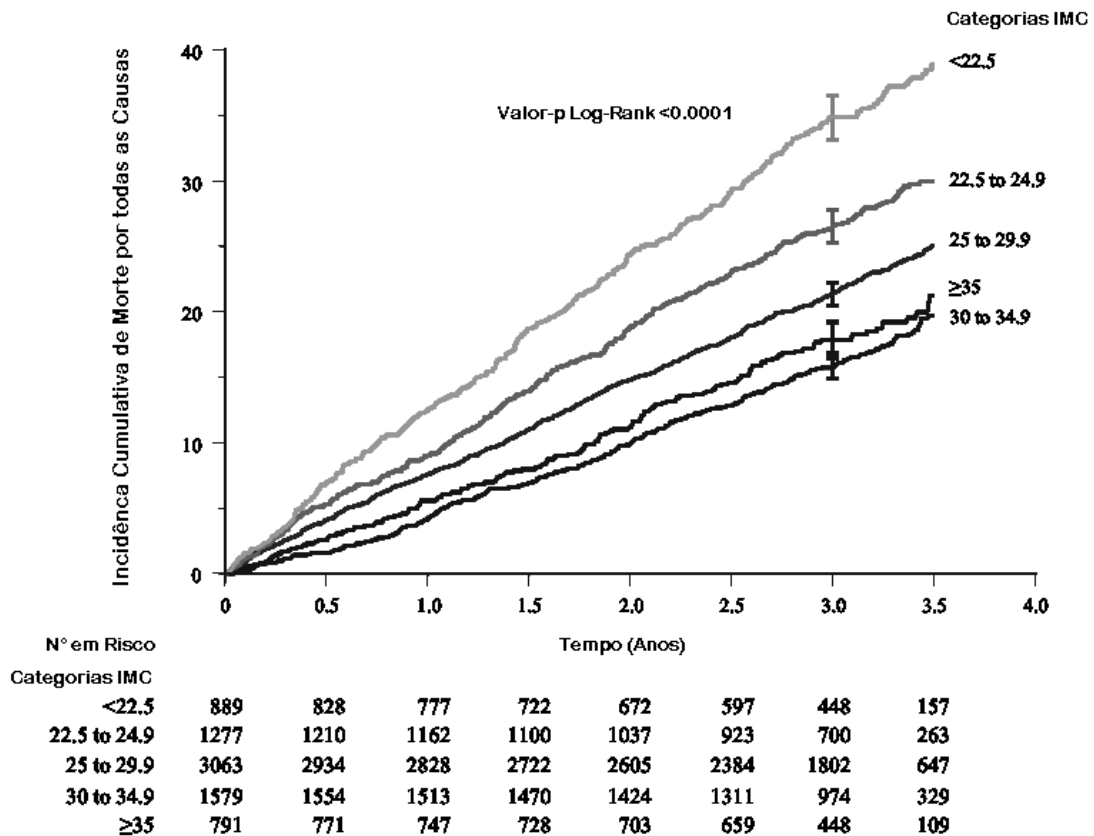


Figura 2: Curvas de incidência cumulativa para mortalidade de acordo com categorias de IMC da avaliação basal. Barras verticais indicam erro padrão das estimativas de incidência em 3 anos de seguimento. Adaptado de *Kenchaiah et al. Body mass index and prognosis in patients with chronic heart failure. Insights from the Candesartan in Heart failure: Assessment of Reduction in Mortality and morbidity (CHARM) Program. Circulation 2007;116:627-36.*

Os mecanismos para explicar este paradoxo da obesidade na IC ainda não estão claros na literatura e, até que sejam identificados, a causalidade não pode ser explicada de maneira satisfatória. Entre as hipóteses já levantadas, está o fato de os pacientes obesos serem mais jovens e mais sintomáticos, levando a uma busca mais precoce por atenção médica no decorrer do desenvolvimento da cardiopatia, além de possuírem maiores reservas energéticas que ajudam a compensar as alterações catabólicas que ocorrem na IC¹⁸. Na IC aguda, em um estudo multicêntrico com 6142 pacientes, o IMC permaneceu associado a uma menor mortalidade em 30 dias e em 1 ano, no entanto este paradoxo ocorreu apenas nos indivíduos idosos, com mais disfunção miocárdica, menos doença metabólica e com início de patologia mais recente¹⁹. Reavaliando o paradoxo IC-obesidade do ponto de vista das diferentes etiologias da miocardiopatia, o estudo de Zamora et al.²⁰,

avaliando prospectivamente pacientes com IC isquêmica e não-isquêmica, observou a relação paradoxal apenas nos pacientes com etiologia não-isquêmica. Recentemente, a capacidade funcional foi estudada como preditora de mortalidade em subgrupos de pacientes eutróficos e obesos com IC sistólica²¹. Uma capacidade funcional alta foi associada a uma maior sobrevida em ambos os grupos (eutróficos e obesos), e o parâmetro combinado do produto do IMC pela distância percorrida no teste de caminhada de 6 minutos foi o mais confiável preditor de mortalidade.

Ao discutirmos a relação entre a obesidade e a IC, é muito importante olharmos não apenas para os efeitos da obesidade sobre o sistema cardiovascular, mas para as alterações nutricionais decorrentes da presença da miocardiopatia. De fato, pacientes com IC costumam apresentar alguma alteração nutricional, seja obesidade ou desnutrição, e alterações de parâmetros antropométricos, bioquímicos ou imunológicos compatíveis com comprometimento nutricional moderado ou importante são freqüentes na insuficiência cardíaca em fase avançada²². A ativação neuro-hormonal e inflamatória vista na insuficiência cardíaca, como o aumento de TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6 e IL-8, resultam em catabolismo aumentado²³, podendo a desnutrição ser uma via final comum nestes pacientes. A caquexia cardíaca ainda não tem sua fisiopatologia completamente esclarecida, mas envolve fatores como diminuição da ingesta alimentar, anormalidades do trato gastrointestinal além das alterações neuro-hormonais já citadas, levando a alteração da relação entre processos anabólicos e catabólicos²⁴. Desta forma, embora obesidade seja fator de risco para IC, a presença de IC parece ser fator de risco para a desnutrição.

Outro mecanismo proposto para explicar o paradoxo IC-obesidade está na limitação do IMC para a classificação de obesidade, uma vez que não fornece informação discriminatória relativa à distribuição ou percentual de gordura corporal (GC) do indivíduo¹⁸. Em um estudo que avaliou a composição corporal na IC com o uso de absorciometria por dupla emissão de raios-X, o IMC levou a uma classificação inadequada do perfil de adiposidade em 41% dos pacientes²⁵. Levando em consideração este aspecto, vários estudos analisaram a relação entre obesidade e IC avaliando outros parâmetros nutricionais. Um estudo que avaliou antropometria, handgrip e avaliações laboratoriais (contagem de linfócitos, hemoglobina, albumina e colesterol), evidenciou que os pacientes com sobrepeso e obesidade eram mais

jovens e tinham melhores parâmetros nutricionais²⁶. O mesmo estudo evidenciou que a sobrevida dos pacientes com IC não foi relacionada a uma prega tricípital acima do percentil 95, porém este parâmetro foi um bom preditor de mortalidade em um estudo realizado pelo nosso grupo²⁷. Clark et al.²⁸ avaliaram a circunferência abdominal, um indicador antropométrico mais específico para adiposidade abdominal, além do IMC, e evidenciaram que os dois índices elevados estavam associados com melhor prognóstico em 344 pacientes com IC sistólica avançada. Um estudo que avaliou o percentual de gordura corporal, determinado pela técnica da prega cutânea, evidenciou em uma análise de regressão logística que o percentual de gordura foi um preditor independente de sobrevida livre de eventos na IC²⁹.

Entre os diferentes métodos para a avaliação da composição corporal, a análise de bioimpedância (BIA) é um método não-invasivo, de baixo custo, portátil e de fácil operação³⁰. O princípio da BIA baseia-se na condutância de uma corrente elétrica pelos fluidos corporais, já que a resistência através da gordura é maior do que através da massa magra, e é um método que demonstrou ser adequado para a avaliação da composição corporal em pacientes com IC³¹.

Quanto a mecanismos fisiopatogênicos envolvidos na obesidade, um componente importante é a infiltração de macrófagos no tecido adiposo em resposta a um aumento de ácidos graxos livres. Estes macrófagos desencadeiam sinais inflamatórios e respostas de estresse intracelulares, levando à resistência à insulina. Outras células que compõem o sistema imune como linfócitos e mastócitos também contribuem para a cascata inflamatória³². Entre os mecanismos que se contrapõem à inflamação na obesidade, está a ação dos receptores ativados por proliferador de peroxissomo-gama (PPAR γ). O PPAR γ é um membro da superfamília de receptores nucleares de fatores de transcrição dependentes de ligação, e é predominantemente expresso no tecido adiposo e intestino, e também altamente expresso em macrófagos. Os ativadores do PPAR inibem a ativação de genes de resposta inflamatória, e alguns dos genes alvos estão envolvidos na diferenciação de adipócitos, armazenamento lipídico, e metabolismo da glicose³³. Ativadores ou inibidores do PPAR γ podem influenciar uma importante rota fisiopatogênica da obesidade, como vem sendo demonstrado em estudos envolvendo microRNAs^{34,35}.

1.3 MicroRNAs e Insuficiência Cardíaca

MicroRNAs (miRNAs ou miRs) são pequenos RNAs endógenos, não-codificadores, contendo cerca de 22 nucleotídeos, que regulam a expressão de genes em nível pós-transcricional através do pareamento com específicos RNA mensageiros (RNAm), inibindo sua transcrição³⁶. Até o presente momento, já existe informação sobre mais de 25 000 miRNAs de 193 espécies, com cerca de 2 mil genes identificados em humanos³⁷.

Quanto à origem e ao mecanismo de ação, a biogênese dos miRNAs inicia no núcleo, a partir do DNA, com a formação de um transcrito primário, o pri-miRNA. Um precursor pre-miRNA é formado após a clivagem pela enzima Drosha, uma RNase do tipo III, é então transportado para o citoplasma, e pode ser posteriormente fragmentado em um miRNA maduro de fita dupla. Uma das fitas do miRNA maduro pode ser incorporada ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), onde pode guiar o RISC para específicos alvos no RNAm, inibindo a translação do RNAm em proteína. A outra hélice pode ser degradada ou liberada da célula através de mecanismos de exportação^{38,39} (Figura 3). No citoplasma, os pre-miRNAs também podem ser incorporados a pequenas vesículas chamadas de exossomas. Além disso, os pre-miRNA podem ser liberados por microvesículas, e também são encontrados na circulação em sua forma livre, associado a lipoproteínas de alta densidade (HDL) ou a proteínas ligadoras de miRNA como a argonauta-2 (Ago2)⁴⁰. Os microRNAs reconhecem os seus alvos por um pareamento imperfeito das bases da sua extremidade 5' com bases complementares na região 3' não-traduzida dos RNAm-alvos, inibindo a expressão gênica, e assim controlam diversos aspectos da estrutura e função cardíaca.

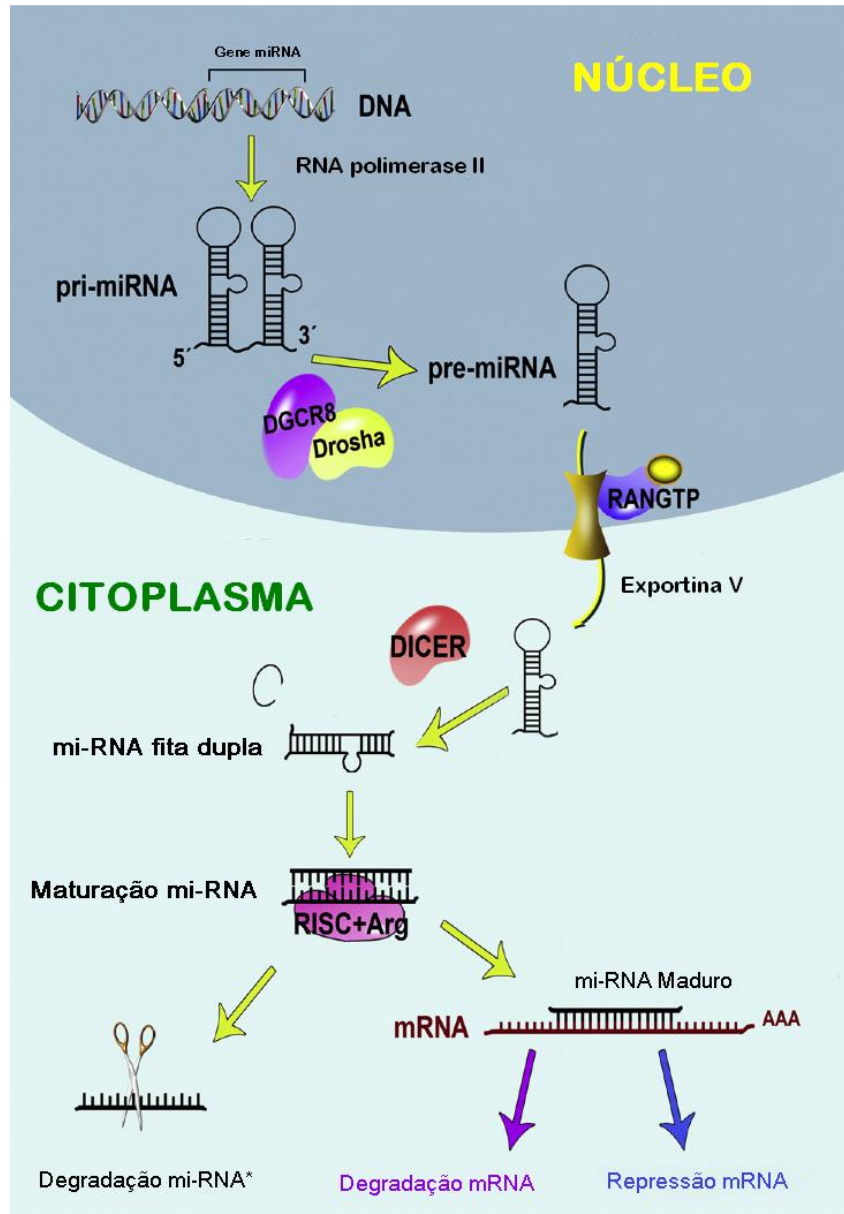


Figura 3. A biogênese de um miRNA inicia com a transcrição dos genes pela RNA polimerase II no núcleo como um transcrito primário, o pri-miRNA, contendo milhares de bases de comprimento. Esses pri-miRNAs são clivados pela endonuclease Drosha (RNase tipo III), transformando-se em micro-RNA preliminar (pre-miRNA). O pre-miRNA então, é transportado do núcleo para o citoplasma, onde é processado pela Dicer, outra enzima RNase III. O novo complexo formado de fita dupla é incorporado ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC) que inclui as proteínas argonautas. Durante este processo, uma hélice é selecionada como o miRNA maduro, enquanto a outra hélice é degradada. O miRNA maduro atua como um regulador negativo da expressão gênica por repressão translacional ou por degradação do RNAm. (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)

Nos últimos anos, os miRNAs tem sido implicados na fisiopatogenia de diversas condições, incluindo processos de envelhecimento celular, inflamação e doenças cardiovasculares⁴¹. A relação entre os miRNAs e a IC já foi evidenciada em diversos estudos. Thum et al.⁴² descobriram que o perfil de miRNA de corações humanos de pacientes com IC avançada difere significativamente do perfil de controles, porém apresenta semelhanças quando comparado a análises de tecido cardíaco fetal, sugerindo papel dos miRNAs na reativação de um programa gênico fetal no desenvolvimento da IC. Os miRNAs parecem exercer um papel importante na patogênese da IC, através de sua capacidade de regular a expressão de genes diretamente envolvidos no processo de remodelamento cardíaco³⁸, conforme esquematizado na Figura 4.

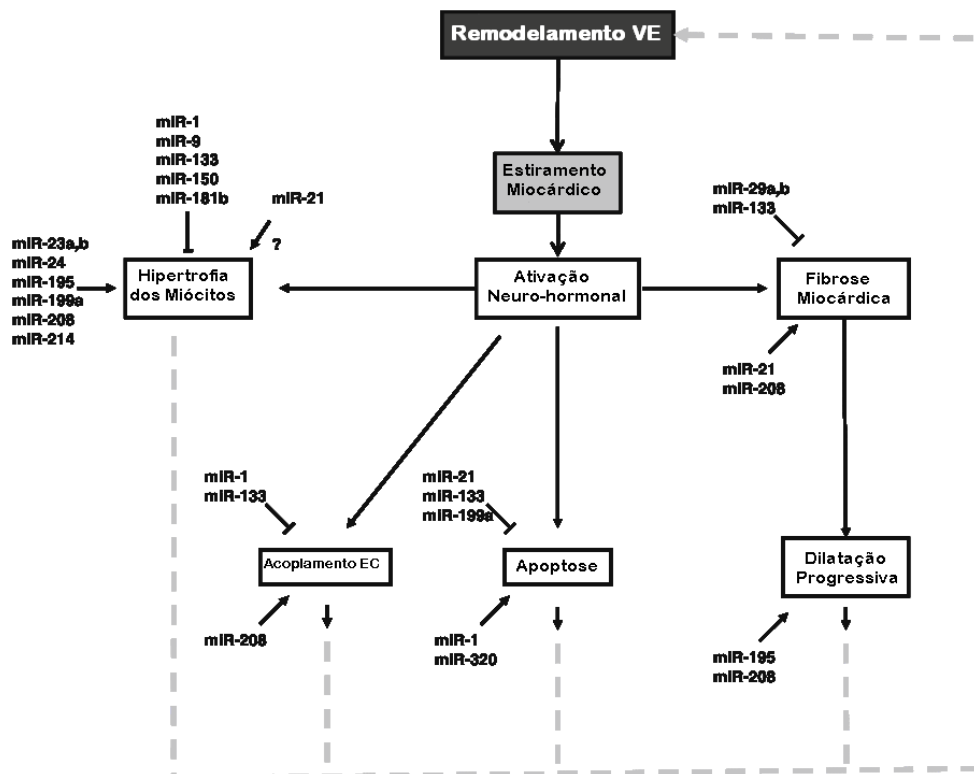


Figura 4: O papel de diferentes miRNAs no processo de remodelamento cardíaco. VE, ventrículo esquerdo. EC, excitação-contracção. (Adaptado de Topkara VK, Mann DL. *Role of MicroRNAs in Cardiac Remodeling and Heart Failure. Cardiovasc Drugs Ther* (2011) 25:171-182)

Estudos em animais demonstram envolvimento de miR-1 e miR-133, considerados miRs específicos do músculo, no processo de disfunção ventricular, evidenciando níveis elevados de expressão dos mesmos em miócitos na IC em comparação a controles⁴³. O miR-21, em especial, tem uma papel definido na hipertrofia cardíaca⁴⁴, na fibrose⁴⁵, resposta a isquemia/reperfusão⁴⁶ e estresse oxidativo⁴⁷. O miR-221 está relacionado ao processo de hipertrofia miocárdica, tendo uma expressão aumentada em animais submetidos a constrição aórtica e em pacientes com cardiomiopatia hipertrófica⁴⁸.

Além dos estudos em animais e amostras de tecidos miocárdicos, os miRNAs podem ser detectados no plasma e possuem alta estabilidade, pois são protegidos de degradação sendo armazenados em vesículas lipídica ou associando-se a complexos de proteínas ou lipoproteínas, entre os quais o HDL (lipoproteína de alta densidade)⁴⁰. Sendo assim, há um crescente número de estudos avaliando o seu papel como biomarcadores^{10,49-55}. Tijssen et al.¹⁰ identificaram 7 miRNAs plasmáticos elevados em pacientes com IC quando comparados a controles, entre os quais o miR-423-5p era o mais relacionado à doença em pacientes com dispnéia. Fukushima et al.⁴⁹ observaram que a concentração plasmática do miR-126 se correlacionou negativamente com a idade e classe funcional NYHA em pacientes com IC. Um estudo comparando 30 pacientes com IC crônica estável e 30 controles, encontrou diferença nos níveis séricos de miR 423-5p, -320a, -22 e -92b⁵⁰. Um estudo recentemente publicado pelo nosso grupo calculou os gradientes transcoronarianos de miR-29b, miR-133a e miR-423-5p em 17 pacientes com IC crônica estável e controles, observando um gradiente positivo de miR-423-5p em IC mas não em controles, o que sugere uma origem cardíaca para este miRNA, além de uma correlação positiva entre o gradiente transcoronariano de miR-423-5p e BNP (peptídeo natriurético tipo B)⁵¹. A tabela 1 resume alguns estudos sobre miRs circulantes em pacientes com IC.

Tabela 1: Estudos com MiRs circulantes relacionados à insuficiência cardíaca em humanos.

Amostra	População do estudo	MiRs com expressão aumentada	MiRs com expressão reduzida	Referência
Plasma	50 pacientes com dispneia (30 IC e 20 sem IC) 39 controles	423-5p, 18b, 129-5p, 1254, 675, HS_202.1, 622		Tyjsen, et al., 2010 ¹⁰
Plasma	33 IC aguda 34 controles	499		Corsten et al., 2010 ⁵²
Plasma	10 IC isquêmica, 17 controles	126		Fukushima et al., 2011 ⁴⁹
Soro	30 IC crônica 30 controles	423-5p, 320a, 22, 92b		Goren et al., 2012 ⁵⁰
Plasma	45 IC 39 controles	423-5p		Fan et al., 2013 ⁵³
Plasma	81 IC aguda 99 controles	133a, 423-5p, 21, 499-5p		Olivieri et al., 2013 ⁵⁴
Plasma	44 IC 15 controles		103, 142-3p, 30b, 342-3p	Ellis et al., 2013 ⁵⁵
Plasma	16 IC 10 controles	423-5p (gradiente transcoronariano)		Goldraich et al., 2014 ⁵¹

Além de potenciais biomarcadores com função diagnóstica e prognóstica, os miRNAs também são estudados como alvos terapêuticos. Terapias farmacológicas em estudo envolvem a inibição ou mimetização de determinados miRNAs⁵⁶. Em um estudo em ratos, a administração de miR-1 regrediu a hipertrofia cardíaca e teve um efeito favorável na prevenção do remodelamento ventricular, com redução de fibrose e inibição de apoptose⁵⁷. A inibição terapêutica do miR-208a através de antimiR-208a subcutâneo em ratos em um modelo de IC hipertensiva preveniu o remodelamento com melhora da função cardíaca e da mortalidade⁵⁸, aumentando ainda mais o interesse nas pesquisas sobre miRNAs.

1.4. MicroRNAs e Obesidade

MicroRNAs também estão envolvidos em processos patológicos relacionados à obesidade que ocorrem no tecido adiposo, tais como alterações do metabolismo dos ácidos graxos, hipertrofia celular, inflamação e resistência à insulina⁵⁹. Obesidade é mais comumente associada a um aumento da massa de gordura, como resultado da hipertrofia ou hiperplasia dos adipócitos, que estão ligados à inflamação crônica e associados a alterações no perfil de miRNA de tecidos afetados⁶⁰.

O miR-21, cujo importante papel na insuficiência cardíaca já foi discutido previamente, também foi estudado na obesidade. Estudos evidenciaram aumento da expressão do miR-21 durante a diferenciação adipogênica de células tronco mesenquimais⁶¹ e uma expressão elevada no tecido adiposo humano, além de uma correlação positiva com o IMC⁶². Lee et al. descobriram que o tecido adiposo de mulheres obesas continha significativamente menor expressão de miR-130 e maiores níveis de receptores ativados por proliferador de peroxissomo-gama (PPAR γ) do que o de mulheres não obesas, revelando que miR-130 reduz adipogênese reprimindo a biossíntese de PPAR γ ³⁴. De forma contrária aos resultados do miR-130, um estudo encontrou miR-221 com regulação positiva no

tecido adiposo subcutâneo humano, e os níveis de expressão de miR-221 tiveram uma correlação positiva com o IMC. Além disso, o mesmo estudo evidenciou um papel do miR-221 no metabolismo da gordura mimetizando a ativação do PPAR γ ³⁵.

O conhecimento da relação dos miRs com a obesidade vem avançando nos últimos anos, porém ainda são poucos os estudos que avaliaram níveis circulantes de miRs em humanos com obesidade⁶³⁻³⁷. Um estudo que avaliou 80 homens, entre os quais 19 obesos, 12 obesos mórbidos e 49 controles, evidenciou que miR-532-5p, -125b, -130b, -221, -15a, -423-5p e -520c-3p tinham menores níveis de expressão no plasma de obesos mórbidos quando comparados aos outros grupos, enquanto a expressão de miR-140-5p, -142-3p e -222 estava aumentada⁶³. Outro estudo avaliando miRs plasmáticos, porém em crianças, tem resultados divergentes como um aumento da expressão plasmática do miR-130b e -423-5p em obesos⁶⁴. A tabela 2 resume alguns estudos sobre miRs circulantes na obesidade.

Tabela 2: Estudos com miRs circulantes relacionados à obesidade em humanos.

Amostra	População do estudo	MiRs com expressão aumentada	MiRs com expressão reduzida	Referência
Sangue total	30 obesos 20 controles		17-5p, 132	Heneghan et al., 2011 ⁶⁶
Plasma	Homens: 19 obesos, 12 obesos mórbidos, 49 controles	140-5p, 142-3p, 222	532-5p, 125b, 130b, 221, 15a, 423-5p, 520c-3p	Ortega et al., 2013 ⁶³
Soro	20 obesos, 16 obesos e diabéticos, 20 controles	15b	138 e 376-a	Pescador et al., 2013 ⁶⁵
Soro	44 homens chineses (entre eutróficos, com sobrepeso e obesos)	130b		Wang et al., 2013 ⁶⁷
Plasma	Crianças: 40 obesas, 85 controles	486-5p, 486-3p, 142-3p, 130b, 423-5p	221, 28-3p	Prats-Puig et al., 2013 ⁶⁴

1.5 Insuficiência cardíaca, microRNAs e obesidade

O paradoxo de uma melhor sobrevida em pacientes obesos com IC já está bem documentado na literatura, mas ainda não está claro por quais mecanismos ele ocorre. Mesmo com diversos estudos abordando esta questão sob diferentes ângulos, como avaliação de parâmetros nutricionais, critérios para a classificação da obesidade e diferenças clínicas e demográficas entre os obesos e não obesos na IC, o paradoxo ainda não tem uma explicação consensual. A obesidade, apesar de ser prejudicial na população em geral, pode estar se contrapondo a mecanismos fisiopatogênicos deletérios no desenvolvimento da IC, como ativadores inflamatórios e regulação da expressão gênica.

Os microRNAs tem sido muito estudados na IC e, nos últimos anos, progressivamente estudados na obesidade. Como estão presentes em ambas as situações, influenciando processos importantes, seja moleculares/genéticos, seja metabólicos, eles poderiam ser um elo para esta relação paradoxal.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Roger VL. Epidemiology of Heart Failure. *Circ Res.* 2013;113:646-659.
- 2 Bocchi EA, Arias A, Verdejo H, Diez M, Gómez E, Castro P; Interamerican Society of Cardiology. The reality of heart failure in Latin America. *J Am Coll Cardiol.* 2013; 62(11):949-58.
- 3 Bocchi EA, Marcondes-Braga FG, Bacal F, Ferraz AS, Albuquerque D, Rodrigues D, et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Atualização da Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica – 2012. *Arq Bras cardiol.* 2012;98(1 supl.1):1-33.
- 4 Denolin H, Kuhn H, Krayenbuehl HP, Loogen F, Reale A. The definition of heart failure. *Eur Heart J.* 1983; 4(7):445-448.
- 5 Bonow RO, Mann DL, Zipes DP, Libby P. Braunwald's heart disease: a textbook of cardiovascular medicine. 9th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012.
- 6 McMurray JJV. Systolic Heart Failure. *N Engl J Med.* 2010; 362:228-38.
- 7 Mann DL. Mechanisms and Models in Heart Failure: A Combinatorial Approach. *Circulation.* 1999;100:999-1008.
- 8 Braunwald E. Biomarkers in Heart Failure. *N Engl J Med.* 2008;358:2148-59.
- 9 Chowdhury P, Kehl D, Choudhary R, Maisel A. The Use of Biomarkers in the Patient with heart Failure. *Curr Cardiol Rep.* 2013;15:372-385.
- 10 Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, De Windt LJ, Van Der Wal AC, Kok WE, Pinto YM. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. *Circ Res.* 2010;106:1035-1039.
- 11 Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM. Circulating microRNAs novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circ Res.* 2012;110:483-495.
- 12 Cornier M-A, Després J-P, Davis N, Grossniklaus DA, Klein S, Lamarche B, Lopez-Jimenez F, Rao G, St-Onge M-P, Towfighi A, Poirier P; on behalf of the American Heart Association Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity and Metabolism, Council on Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, Council on Cardiovascular Disease in the Young, Council on Cardiovascular Radiology and Intervention, Council on Cardiovascular Nursing, Council on Epidemiology and Prevention, Council on the Kidney in Cardiovascular Disease, and Stroke Council. Assessing adiposity: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation.* 2011;124:1996–2019.
- 13 Whitlock G, Lewington S, Sherliker P, Clarke R, Emberson J, Halsey J, Qizilbash N, Collins R, Peto R. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000

- adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet*. 2009;373:1083–1096.
- 14 Kenchaiah S, Evans JC, Levy D, Wilson PW, Benjamin EJ, Larson MG, Kannel WB, Vasan RS. Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med*. 2002;347(5):305-313.
 - 15 Horwich T, Fonarow GC, Hamilton MA, MacLellan WR, Woo MA, Tillisch JH. The relationship between obesity and mortality in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:789-95.
 - 16 Kenchaiah S, Pocock SJ, Wang D, Finn PV, Zornoff LA, Skali H, Pfeffer MA, Yusuf S, Swedberg K, Michelson EL, Granger CB, McMurray JV, Solomon SD. Body mass index and prognosis in patients with chronic heart failure. Insights from the Candesartan in Heart failure: Assessment of Reduction in Mortality and morbidity (CHARM) Program. *Circulation* 2007;116:627-36.
 - 17 Oreopoulos A, Padwal R, Kalantar-Zadeh K, Fonarow G, McAlister F. Body mass index and mortality in heart failure: a meta-analysis. *Am Heart J*. 2008;156(1):13-22.
 - 18 Chase PJ, Davis PG, Bensimhon DR. The Obesity Paradox in Chronic Heart Failure: What Does It Mean? *Curr Heart Fail Rep*. 2014; 11:111–117.
 - 19 Shah R, Gayat E, Januzzi Jr JL, Sato N, Cohen-Solal A, Salvatore diSomma M, Fairman E, Harjola V-P, Ishihara S, Lassus J, Maggioni A, Metra M, Mueller C, Mueller T, parenica J, Pascual-Figal D, Peacock F, Spinar J, van Kimmenade R, Mebazaa A. Body mass index and mortality in acutely decompensated heart failure across the world: A global obesity paradox. *J Am Coll Cardiol*. 2013, doi:10.1016/j.jacc.2013.09.072.
 - 20 Zamora E, Lupón J, de Antonio A, Urrutia A, Coll R, Díez C, Altimit S, Bayés-Genís A. The obesity paradox in heart failure: Is etiology a key factor? *Int J Cardiol* 2013; 166(3):601-5.
 - 21 Zafrir b, Salman N, Amir O. Joint Impact of Body Mass index and Physical capacity on Mortality in Patients With Systolic Heart Failure. *Am J Cardiol* 2014 Jan 15, pii:S0002-9149(14)00056-3. doi:10.1016/j.amjcard.2013.12.030.
 - 22 Veloso LG, de Oliveira Junior MT, Munhoz RT, Morgado PC, Ramires JAF, Barretto ACP. Repercussão nutricional na insuficiência cardíaca avançada e seu valor na avaliação prognóstica. *Arq Bras Cardiol* 2005; 84(6): 480-485.
 - 23 Berry C, Clark AL. Catabolism in chronic heart failure. *Eur Heart J* 2000; 21:521–532.
 - 24 Okoshi MP, Romeiro FG, Paiva SA, Okoshi K. Caquexia Associada à Insuficiência Cardíaca. *Arq Bras cardiol*. 2013; 100(5): 476-482.
 - 25 Oreopoulos A, Ezekowitz JA, McAlister FA, Kalantar-Zadeh K, Fonarow GC, Norris CM, et al. Association between direct measures of body composition and prognostic factors in chronic heart failure. *Mayo Clin Proc*. 2010;85(7):609–17.

- 26 Casas-Vara A, Santolaria F, Fernandez-Bereciartua A, Gonzalez-Reimers E, Garcia-Ochoa A, Martinez-Riera A. The obesity paradox in elderly patients with heart failure: Analysis of nutritional status. *Nutrition* 28 (2012):616-622.
- 27 Zuchinali P, Souza GC, Alves FD, d'Almeida KS, Goldraich LA, Clausell NO, Rohde LE. Triceps skinfold as a prognostic predictor in outpatient heart failure. *Arq Bras Cardiol* 2013. Nov;101(5):434-41.
- 28 Clark AL, Fonarow GC, Horwich TB. Waist circumference, body mass index, and survival in systolic heart failure: the obesity paradox revisited. *J Card Fail.* 2011;17(5):374–80.
- 29 Lavie CJ, Osman AF, Milani RV, Mehra MR. Body composition and prognosis in chronic systolic heart failure: the obesity paradox. *Am J Cardiol.* 2003;91(7):891–4.
- 30 Ricciardi R, Talbot LA. Use of bioelectrical impedance analysis in the evaluation, treatment, and prevention of overweight and obesity. *J Am Acad Nurse Pract.* 2007; 19(5):235-41.
- 31 Uszko-Lencer NH, Bothmer F, Van Pol E, Schols AM. Measuring body composition in chronic heart failure: a comparison of methods. *Eur J Heart Fail* 2006;8(2):208-14.
- 32 Patel PS, Buras ED, Balasubramanyam A. The Role of the Immune System in Obesity and Insulin Resistance. *J Obes.* 2013;2013:616193. doi:10.1155/2013/616193.
- 33 Oyekan A. PPARs and their Effects on the Cardiovascular System. *Clin Exp Hypertens.* 2011;33(5):287-93.
- 34 Lee EK, Lee MJ, Abdelmohsen K, Kim W, Kim MM, Srikantan S, Martindale JL, Hutchison ER, Kim HH, Marasa BS, Selimvan R, Egan JM, Smith SR, Fried SK, Gorospe M. miR-130 suppresses adipogenesis by inhibiting peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression. *Mol Cell Biol.* 2011 Feb;31(4):626-38.
- 35 Meerson A, Traurig M, Ossowski V, Fleming JM, Mullins M, Baier LJ. Human adipose microRNA-221 is upregulated in obesity and affects fat metabolism downstream of leptin and TNF α . *Diabetologia.*2013; 56:1971–1979
- 36 Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116:281-297.
- 37 Kumarswamy R, Thum T. Non-coding RNAs in cardiac remodeling and heart failure. *Circ Res.* 2013;113:676-689.
- 38 Topkara VK, Mann DL. Role of MicroRNAs in Cardiac Remodeling and Heart Failure. *Cardiovasc Drugs Ther* (2011) 25:171-182
- 39 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.

- 40 Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM. Circulating MicroRNAs: Novel Biomarkers and Extracellular Communicators in Cardiovascular Disease? *Circ Res.* 2012;110:483-495.
- 41 Schroen B, Heymans S. Small but smart—microRNAs in the centre of inflammatory processes during cardiovascular diseases, the metabolic syndrome, and ageing. *Cardiovasc Res* 2012; 93: 605–613.
- 42 Thum T, Galuppo P, Wolf C, et al. MicroRNAs in the human heart – a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation* 2007;116(3):258–267.
- 43 Belevych AE, Sansom SE, Terentyeva R, Ho Hsiang-Ting, Nishijima Y, Martin MM, Jindal HK, Rochira JA, Kunimoto Y, Abdellatif M, Carnes CA, Elton TS, Gyorke S, Terentyev D. microRNA-1 and-133 Increase Arrhythmogenesis in Heart Failure by Dissociating Phosphatase Activity from RyR2 Complex. *PLoS ONE* 6(12):e28324.doi:10.1371
- 44 Tatsuguchi M, Seok HY, Callis TE, et al. Expression of microRNAs is dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 2007;42(6):1137–1141.
- 45 Kumarswamy R, Volkmann I, Jazbutyte V, Dangwal S, Park DH, Thum T. Transforming growth factor- β -induced endothelial-to-mesenchymal transition is partly mediated by microRNA-21. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:361–369.
- 46 Roy S, Khanna S, Hussain SA, Biswas S, Azad A, Rink C, Gnyawali S, Shilo S, Nuovo GJ, Sen CK. MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue. *Cardiovasc res.* 2009; 82:21-29.
- 47 Cheng Y, Liu X, Zhang S, Lin Y, Yang J, Zhang C. MicroRNA-21 protects against the H₂O₂-induced injury on cardiac myocytes via its target gene PDCD4. *J Mol Cell Cardiol.* 2009 July; 47(1): 5–14.
- 48 Wang C, Wang S, Zhao P, Wang X, Wang J, Wang Y, Song L, Zou Y, Hui R. MiR-221 promotes cardiac hypertrophy in vitro through the modulation of p27 expression. *J Cell Biochem.* 2012 Jun;113(6):2040-6.
- 49 Fukushima Y, Nakanishi M, Nonogi H, Goto Y, Iwai N. Assessment of plasma miRNAs in congestive heart failure. *Circ J.* 2011;75:336-340.
- 50 Goren Y, Kushnir M, Zafrir B, Tabak S, Lewis BS, Amir O. Serum levels of microRNAs in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2012;14:147-154.
- 51 Goldraich LA, Martinelli NC, Matte U, Cohen C, Andrades M, Pimentel M, Biolo A, Clausell N, Rohde LE. Transcoronary gradient of plasma microRNA 423-5p in heart failure: evidence of altered myocardial expression. *Biomarkers.* 2014. Mar 19(2):135-41.
- 52 Corsten MF, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, Wagner DR, Staessen JA, Heymans S, Schroen B. Circulating micro-RNA-208b and

- MicroRNA-499 Reflect Myocardial Damage in Cardiovascular Disease. *Circ Cardiovasc Genet.* 2010;3:499-506.
- 53 Fan KL, Zhang HF, Shen J, Zhang Q, Li XL. Circulating microRNA levels in Chinese heart failure patients caused by dilated cardiomyopathy. *Indian Heart J.* 2013. Jan-Feb; 65(1):12-6.
- 54 Olivieri F, Antonicelli R, Lorenzi M, D'Alessandra Y, Lazzarini R, Santini G, Spazzafumo L, Lisa R, La Sala L, Galeazzi R, recchioni R, Testa R, Pompilio G, Capogrossi MC, Procopio AD. Diagnostic potential of circulating miR-499-5p in elderly patients with acute non-ST-elevation myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2013. 167:531-536.
- 55 Ellis KL, Cameron VA, Troughton RW, Frampton CM, Ellmers LJ, Richards AM. Circulating microRNAs as candidate markers to distinguish heart failure in breathless patients. *Eur J Heart fail.* 2013 Oct; 15(10):1138-47.
- 56 Oikonomou E, Siasos G, Tousoulis D, Kokkou E, Genimata V, Zisimos K, Latsios G, Stefanadis C. Diagnostic and therapeutic potentials of microRNAs in heart failure. *Curr Top Med Chem.* 2013;13:1548-1558.
- 57 Karakikes I, Chaanine AH, Kang S, Mukete BN, Jeong D, Zhang S, Hajjar RJ, Lebeche D. Therapeutic Cardiac-Targeted Delivery of miR-1 Reverses Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy and Attenuates Pathological Remodeling. *J Am Heart Assoc.* 2013;2:e000078
- 58 Montgomery RL, Hullinger TG, Semus HM, Dickinson BA, Seto AG, Lynch JM, Stack C, Latimer PA, Olson EN, van Rooij E. Therapeutic inhibition of miR-208a improves cardiac function and survival during heart failure. *Circulation.* 2011;124:1537–1547.
- 59 Alexander R, Lodish H, Sun L. MicroRNAs in adipogenesis and as therapeutic targets for obesity. *Expert Opin Ther Targets.* 2011 May ; 15(5): 623–636.
- 60 Williams MD, Mitchell GM. MicroRNAs in insulin resistance and obesity. *Exp Diabetes Res* 2012;;2012:484696. doi: 10.1155/2012/484696.
- 61 Kim YJ, Hwang SJ, Bae YC, Jung JS. MiR-21 Regulates Adipogenic Differentiation through the Modulation of TGF- β Signaling in Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Adipose Tissue. *Stem Cells* 2009;27:3093-3102.
- 62 Keller P, Gburcik V, Petrovic N, Gallagher IJ, Nedergaard J, Cannon B, Timmons JA. Gene-chip studies of adipogenesis-regulated microRNAs in mouse primary adipocytes and human obesity. *BMC Endocr Disord* 2011 Mar 22; 11:7
- 63 Ortega FJ, Mercader JM, Catalán, V, Moreno-Navarrete, JM, Pueyo, N, Sabater, M, Gómez-Ambrosi, J, Anglada, R, Fernández- Formoso, JA Ricart, W, Frühbeck, G, Fernández-Real, JM. Targeting the circulating microRNA signature of obesity. *Clin Chem.* 2013;59:781–92.
- 64 Prats-Puig A, Ortega F, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Moreno M, Bonet N, Ricart W, Lopez-Bermejo A, Fernandez-Real JM. Changes in circulating

microRNAs are associated with childhood obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* doi:10.1210/jc.2013-1496

- 65 Pescador N, Pérez-Barba M, Ibarra JM, Corbatón A, Martínez-Larrad MT. Serum Circulating microRNA Profiling for Identification of Potential Type 2 Diabetes and Obesity Biomarkers, *PLoS ONE* 2013; 8(10):e77251. doi:10.1371
- 66 Heneghan HM, Miller N, MacAnena OJ, O'Brien T, Kerin MJ. Differential miRNA Expression in Omental Adipose Tissue and in the Circulation of Obese Patients Identifies Novel Metabolic biomarkers. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011. 96:E846-E850.
- 67 Wang Y, Li Y, Wang X, Zhang D, Zhang H, Wu Q, He Y, Wang J, Zhang L, Xia H, Yan J, Li X, Ying H. Circulating miR-130b mediates metabolic crosstalk between fat and muscle in overweight/obesity. *Diabetologia.* 2013; 56:2275-2285.

3 JUSTIFICATIVA

Os dados da literatura sobre a relação entre obesidade (ou adiposidade) e insuficiência cardíaca são contraditórios e faltam explicações para a associação paradoxal de obesidade com melhor prognóstico em pacientes com insuficiência cardíaca. Ainda não é claro se, de alguma forma, a presença de obesidade pode de fato alterar a manifestação e/ou progressão da insuficiência cardíaca.

Diversos estudos, experimentais e em humanos, demonstraram que os microRNAs estão alterados na insuficiência cardíaca e têm atuação na regulação de genes diretamente relacionados com o processo de remodelamento cardíaco. Por outro lado, os microRNAs estão também relacionados à obesidade e suas consequências. Desta forma, alterações nos níveis de microRNAs poderiam estar envolvidos nesta associação e ajudar a explicar as influências da obesidade no prognóstico em pacientes com insuficiência cardíaca. Especificamente, as consequências da insuficiência cardíaca com relação a alterações na expressão de miRNAs específicos poderia ser influenciada pela presença da obesidade. Ou seja, se alterações nos níveis de microRNAs vistas na insuficiência cardíaca em sujeitos sem obesidade são atenuadas, abolidas ou até mesmo opostas naqueles pacientes com obesidade, então poderemos estar evoluindo e começando a estudar mecanismos que possam auxiliar no entendimento desta complexa e ainda paradoxal interação.

4 HIPÓTESE CONCEITUAL

A associação de insuficiência cardíaca e obesidade resulta em expressão diferencial de miRNAs quando comparada ao padrão de expressão visto na insuficiência cardíaca isoladamente.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Avaliar se a associação de IC e obesidade resulta em expressão diferencial de miRNAs quando comparada ao padrão de expressão visto na insuficiência cardíaca isoladamente.

5.2 Objetivos Específicos

1. Comparar a expressão de miRNAs selecionados (miR-130b, -221, -423-5p e -21) entre amostra pareada de sujeitos saudáveis e pacientes com insuficiência cardíaca obesos e não-obesos.
2. Comparar o valor da razão miR-221:miR-130b entre amostra pareada de sujeitos saudáveis e pacientes com insuficiência cardíaca obesos e não-obesos.
3. Correlacionar os níveis de expressão dos microRNAs selecionados e a razão miR-221:-130b com variáveis clínicas e parâmetros de adiposidade

6 ARTIGO ORIGINAL**Circulating MicroRNAs in Obese and Lean Heart Failure Patients**

Heart Failure and Cardiac Transplant Group,
Cardiovascular Experimental and Molecular Laboratory, Division of Cardiology,
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Post-Graduate Program of Cardiovascular Sciences: Cardiology
Federal University of Rio Grande do Sul
Porto Alegre, Brazil

Funding: Research Fund from Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE) and Brazilian Research Council (CNPq)

ABSTRACT

Background: The mechanisms underlying the paradoxical finding of a better survival in obese patients with heart failure remain unclear. MicroRNAs regulate processes involved in both cardiac remodeling and obesity and could therefore be involved in this complex interaction. We sought to investigate if the expression of selected microRNAs in patients with heart failure is influenced by the presence of obesity.

Methods: In this case-control study, we compared plasma levels of microRNAs - 130b, -221, -423-5p and -21 in 57 matched subjects: 40 heart failure patients (20 obese and 20 lean) and 17 lean healthy controls. A miR-221:-130b ratio was created because of contrasting effects on specific targets related to the PPAR γ system. MicroRNAs were measured by quantitative real-time polymerase chain reaction.

Results: All groups were matched for age and gender. Both heart failure groups had severe and similar systolic dysfunction, mild symptoms and were on standard heart failure therapy. Heart failure was associated to increased levels of miR-423-5p regardless of the presence of obesity (heart failure lean vs. controls, $p=0.003$; heart failure obese vs. controls $p=0.021$), without difference between obese and lean heart failure groups. On the other hand, only obese heart failure patients had changes in miR-130b (reduced levels as compared to both heart failure lean [$p=0.036$] and controls [$p=0.025$]) and in miR-221 (increased levels, non significant). Mir-21 levels were not different among the groups. Finally, ratio miR-221:130b values were also increased in obese heart failure patients, and were positively associated with body fat percent ($r=0.43$; $p=0.002$), weight ($r= 0.39$; $p= 0.006$), body mass index ($r=0.44$; $p=0.002$), and waist circumference ($r=0.4$; $p=0.02$).

Conclusions: In patients with heart failure, obesity seems to result in a differential expression of selected miRNAs. A ratiometric approach of miRNAs with opposite effects in the PPAR γ system unrevealed correlation with adiposity parameters. The validation of these findings and the study of consequences from this differential expression might bring new insights to the knowledge of the obesity paradox in heart failure.

Key-words: heart failure, obesity, adiposity, microRNA

INTRODUCTION

Heart failure is a major public health problem, and is associated with significant mortality, morbidity, and healthcare expenditures¹. Obesity, classified as a body mass index (BMI) $\geq 30 \text{ kg/m}^2$, is an epidemic affecting more than 30% of adults in the USA² and is concerning given the adverse health consequences, as a doubling of the risk of heart failure³ and increased overall mortality⁴. However, in patients with heart failure of multiple etiologies, overweight and obesity were associated with lower all-cause and cardiovascular mortality rates⁵⁻⁷, which has been termed the *obesity paradox*. The mechanisms underlying this finding have been difficult to ascertain.

MicroRNAs (miRs) are small non-coding endogenous RNAs, containing approximately 22 nucleotides, that regulate gene expression at the post-transcriptional level by inhibiting translation or promoting the degradation of target mRNA⁸. There are more than 25 000 miRs from 193 species⁹, and they were shown to be implicated in processes of cellular senescence, inflammation, and cardiovascular diseases¹⁰. MicroRNAs play an important role in modulating various aspects of the process of cardiac remodeling¹¹. Our group has demonstrated positive transcoronary miR-423-5p gradients in patients with heart failure but not in controls, suggesting that it has a cardiac origin¹². Other miRs, such as miR-21 and -221, have also been implicated in ventricular hypertrophy and heart failure^{13,14}.

Circulating microRNAs have also been recently studied in obesity¹⁵⁻¹⁷, and are involved in obesity-related processes such as disruption of fatty acid metabolism, cellular hypertrophy, inflammation and systemic insulin resistance¹⁸. Deregulation of miRs expression were observed in adipose tissue from obese, such as lower miR-130¹⁹ e increased miR-221²⁰, associated with opposite changes in activation of major regulators of adipogenesis by these miRs.

The effects of microRNAs in regulating key processes in remodeling and/or adipose tissue function might be related to the mechanisms underlying the obesity paradox in heart failure. Therefore, the present case-control study aimed at comparing levels of miR130-b, miR-221, miR-423-5p and miR-21 in blood samples from obese and lean patients with systolic heart failure and in healthy lean subjects

(control group). Additionally, considering opposite mechanisms of miR-221 e miR-130b in regulatory pathways of obesity, we aimed at comparing a ratio miR-221:miR-130b among the same groups and correlating with clinical and adiposity parameters.

METHODS

Patients and controls

Patients were recruited at the Heart Failure and Transplant Clinic of our institution. Subjects with stable heart failure, 18 to 80 year old and a left ventricular ejection fraction (LVEF) lower than 45% were included. Exclusion criteria for heart failure patients were as follows: (1) Episode of decompensation within the previous 30 days, (2) acute coronary syndrome within the previous three months and (3) presence of implantable devices such as pacemakers, implantable cardioverter defibrillators and cardiac resynchronization therapy-defibrillators (CRT-D), which were not eligible for bioelectrical impedance analysis.

For obese patients, the inclusion criteria were BMI (kg body weight/m² height) ≥ 30 kg/ m² and also the World Health Organization criteria for obesity based on percent body fat (> 25% in men and > 35% in woman)², as measured by bioelectrical impedance analyzer (Model 450, Tetrapolar, Biodynamics). Lean subjects were included if BMI < 25 kg/ m² and body fat $\leq 22\%$ in men and $\leq 32\%$ in women²¹.

Control subjects were selected from donors of the Blood Center of our institution and also selected at the Echocardiography Laboratory, from patients showing a normal exam. All controls had no history of structural cardiac disease or symptoms of heart failure, and 7/17 (41%) had Doppler echocardiography studies (all with normal LVEF). Exclusion criteria for both heart failure patients and controls included cell dyscrasias, active inflammation, malignant disease and severe hepatic or renal disease (creatinine > 3mg/dl).

Subjects were divided into three groups: (1) lean healthy controls, (2) lean with heart failure, and (3) obese with heart failure. All groups were matched for age and sex, and groups 2 and 3 were also matched for LVEF, heart failure etiology (ischemic

and non ischemic), New York Heart Association (NYHA) class, use of beta-blockers and of angiotensin-converter enzyme (ACE) inhibitor or angiotensin receptor blocker (ARB).

Data collection

Demographic data, clinical history, comorbidities, echocardiographic, electrocardiographic and laboratory data were collected. Body mass index was calculated as weight in kilograms divided by squared height in meters (kg/m^2). Bioimpedance analysis was performed with tetrapolar bioimpedance of Biodynamics, model 450. Waist circumference was measured by a trained examiner and determined on the lesser curvature located between the ribs and the iliac crest after the expiration of the patient.

Measurement of circulating miRNAs

Peripheral venous blood samples from all subjects were collected in EDTA-coated tubes. Blood samples were centrifuged for 15 min at 4°C and 1500 rpm within one hour from collection and stored in 600uL Eppendorf tubes at -80°C for posterior combined analysis.

Plasma samples were freeze-thawed and miR isolation was performed using the commercially available *miVana* PARIS miRNA Isolation Kit (Ambion, Austin, TX, USA) using 495 μL 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 procedures²². 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, -130b, -221 and -423-5p) 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 $\Delta\Delta CT$ method²³.

In brief, data from qRT-PCR were normalized to the reference control microRNA, cel-miR-39, using the ΔCT method. The relative expression levels for each individual microRNA were calculated using the following mathematical formula: $\Delta CT = CT_{\text{sample}} - CT_{\text{cel-miR-39}}$. The $\Delta\Delta CT$ for each miRNA is calculated using the formula: $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{sample}} - \Delta CT$ mean of control group. These values were transformed into quantities using the formula $2^{-\Delta\Delta CT}$ and are presented as fold-change relative to the internal control. 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).

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 our institution. Written informed consent was obtained from all patients prior to inclusion in the study.

Statistical analysis

Normally distributed continuous variables are expressed as the mean \pm standard deviation, while abnormally distributed variables are expressed as median and interquartile ranges. Categorical variables are reported as the absolute number and percentages. MicroRNA expression values are expressed as the mean \pm standard error, as fold change relative to controls (control values were set as 1). Plasma levels of microRNAs in the three matched groups were compared by the general linear model for repeated measures with Fisher's least significant difference (LSD) post hoc test. Differences between continuous variables across binary clinical categories were assessed using the Student *t*-test. The Chi-square test (or the exact

Fisher test, when appropriate) was used to compare categorical variables. Correlation between plasma levels of microRNAs and clinical, electrocardiographic, echocardiographic and laboratory variables were determined with the use of Pearson correlation analysis after normalization of non-Gaussian variables by log transformation. The sample size calculation was performed by using the PS Power and Sample Size Calculation (Version 3.0, 2009) program, assuming 80% power and alpha error of 5% to detect a two-fold difference with 1.5-fold standard deviation of the pattern of expression.

All statistical analyses were performed with the use of SPSS statistical package (version 18.0) for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL) and a two-tailed *P* value of $< .05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Clinical characteristics of studied patients and controls.

A total of 40 heart failure patients (20 obese and 20 lean) and 17 control subjects were enrolled in the study. Clinical and laboratory characteristics of patients and controls are shown in Table 1.

As expected, the three groups were matched for age and sex, and there were no significant differences for clinical variables except for race. According to group definitions, the expected differences in adiposity parameters were observed in the heart failure obese group. Both heart failure groups have severe systolic dysfunction and exhibited mild functional limitation, as 85% of the patients were on NYHA classes I and II. Most patients were under a standard therapeutic regimen with beta-blockers and angiotensin-converting enzyme inhibitors, and a significant proportion was also on diuretics and spironolactone. There were no significant differences in clinical variables between both heart failure groups, except for a higher proportion of hypertension in the obese group.

Table 1: Clinical and Demographic Characteristics of Subjects

Characteristic	Healthy controls (n=17)	Lean heart failure (n=20)	Obese heart failure (n=20)
Age – yr	52.1 ± 9.7	54.9 ±10.7	54.9 ±11.9
Male sex – no. (%)	12 (70.6)	13 (65)	13 (65)
White race – no. (%)	16 (94)	11 (55) ^a	14 (70)
Body weight – kg	71.3 ± 11.5	61.0 ± 10.2	103.9 ± 20.5 ^b
Body-mass index (Kg/m²)	24.7 ±2.6	21.8 ±2.1 ^a	37.3 ±5.1 ^b
Body fat, %	15.9 ± 5.4	15.7 ± 5.0	33.0 ± 5.5 ^b
Waist circumference (cm)		84.8 ± 8.8	118.7 ± 11.9 ^c
Echocardiography indices			
LVEF - %	67.2 ±3.3 ^d	29.8 ± 7.4	29.8 ± 8.2
LVEDD (mm)	49±3.9 ^d	65.3 ±9.1	65.9 ±4.6
LVESD (mm)	30.2 ±2.2 ^d	55.7 ±9.8	56 ±5.0
NYHA class (%)			
I or II		17 (85)	17 (85)
III		3 (15)	3 (15)
IV		0	0
Etiology – no. (%)			
Ischemic		6 (30)	5 (25)
Hypertensive		3 (15)	12 (60) ^c
Alcoholic		4 (20)	3 (15)
Other		8 (40)	5 (25)
Medical history (%)			
Hypertension		8 (40)	16 (80) ^e
Diabetes		6 (30)	8 (40)
Atrial fibrillation or flutter		4 (20)	8 (40)
Myocardial infarction		4 (20)	4 (20)
Medication (%)			
ACE inhibitor or ARB		19 (95)	19 (95)
Beta-blocker		16 (80)	16 (80)
Diuretic		14 (70)	17 (85)
MRA		7 (35)	14 (70)
Blood pressure – mmHg			
Systolic		120 (98.5–139.5)	135 (110 – 156)
Diastolic		70 (60 – 79,5)	80 (72 – 97.2) ^e
Heart rate – beats/min		80.5 ± 13.5	80.3 ± 14.6

Laboratory values

Creatinine – mg/dl	1.1 (0.8 – 1.2)	1.1 (0.9 – 1.4)
Hemoglobin – g/dl	13.8 ± 1.2	13.6 ± 1.6
Total cholesterol – mg/dl	160.2 ± 37.4	161.1 ± 32
LDL cholesterol – mg/dl	89.2 ± 32.2	92.6 ± 33.4
HDL cholesterol – mg/dl	41.2 ± 10.9	42.1 ± 10.2
Triglycerides – mg/dl	148.2 ± 70.5	140.7 ± 70
Albumin – g/dl	4.3 (3.8 – 4.5)	4.5 (4.2 – 4.6)

HF, Heart Failure. NYHA, New York Heart Association. LVEF, left ventricular ejection fraction. LVEDD, left ventricular end-diastolic diameter. LVESD, left ventricular end-systolic diameter. ACE, angiotensin-converting enzyme. ARB, angiotensin-receptor blocker. MRA, Mineralocorticoid-receptor antagonist. LDL, Low density lipoprotein. HDL, High density lipoprotein. ^ap<.05 in comparison with controls. ^bp<.001 in comparison with lean HF and with controls. ^cp<.001 in comparison with lean HF. ^dp<.001 in comparison with lean HF and with obese HF. ^ep<.05 in comparison with lean HF.

MicroRNA expression levels.

The expression of miR-130b, miR-221, miR-21, and miR-423-5p are depicted in Figure 1. Levels of miR-130b were not changed by the presence of heart failure (heart failure-lean similar to controls), but they were reduced in the presence of obesity, with levels of heart failure-obese group lower as compared to heart failure-lean ($p=0.036$), as well as compared to controls ($p=0.025$). Levels of miR-221 seemed higher only in the heart failure-obese group, but the difference was not significant. Regarding miR-423-5p, both heart failure groups had higher levels and compared to controls (heart failure-lean vs. controls, $p=0.003$, heart failure-obese vs. controls $p=0.021$) and there was no difference between obese and lean heart failure groups. Mir-21 levels were not different among the groups in the post-hoc analysis.

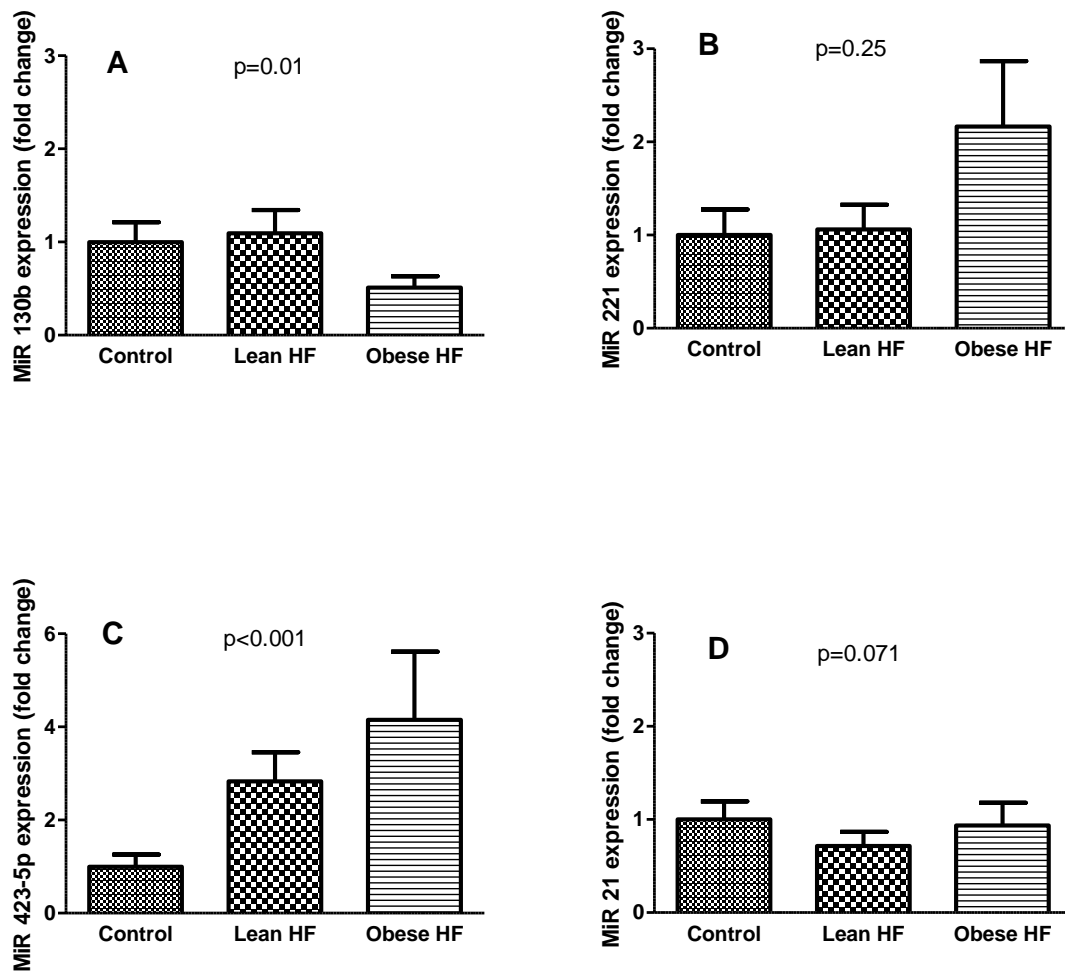


Figure 1. Plasma levels of, miR-130b (A), miR-221 (B), miR-423-5p (C) and miR-21 (D) in three groups – healthy controls, lean HF and obese HF patients. HF, heart failure. MicroRNA levels are shown as mean \pm standard error. *p* values were computed by the general linear model for repeated measures

miR-221:-130b ratio

Since we observed the opposite changes in miR-221 and miR-130b in the heart failure-obese group (higher values for miR-221 and lower values for miR-130b), and found contrasting effects of these miRs related to the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) system, we analysed the miR-221:miR-130b ratio. Figure 2 shows an almost 3-fold increase in this ratio in the heart failure-obese group, both compared to heart failure-lean ($p=0.06$) and to controls ($p=0.001$).

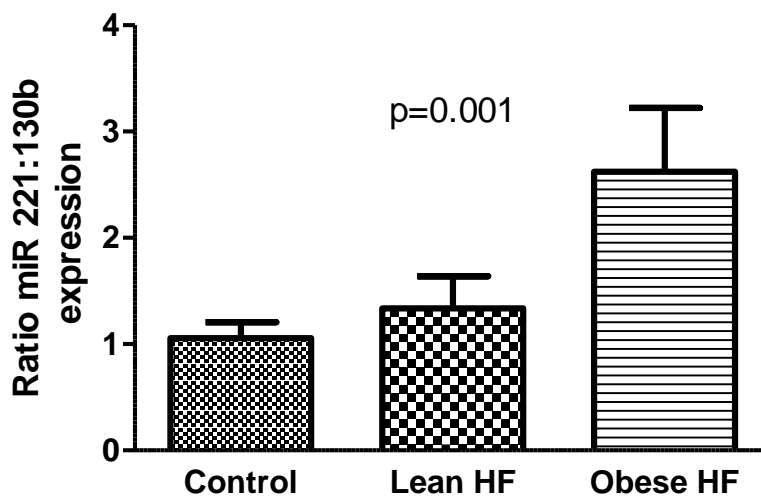


Figure 2. Plasma levels of ratio miR 221:130b in three groups – healthy controls, lean HF and obese HF patients. HF, heart failure. MicroRNA levels are shown as mean \pm standard error. p value were computed by the general linear model for repeated measures.

Correlation of microRNA levels and other clinical parameters.

Interestingly, miR-221:130b ratio levels were positively associated with percent body fat ($r=0.43$; $p=0.002$), weight ($r=0.39$; $p=0.006$), body mass index ($r=0.44$; $p=0.002$), and waist circumference ($r=0.4$; $p=0.02$) (Figure 3). Individual values of miR-130b inversely correlated with percent body fat ($r=-0.27$; $p=0.048$) and had no correlation to other obesity parameters. The other miR values had no correlation with obesity and/or adiposity parameters.

Expression levels of individual miRs as well as the miR-221:130b ratio did not correlate with heart failure parameters such as LVEF, left ventricular end-diastolic diameter (LVEDD) or functional class, except for miR-21 and NYHA class ($p=0.04$) ($p>0.1$ for all others).

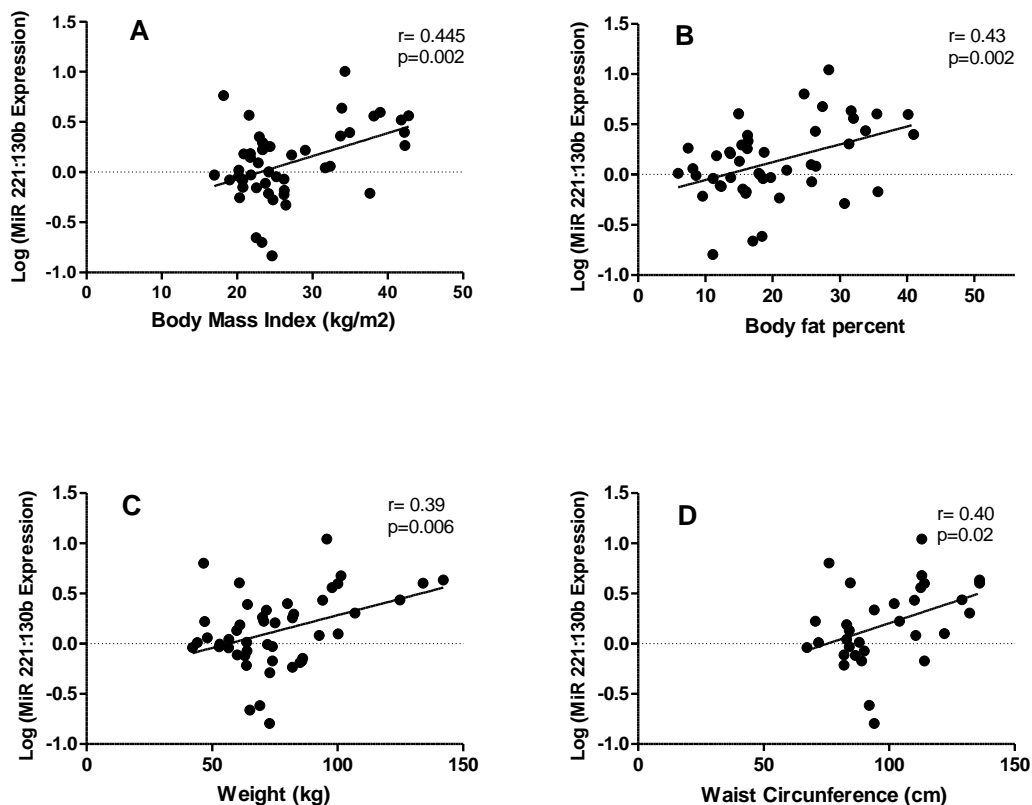


Figure 3. Correlation graphs of ratio miR221:130b (A,B,C,D) and adiposity parameters. r and p -values are shown from Pearson analyses.

DISCUSSION

The main finding of the present study is that the presence of obesity is associated to altered expression of miRs in patients with heart failure. Specifically, while heart failure-related miR-423-5p was increased in both lean and obese heart failure groups, miR-130b levels were not changed in lean-heart failure compared to controls, but reduced in the obese-heart failure group. Furthermore, a miR221-130b ratio was created and was not only increased in the heart failure obese patients but also correlated to obesity/adiposity parameters. The miR221-130b ratio, by combining miRs with opposite effects in the PPAR system, might reflect differential activation of this system in the presence of obesity in patients with heart failure.

The exact mechanisms underlying the obesity paradox have been difficult to ascertain. In one study, obese patients hospitalized for heart failure were younger and had better nutritional status than those with a normal or decreased BMI as shown by several nutritional parameters, and that could be one explanation²⁴. Obese patients may also have larger energy reserves that help to offset the catabolic changes seen with heart failure²⁵. Other possible explanation are limitations of BMI, that led to misclassification of body fat status in 41% of patients with heart failure in a study that directly measured body composition using dual energy x-ray absorptiometry²⁶. Clark et al. analyzed waist circumference (WC), an index of obesity more specific to abdominal adiposity, in patients with advanced heart failure, and showed that high WC, high BMI, and the combination of high WC/high BMI were each associated with improved outcomes²⁷. Other study evaluated percent body fat determined by the skinfold technique in 209 patients with chronic systolic heart failure, and higher percent body fat was the strongest independent predictor of event-free survival, with the multivariate analysis showing that every 1% absolute increase in percent body fat in the population was associated with a >13% reduction in major clinical events²⁸. Other assertive concerning the *obesity paradox* include the pattern of cytokine activation and hormonal changes which contribute to catabolism in chronic heart failure, as increased circulating TNF- α , IL-1, IL-2, IL6²⁹. Our study offers a different view of this paradox, focusing on differential expression of miRs.

The role of microRNAs in heart failure have been recently explored. Thum et

al. showed different miR expression in left ventricular tissue from patients with end-stage heart failure compared with healthy controls, but alterations in miR expression in heart failure were similar to that observed in fetal heart³⁰. Studies observed that miR-21 is involved in cardiac hypertrophy¹³, fibrosis³¹ and participates in H₂O₂-mediated gene regulation and functional modulation in cardiac myocytes³². MiR-221 has also been established as regulator in cardiac hypertrophy, it was up-regulated in both transverse aortic constricted mice and patients with hypertrophic cardiomyopathy¹⁴. MiRs are protected against degradation by being packaged in lipid vesicles or by being associated with protein or lipoprotein complexes³³, being stable in the circulation, and have been studied in serum or plasma as biomarkers in heart failure patients^{12,34-36}. Tijssen et al. identified 7 plasmatic miRs increased in heart failure as compared to controls, and miR-423-5p was the most correlated to the heart failure diagnosis in patients with dyspnea³⁴. In other study, our group showed, besides positive transc coronary gradient of miR-423-5p in heart failure patients, a positive correlation between miR-423-5p and BNP transc coronary gradients¹². In the present study, we found a higher expression of miR-423-5p levels in patients with heart failure, with no significant change in the presence of obesity, reinforcing the idea that miR is a marker of heart failure.

Obesity is most commonly associated with increased fat mass as a result of adipocyte hypertrophy or hyperplasia, which is linked to the chronic inflammation and is associated with changes to the miRNA profile of affected tissues³⁷. Mir-21 is up-regulated in human adipose tissue in obesity and positively correlated with BMI³⁸. Lee et al. found that adipose tissue from obese women contained significantly lower miR-130 and higher protein peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR γ) levels than that from nonobese women, and reveal that miR-130 reduces adipogenesis by repressing PPAR γ biosynthesis¹⁹. Oposite to results of miR-130, a study found miR-221 up-regulated in human subcutaneous adipose tissue, and the expression levels of miR-221 were positively correlated with BMI. In addition, miR-221 upregulated several proteins involved in fat metabolism, mimicking PPAR γ activation²⁰. PPAR γ is a member of the nuclear receptor superfamily of ligand-dependent transcription factors that is predominantly expressed in adipose tissue and the intestines, and function as regulator of glucose homeostasis³⁹. PPAR may influence the inflammatory response either by direct transcriptional downregulation of

proinflammatory genes via mechanisms involving transrepression, or indirectly via their transcriptional effects on lipid metabolism, and have demonstrated a role in counteracting obesity-induced inflammation in animal studies⁴⁰. Considering opposite mechanisms of miR-221 e miR-130b in regulatory pathways of obesity related with PPAR activation, we created a ratio miR-221:miR-130b, that was significantly increased in heart failure obese group as compared with both heart failure lean and control groups, and also correlated positively with BMI, percent body fat, weigh and waist circumference. Grouping of miRs to form ratios or scores are also seen in other studies, such as from Neely et al.⁴¹ and from Goren et al.³⁶, that defined a score from four different miRs to discriminate heart failure patients from control.

Comparing to other studies that evaluated plasmatic miRs in obese subjects, our results are different from Prats-Puig et al.¹⁶, that showed up-regulation of miR-486-5p, -486-3p, -142-3p, -130b, -423-5p and down-regulation of -221 and -28-3p in children obese versus non-obese. However, our result of lower expression of miR-130b in obese subjects was also found by Ortega et al.¹⁵, in a study with 19 obese, 12 morbidly obese and 49 lean men, in which miR-532-5p, -125b, -130b, -221, -15a, -423-5p, -520c-3p were down-regulated in morbidly obese when compared to other groups. MiR 423-5p was different between obese and non-obese in both studies cited above, also in opposite patterns (up-regulated in obese children in Prats-Puig and down regulated in obese adult in Ortega et al.), in our study there was no significant difference between obese and lean heart failure patients. These differences between studies might be due to different population (adults vs. children) or to small number of subjects.

In addition to potential role as biomarkers, microRNAs are potential therapeutic targets in gene therapy. Current therapeutic strategies aiming at modification of specific microRNAs levels have been tested in experimental heart failure models^{42,43}. PPAR γ , that is already a therapeutic target in diseases such as diabetes, may directly contribute to suppression of chronic inflammation accompanying obesity⁴⁰. Maybe the higher level of PPAR activation by a higher miR-221:miR-130b ratio in obese heart failure patients could explain their better prognosis and obesity paradox, an hypotheses that should be tested in further studies.

The strengths of our investigation include groups matched for age and LVEF,

avoiding basal differences that are appointed in studies about obesity paradox. Also, we classified obesity using BMI and percent body fat by bioimpedance analysis. Limitations of our study include a small number of patients, as well as small number of microRNAs analyzed. Groups were different in prevalence of hypertension, what may be a confusion bias. Other issue is the exclusion of patients with pacemakers or defibrillators, which are commonly used in the sickest patients with heart failure, since bioimpedance analysis was not recommended with these devices when this population were enrolled.

To our knowledge, this study provides the first evidence that circulating miRNAs are deregulated in obese patients with heart failure, and we hypothesize this deregulation might be contributing to the yet unexplained paradox of obesity in heart failure. Further studies are needed to validate this finding, and also to explore potential targets of the studied miRs that could be related to the explanations for the obesity paradox, hopefully resulting in new therapeutic approaches for different groups of heart failure patients.

REFERENCES

- 1 Roger VL. Epidemiology of Heart Failure. *Circ Res*. 2013;113:646-659.
- 2 Cornier M-A, Després J-P, Davis N, Grossniklaus DA, Klein S, Lamarche B, Lopez-Jimenez F, Rao G, St-Onge M-P, Towfighi A, Poirier P; on behalf of the American Heart Association Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity and Metabolism, Council on Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, Council on Cardiovascular Disease in the Young, Council on Cardiovascular Radiology and Intervention, Council on Cardiovascular Nursing, Council on Epidemiology and Prevention, Council on the Kidney in Cardiovascular Disease, and Stroke Council. Assessing adiposity: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2011;124:1996–2019.
- 3 Kenchaiah S, Evans JC, Levy D, Wilson PW, Benjamin EJ, Larson MG, Kannel WB, Vasan RS. Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med*. 2002;347(5):305-313.
- 4 Whitlock G, Lewington S, Sherliker P, Clarke R, Emberson J, Halsey J, Qizilbash N, Collins R, Peto R. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet*. 2009;373:1083–1096.
- 5 Horwich T, Fonarow GC, Hamilton MA, MacLellan WR, Woo MA, Tillisch JH. The relationship between obesity and mortality in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:789-95.
- 6 Kenchaiah S, Pocock SJ, Wang D, Finn PV, Zornoff LA, Skali H, Pfeffer MA, Yusuf S, Swedberg K, Michelson EL, Granger CB, McMurray JV, Solomon SD. Body mass index and prognosis in patients with chronic heart failure. Insights from the Candesartan in Heart failure: Assessment of Reduction in Mortality and morbidity (CHARM) Program. *Circulation* 2007;116:627-36.
- 7 Oreopoulos A, Padwal R, Kalantar-Zadeh K, Fonarow G, McAlister F. Body mass index and mortality in heart failure: a meta-analysis. *Am Heart J*. 2008;156(1):13-22.
- 8 Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116:281-297.
- 9 Kumarswamy R, Thum T. Non-coding RNAs in cardiac remodeling and heart failure. *Circ Res*. 2013;113:676-689.
- 10 Schroen B, Heymans S. Small but smart—microRNAs in the centre of inflammatory processes during cardiovascular diseases, the metabolic syndrome, and ageing. *Cardiovasc Res* 2012; 93: 605–613.

- 11 Topkara VK, Mann DL. Role of MicroRNAs in Cardiac Remodeling and Heart Failure. *Cardiovasc Drugs Ther* (2011) 25:171-182
- 12 Goldraich LA, Martinelli NC, Matte U, Cohen C, Andrades M, Pimentel M, Biolo A, Clausell N, Rohde LE. Transcoronary gradient of plasma microRNA 423-5p in heart failure: evidence of altered myocardial expression. *Biomarkers*. 2014. Mar 19(2):135-41.
- 13 Tatsuguchi M, Seok HY, Callis TE, et al. Expression of microRNAs is dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 2007;42(6):1137–1141.
- 14 Wang C, Wang S, Zhao P, Wang X, Wang J, Wang Y, Song L, Zou Y, Hui R. MiR-221 promotes cardiac hypertrophy in vitro through the modulation of p27 expression. *J Cell Biochem*. 2012 Jun;113(6):2040-6.
- 15 Ortega FJ, Mercader JM, Catalán, V, Moreno-Navarrete, JM, Pueyo, N, Sabater, M, Gómez-Ambrosi, J, Anglada, R, Fernández- Formoso, JA Ricart, W, Frühbeck, G, Fernández-Real, JM. Targeting the circulating microRNA signature of obesity. *Clin Chem*. 2013;59:781–92.
- 16 Prats-Puig A, Ortega F, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Moreno M, Bonet N, Ricart W, Lopez-Bermejo A, Fernandez-Real JM. Changes in circulating microRNAs are associated with childhood obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. doi:10.1210/jc.2013-1496
- 17 Pescador N, Pérez-Barba M, Ibarra JM, Corbatón A, Martínez-Larrad MT. Serum Circulating microRNA Profiling for Identification of Potential Type 2 Diabetes and Obesity Biomarkers, *PLoS ONE* 2013; 8(10):e77251. doi:10.1371
- 18 Alexander R, Lodish H, Sun L. MicroRNAs in adipogenesis and as therapeutic targets for obesity. *Expert Opin Ther Targets*. 2011 May ; 15(5): 623–636.
- 19 Lee EK, Lee MJ, Abdelmohsen K, Kim W, Kim MM, Srikantan S, Martindale JL, Hutchison ER, Kim HH, Marasa BS, Selimvan R, Egan JM, Smith SR, Fried SK, Gorospe M. miR-130 suppresses adipogenesis by inhibiting peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression. *Mol Cell Biol*. 2011 Feb;31(4):626-38.
- 20 Meerson A, Traurig M, Ossowski V, Fleming JM, Mullins M, Baier LJ. Human adipose microRNA-221 is upregulated in obesity and affects fat metabolism downstream of leptin and TNFα. *Diabetologia*.2013; 56:1971–1979
- 21 Pi-Sunyer FX. Obesity: criteria and classification. *Proc Nutr Soc* .2000; 59, 505–509.
- 22 Kroh, E. M., Parkin, R. K., Mitchell, P. S. & Tewari, M. Analysis Of Circulating MicroRNA Biomarkers In Plasma And Serum Using Quantitative Reverse Transcription-Pcr (Qrt-Pcr). *Methods*, 2010; 50, 298-301.

- 23 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 2001;25:402–8.
- 24 Casas-Vara A, Santolaria F, Fernandez-Bereciartua A, Gonzalez-Reimers E, Garcia-Ochoa A, Martinez-Riera A. The obesity paradox in elderly patients with heart failure: Analysis of nutritional status. *Nutrition* 28 (2012):616-622.
- 25 Chase PJ, Davis PG, Bensimhon DR. The Obesity Paradox in Chronic Heart Failure: What Does It Mean? *Curr Heart Fail Rep.* 2014; 11:111–117.
- 26 Oreopoulos A, Ezekowitz JA, McAlister FA, Kalantar-Zadeh K, Fonarow GC, Norris CM, et al. Association between direct measures of body composition and prognostic factors in chronic heart failure. *Mayo Clin Proc.* 2010;85(7):609–17.
- 27 Clark AL, Fonarow GC, Horwich TB. Waist circumference, body mass index, and survival in systolic heart failure: the obesity paradox revisited. *J Card Fail.* 2011;17(5):374–80.
- 28 Lavie CJ, Osman AF, Milani RV, Mehra MR. Body composition and prognosis in chronic systolic heart failure: the obesity paradox. *Am J Cardiol.* 2003;91(7):891–4.
- 29 Berry C, Clark AL. Catabolism in chronic heart failure. *Eur Heart J* 2000; 21:521–532.
- 30 Thum T, Galuppo P, Wolf C, et al. MicroRNAs in the human heart – a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation* 2007;116(3):258–267.
- 31 Kumarswamy R, Volkmann I, Jazbutyte V, Dangwal S, Park DH, Thum T. Transforming growth factor- β -induced endothelial-to-mesenchymal transition is partly mediated by microRNA-21. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:361–369.
- 32 Cheng Y, Liu X, Zhang S, Lin Y, Yang J, Zhang C. MicroRNA-21 protects against the H₂O₂-induced injury on cardiac myocytes via its target gene PDCD4. *J Mol Cell Cardiol.* 2009 July; 47(1): 5–14.
- 33 Creemers EE, Tijssen AJ, Pinto YM. Circulating microRNAs novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circ Res.* 2012;110:483-495.
- 34 Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD, De Windt LJ, Van Der Wal AC, Kok WE, Pinto YM. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. *Circ Res.* 2010;106:1035-1039.
- 35 Fukushima Y, Nakanishi M, Nonogi H, Goto Y, Iwai N. Assessment of plasma miRNAs in congestive heart failure. *Circ J.* 2011;75:336-340.
- 36 Goren Y, Kushnir M, Zafrir B, Tabak S, Lewis BS, Amir O. Serum levels of microRNAs in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2012;14:147-154.

- 37 Williams MD, Mitchell GM. MicroRNAs in insulin resistance and obesity. *Exp Diabetes Res* 2012;;2012:484696. doi: 10.1155/2012/484696.
- 38 Keller P, Gburcik V, Petrovic N, Gallagher IJ, Nedergaard J, Cannon B, Timmons JA. Gene-chip studies of adipogenesis-regulated microRNAs in mouse primary adipocytes and human obesity. *BMC Endocr Disord* 2011 Mar 22; 11:7
- 39 Patel PS, Buras ED, Balasubramanyam A. The Role of the Immune System in Obesity and Insulin Resistance. *J Obes.* 2013;2013:616193. doi:10.1155/2013/616193.
- 40 Oyekan A. PPARs and their Effects on the Cardiovascular System. *Clin Exp Hypertens.* 2011;33(5):287-93.
- 41 Neely LA, Rieger-Christ KM, Silva Neto B, Eroshkin A, Garver J, Patel S, Phung NA, McLaughlin S, Libertino JA, Whitney D, Summerhayes IC. A microRNA expression ratio defining the invasive phenotype in bladder tumors. *Urol Oncol.* 2008; 28:39-48.
- 42 Oikonomou E, Siasos G, Tousoulis D, Kokkou E, Genimata V, Zisimos K, Latsios G, Stefanadis C. Diagnostic and therapeutic potentials of microRNAs in heart failure. *Curr Top Med Chem.* 2013;13:1548-1558.
- 43 Montgomery RL, Hullinger TG, Semus HM, Dickinson BA, Seto AG, Lynch JM, Stack C, Latimer PA, Olson EN, van Rooij E. Therapeutic inhibition of miR-208a improves cardiac function and survival during heart failure. *Circulation.* 2011;124:1537–1547.

APÊNDICE 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – Pacientes

Prezado(a) Sr(a):

Nosso estudo tem por objetivo avaliar um painel de pequenos RNAs que são materiais genéticos e a partir de técnicas de biologia molecular identificar os principais pequenos RNAs que podem estar envolvidos no desenvolvimento de uma doença do coração chamada de insuficiência cardíaca. Como o(a) Sr(a) tem insuficiência cardíaca, gostaríamos que o(a) Sr(a) participasse. Caso aceite, realizaremos uma coleta de uma amostra de sangue da sua veia (10 mL) junto com informações do seu prontuário, como idade, sexo, cor, causa da insuficiência cardíaca, sintomas da sua doença, resultado do exame de RX de tórax, exame de imagem do coração (ecocardiografia) e dosagens como creatinina e glicemia (glicose no sangue), medicamentos utilizados e outras doenças. Os riscos para o(a) Sr(a) são relacionados à coleta de sangue do braço, que pode ocasionar desconforto, dor, possibilidade de hematoma, infecção e desmaio. Se o Sr(a) concordar, sua amostra de sangue será processada e esses pequenos RNAs serão extraídos do plasma e dosados para avaliar sua importância em sua doença. Os resultados desse estudo futuramente auxiliarão no melhor entendimento do desenvolvimento e progressão da sua doença para obter melhoras no tratamento; no entanto, os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos para o(a) Sr(a).

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

Eu _____, fui informado(a) dos objetivos e da justificativa da pesquisa de forma clara e detalhada, bem como do procedimento de coleta de sangue o qual serei submetido e das determinações de expressão dos níveis dos microRNAs que serão realizadas. Foi garantido todo o direito de resposta, caso haja dúvidas ou esclarecimentos relacionados à pesquisa e da segurança da confiabilidade dos dados obtidos.

Os pesquisadores responsáveis por este projeto são a Prof^a Dra. Andréia Biolo e a pesquisadora Dra. Juliana Gil Thomé (telefone para contato com os pesquisadores:

33598844 ou 82091344). Endereço: Laboratório de Pesquisa Cardiovascular - Centro de Pesquisa Experimental do HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2.350, 2º andar.

Este projeto foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta instituição, telefone para contato 33597640.

Paciente _____

Nome

Assinatura

Pesquisador _____

Nome

Assinatura

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

Nome: _____

Grau de parentesco: _____

____/____/____

Assinatura do responsável legal do paciente

Data

____/____/____

Assinatura do pesquisador

Data

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - Controles

Prezado(a) Sr(a):

Nosso estudo tem por objetivo avaliar um painel de pequenos RNAs que são materiais genéticos e a partir de técnicas de biologia molecular identificar os principais pequenos RNAs que podem estar envolvidos no desenvolvimento de uma doença do coração chamada de insuficiência cardíaca. Para sabermos quais os principais pequenos RNAs envolvidos na insuficiência cardíaca precisamos conhecer sua frequência em pessoas saudáveis para compararmos com os pacientes. Para participar desta pesquisa, realizaremos perguntas para avaliarmos se o(a) Sr(a) é saudável do ponto de vista cardiovascular e, em caso positivo, o convidaremos para participar do nosso estudo como grupo controle, para os seus dados serem comparados aos de pacientes com insuficiência cardíaca. Caso aceite, realizaremos uma coleta de uma amostra de sangue venoso (10 mL) junto com as informações da sua ficha de doação, como idade, sexo, cor e resultados dos exames realizados no Banco de sangue. Os riscos para o(a) Sr(a) são relacionados à coleta de sangue do braço, que pode ocasionar desconforto, dor, possibilidade de hematoma, infecção e desmaio. Se o Sr(a) concordar, sua amostra de sangue será processada e esses pequenos RNAs serão extraídos do plasma e terão a possibilidade de ser enviados ao exterior para que seja feita a análise do painel de pequenos RNAs. Também realizaremos um ecocardiograma (ecografia do coração), exame sem realização de anestesia e que não provoca dor ou ocasiona riscos. Os resultados desse estudo futuramente auxiliarão no melhor entendimento do desenvolvimento e progressão de pacientes com insuficiência cardíaca para obter melhoras no tratamento; no entanto, os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos para o(a) Sr(a).

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

Eu _____, fui informado(a) dos objetivos e da justificativa da pesquisa de forma clara e detalhada, bem como do procedimento de coleta de sangue o qual serei submetido e das determinações dos níveis de expressão de microRNAs que serão realizadas. Foi garantido todo o direito de resposta caso haja dúvidas ou esclarecimentos relacionados à pesquisa e da segurança da confiabilidade dos dados obtidos.

Os pesquisadores responsáveis por este projeto são a Dra. Andréia Biolo e Dra. Juliana Gil Thomé (telefone para contato com os pesquisadores: 33598844 ou 82091344). Endereço: Laboratório de Pesquisa Cardiovascular- Centro de Pesquisas do HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2.350, 2º andar.

Este projeto foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta instituição, telefone para contato 33597640.

Paciente _____
Nome Assinatura

Pesquisador _____
Nome Assinatura

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

Nome:

Grau de parentesco:

_____/_____/_____
Assinatura do responsável legal do paciente Data

_____/_____/_____
Assinatura do Pesquisador Data

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