



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

ELISANGELA CRISTINA PEREIRA LOPES

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO SÉRICA DE MICRORNAS EM PACIENTES
HIPERTENSOS: CORRELAÇÃO COM HIPERTROFIA CARDÍACA**

***EVALUATION OF SERUM MICRORNA EXPRESSION IN HYPERTENSIVE
PATIENTS: CORRELATION WITH CARDIAC HYPERTROPHY***

CAMPINAS

2023

ELISANGELA CRISTINA PEREIRA LOPES

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO SÉRICA DE MICRORNAS EM PACIENTES
HIPERTENSOS: CORRELAÇÃO COM HIPERTROFIA CARDÍACA**

***EVALUATION OF SERUM MICRORNA EXPRESSION IN HYPERTENSIVE
PATIENTS: CORRELATION WITH CARDIAC HYPERTROPHY***

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de doutora em Ciências na área de concentração Clínica Médica.

Thesis presented to the Faculty of Medical Sciences of the State University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Sciences in the area of concentration Internal Medicine.

ORIENTADOR: ROBERTO SCHREIBER

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA ELISANGELA CRISTINA PEREIRA LOPES,
E ORIENTADA PELO PROF. DR. ROBERTO SCHREIBER.

CAMPINAS

2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

L881a Lopes, Elisangela Cristina Pereira, 1989-
Avaliação da expressão sérica de microRNAs em pacientes hipertensos :
correlação com hipertrofia cardíaca / Elisangela Cristina Pereira Lopes. –
Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Roberto Schreiber.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Hipertensão. 2. Hipertrofia cardíaca. 3. Hipertrofia ventricular esquerda.
4. microRNAs. 5. miR-145-5p. I. Schreiber, Roberto. II. Universidade Estadual
de Campinas (UNICAMP). Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Evaluation of serum microRNA expression in hypertensive patients
: correlation with cardiac hypertrophy

Palavras-chave em inglês:

Hypertension

Hypertrophy, Left ventricular

Cradiac hypertrophy

microRNAs

miR-145-5p

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Roberto Schreiber [Orientador]

Susan Elisabeth Domingues Costa Jorge

Marcos Ferreira Minicucci

Leonardo Antônio Mamede Zornoff

Magnun Nueldo Nunes dos Santos

Data de defesa: 23-11-2023

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-6424-3528>

- Currículo Lattes do autor: <https://lattes.cnpq.br/5199957001294557>

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

ELISANGELA CRISTINA PEREIRA LOPES

ORIENTADOR: ROBERTO SCHREIBER

MEMBROS:

- 1. Presidente da banca: DR. ROBERTO SCHREIBER**
- 2. Membro titular interno: DRA. SUSAN ELISABETH DOMINGUES COSTA JORGE**
- 3. Membro titular interno: DR. MAGNUN NUELDO NUNES DOS SANTOS**
- 4. Membro titular externo: DR. MARCOS FERREIRA MINICUCCI**
- 5. Membro titular externo: DR. LEONARDO ANTÔNIO MAMEDE ZORNOFF**

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 23/11/2023

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais Crystina e José (*in memoriam*), com todo meu amor e carinho. Sou muito grata pelos esforços que fizeram para que eu me tornasse a pessoa que sou hoje.

Dedico, também, ao meu filho Arthur que é por quem eu sigo lutando para ser melhor a cada dia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço minhas amigas do laboratório Dra. Layde e Ma. Eduarda, pois sempre me ajudaram e apoiaram no desenvolvimento da pesquisa.

Ao professor Dr. Wilson Nadruz Junior pelo acolhimento no laboratório e a oportunidade de compor essa equipe dedicada e competente.

Um agradecimento especial ao meu orientador Dr. Roberto Schreiber, por ter sido muito paciente e motivador durante toda a jornada em que estive no laboratório. Obrigada por todo conhecimento transmitido e por todo entendimento e ajuda prestada a mim durante esses anos.

Esta pesquisa foi desenvolvida graças a Faculdade de Ciências Média da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, processo nº 2017/23563-1.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica

PA – Pressão Arterial

PAS – Pressão Arterial Sistólica

PAD - Pressão Arterial Diastólica

DCV – Doenças Cardiovasculares

MVE – Massa do Ventrículo Esquerdo

HVE – Hipertrofia do Ventrículo Esquerdo

ERVE – Espessura Relativa do Ventrículo Esquerdo

VE – Ventrículo Esquerdo

miRNA – microRNA

ALT – Alamina Aminotransferase

AST – Aspartano Aminotransferase

PSA – Antígeno Prostático Específico

CKMB – Creatina Quinase-MB

HC – Hospital das Clínicas

LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade

HDL – Lipoproteína de Alta Densidade

RPM – Rotações Por Minuto

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

IMVE – Índice da Massa do Ventrículo Esquerdo

RESUMO

Pacientes hipertensos comumente desenvolvem lesões de órgão-alvo, como a HVE. Os microRNAs possuem um papel importante no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca. Este estudo avaliou a relação entre os miRNAs circulantes e a HVE em pacientes hipertensos. A pesquisa se iniciou com a coorte exploratória, onde foram avaliadas as expressões de 754 miRNAs em 47 pacientes hipertensos e na sequência na coorte de validação avaliou-se a expressão de 06 miRNAs (miR-30a-5p, miR-let7c, miR-92a, miR-451, miR-145-5p e miR-185) em 297 pacientes através das técnicas de TaqMan OpenArray e qRT-PCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real, respectivamente. Cinco miRNAs (miR-30a-5p, miR-let7c, miR-92a, miR-451, miR-145-5p), foram associados a HVE em pacientes hipertensos, indicando assim que possam estar relacionados no desenvolvimento da HVE induzida por hipertensão. Realizamos o cultivo de células a fim de avaliar o papel do miR-145-5p no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca e constatou-se que na presença do mimetizador miR-145-5p a expressão dos marcadores de hipertrofia Nppa e Nppb ficou até 8 vezes maior quando comparado aos grupos negativos ou com inibidor do miR-145-5p, destacando assim a importância desse miRNA no remodelamento cardíaco em pacientes hipertensos. Nossos dados demonstraram que os níveis circulantes de três miRNAs (miR-145-5p, miR-let7c e miR-451) apresentaram associação tanto ao IMVE quanto a HVE, indicando assim que possam estar mais relacionados no desenvolvimento da HVE induzida por hipertensão, podendo ser potenciais biomarcadores circulantes envolvidos no remodelamento do VE em pacientes hipertensos.

Palavras-chave: Hipertensão; Hipertrofia do Ventrículo Esquerdo; Hipertrofia Cardíaca; microRNAs; miR-145-5p.

ABSTRACT

Hypertensive patients commonly develop target organ damage, such as LVH. MicroRNAs play an important role in the development of cardiac hypertrophy. This study evaluated the relationship between circulating miRNAs and LVH in hypertensive patients. The research began with the exploratory cohort, where the expressions of 754 miRNAs were evaluated in 47 hypertensive patients and then in the validation cohort, the expression of 06 miRNAs was evaluated (miR-30a-5p, miR-let7c, miR-92a, miR-451, miR-145-5p and miR-185) in 297 patients using TaqMan OpenArray and qRT-PCR - real-time quantitative polymerase chain reaction, respectively. Five miRNAs (miR-30a-5p, miR-let7c, miR-92a, miR-451, miR-145-5p) were associated with LVH in hypertensive patients, thus indicating that they may be related to the development of hypertension-induced LVH. We performed cell cultivation in order to evaluate the role of miR-145-5p in the development of cardiac hypertrophy and it was found that in the presence of the miR-145-5p mimic, the expression of hypertrophy markers Nppa and Nppb was up to 8 times higher when compared to negative groups or with miR-145-5p inhibitor, thus highlighting the importance of this miRNA in cardiac remodeling in hypertensive patients. Our data demonstrated that the circulating levels of three miRNAs (miR-145-5p, miR-let7c and miR-451) were associated with both LVMI and LVH, thus indicating that they may be more related to the development of hypertension-induced LVH, which may be potential circulating biomarkers involved in LV remodeling in hypertensive patients.

Keywords: Hypertension; Left Ventricular Hypertrophy; Cardiac Hypertrophy; microRNAs; miR-145-5p

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Mortalidade por doenças cardiovasculares no Brasil.....	11
Tabela 9.1 – microRNAs analisados do OpenArray.....	75

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Disposição dos Sarcômeros.....	12
Figura 1.2 – Coração e Hipertrofia do ventrículo esquerdo.....	13
Figura 1.3 – Padrões Geométricos do Ventrículo Esquerdo	14
Figura 1.4 – Biogênese do microRNA.....	16
Figura 3.1 – Desenho Metodológico Objetivo I.....	20
Figura 3.2 – Desenho Metodológico Objetivo II.....	21
Figura 3.3 – Template da Placa Customizada qRT-PCR.....	25

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Hipertensão arterial.....	13
1.2. Hipertrofia do Ventrículo Esquerdo.....	15
1.3. MicroRNAs.....	18
1.4. MicroRNAs e Doenças Cardiovasculares.....	20
2. OBJETIVOS	22
3. METODOLOGIA.....	23
3.1. Seleção dos Indivíduos.....	24
3.2. Dados Clínicos e Laboratoriais.....	25
3.3. Ultrassonografia do Ventrículo Esquerdo.....	25
3.4. Seleção dos microRNAs.....	26
3.5. Extração dos microRNAs.....	26
3.6 OpenArray - PCR em Tempo Real.....	27
3.7 Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real – qRT-PCR.....	28
3.8. Cultura de Células	29
3.9. Métodos estatísticos e cálculo da amostra	30
3.10. Análise de enriquecimento de genes	30
4. RESULTADOS	32
5. DISCUSSÃO GERAL	53
6. CONCLUSÃO	56
7. REFERÊNCIAS	57
9. ANEXOS.....	65
9.1. Parecer Consubstanciado	65
9.2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	76
9.3. microRNAs analisados no OpenArray.....	79
9.4. Material suplementar do artigo publicado	96

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hipertensão arterial

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é doença crônica multifatorial dependente de fatores genéticos/epigenéticos, ambientais e sociais caracterizada pela elevação persistente da pressão arterial (1,2). Frequentemente é causa de alterações estruturais e/ou funcionais em órgãos-alvo como coração, rins, vasos sanguíneos e encéfalo e de alterações metabólicas com aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não fatais (3).

Considera-se hipertensão arterial quando o paciente apresenta a elevação persistente da pressão arterial (PA), ou seja, PA sistólica (PAS) maior ou igual a 140 mmHg e/ou PA diastólica (PAD) maior ou igual a 90 mmHg medida de forma correta e em pelo menos dois momentos distintos sem o uso de anti-hipertensivos (1).

A HAS é responsável por cerca de 9,4 milhões de mortes no mundo, chegando a acometer aproximadamente 30% da população adulta brasileira. Entre 2000 e 2010 observou-se uma diminuição de 2,6% de prevalência de HAS em países desenvolvidos, enquanto nos países em desenvolvimento registrou-se um aumento de 7,7%. Associa-se o aumento no tecido adiposo visceral a uma maior incidência da doença, assim como o grupo de fumantes e ex fumantes também foi correlacionado a maior propensão no desenvolvimento de HAS (4,5,6).

Doenças cardiovasculares (DCV) são consideradas as principais causas de morte no Brasil (Tabela 1), chegando a 27,7% dos óbitos. Em 2014, das internações brasileiras, 10,1% foram causadas por doenças do aparelho circulatório e desse montante 57,2% eram indivíduos com mais de 60 anos de idade (7). Dentre os fatores de risco cardiovascular temos a hipertensão, aterosclerose, dislipidemia, resistência a insulina e inflamação crônica (8).

Tabela 1 – Mortalidade por Doenças Cardiovasculares no Brasil

Estado Brasileiro	Incidencia de DCV por 100 mil	Número de óbitos 2019
São Paulo	150,17	93,70
Rio de Janeiro	166,54	42,59
Minas Gerais	126,63	37,98
Espírito Santo	138,85	7,10
Paraná	135,99	20,75
Santa Catarina	128,57	11,80
Rio Grande do Sul	126,56	23,51
Goias	146,48	10,96
Mato Grosso do Sul	158,87	5,04
Mato Grosso	142,80	4,70
Bahia	144,73	25,89
Sergipe	150,18	3,45
Alagoas	196,98	6,60
Pernambuco	166,20	18,50
Paraíba	159,01	8,23
Rio Grande do Norte	148,18	6,32
Ceará	145,84	15,98
Piauí	179,91	6,72
Maranhão	166,11	11,30
Tocantins	158,12	2,40
Para	154,78	10,61
Amazonas	143,04	4,00
Acre	161,88	1,01
Rondônia	147,89	2,13
Roraima	175,27	630
Amapá	146,27	773
Brasília	109,56	3,19

Legenda cores: **Sudoeste**, **Sul**, **Centro Oeste**, **Nordeste**, **Norte** e **Distrito Federal**.

Fonte: Sociedade Brasileira Cardiovascular – Estatística Brasil – 2019

1.2. Hipertrofia do Ventrículo Esquerdo

A elevação sustentada da pressão arterial produz um aumento da tensão na parede do ventrículo esquerdo, o qual pode levar a uma resposta caracterizada por aumento da massa ventricular (MVE), que é conhecida como hipertrofia do ventrículo esquerdo (HVE). Essas alterações ocorrem no sentido de normalizar a tensão na parede ventricular e são geralmente consideradas como compensatórias (9). Ela é caracterizada como o aumento no tamanho dos cardiomiócitos, aumento na síntese proteica e maior organização do sarcômero (10). Associa-se a hipertrofia prolongada ao aumento no risco de morte súbita ou insuficiência cardíaca. A hipertrofia cardíaca pode ser concêntrica ou excêntrica, onde na concêntrica observamos o aumento da massa do ventrículo e na excêntrica há o aumento da cavidade do ventrículo (Figura 1.1 – Disposição dos sarcômeros e Figura 1.2 - Coração e Hipertrofias do ventrículo esquerdo) (10,11,12).

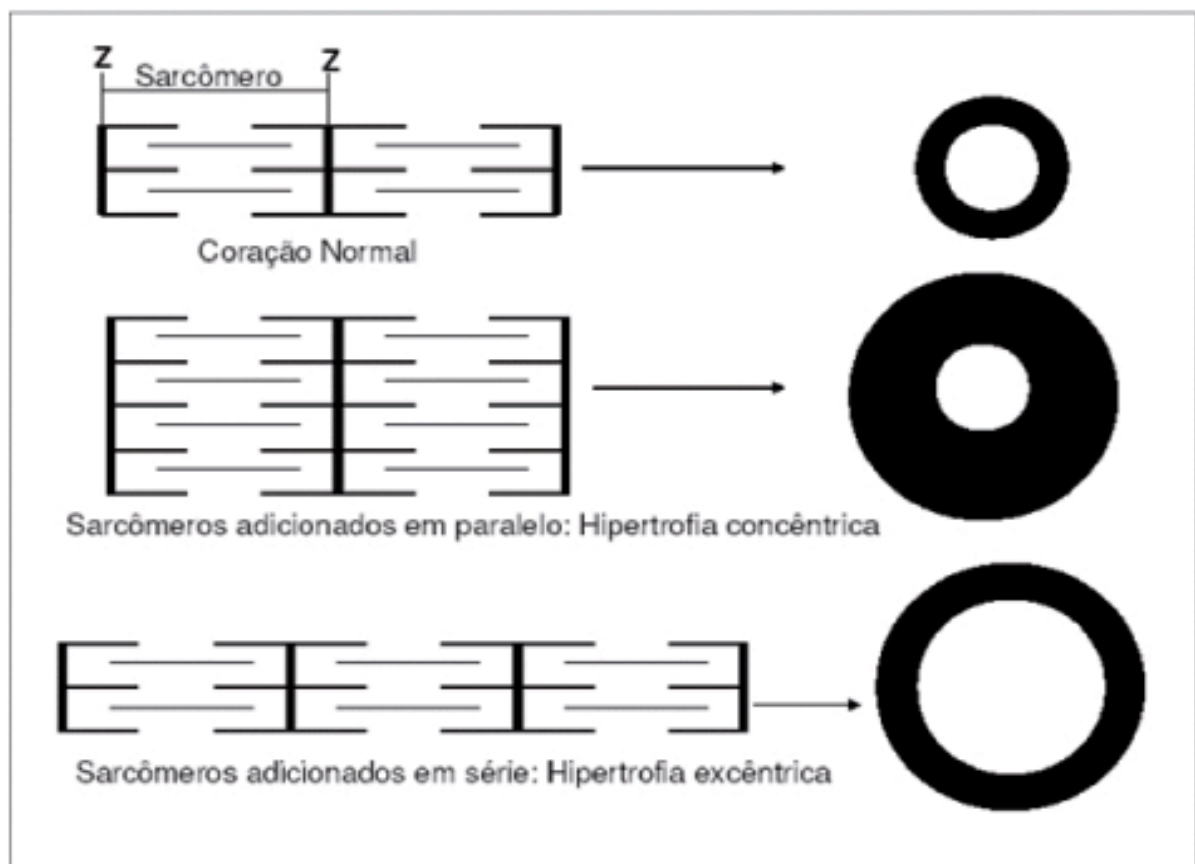


Figura 1.1– Disposição dos sarcômeros – (GARCIA, 2008)

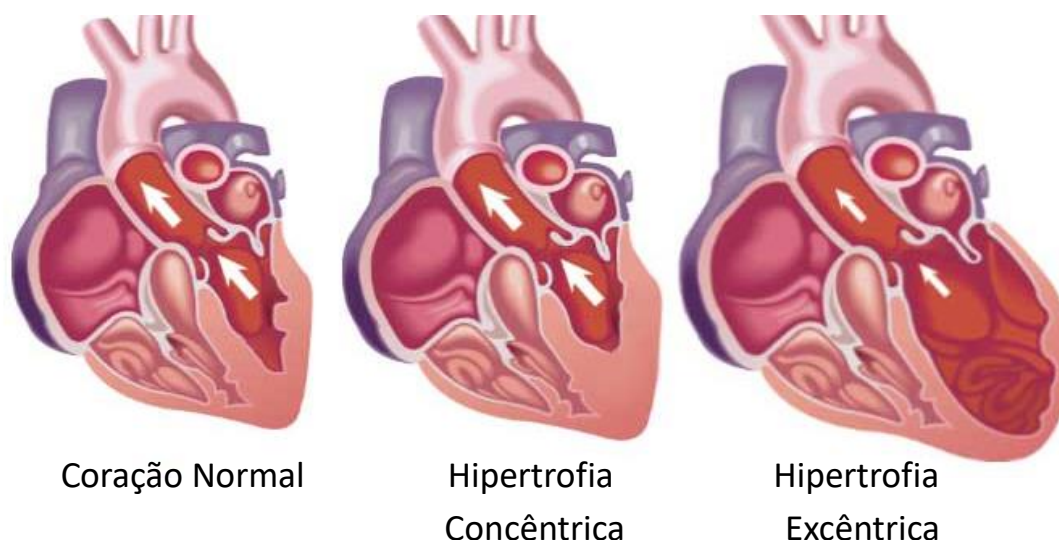


Figura 1.2 – Coração e Hipertrofias do ventrículo esquerdo. (Fonte: mdsaude.com.br).

No desenvolvimento de problemas cardíacos a causa subjacente da hipertensão parece não ter importância. O principal determinante na carga de trabalho do coração e hipertrofia é a pressão sistólica. Associou-se a hipertensão sistólica isolada com pressão de pulso mais ampla a um aumento no risco de doenças cardiovasculares e mortalidade. Apesar de tudo a pressão sistólica continua sendo ignorada por alguns profissionais e pacientes (13).

Apesar de considerada uma resposta compensatória ao aumento de tensão na parede ventricular, a HVE é também fator de risco independente para morbidade e mortalidade cardiovascular por predispor ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca, arritmias e fenômenos isquêmicos coronários mais graves (9). Uma meta-análise de 20 estudos envolvendo mais de 48 mil pacientes encontrou risco médio ponderado de morbidade cardiovascular associado à hipertrofia cardíaca de 2,3 vezes (14). A MVE é um fenótipo complexo influenciado pelos efeitos interativos de múltiplos fatores ambientais e genéticos. Embora a HAS seja reconhecida como a principal determinante da hipertrofia cardíaca, a pressão arterial explica apenas uma pequena parte da variação interindividual da MVE. Neste sentido, diversos fatores alternativos, incluindo fatores genéticos (15) e ambientais, tais como obesidade e diabetes (16), podem contribuir para o desenvolvimento da HVE.

Além de alterações na MVE, a HAS também pode levar a alterações na espessura relativa do ventrículo esquerdo (ERVE), que é determinada pela razão

entre o dobro da espessura da parede posterior e o diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo. Com base nesses parâmetros, quatro padrões geométricos do ventrículo esquerdo foram identificados (16): geometria normal (MVE e ERVE normais), remodelamento concêntrico (MVE normal e ERVE aumentada), hipertrofia concêntrica do VE (MVE e ERVE aumentadas) e hipertrofia excêntrica (MVE aumentada com ERVE normal) (Figura 1.3 - Padrões Geométricos do ventrículo esquerdo).

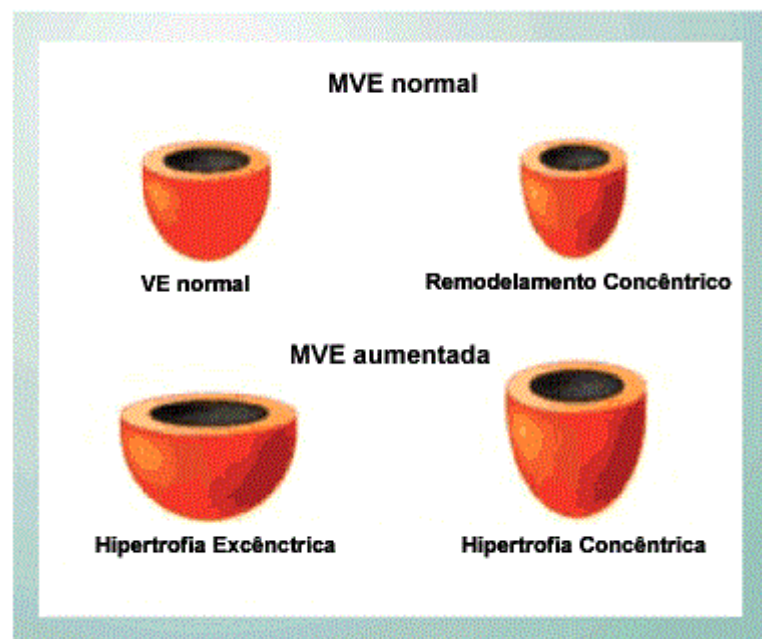


Figura 1.3 – Padrões Geométricos do ventrículo esquerdo. (Fonte: ROCHA, 2007)

Os estudos epidemiológicos têm demonstrado que o prognóstico cardiovascular é pior para indivíduos portadores de hipertrofia concêntrica e melhor para aqueles com geometria normal (17). Por outro lado, indivíduos com hipertrofia excêntrica e remodelamento concêntrico tendem a ter um risco cardiovascular intermediário entre a hipertrofia concêntrica e a geometria normal. A prevenção ou a regressão da HVE e das alterações geométricas do ventrículo esquerdo está associada a uma menor incidência de desfechos ou futuros desfechos adversos de doença cardiovascular em pacientes com HAS (17). Portanto, a prevenção e o diagnóstico de HVE e de alterações geométricas do ventrículo esquerdo devem ser uma prioridade em pacientes com HAS.

1.3. MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs) são uma classe de RNAs não codificantes e evolutivamente conservadas que possuem cerca de 23 nucleotídeos. Estão presentes em animais, plantas e eucariotos unicelulares e são responsáveis por regular a expressão de genes-alvo. Inicialmente os miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II formando o pri-miRNA e na sequência o complexo Drosha rompe locais de pareamento dando origem ao pré-miRNA, nesse momento a estrutura é similar a um grampo (do inglês Hairpin) de cabelo. O pré-miRNA é transportado para fora do núcleo celular através da Exportina-5 e da Ran-GTP e no citoplasma a enzima DICER processa esse pré-miRNA e remove a região da alça e nesse momento o miRNA é constituído por uma fita dupla de aproximadamente 23 nucleotídeos. Através da proteína Argonauta é formado o complexo RISC, responsável por separar a fita dando origem, assim, ao miRNA maduro (18,19). (Figura 1.4 - Biogenese do microRNA)

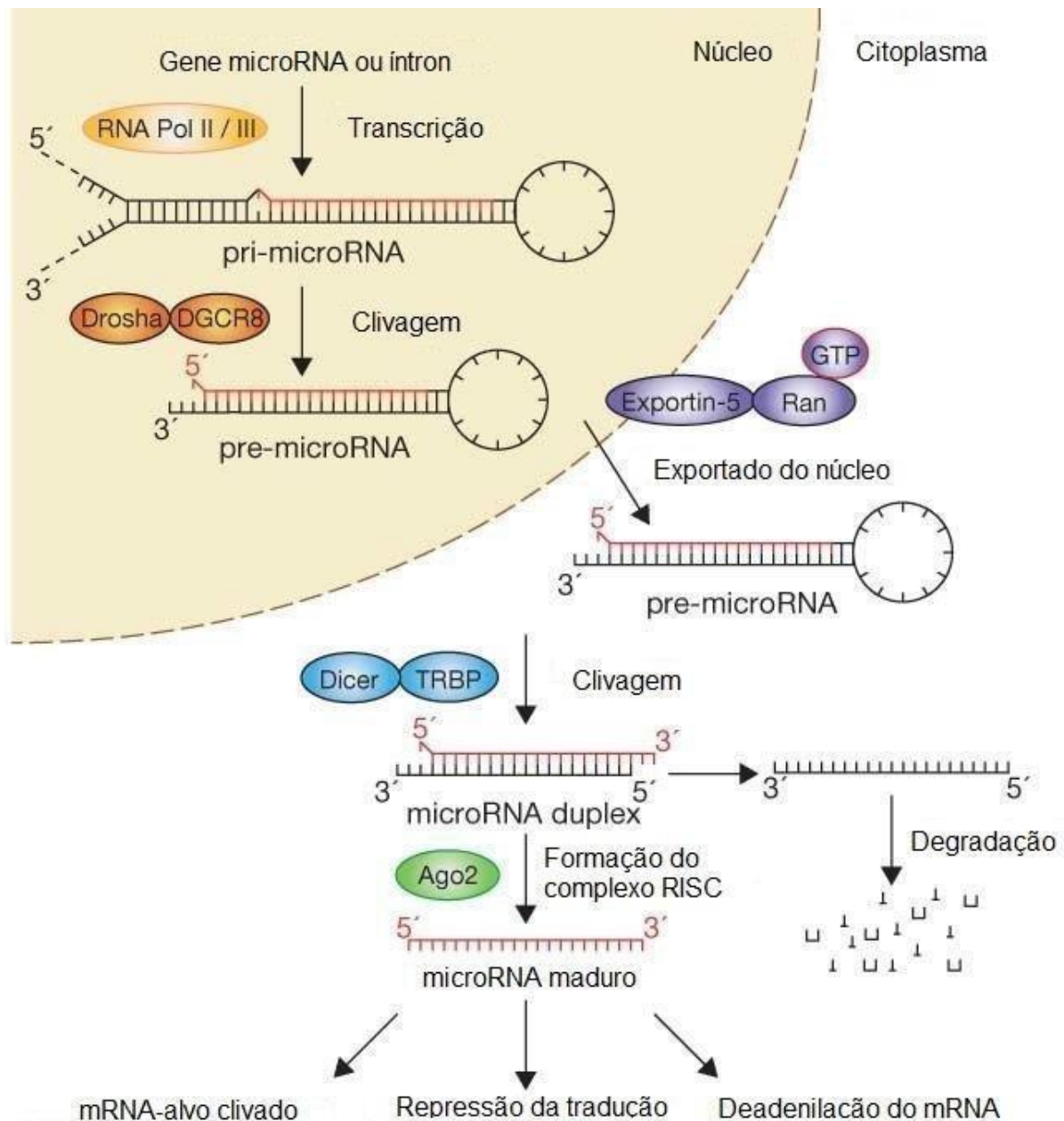


Figura 1.4 – Biogênese do microRNA. (Fonte: [researchgate.net/publication/330157281](https://www.researchgate.net/publication/330157281))

Os microRNAs atuam em nível pós transcricional, seja pela inibição da tradução ou degradação do mRNA e em ambas as situações a expressão do mRNA do gene-alvo é reduzido. Não é necessária uma perfeita complementaridade entre miRNA e mRNA, sendo que o emparelhamento incompleto é suficiente para suprimir a expressão de diferentes genes. Um mRNA pode conter diversos sítios de ligação para vários miRNAs, gerando uma rede complexa de interação entre eles. Há uma estimativa de que os miRNAs regulem aproximadamente 60% dos genes humanos (20).

1.4 MicroRNAs e doenças cardiovasculares

Um biomarcador possui como objetivo indicar a presença ou ausência de determinada doença. Na antiguidade os primeiros biomarcadores eram representados pelos sinais médicos, como pulso, aparência do paciente e até sabor da urina. Atualmente refere-se a biomarcadores como sendo determinadas moléculas detectadas nos diversos fluidos corporais através de técnicas laboratoriais específicas, sendo comumente utilizada na prática clínica a Troponina, ALT, AST, PSA, CKMB, entre outras (21).

Para ser considerado um bom biomarcador é necessário cumprir alguns critérios, sendo eles: acessível por procedimentos minimamente invasivos, possuir boa especificidade para a patologia investigada e ser traduzível da pesquisa para a clínica. Diversos estudos vêm apresentando a possibilidade da utilização de miRNAs como biomarcadores em diferentes doenças como, câncer (22), Alzheimer (23), epilepsia (24), doenças neurodegenerativas (25), doenças cardiovasculares (26), dentre outras. Em expressões anormais de miRNAs a expressão dos mRNAs alvo são afetados e, portanto, os miRNAs são potencialmente causadores de doenças (20).

Um papel crucial dos miRNAs no sistema cardiovascular tem tido suporte na descoberta de que a depleção da enzima de processamento de miRNA, Dicer, leva a defeitos na angiogênese, formação de vasos e desenvolvimento cardíaco (27). Os miRNAs também podem agir como reguladores da inflamação, do metabolismo lipídico e do estresse oxidativo, que são condições importantes para o desenvolvimento de aterosclerose e doenças cardiovasculares (28). De maneira geral, diversos perfis de expressão de miRNAs foram associados ao remodelamento cardíaco patológico em roedores e em seres humanos (28, 29). Van Rooij e cols. 2006, (30) foi o primeiro a utilizar microarray para a análise de miRNAs em dois modelos murinos de hipertrofia patológica. Naquele estudo, os autores encontraram apenas 21 miRNAs aumentados e 7 diminuídos em comum nos dois modelos de hipertrofia, sugerindo que o tipo de hipertrofia e o estímulo podem interferir na expressão dos miRNAs. Desde então, vários estudos foram realizados para avaliar o papel destes miRNAs na hipertrofia cardíaca, sendo a maioria em modelos murinos ou em cultivo celular, conforme pode ser evidenciado em excelente revisão realizada por Wang e cols. 2016 (31).

Entretanto, pouco se sabe sobre a relação entre miRNAs e o desenvolvimento HVE em seres humanos com HAS. Alguns estudos prévios investigaram a expressão de alguns miRNAs em pacientes hipertensos e mostraram que a MVE se correlacionou com níveis circulantes de miR-29 (23) e miR-155 (24) e com a expressão leucocitária de miR-9, miR-1, miR-133a, miR-26b, miR-208b, miR-499, e miR-21 (25, 26). Contudo, estes estudos avaliaram um número bastante reduzido de miRNAs circulantes e incluíram um tamanho amostral relativamente pequeno (50 a 102 indivíduos por estudo), o que permite concluir que ainda se sabe pouco a respeito das relações entre miRNAs e marcadores de remodelamento cardíaco em indivíduos hipertensos.

Em seu estudo, Minin EOZ *et al* (32), constatou a expressão aumentada do miR-145-5p e miR-let7c em pacientes hipertensos com placa aterosclerótica carotídea em comparação aos pacientes hipertensos sem placa aterosclerótica. Já no estudo de Sayed D *et al*, uma matriz com mais de 50 miRNAs apresentaram progressivamente expressão diferenciada durante o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca causada por sobrecarga de pressão, sendo o miR-1 um dos primeiros a apresentar regulação negativa na hipertrofia. O miR-21 chegou a atingir 8 vezes mais expressão no décimo quarto dia do estudo (33).

Nos últimos anos, nosso grupo padronizou uma metodologia que permite a identificação e quantificação da expressão simultânea de um grande número de miRNAs, utilizando o Sistema TaqMan OpenArray, uma plataforma microfluidica capaz de analisar, pelo método de Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo (qRT-PCR), a expressão de 754 miRNAs (34).

2. OBJETIVOS

Geral

- Identificar miRNAs séricos relacionados à HVE em indivíduos hipertensos e avaliar o papel funcional de miRNAs selecionados em marcadores de hipertrofia de miócitos cardíacos *in vitro*.

Específicos

1. Identificar miRNAs séricos relacionados à HVE em uma coorte de indivíduos hipertensos (Coorte Exploratória) através da plataforma de OpenArray;
2. Validar os resultados obtidos na coorte exploratória em um número maior de pacientes hipertensos (Coorte de Validação);
3. Correlacionar os dados de expressão dos miRNAs diferencialmente expressos na coorte de validação com a massa e a geometria ventricular esquerda em pacientes hipertensos;
4. Avaliar o papel do miR-145-5p diferencialmente expressos em pacientes hipertensos sobre a hipertrofia de cardiomiócitos *in vitro*.

3. METODOLOGIA

O presente estudo foi dividido em três etapas, sendo a primeira denominada coorte exploratória, a segunda coorte de validação e a terceira cultura de células. Na coorte exploratória realizou-se uma avaliação mais abrangente contemplando a análise de 754 miRNAs no soro de 42 pacientes hipertensos. Na coorte de validação analisou-se a expressão sérica de 6 miRNAs em 297 pacientes. Nos experimentos de cultura de células analisou-se a ação do miR-145 em células musculares atriais de camundongo.

O protocolo metodológico referente aos objetivos do estudo está apresentado nas figuras abaixo:



Figura 3.1 – Desenho metodológico referente aos objetivos 1, 2 e 3.



Figura 3.2 – Desenho metodológico referente ao objetivo 4

3.1. Seleção dos indivíduos

Foram incluídos pacientes hipertensos atendidos no Hospital de Clínicas da UNICAMP. Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas com parecer nº 56841616.5.0000.5404 (Anexo I), e todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido para participar (Anexo II).

Das coortes analisadas, a exploratória contemplou 42 pacientes (26 com HVE e 16 sem HVE) e a coorte de validação compreendeu 297 pacientes (162 com HVE e 135 sem HVE).

Dentre os critérios de exclusão temos menores de 18 anos, evidência de doença valvar cardíaca grave, cardiomiopatia hipertrófica e causas identificáveis de hipertensão secundária. Realizou-se a pesquisa de acordo com a declaração de Helsinki.

3.2. Dados clínicos e laboratoriais

A caracterização clínica e laboratorial dos pacientes foi realizada em jejum através de técnicas laboratoriais padrão para dosagem de lipoproteína de baixa densidade (LDL) – colesterol, lipoproteína de alta densidade (HDL) – colesterol, triglicerídeos, creatinina e níveis de glicose. Calculou-se o índice de massa corporal dividindo o peso corporal pela altura ao quadrado (kg/m^2). A pressão arterial e a frequência cardíaca foram medidas na posição sentada usando um dispositivo oscilométrico digital validado (HEM-705CP; Omoron Healthcare, Kyoto, Japão) com tamanhos de manguitos apropriados. Definiu-se como hipertensão quando a pressão arterial sistólica foi ≥ 140 mmHg ou diastólica ≥ 90 mmHg ou quando em uso de medicamentos anti-hipertensivos. No diagnóstico de diabetes mellitus considerou-se glicemia de jejum ≥ 126 mg/gl ou quando o paciente estava fazendo uso de medicamentos hipoglicêmicos.

3.3. Ultrassonografia do ventrículo esquerdo

A ultrassonografia foi realizada por um único médico utilizando o aparelho Vivid (General Electric Milwaukee, Wiscosin, EUA) equipado com transdutor 3S-RS, com o objetivo de avaliar as dimensões do ventrículo esquerdo. A fração de ejeção do ventrículo esquerdo foi estimada pelo método Simpson.

O índice de massa do ventrículo esquerdo foi calculado como: Massa do ventrículo esquerdo / área de superfície corporal. A espessura relativa da parede foi medida como $2 \times$ espessura da parede posterior / diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo.

Hipertrofia do ventrículo esquerdo foi definida como índice de massa do ventrículo esquerdo $\geq 95\text{g} / \text{m}^2$ em mulheres e $\geq 115\text{g} / \text{m}^2$ em homens. Definiu-se os padrões geométricos do ventrículo esquerdo da seguinte forma: geometria normal (sem hipertrofia do ventrículo esquerdo e espessura relativa da parede $\leq 0,42$), remodelação concêntrica (sem hipertrofia do ventrículo esquerdo e espessura relativa da parede $> 0,42$), hipertrofia excêntrica (hipertrofia do ventrículo esquerdo e espessura relativa da parede $\leq 0,42$) e hipertrofia concêntrica (hipertrofia do ventrículo esquerdo e espessura relativa da parede $> 0,42$).

A coleta dos dados clínicos, laboratoriais e ultrassonográficos foram realizados no mesmo dia, quando o paciente foi ao HC para acompanhamento na cardiologia.

3.4. Seleção dos miRNAS

Na coorte exploratória utilizou-se para análise o sistema Human OpenArray (LifeTechnologies) com 754 miRNAs. Após as análises estatísticas constatou-se que 10 dos 754 miRNAs apresentavam diferença significativa na expressão quando comparado o grupo hipertenso sem HVE com o grupo hipertenso com HVE. Para a coorte de validação foram selecionados os seis miRNAs com maior diferença de expressão no estudo exploratório, sendo eles: miR-30a-5p, miR-let7c, miR-92a, miR-451, miR-145-5p, miR-185.

3.5. Extração dos miRNAS

Para a extração dos miRNA circulantes, em ambas as coortes, foram coletadas amostras de sangue total dos pacientes em tubos contendo gel separador e ativador de coágulo (BD Vacutainer). A centrifugação das amostras ocorreu a 2200 rpm durante 20 minutos em temperatura ambiente. A fase superior do soro foi imediatamente aliquoteada em tubos isentos de RNase e congeladas a -80°C. Para a extração do RNA total, incluindo miRNA, utilizou-se o Kit miRNeasy Serum/Plasma (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante: Em 200 ul de soro adiciona-se 1000 ul de qiazol Lysis reagente e homogeniza-se no vórtex. A solução fica em repouso por 5 minutos em temperatura ambiente e na sequência adiciona-se 200 ul de Cloroformio no lisado e vortexa-se vigorosamente por 15 segundos. Após 3 minutos em repouso em temperatura ambiente a solução é centrifugada por 15 minutos a 10.000 RPM a 4°C, sendo nesse momento que temos a separação da fase aquosa e da fase orgânica. A fase aquosa é transferida para um novo recipiente e então é adicionado 1,5x do volume coletado de etanol 100%. Adiciona-se 700 ul da mistura na coluna com filtro e centrifuga-se por 30 segundos a 10.000 RPM. Esse processo é repetido até que toda a mistura passe pela coluna, na sequência adiciona-se 700 ul de Buffer RWT na coluna e centrifuga-se por 30 segundos a 10.000 RPM. O filtrado é descartado e adiciona-se 500 ul do Buffer RPE na coluna e centrifuga-se por 30

segundos a 10.000 RPM. Na sequência adiciona-se 500 µl de etanol 80% e centrifuga-se por 2 minutos a 10.000 RPM. Após descartar o filtrado transfere-se a coluna para um novo tubo de coleta e centrifuga-se por 5 minutos a 13.000 RPM com a tampa aberta para secagem da coluna. Transfere-se a coluna para um novo tubo de 1,5 ml e adiciona-se 20 µl de água RNase-free no centro do filtro, na sequência centrifuga-se o tubo fechado por 1 minuto na velocidade máxima para recuperação do RNA. O eluído é congelado no freezer -80°C.

Para a determinação da qualidade do material extraído utilizou-se o espectrofotômetro NanoDrop-2000, onde leituras de oxiemoglobinas em 414 nm superiores a 0,2 foram consideradas hemolisadas e a amostra foi descartada.

3.6. OpenArray – PCR em tempo real

Na coorte exploratória utilizamos o Sistema Human OpenArray (LifeTechnologies) que utiliza a técnica de qRT-PCR. Essa metodologia foi escolhida pois possibilitou a avaliação da expressão de 754 miRNAs em cada amostra. O miRNA extraído foi submetido ao protocolo do fabricante para montagem das placas: Inicialmente é feita a transcrição do miRNA em cDNA através dos pools de primers RT (pool A e pool B), na sequência ocorre a amplificação do cDNA através do TaqMan PreAmp MaxterMix (conforme sugestão do fabricante), onde os miRNAs presentes na amostra original são amplificados gerando um aumento significativo na capacidade de detectar os transcritos de baixa abundância. Na sequência as placas são carregadas usando o sistema AccuFill (Thermo Fisher Scientific), onde cada placa contempla 3 amostras distintas. Em seguida as placas são levadas para a reação de qRT-PCR no equipamento QuantStudio 12K (Thermo Fisher Scientific) que analisa até 4 placas, ou seja, 12 amostras no período de 120 minutos. Após a análise, a leitura dos espectros de qRT-PCR são avaliados com o auxílio do software ExpressionSuite (Thermo Fisher Scientific). Valores de Ct (threshold Cycle) superiores a 35 e score de amplificação abaixo de 1,24 foram excluídos conforme sugerido pelo fabricante. A expressão dos miRNAs foi normalizada, usando o método de normalização global conforme sugerido por Mestdagh et al (35).

3.7. Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real - (qRT-PCR)

Na coorte de validação utilizamos o qRT-PCR para avaliar a expressão dos miRNAs selecionados. Para esta finalidade, as reações de transcrição reversa para síntese do cDNA foi realizada com o SuperScript III First Strand Synthesis Kit (Applied Biosystems) e o termociclador Mastercycler ep (Eppendorf). Os testes foram executados em uma placa customizada (figura 3.3 - Template da placa customizada de qRT-PCR) contendo os ensaios de qRT-PCR para miR-145-5p (002278), miR-let7c (000379), miR-92a (000431), miR-30a (000417), miR-185 (002271) e miR-451 (001141) em StepOne Plus Real-Time Systems (Thermo Fisher Scientific). Cada amostra da reação do qRT-PCR compreende: 10 μL de TaqMan™ Master Mix; 1 μL da solução contendo iniciadores e sonda; 7,67 μL de água e 1,33 μL de cDNA; com um volume final de 20,0 μL . As reações são aquecidas a 95°C por 10 minutos, seguidas de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Calculou-se a expressão relativa do miRNA através do método comparativo de Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$) e o FC (mudança de dobra) foi calculada como $\text{FC} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, no qual Ct foi definido como o número de ciclos PCR onde a fluorescência atingia um limiar no gráfico de amplificação (36). Como controle endógeno utilizou-se a média geométrica de snRNA U6 (RNA nuclear pequeno não codificante-001973) e miR-16 (000391).

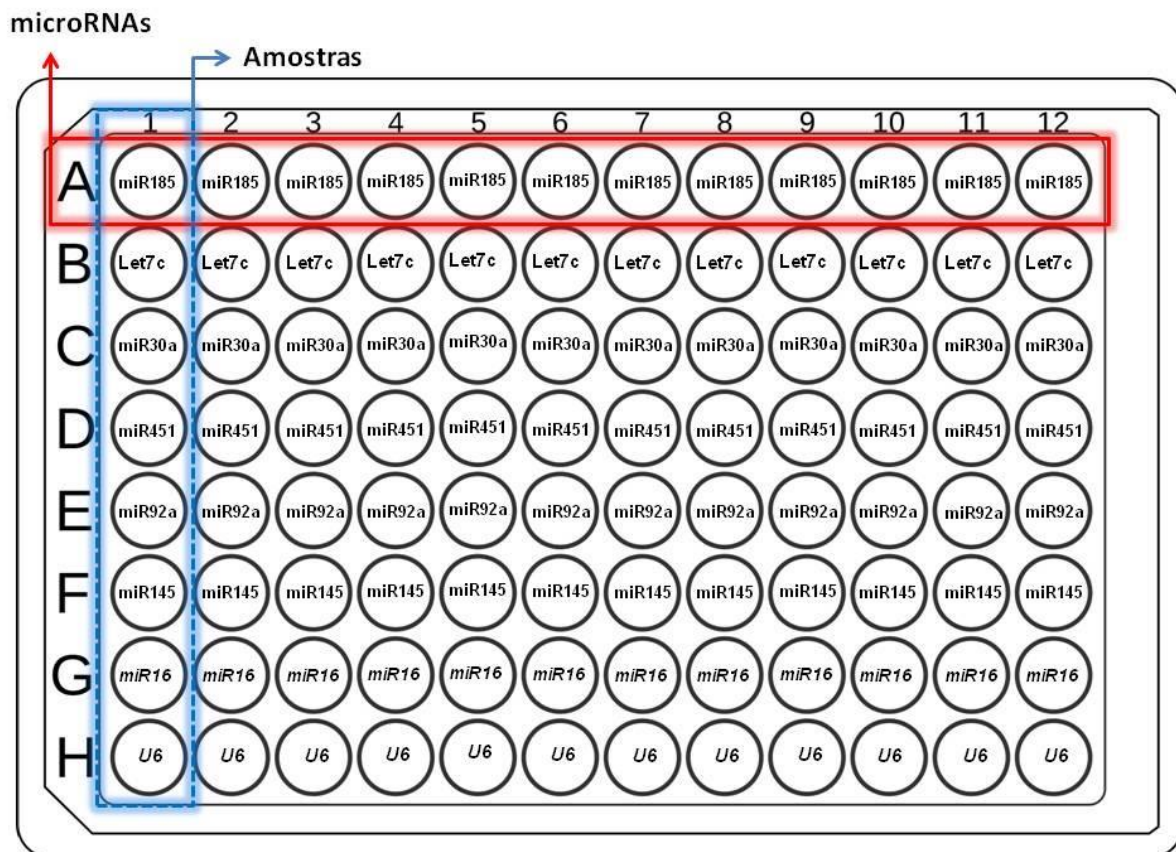


Figura 3.3 – Template da placa customizada de qRT-PCR

3.8. Cultura de células

Na cultura de células utilizamos células musculares atriais de comundongo – HL-1, que tem sido extensivamente usada para avaliar mecanismos relacionados à hipertrofia de miócitos cardíacos (37,38), as quais foram cultivadas a 37,5°C e 5% de atmosfera CO₂ no meio Claycomb. As células foram submetidas a suplementação de 2mM de L-Glutamina, penicilina-estreptomicina a 10% na ausência ou presença de 100 µM de norepinefrina por 2 semanas em gelatina-fibronectina [0.02 % (w/v) gelatina; 5 mg/ml fibronectina]. Posteriormente elas foram transfectadas com miR-145-5p mimético, anti-miR-145-5p ou mirRNA negativo. Na transfecção utilizamos o reagente Lipofectamine 2000. Após 48 horas da transfecção as células foram coletadas para análise em triplicata.

O RNA total dos miócitos cardíacos foram isolados utilizando o Kit Mirvana Paris (Applied Biosystems CA). Para a análise do RT-PCR utilizou-se o StepOnePlus (ThermoFisher). Como controle endógeno dos marcadores de hipertrofia Nppb (peptídeo natriurético tipo B) e Nppa (peptídeo natriurético tipo A) utilizou-se o Gapdh (Mm99999915_g1). Para normalizar a expressão do miR-145-5p utilizou-se como controle endógeno o snRNA U6.

3.9. Método estatístico e cálculo da amostra

As variáveis contínuas com distribuição normal e não normal foram avaliadas pelo teste t de Student não pareado e pelo teste U de Mann-Whitney, respectivamente. As variáveis categóricas foram avaliadas com o teste do qui-quadrado. Para as variáveis contínuas derivadas dos ensaios celulares utilizamos a variância unidirecional (ANOVA) e teste de Tukey. Na correlação entre as variáveis ecocardiográficas e a expressão log-transformada de miRNAs utilizamos o método de Pearson.

A análise de regressão linear multivariada avaliou a associação da expressão log-transformada de miRNAs circulantes com padrões geométricos de HVE, IMVE e VE na coorte de validação, ajustando para variáveis que foram relatadas como potenciais influenciadores do remodelamento do VE, tais como: idade, sexo, diabetes, índice de massa corporal, pressão arterial sistólica, creatinina, tabagismo e classes de anti-hipertensivos. As correlações e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. O software SPSS (SPSS 15.0) foi utilizado nas análises estatísticas.

3.10. Análise de enriquecimento de genes

No intuito de complementar a pesquisa e melhor compreender a relevância biológica dos miRNAs que se apresentaram diferencialmente expressos, realizamos uma análise de enriquecimento de genes. Essa análise foi realizada com os miRNAs diferencialmente expressos correlacionados aos pacientes hipertensos com e sem HVE. Utilizou-se a plataforma de código aberto miRWalk 2.0, onde é possível a comparação de alvos preditos por até doze algoritmos reunindo dados de diferentes *databases*. Foram considerados como possíveis alvos de miRNAs apenas genes

descritos em pelo menos quatro das cinco *databases* (miRWalk, miRanda, RNA22, TargetScan e miRDB). Para a determinação das vias de enriquecimento utilizamos o banco on-line DAVID – Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery.

4. RESULTADOS

Os resultados da presente tese estão apresentados no seguinte artigo:

1. **“Relationship between circulating microRNAs and left ventricular hypertrophy in hypertensive patients”**. Lopes ECP, Paim LR, Carvalho-Romano LFRS, Marques ER, Minin EOZ, Vegian CFL, Pio-Magalhães JA, Velloso LA, Coelho-Filho OR, Sposito AC, Matos-Souza JR, Nadruz W, Schreiber R. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, April 2022, volume 9, article 798954. doi: 10.3389/fcvm.2022.798954.

Relationship between circulating microRNAs and left ventricular hypertrophy in hypertensive patients.

Elisangela C. P. Lopes, Layde R. Paim, Luís F. R. S. Carvalho-Romano, Edmilson R. Marques, Eduarda O. Z. Minin, Camila F. L. Vegian, José A. Pio-Magalhães, Lício A. Velloso, Otavio R. Coelho-Filho, Andrei C. Sposito, José R. Matos-Souza, Wilson Nadruz, Roberto Schreiber.

Department of Internal Medicine, School of Medical Sciences, State University of Campinas, São Paulo, Brazil

Objective: Left ventricular hypertrophy (LVH) is a common complication of hypertension and microRNAs (miRNAs) are considered to play an important role in cardiac hypertrophy development. This study evaluated the relationship between circulating miRNAs and LVH in hypertensive patients.

Methods: Two cohorts [exploratory ($n = 42$) and validation ($n = 297$)] of hypertensive patients were evaluated by clinical, laboratory and echocardiography analysis. The serum expression of 754 miRNAs in the exploratory cohort and 6 miRNAs in the validation cohort was evaluated by the TaqMan OpenArray® system and quantitative polymerase chain reaction, respectively.

Results: Among the 754 analyzed miRNAs, ten miRNAs (miR-30a-5p, miR-let7c, miR-92a, miR-451, miR-145-5p, miR-185, miR-338, miR-296, miR-375, and miR-10) had differential expression between individuals with and without LVH in the exploratory cohort. Results of multivariable regression analysis adjusted for confounding variables showed that three miRNAs (miR-145-5p, miR-451, and miR-let7c) were independently associated with LVH and left ventricular mass index in the validation cohort. Functional enrichment analysis demonstrated that these three miRNAs can regulate various genes and pathways related to cardiac remodeling. Furthermore, *in vitro* experiments using cardiac myocytes demonstrated that miR-145-5p mimic transfection up-regulated the expression of brain and atrial natriuretic peptide genes, which are markers of cardiac hypertrophy, while anti-miR-145-5p transfection abrogated the expression of these genes in response to norepinephrine stimulus.

Conclusions: Our data demonstrated that circulating levels of several miRNAs, in particular miR-145-5p, miR-451, and let7c, were associated with LVH in hypertensive patients, indicating that these miRNAs may be potential circulating biomarkers or involved in hypertension-induced LV remodeling.

Introduction

Hypertension is characterized by high blood pressure (BP) levels and is associated with target-organs damage and increased risk of cardiovascular events (1–3). Sustained BP elevation increases left ventricular (LV) wall tension, and may commonly lead to a compensatory increase in LV mass (LVM), known as left ventricular hypertrophy (LVH). Importantly, LVH is associated with an increased risk of cardiovascular morbidity and mortality (4, 5).

Alternative factors, including genetic (6), epigenetic (7) and environmental (8) factors, can contribute to LVH. MicroRNAs (miRNAs) are a class of small non-coding RNAs that modulate gene expression at the post-transcriptional level. They are believed to comprise about 1% to 5% of the human genome, and currently at least 2,654 mature miRNA sequences have been described (9). Several studies in humans and experimental models have suggested an important role of miRNAs in cardiac hypertrophy (10), but little is known regarding the impact of miRNAs on hypertension-induced LV remodeling. In this regard, an association between selected circulating miRNAs and LVM has been reported in hypertensive individuals (11–15).

This study aimed at identifying circulating miRNAs related to LVH in hypertensive individuals and evaluating the functional role of selected miRNAs on markers of cardiac myocyte hypertrophy *in vitro*.

Materials and Methods

Additional detailed methods are included in the [Supplementary Data](#).

The authors declare that all supporting data are available within the article (and in the Data Supplement).

Study Populations

The present study included two cohorts of consecutive hypertensive patients followed at the Hypertension Outpatient Clinic of the Clinics Hospital of the University of Campinas who were enrolled from 2018 to 2019. The exploratory cohort included 42

patients (26 with LVH and 16 without LVH) and the validation cohort comprised 297 patients (162 with LVH and 135 without LVH). Exclusion criteria were age under 18 years, identifiable causes of secondary hypertension, evidence of significant cardiac valve disease and hypertrophic cardiomyopathy. The research was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki. This study was approved by the Human Research Ethics Committee of the University of Campinas, and all patients gave written informed consent to participate.

Clinical, Laboratory, and Echocardiography Data

Clinical data were gathered from each participant and included information on: age, sex, smoking, hypertension, diabetes mellitus, use of antihypertensive medications, body mass index (BMI), BP, heart rate. BP and heart rate were measured in the sitting position using a validated digital oscillometric device (HEM-705CP; Omron Healthcare, Kyoto, Japan) with appropriate cuff sizes. BMI was calculated as body weight divided by height squared (kg/m^2). Fasting low density lipoprotein (LDL)-cholesterol, high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol, triglycerides, creatinine, and glucose levels were measured using standard laboratory techniques. Hypertension was defined as systolic BP ≥ 140 mmHg or diastolic ≥ 90 mmHg or use of antihypertensive medications. Diabetes mellitus was diagnosed if fasting blood glucose was ≥ 126 mg/dl or when participants were taking hypoglycemic medications.

Echocardiography was performed by a single physician using a Vivid q device (General Electric, Milwaukee, Wisconsin, USA) equipped with a 3S-RS transducer, as previously described ([16–18](#)). LVMI was calculated as LV mass/body surface area. Relative wall thickness (RWT) was measured as $2 \times \text{posterior wall thickness} / \text{LV diastolic diameter}$. LVH was defined as LVMI ≥ 95 g/m^2 and ≥ 115 g/m^2 in women and men, respectively. LV geometric patterns were defined as follows: normal geometry (No LVH and RWT ≤ 0.42), concentric remodeling (No LVH and RWT > 0.42), eccentric hypertrophy (LVH and RWT ≤ 0.42) and concentric hypertrophy (LVH and RWT > 0.42). LV ejection fraction was estimated by the Simpson's method.

Extraction and Analysis of Serum miRNA Expression

Samples from both cohorts were extracted using the miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen). The quality of miRNA was assessed by measuring the percentage of miRNAs in the amount of small RNA using a Bioanalyzer 2,100 (Agilent, Santa Clara,

CA), as previously reported (19). In the exploratory cohort, the miRNA profile was analyzed by the TaqMan OpenArray Human MicroRNA system, a quantitative polymerase chain reaction (qPCR)-based miRNA array platform that contains 754 microRNAs on a microfluidic platform across two sets of primer pools, panel A and B (LifeTechnologies). Data were normalized using the global normalization method as suggested by the manufacturer and previous reports (20). Six circulating miRNAs with the highest fold change in the exploratory study were chosen for the validation in the validation cohort by qRT-PCR using a customized plate (LifeTechnologies). Reverse transcription was performed using the SuperScript®III First Strand Synthesis Kit. Specific miRNA PCR primers were synthesized by Life Technologies. Real-time PCR assays were performed with the TaqMan Master Mix (Life Technologies) on a 7900HT FAST Real- Time PCR System (Life Technologies). The comparative Ct ($\Delta\Delta C_t$) method to quantify relative gene expression was used, and fold change (FC) was calculated as $FC = 2^{-\Delta\Delta C_t}$, where C_t is defined as the PCR cycle number at which the fluorescence meets the threshold in the amplification plot (21). Data were normalized using a geometric mean of U6 snRNA (non-coding small nuclear RNA) and miR-16 as the housekeeping genes.

Gene Set Enrichment Analysis

To understand the biological relevance of differentially expressed miRNAs, we performed functional enrichment analysis. The miRNAs differentially expressed between patients with and without LVH that significantly correlated with LVMI were uploaded into miRWalk (version 2) (22). To strengthen the data, only mRNAs predicted in at least four of five tools (miRanda, miRDB, miRWalk, RNA22, and TargetScan) were considered as possible miRNA targets. We used the Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) to determine the enriched pathways. Only pathways with more than 10 genes, fold enrichment >1.5, and Fisher's exact test p -value < 0.05 were considered (23).

HL-1 Cells Culture and miRNA Transfection

We used the adult mouse atrial muscle cell line HL-1, which has been extensively used to assess mechanisms related to cardiac myocyte hypertrophy (24, 25), to evaluate the functional impact of selected miRNAs. HL-1 cells were cultured at 37°C and 5% CO₂ atmosphere in Claycomb medium (Sigma, 51800C) supplemented with 2 mM L-

Glutamine (Sigma, G7513), penicillin-streptomycin (Sigma, P4333) and 10 % (v/v) FCS (Sigma; F2442) in the absence or presence of 100 μ M of norepinephrine (Sigma, A0937) as a hypertrophic stimulus (26, 27) for 2 weeks (28) on gelatin-fibronectin [0.02 % (w/v) gelatin; 5 mg/ml fibronectin] (Sigma, F1141) pre-coated plates (29). Then, HL-1 cells were transiently transfected with miR-145-5p mimetic, anti-miR-145-5p or negative control miRNA (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, Grand Island, NY) at final concentrations of 30 nM. This assay was carried out using the Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) following the manufacturer's instructions. Cells were harvested for subsequent analyses 48 h after the transfection. All transfection experiments were carried out in triplicate.

Real-Time Quantitative PCR Analysis From Cells Culture

For detecting the *in vitro* expression of miRNAs and markers of cardiac myocyte hypertrophy, total RNA from cardiac myocytes was isolated using Mirvana Paris Kit (Applied Biosystems, CA). We evaluated the expression of brain natriuretic peptide (Nppb) and atrial natriuretic peptide (Nppa) genes, which are markers of cardiac myocyte hypertrophy, and miR-145-5p using the TaqMan Gene Expression Assays Kit (Applied Biosystems, CA). The polymerase chain reaction was performed in a StepOnePlus™ System (ThermoFisher) real-time PCR system. Gapdh (Mm99999915_g1) was used as endogenous control for Nppb and Nppa expression, while U6 snRNA was used to normalize miR-145-5p expression.

Statistical Analysis

Continuous variables with normal or non-normal distribution are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD) or median [25th, 75th percentiles]. Differences in continuous variables with normal or non-normal distribution between the studied groups (with and without LVH) were evaluated by unpaired student's *t*-test and Mann-Whitney U-test, respectively. Chi-square test was used to compare categorical variables. Differences in continuous variables derived from cell assays were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test. The correlation between echocardiographic variables and log-transformed expression of miRNAs was assessed by the Person's Method. Multivariable linear regression analysis evaluated the association of log-transformed expression of circulating miRNAs with LVH, LVMI, and LV geometric patterns in the validation cohort, adjusting for variables that have

been reported to influence LV remodeling: age, sex, diabetes, body mass index, systolic blood pressure, creatinine, smoking, and antihypertensive classes (5). p -value < 0.05 was considered statistically significant. SPSS 15.0 software was used for statistical analyses.

Results

Clinical Characteristics of Participants

The characteristics of the exploratory cohort ($n = 42$; 57.7 ± 8.5 years, 52% males) and the validation cohort ($n = 297$; 61.3 ± 12.1 years, 43% males) are shown in the [Supplementary Table S1](#). The cohorts had similar characteristics except for higher BP and rates of diabetes and use of diuretics, greater LV wall thickness and relative wall thickness values, and lower LDL-cholesterol levels in the validation cohort.

Clinical, laboratory, and echocardiographic features of the exploratory and validation cohorts according to the presence or not of LVH are presented in [Table 1](#). There were no differences in clinical and laboratory characteristics between participants according to LVH status, except for greater systolic BP and creatinine levels in LVH patients of the validation cohort compared with those without LVH. In addition, patients with LVH had greater LV dimensions, LV mass and RWT than those without LVH in both cohorts.

Characteristics	Exploratory cohort			Validation cohort		
	No LVH ($n = 16$)	LVH ($n = 26$)	p	No LVH ($n = 135$)	LVH ($n = 162$)	p
Age, years	56.5 ± 8.2	58.4 ± 8.8	0.49	59.9 ± 12.9	62.4 ± 11.3	0.09
Sex (Male/Female)	7/9	15/11	0.38	62/73	66/96	0.37
Smokers, (%)	2 (12)	6 (23)	0.66	16 (12)	17 (11)	0.85
Diabetics, (%)	4 (25)	13 (50)	0.21	76 (56)	98 (60)	0.54
Body mass index, kg/m^2	28.9 ± 4.6	29.8 ± 4.6	0.53	30.0 ± 6.0	30.4 ± 5.4	0.54
LDL-cholesterol, mg/dL	105 ± 40	117 ± 29	0.30	91 ± 33	94 ± 33	0.40
HDL-cholesterol, mg/dL	48 ± 14	48 ± 11	0.93	46 ± 12	46 ± 13	0.95
Triglycerides, mg/dL	110 [78, 181]	139 [94, 212]	0.21	123 [86, 180]	124 [90, 175]	0.94
Glucose, mg/dL	99 [86, 114]	100 [92, 137]	0.40	101 [91, 117]	102 [90, 130]	0.73
Creatinine, mg/dL	0.90 [0.76, 0.94]	0.89 [0.74, 1.07]	0.86	0.88 [0.73, 1.07]	0.99 [0.76, 1.20]	0.030
Systolic blood pressure, mm Hg	137.1 ± 21.1	142.3 ± 19.5	0.42	144.8 ± 23.9	152.3 ± 25.4	0.010
Diastolic blood pressure, mm Hg	73.5 ± 11.1	78.4 ± 14.3	0.25	82.2 ± 15.1	84.4 ± 15.3	0.23
Diuretics, n (%)	12 (75)	20 (77)	0.88	66 (49)	90 (55)	0.30
CCB, n (%)	9 (56)	13 (50)	0.94	54 (40)	78 (48)	0.20
β -Blockers, n (%)	8 (50)	13 (50)	0.99	59 (44)	70 (43)	0.93
ACEI or ARB, n (%)	12 (75)	21 (81)	0.95	118 (87)	143 (88)	0.96
Interventricular septum thickness, mm	8.9 ± 0.6	10.7 ± 1.3	<0.001	9.4 ± 1.2	11.4 ± 1.6	<0.001
Posterior wall thickness, mm	8.9 ± 0.6	10.6 ± 1.1	<0.001	9.5 ± 1.2	11.3 ± 1.3	<0.001
LV end-diastolic diameter, mm	47.6 ± 2.5	51.0 ± 5.3	0.026	47.0 ± 4.4	51.9 ± 6.4	<0.001
LV ejection fraction, %	68.9 ± 5.8	65.1 ± 4.4	0.043	67.5 ± 6.8	63.2 ± 10.9	<0.001
Relative wall thickness, mm	0.37 ± 0.03	0.42 ± 0.01	0.004	0.41 ± 0.06	0.44 ± 0.07	<0.001
LV mass index, g/m^2	89.6 ± 6.3	138.8 ± 4.7	<0.001	85.7 ± 13.7	133.1 ± 28.7	<0.001

Continuous data with normal and non-normal distribution are presented as mean $\pm$ standard deviation and median [25th, 75th percentiles]. ACEI or ARB, angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers; CCB, calcium channel blockers; HDL, high density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; LV, left ventricular; LVH, left ventricular hypertrophy.

Table 1. Clinical, laboratory and echocardiographic characteristics of the cohorts.**MicroRNA Expression Levels and LV Remodeling in Exploratory and Validation Cohorts**

The analysis of serum expression of 754 miRNAs using the OpenArray MicroRNA System in the exploratory cohort showed that 357 miRNAs were expressed in at least one of the two groups (with and without LVH). For the differential analysis, only 122 miRNAs that were expressed in at least 50% of the participants within each group were considered ([Supplementary Table S2](#)). Of these, 10 miRNAs (miR-30a-5p, miR-let7c, miR-92a, miR-451, miR-145-5p, miR-185, miR-338, miR-296, miR-375 and miR-10) were significantly upregulated in patients with LVH compared with those without LVH ([Figure 1A](#), [Supplementary Table S3](#) and [Figure S1](#)). Of these 10 miRNAs, six miRNAs with the highest fold change in the exploratory study (miR-30a-5p, miR-let7c, miR-92a, miR-451, miR-145-5p, miR-185) were chosen to have their serum expression measured by qRT-PCR in the validation cohort. All except one miRNA (miR-185) showed higher expression in LVH patients when compared with those without LVH in the validation cohort ([Figure 1B](#) and [Supplementary Table S3](#)). Bivariate correlation analysis was then performed to evaluate the relationship of circulating miRNAs with LVMI in the validation cohort. Of the six tested miRNAs, miR-145-5p ($r = 0.153$; $p = 0.011$), miR-451 ($r = 0.162$; $p = 0.016$) and miR-let7c ($r = 0.242$; $p < 0.001$) significantly correlated with LVMI, while miR-92a ($r = 0.098$; $p = 0.10$), miR-30a-5p ($r = 0.093$; $p = 0.12$) and miR-185 ($r = -0.155$; $p = 0.07$) did not. Systolic BP was positively correlated with miR-30a-5p ($r = 0.146$; $p = 0.015$) and miR-451 ($r = 0.213$; $p = 0.002$), while no correlation between the studied miRNAs and the presence of diabetes was observed ([Supplemental Table S4](#)).

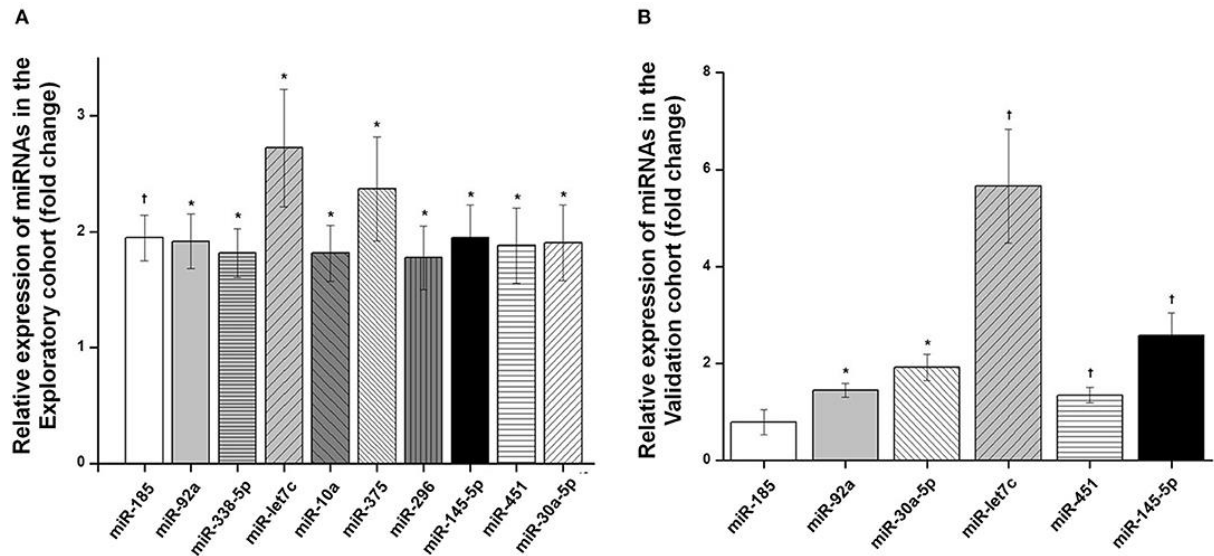


Figure 1. Differential expression analysis of miRNAs obtained in serum of hypertensive patients. **(A)** Differentially expressed serum miRNAs (fold change) in patients with left ventricular hypertrophy (LVH) compared with patients without LVH in the exploratory cohort. **(B)** Differentially expressed serum miRNAs (fold change) in patients with LVH compared with patients without LVH in the validation cohort. Box and whisker plots are represented for each miRNA and indicate the fold change in expression of LVH patients compared with patients without LVH. p-values from independent Mann-Whitney test are presented. † $p < 0.001$; * $p < 0.05$.

Results of multivariable linear regression analyses adjusted for potentially relevant confounders (age, sex, body mass index, systolic blood pressure, diabetes mellitus, creatinine, smoking, and antihypertensive medications) showed that miR-30a-5p, miR-let7c, miR-92a, miR-451, miR-145-5p remained associated with LVH, while only miR-145-5p, miR-let7c, and miR-451 showed an independent association with LVMI in the validation cohort (Supplementary Table S5). As a secondary analysis, we evaluated the relationship between LV geometric patterns and selected miRNAs (miR-30a-5p, miR-let7c, miR-92a, miR-451, miR-145-5p, miR-185) adjusted for potential confounders in the validation cohort. Compared with the normal geometric pattern, patients with concentric hypertrophy had greater expression of miR-let7c, miR-92a, miR-145-5p, miR-30a-5p, and miR-451, while patients with eccentric hypertrophy had greater expression of miR-let7c and miR-145-5p (Supplementary Table S6).

Gene Set Enrichment Analysis

Using the miRWALK2.0 software, 1030 predicted genes were identified to be targeted by the three miRNAs that were associated with both LVH and LVMI (miR-145-5p, miR-let7c and miR-451). The number of genes targeted by each of the miRNAs is shown

in the Venn diagram presented in [Figure 2A](#). [Figure 2B](#) shows the predicted pathways of the aforementioned miRNAs. Pathways related to cardiac remodeling and vascular diseases, and metabolic and inflammatory pathways were predicted, including calcium and adrenergic signaling pathways, focal adhesion and hypertrophic cardiomyopathy.

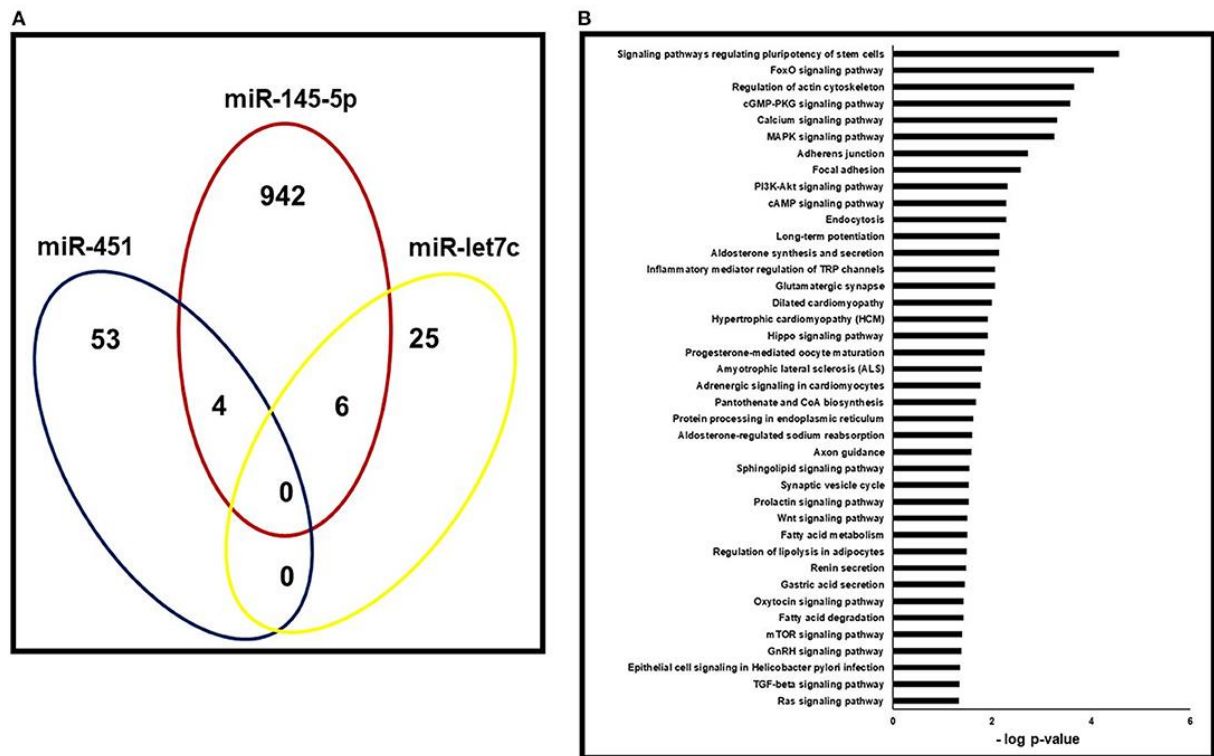


Figure 2. Pathway enrichment analysis of predicted target genes. **(A)** Gene ontology analysis for the three miRNAs (miR-145-5p, miR-451 and miR-let7c) that correlated with both LVH and LVMI in the validation cohort. Venn's diagram of genes targeted by each of the three miRNAs with $p < 0.05$. **(B)**- Gene set enrichment analyses of pathways targeted by miR-145-5p, miR-451 and miR-let7c.

Overexpression of miR-145-5p Increases Hypertrophic Genes

Due to controversial results in the literature ([30–32](#)), we decided to assess whether miR-145 is involved in the regulation of cardiac myocyte hypertrophy *in vitro*. We first evaluated the expression of this miRNA in HL-1-cells. We found that miR-145-5p was constitutively expressed in these cells and that its expression increased by ≈ 3 -fold after norepinephrine stimulus and by ≈ 10 -fold after transfection with miR-145-5p mimic ([Figure 3A](#)). The expression of Nppa and Nppb significantly increased in HL-1-cells transfected with miR-145-5p mimic (30nM) and in response to norepinephrine ([Figures 3B,C](#)). By contrast, transfection of anti-miR-145-5p (30nM) markedly decreased norepinephrine-induced expression of Nppa and Nppb when compared with cells transfected with negative control ([Figures 3B,C](#)).

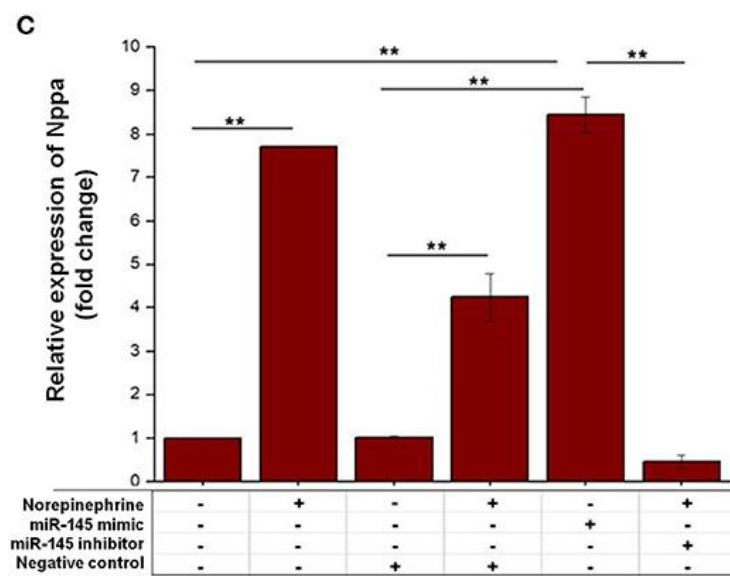
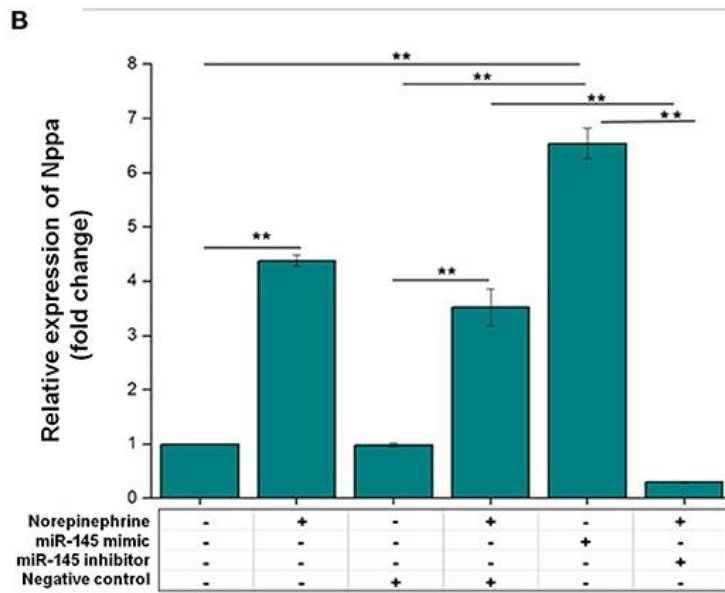
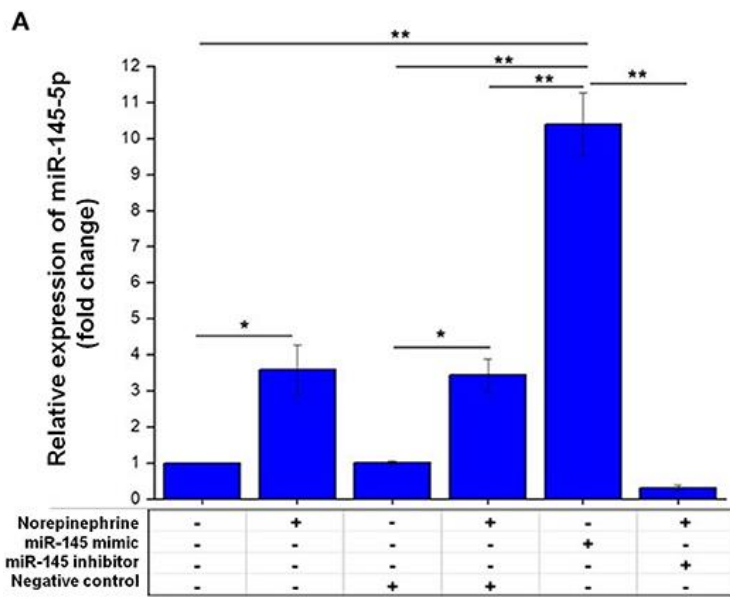


Figure 3. Effects of miR-145-5p on cardiac myocyte hypertrophy. **(A)** The mRNA levels of miR-145-5p were increased in HL-1 cells treated with norepinephrine or transfected with miR-145-5p mimic (30 nM). Relative miR-145-5p expression corresponded to average expressions (fold change) normalized to U6. **(B,C)** HL-1 cells transfected with miR-145-5p mimic (30 nM) increased the mRNA level of Nppa (atrial natriuretic peptide gene) and Nppb (brain natriuretic peptide gene), while transfection with miR-145-5p inhibitor (30 nM) abrogated norepinephrine-induced increases in Nppa and Nppb. Relative expressions of hypertrophy markers were expressed as the average expressions (fold change) normalized to Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), by RT-PCR analysis. Data are presented as mean $\pm$ SEM ($n = 3$). Differences in the expression of Nppa, Nppb and miR-145 were assessed by one-way ANOVA and Tukey *post hoc* test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

Discussion

In the present study, three main results were reported. First, we found a differential expression of 10 miRNAs from 754 studied miRNAs between hypertensive patients with and without LVH in an exploratory cohort. Second, we confirmed a differential expression of 5 miRNAs (miR-30a-5p, miR-let7c, miR-92a, miR-451, and miR-145-5p) in an extended sample of hypertensive patients (validation cohort). Of these miRNAs, miR-145-5p, miR-451, and let7-c expression levels were significantly associated with both LVH and LVMI even after adjusting for relevant confounders. Third, results of cell culture assays demonstrated a role of miR-145-5p in the development of cardiac myocyte hypertrophy. These findings provide novel evidence regarding the potential value of previously undisclosed miRNAs as circulating biomarkers or potential mediators of hypertension-induced LV remodeling.

Several studies have suggested that miRNAs play an important role in the LV remodeling and may also serve as circulating biomarkers of LVH ([11](#), [33](#), [34](#)). However, the knowledge regarding the relationship between circulating miRNAs and LVH in hypertensive individuals is scarce and has been restricted to the evaluation of a small number of pre-selected miRNAs in small samples of patients. In this regard, relationships between LVMI and circulating levels of miR-1, miR-133a, miR-26b, miR-208b, miR-499, and miR-21, miR-9 ([12](#)), miR-30e ([13](#)), miR-27b ([14](#)), miR-29 ([15](#)), miR-7, and miR-26 ([34](#)) have been reported. Notably, none of these miRNAs showed an association with LVH in our study. These divergences could be explained by differences in sample size, and in ethnic and clinical characteristics among the studied samples, and reinforce the need of confirmatory studies in alternative populations. It is

also worth mentioning that the miRNAs which were associated with LVH in our validation cohort were derived from the evaluation of 754 miRNAs in an exploratory sample of 42 hypertensive individuals, thus strengthening the validity of our findings. In our analysis, there was a significant association of circulating miR-145-5p levels with LVMI and LVH. We then evaluated the impact of this miRNA on cardiac myocyte hypertrophy *in vitro*. The results of cell assays showed that treatment with norepinephrine, a hypertrophic stimulus, increased the expression of miR-145-5p, while overexpression of miR-145-5p also upregulated the expression of markers of cardiac myocyte hypertrophy. In addition, transfection of anti-miR-145-5p markedly decreased norepinephrine-induced expression of cardiac myocyte hypertrophy markers. These data support the notion that miR-145-5p may play a role in the pathophysiology of cardiac myocyte hypertrophy. Conversely, our findings are in contrast with previous *in vitro* studies which showed that miR-145 transfection attenuated isoproterenol- and angiotensin II-induced cardiac myocyte hypertrophy (30, 31) but in agreement with the results of Xu et al. (32) who showed that miR-145 expression increases in induced hypertrophic cardiomyocytes by angiotensin II. The reasons for these discrepancies are not clear, but it is possible that differences in the experimental protocol among the studies might have played a role in this regard. In our protocol, HL-1 cells were treated or not with norepinephrine for 2 weeks, transfected with miR-145-5p or miR-145-5p antagonist, and then analyzed 48 h after. In the study by Lin et al. (30) H9C2 cells were overexpressed with miR-145-5p for 6 h, and then treated with Angiotensin-II for 24 h before analyses, while in the study by Li et al., neonatal rat cardiac myocytes from 1-day-old Sprague–Dawley rats were transfected with miR-145 adenovirus for 48 h, and then stimulated with isoproterenol for 24 h before analyses (31). Regardless of the divergences in the results of *in vitro* studies, our findings provide novel evidence that miR-145-5p may be a circulating marker of LV hypertrophy among hypertensive individuals.

Our data showed that not only miR-145-5p, but also miR-30a-5p, miR-let7c, miR-92a, miR-451 had an independent relationship with LVH in both validation and exploratory cohorts. Notably, these latter 4 miRNAs (miR-30a-5p, miR-let7c, miR-92a, miR-451) have been previously reported to be involved in adverse cardiac remodeling in experimental models (35–38). In addition, we found that only miR-145-5p, miR-let7c, and miR-451 were related to both LVH and LVMI, and therefore could be more specifically involved in the development of hypertension-induced LV hypertrophy. To

better understand the biological relevance of these three miRNAs, functional enrichment analysis was performed aiming at identifying their targeted genes and pathways. We found that these miRNAs regulate genes and pathways related to cardiac remodeling and vascular diseases, including metabolic, inflammatory, focal adhesion, calcium and adrenergic signaling pathways. Overall, the current findings suggest that miR-145-5p, miR-let7c, and miR-451 comprise an attractive group of miRNAs that might play a role in hypertension-induced LV remodeling and could emerge as potential biomarkers or therapeutic targets in this regard.

Hypertension is classically assumed to induce LV concentric hypertrophy due to increases in LV wall stress (5). However, several other factors, including hemodynamic variables, as well as acquired and genetic factors may modulate LV geometry in hypertensive individuals, resulting in alternative LV geometric patterns, such as eccentric hypertrophy (5, 39). Available evidence obtained in experimental and clinical settings has also suggested that miRNAs may play a role in the development of LV geometric patterns (11, 40, 41). In our study, we found that patients with eccentric hypertrophy had increased expression of miR-let7c, and miR-145-5p, while those with concentric hypertrophy had higher expression of miR-let7c, miR-92a, miR-145-5p, miR-30a-5p, and miR-451. As far as we know, this is the first study to describe the expression of these aforementioned miRNAs as a function of LV geometric patterns in hypertensive patients and further indicate that the assessment of LV geometry can also be a target in studies focusing on the role of miRNAs in hypertension-induced LV remodeling.

We acknowledge that our study has some limitations. First, we only selected six miRNAs for validation among the miRNAs that were differentially expressed between hypertensive patients with and without LVH in the exploratory cohort. Therefore, further studies should be performed to validate the remaining miRNAs whose expression was different between the two groups. Second, as any cross-sectional study, the influence of residual confounding cannot be excluded and the association between miRNAs and LV structural parameters cannot be assumed to be causal. Third, it is possible that the use of antihypertensive medications and clinical characteristics might have influenced our findings. In order to overcome this limitation, we included each antihypertensive class and potential relevant clinical confounders as independent variables in multivariable analyses regarding the validation cohort. Conversely, because the major aim of the exploratory cohort was to perform miRNA mining and due to its smaller

number of enrolled patients, we opted to only perform unadjusted analyses for the relationship of miRNAs with LVH in this cohort.

In conclusion, starting from an analysis of 754 miRNAs, we found that the circulating levels of three miRNAs (miR-145-5p, miR-451, and let7-c) were associated with LVH and left ventricular mass index in hypertensive individuals. Furthermore, *in vitro* studies showed that miR-145-5p may have a pro-hypertrophic effect on cardiac myocytes. These findings suggest that miR-451 and let7c, and especially miR-145-5p, may be potential circulating biomarkers or may be involved hypertension-induced LV remodeling.

Data Availability Statement

The original contributions presented in the study are included in the article/[Supplementary Material](#), further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

Ethics Statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by was approved by the Ethics Committee of the State University of Campinas. 56841616.5.0000.5404. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

Author Contributions

EL, RS, and WN designed this study, acquired and interpreted data, and wrote the manuscript. LP, EOM, LC-R, ERM, CV, JP-M, JM-S, OC-F, and AS acquired and/or interpreted data and revised manuscript for intellectual content. All authors read and agreed with the published version of the manuscript.

Funding

The study was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP 2017/23563-1) for Dr. Schreiber and by FAPESP 2013/07607-8.

Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary Material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcvm.2022.798954/full#supplementary-material>

Abbreviations

BP, blood pressure; LV, left ventricular; LVM, left ventricular mass; LVMI, left ventricular mass index; LVH, left ventricular hypertrophy; miRNA, microRNA; Nppb, brain natriuretic peptide gene; Nppa, atrial natriuretic peptide gene; RT-qPCR, real-time quantitative polymerase chain reaction.

References

1. Williams B. The year in hypertension. *J Am Coll Cardiol.* (2009) 55:65–73. doi: 10.1016/j.jacc.2009.08.037
[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
2. Nadruz W Jr, Claggett B, Henglin M, Shah AM, Skali H, Rosamond WD, et al. Racial disparities in risks of stroke. *N Engl J Med.* (2017) 376:2089–90. doi: 10.1056/NEJMc1616085
[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
3. Nadruz W Jr, Claggett B, Henglin M, Shah AM, Skali H, Rosamond WD, et al. Widening racial differences in risks for coronary heart disease. *Circulation.* (2018) 137:1195–7. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030564
[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
4. Lorell BH, Carabello BA. Left Ventricular hypertrophy. *Circulation.* (2000) 102:470–9. doi: 10.1161/01.CIR.102.4.470
[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
5. Nadruz W Jr. Myocardial remodeling in hypertension. *J Hum Hypertens.* (2015) 29:1–6. doi: 10.1038/jhh.2014.36

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

6. Rossi GP, Ceolotto G, Caroccia B, Lenzini L. Genetic screening in arterial hypertension. *Nat Rev Endocrinol.* (2017) 13:289–98. doi: 10.1038/nrendo.2016.196

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

7. Gosev I, Zeljko M, Duric Z, Nikolic I, Gosev M, Ivcevic S, et al. Epigenome alterations in aortic valve stenosis and related left ventricular hypertrophy. *Clin Epigenetics.* (2017) 9:106. doi: 10.1186/s13148-017-0406-7

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

8. Sakamoto M, Matsutani D, Kayama Y. Possibility of a New Therapeutic Strategy for Left Ventricular Dysfunction in Type 2 Diabetes. *J Clin Med Res.* (2018) 10:799–805. doi: 10.14740/jocmr3584w

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

9. Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.* (2019) 47: D155–62. doi: 10.1093/nar/gky1141

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

10. Wehbe N, Nasser AS, Pintus G, Badran A, Eid AH, Baydoun E. MicroRNAs in cardiac hypertrophy. *Int J Mol Sci.* (2019) 20:4714. doi: 10.3390/ijms20194714

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

11. Kontaraki JE, Marketou ME, Parthenakis FI, Maragkoudakis S, Zacharis EA, Petousis S, et al. Hypertrophic and antihypertrophic microRNA levels in peripheral blood mono-nuclear cells and their relationship to left ventricular hypertrophy in patients with essential hypertension. *J Am Soc Hypertens.* (2015) 9:802–10. doi: 10.1016/j.jash.2015.07.013

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

12. Kontaraki JE, Marketou ME, Zacharis EA, Parthenakis FI, Vardas PE. MicroRNA-9 and microRNA-126 expression levels in patients with essential hypertension: potential markers of target-organ damage. *J Am Soc Hypertens.* (2014) 8:368–75. doi: 10.1016/j.jash.2014.03.324

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

13. Xu H, Xu Y, Yang J, Juang J. Circulating MicroRNA-30e Predicts left ventricular hypertrophy in essential hypertensive patients. *Rev Invest Clin.* (2021) 73:138–44. doi: 10.24875/RIC.20000447

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

14. Wang Y, Chen S, Gao Y, Zhang S. Serum MicroRNA-27b as a screening biomarker for left ventricular hypertrophy. *Tex Heart Inst J.* (2017) 44:385–9. doi: 10.14503/THIJ-16-5955
[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
15. Huang Y, Tang S, Huang C, Chen J, Li J, Cai A, et al. Circulating miRNA29 family expression. levels in patients with essential hypertension as potential markers for left ventricular hypertrophy. *Clin Exp Hypertens.* (2017) 39:119–25. doi: 10.1080/10641963.2016.1226889
[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
16. De Rossi G, Matos-Souza JR, Costa e Silva AA, Campos LF, Santos LG, Azevedo ER, et al. Physical activity and improved diastolic function in spinal cord-injured subjects. *Med Sci Sports Exerc.* (2014) 46:887–92. doi: 10.1249/MSS.0000000000000187
[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
17. Lacchini R, Jacob-Ferreira ALB, Luizon MR, Coeli FB, Izidoro-Toledo TC, Gasparini S, et al. Matrix metalloproteinase 9 gene haplotypes affect left ventricular hypertrophy in hypertensive patients. *Clin Chim Acta.* (2010) 411:1940–4. doi: 10.1016/j.cca.2010.08.008
[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
18. Lacchini R, Jacob-Ferreira ALB, Luizon MR, Gasparini S, Ferreira-Sae MC, Schreiber R, et al. Common matrix metalloproteinase 2 gene haplotypes may modulate left ventricular remodelling in hypertensive patients. *J Hum Hypertens.* (2012) 23:171–7. doi: 10.1038/jhh.2011.8
[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
19. Li Y, Kowdley KV. Method for microRNA isolation from clinical sérum samples. *Anal Biochem.* (2012) 431:69–75. doi: 10.1016/j.ab.2012.09.007
[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
20. Paim LR, Schreiber R, de Rossi G, Matos-Souza JR, Costa E Silva AA, Calegari DR, et al. Circulating microRNAs, vascular risk, and physical activity in spinal cord-injured subjects. *J Neurotrauma.* (2019) 36:845–52. doi: 10.1089/neu.2018.5880
[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)
21. 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. doi: 10.1006/meth.2001.1262

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

22. Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N. miRWalk—database: prediction of possible miRNA binding sites by “walking” the genes of three genomes. *J Miomed Inform.* (2011) 44:839–47. doi: 10.1016/j.jbi.2011.05.002

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

23. Zhang X, Wang X, Wu J, Peng J, Deng X, Shen Y, et al. The diagnostic values of circulating miRNAs for hypertension and bioinformatics analysis. *Biosci Rep.* (2018) 38:BSR20180525. doi: 10.1042/BSR20180525

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

24. White SM, Constantin PE, Claycomb WC. Cardiac physiology at the cellular level: use of cultured HL-1 cardiomyocytes for studies of cardiac muscle cell structure and function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* (2004) 286:H823–9. doi: 10.1152/ajpheart.00986.2003

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

25. Hao L, Ren M, Rong B, Xie F, Lin MJ, Zhao YC, et al. TWEAK/Fn14 mediates atrial-derived HL-1 myocytes hypertrophy via JAK2/STAT3 signalling pathway. *J Cell Mol Med.* (2018) 22:4344–53. doi: 10.1111/jcmm.13724

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

26. Chen Y, Qiao X, Zhang L, Li X, Liu Q. Apelin-13 regulates angiotensin ii-induced Cx43 downregulation and autophagy via the AMPK/mTOR signaling pathway in HL-1 cells. *Physiol Res.* (2020) 69:813–22. doi: 10.33549/physiolres.934488

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

27. Landstrom AP, Kellen CA, Dixit SS, van Oort RJ, Garbino A, Weisleder N, et al. Junctophilin-2 expression silencing causes cardiocyte hypertrophy and abnormal intracellular calcium handling. *Circ Heart Fail.* (2011) 4:214–23. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.110.958694

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

28. Bloch L, Ndongson-Dongmo B, Kusch A, Gragun D, Heller R, Huber O. Real-time monitoring of hypertrophy in HL-1 cardiomyocytes by impedance measurements reveals different modes of growth. *Cytotechnology.* (2016) 68:1897–907. doi: 10.1007/s10616-016-001-3

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

29. Claycomb WC, Lanson NA Jr, Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, et al. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic

characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1998) 95:2979–84. doi: 10.1073/pnas.95.6.29.79

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

30. Lin KH, Kumar VB, Shanmugam T, Shibu MA, Chen RJ, Kuo CH, et al. miR-145-5p targets paxillin to attenuate angiotensin II-induced pathological cardiac hypertrophy via downregulation of Rac 1, pJNK, p-c-Jun, NFATc3, ANP and by Sirt-1 upregulation. *Mol Cell Biochem*. (2021). doi: 10.1007/s11010-021-04100-w;

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

31. Ruotian L, Guijun Y, Qun Z, Yue J, Haixiang S, Yali H, et al. miR-145 inhibits isoproterenol-induced cardiomyocyte hypertrophy by targeting the expression and localization of GATA6. *FEBS Lett*. (2013) 587:1754–61. doi: 10.1016/j.febslet.2013.04.018

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

32. Xu XD, Song XW, Li Q, Wang GK, Jing Q, Qin YW. Attenuation of microRNA-22 derepressed PTEN to effectively protect rat cardiomyocytes from hypertrophy. *J Cell Physiol*. (2012) 227:1391–8. doi: 10.1002/jcp.22852

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

33. Sayed D, Hong C, Chen IY, Lypowy J, Abdellatif M. MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circ Res*. (2007) 100:416–24. doi: 10.1161/01.RES.0000257913.42552.23

[CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

34. Kaneto CM, Nascimento JS, Moreira MCR, Ludovico ND, Santana AP, Silva RAA, et al. MicroRNA profiling identifies miR-7-5p and miR-26b-5p as differentially expressed in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy. *Braz J Med Biol Res*. (2017) 50: e6211. doi: 10.1590/1414-431X20176211

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

35. Yin X, Peng C, Ning W, Li C, Ren Z, Zhang J, et al. miR-30a downregulation aggravates pressure overload-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Mol Cell Biochem*. (2013) 379:1–6. doi: 10.1007/s11010-012-1552-z

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

36. Bellera N, Barba I, Rodriguez-Sinovas A, Ferret E, Asín MA, Gonzalez-Alujas MT, et al. Single intracoronary injection of encapsulated antagomir-92a promotes angiogenesis and prevents adverse infarct remodeling. *J Am Heart Assoc*. (2014) 3:e000946. doi: 10.1161/JAHA.114.000946

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

37. Liang C, Gao L, Liu Y, Liu Y, Yao R, Li Y, et al. Mir-451 antagonist protects against cardiac fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mouse heart. *Life Sci.* (2019) 224:12–22. doi: 10.1016/j.lfs.2019.02.059

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

38. Tolonen AM, Magga J, Szabó Z, Viitala P, Gao E, Moilanen AM, et al. Inhibition of Let-7 microRNA attenuates myocardial remodeling and improves cardiac function postinfarction in mice. *Pharmacol Res Perspect.* (2014) 2:e00056. doi: 10.1002/prp2.56

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

39. Cuspidi C, Sala C, Negri F, Mancia G, Morganti A, Hypertension IS. Prevalence of left-ventricular hypertrophy in hypertension: na updated review of echocardiographic studies. *J Hum Hypertens.* (2012) 26:343–9. doi: 10.1038/jhh.2011.104

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

40. Raso A, Dirkx E, Philippen LE, Fernandez-Celis A, De Majo F, Sampaio-Pinto V, et al. Therapeutic delivery of miR-148a suppresses ventricular dilation in heart failure. *Mol Ther.* (2019) 27:584–99. doi: 10.1016/j.ymthe.2018.11.011

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

41. Jhou J, Gao J, Jhang X, Liu Y, Gu S, Jhang X, et al. microRNA-340-5p Functions downstream of cardiotrophin-1 to regulate cardiac eccentric hypertrophy and heart failure via target gene dystrophin. *Int Heart J.* (2015) 56:454–8. doi: 10.1536/ihj.14-386

[PubMed Abstract](#) | [CrossRef Full Text](#) | [Google Scholar](#)

5. DISCUSSÃO GERAL

O presente estudo foi fragmentado em três etapas, onde na coorte exploratória foram avaliadas as expressões séricas de 754 microRNAs em 42 pacientes hipertensos que apresentavam ou não hipertrofia do ventrículo esquerdo (26 com HVE e 16 sem HVE). Dentre os 754 miRNAs, 357 miRNAs foram expressos em pelo menos um dos dois grupos (com e sem HVE) e 122 foram expressos em pelo menos 50% dos participantes dentro de cada grupo na coorte exploratória. Destes, 10 apresentaram expressão significativamente alterada quando comparados os grupos com e sem HVE. Na coorte de validação, a partir dos resultados obtidos na coorte exploratória, avaliou-se a expressão de seis microRNAs (miR-30a-5p, miR-let7c, miR-92a, miR-451, miR-145-5p e miR-185) em 297 pacientes hipertensos, sendo 162 com HVE e 135 sem HVE. Dos seis miRNAs inicialmente avaliados cinco (miR-30a-5p, miR-let7c, miR-92a, miR-451 e o miR-145-5p) confirmaram alteração significativa na expressão quando comparados os grupos com e sem HVE. A terceira etapa contemplou o cultivo de células a fim de avaliar o papel do miR-145-5p no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca e constatou-se que na presença do mimetizador miR-145-5p a expressão dos marcadores de hipertrofia Nppa e Nppb ficou até 8 vezes maior quando comparado aos grupos negativos ou com inibidor do miR-145-5p.

O miR-185 não apresentou expressão diferencialmente significativa na coorte de validação quando comparados os grupos hipertensos com e sem HVE. Kim JO e *et al*, constataram em seu estudo realizado com miócitos ventriculares de ratos neonatos que a expressão do miR-185 possui potencialmente um papel anti-hipertrófico no coração, uma vez que sua regulação negativa apresentou efeitos pró-hipertróficos no coração (39). Já no estudo de Lin R e *et al*, o mir-185-5p apresentou-se como um potencial regulador de fibrose miocárdica, doença que, assim como a HVE, pode levar a insuficiência cardíaca (40).

Estudos apontam que a superexpressão do miR-92a é observada em pacientes com desenvolvimento de tumores malignos, devido ao envolvimento na proliferação celular, invasão e metástase e inibição de apoptose (41). Em seu estudo Schee C *et al* (42), apontaram uma expressão aumentada do miR-92a em pacientes com câncer retal. Shigoka M e *et al*, associaram a super expressão do miR-92a ao

carcinoma hepato celular (43). Em pacientes hipertensos, pesquisas demonstraram que a expressão aumentada do miR-92a pode estar associado ao desenvolvimento de placas ateroscleróticas, podendo funcionar como biomarcador dessa condição clínica (32,44). O presente estudo é o único, de nosso conhecimento, que avaliou a expressão de miR-92a em pacientes com HVE.

O miR-30a-5p quando com expressão reduzida está relacionado ao câncer de pulmão de células não pequenas e sua subexpressão foi associado a variáveis clínicas mais agressivas em pacientes com câncer colorretal (45,46). No estudo de Ding H e *et al* (47), o miR-30a-5p apresentou expressão aumentada em pacientes com insuficiência cardíaca quando comparado ao grupo controle sem insuficiência cardíaca, e assim como em nosso estudo a expressão aumentada desse microRNA foi encontrada nos pacientes com HVE o que corrobora com outros estudos onde esse miRNA está associado a doenças cardiovasculares.

Assim como descrito para os miRNAs abordados acima, existem relatos na literatura sobre o envolvimento do miR-451 com o desenvolvimento de alguns tipos de câncer (48,49). O miR-451 está envolvido em processos fisiológicos e patológicos relacionados ao câncer como proliferação, apoptose e angiogênese (48). No presente estudo, observamos um aumento na expressão do miR-451 em pacientes com HVE. Marques FZ *et al* (50) também demonstraram o aumento na expressão deste miRNA em amostras de córtex renal de pacientes hipertensos e Kuwabara Y *et al* (51) demonstraram o aumento na expressão de miR-451 na cardiomiopatia diabética em ratos, enquanto Sonsoz MR *et al* (52), observou aumento na expressão deste miRNA em pacientes com cardiomiopatia hipertrófica.

O miR-145-5p foi associado ao IMVE e HVE em nosso estudo. Seu impacto também foi avaliado na hipertrofia de miócitos cardíacos *in vitro*. Observamos que com o tratamento de norepinefrina a expressão do miR-145-5p aumentou e que com a expressão aumentada desse microRNA também obtivemos aumento na expressão dos marcadores de hipertrofia dos miócitos cardíacos. Com a transfecção do anti-miR-145-5p obtivemos uma diminuição na expressão induzida pela norepinefrina de marcadores de hipertrofia de miócitos cardíacos. Esses resultados embasam a ideia de que o miR-145-5p pode desempenhar um papel importante na fisiopatologia da hipertrofia de miócitos cardíacos. Estudos anteriores realizados *in vitro* (53,54) mostraram que a transfecção do miR-145 atenuou a hipertrofia de miócitos cardíacos induzida por isoprotenerol e angiotensina II, o que vem em desconformidade com nossos

achados. É possível que essa divergência ocorra devido principalmente as diferenças de protocolo, uma vez que em nosso estudo as células HL-1 foram tratadas com norpinefrina por 2 semanas, transfectadas com o antagonista miR-145-5p ou com o miR-145-5p e analisadas após 48 horas. Já nos outros dois estudos os protocolos utilizados eram diferentes e as células H9C2 foram tratadas por um tempo menor, o que pode explicar a diferença encontrada.

Estudos mostraram relação entre o IMVE e os níveis circulantes do miR-30e (55), miR-29 (56), miR-27b (57), miR-7, miR-26 (58), miR-1, miR-26b, miR-208b, miR-499, miR-21 e miR-9 (59). Em nossa pesquisa esses microRNAs não apresentaram associação com a HVE. Tais divergências podem ser explicadas pela diferença no tamanho da amostragem e pelas diferenças étnicas e clínicas entre os grupos, o que reforça a necessidade de estudos confirmatórios em populações distintas.

Dos cinco microRNAs que apresentaram expressão diferenciada na coorte de validação, apenas o miR-145-5p, miR-let7c e miR-451 apresentaram associação tanto ao IMVE quanto a HVE, indicando assim que possam estar mais relacionados no desenvolvimento da HVE induzida por hipertensão. Um estudo de enriquecimento funcional para identificação de genes e vias alvo foi realizado com o intuito de entender melhor a relevância desses três microRNAs e identificamos que eles regulam genes e vias que estão relacionadas ao remodelamento cardíaco e doenças cardiovasculares, incluindo vias metabólicas, inflamatórias, adesão focal, cálcio e sinalização adrenérgica.

Nosso estudo apresentou algumas limitações: apenas seis miRNAs foram selecionados para a validação dos miRNAs que se apresentaram diferencialmente expressos nos pacientes hipertensos com e sem hipertrofia do ventrículo esquerdo, sendo importante que outros estudos avaliem e validem esses outros miRNAs que apresentaram diferença na expressão entre os dois grupos. Por se tratar de um estudo transversal, a influência da confusão residual não pode ser excluída e não podemos assumir como causal a associação entre miRNAs e os parâmetros estruturais do VE. É possível, também, que o uso de medicamentos anti-hipertensivos e as características clínicas possam ter influenciado em nossos resultados. Essas limitações foram consideradas e cada classe de anti-hipertensivo e potenciais confundidores clínicos relevantes foram incluídos como variáveis independentes em análises multivariáveis referentes na coorte de validação.

6. CONCLUSÃO

De 754 microRNAs constatamos que cinco (miR-30a-5p, miR-let7c, miR-92a, miR-451, miR-145-5p) possuem expressão aumentada em pacientes hipertensos com hipertrofia do ventrículo esquerdo. Desses miRNAs o miR-451, miR-let7c e o miR-145-5p foram associados tanto a hipertrofia do ventrículo esquerdo quanto ao aumento no índice da massa do ventrículo esquerdo nesses mesmos pacientes. Evidenciamos também o importante papel do miR-145-5p na hipertrofia de miócitos cardíacos *in vitro*. Com base nesses resultados encontrados concluimos que estes microRNAs possuem um papel importante na fisiopatologia da hipertrofia do ventrículo esquerdo em pacientes com hipertensão arterial sistêmica.

7. REFERÊNCIAS

1. Barroso, W.K.S.; Rodrigues, C.I.S.; Bortolotto, L.A.; Mota-Gomes, M.A.; Brandão, A.A.; Feitosa, A.D.M.; Machado, C.A.; Poli-de-Figueiredo, C.E.; Amodeo, C.; Mion Júnior, D.; Barbosa, E.C.D.; Nobre, F.; Guimarães, I.C.B.; Vilela Martin, J.F.; Yugar-Toledo, J.C.; Magalhães, M.E.C.; Neves, M.F.T.; Jardim, P.C.B.V.; Miranda, P.D.; Póvoa, R.M.S.; Fuchs, S.C.; Alessi, A.; Lucena, A.J.G.; Avezum, A.; Sousa, A.L.L.; Pio-Abreu, A.; Sposito, A.C.; Pierin, A.M.G.; Paiva, A.M.G.; Spinelli, A.C.S.; Nogueira, A.R.; Dinamarco, N.; Eibel, B.; Forjaz, C.L.M.; Zanini, C.R.O.; Souza, C.B.; Souza, D.S.M.; Nilson, E.A.F.; Costa, E.F.A.; Freitas, E.V.; Duarte, E.R.; Muxfeldt, E.S.; Lima Júnior, E.; Campana, E.M.G.; Cesarino, E.J.; Marques, F.; Argenta, F.; Consolim-Colombo, F.M.; Baptista, F.S.; Almeida, F.A.; Borelli, F.A.O.; Fuchs, F.D.; Plavnik, F.L.; Salles, G.F.; Feitosa, G.S.; Silva, G.V.; Guerra, G.M.; Moreno Júnior, H.; Finimundi, H.C.; Back, I.C.; Oliveira Filho, J.B.; Gemelli, J.R.; Mill, J.G.; Ribeiro, J.M.; Lotaif, A.A.D.; Costa, L.S.; Magalhães, L.B.N.C.; Drager, L.F.; Martin, L.C.; Scala, L.C.N.; Almeida, M.Q.; Gowdak, M.M.G.; Klein, M.R.S.T.; Malachias, M.V.B.; Kuschnir, M.C.C.; Pinheiro, M.E.; Borba, M.H.E.; Moreira Filho, O.; Passarelli Júnior, O.; Coelho, O.R.; Vitorino, P.V.O.; Ribeiro Junior, R.M.; Esporcatte, R.; Franco, R.; Pedrosa, R.; Mulinari, R.A.; Paula, R.B.; Okawa, R.T.P.; Rosa, R.F.; Amaral, S.L.; Ferreira-Filho, S.R.; Kaiser, S.E.; Jardim, T.S.V.; Guimarães, V.; Koch, V.H.; Oigman, W.; Nadruz, W. Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial – 2020.
2. Mafalda Sousa Uva Paulo Victorino Rita Roquette Ausenda Machado Carlos Matias Dias. Investigação epidemiológica sobre prevalência e incidência de hipertensão arterial na população portuguesa --- uma revisão de âmbito. Revista Portuguesa de Cardiologia. 2014; 33 (7-8):451-463. doi.org/10.1016/j.repc.2014.02.012
3. Mariana Giroto Carvalho da Silva (marianagirotto@ig.com.br)¹, Thiago da Silva Domingos (thiagosd7@hotmail.com)², & Sandro Caramaschi (caramas@fc.unesp.br). HIPERTENSÃO ARTERIAL E CUIDADOS COM A SAÚDE: CONCEPÇÕES DE HOMENS E MULHERES. PSICOLOGIA, SAÚDE

- & DOENÇAS, 2018, 19(2), 435-452. DOI: <http://dx.doi.org/10.15309/18psd190221>
4. Chandra A, Neeland IJ, Berry JD, Ayers CR, Rohatgi A, Das SR, *et al.* The relationship of body mass and fat distribution with incident hypertension: observations from the Dallas Heart Study. *J Am Coll Cardiol.* 2014;64(10):997-1002. Doi: 10.1016/j.jacc.2014.05.057
 5. Passos VMDA, Assis TD, Barreto SM. Hipertensão arterial no Brasil: estimativa de prevalência a partir de estudos de base populacional. *Epidemiol Serv Saude.* 2006;15(1):35-45. Doi: 10.5123/S1679-49742006000100003.
 6. Santiago ERC, Diniz AS, Oliveira JS, Leal VS, Andrade MIS, Lira PIC. Prevalência e Fatores Associados à Hipertensão Arterial Sistêmica em Adultos do Sertão de Pernambuco, Brasil. *Arq Bras Cardiol.* 2019; 113(4):687-695. DOI: 10.5935/abc.20190145.
 7. Kirshblum SC, Burns SP, Biering-Sorensen F, Donovan W, Graves DE, Jha A, *et al.* International standards for neurological classification of spinal cord injury (revised 2011). *J Spinal Cord Med.* 2011; 34(6): 535-46.
 8. Massa KHC, Duarte YAO, Chiavegatto-Filho ADP. Avaliação da prevalência de doenças cardiovasculares e fatores associados em idosos 2000-2010. *Ciência e saúde coletiva.* 2019. 24.
 9. Lorell, B.H.; Carabello, B.A. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation*, 2000; 102: 470-479.
 10. Frey N, Olson EN. Cardiac Hypertrophy: The Good, the Bad, and the Ugly. *Annual Review of Physiology*, vol. 65:45-79, 2003. Doi: 10.1146/annurev.physiol.65.092101.142243.
 11. Kannel WB, Gordon T, Offutt D. Left ventricular hypertrophy by electrocardiogram. Prevalence, incidence, and mortality in the Framingham study. *Ann Intern Med.*, 1969 Jul; 71(1):89-105. Doi: 10.7326/0003-4819-71-1-89
 12. Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med*, 1990 May 31;322(22):1561-6. Doi: 10.1056/NEJM199005313222203.

13. Berkin KE, Ball SG. Essential hypertension: the heart and hypertension. *Heart*, 2001; 86:467-475. Doi: 10.1136/heart.86.4.467
14. Vakili, B.A.; Okin, P.M.; Devereux, R.B. Prognostic implications of left ventricular hypertrophy. *Am Heart J*. 2001; 141:334-341.
15. Zhi, D.; Irvin, M.R.; Gu, C.C.; Stoddard, A.J.; Lorier, R.; Matter, A.; Rao, D.C.; Srinivasasainagendra, V.; Tiwari, H.K.; Turner, A.; Broeckel, U.; Arnett, D.K. Whole-exome sequencing and an iPSC-derived cardiomyocyte model provides a powerful platform for gene discovery in left ventricular hypertrophy. *Front Genet*, 2012; 3: 92.
16. Nadruz, W. Myocardial remodeling in hypertension. *Journal of Human Hypertension* (2015) 29, 1–6
17. Lavie, C.J.; Patel, D.A.; Milani, R.V.; Ventura, H.O.; Shah, S.; Gilliland, Y. Impact of echocardiographic left ventricular geometry on clinical prognosis. *Prog Cardiovasc Dis*. 2014;57:3-9.
18. Vargas, M.M.; Stolf-Moreira, R. Aplicação de microRNAs na prática clínica. *Revista Brasileira Clinica Médica*. 2013, 11(1):62-6.
19. Davis-Dusembery, B.N.; Hata, A. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *The Journal Of Biochemistry*, 2010, 148: 381-392. Doi: 10.1093/jb/mvq096.
20. Gonzalo-Calvo, D.; Iglesias-Guyierrez, E.; Llorente-Cortes, V. Epigenetic Biomarkers and Cardiovascular Disease: Circulating MicroRNAs. *Rev. Esp. Cardiol*, 2017; 70(9): 763-769. Doi: 10.1016/j.rec.2017.05.013
21. Condrat, C.E.; Thompson, D.C.; Barbu, M.G.; Bugnar, O.L.; Boboc, A.; Cretoiu, D.; Suciu, N.; Cretoiu, S.M.; Voinea, S.C. miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis, 2020, 9 (2), 276. <https://doi.org/10.3390/cells9020276>
22. Zhang, H.D.; Jiang, L.H.; Sun, D.W.; Hou, J.C.; Ji, Z.L. CircRNA: A novel type of biomarker for cancer. *Breast Cancer* 2018, 25, 1–7. DOI: [10.1007/s12282-017-0793-9](https://doi.org/10.1007/s12282-017-0793-9)
23. Wiedrick, J.T.; Phillips, J.I.; Lusardi, T.A.; McFarland, T.J.; Lind, B.; Sandau, U.S.; Harrington, C.A.; Lapidus, J.A.; Galasko, D.R.; Quinn, J.F.; et al. Validation of MicroRNA Biomarkers for Alzheimer's Disease in Human Cerebrospinal Fluid. *J. Alzheimers Dis*. 2019, 67, 875–891

24. Raoof, R.; Bauer, S.; El Naggar, H.; Connolly, N.M.C.; Brennan, G.P.; Brindley, E.; Hill, T.; McArdle, H.; Spain, E.; Forster, R.J.; et al. Dual-center, dual-platform microRNA profiling identifies potential plasma biomarkers of adult temporal lobe epilepsy. *EBioMedicine* 2018, 38, 127–141
25. Sheinerman, K.S.; Umansky, S.R. Circulating cell-free microRNA as biomarkers for screening, diagnosis and monitoring of neurodegenerative diseases and other neurologic pathologies. *Front. Cell. Neurosci.* 2013, 7, 150
26. Zhou, S.-S.; Jin, J.-P.; Wang, J.-Q.; Zhang, Z.-G.; Freedman, J.H.; Zheng, Y.; Cai, L. miRNAs in cardiovascular diseases: Potential biomarkers, therapeutic targets and challenges. *Acta Pharmacol. Sin.* 2018, 39, 1073–1084
27. Van Rooij, E.; Olson, E.N. MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *J Clin Invest*, 2007, 117: 2369–2376
28. Latronico, M.V.; Condorelli, G. MicroRNAs and cardiac pathology. *Nat Rev Cardiol*, 2009, 6(6):419-29
29. Cheng, Y.; Ji, R.; Yue, J.; Yang, J.; Liu, X.; Chen, H.; DEAN DB, AND ZHANG C. MicroRNAs Are Aberrantly Expressed in Hypertrophic Heart - Do They Play a Role in Cardiac Hypertrophy? *The American Journal of Pathology*, 2007; 170, 6, 1831-1840
30. Van Rooij, E.; Sutherland, L.B.; Liu, N.; Williams, A.H.; McAnally, J.; Gerard, R.D.; Richardson, J.A.; Olson, E.N. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 28, 103(48):18255-60
31. Wang, J.; Liew, O.W.; Richards, A.M.; Chen, Y.T. Overview of MicroRNAs in Cardiac Hypertrophy, Fibrosis, and Apoptosis. *Int J Mol Sci*, 2016, 18;17(5). pii: E749
32. Minin, E.O.Z; Paim, L.R; Lopes, E.C.P; Bueno, L.C.M; Carvalho-Romano, L.F.R.S., Marques, E.R.; Vegian, C.F.L.; Pio-Magalhães, J.A.; Coelho-Filho, O.R.; Sposito, A.C.; Matos-Souza, J.R., Nadruz, W.; Schreiber, R. Association of Circulating miR-145-5p and miR-let7c and Atherosclerotic Plaques in Hypertensive Patients. *Biomolecules*, 2021, 11 (12), 1840; <https://doi.org/10.3390/biom11121840>
33. Sayed, D.; Hong, C.; Chen, I.; Lypowy, J.; Abdellatif, M. MicroRNAs Play an Essential Role in the Development of Cardiac Hypertrophy. *Circulation Research*, 2007, 100:416-424. doi/10.1161/01.res.0000257913.42552.23

34. Morrison, T.; Hurley, J.; Garcia, J.; Yoder, K.; Katz, A.; Roberts, D.; Cho, J.; Kanigan, T.; Ilyin, S. E.; Horowitz, D.; Dixon, J. M.; Brenan, C. J. H. Nanoliter high throughput quantitative PCR. *Nucleic Acids*, 2006, 34(18):e123. doi: 10.1093/nar/gkl639
35. Mestdagh, P.; Van Vlierberghe, P.; De Weer, A.; Muth, D.; Westermann, F.; Speleman, F.; and Vandesompele, J. A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biology*, 2009. 10, R64
36. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, 2001, 25(4):402–408
37. White, S.M.; Constantin, P.E.; Claycomb, W.C. Cardiac physiology at the cellular level: use of cultured HL-1 cardiomyocytes for studies of cardiac muscle cell structure and function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. (2004) 286:H823–9. doi: 10.1152/ajpheart.00986.2003
38. Hao L, Ren M, Rong B, Xie F, Lin MJ, Zhao YC, et al. TWEAK/Fn14 mediates atrial-derived HL-1 myocytes hypertrophy via JAK2/STAT3 signalling pathway. *J Cell Mol Med*. (2018) 22:4344–53. doi: 10.1111/jcmm.13724
39. Kim, J.O.; Song, D.W.; Kwon, E.J.; Hong, S.; Song, H.K.; Min, C.K.; Kim, D.H. miR-185 Plays an Anti-Hypertrophic Role in the Heart via Multiple Targets in the Calcium-Signaling Pathways. *PLoS ONE*, 2015, 10(3): e0122509. doi.org/10.1371/journal.pone.012250
40. Lin, R.; Rahtu-Korpela, L.; Szabo, Z.; Kemppi, A.; Skarp, S.; Kiviniemi, A. M.; Lepojarvi, E. S.; Halmetoja, E.; Kilpiö, T.; Porvari, K.; Pakanen, L.; Tolva, J.; Paakkanen, R.; Segersvärd, H.; Tikkanen, I.; Laine, M.; Sinisalo, J.; Lakkisto, P.; Huikuri, H.; Magga, J.; Kerkelä, R. miR-185-5p regulates the development of myocardial fibrosis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2022, 165, 130-140. doi.org/10.1016/j.yjmcc.2021.12.011
41. Li, M.; Guan, X.; Sun, Y.; Mi, J.; Shu, X.; Liu, F.; Li, C. miR-92a family and their target genes in tumorigenesis and metastasis. *Experimental Cell Research*, 2014, 323 (1), 1-6. doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.12.025
42. Schee, K.; Boye, K.; Abrahamsen, T. W.; Fodstad, Ø.; Flatmark, K. Clinical relevance of microRNA miR-21, miR-31, miR-92a, miR-101, miR-106a and miR-145 in colorectal cancer. *BMC Cancer*, 2012, 12:505

43. Shigoka, M.; Tsuchida, A.; Matsudo, T.; Nagakawa, Y.; Saito, H.; Suzuki, Y.; Aoki, T.; Murakami, Y.; Toyoda, H.; Kumada, T.; Bartenschlage, R.; Kato, N.; Ikeda, M.; Takashina, T.; Tanaka, M.; Suzuki, R.; Oikawa, K.; Takanashi, M.; Kuroda, M. Deregulation of miR-92a expression. Is implicated in hepatocellular carcinoma development. *Pathology International*, 2010, 60 (5), 351-357. doi.org/10.1111/j.1440-1827.2010.02526.x
44. Huang, Y.; Tang, S.; Ji-Yan, C.; Huang, C.; Li, J.; Cai, A. P.; Feng, Y. Q. Circulating miR-92a expression level in patients with essential hypertension: a potential marker of atherosclerosis. *J Hum Hypertens*, 2017 31(3):200-205. doi: 10.1038/jhh.2016.66
45. Zhu, J.; Zeng, Y.; Li, W.; Qin, H.; Lei, Z.; Shen, D.; Gu, D.; Huang, J.; Liu, Z. CD73/NT5E is a target of miR-30a-5p and plays an important role in the pathogenesis of non-small cell lung cancer. *Molecular Cancer*, 2017, 34
46. Sun, Y.; Yang, B.; Lin, M.; Yu, H.; Chen, H.; Zhang, Z.; Identification of serum miR-30a-5p as a diagnostic and prognostic biomarker in colorectal cancer. *Cancer Biomark*, 2019, 24(3):299-305. doi: 10.3233/CBM-182129
47. Ding, H.; Wang, Y.; Hu, L.; Xue, S.; Wang, Y.; Zhang, L.; Qi, H.; Yu, H.; Aung, L. H. H.; An, Y.; Li, P. Combined detection of miR-21-5p, miR-30a-3p, miR-30a-5p, miR-155-5p, miR-216a and miR-217 for screening of early heart failure diseases. *Bioscience Reports*, 2020, 40 (3): BSR20191653. doi.org/10.1042/BSR20191653
48. Bai, H.; Wu, S. miR-451: A Novel Biomarker and Potential Therapeutic Target for Cancer. *OncoTargets and Therapy*, 2019, 12, 11069-11082. doi:10.2147/OTT.S230963
49. Song, L.; Su, M.; Wang, S.; Zou, Y.; Wang, X.; Wang, Y.; Cui, H.; Zhao, P.; Hui, R.; Wang, J. miR-451 is decreased in hypertrophic cardiomyopathy and regulates autophagy by targeting TSC1. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2014, 18 (11):2266-2274. doi.org/10.1111/jcmm.12380
50. Marques, F. Z.; Campain, A. E.; Tomaszewski, M.; Zukowska-Szczechowska, E.; Yang, Y. H. J.; Charchar, F. J.; Morris, B. J. Gene expression profiling reveals renin mRNA overexpression in human hypertensive kidneys and a role for microRNAs. *Hypertension*, 2011, 58(6):1093-8. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.180729

51. Kuwabara, Y.; Horie, T.; Baba, O.; Watanabe, S.; Nishiga, M.; Usami, S.; Izuhara, M.; Nakao, T.; Nishino, T.; Otsu, K.; Kita, T.; Kimura, T.; Ono, K. microRNA-451 exacerbates lipotoxicity in cardiac myocytes and high-fat diet-induced cardiac hypertrophy in mice through suppression of the LKB1/AMPK pathway. *Circulation Research*, 2015. 116:279-288. doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.304707
52. Sonsoz, M. R.; Yilmaz, M.; Cevik, E.; Orta, H.; Bilge, A. K.; Elitok, A.; Onur, I.; Komurcu-Bayrak, E. Circulating levels of microRNAs in hypertrophic cardiomyopathy: The relationship with left ventricular hypertrophy, left atrial dilatation and ventricular depolarisation-repolarisation parameters. *Heart, Lung and Circulation*, 2022, 31 (2):199-206. Doi: org/10.1016/j.hlc.2021.04.019
53. Lin KH, Kumar VB, Shanmugam T, Shibu MA, Chen RJ, Kuo CH, et al. miR-145-5p targets paxillin to attenuate angiotensin II-induced pathological cardiac hypertrophy via downregulation of Rac 1, pJNK, p-c-Jun, NFATc3, ANP and by Sirt-1 upregulation. *Mol Cell Biochem.* (2021). doi: 10.1007/s11010-021-04100-w
54. Ruotian L, Guijun Y, Qun Z, Yue J, Haixiang S, Yali H, et al. miR-145 inhibits isoproterenol-induced cardiomyocyte hypertrophy by targeting the expression and localization of GATA6. *FEBS Lett.* (2013) 587:1754–61. doi: 10.1016/j.febslet.2013.04.018
55. Xu H, Xu Y, Yang J, Juang J. Circulating MicroRNA-30e Predicts left ventricular hypertrophy in essential hypertensive patients. *Rev Invest Clin.* (2021) 73:138–44. doi: 10.24875/RIC.20000447
56. Huang Y, Tang S, Huang C, Chen J, Li J, Cai A, et al. Circulating miRNA29 family expression. levels in patients with essential hypertension as potential markers for left ventricular hypertrophy. *Clin Exp Hypertens.* (2017) 39:119–25. doi: 10.1080/10641963.2016.1226889
57. Wang Y, Chen S, Gao Y, Zhang S. Serum MicroRNA-27b as a screening biomarker for left ventricular hypertrophy. *Tex Heart Inst J.* (2017) 44:385–9. doi: 10.14503/THIJ-16-5955
58. Kaneto CM, Nascimento JS, Moreira MCR, Ludovico ND, Santana AP, Silva RAA, et al. MicroRNA profiling identifies miR-7-5p and miR-26b-5p as differentially expressed in hypertensive patients with left ventricular

hypertrophy. *Braz J Med Biol Res.* (2017) 50: e6211. doi: 10.1590/1414-431X20176211

- 59.** Kontaraki JE, Marketou ME, Zacharis EA, Parthenakis FI, Vardas PE. MicroRNA-9 and microRNA-126 expression levels in patients with essential hypertension: potential markers of target-organ damage. *J Am Soc Hypertens.* (2014) 8:368–75. doi: 10.1016/j.jash.2014.03.324

9. ANEXOS

9.1 Parecer Consubstanciado



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: ESTUDO DE POLIMORFISMOS DE MICRORNAS EM PACIENTES HIPERTENSOS E NÃO HIPERTENSOS: RELAÇÃO COM RISCO CARDIOVASCULAR.

Pesquisador: Roberto Schreiber

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 8

CAAE: 56841616.5.0000.5404

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.179.618

Apresentação do Projeto:

1.1. Hipertensão arterial sistêmica e risco cardiovascular A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial. Associa-se frequentemente a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, vasos sanguíneos, cérebro, rins), com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares (48). A HAS é considerada um dos principais fatores de risco modificáveis e um dos mais importantes problemas de saúde pública. Além disso, apresenta alta prevalência e baixas taxas de controle. No Brasil, inquéritos populacionais realizados nos últimos 20 anos apontaram para uma prevalência de HAS acima de 30%. Contudo, estima-se que menos de 20% da população hipertensa brasileira esteja controlada (47). A mortalidade por doença cardiovascular aumenta progressivamente com a elevação da pressão arterial a partir de 115/75 mmHg de forma linear, contínua e independente (25). Já em pacientes com HAS diagnosticada, há um aumento de duas a três vezes na prevalência de doença vascular aterosclerótica e de eventos cardiovasculares (20). Sob esta perspectiva, o entendimento dos mecanismos e dos fatores predisponentes que levam ao desenvolvimento de lesões de órgão-alvo associados à HAS são necessários para que estratégias diagnósticas e terapêuticas mais efetivas sejam instituídas.

1.2. HAS e hipertrofia cardíaca Após agressão ao coração, podem ocorrer alterações moleculares, celulares e intersticiais cardíacas, que

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.063-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.179.618

vão se manifestar clinicamente por modificações na arquitetura, no tamanho, na massa, na geometria e na função do coração. Esse fenômeno recebe o nome de remodelamento cardíaco (10). A HAS se acompanha, freqüentemente, de alterações na estrutura e na forma do ventrículo esquerdo que refletem fenômenos como hipertrofia dos cardiomiócitos, proliferação do estroma conjuntivo e rarefação da microcirculação coronária. A elevação sustentada da pressão arterial produz um aumento da tensão na parede do ventrículo esquerdo, o qual pode levar a uma resposta caracterizada por aumento da massa ventricular, que é conhecida como hipertrofia cardíaca. Essas alterações ocorrem no sentido de normalizar a tensão na parede ventricular e são geralmente consideradas como compensatórias (24). Apesar de considerada uma resposta compensatória ao aumento de tensão na parede ventricular, a hipertrofia cardíaca é também fator de risco independente para morbidade e mortalidade cardiovascular por predispor ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca, arritmias e fenômenos isquêmicos coronários mais graves (24). Em uma meta-análise de 20 estudos envolvendo mais de 48 mil pacientes, encontrou risco médio ponderado de morbidade cardiovascular associado à hipertrofia cardíaca de 2,3 vezes (45). A massa ventricular esquerda é um fenótipo complexo influenciado pelos efeitos interativos de múltiplos fatores ambientais e genéticos. Embora a HAS seja reconhecida como a principal determinante da hipertrofia cardíaca, a pressão arterial explica apenas uma pequena parte da variação interindividual da massa ventricular esquerda. Atualmente, estima-se que a hereditariedade seja responsável por 30 a 70% da variabilidade da massa ventricular esquerda (1). Em função destas observações, a busca por mecanismos genéticos que possam estar envolvidos no desenvolvimento de hipertrofia cardíaca em hipertensos tem sido intensa (50).

1.3. HAS e aterosclerose De acordo com o conhecimento atual, a aterosclerose é considerada uma doença multifatorial, de natureza inflamatória, que ocorre em resposta ao acúmulo de lipoproteínas plasmáticas na camada íntima das artérias (27). A doença cardiovascular aterosclerótica é a principal causa de morbidade e mortalidade no mundo industrializado e sua incidência está aumentando progressivamente nos países em desenvolvimento (44). A HAS é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de aterosclerose (48). Neste contexto, estima-se que o aumento do estresse mecânico arterial provocado pelas elevações nos níveis pressóricos seja o principal estímulo contributivo para a aterogênese em indivíduos portadores de HAS (42). Contudo, ainda não há explicações definidas para o fato de aterogênese ocorrer em apenas parte dos indivíduos hipertensos, o que parece sugerir que características genéticas individuais devam ser importantes neste processo.

1.4 MicroRNAs MicroRNAs (miRNAs) são um grupo de pequenas moléculas (22 nucleotídeos) de RNA não codificantes, evolutivamente conservados, que pareiam

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.179.618

com sequências não totalmente complementares na região 3'UTR e 5'UTR do RNA mensageiro (mRNA) de genes-alvo, causando repressão da transcrição para a síntese protéica (8). É atualmente estimado que possa haver mais de 1400 genes de miRNA no genoma humano (21). Com efeito, miRNAs humanos são previstos para controlar as atividades de mais de 60% de todos os genes que codificam proteínas. Portanto, os miRNAs tem sido implicados nos controles de uma vasta gama de funções biológicas, incluindo desenvolvimento, diferenciação, metabolismo, crescimento, proliferação e apoptose (9; 14). A seleção de alvos dos miRNA é mediada por um emparelhamento imperfeito de bases entre o miRNA e sítios de ligação presentes na região 3' não traduzida do mRNA alvo. A natureza imperfeita da interação miRNA-mRNA significa que um único miRNA pode ter como alvo dezenas ou centenas de RNAs mensageiros (11; 46; 8).

1.5. Biogênese de miRNAs Conforme ilustrado na figura 1, a biogênese dos miRNAs tem início no núcleo da célula, onde o miRNA primário (pri-miRNA) é transcrito pelo DNA (1) sendo então processado pela endonuclease Drosha (2) formando o miRNA precursor (pré-miRNA em formato de "hairpin" ou "grampo para cabelo"). Este pré-miRNA é transportado para o citoplasma (3) onde pode ser liberado para o espaço extracelular (4a) ou pode ser processado por uma endonuclease denominada Dicer (4b) originando um duplex imperfeito (miRNA: miRNA*) constituído por duas cadeias de RNA, uma que compreende o miRNA maduro e outra com um fragmento de tamanho similar a este, derivado do braço oposto do pré-miRNA, que tem o nome de miRNA* (referência 3). Depois de o miRNA ser transformado num duplex pela Dicer, uma das cadeias é selecionada e incorporada (5a) no complexo proteico RISC (RNA-induced silencing complex) e a outra pode ser secretada para fora da célula (5b). O complexo RISC guia o miRNA maduro até o seu mRNA alvo onde ocorrerá o pareamento correto (6a) resultando na clivagem e degradação do mRNA (7a). Já o pareamento incorreto (6b), resultará na inibição da tradução do mRNA (7b) ou desestabilização por deadenilação da cauda de poli A do mRNA (7c). A região crítica para a ligação do miRNA com o mRNA alvo é composta por 7 nucleotídeos sendo denominada região "seed" e localiza-se na extremidade 5' entre os nucleotídeos 2 até 8 dos miRNAs maduros e geralmente se liga a região 3' não traduzida do mRNA alvo e em casos raros na região codificante (referência 26). Uma vez que uma pequena variação na quantidade de miRNA pode ter um efeito sobre milhares de mRNAs alvo e ter consequências funcionais diversas, uma variação genética comum, como os SNPs, em sequências de miRNAs podem também resultar em alterações funcionais, representando portanto em candidatos a biomarcadores ideais para diagnóstico e prognóstico em diversas doenças (referência 32). Figura 1- Esquema ilustrativo da biogênese e do mecanismo pós-transcricional dos miRNAs (adaptado de Shaomian Yao - referência 23) 1.6. Polimorfismos de

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.179.618

microRNAs Polimorfismos de miRNA são uma nova classe de polimorfismos funcionais presentes no genoma humano (32). Uma vez que eles podem regular a expressão de múltiplos genes ou vias regulatórias através da sua ligação com a extremidade 3' não traduzida do mRNA alvo, um único polimorfismo na região "seed" do miRNA ou próximo dela, pode afetar a expressão de múltiplos genes alvo ou de vias que regulam a absorção de drogas, metabolismo, funções e ciclo celulares, desta forma interferindo em processos fisiológicos e patológicos resultando em doenças (2). No genoma humano, estes polimorfismos podem resultar em perda ou ganho de função e de acordo com Mishra PJ and Bertino JR (32) os polimorfismos de miRNA podem ser classificados em: 1-Polimorfismos que afetam a biogênese do miRNA. São aqueles presentes em sequências do pri-miRNA, de pre-miRNA ou do miRNA maduro afetando a expressão de proteínas envolvidas nas diversas etapas da biogênese do miRNA. Estudos recentes apontaram que SNP em três pre-miRNA (has-mir-198a2, has-mir-498, and has-mir-148a) estão associados não apenas com câncer, mas também com doença cardíaca (18; 51; 41; 17); 2-Polimorfismos que afetam a região de ligação do miRNA com o mRNA alvo. Uma vez que as sequências na região "seed" do miRNA são curtas e altamente conservadas evolutivamente, a probabilidade de polimorfismos nesta região é muito menor e embora possam afetar a expressão de centenas de genes alvos, faltam estudos que demonstrem o verdadeiro significado destes polimorfismos do ponto de vista de genética de populações (32). Por outro lado, polimorfismos em mRNAs alvos que afetem a ligação deste transcrito com a região "seed" do miRNA é muito mais comum no genoma humano e deve afetar apenas a expressão de um gene específico ou de vias envolvidas pelo gene atingido, sendo portanto muito mais relevantes do ponto de vista epidemiológico. Este parece ser o caso do polimorfismo no gene que codifica para o receptor tipo I da angiotensina II (AT1R). O polimorfismo A1166C deste gene esta associada a maior predisposição a hipertensão e lesão de órgãos alvo (4). Além disso, nos pacientes hipertensos homozigotos para o alelo C a expressão de mir-155 foi menor do que nos genótipos AC e AA e enquanto a expressão de AT1R foi positivamente associada com a pressão sanguínea, ela foi negativamente associada com a expressão de miR-155 sugerindo a participação deste miRNA na regulação da pressão sanguínea juntamente com o AT1R e o polimorfismo deste gene (5); 3-Polimorfismos que alteram a regulação epigenética dos genes que codificam miRNAs. Polimorfismos de miRNAs que podem alterar epigeneticamente (por metilação ou acetilação) a regulação de miRNAs. O silenciamento epigenético de miRNA parece ser frequente no desenvolvimento de câncer de mama (32).

1.7. Polimorfismos de microRNAs e Doenças Cardiovasculares

Conforme mencionado anteriormente, o polimorfismo no gene para o receptor tipo I da angiotensina II pode alterar a expressão de miR-155 e estar associado com

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.179.618

hipertensão arterial. Zhou e cols. (51) observaram que polimorfismos nos miR-196a2 e miR-499 (rs11614913 e rs3746444) estão associados com miocardiopatia dilatada. Neste estudo, os autores associaram o genótipo mais frequente (TT) do miR-196a2 com aumento de risco da doença e sugeriram um papel protetor para o genótipo CC, mas não avaliaram a expressão deste miRNA. Em outro artigo, Xu e cols. (49), demonstraram que o genótipo CC do miR-196a2 está associado com maior expressão do miRNA maduro e com risco aumentado de cardiopatia congênita. Além disso, o genótipo TT foi associado com risco aumentado de acidente vascular cerebral (AVC) na população chinesa (52). O miR-196a2 pode regular a anexina A1 que está associada com a migração e adesão de monócitos na progressão da aterosclerose e pode atuar também como importante mediador anti-inflamatório pela repressão da expressão e da ativação de enzimas inflamatórias como as ciclooxigenase 2 (COX2), óxido nítrico sintase (iNOS) e fosfolipase A2 exercendo portanto, através da anexina A1 algum papel no desenvolvimento de AVC (35; 29). Por outro lado, Huang S e cols. (18) não encontraram qualquer associação deste polimorfismo com síndrome coronariana aguda (SCA) cujos tradicionais fatores de risco incluem a hipertensão arterial, mas observaram uma diminuição no risco de SCA em homens portadores heterozigotos do polimorfismo rs2910164 no miR-146a associados com índice de massa corporal maior que 24kg/m² ou hipertensos, sugerindo que este genótipo pode exercer um papel protetor no desenvolvimento de SCA. Em um estudo realizado por Ramkaran P e cols. (41), os autores descrevem que em pacientes com doença arterial coronariana (DAC) portadores do genótipo CC (menos frequente) do polimorfismo rs2910164 no miR-146a, os níveis de expressão deste miRNA estão cerca de 6x maiores que nos pacientes portadores do genótipo mais comum (GG). Além disso, os níveis de IRAK-1 e TRAF-6, que são genes alvos do miR-146a e estão relacionados a via de sinalização dos Toll Like Receptors (TLR), estão reduzidos nos portadores com DAC e genótipo CC quando comparados ao genótipo GG causando redução nos níveis de citocinas pro-inflamatórias, sugerindo que o genótipo CC deste polimorfismo pode exercer um papel protetor no desenvolvimento de DAC pela redução da inflamação podendo ainda ser um potencial alvo de intervenções terapêuticas nesta doença. Apesar da existência de diversos estudos sobre o polimorfismo rs2910164 no miR-146a com doenças cardiovasculares, até o momento não foi realizado nenhum estudo específico do papel deste polimorfismo na hipertensão arterial sistêmica. Nosso grupo estudou a influência dos polimorfismos de TLR4 (37) e TLR6 (38) na hipertrofia do ventrículo esquerdo (HVE) em pacientes com hipertensão e demonstrou associação entre a presença destes polimorfismos e HVE. Desta forma, o estudo do polimorfismo de miR-146a poderá ajudar a esclarecer o papel deste miRNA na HVE e da interação com os polimorfismos de

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.179.618

TLR.Liu e cols. (28) mostrou que o alelo G do polimorfismo de miR-499 (rs3746444) está associado com risco aumentado de desenvolver AVC. Por outro lado, Zhu e cols. (52) em um estudo de meta-análise, que incluiu 5 estudos com um total de 2254 casos e 2508 controles, apontou que apenas o genótipo AA deste polimorfismo está associado com diminuição no risco de desenvolver AVC, não encontrando associação dos outros genótipos com AVC. O estudo de Yang e cols. (22) associou o polimorfismo do miR-499 com o aumento plasmático da proteína C reativa (PCR), um marcador inflamatório intimamente relacionado com isquemia cerebral, estando também associado com aumento da pressão sanguínea, resistência a insulina e aumento de triglicerídeos (19; 43; 22). Uma vez que a hipertensão arterial está associada com AVC (34), o estudo do polimorfismo de miR-499 (rs3746444) pode ajudar a entender os mecanismos de ajuste fino na regulação de genes que podem estar relacionados com a hipertensão. 1.8. MicroRNAs circulantes como biomarcadores de doenças cardiovasculares Em 2008, Mitchell et al. mostraram que os miRNAs também estão presentes no plasma (33). Os miRNAs plasmáticos apresentam grande estabilidade, mesmo em condições extremamente adversas, como altas temperaturas, grandes variações de pH, longos períodos de armazenamento à temperatura ambiente e múltiplos ciclos de congelamento e descongelamento (7). Ao contrário dos miRNAs endógenos, os miRNAs sintéticos são rapidamente degradado pelas RNases plasmáticas quando adicionados ao plasma humano, evidenciando um mecanismo de proteção ao miRNA endógeno circulante, provavelmente, através de microvesículas (exossomos, micropartículas ou corpos apoptóticos) (7; 33). Além disto, os miRNAs circulantes podem ser mensurados por metodologias relativamente simples como Real-Time PCR ou microarrays, o que torna estas moléculas facilmente mensuráveis. Um dos maiores desafios da pesquisa cardiovascular é a identificação de biomarcadores confiáveis que possam ser aferidos rotineiramente em amostras facilmente acessíveis, como o plasma. Um biomarcador ideal deve preencher diversos critérios, tais como acessibilidade por métodos não-invasivos, alta especificidade e sensibilidade, capacidade de diferenciar patologias e uma longa meia-vida na amostra a ser avaliada. Os miRNAs apresentam diversas destas características, o que os tornam atraentes moléculas a serem utilizadas como biomarcadores, especialmente no contexto de pesquisa cardiovascular (12; 13). O Ambulatório de Hipertensão Arterial da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP conta com uma casuística de cerca de 800 pacientes que tem sido estudada, especialmente no que se refere aos determinantes genéticos de lesões de órgãos-alvo. Sob esta perspectiva, a análise de polimorfismos nesta população por nosso grupo de pesquisa levou recentemente à geração de diversos artigos com foco em hipertrofia cardíaca (37; 38), e remodelamento vascular (39; 15). O presente estudo

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.179.618

pretende expandir esta investigação para polimorfismos de miRNAs potencialmente envolvidos em alterações cardiovasculares nesta mesma amostra de pacientes portadores de hipertensão arterial sistêmica, e correlacionar os dados obtidos nos estudos dos polimorfismos previamente estudados com os que serão obtidos no estudo de polimorfismos de miRNAs. Estas publicações demonstram que nosso grupo apresenta experiência na área do conhecimento em que se insere o projeto e tem potencial capacidade para estudar a relação entre os polimorfismos de miRNAs e a presença de lesões de órgãos-alvo (aterosclerose carotídea e hipertrofia cardíaca) em pacientes hipertensos.

Hipótese:

A HAS é fator de risco primário para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, sendo importante destacar sua capacidade de promover lesões de órgãos-alvo, tais como a hipertrofia cardíaca e a aterosclerose. MicroRNAs (miRNAs) são um grupo de pequenas moléculas (22 nucleotídeos) de RNA não codificantes, evolutivamente conservados, que pareiam com sequências do RNA mensageiro (mRNA) de genes-alvo, causando repressão da transcrição para a síntese protéica. Diversos estudos sugerem que a expressão aberrante de miRNAs pode estar envolvida no desenvolvimento de hipertrofia cardíaca e aterosclerose, contudo pouco se sabe sobre o impacto dos polimorfismos de miRNAs no desenvolvimento de lesões de órgãos-alvo em hipertensos. Neste contexto, o estudo destes polimorfismos pode resultar na descoberta de potenciais biomarcadores para o desenvolvimento de lesões de órgãos-alvo em pacientes hipertensos.

Metodologia Proposta:

Vinte ml de sangue venoso serão colhidos de cada indivíduo e o DNA extraído pelo método "salting-out" (36) será estocado a -80°C. Os polimorfismos de miRNAs a serem estudados são apresentados na tabela 1. A genotipagem destes polimorfismos será realizada pela Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR) que permite a discriminação alélica através do uso de sondas do tipo TaqMan. Cada alelo é marcado com uma sonda que emite fluorescências distintas que podem então ser interpretadas pelo equipamento StepOnePlus™ System (ThermoFisher). Este equipamento de RT-PCR encontra-se disponível no Laboratório de Genética do Câncer da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP coordenado pela Dra Carmen Sílvia Passos Lima que concordou com o uso do equipamento pelo nosso laboratório. Os ensaios de genotipagem fornecidos pela ThermoFisher são apresentados na tabela 1. A extração de miRNA em soro, será realizada com o Kit miRNeasy Serum/Plasma (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante: para esta finalidade, soro e plasma (já coletado ou a ser coletado) dos pacientes

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.179.618

serão estocados no freezer -80oC. A análise de expressão plasmática de miRNAs será realizada por TaqMan OpenArrayR Human MicroRNA system, um painel capaz de analisar 754 diferentes miRNAs por amostra.

Critério de Inclusão:

No estudo acima mencionado, serão incluídos pacientes com hipertensão arterial sistêmica e indivíduos não hipertensos. Os indivíduos hipertensos serão selecionados de unidades de atendimento do Hospital de Clínicas da UNICAMP, principalmente do ambulatório de hipertensão arterial do Hospital de Clínicas da UNICAMP. Os indivíduos não hipertensos serão selecionados de unidades de atendimento do Hospital de Clínicas da UNICAMP, principalmente de ambulatórios da disciplina de Cardiologia e do ambulatório de Tabagismo vinculado à disciplina de Psiquiatria, e do Centro de Saúde da Comunidade (CECOM) da UNICAMP. Os indivíduos a serem incluídos no estudo serão convidados a participar do mesmo nos dias em que estiverem sendo atendidos nas unidades de Saúde da UNICAMP. Os resultados dos exames complementares serão anexados ao prontuário médico.

Critério de Exclusão:

Os critérios de exclusão serão: hipertensão secundária, câncer, valvulopatias significativas ou cardiomiopatia hipertrófica hereditária.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar a relação dos polimorfismos dos miRNAs -146a, -196a2 e -499 (rs2910164, rs11614913 e rs3746444 respectivamente) e do polimorfismo A1166C no gene para o receptor tipo I da angiotensina II (rs5186), relacionado ao miR-155, bem como a expressão plasmática de diversos miRNAs de acordo com o seu genótipo, em uma amostra de pacientes hipertensos e não hipertensos, e correlacionar estes dados com a presença de lesões de órgãos-alvo e o risco cardiovascular nesta população.

Objetivo Secundário:

Além disso, pretendemos correlacionar os dados de polimorfismos de TLR4 e TLR6 previamente genotipados em pacientes hipertensos com os dados de genotipagem do polimorfismo de miR-146a

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo informações do pesquisador: "Riscos: Este projeto não implica risco aos pacientes. Utilizaremos amostras biológicas e os dados clínicos coletados em estudo anterior, aprovado pelo

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.179.618

Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas com parecer n 181/2005, ou de novas coletas (para os casos em que o material estocado não pode ser utilizado) e também de pacientes novos (hipertensos e não hipertensos). Os pesquisadores garantem sigilo de todos os pacientes, não divulgando publicamente o nome ou qualquer outra informação que possa identificar os pacientes envolvidos neste estudo. Novas coletas de sangue serão precedidas por assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecidas (anexo). Benefícios: O estudo destes polimorfismos pode resultar na descoberta de potenciais biomarcadores para o desenvolvimento de lesões de órgãos-alvo em pacientes hipertensos."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Segundo informações do pesquisador responsável pelo projeto, presentes no documento "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1284075_E3.pdf", de 15/01/2019, a emenda foi enviada devido à: "Inclusão de dois novos membros no grupo de pesquisa: Elisângela Cristina Lopes Dias; Luís Felipe R.S. Carvalho-Romano".

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Para avaliação desta emenda, foram analisados os seguintes documentos anexados:

- 1- "CartaCEPpendencias1.pdf"
- 2- "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1284075_E3.pdf" de 20/02/2019
- 3- "ProjetoenviadoCEP2017versao2019.pdf"

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).
- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.179.618

aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

- O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_128407_5_E3.pdf	20/02/2019 17:11:32		Aceito
Outros	CartaCEPpendencias1.pdf	20/02/2019 16:31:56	Roberto Schreiber	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	ProjetoenviadoCEP2017versao2019.pdf	20/02/2019 16:31:45	Roberto Schreiber	Aceito

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.179.618

Investigador	ProjetoenviadoCEP2017versao2019.pdf	20/02/2019 16:31:45	Roberto Schreiber	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE2017versao5.pdf	19/09/2017 11:06:11	Roberto Schreiber	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoenviadoCEP2017versao5.pdf	19/09/2017 11:06:04	Roberto Schreiber	Aceito
Outros	CartaaoCEP2017Pendenciasversao5.pdf	19/09/2017 11:05:57	Roberto Schreiber	Aceito
Outros	CartaaoCEP2017Pendencias1.pdf	01/09/2017 09:27:08	Roberto Schreiber	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorepositorio2017.pdf	01/09/2017 09:26:53	Roberto Schreiber	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE2016modificado2017B.pdf	01/09/2017 09:26:42	Roberto Schreiber	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto2017.pdf	26/07/2017 16:45:56	Roberto Schreiber	Aceito
Outros	parecerprojetoanterior.pdf	01/07/2016 15:19:33	Roberto Schreiber	Aceito
Outros	carteirafuncional.pdf	07/06/2016 12:06:08	Roberto Schreiber	Aceito
Declaração de Pesquisadores	anuencia.pdf	03/06/2016 11:08:44	Roberto Schreiber	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 01 de Março de 2019

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

9.2 Termo de consentimento livre e esclarecido – TCLE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: ESTUDO DE POLIMORFISMOS DE MICRORNAS EM PACIENTES HIPERTENSOS E NÃO HIPERTENSOS: RELAÇÃO COM RISCO CARDIOVASCULAR.

Pesquisador Responsável: Roberto Schreiber

Número do CAAE: 56841616.5.0000.5404

Você está sendo convidado a participar como voluntário de uma pesquisa. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar este Termo para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo se você não aceitar participar ou retirar sua autorização em qualquer momento.

Justificativa e objetivos:

A Hipertensão (pressão alta) é fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, podendo levar a problemas no coração e nos vasos sanguíneos, tais como a hipertrofia cardíaca e a aterosclerose. MicroRNAs (miRNAs) são um grupo de pequenas moléculas produzidas pelo material genético (DNA). Diversos estudos sugerem que alterações na expressão (níveis no sangue e nos órgãos) de miRNAs podem estar envolvidas no desenvolvimento de hipertrofia cardíaca e aterosclerose. Por outro lado, pouco se sabe sobre a relação das variações (polimorfismos) no material genético que produz miRNAs com o desenvolvimento de alterações do coração e dos vasos sanguíneos em pessoas com e sem pressão alta. O objetivo deste estudo é investigar a expressão de miRNAs e a presença de variações (polimorfismos) no material genético que produz os miRNAs em pessoas com ou sem pressão alta e suas relações com o desenvolvimento de alterações dos vasos sanguíneos e do coração.

Procedimentos:

Participando do estudo você está sendo convidado a:

- Colher uma amostra de sangue (20 ml, mais ou menos 2 seringas). Caso você tenha participado anteriormente do projeto "Influência de polimorfismos gênicos relacionados a componentes do complexo de adesão focal e aos Toll-Like Receptors sobre a doença arterial coronária em pacientes com hipertensão arterial sistêmica", já aprovado pelo parecer nº 56841616.5.0000.5404 de julho de 2016) e cujo material estocado não pôde ser utilizado para as análises laboratoriais e de extração de DNA e de miRNA, você está sendo convidado a permitir que seja realizada nova coleta de sangue (20 ml, mais ou menos 2 seringas). Este sangue será utilizado para pesquisa de miRNAs, variações de DNA (polimorfismos) que produzem miRNAs e dosagens de marcadores de inflamação.

- Fazer exames das artérias (vasos) do pescoço (exame conhecido como "ultrassonografia") e do coração (exame conhecido como "ecocardiografia") por meio de um aparelho de ultrassom. Você receberá todos os esclarecimentos sobre os resultados dos exames de ultrassonografia e Ecocardiografia, os quais também serão anexados ao prontuário médico.

- Autorizar a coleta e análise de dados clínicos, laboratoriais e de exames complementares (por exemplo: ecocardiografia, ultrassonografia de carótida, medida ambulatorial de pressão arterial e cateterismo) constantes do prontuário médico.

Rubrica do pesquisador: _____

Rubrica do participante: _____

Desconfortos e riscos:

O risco associado à coleta de sangue será mínimo, pois se trata de um exame de sangue tradicional, que será realizado na veia do braço por um profissional treinado e habilitado. Além disto, a realização de ultrassonografia (exame das minhas artérias) e ecocardiografia (exame do coração) não promoverá riscos ou prejuízos à minha saúde pois estes exames não são invasivos, e não causam desconforto.

Vantagens e benefícios:

Entendo que não obterei nenhuma vantagem direta com minha participação nesse estudo. Fui informado que se for detectada alguma alteração gênica, serei imediatamente comunicado, sendo que todas as consequências serão devidamente explicadas e meus parentes próximos, se assim desejarem, poderão realizar o exame. Caso sejam detectadas alterações significativas nos exames de ultrassonografia ou ecocardiografia, serei encaminhado para especialidade médica responsável por acompanhar este tipo de problema.

Sigilo e privacidade:

Você tem a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo, seu nome não será citado.

O estudo passou pela aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp e a aprovação da Superintendência do Hospital de Clínicas para sua realização. Entendo também que minha participação é voluntária e que posso me recusar a participar ou me retirar da participação na pesquisa a qualquer momento sem comprometer os cuidados que recebo hoje ou que poderei receber futuramente no HC-UNICAMP.

Ressarcimento e indenização:

Você terá a garantia ao direito a indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Os indivíduos a serem incluídos no estudo serão convidados a participar do mesmo, nos dias em que estiverem sendo atendidos nas unidades de Saúde da UNICAMP durante a rotina do participante.

A Resolução 466/12 (item IV.3) define que "os participantes da pesquisa que vierem a sofrer qualquer tipo de dano resultante de sua participação na pesquisa, previsto ou não no TCLE, têm direito à indenização, por parte do pesquisador, patrocinador e das instituições envolvidas". Fica garantido o atendimento gratuito, imediato e pelo tempo necessário em caso de evento adverso.

Armazenamento de MATERIAL BIOLÓGICO:

() Eu autorizo que meu material biológico (sangue, soro, plasma e ácidos nucleicos), coletado neste momento, ou já colhido no projeto anterior, seja armazenado em biorrepositório por um período de cinco anos que podem ser renováveis, sabendo que o sujeito da pesquisa deverá ser contatado para consentir, a cada nova pesquisa, sobre a utilização do material biológico humano armazenado em biorrepositório, formalizando-se o consentimento por meio de TCLE específico e aprovado pelo CEP/FCM/UNICAMP.

() concordo em participar do presente estudo, porém NÃO AUTORIZO o armazenamento do meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado ao final desta pesquisa.

Rubrica do pesquisador: _____

Rubrica do participante: _____

Em caso de falecimento ou condição incapacitante, os direitos sobre o material armazenado deverão ser dados a: _____
(pedir para o participante indicar o nome de uma pessoa a ser contatada).

Contato:

Qualquer dúvida poderá ser esclarecida com o Pesquisador Responsável pela Pesquisa: Dr Roberto Schreiber. Laboratório de Biologia Cardiovascular- Faculdade de Ciências Médicas/Universidade Estadual de Campinas. Cx P 6111 CEP: 13083-970 Campinas, SP. Tel: 19 35217364. e-mail: robertos@fcm.unicamp.br

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você poderá entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP das 08:30hs às 11:30hs e das 13:00hs às 17:00hs na Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936 ou (19) 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br.

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

O papel do CEP é avaliar e acompanhar os aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), tem por objetivo desenvolver a regulamentação sobre proteção dos seres humanos envolvidos nas pesquisas. Desempenha um papel coordenador da rede de Comitês de Ética em Pesquisa (CEPs) das instituições, além de assumir a função de órgão consultor na área de ética em pesquisas

Consentimento livre e esclarecido:

Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar e declaro estar recebendo uma via original deste documento assinada pelo pesquisador e por mim, tendo todas as folhas por nós rubricadas:

Nome do (a) participante: _____

Contato telefônico: _____

e-mail (opcional): _____

_____, Data: ____/____/_____
(Assinatura do participante ou nome e assinatura do seu RESPONSÁVEL LEGAL)

Responsabilidade do Pesquisador:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado e pela CONEP, quando pertinente. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

_____, Data: ____/____/_____
(Assinatura do pesquisador)

Rubrica do pesquisador: _____

Rubrica do participante: _____

9.3 microRNAs analisados no OpenArray

Tabela 9.1 – microRNAs analisados no TaqMan® OpenArray®

Identificação	microRNA
TM000186	mmu-miR-96
TM000268	dme-miR-7
TM000338	ath-miR159a
TM000377	hsa-let-7a
TM000379	hsa-let-7c
TM000382	hsa-let-7f
TM000387	hsa-miR-10a
TM000389	hsa-miR-15a
TM000390	hsa-miR-15b
TM000391	hsa-miR-16
TM000395	hsa-miR-19a
TM000396	hsa-miR-19b
TM000397	hsa-miR-21
TM000398	hsa-miR-22
TM000399	hsa-miR-23a
TM000400	hsa-miR-23b
TM000402	hsa-miR-24
TM000403	hsa-miR-25
TM000405	hsa-miR-26a
TM000407	hsa-miR-26b
TM000408	hsa-miR-27a
TM000409	hsa-miR-27b
TM000411	hsa-miR-28
TM000413	hsa-miR-29b
TM000416	hsa-miR-30a-3p
TM000417	hsa-miR-30a-5p
TM000419	hsa-miR-30c
TM000420	hsa-miR-30d
TM000422	hsa-miR-30e-3p
TM000426	hsa-miR-34a
TM000427	hsa-miR-34b
TM000428	hsa-miR-34c
TM000431	hsa-miR-92a
TM000433	hsa-miR-95
TM000435	hsa-miR-99a
TM000436	hsa-miR-99b
TM000437	hsa-miR-100
TM000439	hsa-miR-103
TM000442	hsa-miR-106b

TM000443	hsa-miR-107
TM000449	hsa-miR-125b
TM000451	hsa-miR-126#
TM000452	hsa-miR-127
TM000454	hsa-miR-130a
TM000456	hsa-miR-130b
TM000457	hsa-miR-132
TM000460	hsa-miR-135a
TM000463	hsa-miR-141
TM000464	hsa-miR-142-3p
TM000468	hsa-miR-146a
TM000469	hsa-miR-147
TM000470	hsa-miR-148a
TM000471	hsa-miR-148b
TM000473	hsa-miR-150
TM000475	hsa-miR-152
TM000477	hsa-miR-154
TM000478	hsa-miR-154#
TM000480	hsa-miR-181a
TM000482	hsa-miR-181c
TM000483	hsa-miR-182#
TM000485	hsa-miR-184
TM000489	hsa-miR-190
TM000491	hsa-miR-192
TM000493	hsa-miR-194
TM000494	hsa-miR-195
TM000497	hsa-miR-197
TM000498	hsa-miR-199a
TM000500	hsa-miR-199b
TM000502	hsa-miR-200a
TM000507	hsa-miR-203
TM000508	hsa-miR-204
TM000509	hsa-miR-205
TM000510	hsa-miR-206
TM000511	hsa-miR-208
TM000512	hsa-miR-210
TM000514	hsa-miR-211
TM000515	hsa-miR-212
TM000516	hsa-miR-213
TM000518	hsa-miR-215
TM000521	hsa-miR-218
TM000522	hsa-miR-219
TM000523	hsa-miR-220
TM000524	hsa-miR-221
TM000527	hsa-miR-296
TM000528	hsa-miR-301

TM000529	hsa-miR-302a
TM000531	hsa-miR-302b
TM000533	hsa-miR-302c
TM000534	hsa-miR-302c#
TM000535	hsa-miR-302d
TM000539	hsa-miR-324-5p
TM000540	hsa-miR-325
TM000542	hsa-miR-326
TM000543	hsa-miR-328
TM000544	hsa-miR-330
TM000545	hsa-miR-331
TM000546	hsa-miR-335
TM000553	hsa-miR-346
TM000554	hsa-miR-361
TM000555	hsa-miR-367
TM000557	hsa-miR-369-3p
TM000560	hsa-miR-372
TM000561	hsa-miR-373
TM000563	hsa-miR-374
TM000564	hsa-miR-375
TM000565	hsa-miR-376a
TM000566	hsa-miR-377
TM000567	hsa-miR-378
TM000569	hsa-miR-380-3p
TM000570	hsa-miR-380-5p
TM000571	hsa-miR-381
TM000572	hsa-miR-382
TM000573	hsa-miR-383
TM000574	hsa-miR-384
TM000577	hsa-miR-98
TM000580	hsa-miR-20a
TM000583	hsa-miR-9
TM000587	hsa-miR-29c
TM000590	hsa-miR-129
TM000592	hsa-miR-136
TM000600	hsa-miR-299-5p
TM000602	hsa-miR-30b
TM000604	hsa-miR-424
TM001006	RNU48
TM001011	hsa-miR-200a#
TM001014	hsa-miR-20b
TM001015	hsa-miR-299-3p
TM001020	hsa-miR-365
TM001021	hsa-miR-369-5p
TM001023	hsa-miR-412
TM001024	hsa-miR-429

TM001026	hsa-miR-432
TM001027	hsa-miR-432#
TM001028	hsa-miR-433
TM001029	hsa-miR-448
TM001030	hsa-miR-449
TM001036	hsa-miR-485-5p
TM001037	hsa-miR-490
TM001039	hsa-miR-492
TM001043	hsa-miR-497
TM001046	hsa-miR-500
TM001047	hsa-miR-501
TM001048	hsa-miR-503
TM001050	hsa-miR-506
TM001051	hsa-miR-507
TM001052	hsa-miR-508
TM001090	mmu-miR-93
TM001094	RNU44
TM001097	hsa-miR-146b
TM001101	hsa-miR-329
TM001102	hsa-miR-376b
TM001106	hsa-miR-488
TM001109	hsa-miR-502
TM001111	hsa-miR-511
TM001112	hsa-miR-515-5p
TM001113	hsa-miR-517#
TM001116	hsa-miR-520b
TM001119	hsa-miR-520e
TM001120	hsa-miR-520f
TM001121	hsa-miR-520g
TM001122	hsa-miR-521
TM001129	mmu-miR-137
TM001138	mmu-miR-379
TM001141	mmu-miR-451
TM001145	hsa-miR-512-5p
TM001149	hsa-miR-516-3p
TM001150	hsa-miR-516b
TM001152	hsa-miR-517b
TM001153	hsa-miR-517c
TM001156	hsa-miR-518b
TM001158	hsa-miR-518c#
TM001159	hsa-miR-518d
TM001163	hsa-miR-519c
TM001166	hsa-miR-519e#
TM001167	hsa-miR-520a
TM001168	hsa-miR-520a#
TM001170	hsa-miR-520h

TM001173	hsa-miR-524
TM001174	hsa-miR-525
TM001178	mmu-let-7d#
TM001182	mmu-miR-124a
TM001184	mmu-miR-129-3p
TM001186	mmu-miR-134
TM001187	mmu-miR-140
TM001191	mmu-miR-153
TM001193	mmu-miR-187
TM001271	hsa-miR-363
TM001273	hsa-miR-362
TM001274	hsa-miR-410
TM001277	hsa-miR-485-3p
TM001278	hsa-miR-486
TM001279	hsa-miR-487a
TM001280	hsa-miR-455
TM001283	hsa-miR-363#
TM001284	hsa-miR-542-3p
TM001285	hsa-miR-487b
TM001286	hsa-miR-539
TM001319	mmu-miR-374-5p
TM001338	rno-miR-7#
TM001352	mmu-miR-499
TM001510	hsa-miR-656
TM001511	hsa-miR-549
TM001512	hsa-miR-657
TM001513	hsa-miR-658
TM001514	hsa-miR-659
TM001515	hsa-miR-660
TM001516	hsa-miR-425-5p
TM001518	hsa-miR-532
TM001519	hsa-miR-551a
TM001520	hsa-miR-552
TM001521	hsa-miR-553
TM001522	hsa-miR-554
TM001523	hsa-miR-555
TM001525	hsa-miR-557
TM001526	hsa-miR-558
TM001527	hsa-miR-559
TM001528	hsa-miR-561
TM001529	hsa-miR-562
TM001530	hsa-miR-563
TM001531	hsa-miR-564
TM001533	hsa-miR-566
TM001534	hsa-miR-567
TM001535	hsa-miR-551b

TM001536	hsa-miR-569
TM001538	hsa-miR-548a
TM001539	hsa-miR-586
TM001540	hsa-miR-587
TM001541	hsa-miR-548b
TM001542	hsa-miR-588
TM001543	hsa-miR-589
TM001544	hsa-miR-550
TM001545	hsa-miR-591
TM001546	hsa-miR-592
TM001547	hsa-miR-593
TM001550	hsa-miR-596
TM001551	hsa-miR-597
TM001553	hsa-miR-622
TM001554	hsa-miR-599
TM001555	hsa-miR-623
TM001556	hsa-miR-600
TM001557	hsa-miR-624
TM001558	hsa-miR-601
TM001559	hsa-miR-626
TM001560	hsa-miR-627
TM001562	hsa-miR-629
TM001563	hsa-miR-630
TM001564	hsa-miR-631
TM001566	hsa-miR-603
TM001567	hsa-miR-604
TM001568	hsa-miR-605
TM001569	hsa-miR-606
TM001570	hsa-miR-607
TM001571	hsa-miR-608
TM001573	hsa-miR-609
TM001574	hsa-miR-633
TM001576	hsa-miR-634
TM001578	hsa-miR-635
TM001581	hsa-miR-637
TM001582	hsa-miR-638
TM001583	hsa-miR-639
TM001584	hsa-miR-640
TM001585	hsa-miR-641
TM001586	hsa-miR-613
TM001587	hsa-miR-614
TM001589	hsa-miR-616
TM001590	hsa-miR-548c
TM001591	hsa-miR-617
TM001592	hsa-miR-642
TM001593	hsa-miR-618

TM001594	hsa-miR-643
TM001596	hsa-miR-644
TM001597	hsa-miR-645
TM001598	hsa-miR-621
TM001599	hsa-miR-646
TM001600	hsa-miR-647
TM001601	hsa-miR-648
TM001602	hsa-miR-649
TM001603	hsa-miR-650
TM001604	hsa-miR-651
TM001605	hsa-miR-548d
TM001606	hsa-miR-661
TM001607	hsa-miR-662
TM001608	hsa-miR-449b
TM001610	hsa-miR-411
TM001611	hsa-miR-654
TM001612	hsa-miR-655
TM001613	hsa-miR-571
TM001614	hsa-miR-572
TM001615	hsa-miR-573
TM001617	hsa-miR-575
TM001619	hsa-miR-578
TM001621	hsa-miR-580
TM001622	hsa-miR-581
TM001623	hsa-miR-583
TM001624	hsa-miR-584
TM001625	hsa-miR-585
TM001630	mmu-miR-491
TM001663	mmu-miR-495
TM001818	rno-miR-29c#
TM001821	hsa-miR-484
TM001823	hsa-miR-512-3p
TM001953	mmu-miR-496
TM001960	mmu-miR-615
TM001973	U6 rRNA
TM001979	hsa-miR-431
TM001982	hsa-miR-524-5p
TM001983	hsa-miR-582-5p
TM001984	hsa-miR-590-5p
TM001986	hsa-miR-766
TM001987	hsa-miR-595
TM001988	hsa-miR-598
TM001990	hsa-miR-758
TM001992	hsa-miR-668
TM001993	hsa-miR-767-5p
TM001995	hsa-miR-767-3p

TM001996	hsa-miR-454#
TM001998	hsa-miR-769-5p
TM002002	hsa-miR-770-5p
TM002003	hsa-miR-769-3p
TM002004	hsa-miR-802
TM002005	hsa-miR-675
TM002021	hsa-miR-674
TM002083	hsa-miR-502-3p
TM002084	hsa-miR-504
TM002085	hsa-miR-33b
TM002087	hsa-miR-505#
TM002088	hsa-miR-636
TM002089	hsa-miR-505
TM002090	hsa-miR-513-5p
TM002092	hsa-miR-508-5p
TM002093	hsa-miR-486-3p
TM002094	hsa-miR-218-1#
TM002095	hsa-miR-219-1-3p
TM002096	hsa-miR-221#
TM002097	hsa-miR-222#
TM002098	hsa-miR-223#
TM002099	hsa-miR-224
TM002100	hsa-miR-136#
TM002101	hsa-miR-296-3p
TM002102	hsa-miR-34b
TM002104	hsa-miR-185#
TM002105	hsa-miR-186#
TM002106	hsa-miR-188-3p
TM002107	hsa-miR-195#
TM002108	hsa-miR-30c-1#
TM002109	hsa-miR-32
TM002110	hsa-miR-30c-2#
TM002111	hsa-miR-32#
TM002112	hsa-miR-29a
TM002113	hsa-miR-31#
TM002114	hsa-miR-130b#
TM002115	hsa-miR-26a-2#
TM002116	hsa-miR-361-3p
TM002117	hsa-miR-362-3p
TM002118	hsa-let-7g#
TM002119	hsa-miR-302b#
TM002120	hsa-miR-302d#
TM002121	hsa-miR-367#
TM002122	hsa-miR-376c
TM002124	hsa-miR-371-3p
TM002125	hsa-miR-374a#

TM002126	hsa-miR-23b#
TM002127	hsa-miR-376a#
TM002128	hsa-miR-377#
TM002129	hsa-miR-30b#
TM002130	hsa-miR-122#
TM002131	hsa-miR-130a#
TM002132	hsa-miR-132#
TM002134	hsa-miR-148a#
TM002135	hsa-miR-33a
TM002136	hsa-miR-33a#
TM002137	hsa-miR-92a-1#
TM002138	hsa-miR-92a-2#
TM002139	hsa-miR-93#
TM002140	hsa-miR-96#
TM002141	hsa-miR-99a#
TM002142	hsa-miR-100#
TM002143	hsa-miR-101#
TM002144	hsa-miR-138-2#
TM002145	hsa-miR-141#
TM002146	hsa-miR-143#
TM002147	hsa-miR-342-5p
TM002148	hsa-miR-144#
TM002149	hsa-miR-145#
TM002150	hsa-miR-920
TM002151	hsa-miR-921
TM002152	hsa-miR-922
TM002154	hsa-miR-924
TM002155	hsa-miR-509-3-5p
TM002156	hsa-miR-337-5p
TM002157	hsa-miR-337-3p
TM002158	hsa-miR-125b-2#
TM002159	hsa-miR-135b#
TM002160	hsa-miR-148b#
TM002161	hsa-miR-324-3p
TM002163	hsa-miR-146a#
TM002164	hsa-miR-149#
TM002165	hsa-miR-29b-1#
TM002166	hsa-miR-29b-2#
TM002167	hsa-miR-105
TM002168	hsa-miR-105#
TM002169	hsa-miR-106a
TM002170	hsa-miR-106a#
TM002171	hsa-miR-16-2#
TM002172	hsa-let-7i#
TM002173	hsa-miR-15b#
TM002174	hsa-miR-27b#

TM002176	hsa-miR-933
TM002177	hsa-miR-934
TM002178	hsa-miR-935
TM002179	hsa-miR-936
TM002180	hsa-miR-937
TM002181	hsa-miR-938
TM002182	hsa-miR-939
TM002183	hsa-miR-941
TM002184	hsa-miR-339-3p
TM002185	hsa-miR-335#
TM002186	hsa-miR-345
TM002187	hsa-miR-942
TM002188	hsa-miR-943
TM002189	hsa-miR-944
TM002190	hsa-miR-298
TM002191	hsa-miR-891a
TM002193	hsa-miR-886-5p
TM002194	hsa-miR-886-3p
TM002195	hsa-miR-892a
TM002196	hsa-miR-99b#
TM002197	hsa-miR-124#
TM002198	hsa-miR-125a-5p
TM002199	hsa-miR-125a-3p
TM002200	hsa-miR-541#
TM002201	hsa-miR-541
TM002202	hsa-miR-889
TM002203	hsa-miR-875-5p
TM002204	hsa-miR-875-3p
TM002205	hsa-miR-876-5p
TM002206	hsa-miR-220b
TM002207	hsa-miR-450b-5p
TM002208	hsa-miR-450b-3p
TM002209	hsa-miR-890
TM002210	hsa-miR-891b
TM002211	hsa-miR-220c
TM002212	hsa-miR-888
TM002213	hsa-miR-888#
TM002214	hsa-miR-892b
TM002215	hsa-miR-196b
TM002216	hsa-miR-128a
TM002217	hsa-miR-18b
TM002218	hsa-miR-10b
TM002220	hsa-miR-216a
TM002222	hsa-miR-1
TM002225	hsa-miR-876-3p
TM002227	hsa-miR-323-3p

TM002228	hsa-miR-126
TM002229	hsa-miR-127-5p
TM002230	hsa-miR-330-5p
TM002231	hsa-miR-9#
TM002233	hsa-miR-331-5p
TM002234	hsa-miR-140-3p
TM002235	hsa-miR-509-5p
TM002237	hsa-miR-548d-5p
TM002238	hsa-miR-411#
TM002239	hsa-miR-654-3p
TM002240	hsa-miR-542-5p
TM002241	hsa-miR-510
TM002243	hsa-miR-378
TM002244	hsa-miR-455-3p
TM002245	hsa-miR-122
TM002246	hsa-miR-133a
TM002247	hsa-miR-133b
TM002248	hsa-miR-142-5p
TM002249	hsa-miR-143
TM002250	hsa-miR-193a-3p
TM002251	hsa-miR-200b
TM002252	hsa-miR-338-3p
TM002253	hsa-miR-101
TM002254	hsa-miR-151-3p
TM002255	hsa-miR-149
TM002257	hsa-miR-339-5p
TM002258	hsa-miR-340
TM002259	hsa-miR-340#
TM002260	hsa-miR-342-3p
TM002261	hsa-miR-135b
TM002262	hsa-miR-147b
TM002263	hsa-miR-190b
TM002264	hsa-miR-872
TM002265	hsa-miR-544
TM002266	hsa-miR-545#
TM002267	hsa-miR-545
TM002268	hsa-miR-874
TM002269	hsa-miR-183
TM002270	hsa-miR-183#
TM002271	hsa-miR-185
TM002272	hsa-miR-192#
TM002273	hsa-miR-198
TM002274	hsa-miR-200b#
TM002275	hsa-miR-370
TM002276	hsa-miR-222
TM002277	hsa-miR-320

TM002278	hsa-miR-145
TM002279	hsa-miR-31
TM002281	hsa-miR-193a-5p
TM002282	hsa-let-7g
TM002283	hsa-let-7d
TM002284	hsa-miR-138
TM002285	hsa-miR-186
TM002286	hsa-miR-200c#
TM002287	hsa-miR-155#
TM002288	hsa-miR-10a#
TM002289	hsa-miR-139-5p
TM002290	hsa-miR-208b
TM002292	hsa-miR-653
TM002293	hsa-miR-214#
TM002294	hsa-miR-218-2#
TM002295	hsa-miR-223
TM002296	hsa-miR-885-5p
TM002297	hsa-miR-422a
TM002298	hsa-miR-129#
TM002299	hsa-miR-191
TM002300	hsa-miR-200c
TM002301	hsa-miR-22#
TM002302	hsa-miR-425#
TM002303	hsa-miR-450a
TM002304	hsa-miR-199a-3p
TM002305	hsa-miR-30d#
TM002306	hsa-miR-214
TM002307	hsa-let-7a#
TM002308	hsa-miR-17
TM002309	hsa-miR-424#
TM002310	hsa-miR-18b#
TM002311	hsa-miR-20b#
TM002312	hsa-miR-431#
TM002313	hsa-miR-139-3p
TM002314	hsa-miR-7-2#
TM002315	hsa-miR-10b#
TM002316	hsa-miR-34a#
TM002317	hsa-miR-181a-2#
TM002318	hsa-miR-453
TM002322	hsa-miR-671-3p
TM002323	hsa-miR-454
TM002324	hsa-miR-744
TM002325	hsa-miR-744#
TM002326	hsa-miR-216b
TM002327	hsa-miR-672
TM002329	hsa-miR-452

TM002330	hsa-miR-452#
TM002331	hsa-miR-409-5p
TM002332	hsa-miR-409-3p
TM002333	hsa-miR-181c#
TM002334	hsa-miR-182
TM002336	hsa-miR-196a#
TM002337	hsa-miR-217
TM002338	hsa-miR-483-5p
TM002339	hsa-miR-483-3p
TM002340	hsa-miR-423-5p
TM002341	hsa-miR-708
TM002342	hsa-miR-708#
TM002343	hsa-miR-92b#
TM002344	hsa-miR-556-5p
TM002345	hsa-miR-556-3p
TM002346	hsa-miR-551b#
TM002347	hsa-miR-570
TM002349	hsa-miR-574-3p
TM002350	hsa-miR-576-5p
TM002351	hsa-miR-576-3p
TM002352	hsa-miR-652
TM002353	hsa-miR-615-5p
TM002354	hsa-miR-871
TM002355	hsa-miR-532-3p
TM002356	hsa-miR-873
TM002357	hsa-miR-488
TM002358	hsa-miR-489
TM002360	hsa-miR-491-3p
TM002361	hsa-miR-146b-3p
TM002362	hsa-miR-202#
TM002363	hsa-miR-202
TM002364	hsa-miR-493
TM002365	hsa-miR-494
TM002366	hsa-miR-193b#
TM002367	hsa-miR-193b
TM002368	hsa-miR-497#
TM002369	hsa-miR-515-3p
TM002370	hsa-miR-519e
TM002371	hsa-miR-518e#
TM002372	hsa-miR-885-3p
TM002374	hsa-miR-887
TM002376	hsa-miR-543
TM002378	hsa-miR-125b-1#
TM002379	hsa-miR-194#
TM002380	hsa-miR-106b#
TM002381	hsa-miR-302a#

TM002382	hsa-miR-526b
TM002384	hsa-miR-519b-3p
TM002385	hsa-miR-525-3p
TM002386	hsa-miR-523
TM002387	hsa-miR-518f#
TM002388	hsa-miR-518f
TM002389	hsa-miR-518d-5p
TM002390	hsa-miR-219-2-3p
TM002391	hsa-miR-374b#
TM002392	hsa-miR-301b
TM002393	hsa-miR-520d-5p
TM002395	hsa-miR-518e
TM002396	hsa-miR-518a-5p
TM002397	hsa-miR-518a-3p
TM002398	hsa-miR-579
TM002399	hsa-miR-582-3p
TM002400	hsa-miR-520c-3p
TM002401	hsa-miR-518c
TM002402	hsa-miR-517a
TM002403	hsa-miR-519d
TM002404	hsa-let-7b#
TM002405	hsa-let-7c#
TM002406	hsa-let-7e
TM002407	hsa-let-7e#
TM002408	hsa-miR-548b-5p
TM002409	hsa-miR-589
TM002410	hsa-miR-550
TM002411	hsa-miR-593
TM002412	hsa-miR-548a-5p
TM002413	hsa-miR-522
TM002414	hsa-miR-616
TM002415	hsa-miR-519a
TM002416	hsa-miR-516a-5p
TM002417	hsa-let-7f-1#
TM002418	hsa-let-7f-2#
TM002419	hsa-miR-15a#
TM002420	hsa-miR-16-1#
TM002421	hsa-miR-17#
TM002422	hsa-miR-18a
TM002423	hsa-miR-18a#
TM002424	hsa-miR-19a#
TM002425	hsa-miR-19b-1#
TM002427	hsa-miR-499-3p
TM002428	hsa-miR-500
TM002429	hsa-miR-548c-5p
TM002430	hsa-miR-624

TM002431	hsa-miR-625
TM002432	hsa-miR-625#
TM002433	hsa-miR-628-5p
TM002434	hsa-miR-628-3p
TM002435	hsa-miR-501-3p
TM002436	hsa-miR-629
TM002437	hsa-miR-20a#
TM002438	hsa-miR-21#
TM002439	hsa-miR-23a#
TM002440	hsa-miR-24-1#
TM002441	hsa-miR-24-2#
TM002442	hsa-miR-25#
TM002443	hsa-miR-26a-1#
TM002444	hsa-miR-26b#
TM002445	hsa-miR-27a#
TM002446	hsa-miR-28-3p
TM002447	hsa-miR-29a#
TM002619	hsa-let-7b
TM002623	hsa-miR-155
TM002642	HSA-MIR-151-5P
TM002643	HSA-MIR-765
TM002658	HSA-MIR-338-5P
TM002672	HSA-MIR-620
TM002675	HSA-MIR-577
TM002676	HSA-MIR-144
TM002677	HSA-MIR-590-3P
TM002678	HSA-MIR-191#
TM002681	HSA-MIR-665
TM002743	HSA-MIR-520D-
TM002752	3P
TM002756	HSA-MIR-1224-3P
TM002757	HSA-MIR-513C
TM002758	HSA-MIR-513B
TM002761	HSA-MIR-1226#
TM002763	HSA-MIR-1236
TM002766	HSA-MIR-1228#
TM002768	HSA-MIR-1225-3P
TM002769	HSA-MIR-1233
TM002773	HSA-MIR-1227
TM002775	HSA-MIR-1286
TM002776	HSA-MIR-548M
TM002777	HSA-MIR-1179
TM002778	HSA-MIR-1178
TM002779	HSA-MIR-1205
TM002781	HSA-MIR-1271
TM002783	HSA-MIR-1201

TM002784	HSA-MIR-548J
TM002785	HSA-MIR-1263
TM002789	HSA-MIR-1294
TM002790	HSA-MIR-1269
TM002791	HSA-MIR-1265
TM002792	HSA-MIR-1244
TM002796	HSA-MIR-1303
TM002798	HSA-MIR-1259
TM002799	HSA-MIR-548P
TM002801	HSA-MIR-1264
TM002803	HSA-MIR-1255B
TM002805	HSA-MIR-1282
TM002807	HSA-MIR-1255A
TM002810	HSA-MIR-1270
TM002815	HSA-MIR-1197
TM002816	HSA-MIR-1324
TM002818	HSA-MIR-548H
TM002819	HSA-MIR-1254
TM002820	HSA-MIR-548K
TM002822	HSA-MIR-1251
TM002823	HSA-MIR-1285
TM002824	HSA-MIR-1245
TM002827	HSA-MIR-1292
TM002829	HSA-MIR-1301
TM002830	HSA-MIR-1200
TM002832	HSA-MIR-1182
TM002838	HSA-MIR-1288
TM002840	HSA-MIR-1291
TM002841	HSA-MIR-1275
TM002842	HSA-MIR-1183
TM002843	HSA-MIR-1184
TM002844	HSA-MIR-1276
TM002845	HSA-MIR-320B
TM002847	HSA-MIR-1272
TM002850	HSA-MIR-1180
TM002851	HSA-MIR-1256
TM002852	HSA-MIR-1278
TM002854	HSA-MIR-1262
TM002857	HSA-MIR-1243
TM002860	HSA-MIR-663B
TM002861	HSA-MIR-1252
TM002863	HSA-MIR-1298
TM002867	HSA-MIR-1290
TM002868	HSA-MIR-1305
TM002870	HSA-MIR-1249
TM002871	HSA-MIR-1248

TM002872	HSA-MIR-1289
TM002873	HSA-MIR-1204
TM002874	HSA-MIR-1826
TM002877	HSA-MIR-1304
TM002878	HSA-MIR-1203
TM002879	HSA-MIR-1206
TM002880	HSA-MIR-548G
TM002881	HSA-MIR-1208
TM002883	HSA-MIR-548E
TM002884	HSA-MIR-1274A
TM002885	HSA-MIR-1274B
TM002887	HSA-MIR-1267
TM002888	HSA-MIR-1250
TM002890	HSA-MIR-548N
TM002893	HSA-MIR-1283
TM002894	HSA-MIR-1247
TM002895	HSA-MIR-1253
TM002896	HSA-MIR-720
TM002897	HSA-MIR-1260
TM002901	HSA-MIR-664
TM002902	HSA-MIR-1302
TM002903	HSA-MIR-1300
TM002904	HSA-MIR-1284
TM002905	HSA-MIR-548L
TM002907	HSA-MIR-1293
TM002908	HSA-MIR-1825
TM002909	HSA-MIR-1296
TM002910	HSA-MIR-548I
TM002927	HSA-MIR-1257
	HSA-MIR-1238

9.4 Material Suplementar do Artigo Publicado

ONLINE SUPPLEMENT

Relationship between circulating MicroRNAs and left ventricular hypertrophy in hypertensive patients.

Running title: Cardiac hypertrophy and microRNAs

Authors: Elisangela C.P. Lopes; Layde R. Paim; Luís F.R.S. Carvalho-Romano; Edmilson R. Marques; Eduarda O.Z. Minin; Camila F.L. Vegian; José A. Pio-Magalhães; Lício A. Velloso; Otavio R. Coelho-Filho; Andrei C. Sposito; José R. Matos-Souza; Wilson Nadruz Jr, Roberto Schreiber.

Department of Internal Medicine, School of Medical Sciences, State University of Campinas, São Paulo, Brazil.

Address for correspondence:

Roberto Schreiber, Ph.D.

E-Mail: robertos@unicamp.br.

Wilson Nadruz Junior, MD, Ph.D.

E-Mail: wilnj@fcm.unicamp.br.

Laboratório de Biologia Cardiovascular, Faculdade de Ciências Médicas, Rua Vital Brasil 50- Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitária "Zeferino Vaz". CEP: 13081-970 Campinas, SP. Brasil.

Phone: (55) (19) 3521 7364

EXPANDED MATERIAL AND METHODS

Study Populations

The present study included two cohorts of consecutive hypertensive patients followed at the Hypertension Outpatient Clinic of the Clinics Hospital of the University of Campinas who were enrolled from 2018 to 2019. The exploratory cohort included 42 patients (26 with LVH and 16 without LVH) and the validation cohort comprised 297 patients (162 with LVH and 135 without LVH). Exclusion criteria were age under 18 years, identifiable causes of secondary hypertension, evidence of significant cardiac valve disease and hypertrophic cardiomyopathy. The research was carried out in accordance with the Declaration of Helsinki. This study was approved by the Human Research Ethics Committee of the University of Campinas, and all patients gave written informed consent to participate.

Clinical, Laboratory and Echocardiography Data

Clinical data were gathered from each participant and included information on: age, sex, smoking, hypertension, diabetes mellitus, use of antihypertensive medications, body mass index (BMI), BP, heart rate. BP and heart rate were measured in the sitting position using a validated digital oscillometric device (HEM-705CP; Omron Healthcare, Kyoto, Japan) with appropriate cuff sizes. BMI was calculated as body weight divided by height squared (kg/m^2). Fasting low density lipoprotein (LDL)-cholesterol, high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol, triglycerides, creatinine, and glucose levels were measured using standard laboratory techniques. Hypertension was defined as systolic BP ≥ 140 mmHg or diastolic ≥ 90 mmHg or use of antihypertensive medications. Diabetes mellitus was diagnosed if fasting blood glucose was ≥ 126 mg/dl or when participants were taking hypoglycemic medications.

Echocardiography was performed by a single physician using a Vivid q device (General Electric, Milwaukee, Wisconsin, USA) equipped with a 3S-RS transducer, as previously described (1-3). LVMI was calculated as LV mass/body surface area. Relative wall thickness (RWT) was measured as $2 \times \text{posterior wall thickness} / \text{LV diastolic diameter}$. LVH was defined as LVMI ≥ 95 g/m^2 and ≥ 115 g/m^2 in women and men, respectively. LV geometric patterns were defined as follows: normal geometry (No LVH and RWT ≤ 0.42), concentric remodeling (No LVH and RWT > 0.42), eccentric hypertrophy (LVH and RWT ≤ 0.42) and concentric hypertrophy (LVH and RWT > 0.42). LV ejection fraction was estimated by the Simpson's method.

Extraction and Analysis of Serum miRNA Expression

For the extraction of serum miRNAs, whole blood samples were collected in tubes containing separator gel and clot activator (BD Vacutainer) and subjected to centrifugation at 2000 rpm for 15 min at room temperature. The top serum layer was immediately aliquoted into RNase-free tubes and immediately frozen at -80°C until RNA extraction. To detect hemolysis in serum samples, we used a spectrophotometer to

measure the absorbance of oxyhemoglobin at 414 nm. Serum samples with a reading of 414 >0.2 were considered hemolyzed and excluded.

Samples from both cohorts were extracted using the miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen). The quality of miRNA was assessed by measuring the percentage of miRNAs in the amount of small RNA using a Bioanalyzer 2100 (Agilent, Santa Clara, CA), as previously reported (4). In the exploratory cohort, the miRNA profile was analyzed with the TaqMan OpenArray Human MicroRNA system, a quantitative polymerase chain reaction (qPCR)-based miRNA array platform that contains 754 microRNAs on a microfluidic platform across two sets of primer pools, panel A and B (Life Technologies). Data were normalized using the global normalization method as suggested by the manufacturer and previous reports (5). Six circulating miRNAs with the highest fold change in the exploratory study were chosen for the validation in the validation cohort by qRT-PCR using a customized plate (Life Technologies). Reverse transcription was performed using the SuperScript®III First Strand Synthesis Kit. Specific miRNA PCR primers were synthesized by Life Technologies. Real-time PCR assays were performed with the TaqMan Master Mix (Life Technologies) on a 7900HT FAST Real-Time PCR System (Life Technologies). The comparative Ct ($\Delta\Delta Ct$) method to quantify relative gene expression was used, and fold change (FC) was calculated as $FC = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, where Ct is defined as the PCR cycle number at which the fluorescence meets the threshold in the amplification plot (6). Data were normalized using a geometric mean of U6 snRNA (noncoding small nuclear RNA) and miR-16 as the housekeeping genes.

Gene Set Enrichment Analysis

To understand the biological relevance of differentially expressed miRNAs, we performed functional enrichment analysis. The miRNAs differentially expressed between patients with and without LVH that significantly correlated with LVMI were uploaded into miRWalk (version 2) (7). To strengthen the data, only mRNAs predicted in at least four of five tools (miRanda, miRDB, miRWalk, RNA22, and TargetScan) were considered as possible miRNA targets. We used the Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) to determine the enriched pathways. Only pathways with more than 10 genes, fold enrichment >1.5, and Fisher's exact test p-value <0.05 were considered (8).

HL-1 Cells Culture and miRNA Transfection

We used the adult mouse atrial muscle cell line HL-1, which has been extensively used to assess mechanisms related to cardiac myocyte hypertrophy (9,10), to evaluate the functional impact of selected miRNAs. HL-1 cells were cultured at 37°C and 5% CO₂ atmosphere in Claycomb medium (Sigma, 51800C) supplemented with 2 mM L-Glutamine (Sigma, G7513), penicillin-streptomycin (Sigma, P4333) and 10 % (v/v) FCS (Sigma; F2442) in the absence or presence of 100 μ M of norepinephrine (Sigma, A0937) as a hypertrophic stimulus (11,12) for 2 weeks (13) on gelatin-fibronectin [0.02 % (w/v) gelatin; 5 mg/ml fibronectin] (Sigma, F1141) pre-coated plates (14). Then, HL-1 cells were transiently transfected with miR-145-5p mimetic, anti-miR-145-5p or negative control miRNA (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, Grand Island, NY) at final concentrations of 30 nM. This assay was carried out using the Lipofectamine 2000 Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) following the manufacturer's instructions. Cells were

harvested for subsequent analyses 48 h after the transfection. All transfection experiments were carried out in triplicate.

Real-time Quantitative PCR Analysis from Cells Culture

For detecting the *in vitro* expression of miRNAs and markers of cardiac myocyte hypertrophy, total RNA from cardiac myocytes was isolated using Mirvana Paris Kit (Applied Biosystems, CA). We evaluated the expression of brain natriuretic peptide (Nppb) and atrial natriuretic peptide (Nppa) genes, which are markers of cardiac myocyte hypertrophy, and miR-145-5p using the TaqMan Gene Expression Assays Kit (Applied Biosystems, CA). The polymerase chain reaction was performed in a StepOnePlus™ System (ThermoFisher) real-time PCR system. Gapdh (Mm99999915_g1) was used as endogenous control for Nppb and Nppa expression, while U6 snRNA was used to normalize miR-145 expression.

Statistical Analysis

Continuous variables with normal or non-normal distribution are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD) or median [25th,75th percentiles]. Differences in continuous variables with normal or non-normal distribution between the studied groups (with and without LVH) were evaluated by unpaired student's t-test and Mann-Whitney U-test, respectively. Chi-square test was used to compare categorical variables. Differences in continuous variables derived from cell assays were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test. The correlation between echocardiographic variables and log-transformed expression of miRNAs was assessed by the Person's Method. Multivariable linear regression analysis evaluated the association of log-transformed expression of circulating miRNAs with LVH, LVMI and LV geometric patterns in the validation cohort, adjusting for variables that have been reported to influence LV remodeling: age, sex, diabetes, body mass index, systolic blood pressure, creatinine, smoking and antihypertensive classes (15). p-value <0.05 was considered statistically significant. SPSS 15.0 software was used for statistical analyses.

SUPPLEMENTAL REFERENCE SECTION

1. De Rossi G, Matos-Souza JR, Costa e Silva AA, Campos LF, Santos LG, Azevedo ER, Alonso KC, Paim LR, Schreiber R, Gorla JI, et al. Physical activity and improved diastolic function in spinal cord-injured subjects. *Med Sci Sports Exerc.* 2014; 46:887-92.
2. Lacchini R, Jacob-Ferreira ALB, Luizon MR, Coeli FB, Izidoro-Toledo TC, Gasparini S, Ferreira-Sae MC, Schreiber R, Nadruz Jr W, Tanus-Santos JE. Matrix metalloproteinase 9 gene haplotypes affect left ventricular hypertrophy in hypertensive patients. *Clin Chim Acta* 2010; 411:1940-1944.
3. Lacchini R, Jacob-Ferreira ALB, Luizon MR, Gasparini S, Ferreira-Sae MC, Schreiber R, Nadruz Jr W, Tanus-Santos JE. Common matrix metalloproteinase 2 gene haplotypes may modulate left ventricular

- remodelling in hypertensive patients. *J Hum Hypertens*. 2012;23: 171-177.
4. Li Y, Kowdley KV. Method for microRNA isolation from clinical serum samples. *Anal Biochem*, 2012;431:69-75.
 5. Paim LR, Schreiber R, de Rossi G, Matos-Souza JR, Costa E Silva AA, Calegari DR, Cheng S, Marques FZ, Sposito AC, Gorla JI, et al. Circulating microRNAs, Vascular Risk, and Physical Activity in Spinal Cord-Injured Subjects. *J Neurotrauma*. 2019; 36:845-852.
 6. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method. *Methods*, 2001;25:402-408.
 7. Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N. miRWalk—database: prediction of possible miRNA binding sites by “walking” the genes of three genomes. *J Miomed inform*. 2011; 44:839-47.
 8. Zhang X, Wang X, Wu J, Peng J, Deng X, Shen Y, Yang C, Yuan J, Zou Y. The diagnostic values of circulating miRNAs for hypertension and bioinformatics analysis. *Biosci Rep*, 2018;38: BSR20180525.
 9. White SM, Constantin PE, Claycomb WC. Cardiac physiology at the cellular level: use of cultured HL-1 cardiomyocytes for studies of cardiac muscle cell structure and function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286:H823-H829.
 10. Hao L, Ren M, Rong B, Xie F, Lin MJ, Zhao YC, Yue X, Han WQ, Zhong JQ. TWEAK/Fn14 mediates atrial-derived HL-1 myocytes hypertrophy via JAK2/STAT3 signalling pathway. *J Cell Mol Med*. 2018; 22:4344-4353.
 11. Chen Y, Qiao X, Zhang L, Li X, Liu Q. Apelin-13 regulates angiotensin ii-induced Cx43 downregulation and autophagy via the AMPK/mTOR signaling pathway in HL-1 cells. *Physiol Res*, 2020;69:813-822.
 12. Landstrom AP, Kellen CA, Dixit SS, van Oort RJ, Garbino A, Weisleder N, Ma J, Wehrens XH, Ackerman MJ. Junctophilin-2 expression silencing causes cardiocyte hypertrophy and abnormal intracellular calcium handling. *Circ Heart Fail*. 2011; 4:214-23.
 13. Bloch L, Ndongson-Dongmo B, Kusch A, Gragun D, Heller R, Huber O. Real-time monitoring of hypertrophy in HL-1 cardiomyocytes by impedance measurements reveals different modes of growth. *Cytotechnology*, 2016;68:1897-907.
 14. Claycomb WC, Lanson Jr NA, Stallworth BS, Egeland DB, Delcarpio JB, Bahinski A, Izzo Jr NJ. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95:2979-84.
 15. Nadruz Jr W. Myocardial remodeling in hypertension. *J Hum Hypertens*. 2015;29: 1-6. doi:10.1038/jhh.2014.36

Supplementary Tables

Table S1. Clinical, laboratory and echocardiographic characteristics of the cohorts

Characteristics	Exploratory cohort (n=42)	Validation cohort (n=297)	p
Age, years	57.7 ± 8.5	61.2 ± 12.2	0.062
Male (%)	22 (52)	128 (43)	0.256
Smokers, (%)	8 (19)	33 (11)	0.22
Diabetics, (%)	17 (40)	174 (58)	0.040
Body mass index, kg/m ²	29.5 ± 4.6	30.3 ± 5.7	0.398
LDL-cholesterol, mg/dL	113 ± 34	93 ± 33	0.001
HDL-cholesterol, mg/dL	48 ± 12	46 ± 13	0.318
Triglycerides, mg/dL	118 [90, 208]	124 [89, 177]	0.550
Glucose, mg/dL	100 [89, 129]	101 [90, 121]	0.969
Creatinine, mg/dL	0.90 [0.76, 1.05]	0.91 [0.75, 1.14]	0.496
Systolic blood pressure, mm Hg	140.3 ± 20.1	149.0 ± 25.0	0.034
Diastolic blood pressure, mm Hg	76.5 ± 13.2	83.5 ± 15.3	0.003
Diuretics, n (%)	32 (76)	156 (52)	0.006
CCB, n (%)	22 (52)	132 (44)	0.423
β-Blockers, n (%)	21 (50)	129 (43)	0.524
ACEI or ARB, n (%)	33 (78)	261 (88)	0.155
Interventricular septum thickness, mm	10.0 ± 1.4	10.5 ± 1.8	0.047
Posterior wall thickness, mm	9.9 ± 1.3	10.5 ± 1.6	0.037
LV end-diastolic diameter, mm	49.6 ± 4.7	49.7 ± 6.1	0.953
LV ejection fraction, %	67.0 ± 5.4	65.2 ± 9.5	0.297
Relative wall thickness, mm	0.40±0.05	0.43±0.07	0.046
LV mass index, g/m ²	120.1 ± 30.9	111.5 ± 33.1	0.116

Continuous data with normal and non-normal distribution are presented as mean ± standard deviation and median [25th, 75th percentiles]. ACEI or ARB – angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers; CCB – calcium channel blockers; HDL – high density lipoprotein; LDL – low density lipoprotein; LV – left ventricular.

Table S2. Differentially expressed miRNAs in participants with left ventricular hypertrophy vs those without left ventricular hypertrophy in exploratory cohort.

miRNA	Log2 FC	p-value
Up-regulated miRNAs		
miR-let-7c	1.90	0.019
miR-92a	1.15	0.017
miR-30a-5p	1.15	0.023
miR-145-5p	1.49	0.030
miR-451	1.08	0.027
miR-375	1.05	0.018
miR-601	1.03	0.279
miR-185	0.94	<0.001
miR-320B	0.95	0.220
miR-93#	0.93	0.125
miR-10b#	0.88	0.187
miR-1291	0.86	0.145
miR-30d	0.84	0.129
miR-376c	0.83	0.086
miR-340	0.82	0.198
miR-328	0.79	0.114
miR-885-5p	0.79	0.093
miR-338-5p	0.78	0.022
miR-122	0.78	0.064
miR-10a	0.76	0.034
miR-484	0.74	0.155
miR-532-3p	0.72	0.262
miR-193b	0.72	0.107
miR-296	0.68	0.034
miR-150	0.69	0.181
miR-597	0.69	0.074
miR-423-5p	0.69	0.065
miR-197	0.62	0.088
miR-766	0.62	0.278
miR-638	0.61	0.133
miR-345	0.59	0.274
miR-99b	0.57	0.153
miR-146a	0.55	0.369
miR-127	0.54	0.153
miR-193a-5p	0.54	0.155
miR-125b	0.53	0.128
miR-30e-3p	0.50	0.433
miR-194	0.50	0.221
miR-192	0.47	0.580
miR-191	0.46	0.374
miR-660	0.44	0.137
miR-324-3p	0.43	0.199
miR-29a	0.41	0.647
miR-223#	0.40	0.362
miR-222	0.39	0.456
miR-365	0.39	0.482
miR-148b	0.38	0.417
miR-20a	0.36	0.495
miR-21	0.36	0.260
miR-106b	0.34	0.373

miR-148a	0.33	0.262
miR-19a	0.32	0.549
miR-93	0.27	0.333
miR-340#	0.27	0.735
miR-126	0.26	0.596
miR-139-5p	0.26	0.207
miR-18a	0.24	0.393
miR-132	0.24	0.385
miR-221	0.23	0.486
miR-19b	0.23	0.576
miR-642	0.21	0.802
miR-223	0.21	0.687
miR-181c	0.20	0.684
miR-24	0.20	0.591
miR-645	0.19	0.523
miR-144#	0.19	0.731
miR-16	0.17	0.757
miR-574-3p	0.16	0.714
miR-143	0.16	0.727
miR-Let-7d	0.14	0.679
miR-106a	0.13	0.661
miR-Let-7g	0.13	0.806
miR-30c	0.13	0.731
miR-532	0.12	0.748
miR-942	0.12	0.905
miR-126#	0.10	0.880
miR-17	0.10	0.732
miR-140	0.09	0.865
miR-28	0.09	0.807
miR-125a-5p	0.09	0.865
miR-25	0.06	0.872
miR-199a-3p	0.04	0.855
miR-146b	0.03	0.952
miR-130b	0.02	0.938
miR-142-3p	0.02	0.953
miR-195	0.02	0.961
miR-186	0.02	0.964
Down-regulated miRNAs		
miR-342-3p	-0.02	0.968
miR-323-3p	-0.04	0.959
miR-30b	-0.05	0.873
miR-101	-0.06	0.917
miR-26a	-0.09	0.809
miR-181a	-0.10	0.742
miR-20b	-0.13	0.712
miR-15b	-0.13	0.662
miR-128a	-0.13	0.763
miR-548a	-0.14	0.863
miR-331	-0.16	0.599
miR-204	-0.18	0.714
miR-28-3p	-0.18	0.500
miR-335	-0.19	0.646
miR-103	-0.20	0.432
miR-130a	-0.22	0.583
miR-339-3p	-0.22	0.693

miR-134	-0.23	0.708
miR-27a	-0.26	0.405
miR-361	-0.26	0.477
miR-378	-0.27	0.711
miR-744	-0.29	0.302
miR-376a	-0.31	0.805
miR-27b	-0.31	0.190
miR-324-5p	-0.33	0.317
miR-374-5p	-0.33	0.209
miR-26b	-0.38	0.143
miR-374	-0.39	0.498
miR-206	-0.48	0.566
miR-27a#	-0.49	0.354
miR-151-3p	-0.53	0.838
miR-152	-0.55	0.131
miR-301	-0.61	0.076
miR-29c	-1.04	0.483
miR-590-5p	-2.74	0.200

FC- Fold change

Table S3. Differentially expressed miRNAs in participants with left ventricular hypertrophy vs those without left ventricular hypertrophy in the exploratory and validation cohorts.

miRNA	Exploratory Cohort		Validation cohort	
	Fold change	p	Fold change	p
miR-Let-7c	3.72	0.019	5.66	<0.001
miR-145-5p	2.81	0.030	2.57	0.005
miR-30a-5p	2.21	0.023	1.92	0.046
miR-92a	2.22	0.017	1.45	0.041
miR-185	1.92	<0.001	-1.27	0.358
miR-451	2.11	0.027	1.34	0.032
miR-375	2.07	0.018	-	-
miR-338-5p	1.81	0.007	-	-
miR-10a	1.69	0.034	-	-
miR-296	1.60	0.034	-	-

Table S4. Bivariate correlation coefficients between selected miRNAs and diabetes mellitus and systolic blood pressure in the validation cohort.

miRNAs	Diabetes mellitus		Systolic blood pressure	
	r	p	r	p
Log miR-let7c	-0.051	0.197	0.037	0.547
Log miR-92a	-0.069	0.266	0.106	0.077
Log miR-145-5p	0.034	0.588	0.106	0.080
Log miR-30a-5p	0.094	0.128	0.146	0.015
Log miR-451	0.134	0.057	0.213	0.002
Log miR-185	0.039	0.672	-0.007	0.938

The correlation of log-transformed expression of miRNAs with systolic blood pressure and diabetes was assessed by the Person's and Spearman's Method, respectively.

Table S5. Multivariable linear regression analysis between selected miRNAs and left ventricular mass index or left ventricular hypertrophy in the validation cohort.

miRNA	Left ventricular mass index		Left ventricular hypertrophy	
	Beta $\pm$ SE	p	Beta $\pm$ SE	p
Log miR-let7c	0.015 $\pm$ 0.004	<0.001	1.33 $\pm$ 0.28	<0.001
Log miR-92a	0.006 $\pm$ 0.005	0.26	0.74 $\pm$ 0.32	0.022
Log miR-145-5p	0.011 $\pm$ 0.004	0.005	0.89 $\pm$ 0.25	<0.001
Log miR-30a-5p	0.001 $\pm$ 0.003	0.74	0.54 $\pm$ 0.20	0.009
Log miR-451	0.010 $\pm$ 0.004	0.019	0.79 $\pm$ 0.26	0.003
Log miR-185	-0.010 $\pm$ 0.007	0.12	-0.04 $\pm$ 0.39	0.93

Legend: All analyses were adjusted for age, sex, body mass index, systolic blood pressure, diabetes mellitus, smoking, creatinine, use of diuretics, beta-blockers, calcium-channel blockers and angiotensin-converting-enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers. Each studied miRNA entered alone in the multivariable regression models. SE – standard error.

Table S6. Multivariable linear regression analysis evaluating the relationship between miRNA expression and left ventricular geometric patterns in the validation cohort.

miRNA	Normal geometry (n=91)	Eccentric LVH (n=53)	Concentric LVH (n=109)	Concentric remodelling (n=44)
Log miR-let7c	Ref	1.47 ± 0.42 ^ψ	1.48 ± 0.35 ^ψ	0.42 ± 0.44
Log miR-92a	Ref	0.67 ± 0.48	1.06 ± 0.40*	0.52 ± 0.50
Log miR-145-5p	Ref	1.39 ± 0.37 ^ψ	0.62 ± 0.30*	-0.05 ± 0.38
Log miR-30a-5p	Ref	0.50 ± 0.30	0.65 ± 0.25*	0.18 ± 0.31
Log miR-451	Ref	0.75 ± 0.41	0.99 ± 0.32 [#]	0.34 ± 0.39
Log miR-185	Ref	-1.25 ± 0.65	0.05 ± 0.50	-0.58 ± 0.60

Legend: Data are presented as beta coefficient ± standard error. All analyses were adjusted for age, sex, body mass index, systolic blood pressure, diabetes mellitus, smoking, creatinine, and use of diuretics, beta-blockers, angiotensin-converting enzyme or angiotensin receptor blocker and calcium-channel blocker. *p<0.05; #p<0.01; and ^ψp<0.001 compared with normal geometry. LVH – left ventricular hypertrophy. Ref-Reference.

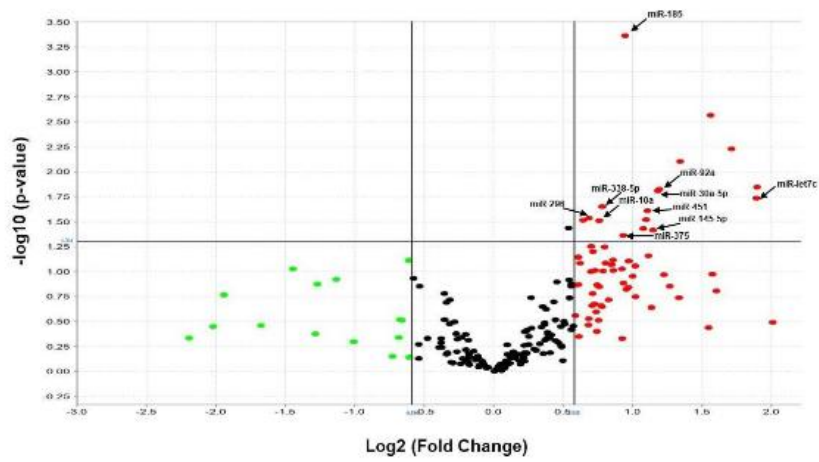


Figure S1. Differential expression analysis of microRNAs (miRNAs) obtained in serum of hypertensive patients with left ventricular hypertrophy (LVH) vs without LVH. Volcano plot depicts the significantly altered miRNAs found ($p < 0.05$). Each dot represents a miRNA, upregulated are in red ($\log_2$ fold change ≥ 1.5), downregulated in green ($\log_2$ fold-change ≤ -1.5), and unchanged in black.