



EXPRESSÃO DE MICRORNAS E RELAÇÃO COM A CAMADA MÉDIA CAROTÍDEA EM PACIENTES HIPERTENSOS

Palavras-Chave: Hipertensão arterial sistêmica; microRNAs, remodelamento arterial; ultrassonografia.

Autores(as):

Nathan N. Gonçalves (FCA/UNICAMP), Eduarda. O.Z. Minin (FCM/UNICAMP), Larissa Volpini Cardoso, Luís F.R.S. Carvalho-Romano, Roberto Schreiber (FCM/UNICAMP), Wilson Nadruz (FCM/UNICAMP), Prof. José Roberto Matos-Souza, FCM – UNICAMP, Prof. Wilson Nadruz Júnior (orientador), FCM - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) é fator de risco primário para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, sendo importante destacar sua capacidade de promover aterosclerose. A mensuração ultrassonográfica da espessura da camada íntima-média carotídea (EIMc) tem sido utilizada como uma ferramenta na monitorização da aterosclerose (1), entretanto essa medida é incapaz de discriminar entre o espessamento da parede causado por hipertrofia da média carotídea ou por uma doença aterosclerótica adequadamente definida (3). A partir disso, um estudo recente de nosso grupo (4), identificou uma forte associação entre a espessura da camada média carotídea (EMc) e EIMc, mas uma falta de relação significativa entre a espessura da íntima carotídea (Eic) com EIMc, sugerindo que aumentos em EIMc podem ser bons marcadores de hipertrofia da túnica média, mas não necessariamente de aterosclerose *per se*. A hipertensão pode levar à hipertrofia da parede arterial, especialmente por estimular aumentos da EMc. Além disto, estudos anteriores mostraram que a função diastólica do ventrículo esquerdo apresenta uma associação inversa mais robusta com a EMc do que com a Eic e a EIMc em hipertensos, indicando que o aumento na EMc também possa ser um marcador de lesões de órgãos-alvo extra-vasculares nesta população.

De maneira geral, o estudo da expressão sérica de miRNAs pode resultar na descoberta de potenciais biomarcadores para o desenvolvimento e progressão de lesão de órgão-alvo em pacientes hipertensos. Dados preliminares de nosso grupo sugerem que diversos miRNAs podem estar envolvidos na EMc em uma amostra de pacientes hipertensos brasileiros, contudo, estes dados precisam ser confirmados em uma amostra maior de pacientes para validar estes resultados.

Com isso, o objetivo principal do projeto foi validar os resultados do estudo anterior em uma amostra maior de pacientes hipertensos, aferindo os níveis de expressão sérica dos miRNAs diferencialmente expressos e correlacioná-los com a espessura da subcamada média carotídea.

METODOLOGIA:

Inicialmente, foi realizada a coleta de sangue periférico dos pacientes utilizando sistema vacutainer em tubos contendo EDTA como anticoagulante. Em seguida, o tubo foi centrifugado por 10 min a 5000 rpm em temperatura ambiente. O soro foi alíquotado e estocado a -80°C até a análise. A extração de miRNA em soro, foi realizada com o Kit miRNeasy Serum/Plasma (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante.

Após essa etapa, a análise de expressão plasmática de miRNAs foi realizada por PCR em Tempo Real quantitativo (qRT-PCR), procedidas no equipamento QuantiStudio3 (Applied Biosystems® - ThermoFisher), em triplicata. A síntese de cDNA necessária para os experimentos de PCR em tempo real foi realizada utilizando-se o TaqMan™ miRNA cDNA Synthesis Kit, sendo utilizados os ensaios otimizados e validados pela mesma fornecedora. Os miRNAs estudados foram: miR-192, miR-212; miR-324-5p; miR-642; miR-139-5p e miR-338-5p. A média geométrica da expressão de miR-222 e miR-16 foi utilizado como controle endógeno (6), uma vez que refletem os valores utilizados no estudo piloto por Openarray que utilizou a normalização global. A quantificação relativa dos miRNAs foi calculada pelo método de Ct comparativo ($\Delta\Delta\text{Ct}$), e utilizando-se a média geométrica do controle endógeno. Os resultados são expressos em fold change (Fc).

Imagens de alta resolução das artérias carótidas comuns (CCA) esquerda e direita 2 cm proximal à bifurcação carotídea de cada participante foram obtidas conforme relatado anteriormente (4) por um médico qualificado (L.F.R.S.C-R) usando um dispositivo Vivid q (General Electric, Milwaukee, Wisconsin, EUA) equipado com um transdutor linear (12L-RS; 6-13 MHz) ajustado em 10 MHz. As configurações de ganho foram otimizadas com o objetivo de produzir uma distinção clara entre as camadas íntima e média. Para cada imagem, cinco medições de cIMT, cMT e cIT foram realizadas manualmente em áreas livres de placas usando o software ImageJ (NIH, Maryland, EUA) e a média das medições de CCA esquerda e direita foi usada para calcular a espessura de cada camada (4,7). Para cIT, cMT e cIMT, as variabilidades intraobservador médias foram de 2,4%, 1,9% e 1,2%, enquanto as variabilidades interobservador médias foram de 2,7%, 4,8% e 3,5%, quando considerada a análise de 20 imagens de 10 pacientes, conforme descrito anteriormente (8).

As análises estatísticas foram realizadas usando o software SPSS (SPSS 16.0). Variáveis são apresentadas como média \pm desvio padrão (DP) e mediana [percentis 25, 75], e suas diferenças entre os dois grupos foram avaliadas por teste t de Student não pareado e teste U de Mann Whitney, respectivamente. Teste qui-quadrado foi usado para comparar variáveis categóricas. A correlação entre a EMc e a expressão de miRNAs foi avaliada pelo método de Pearson. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Foram coletadas amostras biológicas de 200 indivíduos hipertensos acompanhados no Ambulatório de Hipertensão Arterial do Hospital de Clínicas da UNICAMP, entretanto, até o momento a expressão sérica dos miRNAs somente foi avaliada em 123 pacientes. A **tabela 1** apresenta as características clínicas, laboratoriais e ultrassonográficas dos pacientes analisados até o momento.

Tabela 1- Características clínicas, laboratoriais e carotídeas dos pacientes envolvidos

Variáveis	Grupo 1	Grupo 2	Valor p
	(média carotídea <0.452)	(média carotídea ≥ 0.452)	
	n=58	65	

Clínicas			
Idade (anos)	56.34 ± 11.39	63.46 ± 9.92	<0.0001
Homens (%)	27 (47%)	28 (43%)	0.698
Pressão sistólica (mmHg)	148.49 ± 25.26	154.17 ± 23.05	0.198
Pressão diastólica (mmHg)	85.10 ± 15.92	85.14 ± 15.81	0.990
IMC (kg/m ²)	30.66 ± 5.89	28.93 ± 4.80	0.076
Fumo (%)	5 (8.6%)	2 (3.7%)	0.185
Diabetes mellitus (%)	28 (48.3%)	27 (41.5%)	0.453
Doença arterial coronariana (%)	7 (12.1%)	16 (24.6%)	0.074
Infartos prévios (%)	7 (12.1%)	12 (18.5%)	0.327
Diuréticos (%)	42 (72.4%)	43 (66.2%)	0.453
ACEI or ARB, %	45 (77.6%)	57 (87.7%)	0.137
Beta-bloqueadores (%)	38 (65.5%)	39 (60.0%)	0.527
Bloqueadores de canal de Ca (%)	36 (62.1%)	37 (56.9%)	0.561
Estatinas (%)	40 (69.0%)	46 (70.8%)	0.827
Glicemia (mg/dL)	101 [91,140]	99 [88,111]	0.373
Triglicerídeos (mg/dL)	135 [89,177]	129 [99,168]	0.898
HDL-C (mg/dL)	44.96 ± 12.46	45.55 ± 14.05	0.810
LDL-C (mg/dL)	89.31 ± 29.39	91.90 ± 32.90	0.652
Creatinina (mg/dL)	0.90 [0.70,1.12]	0.98 [0.79,1.17]	0.133
EIMc (mm)	0.64 ± 0.08	0.84 ± 0.11	<0.0001
EMc	0.39 ± 0.04	0.55 ± 0.09	<0.0001
Elc	0.25 ± 0.05	0.29 ± 0.06	<0.0001

Até o momento, dois miRNAs apresentaram aumentos estatisticamente significantes de expressão sérica nos indivíduos com alta EMc ($\geq 0,452$ mm) quando comparados aos pacientes com EMc menor que a mediana ($< 0,452$ mm), conforme apresentado na **figura 1 (A e B)**: miR-139-5p (Fold change=4,2; $p<0,001$) e miR-192 (FC=2,7; $p< 0,001$), enquanto o miR-338-5p apresentou redução na expressão sérica (FC=0,8; $p= 0,045$), conforme demonstrado na **figura 1C**.

A análise de correlação da coorte de validação, mostrou uma correlação positiva entre a EMc e a expressão dos miR-192 ($r= 0,260$; $p=0,012$), miR-212 ($r= 0,315$; $p=0,017$), miR-338 ($r= 0,245$; $p=0,016$) e miR-139 ($r= 0,211$; $p=0,045$), mas apenas os miR-192 e miR-338 permaneceram significantes após ajuste por sexo e idade (**Tabela 2**)

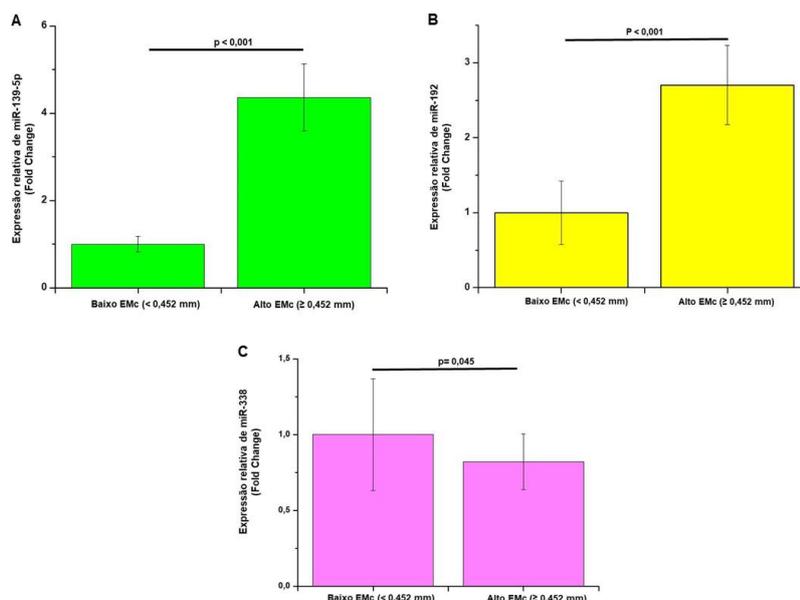


Figura 1- Análise de expressão diferencial (expresso em Fold change) de miR-139-5p (A), miR-192 (B) e miR-338-5p (C) obtidos no soro de pacientes hipertensos com alta EMc ($\geq 0,452$ mm) comparados com pacientes hipertensos com baixa EMc ($< 0,452$ mm). O valor de p do teste independente de Mann–Whitney é apresentado.

Tabela 2 – Análise de correlação multivariada entre EMc e expressão sérica de miRNAs

	Espessura da Camada Média Carotídea	
	Multivariada	
	Beta \pm EP	p
miR-192	0,008 \pm 0,004	0,042
miR-212	0,009 \pm 0,005	0,073
miR-139	0,007 \pm 0,004	0,089
miR-338-5p	0,009 \pm 0,004	0,039

CONCLUSÕES:

A expressão aumentada de miR-139-5p, miR-192 e reduzida do miR-338-5p está associada com maior EMc, em uma amostra de hipertensos brasileiros. No entanto, apenas os miR-192 e miR-338 permaneceram significantes após ajuste por sexo e idade, sugerindo que esses miRNAs podem estar envolvidos no processo de remodelamento vascular associado à hipertensão arterial e podem ser potenciais biomarcadores deste processo em pacientes hipertensos.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Joke M Dijk, Yolanda van der Graaf, Michiel L Bots, Diederick E Grobbee, Ale Algra. Carotid intima-media thickness and the risk of new vascular events in patients with manifest atherosclerotic disease: the SMART study. Eur Heart J. 2006 Aug;27(16):1971-8. doi: 10.1093/eurheartj/ehl136.

- 2- Sven Bos, Martijne H C Duvekot, Gert-Jan R Ten Kate, Adrie J M Verhoeven, Monique T Mulder, Arend F L Schinkel, Koen Nieman, Gerald F Watts, Eric J G Sijbrands, Jeanine E Roeters van Lennep. Carotid artery plaques and intima medial thickness in familial hypercholesterolaemic patients on long-term statin therapy: A case control study. *Atherosclerosis*. 2017 Jan; 256:62-66. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.12.005.
- 3- M J Roman, P S Saba, R Pini, M Spitzer, T G Pickering, S Rosen, M H Alderman, R B Devereux. Parallel cardiac and vascular adaptation in hypertension. *Circulation*. 1992 Dec;86(6):1909-18. doi: 10.1161/01.cir.86.6.1909.
- 4- Amanda V Sardeli, Arthur F Gáspari, Guilherme de Rossi, Giovana V de Souza, Thiago M F de Souza, Cláudia R Cavaglieri, José R Matos-Souza, Wilson Nadruz Jr, Mara P T Chacon-Mikahil. Carotid intima-media thickness is associated with media rather than intima thickness. *Atherosclerosis* . 2017 Jun; 261:169-171. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.03.033.
- 5- K J Livak 1, 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.
- 6- Emma Raitoharju, Ilkka Seppälä, Niku Oksala, Leo-Pekka Lyytikäinen, Olli Raitakari, Jorma Viikari, Mika Ala-Korpela, Pasi Soininen, Antti J Kangas, Melanie Waldenberger, Norman Klopp, Thomas Illig, Jaana Leiviskä, Britt-Marie Loo, Nina Hutri-Kähönen, Mika Kähönen, Reijo Laaksonen, Terho Lehtimäki. Blood microRNA profile associates with the levels of serum lipids and metabolites associated with glucose metabolism and insulin resistance and pinpoints pathways underlying metabolic syndrome: the cardiovascular risk in Young Finns Study. *Mol Cell Endocrinol*. 2014 Jun 25;391(1-2):41-9. doi: 10.1016/j.mce.2014.04.013.
- 7- L.F.R.S. Carvalho-Romano, R.P. Bonafe, L.R. Paim, E.R. Marques, C.F.L. Vegian, J.A. Pio-Magalhaes, D.S.S. Mello, R. Schreiber, A.C. Sposito, J.R. Matos-Souza W. Nadruz Jr. Association of left ventricular strain and e/e' ratio with carotid wall layers. *Atherosclerosis*, 310:109–110, 2020
- 8- Luís F R S Carvalho-Romano, Rafael P Bonafé, Layde R Paim, Edmilson R Marques, Camila F L Vegian, José A Pio-Magalhães, Daniel S S Mello, Guilherme de Rossi, Otavio R Coelho-Filho, Roberto Schreiber, Andrei C Sposito, José R Matos-Souza, Wilson Nadruz Jr. Association of carotid wall layers with atherosclerotic plaques and cardiac hypertrophy in hypertensive subjects. *J Hum Hypertens*. 2022 Aug;36(8):732-737. doi: 10.1038/s41371-021-00565-w.