

Avaliação da Expressão Sérica de MicroRNAs em Pacientes Hipertensos com Doença Renal Crônica

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

Autores(as):

Jordana Laura Reis Soares (Medicina/UNICAMP), Eduarda O.Z. Minin (FCM/UNICAMP), Elisangela 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), 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 miR-30b, miR-574, miR-106b, miR-451a e miR-16, entre indivíduos com doença renal crônica e sem a doença. Contudo a relação destes miRNAs 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 dos miR-30b, miR-574, miR-106b, miR-451a e miR-16 em soro de 283 pacientes hipertensos, e correlacionar estes resultados com a taxa de filtração glomerular (TFGe).

METODOLOGIA:

No presente estudo, foram incluídos pacientes com hipertensão arterial sistêmica acompanhados em ambulatorios 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 CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) (7) foi usada para estimar a TFG. Os pacientes foram classificados como sem DRC (N-DRC) com $TFGe \geq 60$ mL/min/m² e com DRC os participantes com $TFGe < 60$ mL/min/m². 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 dos miRNAs foi realizada por qRT-PCR no equipamento QuantiStudy 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 U6sra e miR-222 como controles endógenos (9). Os resultados foram expressos em 2^{-ddct}. 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 e não paramétricas com o método de Spearman. Para se avaliar os efeitos de variáveis confundidoras, foram realizadas análises de regressão multivariada. 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, 283 pacientes hipertensos, sendo 208 hipertensos sem doença renal crônica (N-DRC) e 75 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 dos miRNAs, onde observamos expressão significativamente diferenciada entre pacientes hipertensos com DRC comparado com os N-DRC para os miR-106b ($p=0,016$), miR-451 ($p=0,036$) e miR-16 ($p<0,001$). Os miR-30b e miR-574 não apresentaram diferenças estatísticas. No entanto é preciso atentar para o menor número de amostras analisadas destes miRNAs, principalmente nos pacientes com DRC. A **Tabela 2** apresenta a análise de correlação bivariada entre os miRNAs e os parâmetros de filtração glomerular nos pacientes avaliados, e demonstrou correlação direta entre a TFGe e os miR-451 ($r=0,209$; $p=0,004$) e miR-16 ($r= 0,204$; $p=0,001$) e com a TFGe indexada pela área de superfície corpórea (ASC) com os miR-451 ($r=0,199$; $p=0,007$) e miR-16 ($r= 0,184$; $p=0,003$). Todas as associações permaneceram significantes mesmo após o ajuste para variáveis como pressão sistólica (PAS) e diastólica (PAD), diabetes mellitus (DM), tabagismo e uso de medicamentos anti-hipertensivos ou estatinas (**Tabela 3**).

Tabela 1- Características clínicas e laboratoriais dos pacientes envolvidos.

Variáveis	S/DRC (n=208)	DRC (n=75)	p
<i>Clínica</i>			
Idade, anos	59.7 ± 11.6	66.0 ± 12.0	<0.001
Sexo masculino, %	88 (43)	34 (45)	0.525
Pressão sistólica, mmHg	149.0 ± 25.4	147.2 ± 22.4	0.589
Pressão diastólica, mmHg	84.0 ± 15.5	80.7 ± 13.9	0.108
Índice de Massa Corpórea, kg/m ²	30.2 ± 5.8	30.0 ± 5.4	0.787
Diabetes mellitus, %	85 (41)	35 (47)	0.363
Tabagista, %	27 (13)	5 (7)	0.663
Diuréticos, %	102 (49)	46 (61)	0.249
ACEI or ARB, %	187 (90)	62 (83)	0.343
Beta - bloqueadores, %	84 (41)	37 (49)	0.606
Bloqueadores de canal de cálcio, %	92 (44)	32 (43)	0.458
Estatinas, %	128 (64)	55 (75)	0.216
Glucose, mg/dL	101 [91-125]	101 [90-117]	0.804
Triglicerídeos, mg/dL	123 [89-177]	121 [90-185]	0.705
HDL-colesterol, mg/dL	46.4 ± 12.4	45.5 ± 15.2	0.636
LDL-colesterol, mg/dL	95.4 ± 33.2	86.2 ± 33.4	0.042
Creatinina, mg/dL	0.84 [0.71-0.95]	1.43 [1.18-1.88]	<0.001
TFGe, mL/min/m ²	89.7 ± 15.9	43.7 ± 13.4	<0.001

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

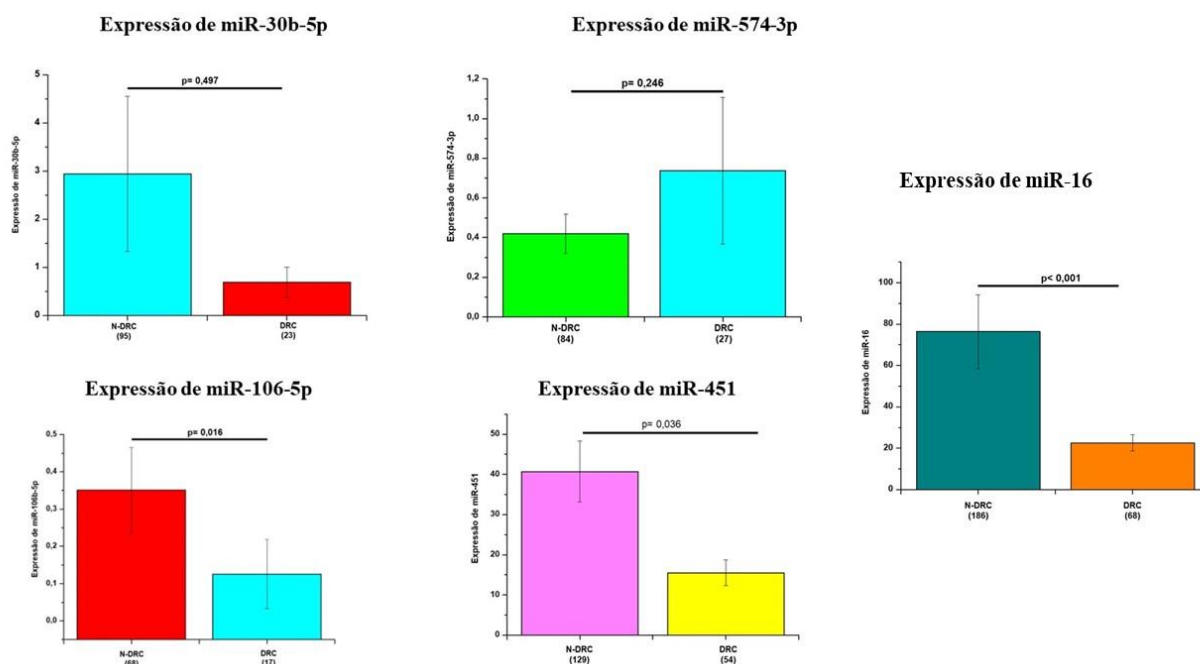


Figura 1- Expressão diferencial dos miR-30b, miR-574, miR-106b, miR-451a e miR-16 em soro de pacientes hipertensos. A expressão de miRNA é apresentada como 2-ddct. TFGe alterada (DRC < 60 mL/min/m²) comparados com os TFGe normal (N-DRC - ≥ 60 mL/min/m²).

Tabela 2- Análise de correlação bivariada entre os miRNAs e os parâmetros de DRC

	Grupo todo			
	TFGe		TFGe/ASC	
	r	p	r	p
LogmiR-30b	-0,046	0,621	-0,081	0,384
Log miR-574	-0,001	0,989	-0,051	0,589
LogmiR-106b	0,081	0,462	-0,010	0,926
LogmiR-451	0,209	0,004	0,199	0,007
LogmiR-16*	0,204	0,001	0,184	0,003

Tabela 3- Análise de regressão multivariada entre os miRNAs e os parâmetros de DRC.

	Grupo todo			
	TFGe		TFGe/ASC	
	Beta ± SD	p	Beta ± SD	p
LogmiR-451	1,670±0,611	0,007	1,728±0,650	0,009
LogmiR-16*	2,064±0,697	0,003	2,352±0,804	0,004

Ajustado por PAS, PAD, DM, tabagismo e uso de medicamentos anti-hipertensivos ou estatinas.

CONCLUSÕES:

No presente estudo, observamos a redução na expressão sérica de miR-106b, miR-451 e miR-16 em pacientes com DRC comparados aos N-DRC, além de uma correlação direta entre a TFGe e a expressão sérica dos miR-451 e miR-16 que permaneceram significantes mesmo após o ajuste para variáveis como PAS, PAD, DM, tabagismo e uso de medicamentos anti-hipertensivos ou estatinas em uma amostra de hipertensos brasileiros.

Esses dados sugerem que os miR-451 e miR-16 podem estar envolvidos 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, outras amostras, principalmente de pacientes com DRC devem ser analisadas para aumentar a casuística do estudo. 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- Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Blood Pressure Work Group. KDIGO 2021 Clinical Practice Guideline for the Management of Blood Pressure in Chronic Kidney Disease. *Kidney Int*. 2021 Mar;99(3S): S1-S87.
- 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.