

## **Avaliação da Expressão Sérica de miR-146b em Pacientes Hipertensos com Doença Renal Crônica**

**Palavras-Chave:** Hipertensão Arterial Sistêmica, Doença Renal Crônica, MicroRNAs.

**Autores(as):**

**Larissa Volpini Cardoso (PUC-Campinas), Eduarda O.Z. Minin (FCM/UNICAMP), Elisângela C.P. Lopes (FCM/UNICAMP), Layde R. Paim (FCM/UNICAMP), Luís F.R.S. Carvalho-Romano (FCM/UNICAMP), Edmilson R. Marques (FCM/UNICAMP), Camila F.L. Vegian (FCM/UNICAMP), José A. Pio-Magalhães (FCM/UNICAMP), Lício A. Velloso (FCM/UNICAMP), Andrei C. Sposito (FCM/UNICAMP), Otavio R. Coelho-Filho (FCM/UNICAMP), Wilson Nadruz (FCM/UNICAMP), Roberto Schreiber (FCM/UNICAMP)**

**Prof. Dr. Roberto Schreiber (orientador), FCM - UNICAMP**

---

### **INTRODUÇÃO:**

A hipertensão arterial (HA) é mundialmente reconhecida como um problema de saúde pública, por sua prevalência e incidência na população (1). Além de ser isoladamente prevalente, a HA é também fator de risco primário para o desenvolvimento de outras doenças cardiovasculares, sendo importante destacar sua capacidade de promover lesões de órgãos-alvo, tais como: hipertrofia do ventrículo esquerdo, doença renal crônica (DRC), acidente vascular cerebral e retinopatia (2). MicroRNAs são um grupo de pequenas moléculas (22 nucleotídeos) de RNA não codificantes, evolutivamente conservados, que pareiam com sequências do RNA mensageiro de genes-alvo, causando repressão da transcrição para a síntese proteica (3). Diversos estudos sugerem que a expressão aberrante de miRNAs pode estar envolvida no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, contudo pouco se sabe sobre o papel da expressão de miRNAs no desenvolvimento de doença renal crônica em hipertensos (4,5,6). Neste contexto, o estudo da expressão sérica de miRNAs pode resultar na descoberta de potenciais biomarcadores para o desenvolvimento de doença renal crônica em pacientes hipertensos. Resultados preliminares de nosso grupo, avaliando 42 pacientes hipertensos, por meio da plataforma de TaqMan OpenArray, demonstraram a expressão diferencial de pelo menos 12 miRNAs, entre eles o miR-146b, entre indivíduos com doença renal crônica e sem a doença. Contudo a relação deste miRNA com a taxa de filtração glomerular em uma amostra maior de pacientes hipertensos, permanece desconhecida.

### **OBJETIVOS**

O presente estudo teve como objetivo validar, por meio de PCR em tempo Real (qRT-PCR), os dados de expressão sérica de miR-146b do estudo piloto em uma amostra maior de pacientes hipertensos, e correlacionar estes resultados com a taxa de filtração glomerular (TGFe) em pacientes hipertensos.

## METODOLOGIA:

No presente estudo, foram incluídos pacientes com hipertensão arterial sistêmica acompanhados em ambulatórios do Hospital de Clínicas da UNICAMP. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética (CAAE:56841616.5.0000.5404) e todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Foram avaliadas diversas características clínicas, incluindo: idade, sexo, peso, altura, índice de massa corpórea, superfície corpórea, pressão arterial e frequência cardíaca, tempo de HA e de DRC, uso de medicações, diabetes mellitus, tabagismo, presença de doença cardiovascular clinicamente manifesta ou diagnosticada e história familiar de doenças cardiovasculares. Todos os pacientes com suspeita de DRC passam por um protocolo diagnóstico sistemático. Amostras sanguíneas foram obtidas após jejum de 12 horas para análise de exames complementares. A equação Cockcroft & Gault (7) foi usada para estimar a TFG, por conter em sua equação dados de creatinina, idade, sexo e peso do paciente. Os pacientes foram classificados como sem DRC com TFGe  $\geq 60$  mL/min/m<sup>2</sup> e com DRC os participantes com TFGe  $< 60$  mL/min/m<sup>2</sup>.

A extração de miRNA em soro, foi realizada com o Kit miRNeasy Serum/Plasma (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. A análise de expressão sérica de miR-146b foi realizada por qRT-PCR no equipamento QuantiStudio 3 (ThermoFisher). A quantificação relativa dos miRNAs foi calculada pelo método de Ct comparativo ( $\Delta\Delta Ct$ ), onde “Ct” do inglês threshold cycle (8) é o ponto inicial da fase exponencial que se correlaciona com a quantidade de cDNA, e utilizando-se o miR-24 e o miR-92a como controles endógenos (9). Os resultados foram expressos em Fc (Fold change).

As comparações entre os grupos estudados foram feitas por teste t, Mann-Whitney ou Chi-quadrado, de acordo com o tipo de variável. Foram realizadas correlações entre variáveis paramétricas com o método de Pearson. Para se avaliar os efeitos de variáveis confundidoras, foram realizadas análises de regressão linear. Todas as análises foram realizadas por meio do aplicativo SPSS 15.0 (SPSS Incorporation, Chicago, IL, USA). As diferenças e as correlações foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

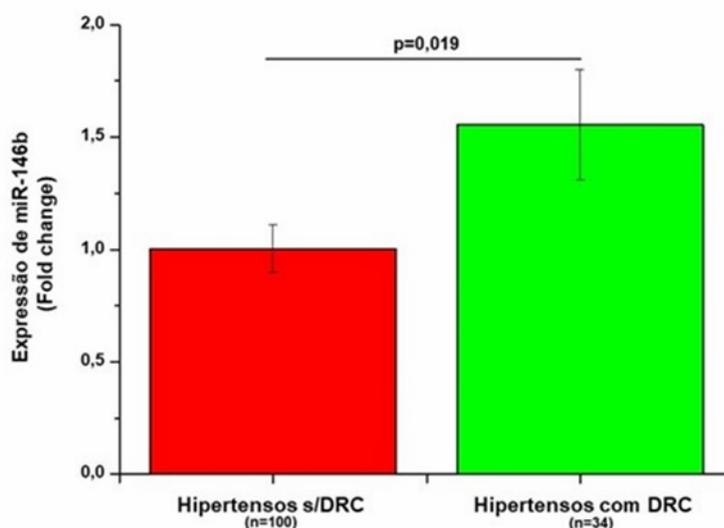
## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

No presente estudo, foram avaliados, 134 pacientes hipertensos, sendo 100 hipertensos sem Doença Renal crônica (S/DRC) e 34 pacientes hipertensos com DRC. A **tabela 1** apresenta os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes envolvidos. A **figura 1** apresenta os resultados da expressão sérica na validação do miR-146b em pacientes com DRC comparados aos pacientes hipertensos sem DRC, onde observamos um aumento na expressão sérica do miR-146b (Fc=1,55,  $p= 0,019$ ). A **figura 2** apresenta a expressão de miR-146b estratificado de acordo com a TFGe nos pacientes estudados e observamos um aumento na expressão do miR-146b de acordo com a redução na TFGe, o que foi confirmado na análise de correlação de Person ( $r= -0,188$ ;  $p=0,029$ ) entre a expressão sérica do miR-146b e a TFGe (Cockcroft & Gault) nos pacientes envolvidos no estudo (**Figura 3**). Esta correlação permaneceu significativa mesmo após o ajuste para variáveis como: PAS, DM, tabagismo e uso de medicamentos anti-hipertensivos ou estatinas (**Tabela 2**). A análise de regressão univariada apresentou associação entre a DRC e a expressão sérica de miR-146b (**Tabela 2**). Estes resultados não foram corrigidos por sexo ou idade, pois estes parâmetros entram na estimativa da TFGe.

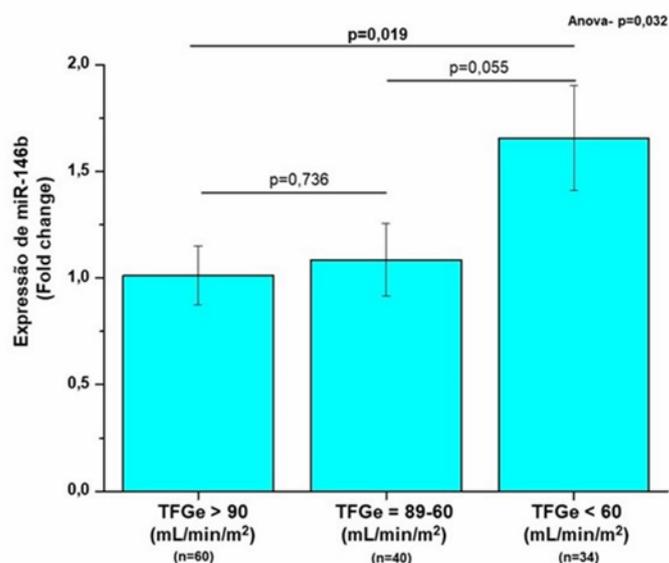
**Tabela 1-** Características clínicas e laboratoriais dos participantes envolvidos.

Variables	S/DRC (n=100)	DRC (n=34)	p
<i>Clinical</i>			
Age, years	57.4 ± 10.1	68.1 ± 8.8	<b>&lt;0.001</b>
Male sex, %	55 (55)	22 (65)	0.322
Systolic blood pressure, mmHg	151.9 ± 25.4	150.2 ± 28.1	0.739
Diastolic blood pressure, mmHg	86.1 ± 14.5	78.3 ± 15.3	<b>0.009</b>
Body mass index, kg/m <sup>2</sup>	30.9 ± 5.1	26.1 ± 4.9	<b>&lt;0.001</b>
Diabetes mellitus, %	45 (45)	18 (53)	0.422
Current smoking, %	9 (9)	2 (6)	0.567
Diuretics, %	67 (67)	28 (82)	0.088
ACEI or ARB, %	84 (84)	28 (82)	0.822
Beta-blocker, %	62 (62)	22 (65)	0.778
Calcium-channel blocker, %	66 (66)	17 (50)	0.096
Statin, %	71 (71)	26 (76)	0.537
Glucose, mg/dL	101 [88, 117]	95 [85, 105]	0.124
Triglycerides, mg/dL	144 [100, 183]	108 [79, 208]	0.082
HDL-cholesterol, mg/dL	45.3 ± 12.1	46.6 ± 14.7	0.624
LDL-cholesterol, mg/dL	97.5 ± 31.9	87.3 ± 33.3	0.114
Creatinine, mg/dL	0.87 [0.71, 1.02]	1.17 [1.01, 1.66]	<b>&lt;0.001</b>
TFGe	103.6 ± 31.5	45.6 ± 11.8	<b>&lt;0.001</b>

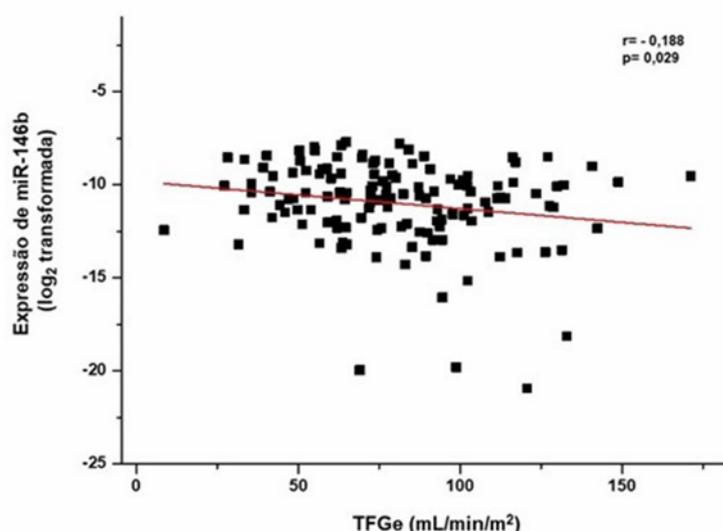
TFGe-taxa de filtração glomerular estimada; ACEI- Inibidores da enzima conversora de angiotensina; ARB- Bloqueadores do receptor da angiotensina II.



**Figura 1-** Expressão sérica de miR-146b em pacientes hipertensos com TFGe alterada (DRC < 60 mL/min/m<sup>2</sup>) comparados com os TFGe normal (s/DRC- ≥ 60 mL/min/m<sup>2</sup>).



**Figura-2-** Expressão sérica de miR-146b (expressos em fold change) em pacientes hipertensos estratificado de acordo com a TFGe.



**Figura-3-** Análise de correlação de Person entre a expressão sérica do miR-146b e a TFGe nos pacientes envolvidos no estudo.

**Tabela 2-** Análise de regressão linear e logística em pacientes hipertensos.

	Linear				Logística	
	TFGe				DRC	
	Univariada		Multivariada		Univariada	
	r	p	Beta ± EP	p	R <sup>2</sup>	p
miR-146b	-0,189	<b>0,029</b>	-3,303 ±1,651	<b>0,048</b>	0,762	<b>0,044</b>

## CONCLUSÕES:

No presente estudo, confirmamos os resultados obtidos no estudo piloto e observamos um aumento na expressão sérica de miR-146b em pacientes com DRC, além de uma correlação inversa entre a TFGe e a expressão sérica deste miRNA em uma amostra de hipertensos brasileiros. Esses dados

sugerem que o miR-146b pode estar envolvido no processo de injúria renal associado à hipertensão arterial e podem ser potenciais biomarcadores desta doença em pacientes hipertensos.

No entanto, conforme mencionado nos resultados, apenas 134 amostras foram utilizadas até o momento e as demais 66 não apresentaram resultados confiáveis ou não apresentaram expressão mensurável e desta forma serão repetidas. Portanto estes resultados devem ser analisados com cautela até que todos os dados estejam disponíveis.

## AGRADECIMENTOS

Suporte financeiro da FAPESP, FAEPEX e CAPES.

## BIBLIOGRAFIA

1-VI Brazilian Guidelines on Hypertension. *Arq Bras Cardiol* 2010; 95: 1-51.

2-Bryan Williams. The year in hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Dec 29;55(1):65-73. doi: 10.1016/j.jacc.2009.08.037.

3- Stephanie Ceman, Julie Saugstad, MicroRNAs: Meta-controllers of gene expression in synaptic activity emerge as genetic and diagnostic markers of human disease. *Pharmacol Ther*. 2011 Apr;130(1):26-37. doi: 10.1016/j.pharmthera.2011.01.004.

4- Guo-Kun Wang 1, Jia-Qi Zhu, Jun-Tao Zhang, Qing Li, Yue Li, Jia He, Yong-Wen Qin, Qing Jing. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J*. 2010 Mar;31(6):659-66. doi: 10.1093/eurheartj/ehq013.

5- Stephan Fichtlscherer, Salvatore De Rosa, Henrik Fox, Thomas Schwietz, Ariane Fischer, Christoph Liebetrau, Michael Weber, Christian W Hamm, Tino Röxe, Marga Müller-Ardogan, Angelika Bonauer, Andreas M Zeiher, Stefanie Dimmeler. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res*. 2010 Sep 3;107(5):677-84. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.215566.

6- Temo Barwari, Abhishek Joshi, Manuel Mayr. MicroRNAs in Cardiovascular Disease. *J Am Coll Cardiol*. 2016 Dec 13;68(23):2577-2584. doi: 10.1016/j.jacc.2016.09.945.

7- D W Cockcroft, M H Gault. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron*. 1976;16(1):31-41. doi: 10.1159/000180580

8- K J Livak, T D Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.

9- Axel Muendlein, Kathrin Geiger, Andreas Leiberer, Christoph H Saely, Peter Fraunberger, Heinz Drexel. Evaluation of the associations between circulating microRNAs and kidney function in coronary angiography patients. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2020 Feb 1;318(2):F315-F321. doi: 10.1152/ajprenal.00429.2019.