

**VAGNER OLIVEIRA CARVALHO RIGAUD**

**Estudo dos níveis plasmáticos de miR-208a na  
cardiotoxicidade de pacientes submetidos à quimioterapia  
com antraciclina**

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina da Universidade de São  
Paulo para a obtenção do título de  
Doutor em Ciências.

Programa de: Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Edimar Alcides  
Bocchi

São Paulo,

2016

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Rigaud, Vagner Oliveira Carvalho

Estudo dos níveis plasmáticos de miR-208<sup>a</sup> na cardiotoxicidade de pacientes submetidos à quimioterapia com antraciclina / Vagner Oliveira Carvalho Rigaud. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Cardiologia.

Orientador: Edimar Alcides Bocchi.

Descritores: 1.MicroRNAs 2.Cardiotoxicidade 3.Doxorrubicina 4.Neoplasias da mama 5.Biomarcadores 6.Antraciclina

USP/FM/DBD-120/16

*“A felicidade só é plena quando compartilhada”*

*- Christopher McCandless*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais Maisete Jane Menezes de Oliveira e Carlos Alberto Lopes de Carvalho pelo amor e apoio incondicionais ofertados durante esses longos nove anos de pós-graduação entre mestrado e doutorado. Um longo período de mais do que aprendizado e amadurecimento, mas de reflexões sobre os valores da vida. Gostaria também de agradecer ao meu irmão Vitor Oliveira Carvalho por ser minha inspiração e sempre me guiar pelos caminhos menos árduos; e minha irmã Vivane Oliveira Carvalho por me fazer acreditar que sempre o melhor ainda está por vir. Por fim, mas não menos importante, gostaria de agradecer a minha noiva Lays Tavares Melo por tornar os meus dias mais agradáveis e por dividir todas as nossas felicidades, angustias e anseios.

Gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Edimar Alcides Bocchi por me receber de braços abertos e me guiar durante estes anos. Agradeço também pela oportunidade de estar ao lado de profissionais de excelência como o senhor.

Agradeço a todos os integrantes da Unidade de Insuficiência Cardíaca do Instituto do Coração, em especial ao Prof. Dr. Guilherme Veiga Guimarães pelas contribuições, discussões e ensinamentos; a Maria de Lourdes Ribeiro pelo suporte; e aos colegas de pós-graduação Rafael Ertner Castro e Leandro Silva pela alegria e apoio.

A todos envolvidos no ensaio clínico *“Estudo duplo-cego randomizado e controlado sobre o efeito do betabloqueador na prevenção da cardiomiopatia secundária a quimioterápicos”* (CECCY trial), em especial a

todos pacientes, meio e finalidade deste estudo; a Dra. Silvia Ayub Ferreira, Mônica Ávila, Sara Brandão e Fátima Cruz pelo suporte.

Ao Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração, em especial ao Prof. Dr. Edécio de Cunha Neto e Dra. Ludmila Ferreira pelo apoio técnico, discussões e ensinamentos.

Ao Laboratório de Lípidos do Instituto do Coração, em especial ao Prof. Dr. Raul Maranhão e a Dra. Priscila Oliveira Carvalho pelo apoio técnico e contribuições.

Ao Laboratório Clínico do Instituto do Coração, em especial a Adriana Nogueira pelas quantificações da troponina cardíaca I.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação Zerbini pelo suporte financeiro.

## Sumário

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Biomarcadores de cardiotoxicidade.....	3
1.2. microRNAs.....	5
1.2.1. Biogênese.....	6
1.2.2. Mecanismo de ação.....	7
1.2.3. Nomenclatura.....	8
1.2.4. O microRNA cardio-específico miR-208a.....	9
1.2.5. Implicações do miR-208a na insuficiência cardíaca.....	11
1.2.6. miR-208a como potencial biomarcador de lesão miocárdica ....	12
2. JUSTIFICATIVA .....	15
3. HIPÓTESE .....	17
4. OBJETIVOS.....	19
4.1. Objetivo geral .....	20
4.2. Objetivos específicos .....	20
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	21
5.1. Desenho do estudo .....	22
5.2. Coleta de sangue periférico e preparação do plasma.....	24
5.3. Extração de RNA total .....	25
5.4. Determinação da concentração de RNA total.....	26
5.5. Reação de transcrição reversa.....	27
5.6. Quantificação relativa dos níveis plasmáticos de microRNAs .....	28
5.7. Estratégia de normalização dos dados .....	29
5.8. Medidas para minimização e controle de contaminação.....	30
5.9. Mensuração dos níveis séricos de troponina cardíaca I.....	31

5.10.	Ecocardiograma bidimensional com doppler.....	31
5.11.	Análise estatística .....	31
6.	RESULTADOS .....	33
6.1	Casuística .....	34
6.1	Mensuração dos níveis plasmáticos de miR-208a.....	35
6.2	Mensuração dos níveis séricos de cTnI e FEVE.....	37
6.3	Mensuração dos níveis de miR-1, -133b, -146a, -208b e -423-5p...	39
7.	DISCUSSÃO.....	45
7.1.	Efeito do tratamento com doxorrubicina sobre os níveis circulantes de miR-1, -133b, -208a/b, -146a e -423-5p.....	46
7.2.	miR-1 e cardiotoxicidade .....	49
7.3.	Implicações clínicas .....	51
7.4.	Limitações.....	52
8.	CONCLUSÕES .....	53
9.	ANEXOS.....	55
	Anexo A - Artigos publicados durante o período de doutoramento.....	56
	Anexo B – Trabalhos apresentados durante período de doutoramento.....	68
	Anexo C – Atuações como revisor durante o período de doutoramento. ..	69
	Anexo D – Número de citações e índice ‘h’ por indicadores de produtividade.....	70
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73



**LISTAS**

## Lista de figuras

**Figura 1** – Fluxograma do estudo.

**Figura 2** – Concentrações de troponina cardíaca I (cTnI) no sangue ao longo da quimioterapia com antraciclina em pacientes com câncer de mama.

**Figura 3** – Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo (FEVE) ao longo da quimioterapia com doxorrubicina em pacientes com câncer de mama. Não houve diferença estatística entre os tempos.

**Figure 4** – Regressão linear revelando ausência de associação ente mudanças na fração de ejeção do ventrículo esquerdo ( $\Delta$ FEVE) e na troponina cardíaca I ( $\Delta$ cTnI) com um  $r^2 = 0.005$  e  $p = 0.604$ .

**Figura 5** – Níveis de expressão de miR-1, -133b, -146a e -423-5p ao longo do tratamento com 4 ciclos de doxorrubicina em pacientes com câncer de mama.

**Figura 6** – Regressão linear entre os níveis circulantes de (A) miR-1, (B) -133b, (C) -146a e (D) -423-5p e mudanças na fração de ejeção do ventrículo esquerdo ( $\Delta$ FEVE) revelando associação entre miR-1 e  $\Delta$ FEVE (A).

**Figura 7** – Curva ROC (receiver operating characteristic) revelando a habilidade dos níveis circulantes de miR-1 e cTnI em discriminar pacientes que desenvolveram cardiotoxicidade daqueles que não desenvolveram durante em pacientes com câncer de mama sob tratamento com doxorrubicina.

**Figura 8** – Níveis circulantes de miR-1 e -133b em pacientes com troponina cardíaca I (cTnI) alta (n= 7) e baixa (n= 49) tratados com doxorrubicina.

**Figura 9** – Regressão linear entre os níveis circulantes de (A) miR-1, (B) -133b e troponina cardíaca I (cTnI) revelando uma associação entre miR-1 e cTnI (A).

## **Lista de tabelas**

**Tabela 1** – Características clínicas da população estudada.

## Lista de símbolos

$\bar{x}$  - média

$\tilde{x}$  - mediana

< - menor que

> - maior que

°C - grau Celsius

$C_t$  – *Cycle Treshold*

$g$  - força gravitacional

$m^2$  – metro quadrado

mg – miligrama

ml - mililitro

mM - milimolar

ng - nanograma

pg - picograma

u - unidade

$\alpha$  - alfa

$\beta$  - beta

$\Delta$  - delta

$\mu$ l - microlitro

## Lista de siglas e abreviaturas

cTnI – Troponina Cardíaca I

DNA – Ácido desoxirribonucleico

etc. – *Et cetera*

FEVE – Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo

FC – *Fold Change*

HC-FMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo

HDL – Lipoproteína de alta densidade (High Density Lipoprotein)

IC – Insuficiência Cardíaca

MHC – Miosina de cadeia pesada (Myosin Heavy Chain)

miRNA ou miR – microRNA

miRNA - mRNA-like non-coding RNA

ncRNAs – RNAs não codificantes (non-coding RNAs)

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa

RISC – Complexo de silenciamento induzido por RNA (RNA-induced  
silencing complex)

RNA – Ácido ribonucleico

RNA<sub>m</sub> – RNA mensageiro

rRNA – RNA ribossomal

ROC – *Receiver Operating Characteristic*

RT – Transcrição Reversa

RT-qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa por Transcrição

Reversa

snoRNAs – RNAs pequenos nucleolares (Small Nucleolar RNAs)

tRNA – RNA transportador

UTR – Região não traduzidas (UnTranslated Region)

## **Lista de anexos**

**Anexo A** – Artigos publicados durante o período de doutoramento

**Anexo B** – Trabalhos apresentados durante período de doutoramento.

**Anexo C** – Artigos revisados durante o período de doutoramento.

**Anexo D** – Número de citações e índice 'h' por indicadores de produtividade.



**RESUMO**

**Rigaud VOC. Estudo dos níveis plasmáticos de miR-208a na cardiotoxicidade de pacientes submetidos à quimioterapia com antraciclina [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.**

**INTRODUÇÃO:** Cardiotoxicidade é frequentemente associada ao uso crônico de doxorubicina (DOX) podendo levar a cardiomiopatia e insuficiência cardíaca. A identificação de miRNAs cardiotoxicidade-específicos e seu potencial como biomarcadores poderia fornecer uma ferramenta prognostica valiosa e uma potencial área de intervenção.

**METODOLOGIA:** Este é um sub-estudo do ensaio clínico prospectivo “Efeito do Carvedilol na Prevenção da Cardiotoxicidade Induzida por Quimioterapia” (ensaio CECCY) no qual incluiu 56 pacientes do sexo feminino (idade 49.9±3.3) provenientes do braço placebo. Os pacientes incluídos foram submetidos à quimioterapia com DOX seguido por taxanos. Troponina cardíaca I (cTnI), fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) e microRNAs foram mensurados periodicamente. **RESULTADOS:** Os níveis circulantes de miR-1, -133b, -146a e -423-5p aumentaram significativamente durante o tratamento (18.6, 11.5, 10.6 e 12.1-vezes respectivamente;  $p < 0.001$ ) enquanto miR-208a e -208b foram indetectáveis. cTnI aumentou de 6.6±0.3 para 46.7±5.5 pg/ml ( $p < 0.001$ ) enquanto FEVE tendeu a diminuir de 65.3±0.5 para 63.8±0.9 ( $p = 0.053$ ) após 12 meses; deis pacientes (17.9%) desenvolveram cardiotoxicidade. miR-1 foi associado a mudanças na FEVE ( $r^2 = 0.363$ ,  $p < 0.001$ ) enquanto miR-1 e -133b foram associados a cTnI ( $r^2 = 0.675$  e  $0.758$ ;  $p < 0.001$ ). Além disso, miR-1 antecipou a cardiotoxicidade e mostrou uma area sobre a curva maior que cTnI para discriminar pacientes que desenvolveram cardiotoxicidade daqueles que não desenvolveram (AUC = 0.849 e 0.456,  $p < 0.001$  e 0.663, respectivamente). **CONCLUSÃO:** Nossos dados sugerem miR-1 como um potencial novo biomarcador de cardiotoxicidade induzida por DOX em pacientes com câncer de mama. Estes resultados podem levar a novas estratégias de detecção precoce do risco de lesão cardíaca induzida por DOX bem como a introdução de uma nova área para intervenção.

**Descritores:** microRNA; cardiotoxicidade; doxorubicina; neoplasias de mama; biomarcadores; antraciclina.

**ABSTRACT**

**Rigaud VOC. Study of the circulating levels of miR-208a in cardiotoxicity from patients under chemotherapy with anthracycline [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.**

**INTRODUCTION:** Cardiotoxicity is frequently associated with the chronic use of doxorubicin (DOX) and may lead to cardiomyopathy and heart failure. Identification of cardiotoxicity-specific miRNA biomarkers could provide clinicians with a valuable prognosis tool and a potential area for intervention. **METHODS:** This is an ancillary study from the prospective trial "Carvedilol Effect in Preventing Chemotherapy-Induced Cardiotoxicity." (CECCY trial) which included 56 female patients (49.9±3.3 age) from placebo arm. Enrolled patients were treated with DOX followed by taxanes. Cardiac troponin I (cTnI), left ventricle ejection fraction (LVEF) and miRNAs were measured periodically. **RESULTS:** Circulating levels of miR-1, -133b, -146a and -423-5p increased along the treatment (18.6, 11.5, 10.6 and 12.1-fold respectively;  $p < 0.001$ ); miR-208a and -208b were undetectable. cTnI increased from 6.6±0.3 to 46.7±5.5 pg/ml ( $p < 0.001$ ) while LVEF tended to decrease from 65.3±0.5 to 63.8±0.9 ( $p = 0.053$ ) over 12 months; ten patients (17.9%) developed cardiotoxicity. miR-1 was associated to changes in LVEF ( $r^2 = 0.363$ ,  $p < 0.001$ ) while miR-1 and -133b were associated to cTnI ( $r^2 = 0.675$  and  $0.758$ ;  $p < 0.001$ ). Furthermore, miR-1 anticipated cardiotoxicity and showed greater area under the curve than cTnI to discriminate between patients who did and did not developed cardiotoxicity (AUC = 0.849 and 0.456,  $p < 0.001$  and 0.663, respectively). **CONCLUSION:** Our data suggest circulating miR-1 as a potential new biomarker of DOX-induced cardiotoxicity in breast cancer patients. These results may lead to new earlier strategies to detect drug-induced cardiac injury risk before it develops to an irreversible stage or introduce new area for intervention.

**Descriptors:** microRNA; cardiotoxicity; doxorubicin; breast neoplasms; biomarkers; anthracyclines.

# **1.INTRODUÇÃO**

As doenças cardíacas e as neoplasias são as principais causas de óbito geral na população brasileira [1] e americana [2]. Dentre as doenças cardíacas, destaca-se a insuficiência cardíaca (IC) com altos índices de mortalidade a despeito dos avanços no tratamento farmacológico [1]. Aproximadamente 80% dos homens e 70% das mulheres com menos de 65 anos morrem dentro de oito anos do diagnóstico de IC [3].

Quanto às neoplasias em geral, a mortalidade tem decrescido ano a ano. Nos homens a taxa de óbito reduziu-se 19,2% entre 1990 – 2005 e nas mulheres, 11,4% [2]. Esta melhora na sobrevida pode ser atribuída a diversos fatores, entre eles a detecção precoce das neoplasias, controle dos fatores de risco e melhora do tratamento quimioterápico.

Entretanto, com o aumento da sobrevida, os pacientes vivenciam cada vez mais os efeitos colaterais dos medicamentos administrados, destacando-se a cardiotoxicidade. A manifestação mais típica desta cardiotoxicidade é a cardiomiopatia dilatada que se manifesta tardiamente no curso da doença e normalmente é refratária ao tratamento clínico [4].

A cardiomiopatia dilatada secundária a quimioterápicos (CMQT) responde por aproximadamente 1% de todas as cardiomiopatias dilatadas [5]. No caso das antraciclinas, classe de quimioterápicos usada no tratamento de uma variedade de neoplasias hematológicas e de órgãos sólidos, observa-se algum grau de disfunção ventricular em metade dos pacientes após 10 a 20 anos do tratamento [4] e IC sintomática desenvolve-

se em 10% dos pacientes que recebem doses superiores a 550 mg/m<sup>2</sup> de doxorubicina [6].

No caso da terapia adjuvante para câncer primário de mama, o uso de derivados da antraciclina provocou redução acima de 10% na fração ejeção do ventrículo esquerdo em 10 a 50% dos pacientes tratados, mesmo com uso de doses consideradas seguras para o tratamento [7].

A ação quimioterápica das antraciclinas é derivada da indução de apoptose em células cancerígenas. No entanto induz também apoptose em células normais. A lesão cardíaca induzida pelas antraciclinas envolve a geração de radicais livres por mecanismos enzimáticos da cadeia respiratória mitocondrial assim como uma via não enzimática que incorpora ferro. Os radicais livres e o ferro podem lesar a membrana celular ou macromoléculas, aumentando a sua permeabilidade. Os miócitos são mais suscetíveis à lesão por radicais livres devido ao seu alto metabolismo oxidativo e poucas defesas antioxidantes [8].

### **1.1. Biomarcadores de cardiotoxicidade**

A identificação precoce do risco de cardiotoxicidade é o objetivo primário tanto para cardiologistas quanto para oncologistas, permitindo o planejamento de estratégias terapêuticas, o suporte à função cardíaca e o monitoramento da progressão da injúria cardíaca. No entanto, o desenvolvimento de estratégias para monitoramento da lesão cardíaca induzida por antraciclinas tem sido um desafio. A biópsia endomiocárdica é o padrão ouro, existindo um sistema de graduação da toxicidade,

demonstrando que o dano miocárdico já ocorre com doses de 180mg/m<sup>2</sup> [9]. Esse procedimento é muito sensível para detecção de injúria miocárdica, porém é invasivo, necessita de um médico treinado e pode não estar correlacionado com o quadro clínico. Por isso, outras formas de monitorização da IC têm sido aceitas.

A mensuração de biomarcadores cardioespecíficos, como a troponina cardíaca I (cTnI), é uma ferramenta diagnóstica útil para a identificação precoce, avaliação, e monitoramento da cardiotoxicidade. A cTnI é uma proteína das células miocárdicas e está muito bem estabelecida como marcador de injúria miocárdica [10]. Também já foi demonstrado que o aumento da cTnI após tratamento quimioterápico é um marcador de risco para eventos cardíacos [11,12]. Possui alto valor preditivo negativo, permitindo a exclusão de monitorização em longo prazo com métodos caros como o ecocardiograma e a angiocardiografia [13]. A elevação da cTnI após 1 mês do tratamento quimioterápico foi relacionado com maior incidência de eventos em relação a um aumento transitório [11].

Apesar de a cTnI estar bem estabelecida como marcador de injúria miocárdica, estudos recentes revelaram que pequenas moléculas de RNA circulantes no sangue, denominadas microRNAs (miRNAs), têm sido descritas como potenciais biomarcadores em diversas doenças, apresentando alta sensibilidade e especificidade na detecção da injúria cardíaca [14].



## 1.2. microRNAs

O genoma humano codifica um amplo espectro de RNAs onde a função da maioria destas moléculas tem sido parcialmente elucidada ou ainda permanece desconhecida. Didaticamente, os RNAs podem ser divididos em dois grandes grupos: 1) RNAs codificadores de proteínas (RNA mensageiro ou mRNA), e 2) RNAs não codificadores de proteína (ncRNAs – exemplificados posteriormente).

Embora o genoma humano possua um grande número de genes, somente por volta de 30% de todos os genes transcritos são codificadores de proteínas. Se levarmos em conta todas as bases nitrogenadas transcritas, somente 2% delas compõem genes codificadores de proteínas, enquanto os 98% restantes e aproximadamente 70% de todos os genes estão relacionados a funções estruturais e regulatórias [15].

O grupo dos ncRNAs podem ser subdivididos em duas classes: constitutivos e regulatórios. Os ncRNAs constitutivos são expressados continuamente e são essenciais para a estrutura e função normal das células, por exemplo os RNAs transportadores (tRNA) e ribossomais (rRNA). Já os ncRNAs regulatórios são seletivamente expressados e afetam a expressão de outros genes ao nível transcricional ou translacional.

Nas últimas duas décadas, uma família de ncRNAs regulatórios, chamados de microRNAs (miRNAs) devido ao seu pequeno comprimento (~22 nucleotídeos), tem chamado muita atenção por sua singular habilidade de modular uma enorme e complexa rede regulatória da expressão dos genes. Desde a sua descoberta, estas moléculas têm fundamentalmente

transformado a nossa compreensão de como os genes são regulados e como interagem entre si, representando hoje, uma das áreas mais estimulantes da ciência médica moderna.

### 1.2.1. Biogênese

Os miRNAs podem estar localizados em diversas regiões do genoma. Aproximadamente 70% dos miRNAs estão em regiões intrônicas ou exônicas e 30% em regiões intergênicas [16]. Baseados na localização genômica podemos classificar os miRNAs em três grupos: 1) miRNAs exônicos: presentes em éxons de unidades transcricionais não-codificadores de proteínas conhecidas como miRNA (*mRNA-like noncoding RNA*). Estes RNAs compartilham as mesmas propriedades do mRNA tais como *splicing*, poliadenilação, *capping* e expressão temporal, mas não codificam proteínas [17]; 2) miRNAs intrônicos de transcritos não-codificadores de proteínas; e 3) miRNAs intrônicos de transcritos codificadores de proteínas. Além destes três grupos, alguns miRNAs apresentam uma variação entre íntrons e éxons dependendo do padrão de *splicing* alternativo, sendo assim chamados de "categoria mista" [18,19].

O processo de síntese e maturação dos miRNAs envolve uma complexa via metabólica que se inicia no núcleo e se estende até o citoplasma celular. O primeiro passo para a maturação do miRNA é dado pela enzima RNA polimerase II. Esta enzima transcreve uma longa fita de miRNA primário (pri-miRNA) a partir de um determinado gene [20]. O pri-miRNA resultante é bem longo, possuindo centenas ou milhares de

nucleotídeos, podendo conter de uma a seis regiões precursoras (pré-miRNAs) que irão formar miRNAs distintos [21]. Cada pré-miRNA é composto por cerca de 70 nucleotídeos e é caracterizado por formar uma estrutura de alça dupla-fita. Estas estruturas são flanqueadas por sequências nucleotídicas específicas que têm a função de informar ao complexo enzimático *Drosha* (*Pasha* em invertebrados) onde começa e termina cada pré-miRNA [22,23]. *Drosha* irá reconhecer esta região e clivar o pri-miRNA liberando os pré-miRNAs no núcleo celular. Porém, para que estas moléculas transformem-se em miRNAs, elas devem ser exportadas para o citoplasma através da proteína transportadora Exportina-5 [24,25].

Uma vez no citoplasma, o pré-miRNA é submetido a um segundo processamento realizado pela enzima *Dicer* [26,27]. Como resultado, forma-se um RNA de dupla fita composto por aproximadamente 22 nucleotídeos. As duas fitas são então separadas, porém, apenas uma delas irá potencialmente atuar como um miRNA funcional, enquanto a outra geralmente é degradada [28]. Este processo de seleção é primariamente determinado pela estabilidade termodinâmica das fitas e pela forma com que se ligam na porção final da duplex [29,30].

### **1.2.2. Mecanismo de ação**

A fita de miRNA, agora madura, é incorporada a um conjunto enzimático denominado RISC (*RNA-induced silencing complex*). O complexo miRNA-RISC exerce seu efeito regulatório através da ligação de 6-8 de seus nucleotídeos localizados na terminação 5' (denominada região “*seed*”) a

região 3' não-traduzida (3'UTR) do RNA mensageiro (mRNA)-alvo. Em mamíferos, o resultado desta ligação acarreta em um silenciamento gênico propiciado, geralmente, pelo encurtamento da calda poli(a) – o que leva a uma desestabilização do mRNA-alvo – ou reprimindo a formação do complexo de tradução, reduzindo a eficiência dos ribossomos em traduzir a informação genética contida no mRNA-alvo. Desta forma, os miRNAs agem diminuindo a síntese proteica do gene-alvo sem impactar nos níveis correspondentes de mRNA [31].

Entretanto, a interação miRNA-RNA não precisa necessariamente ser perfeita, ou seja, todos os nucleotídeos do miRNA ligados ao RNA. De fato, normalmente esta ligação é imperfeita em mamíferos. Esta não obrigatoriedade de interação completa somado ao fato de os miRNAs possuírem sequências pequenas, permitem que um único miRNA possa regular centenas de genes-alvo distintos, assim como vários miRNAs diferentes podem cooperar no controle de um único gene [32].

### **1.2.3. Nomenclatura**

De acordo com a nomenclatura padrão, o prefixo "miR" (abreviação de microRNA) é seguido por um hífen e um número atribuído a ordem em que o miRNA foi descoberto [33, 34]. Assim, o miR-208 foi descoberto antes do miR-456. O prefixo "mir" com a letra "r" minúscula refere-se ao pré-miRNA, enquanto o maiúsculo "R" se refere à sua forma madura. Opcionalmente, pode ser inserida a espécie de origem, designado por um prefixo de três letras, onde a primeira refere-se ao gênero e as outras duas à

espécie. Por exemplo, hsa-miR-208 para *Homo sapiens* e mmu-miR-208 para *Mus musculus* (camundongo).

Alguns miRNAs apresentam sequências muito semelhantes, variando em apenas um ou dois nucleotídeos. Nestes casos, os miRNAs são nomeados com o mesmo número, porém, com uma letra minúscula adicional. Por exemplo, miR-208a possui uma sequência muito semelhante a miR-208b, pertencendo-os a mesma família. Também é importante lembrar que um mesmo miRNA maduro pode ser sintetizado por pré-miRNAs oriundos de regiões distintas do genoma. Neste caso, adiciona-se um sufixo numérico. Por exemplo, os pré-miRNAs mir-194-1 e mir-194-2 formam o mesmo miRNA maduro (miR-194), mas estão localizados em diferentes regiões do genoma.

#### **1.2.4. O microRNA cardio-específico miR-208a**

miR-208 compreende em uma família de miRNAs altamente conservada constituída por dois membros: miR-208a e miR-208b nos quais possuem uma sequência nucleotídica muito similar [14]. Até aproximadamente 2009, somente um membro da família (miR-208) tinha sido descrito. Porém, em 2009 um novo membro foi descoberto, fazendo com que o miR-208 fosse então renomeado para miR-208a e o novo membro como miR-208b. Mais tarde, outro miRNA conhecido como miR-499 foi incluído como um terceiro membro desta família devido a sua alta taxa de homologia de sequência e padrão de expressão tecidual.

Até onde se sabe, miR-208a é expresso exclusivamente no coração pelo íntron 29 do gene *Myh6*, enquanto miR-208b é codificado pelo íntron 31 do gene *Myh7* e expresso tanto em músculos cardíacos quanto esqueléticos [35, 36]. Quanto ao terceiro membro da família, miR-499 é codificado pelo íntron 19 de um gene estritamente relacionado: *Myh7b*. Assim como miR-208b, miR-499 é expresso no músculo esquelético e em corações durante o estágio embrionário. Em parte, estes três miRNAs (miR-208a/b e miR-499) controlam o conteúdo muscular de miosina, identidade das miofibrilas e performance muscular [36].

A eficiência da contratilidade do miocárdio é amplamente dependente da proteína contrátil Miosina de Cadeia Pesada (*Myosin Heavy Chain* - MHC). A MHC é a maior proteína contrátil do músculo cardíaco e é representada por duas isoformas:  $\alpha$ -MHC (miosina rápida) e  $\beta$ -MHC (miosina lenta) nos quais são codificadas respectivamente pelos genes *Myh6* e *Myh7*. Estes genes (*Myh6* e *Myh7*) são diferentemente expressos no coração adulto em paralelo a expressão de miR-208a e miR-208b respectivamente [35, 36].

A proporção de isoformas de MHC pode variar de acordo com a espécie e estágio de desenvolvimento. Em roedores, miR-208b parece ser altamente expresso em corações fetais, reduzindo seus níveis de expressão até se tornarem adultos. Em contraste, miR-208a apresenta níveis de expressão mais baixos durante o desenvolvimento do coração, tornando-se predominante na fase adulta. A inversão da expressão fetal de miR-208b para a miR-208a ocorre logo após o nascimento, indicando que se miR-208a

e miR-208b atuam sobre os mesmos mRNAs, eles agem em diferentes estágios do desenvolvimento [35]. Aparentemente, miR-208b a miR-499 são funcionalmente redundantes e desempenham um papel dominante na especificação da identidade da fibra muscular ativando os genes relacionados a miofibrila de contração lenta e reprimindo as de contração rápida [36].

A deleção de miR-208a resulta na redução da expressão de  $\beta$ -MHC em corações adultos, gerando evidencias de que miR-208a está envolvido na regulação da expressão de *Myh7* e *Myh7b* e seus miRNAs intrônicos miR-208b e miR-499 [35, 36].

#### **1.2.5. Implicações do miR-208a na insuficiência cardíaca**

A contratilidade cardíaca depende da expressão de duas isoformas da MHC:  $\alpha$ - e  $\beta$ -MHC e mudanças nas suas proporções podem levar a situações adversas como hipertrofia, fibrose e sérios efeitos sobre a função contrátil do coração. Esta mudança das proporções de  $\alpha$ - e  $\beta$ -MHC pode ser desencadeada por variações dos níveis de expressão de miR-208a, uma vez que miR-208a está envolvido na regulação de seus genes codificantes.

O aumento da expressão de miR-208a no coração resulta em um aumento também de  $\beta$ -MHC, sendo associado à arritmia, fibrose e crescimento hipertrófico em camundongos [35] e desfechos clínicos ruins na cardiomiopatia dilatada humana [37]. De fato, a expressão aumentada de  $\beta$ -MHC no miocárdio, uma característica comum da hipertrofia cardíaca e IC,

pode diminuir o *power output* e contribuir para a redução da função sistólica no estágio final da IC [38]. Assim, o aumento da expressão de miR-208a no coração tem sido proposto como um forte preditor de insuficiência cardíaca [37].

Por outro lado, camundongos que não expressam miR-208a falharam na regulação positiva de  $\beta$ -MHC não desenvolvendo hipertrofia ou fibrose dos cardiomiócitos [39].

#### **1.2.6. miR-208a como potencial biomarcador de lesão miocárdica**

Tendo em vista que os miRNAs modulam a expressão dos genes, não é difícil imaginar que em um estado patológico o padrão de expressão dos miRNAs envolvidos em vias metabólicas relacionadas estejam alterados. Baseados nestas nuances podemos associar o nível de expressão dos miRNAs a um diagnóstico, uma etiologia, e/ou ter uma indicação de como a doença irá progredir.

Embora estejam presentes em todos os tipos celulares, a maioria dos miRNAs são mais expressos em certos tecidos do que em outros, sendo assim chamados de miRNAs tecido-específicos. Para isso, sua expressão deve ser cerca de 20 vezes maior em um determinado tecido em relação aos outros [40]. Por esse motivo, a maioria dos estudos clínicos têm se baseado na mensuração dos níveis de expressão de miRNAs em amostras do tecido de origem. Entretanto, a necessidade de procedimentos muito invasivos como biópsias tem limitado significativamente este tipo de pesquisa.



Por outro lado, numerosos estudos tem demonstrado que alguns miRNAs, incluindo miR-208a, não são somente encontrados intracelularmente, mas também detectáveis fora das células, em vários fluidos corporais como sangue, saliva, urina e etc [41]. Estes miRNAs foram então nomeados como miRNAs circulantes ou simplesmente “c-miRNAs”. Interessantemente, ~90% dos miRNAs extracelulares estão associados a proteínas Ago2, HDL, entre outras e ~10% estão envolvidas em pequenas unidades membranosas como exossomos, microvesículas, e corpos apoptóticos [41]. Evidências recentes revelam que uma porção dos c-miRNAs é secretado como microvesículas tanto de células normais saudáveis quanto células danificadas [42]. Contudo, se o miR-208a é liberado na corrente sanguínea na forma de microvesículas por cardiomiócitos danificados, o seu preciso mecanismo de liberação permanece desconhecido. O fato de miR-208a ser cardio-específico e poder ser detectado em sangue periférico o torna potencialmente útil para testes fáceis e rápidos, auxiliando o diagnóstico e/ou guiando a terapia.

O primeiro estudo em camundongos mostrou que a concentração plasmática de miR-208a está aumentada na presença de cardiotoxicidade induzida por isoproterenol (isoprenalina) apresentando uma boa correlação com a cTnI plasmática [43]. No ano seguinte, foi mostrado que os níveis de miR-1, miR-133 [44, 45], miR-208a [44], miR-208b [45-47] e miR-499 [44-47] estavam altamente elevados no plasma sanguíneo e significativamente reduzido no miocárdio infartado [48]. Dentre estes, o miR-208a apresentou resultados mais promissores, com 90.9% de sensibilidade e 100% de

especificidade, enquanto miR-499, miR-1, e miR-133a foram menos sensíveis (36.4, 33.3, e 15.2%, respectivamente) [44].

Já em 2010, Wang e colaboradores [44], mostraram que miR-208a foi mais sensível que a cTnI podendo ser detectado em todos os pacientes com infarto do miocárdio, enquanto, em paralelo, cTnI foi detectado em 85% destes pacientes. Outro dado importante é que o nível de cTnI no sangue começa a se elevar após quatro a oito horas da lesão miocárdica [49] enquanto uma aparente elevação dos miRNAs é observada dentro de apenas uma hora [44]. Além disso, cTnI é excretada pelos rins e ocasionalmente seus níveis aumentam no sangue de pacientes com doença renal, mesmo na ausência de doenças cardíacas [50], limitando assim a sua aplicação. Juntos estes dados sugerem que o miR-208a pode ser superior a cTnI como biomarcador de injúria miocárdica.

## **2. JUSTIFICATIVA**

O desenvolvimento de biomarcadores validados clinicamente capazes de detectar precocemente a cardiotoxicidade induzida pela antraciclina é de grande interesse para cardiologistas e oncologistas. Esta ferramenta pode ser útil na predição do risco de desenvolvimento de cardiotoxicidade e permitir o monitoramento da progressão do dano cardíaco além de guiar o planejamento de estratégias terapêuticas para proteger a função cardíaca.

### **3. HIPÓTESE**

Teoriza-se que a terapia com antraciclina promova a lesão ou aumento da permeabilidade da membrana celular dos miócitos permitindo a liberação precoce de miR-208a na corrente sanguínea. Desta forma, espera-se que os níveis plasmáticos de miR-208a elevem-se precocemente e mantenham-se elevados por mais tempo quando comparado aos níveis séricos da troponina cardíaca (cTnI).

## **4. OBJETIVOS**

#### **4.1. Objetivo geral**

Avaliar o efeito do tratamento quimioterápico com doxorubicina sobre os níveis circulantes de miR-208a em pacientes com câncer de mama.

#### **4.2. Objetivos específicos**

- a. Correlacionar os níveis circulantes de miR-208a com a troponina cardíaca sérica em pacientes submetidos a tratamento quimioterápico com doxorubicina.
  
- b. Correlacionar os níveis circulantes de miR-208a com a função cardíaca, determinada pela fração de ejeção do ventrículo esquerdo, em pacientes submetidos a tratamento quimioterápico com doxorubicina.



## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

Este estudo está vinculado ao projeto de pesquisa “*Estudo duplo-cego randomizado e controlado sobre o efeito do betabloqueador na prevenção da cardiomiopatia secundária a quimioterápicos*” (ClinicalTrials.gov NCT01724450), aprovado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 2010/18078-8 e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) protocolo número 0834/10. Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Este ensaio clínico ainda está encontra-se em andamento, sendo a randomização dos pacientes cedida pelo comitê de segurança preservando assim o cegamento do estudo. Somente as variáveis aqui reportadas foram analisadas.

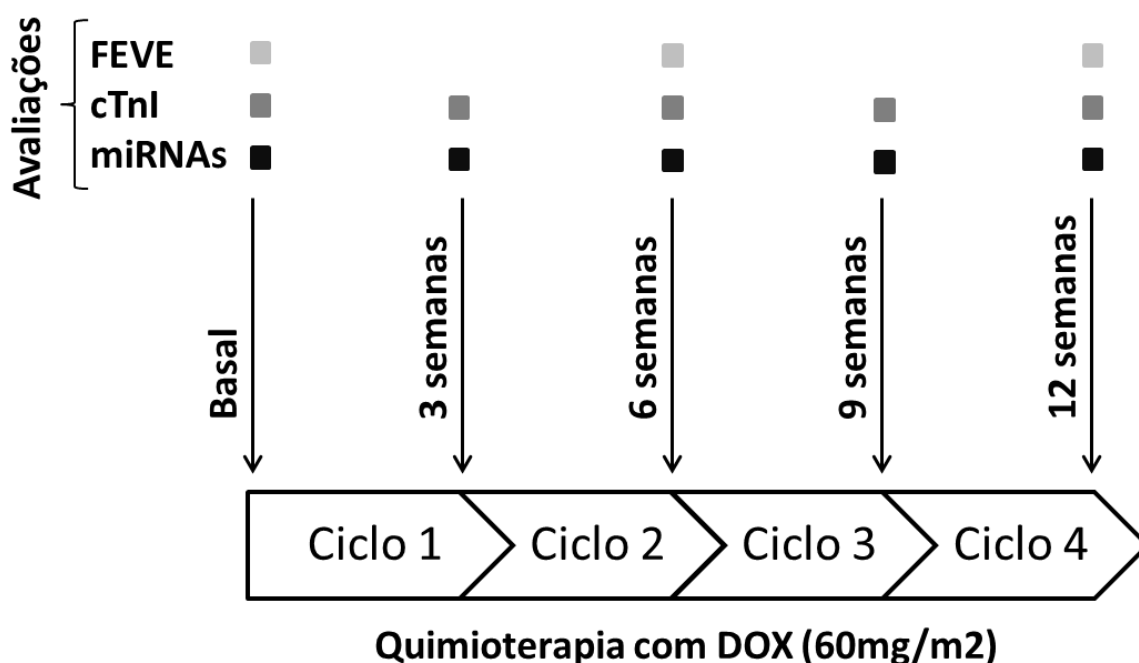
### **5.1. Desenho do estudo**

Neste estudo foram incluídos, prospectivamente, apenas os pacientes do grupo placebo provenientes do ensaio clínico acima citado, mantendo assim a dinâmica do tratamento quimioterápico.

Resumidamente, todos os pacientes incluídos foram submetidos a tratamento quimioterápico com quatro ciclos de 60mg/m<sup>2</sup> de doxorubicina (DOX) e ciclofosfamida 600 mg/m<sup>2</sup> em 30 minutos a cada 21 dias, seguido de paclitaxel 80mg/m<sup>2</sup> em 2 horas semanalmente por 12 semanas ou docetaxel 75mg/m<sup>2</sup> em 1 hora a cada 21 dias por 4 ciclos.

Os níveis circulantes de miR-208a e troponina cardíaca I (cTnI) foram mensurados antes do início do tratamento (basal) e 3 semanas após cada

ciclo de DOX sendo os dados ecocardiográficos colhidos também no basal e ao final dos ciclos 2 e 4 (Figura 1). Após o término da quimioterapia com DOX, a fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) foi avaliada com 24, 48 e 96 semanas após o início do tratamento.



**Figura 1** – Fluxograma do estudo.

#### 5.1.1. Critérios de inclusão

- Pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma invasivo de mama, com indicação de terapia adjuvante com tratamento esquema AC→T (doxorubicina / ciclofosfamida e taxano);
- Idade acima de 18 anos.

### 5.1.2. Critérios de exclusão

- Impossibilidade de análise da função ventricular;
- História de quimioterapia ou radioterapia;
- Sintomas prévios de Insuficiência Cardíaca;
- Presença de Cardiomiopatia;
- Presença de Doença Arterial Coronariana;
- Valvopatia aórtica ou mitral moderada a importante;
- Contra-indicação ao uso de  $\beta$ -bloqueador;
- Não estar fazendo uso de inibidor da enzima de conversão da angiotensina, bloqueador do receptor da angiotensina ou  $\beta$ -bloqueador
- Pacientes com expressão de HER 2

### 5.2. Coleta de sangue periférico e preparação do plasma

O sangue periférico foi coletado em tubos de 4ml contendo 7,2mg de K2 EDTA (BD Vacutainer, EUA), sendo em seguida submetidos à centrifugação sob força de 2000g a 4°C durante 10 minutos. O sobrenadante (plasma) foi transferido, em proporções iguais, para dois microtubos RNase/DNase-free de 1,5ml (prova e contraprova) e armazenado em freezer -70°C até o momento da extração de RNA.

### 5.3. Extração de RNA total

Após retiradas do freezer  $-70^{\circ}\text{C}$ , as amostras foram equilibradas a temperatura ambiente e submetidas a extração de RNA extracelular por meio do kit miRNeasy Serum/Plasma (Qiagen, Alemanha) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Resumidamente, 1ml da solução QIAzol foi adicionado à 0.2ml de plasma sanguíneo, sendo em seguida homogeneizado vigorosamente em vortex por 15 segundos e incubado por 05 minutos a temperatura ambiente para promover a dissociação dos complexos nucleoprotéicos. Após incubação, 3 $\mu\text{l}$  do miRNA-39 sintético de *Caenorhabditis elegans* (cel-miR-39; Qiagen, Alemanha) na concentração de  $1,6 \times 10^8/\mu\text{l}$  foram adicionados como controle “*spike-in*” para normalização dos dados. Em seguida, foram adicionados 200 $\mu\text{l}$  de clorofórmio (Merk, Alemanha) e homogeneizado vigorosamente por 30 segundos seguidos por 5 minutos de incubação à temperatura ambiente. As amostras foram então submetidas à centrifugação sob força de 14.000g a  $4^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos para a separação das fases aquosa (acima) e orgânica (abaixo). A fase aquosa foi então transferida para outro microtubo de 1,5ml onde foi adicionado 1,5 volumes de etanol 100% (Merk, Alemanha) para a precipitação do RNA total. A purificação do RNA total extraído foi realizada por meio das colunas miRNeasy (Qiagen, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA final foi eluído das colunas em 14 $\mu\text{l}$  de água RNase-free (Qiagen, Alemanha).

As extrações de RNA foram realizadas apenas em um dos dois microtubos de amostra (tubo prova) de cada paciente, mantendo assim, uma

porção de material não manipulado que poderá ser utilizado posteriormente como contraprova.

#### **5.4. Determinação da concentração de RNA total**

Usualmente, a determinação da concentração e qualidade do RNA de uma amostra é mensurada por meio de espectrofotometria ultravioleta (UV). Entretanto, este tipo de método não é adequado para estudos de expressão de miRNAs em biofluidos por uma série de fatores. Entre eles, está a dramática combinação de um baixo conteúdo de RNA (e alta concentração de proteínas) no soro somado com o baixo volume de amostra utilizado para a extração. Somados, estes fatos tornam a quantificação de RNA por espectrofotometria UV extremamente difícil. Nestes casos, é amplamente recomendado o uso de um volume inicial de RNA fixo para todas as amostras ao invés de uma quantidade (ng) como molde para a reação de transcrição reversa. Desta forma, um método alternativo para monitoração das amostras deve ser empregado. Tratando-se de soro ou plasma, o uso de miRNAs sintéticos (*spike in*) é um dos métodos mais aceitos para monitorar a eficiência da extração de RNA, síntese de cDNA (pela técnica de transcrição reversa) e amplificação por PCR [51]. Assim, foi empregado neste estudo o uso de uma quantidade conhecida do miRNA sintético *Cel-miR-39* (qiagen).

### 5.5. Reação de transcrição reversa

Para a realização da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é necessário que os RNAs extraídos das amostras sejam convertidos em DNA complementar (cDNA) por meio da reação de transcrição reversa. Para este propósito foi utilizando o kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific, EUA) combinado com um oligonucleotídeo específico para o miR-208a (provido pelo kit TaqMan® MicroRNA Assays - Thermo Fisher Scientific, EUA) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. O oligonucleotídeo utilizado é *stem-loop* específico, o que reduz a hibridização com os pri- e pré-miRNAs, aumentando assim a especificidade do ensaio.

Cada reação de transcrição reversa consistiu de 13µL de *master mix* e 2µL de amostra de RNA, totalizando 15µL. Para a preparação do *master mix* foi utilizado 0,15µL de dNTP (100mM), 1µL da enzima Multiscribe RT (50U/µL), 1,5µL de RT Buffer (10x), 0,19µL de Inibidor de RNase (20U/µL), 3µL do inicializador específico (5x) e 7,16µL de água livre de nucleases. Uma vez preparado, o *master mix* foi depositado em placas de 96 poços de 0,1ml (MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate - Thermo Fisher Scientific, EUA) onde foram adicionados aproximadamente 2µL de RNA em cada poço. Após a adição das amostras de RNA, as placas foram seladas com adesivo óptico (Thermo Fisher Scientific, EUA) e submetidas a uma breve centrifugação a 300g a 4°C por 1min. As reações foram então otimizadas no termociclador PTC-200 (MJ Research, EUA) utilizando o seguinte programa: 16°C por 30min, 42°C por 30min e 85°C por 5min, seguido de 4°C

até o momento do desligamento do aparelho. Após o término do programa os cDNAs foram armazenados em freezer -20°C até o momento da quantificação por PCR em tempo real.

Para cada amostra de RNA foram realizadas duas reações de transcrição reversa: uma contendo o oligonucleotídeo específico para o miR-208a e outra para o cel-miR-39 (controle - *spike in*).

### **5.6. Quantificação relativa dos níveis plasmáticos de microRNAs**

A quantificação relativa dos níveis de expressão de miR-208a, bem como do controle *spike-in*, foi mensurada por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) utilizando o kit TaqMan® MicroRNA Assays (Thermo Fisher Scientific, EUA) com sondas específicas para *hsa-miR-208a* (providas pelo kit; assay n° 000511) e *cel-miR-39* (assay n° 000200).

Para a montagem das reações de qPCR, foi padronizado a utilização de meia reação padrão descrita pelo protocolo do fabricante. Desta forma, cada reação consistiu de 5µL de TaqMan Universal Master Mix II (Thermo Fisher Scientific, EUA), 0,5µL da sonda específica (20x), 1,33µL de amostra de cDNA e 3,17µL de água livre de nucleases, totalizando 10µL. As reações foram plotadas em placas de 384 poços (MicroAmp® Optical 384-Well Reaction Plate with Barcodes - Thermo Fisher Scientific, EUA) e otimizadas na plataforma QuantStudio 12K Flex (Thermo Fisher Scientific, EUA). A qPCR foi conduzida utilizando as condições padrões de amplificação



descritas pelo fabricante, consistindo dos seguintes parâmetros: 95°C por 10min seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1min.

Para maior confiabilidade dos dados, todas as reações foram realizadas em triplicata, incluindo o controle *spike-in*. Os dados foram analisados no software QuantStudio™ 12K Flex v1.2.2 (Thermo Fisher Scientific, EUA) e no Excel 2010 (Microsoft, EUA) por meio do cálculo comparativo de  $C_t$  ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ). Desta forma, os resultados são expressos em *Fold Change* (FC), no qual representa quantas vezes um dado miRNA está mais expresso em uma amostra em relação a outra. Para isso, os dados foram analisados com base na seguinte equação [52]:

$$Fold\ Change = 2^{-[(Ct\ miR - \bar{x}\ Ct\ controle)Amostra\ A - (Ct\ miR - \bar{x}\ Ct\ controle)Amostra\ B]}$$

Nos casos de  $FC < 1$ , a seguinte fórmula é também aplicada:

$$Fold\ Change = - \frac{1}{(FC < 1)}$$

### 5.7. Estratégia de normalização dos dados

O propósito da normalização dos dados é a remoção da variação técnica dos dados que não são relacionadas às variações biológicas sob investigação. Diversos genes endógenos são aceitos como referência (*housekeeping genes*) para a normalização dos dados em miRNAs

celulares. No entanto, até o momento não existe genes de referência bem estabelecidos para a normalização de miRNAs circulantes, tornando assim este processo desafiador e controverso. Tipicamente, amostras de fluidos biológicos, como soro e plasma, não possuem a maior espécie de pequenos RNAs (*small RNAs*), como o 5S, U6 e os snoRNAs, os quais são frequentemente usados para a normalização dos dados de expressão de miRNAs em outros tipos de amostras. Desta forma, tem sido adotado o uso de miRNAs exógenos sintéticos, como *cel-miR-39*, *cel-miR-54* e *cel-miR-238* (correspondentes a espécie *Caenorhabditis elegans*), os quais não possuem sequência homóloga em humanos [53]. Estes miRNAs sintéticos são inseridos na amostra durante a extração de RNA representando um método chamado *Spike-in*. Assim, os dados de expressão dos miRNAs foram normalizados utilizando a seguinte fórmula:

$$C_t \text{ normalizado} = \bar{x} C_t \text{ miR} - (\bar{x} C_t \text{ controle} - \tilde{x} C_t \text{ controles})$$

### **5.8. Medidas para minimização e controle de contaminação**

Para a realização do estudo, processos que objetivam a minimização dos riscos de contaminação foram aplicados: utilização de reagentes de lote controlado e em alíquotas para evitar diversos ciclos de congelação e descongelação; todos os materiais utilizados foram de natureza *RNase/DNase-free* e manipulados em cabines de fluxo laminar livres de *amplicons* previamente tratadas com *RNase Away* (Invitrogen, EUA).

### **5.9. Mensuração dos níveis séricos de troponina cardíaca I**

O sangue periférico foi coletado em tubos secos, a vácuo, de 5ml contendo gel (BD Vacutainer, EUA). A análise das amostras foi realizada no laboratório clínico do Instituto do Coração (InCor) por meio da técnica de quimioluminescência automatizada e otimizada na plataforma Advia Centaur (Siemens Healthcare, Alemanha) de acordo com protocolo previamente padronizado. O valor de referência para a cTnI é de até 0,04ng/mL.

### **5.10. Ecocardiograma bidimensional com doppler**

O estudo ecocardiográfico bidimensional e análise de fluxos cardíacos foram realizados pela técnica de dopplerecocardiografia por médicos especializados. As imagens foram adquiridas em projeções paraesternal longitudinal de câmaras esquerdas, transversal e apical 2, 3 e 4 câmaras de acordo com padronização da Sociedade Americana de Ecocardiografia.

### **5.11. Análise estatística**

Todos os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão, caso não especificado contrariamente. Os dados foram analisados por meio do pacote estatístico SPSS v21 para *MS Windows* sendo assim utilizado os testes não-paramétricos de Mann-Whitney ou Wilcoxon quando aplicável. Regressões lineares foram realizadas para determinar a associação entre os níveis circulantes de miRNAs e mudanças na FEVE ( $\Delta$ FEVE/FEVE<sub>basal</sub>) ou

cTnI. Curvas de Características de Operação do Receptor (Curvas ROC- *Receiver Operating Characteristic*) foram geradas para determinar a habilidade dos miRNAs e cTnI em discriminar pacientes que desenvolveram cardiotoxicidade daqueles que não desenvolveram. Todos os testes foram realizados de forma bicaudal e o nível de significância de  $p < 0.05$  foi considerado para indicar significância estatística.

Para verificar se os miRNAs estudados foram diferencialmente expressos em pacientes com lesão miocárdica diagnosticada por troponina, foram agrupados como “cTnI alta” aqueles pacientes que apresentaram valores de troponina maiores que dois desvios padrões acima da média e comparado com os demais “cTnI baixa”. Cardiotoxicidade foi definida como uma redução na FEVE  $\geq 10\%$  e/ou valores de FEVE  $< 50\%$  em qualquer eco cardiograma realizado durante ou após a quimioterapia [54].

A análise dos níveis de expressão relativa dos miRNAs foi realizada com o auxílio dos programas *MS Excel* e *REST* onde foi aplicado o cálculo comparativo de Ct ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ), sendo assim representados por *Fold Change* (FC). Para uma visualização mais simétrica entre níveis de aumento ( $FC > 1$ ) e diminuição ( $0 < FC < 1$ ) de expressão, os valores de FC foram convertidos em escala logarítmica antes de serem plotados nos gráficos. Valores médios de  $C_t \geq 38$  foram considerados como não detectáveis.

## **6. RESULTADOS**

### 6.1. Casuística

Neste estudo foram incluídos, prospectivamente, um total de 56 pacientes ( $49.9 \pm 3.3$  idade) provenientes do ensaio clínico “*Estudo duplo-cego randomizado e controlado sobre o efeito do betabloqueador na prevenção da cardiomiopatia secundária a quimioterápicos*”. Apenas os pacientes do grupo placebo foram incluídos neste estudo, mantendo assim a dinâmica do tratamento quimioterápico. Os pacientes foram incluídos entre Abril de 2013 e Outubro de 2015 e receberam uma dose acumulada de  $410.3 \pm 9.5$ mg de DOX em 4 ciclos for 3 meses. As características clínicas da população estão sumarizadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Características clínicas da população estudada.

	População (n=56)	Cardiotoxicidade (n=10)	Não- cardiotoxicidade (n=46)
Idade, a	49.9±3.3	48.6±3.2	49.9±1.2
Hipertensão	5 (8.5)	1 (10)	5 (10.9)
Diabetes mellitus	1 (1.7)	0 (0)	1 (2.2)
Fumantes	17 (28.8)	5 (50)	13 (28.3)
IMC, kg/m <sup>2</sup>	28.5±3.3	19.5±6.5	29.4±1.1
Doxorubicina dose total, mg	410.3±9.5	408.4±1.4	410.6±11.4
Menopausa			
Pré	29 (49.2)	5 (50)	22 (47.8)
Pós	30 (50.8)	5 (50)	24 (52.2)
Mama afetada			
Direita	28 (47.5)	4 (40)	21 (45.7)
Esquerda	30 (50.8)	6 (60)	24 (52.2)
Bilateral	1 (1.7)	0 (0)	1 (2.2)
FEVE basal, %	65.3±0.5	67.2±1.0	64.9±0.5

Valores expressos em média±EPM ou n (%); FEVE – fração de ejeção do ventrículo esquerdo; IMC – Índice de massa corpórea

### 6.1. Mensuração dos níveis plasmáticos de miR-208a

Quanto analisado pela qPCR, os níveis plasmáticos de miR-208a não puderam ser determinados devido a baixa intensidade de sinal em todas as amostras. Por outro lado, uma amostra de tecido cardíaco, utilizado como

controle positivo, apresentou um  $C_t$  médio de  $25.2 \pm 0.2$ , indicando a viabilidade dos *primers* e a não ocorrência de falhas técnica durante as reações.

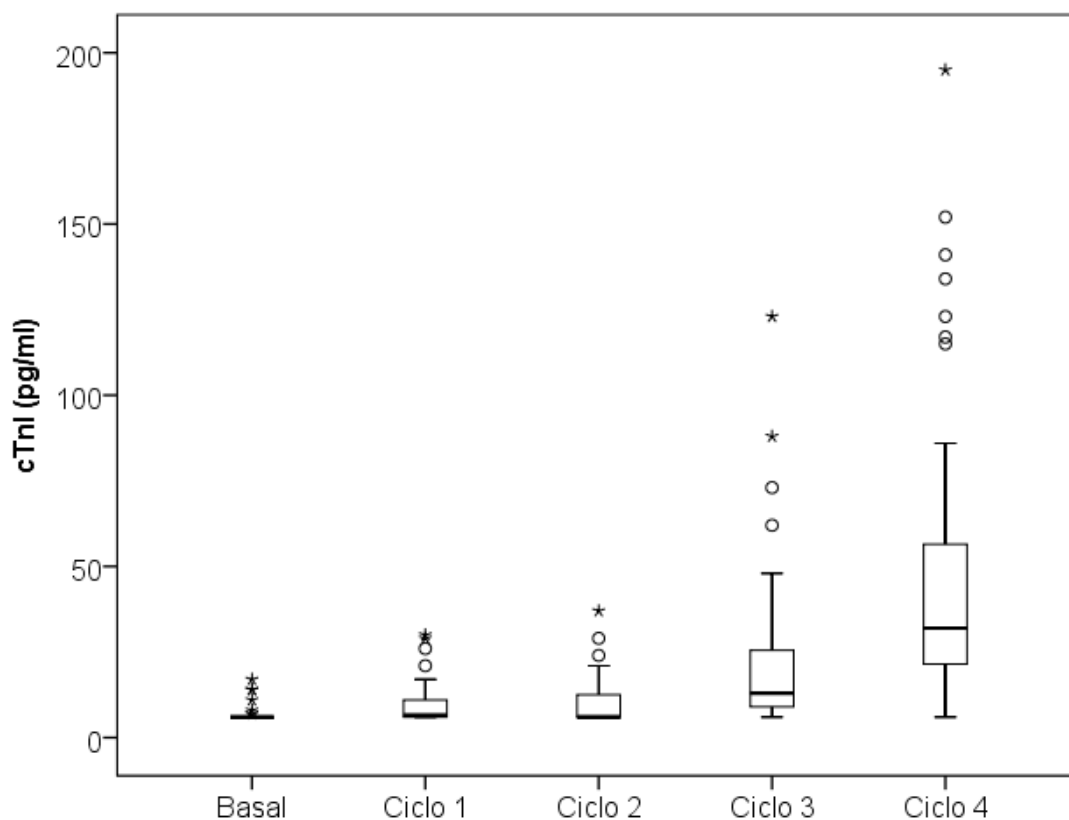
Para afastar a possibilidade de baixa integridade dos miRNAs nas amostras, um novo ciclo de extração-transcrição reversa-qPCR foi realizado. Desta vez, o miR-1 foi também quantificado como controle de amplificação e todas as reações de transcrição reversa foram realizadas utilizando dois volumes diferentes de RNA como molde: 2 e 5 $\mu$ . Entretanto, os níveis de miR-208a continuaram indetectáveis, mesmo quando utilizado 5 $\mu$ l de RNA. O miR-1, usado como controle, apresentou amplificação satisfatória em todas as amostras. Em conjunto, estes dados sugerem que o miR-208a não estão sendo liberado na corrente sanguínea em resposta ao tratamento com doxorubicina.

Em decorrência dos resultados negativos encontrados para miR-208a, novos miRNAs foram selecionados para serem avaliados: miR-1, -133b, -146a, -208b e -423-5p. Estes miRNAs foram selecionados por terem sido previamente indicados como potenciais biomarcadores de lesões do miocárdio e/ou cardiomiopatia e insuficiência cardíaca [1].



## 6.2. Mensuração dos níveis séricos de troponina cardíaca e fração de ejeção do ventrículo esquerdo

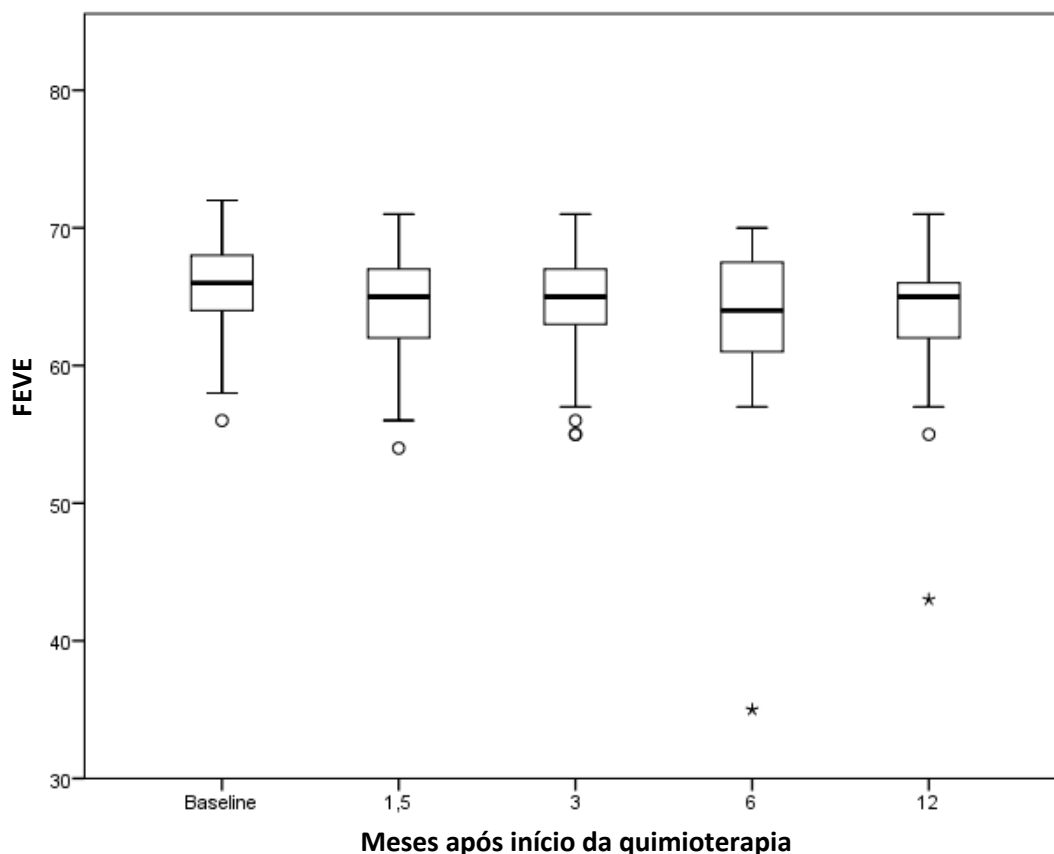
As concentrações plasmáticas da troponina cardíaca I (cTnI) elevaram-se após cada ciclo de DOX, apresentando média basal de  $6.6 \pm 0.3$  pg/ml e atingindo o seu valor máximo no último ciclo de DOX ( $46.0 \pm 5.5$  pg/ml; Figura 2).



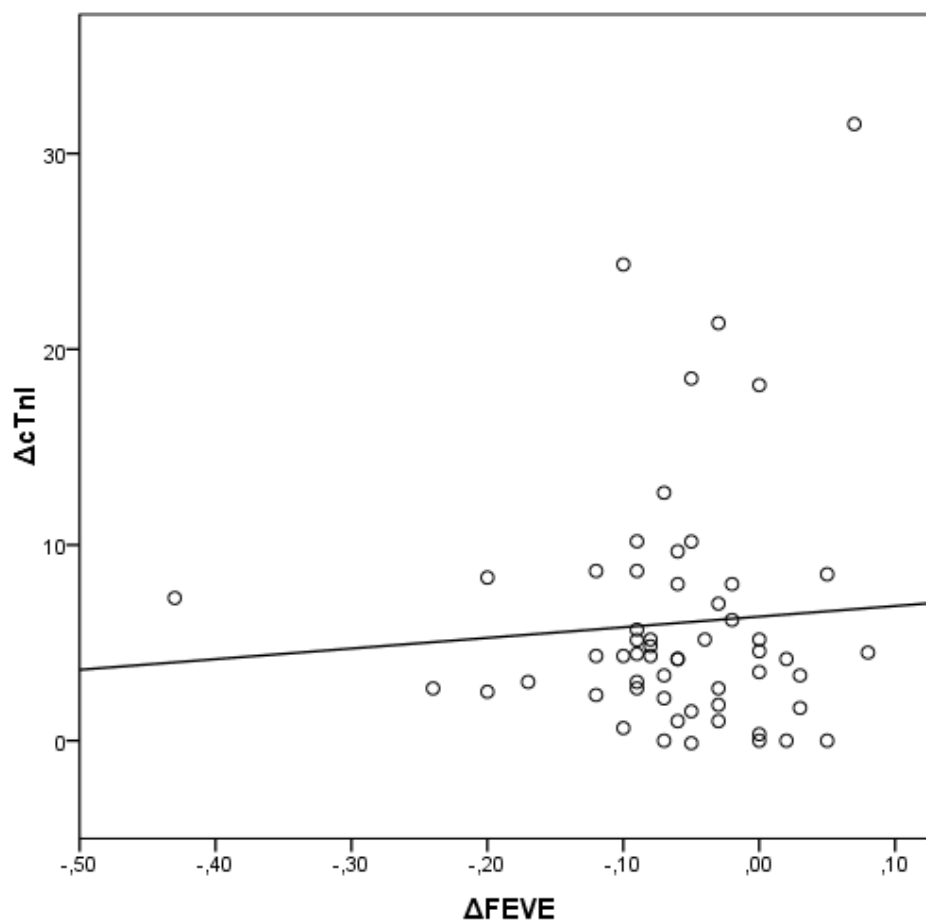
**Figura 2** – Concentrações de troponina cardíaca I (cTnI) no sangue ao longo da quimioterapia com antraciclina em pacientes com câncer de mama.

Por outro lado, a média de FEVE reduziu em 2% em 12 meses quando analisado como um todo. Entretanto, esta redução não alcançou

significância estatística, decrescendo de  $65.3 \pm 0.5$  no basal para  $64.3 \pm 0.6$  no ciclo 4 ( $p=0.549$ ) e  $63.8 \pm 0.9$  ( $p=0.053$ ) após 12 meses do início da quimioterapia (Figure 3). Dentre eles, 10 (17.9%) pacientes atingiram o critério para cardiotoxicidade apresentando uma redução em FEVE  $\geq 10\%$  e/ou FEVE  $< 50\%$  com  $7.2 \pm 1.3$  meses do início da quimioterapia. Em adição, nenhuma correlação foi observada entre os níveis plasmáticos de cTnl e a FEVE (Figure 4).



**Figura 3** – Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo (FEVE) ao longo da quimioterapia com doxorrubicina em pacientes com câncer de mama. Não houve diferença estatística entre os tempos.

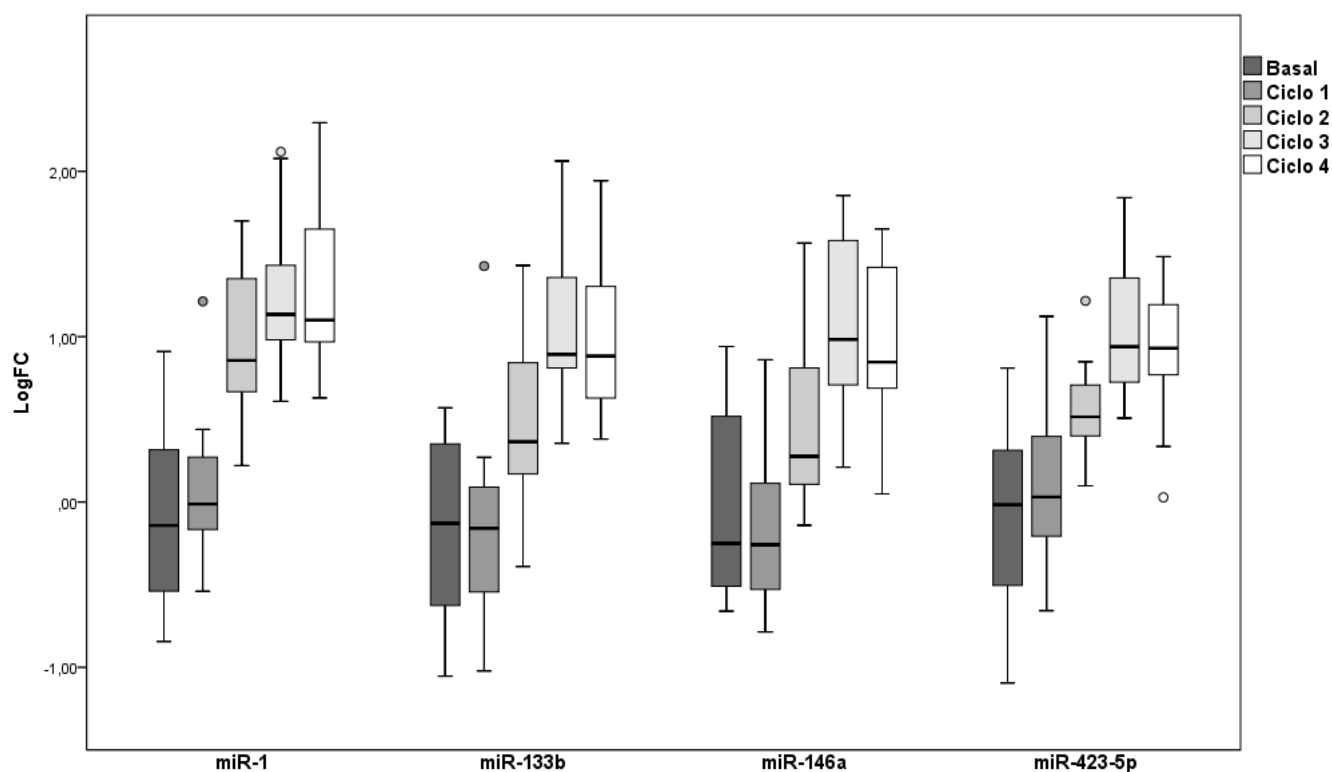


**Figure 4** – Regressão linear revelando ausência de associação ente mudanças na fração de ejeção do ventrículo esquerdo ( $\Delta$ FEVE) e na troponina cardíaca I ( $\Delta$ cTnI) com um  $r^2 = 0.005$  e  $p = 0.604$ .

### 6.3. Mensuração dos níveis plasmáticos de miR-1, -133b, -146a, -208b e -423-5p

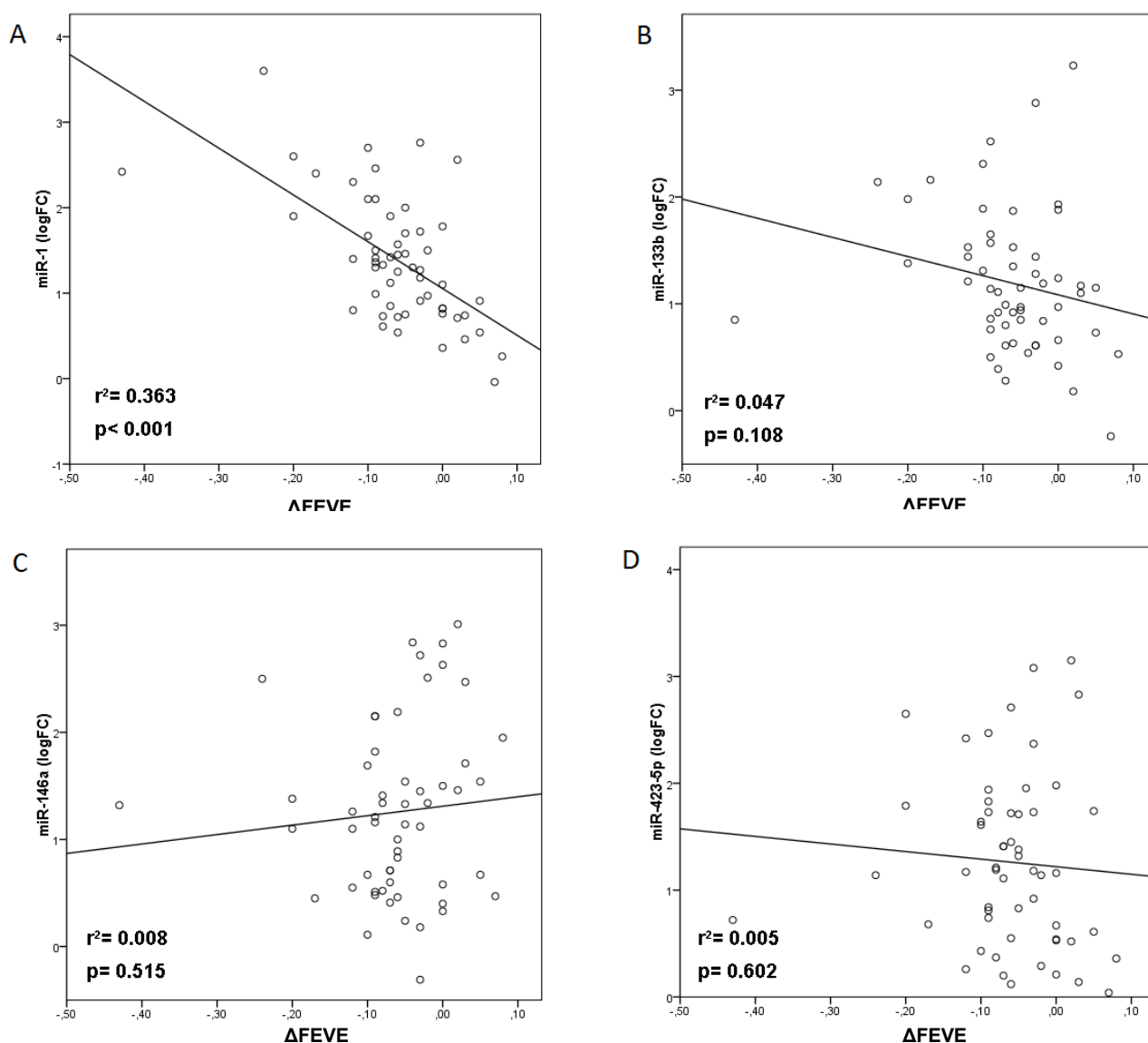
Após avaliação pela qPCR, foi observado um aumento gradativo nos níveis circulantes de miR-1, -133b, -146a e -423-5p durante o tratamento com DOX atingindo significância estatística a partir do ciclo 2 e seu pico

durante o ciclo 3 (Figura 5). Entretanto, os níveis de expressão de miR-208b foram muito baixos, apresentando valores de  $C_t > 38$  para todas as amostras, sendo assim considerado também como não detectado. Considerando todos os pacientes, os valores de expressão relativos ao início do tratamento aumentaram em 18.6, 10.6, 12.1 e 11.5-vezes para miR-1, -133b, -146a e -423-5p respectivamente ( $p < 0.001$  para todos os miRNAs).



**Figura 5** – Níveis de expressão de miR-1, -133b, -146a e -423-5p ao longo do tratamento com 4 ciclos de doxorrubicina em pacientes com câncer de mama.

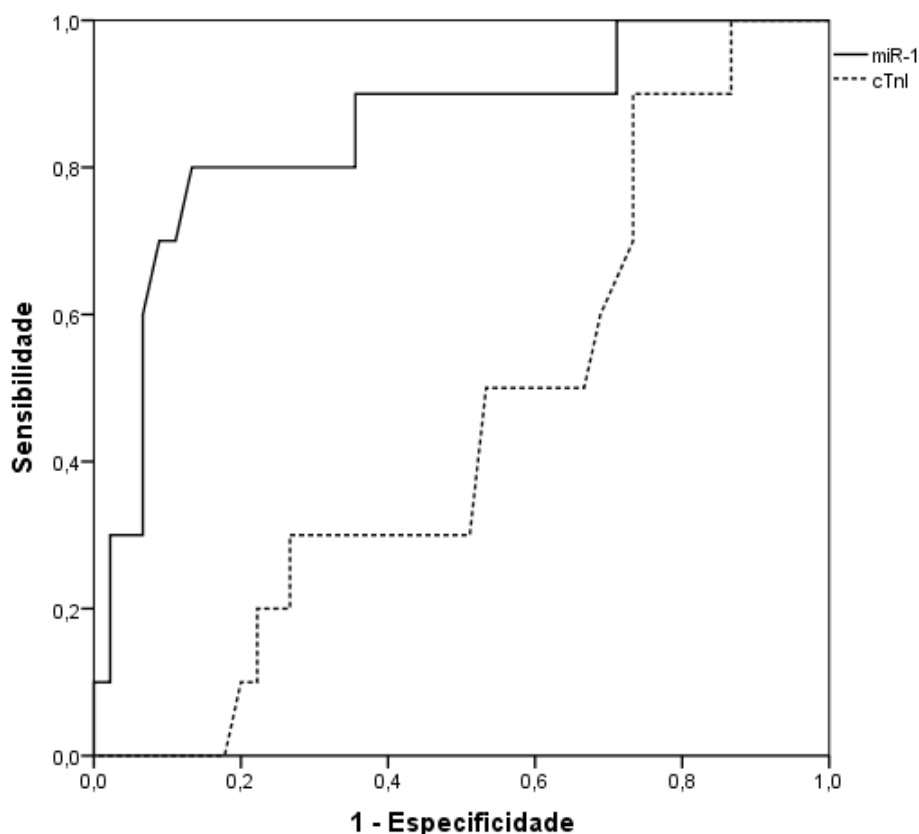
Em uma análise de regressão linear, o nível circulante de miR-1 foi associado a mudanças em FEVE revelando um  $r^2 = 0.363$  ( $p < 0.001$ ) enquanto nenhuma associação foi observada para miR-133b, -146a e -423-5p (Figura 6).



**Figura 6** – Regressão linear entre os níveis circulantes de (A) miR-1, (B) -133b, (C) -146a e (D) -423-5p e mudanças na fração de ejeção do ventrículo esquerdo ( $\Delta$ FEVE) revelando associação entre miR-1 e  $\Delta$ FEVE (A).

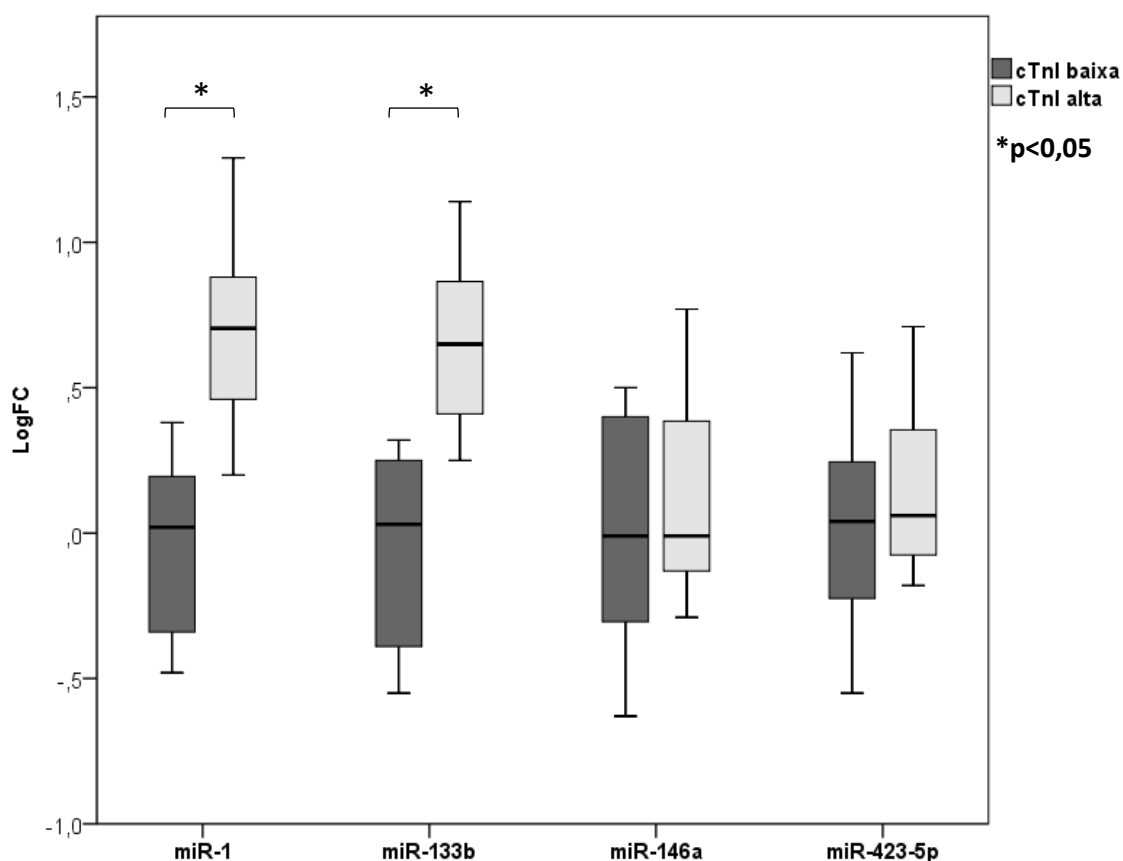
Uma curva ROC (*receiver operating characteristic*) foi gerada para prever o potencial dos níveis circulantes de miR-1 e cTnI em discriminar pacientes que desenvolveram cardiotoxicidade daqueles que não desenvolveram. Como resultado, miR-1 revelou-se mais sensível para detecção de cardiotoxicidade com uma área sob a curva = 0.849 e  $p < 0.001$  quando comparado a cTnI (AUC= 0.456 e  $p = 0.663$ ; Figura 7).

O pico de miR-1 foi observado em  $2.5 \pm 0.2$  meses após o início da quimioterapia antecipando a redução na FEVE ( $7.2 \pm 1.3$  meses).



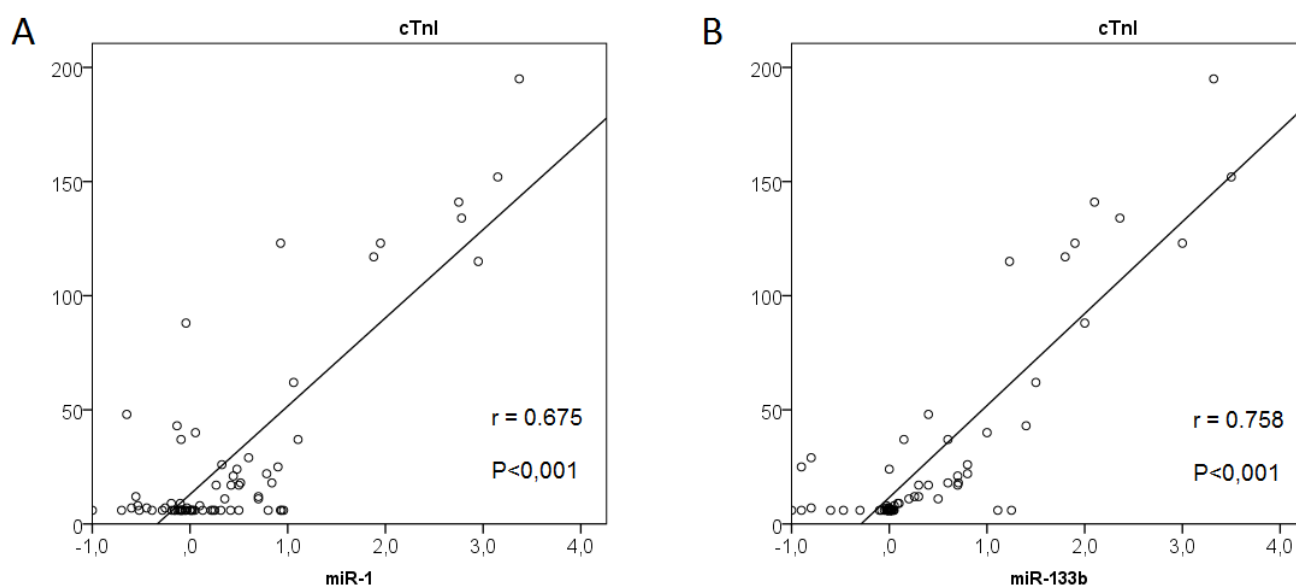
**Figura 7** – Curva ROC (*receiver operating characteristic*) revelando a habilidade dos níveis circulantes de miR-1 e cTnI em discriminar pacientes que desenvolveram cardiotoxicidade daqueles que não desenvolveram durante em pacientes com câncer de mama sob tratamento com doxorubicina.

Comparando os níveis circulantes de miR-1, miR-133b, miR-146a e miR-423-5p entre pacientes com troponina alta (n= 7) e baixa (n= 49), observou-se que miR-1 e miR-133b (miRNAs músculo-específicos) foram significativamente mais expressos em pacientes com troponina elevada (Figura 8). Respectivamente, os níveis circulantes de miR-1, -133b, -146a e -423-5p foram aumentados 5.05 (p=0.04), 4.46 (p=0.03), 1.09 (p=0.58) e 1.36-vezes (p=0.22) em pacientes com níveis de troponina elevada.



**Figura 8** – Níveis circulantes de miR-1 e -133b em pacientes com troponina cardíaca I (cTnI) alta (n= 7) e baixa (n= 49) tratados com doxorubicina.

Uma análise de regressão linear realizada em toda a coorte também revelou que os níveis circulantes de miR-1 e -133b foram associados com cTnI revelando um  $r^2 = 0.675$  e  $0.758$  ( $p < 0.001$ ; Figura 9), respectivamente.



**Figura 9** – Regressão linear entre os níveis circulantes de (A) miR-1, (B) -133b e troponina cardíaca I (cTnI) revelando uma associação entre miR-1 e cTnI (A).



## **7. DISCUSSÃO**

Neste estudo foi demonstrado que os níveis circulantes de miR-1, -133b, -146a e -423-5p foram regulados positivamente em resposta ao tratamento com DOX enquanto miR-208a/b foram indetectáveis. Ao nosso conhecimento, este foi o primeiro estudo a demonstrar que o miR-1 circulante foi associado não somente com mudanças na FEVE mas também com as concentrações de cTnI em pacientes com câncer de mama sob tratamento quimioterápico com DOX. Além disso, os níveis circulantes de miR-1 aumentaram previamente a redução na FEVE, antecipando-se a detecção da cardiotoxicidade. Análise da curva ROC mostrou que miR-1 foi superior a cTnI para distinguir pacientes que desenvolveram cardiotoxicidade daqueles que não desenvolveram. Somados, estes dados sugerem que miR-1 pode se tornar um potencial biomarcador de cardiotoxicidade induzida pela quimioterapia com DOX em pacientes com câncer de mama.

#### **7.1. Efeito do tratamento com doxorrubicina sobre os níveis circulantes de miR-1, -133b, -208a/b, -146a e -423-5p**

Os dados apresentados neste estudo confirmam relatos prévios mostrando que o tratamento com DOX pode perturbar a expressão de miRNAs relacionados com o coração [56-58]. De fato, muito poucos estudos avaliaram os padrões de expressão de miRNAs durante a cardiotoxicidade induzida por quimioterápicos concentrando-se, essencialmente, em abordagens experimentais em camundongos e culturas de células.

Sustentando os resultados encontrados neste estudo, Horie e colaboradores [59] mostraram que os níveis de miR-146a foram significativamente aumentados em culturas de cardiomiócitos após administração de uma dose alta de DOX. Este aumento foi suficiente para induzir apoptose dos cardiomiócitos por meio da inibição do gene ErbB4. Este é um achado interessante uma vez que a inibição do gene ErbB4 pela DOX foi postulado como sendo envolvida no desenvolvimento de insuficiência cardíaca em pacientes com câncer tratados com DOX. Por outro lado, em um modelo de cardiotoxicidade crônica, Vacchi-Suzzi e colaboradores [58] mostraram que os níveis de miR-146a no coração de camundongos não foram alterados mesmo havendo evidências de lesões histopatológicas. No cenário clínico, mostrou-se neste estudo que os níveis circulantes de miR-146a aumentaram significativamente a partir do segundo ciclo de DOX. De fato, não se sabe se miR-146a foi realmente liberado pelo coração e se este aumento no plasma poderia estar relacionado com estágios moleculares que precedem danos nos cardiomiócitos.

Recentemente, miR-423-5p tem despertado bastante atenção por ter sido destacado como potencial biomarcadores de insuficiência cardíaca correlacionando com importantes parâmetros prognósticos clínicos [60-64]. Entretanto, um aumento significativo da expressão de miR-423-5p foi observado neste estudo sem associação com a redução na FEVE. Uma vez que a super expressão de miR-423-5p foi descrita como suficiente para induzir apoptose em cardiomiócitos [65], este aumento encontrado no plasma de pacientes tratados com DOX poderia ser um indicativo de um pior

prognóstico. Porém ainda permanece elusivo se este aumento de miR-423-5p proveio do aumento da sua produção no miocárdio e subsequente liberação na corrente sanguínea ou se foi liberado ativamente por outros tipos celulares em resposta ao tratamento com DOX.

Interessantemente, miR-208a (miRNA coração-específico [14]) e -208b (músculo específico) foram indetectáveis neste estudo [66] embora estudos prévios tenham sugeridos como potenciais biomarcadores de lesão miocárdica secundária ao infarto agudo do miocárdio [44, 67] ou uso de isoproterenol [43, 57, 68]. Esta discrepância pode ser resultado de uma resposta diferencial dos cardiomiócitos ao estímulo de DOX. Como mostrado por Vacchi-Suzzi e colaboradores [58], miR-208a diminui seu nível de expressão no coração durante tratamento com DOX de forma similar com o seu gene codificante Myh6. Em paralelo, os níveis de expressão de miR-208b e Myh7 (seu gene codificante) aumentam significativamente, indicando uma inversão de miosinas o qual é associado ao remodelamento cardíaco patológico [14]. Já no plasma sanguíneo, Nishimura e colaboradores [57] mostraram que, após administração de uma alta dose de DOX em ratos, o miR-208a não foi alterado significativamente enquanto miR-1, miR-133a/b e miR-206 foram aumentados. Somados, estes dados sugerem que, aparentemente, DOX induz lesão miocárdica por uma via diferente da observada para isoproterenol e após o infarto, o qual parcialmente explica a ausência de miR-208a no plasma de pacientes tratados com DOX observado neste estudo.

Em acordo com os resultados obtidos neste estudo, um aumento da expressão de miR-1 e -133b foi também observado no plasma de camundongos tratados com DOX [57]. Entretanto, outros dois estudos não observaram mudanças significantes na expressão de miR-1 no tecido cardíaco de camundongos [56, 58]. Em conjunto, a manutenção dos níveis de miR-1 no coração e o seu aumento progressivo no plasma sugerem uma liberação de miR-1 do coração para a corrente sanguínea. Este dado é também é apoiado pelo fato de que os cardiomiócitos aumentam a formação de vacúolos quando expostos a DOX [56, 58].

## **7.2. miR-1 e cardiotoxicidade**

A ocorrência de cardiotoxicidade em pacientes sob tratamento com DOX é amplamente variável e depende de diversos fatores de risco como a dose cumulativa de DOX administrada, idade e tratamentos concomitantes com medicamentos tóxicos como trastuzumab [54]. Neste estudo, nós observamos uma ocorrência de cardiotoxicidade em 17.9% dos pacientes mesmo utilizando doses cumulativas de DOX consideradas como “seguras”. Quando analisado como um todo, foi observada uma redução geral de 2% na FEVE durante os 12 meses de seguimento com uma tendência a significância estatística. Uma redução de magnitude similar (2.6%) foi observada no recente ensaio clínico PRADA [69] levando a acreditar que o aumento do tamanho amostral seja suficiente para alcançar o nível de significância.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem a existência de uma associação entre miR-1 e alterações na FEVE em pacientes sob tratamento com DOX. Além disso, miR-1 apresentou uma habilidade superior a cTnl para discriminar pacientes com cardiotoxicidade. Apesar de diversos estudos terem explorado o potencial de miR-1 como biomarcador de lesão miocárdica [57, 70-72] ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a destacar o potencial de miR-1 como biomarcador precoce de cardiotoxicidade induzida pelo tratamento com DOX. A relação de miR-1 com a cardiotoxicidade poderia ser explicada, em partes, pelo seu recentemente descrito envolvimento na geração de espécies reativas ao oxigênio (ROS) [73-75]. O aumento da produção de ROS é conhecido por incentivar o estresse oxidativo nos cardiomiócitos levando-os a apoptose e descrito como um dos principais mecanismos de cardiotoxicidade induzida pela DOX. Estudos prévios [74-78] mostraram que miR-1 suprime a expressão de genes antioxidantes nos cardiomiócitos podendo levar a um desequilíbrio entre o estresse oxidativo e atividade antioxidante levando a apoptose. Por sua vez, o aumento desta atividade apoptótica pode ser responsável pela liberação o conteúdo celular na corrente sanguínea elevando os níveis circulantes de miR-1.

O aumento de miR-1 no plasma de pacientes tratados com DOX somados ao seu papel pró-apoptótico via produção de ROS abre uma nova janela sobre o seu uso como um alvo terapêutico a fim de reprimir o efeito cardiotóxico da quimioterapia. De fato, diversas terapias baseadas em miRNAs têm sido recentemente empregadas em doenças cardiovasculares

revelando resultados promissores na melhora ou proteção das funções cardíacas [79-81]. Desta forma, estes resultados destacam não somente o potencial de miR-1 como promissor biomarcadores de cardiotoxicidade induzida pelo tratamento com DOX, mas também a possibilidade de seu uso como alvo terapêutico.

### **7.3. Implicações clínicas**

As mudanças na expressão de miRNAs observadas neste estudo podem indicar um potencial risco de eventos cardíacos como apoptose dos cardiomiócitos e hipertrofia, no qual podem, conseqüentemente, levar a uma perda da performance do coração. A associação entre miR-1 e mudanças na FEVE e cTnI em pacientes com câncer de mama sob tratamento com DOX pode indicar lesão miocárdica subclínica. De fato, o aumento dos níveis de miR-1 induzido pelo tratamento com DOX pode ser um reflexo de uma produção de ROS aumentada o qual pode levar a apoptose de cardiomiócitos e subseqüentemente lesão miocárdica. Desta forma, terapias baseadas em miRNA que visem miR-1 poderiam proteger o coração contra o efeito cardiotóxico da quimioterapia. Finalmente, os dados obtidos neste estudo sugerem que miR-1 não é somente atrativo como um promissor biomarcador de cardiotoxicidade induzida pelo tratamento com DOX, mas também um possível alvo terapêutico.

#### **7.4. Limitações**

Apesar da alta precisão dos ensaios individuais pela RT-qPCR, o seu uso restringiu os dados a somente poucos miRNAs, sendo o emprego da técnica de miRNA array mais adequada para uma identificação mais abrangente do perfil de miRNAs.

Os níveis de troponina cardíaca I ultra sensível (Hs-TnI) não foram determinados neste estudo e poderiam fornecer melhores resultados se comparados com a troponina cardíaca I (cTnI). Por outro lado, Hs-TnI não está disponível amplamente na prática clínica.

Outra limitação é que não se sabe a exata origem de miR-1, entretanto, a sua associação com a cTnI sugere uma origem cardíaca.

Finalmente, um maior tempo de seguimento destes pacientes ainda é necessário para determinar se o aumento dos níveis destes miRNAs é preditivo de eventos cardíacos tardios.



## **8. CONCLUSÕES**

O tratamento quimioterápico com doxorrubicina (DOX) em pacientes com câncer de mama promoveu o aumento dos níveis circulantes de miR-1, -133b, -146a e -423-5p enquanto nenhum efeito foi observado sobre miR-208a e -208b. Dentre os miRNAs analisados, miR-1 e -133b foram associados aos níveis séricos da troponina cardíaca I (cTnI) enquanto somente miR-1 foi associado a alterações na fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE).

O fato de que miR-1 foi associado a alterações na FEVE e cTnI bem como sua habilidade de antecipar a cardiotoxicidade o torna atrativo como um promissor biomarcador de cardiotoxicidade em pacientes com câncer de mama tratados com DOX. Estes achados podem ajudar no desenvolvimento de estratégias de detecção precoce de lesão cardíaca com potencial utilidade clínica no monitoramento ou predição de risco de desenvolvimento de cardiotoxicidade antes que alcancem um estágio irreversível.

Além disso, estes resultados podem levar ao desenvolvimento de uma nova área de intervenção com terapias baseadas em miRNA que visem proteger o coração contra o efeito cardiotóxico da quimioterapia

## **9. ANEXOS**

## Anexo A - Artigos publicados durante o período de doutoramento

### Review Article



## MicroRNAs: A New Paradigm in the Treatment and Diagnosis of Heart Failure?

Vagner Oliveira-Carvalho, Vitor Oliveira Carvalho, Miguel Morita Silva, Guilherme Veiga Guimarães, Edimar Alcides Bocchi

Instituto do Coração - InCor - HCFMUSP, SP, São Paulo, Brazil

### Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are a group of newly discovered small RNAs, non-coding, which represent one of the most exciting areas of modern medical science as they modulate a huge and complex regulatory network of gene expression. Lines of evidence have recently suggested that miRNAs play a key role in the pathogenesis of heart failure. Some miRNAs highly expressed in the heart, such as miR-1, miR-133 and miR-208, are strongly associated with the development of cardiac hypertrophy, while the exact role of miR-21 in the cardiovascular system remains controversial. Serum levels of circulating miRNAs such as miR-423-5p are being evaluated as potential biomarkers in the diagnosis and prognosis of heart failure. On the other hand, the manipulation of levels of miRNAs using techniques such as mimicking the miRNAs (miRmimics) and antagonistic miRNAs (antagomiRs) is making increasingly evident the enormous potential of miRNAs as promising therapeutic strategies in heart failure.

### Introduction

The syndrome of heart failure (HF) is considered the final common pathway of every heart disease and a major cause of death<sup>1,2</sup>. This syndrome has an alarming mortality rate of approximately 50% in five years, which can overcome many types of cancer<sup>3</sup>. In Brazil, HF represents a major cause of hospitalization for cardiovascular disease, and when considering all causes of death, it represents a mortality rate of 6.3%<sup>4,5</sup>.

The recent discovery of microRNAs (miRNAs) has placed them among the most exciting areas of modern medical science. MiRNAs are a group of small RNAs, non protein encoders, with approximately 19-25 nucleotides of extension. Differing from the wide range of RNAs encoded by the human

genome, this type of RNA has been noted for its unique ability to modulate an enormous and complex regulatory network of gene expression<sup>6</sup>.

The biological role of miRNAs in the cardiovascular system of mammals has recently become a research field of rapid evolution. Several studies have demonstrated the crucial role of miRNAs not only in embryonic cardiovascular development, but also in cardiovascular disease.

### Biology of microRNAs

The human genome encodes a broad range of types of RNAs, in which the function of most of these molecules has been only partially elucidated and remains unknown. Along with other more common types of RNA such as mRNA (messenger RNA or protein-coding RNA) and those with structural functions, such as tRNA (transfer RNA) and rRNA (ribosomal RNA) are the non-protein-coding RNAs, including the miRNAs.

It is known that miRNAs are usually synthesized from miRNA-specific genes or specific genetic regions that are not associated with the production of proteins (introns)<sup>7</sup>. The maturation of miRNAs involves a complex metabolic pathway that begins in the nucleus and extends to the cell cytoplasm (Fig. 1)<sup>8</sup>.

MiRNAs exert their regulatory effects by binding their nucleotides to those of the target messenger RNA (mRNA) in a process called pairing. This binding prevents the ribosomes from translating the genetic information contained in the mRNA, resulting in decreased protein synthesis of the target gene without impacting the corresponding levels of RNAm<sup>9</sup>.

The miRNA-mRNA interaction, however, does not necessarily need to be perfect, i.e., all miRNA nucleotides bound to the mRNA. In mammals, this binding is usually imperfect. Therefore, lack of necessity for a complete interaction coupled with the fact that miRNAs have small sequences, a single miRNA can regulate hundreds of target genes, and cooperate in control of a single target gene<sup>9,9</sup>.

The involvement of miRNAs in regulatory control of gene expression and association with different functions make it clear that miRNAs can alter the progression of several diseases.

### MicroRNAs and the cardiovascular system

Although the biological functions of miRNAs are not fully understood, studies have shown that some miRNAs are specifically present in certain tissues or cell types, including

### Keywords

microRNAs / genetics; microRNAs / diagnostic use; microRNAs / antagonists & inhibitors; heart failure; cardiomegaly.

Mailing Address: Vagner Oliveira Carvalho •  
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44 - Laboratório de Insuficiência Cardíaca e Transplante - InCor - Bloco 1, 1º Andar - 05403-900, São Paulo, SP, Brazil  
E-mail: vagnercarvalho@usp.br  
Manuscript received August 31, 2011; revised manuscript received October 25, 2011; accepted November 10, 2011.

## Review Article



### Physical Exercise and MicroRNAs: New Frontiers in Heart Failure

Miguel Morita Fernandes-Silva<sup>1,2</sup>, Vagner Oliveira Carvalho<sup>1</sup>, Cuiherme Veiga Cuimarães<sup>1</sup>, Fernando Bacal<sup>1</sup>, Edimar Alcides Bocchi<sup>1</sup>

Instituto do Coração do Hospital das Clínicas de São Paulo-INCOR<sup>1</sup>, São Paulo, SP; Hospital Cardiológico Costantini<sup>2</sup>, Curitiba, PR, Brazil

#### Abstract

Although the impact of exercise on survival of patients with heart failure has been recently questioned, exercise training improves quality of life, functional capacity, inflammation, endothelial and autonomic function. In recent years, interest has increased regarding a group of small non-protein coding RNAs called microRNAs.

Studies have shown that the expression of these molecules changes in several pathological conditions, such as myocardial infarction, myocardial ischemia and heart failure, and when clinical improvement occurs, they seem to normalize. With the potential for practical applicability, markers that may be useful in diagnostic and prognostic assessment of heart failure have been identified, such as miR-423-5p. In addition, results of experimental studies have indicated that there are potential therapeutic effects of microRNAs.

MicroRNAs are involved in the regulation of gene expression during fetal development and in adult individuals, increasing or decreasing in the heart in response to physiological stress, injury or hemodynamic overload. Thus, the study of the behavior of these molecules in physical exercise has brought important information about the effects of this therapeutic modality and represents a new era in the understanding of heart failure.

This review aims to integrate the evidence on microRNAs in heart failure with greater relevance in the study of physical exercise.

#### Introduction

Several advances in the understanding of the physiopathology of heart failure (HF) allowed the development of new therapeutic modalities, or even optimized them, with a consequent increase in survival. Nevertheless, HF is still a condition with high mortality and morbidity, being the leading cause of hospitalization due to cardiovascular disease in Brazil<sup>1</sup>.

#### Keywords

Exercise; microRNAs; heart rate / physiopathology.

Mailing Address: Miguel Morita Fernandes da Silva • Avenida Eneas de Carvalho Aguiar, 44, Bloco I, 1º Andar, Bairro Cerqueira Cesar, CEP 05403-000, São Paulo, SP – Brazil  
E-mail: miguelmorita@cardiol.br, miguelmorita@me.com  
Manuscript received September 29, 2011; revised manuscript received October 25, 2011; accepted November 03, 2011.

In spite of recent evidence questioning the impact of exercise on survival<sup>2</sup>, physical training improves quality of life<sup>3</sup>, functional capacity<sup>4</sup>, inflammation<sup>5</sup>, and autonomic<sup>6</sup> and endothelial function<sup>4</sup>. The mechanisms involved in this phenomenon are not yet fully understood. In recent years, interest has increased in the area of research involving aspects related to the body's response to exercise in the genetic scenario, in which microRNAs appear to play a key role.

It has become increasingly evident that microRNAs play a critical role in many biological processes, and research in cancer and cardiovascular diseases have been the main focus in translational medicine. Recent studies have evaluated the expression of several microRNAs in myocardial hypertrophy, myocardial infarction and heart failure, which will improve the understanding of the physiopathology of these clinical conditions, in addition to their promising use in the diagnosis and prognosis of major cardiovascular diseases<sup>6,7</sup>. Moreover, the possibility of mimicking microRNAs with reduced expression or antagonizing those of which increased expression would be causally linked to a specific pathology, represent a therapeutic potential and new paradigm in the management of heart diseases.

Implicated in the regulation of gene expression during fetal development and in adult individuals<sup>8,9</sup>, many of these microRNAs increase or decrease in the heart in response to physiological stress, injury or hemodynamic overload<sup>10</sup>. The study of the behavior of these molecules in physical exercise therefore represents a great potential for new discoveries of this type of therapeutic modality in HF.

This review aims to integrate the evidence for microRNAs in heart failure with greater relevance in the study of physical exercise.

#### MicroRNAs

In response to external stimuli such as exercise, gene expression can be modulated by different mechanisms, including gene silencing by small RNAs, including the microRNAs (miRNAs)<sup>11</sup>.

The miRNAs, initially described in 1993 when studying the development of nematodes<sup>12</sup>, are characterized as a group of small non-protein-coding RNAs, with approximately 19-25 nucleotides in length. Unlike the wide range of RNAs encoded by the human genome, this variety of RNA has been noted for its unique ability to modulate an enormous and complex regulatory network of gene expression<sup>13</sup>.



## The Emerging Role of miR-208a in the Heart

Vagner Oliveira-Carvalho, Vitor Oliveira Carvalho, and Edimar Alcides Bocchi

MicroRNAs (miRNAs) are a class of regulatory small RNAs that have fundamentally transformed our understanding of how gene networks are regulated representing one of the most exciting areas of the modern cardiology research. Among all known miRNAs, miR-208a is one of the most important heart-enriched miRNA playing a crucial role in the heart health and disease. miR-208a is a member of a miRNA family that also included miR-208b and is encoded by an intronic region of the *Myh6* gene. Within the heart, miR-208a and miR-208b are involved in the regulation of the myosin heavy chain isoformswitch during development and in pathophysiological conditions. miR-208a is sufficient to induce arrhythmias, cardiac remodeling, and to regulate the expression of hypertrophy pathway components and the cardiac conduction system. Recently, the identification of miR-208a in the bloodstream has led to a great clinical interest to use this molecule as a potential noninvasive biomarker of myocardial injuries.

### Introduction

THE HUMAN GENOME encodes a wide range of RNAs, where the function of the most of these molecules has been only partially elucidated or still remains unknown. Although the human genome has a large number of genes, only around 30% of all transcribed genes are protein-coding. Indeed, only ~2% of all transcribed bases make up known protein-coding genes, whereas non-protein-coding RNAs (ncRNAs) represent 98% and nearly 70% of all genes (Prasanth and Spector, 2007).

In the last two decades, one family of regulatory ncRNAs called microRNAs (miRNAs), because of their short length (~22 nucleotides), has fundamentally transformed our understanding of how gene networks are regulated representing one of the most exciting areas of the modern cardiology research. Since the discovery, the number of known miRNAs has expanded substantially. Today, more than 1500 different miRNAs have been identified in the human genome ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)) and many of them are implicated in cardiovascular development, function, and disease (Oliveira-Carvalho *et al.*, 2012). Among all known cardiovascular miRNAs, a heart-enriched miRNA called miR-208a had earned much attention not only as a critical player for the heart health and disease, but also as a potential biomarker and therapeutic target.

### Biology and Role of miR-208a in the Heart

miR-208 is a highly conserved miRNA family constituted of two members, miR-208a and miR-208b, which have very similar nucleotide sequences (Fig. 1; [www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)).

Until approximately 2009, only one member of the family (miR-208) had been described. In 2009, another member was described, and then miR-208 was renamed into miR-208a and the new member as miR-208b. Later, another miRNA called miR-499 was included as a third member of this family based on the sequence homology and tissue expression pattern (Fig. 1). Both miR-208a and miR208b as well as miR-1, miR-133a, and miR133b were recently described as important regulators of the gene network involved in the stem cell differentiation to cardiomyocytes (Babiarz *et al.*, 2012). Indeed, miR-208a is highly expressed in the heart by intron 29 of the *Myh6* gene, whereas miR-208b is encoded by intron 31 of the *Myh7* and expressed in cardiac and skeletal muscles (Callis *et al.*, 2009; van Rooij *et al.*, 2009). The third member of the family, miR-499, is encoded by intron 19 of a closely related gene, *Myh7b*. Similar to miR-208b, miR-499 is expressed in the embryonic heart and skeletal muscle. In turn, these three miRNAs (miR-208a/b and miR-499), control muscle myosin content, myofiber identity, and muscle performance (van Rooij *et al.*, 2009).

The efficiency of myocardial contractility is largely dependent on the contractile protein Myosin Heavy Chain (MHC). The MHC is the major contractile protein of the cardiac muscle and represented by two MHC isoforms:  $\alpha$ -MHC (fast myosin) and  $\beta$ -MHC (slow myosin), which are encoded by *Myh6* and *Myh7* genes, respectively (Weiss and Leinwand, 1996). However, there are more ancient myosin genes, such as *Myh7b*. Although *Myh7b* is closely related to  $\alpha$ -MHC and  $\beta$ -MHC, it does not generate a new myosin isoform with related or novel physiological function (Bell *et al.*, 2010). The proportion of MHC isoforms may vary

Laboratório de Insuficiência Cardíaca e Transplante do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (InCor HC-FMUSP), São Paulo, Brasil.

Mol Biol Rep (2013) 40:2663–2670  
DOI 10.1007/s11033-012-2352-y

## MicroRNAs: new players in heart failure

Vagner Oliveira-Carvalho · Miguel Morita Fernandes da Silva ·  
Guilherme Veiga Guimarães · Fernando Bacal ·  
Edimar Alcides Bocchi

Received: 25 June 2012 / Accepted: 9 December 2012 / Published online: 15 December 2012  
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2012

**Abstract** MicroRNAs (miRNAs) are a class of non-coding small RNAs representing one of the most exciting areas of modern medical science. miRNAs modulate a large and complex regulatory network of gene expression of the majority of the protein-coding genes. Currently, evidences suggest that miRNAs play a crucial role in the pathogenesis of heart failure. Some miRNAs as miR-1, miR-133 and miR-208a are highly expressed in the heart and strongly associated with the development of cardiac hypertrophy. Recent data indicate that these miRNAs as well as miR-206 change their expression quickly in response to physical activity. The differential regulation of miRNAs in response to exercise suggests a potential value of circulating miRNAs (c-miRNAs) as biomarkers of physiological mediators of the cardiovascular adaptation induced by exercise. Likewise, serum levels of c-miRNAs such as miR-423-5p have been evaluated as potential biomarkers in the diagnosis and prognosis of heart failure. On the other hand, the manipulation of miRNAs levels using techniques such as ‘miR mimics’ and ‘antagomiRs’ is becoming evident the enormous potential of miRNAs as promising therapeutic strategies in heart failure.

**Keywords** MicroRNAs · Heart failure · Exercise

V. Oliveira-Carvalho (✉) · M. M. F. d. Silva ·  
G. V. Guimarães · F. Bacal · E. A. Bocchi  
Laboratório de Insuficiência Cardíaca e Transplante, Instituto do  
Coração, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da  
USP (InCor HC-FMUSP), Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar,  
44, Bloco 1, 1º Andar, InCor, São Paulo 05403-900, Brazil  
e-mail: vagnercarvalho@usp.br

### Introduction

In the last two decades, one family of regulatory RNAs called microRNAs (miRNAs), because of their short length (~22 nucleotides), has fundamentally transformed our understanding of how gene networks are regulated representing one of the most exciting areas of the modern cardiology research. Unlike the wide range of RNAs encoded by the human genome this RNA variety has been noted for its unique ability to modulate an enormous and complex regulatory network of gene expression.

To date, more than 1,500 miRNAs have been identified in the human genome ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)) and this number is expected to grow further due to the recent development of sequencing technologies and computational prediction methods [1]. Recently, several studies have shown that miRNAs modulate a wide spectrum of cardiac functions not only in heart development but also in pathogenic conditions such as heart failure (HF).

### MicroRNAs in cardiac and skeletal muscles

Although the biological functions of miRNAs are not fully understood, studies have shown that some miRNAs are specifically expressed in certain tissues or cell types [1]. Four miRNAs are highly expressed in the heart: miR-1, miR-133, miR-208 and miR-499. The miR-1 family is the most expressed miRNA in the heart while miR-208 is the only cardio-specific miRNA known until now. However, some miRNAs such as miR-128, miR-302, miR-367 and miR-499 are potentially cardio-specific, but more studies are needed to confirm.

In skeletal muscle, miR-1, miR-133a, miR-133b and miR-206 together account for approximately 25 % of the



## Note

# The new mutation L321F in *Candida albicans* ERG11 gene may be associated with fluconazole resistance

Vagner Oliveira Carvalho<sup>a,\*</sup>, Thelma S. Okay<sup>b</sup>, Márcia S.C. Melhem<sup>c</sup>, Maria Walderez Szeszs<sup>c</sup>, Gilda M.B. del Negro<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Medical Mycology (IUM-53)-Clinical Dermatology Division, Hospital das Clínicas da FMUSP e Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, State of São Paulo, Brazil

<sup>b</sup> Laboratory of Seroepidemiology and Immunobiology, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, State of São Paulo, Brazil

<sup>c</sup> Division of Mycology, Instituto Adolfo Lutz, Public Health Reference Laboratory, São Paulo, State of São Paulo, Brazil

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 27 August 2012

Accepted 30 January 2013

Available online 9 February 2013

### Keywords:

Drug resistance

Mutation

*Candida*

ERG11 gene

Fluconazole

### Palabras clave:

Resistencia farmacológica

Mutación

*Candida*

Gen ERG11

Fluconazol

## ABSTRACT

**Background:** For many years fluconazole has been commonly used to treat *Candida* infections. However, the indiscriminate use of this antimycotic therapy has favored the emergence of resistant isolates. Mutations in the ERG11 gene have been described as one of the primary mechanisms of resistance in *Candida* species.

**Aims:** In this study we investigated missense mutations in ERG11 genes of *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida tropicalis* isolates previously evaluated by susceptibility testing to fluconazole.

**Methods:** Screening for these mutations was performed on 19 *Candida* clinical isolates (eight *C. albicans*, five *C. glabrata* and six *C. tropicalis*) resistant and susceptible to fluconazole. The ERG11 gene was amplified by PCR with specific primers for each *Candida* species and analyzed by automated sequencing.

**Results:** We identified 14 different missense mutations, five of which had not been described previously. Among them, a new mutation L321F was identified in a fluconazole resistant *C. albicans* isolate and it was analyzed by a theoretical three-dimensional structure of the ERG11p.

**Conclusion:** The L321F mutation in *C. albicans* ERG11 gene may be associated with fluconazole resistance.

© 2012 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

## La nueva mutación L321F en el gen ERG11 de *Candida albicans* puede asociarse a resistencia a fluconazol

## RESUMEN

**Antecedentes:** Durante años, el fluconazol se ha utilizado para tratar las infecciones por *Candida*. Sin embargo, el uso indiscriminado de este antimicótico ha favorecido la aparición de cepas resistentes. Se han descrito mutaciones en el gen ERG11 como uno de los principales mecanismos de resistencia en especies de *Candida*.

**Objetivos:** En el presente estudio se investigaron las mutaciones de sentido erróneo en genes ERG11 de aislamientos de *Candida albicans*, *glabrata* y *tropicalis* previamente examinados mediante pruebas de sensibilidad a fluconazol.

**Métodos:** La detección de las mutaciones de este gen se realizó en 19 aislamientos clínicos de *Candida* (8 *C. albicans*, 5 *C. glabrata* y 6 *C. tropicalis*) sensibles y resistentes a fluconazol. El gen se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores específicos para cada especie de *Candida* y se analizaron mediante secuenciación automatizada.

**Resultados:** Se identificaron 14 mutaciones de sentido erróneo diferentes, 5 de las cuales no habían sido descritas previamente. Entre ellas, se identificó una nueva mutación L321F en un aislamiento de *C. albicans* resistente a fluconazol y que fue analizada mediante una estructura tridimensional teórica de ERG11p.

**Conclusión:** La mutación L321F del gen ERG11 de *C. albicans* puede asociarse a resistencia a fluconazol.

© 2012 Revista Iberoamericana de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

\* Corresponding author.

E-mail address: vagnercarvalho@usp.br (V. Oliveira Carvalho).

1130-1406/\$ – see front matter © 2012 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2013.01.001





## Exercise capacity in early and late adult heart transplant recipients

Vitor Oliveira Carvalho<sup>1,2</sup>, Carolina Barni<sup>1</sup>, Iram Soares Teixeira-Neto<sup>1</sup>,  
Guilherme Veiga Guimaraes<sup>1</sup>, Vagner Oliveira-Carvalho<sup>1</sup>, Edimar Alcides Bocchi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto do Coracao do Hospital das Clinicas da Faculdade  
de Medicina da USP (InCor HC-FMUSP), Sao Paulo, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de Sergipe — UFS, Aracaju-SE, Brasil

### Abstract

**Background:** The aim of this study was to compare peak oxygen consumption ( $VO_2$ ), heart rate (HR) reserve and HR recovery in early and late heart transplant recipients. Moreover, we also aimed to correlate peak  $VO_2$  and HR reserve.

**Methods:** Fifteen heart transplant recipients (8 early and 7 late),  $8 \pm 3$  and  $161 \pm 58$  months after transplantation, respectively, performed a cardiopulmonary exercise test.

**Results:** Early heart transplant recipients showed lower HR reserve compared to late heart transplant recipients,  $39 \pm 15$  vs.  $58 \pm 19$  bpm ( $p = 0.049$ ), respectively. Peak  $VO_2$  ( $23.4 \pm 4$  vs.  $21.8 \pm 5$  mL/kg/min,  $p = 0.56$ ),  $VO_2$  respiratory compensation point ( $18.7 \pm 2$  vs.  $18.5 \pm 4$  mL/kg/min,  $p = 0.48$ ) and time of exercise testing ( $14 \pm 3$  vs.  $13 \pm 3$  min,  $p = 0.95$ ) %age-predicted peak  $VO_2$  ( $65 \pm 12$  vs.  $70 \pm 10\%$ ,  $p = 0.24$ ) were not different between the groups. Moreover, peak  $VO_2$  and %age-predicted peak  $VO_2$  correlated with HR reserve only in early heart transplant recipients ( $r = 0.89$ ,  $p = 0.003$  and  $r = 0.71$ ,  $p = 0.04$ , respectively). Early heart transplant recipients increased HR ( $2.5 \pm 2.0\%$  at first minute and  $0.7 \pm 2.3\%$  at the second minute), while late recipients decreased HR ( $-6.0 \pm 4.7$  at first minute and  $-15.5 \pm 2.4$  at the second minute) at the recovery period of cardiopulmonary exercise test.

**Conclusions:** Exercise capacity did not show difference between early and late heart transplant recipients. HR reserve was higher in late compared to early recipients. HR reserve only correlated with peak  $VO_2$  in early recipients. Moreover, only late heart transplant recipients showed decrease in HR during the recovery period of cardiopulmonary exercise test. (Cardiol J 2013; 20, 2: 178–183)

**Key words:** peak  $VO_2$ , heart rate reserve, transplantation, reinnervation

### Introduction

Heart transplantation is worldwide recognized as treatment for end stage of patients with heart failure. Despite of heart transplant recipients show increased exercise capacity when compared to pre-transplantation, it is not restored to normal values considering age-matched health subjects [1].

Too much effort is taken by the scientific community to explain the cardiac and non-cardiac causes of impaired exercise capacity in heart transplant recipients. Diastolic dysfunction [2], chronotropic incompetence, and pre-transplant physical deconditioning [3] have been suggested. It has also been suggested that exercise capacity can increase over the time after heart transplant as

Address for correspondence: Dr. Vitor Oliveira Carvalho, PT, PhD, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44, Laboratório de Insuficiência Cardíaca e Transplante, Bloco 1, 1º Andar, InCor. São Paulo, Brasil, tel: +55 11 30695419, CEP: 05403-900, e-mail: vitor.carvalho@usp.br

Received: 14.07.2012

Accepted: 25.10.2012

## O controle da (*El control de la*) expressão gênica por microRNAs e sua (*y su*) importância para a (*la*) medicina

### *The control of gene expression by microRNAs and their importance in medicine*

Vagner Oliveira-Carvalho  
Pesquisador Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Edimar Alcides Bocchi, Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Acceda a este artículo en *siic*salud

Código Respuesta Rápida  
(Quick Response Code, QR)



[www.siic.salud.com/datosiic.php/137819](http://www.siic.salud.com/datosiic.php/137819)

Recepción: 20/8/2013 - Aprobación: 22/8/2014  
Primera edición, [www.siic.salud.com](http://www.siic.salud.com): 31/02/2014

Enviar correspondencia a: Vagner Oliveira-Carvalho, Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil  
[vagnercarvalho@usp.br](mailto:vagnercarvalho@usp.br)



➔ Especialidades médicas relacionadas, producción bibliográfica y referencias profesionales de los autores.

#### Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are a group of small RNAs, around 19-25 non-protein-coding nucleotides that are present in most eukaryotic organisms, including man. Since their discovery (1993), miRNAs have received great attention in the scientific community and present one of the most exciting areas of modern medical science. These molecules have the singular ability to modulate a huge and complex regulatory network of gene expression estimated at about 70% of the human genome. The miRNAs play their role in inhibiting the movement of specific mRNAs (post-transcriptional control), in other words, they reduce (or block) the synthesis of specific proteins during a certain time interval. The miRNAs thus play a crucial role not only in normal cellular processes, such as development and differentiation, but also in pathogenesis of various diseases. Recent studies show that the miRNA profile alters according to etiology, intensity and disease stage and may be used as potential tools in diagnosis and prognosis. In addition, the possible use of miRNAs to silence or activate specific genes is a promising tool that allows the development of new individual therapeutic strategies based on the specific condition of each patient. This review will discuss certain aspects of miRNA biology and how they may help us fight human disease.

**Key words:** microRNA, control of gene expression, biomarker, treatment, cancer

#### Resumo

MicroRNAs (miRNAs) são um (*constituyen un*) grupo de pequenos RNAs, com aproximadamente 19-25 nucleotídeos, que não-codificam (*no codifican*) proteínas e que estão (*y se encuentran*) presentes em grande parte dos organismos eucariontes, incluindo o homem. Desde a sua descoberta (1993) os miRNAs vêm ganhando um (*vienen ganando un*) enorme destaque na (*papel destacado en la*) comunidade científica, representando hoje uma das (*en la actualidad una de las*) áreas mais estimulantes da ciência médica moderna. Estas moléculas têm a singular (*poseen la singular*) habilidade de modular uma (*para modular una*) enorme e complexa rede (*compleja red*) regulatória da expressão dos genes estimada em cerca de 70% do genoma humano. Os miRNAs exercem sua (*ejercen su*) função por meio da (*a través de la*) inibição da tradução de mRNAs específicos (*controlé pós-transcripcional*), ou seja, impedem a (*es decir, impiden la*) síntese de determinadas proteínas durante um certo intervalo de tempo. Desta forma, os miRNAs desempenham um papel crucial não só nos (*no sólo en los*) processos celulares normais, como desenvolvimento e (*desarrollo y*) diferenciação, mas também na (*en la*) patogênese de diversas doenças (*enfermedades*). Estudos recentes mostram que os perfis (*los perfiles*) de miRNAs se alteram de acordo com a etiologia, intensidade e estágio da (*y etapa de la*) doença, podendo ser utilizados como potenciais ferramentas de diagnóstico e prognóstico. Aliado a isto, a (*Asociado con esto, la*) possibilidade do uso dos miRNAs para silenciar ou ativar (*o activar*) genes específicos é uma (*constituye una*) atual e promissora ferramenta que permite o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas individualizadas, ou seja (*es decir*), baseadas na (*con base en la*) condição específica de cada paciente. Nesta revisão serão abordados aspectos sobre a biologia dos miRNAs e como eles podem nos ajudar no (*y como ellos pueden ayudar en el*) combate às (*de las*) enfermidades humanas.

**Palavras chave:** microRNA, controle da expressão gênica, biomarcador, tratamento, câncer

#### Justificativa e objetivos

Embora os (*Aunque los*) microRNAs sejam uma das (*son una de las*) áreas mais estimulantes da ciência biomédica atual, pouca informação sobre estas moléculas está disponível em línguas latinas, o (*lo*) que dificulta a sua (*su*) difusão e retarda o surgimento (*la aparición de*) de novos estudos. Desta forma, o objetivo deste estudo é fazer uma (*es realizar una*) revisão da (*de la*) literatura e introduzir aos leitores os (*los lectores en los*) principais conceitos sobre dos microRNAs.

#### Metodologia

Pesquisas bibliográficas foram realizadas no banco de dados (*en el banco de datos*) PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) utilizando como palavras-chave

*Mesh terms* relacionados. Foram incluídos apenas artigos (*artículos*) de língua inglesa. Demais dados específicos foram obtidos nos (*han sido obtenidos de los*) bancos de dados miRBase (<http://www.mirbase.org>) e miRandola (<http://atlas.dmi.unict.it/mirandola/>).

#### Introdução

O genoma humano codifica um amplo espectro de RNAs onde a (*en que la*) função da maioria destas moléculas tem sido parcialmente elucidada ou ainda (*dilucidada o aún*) permanece desconhecida. Didaticamente, podemos dividir os RNAs em dois grandes grupos: 1) RNAs codificadores de proteínas (RNA mensageiro ou mRNA), e 2) RNAs não codificadores de proteína (ncRNAs – exemplificados posteriormente).





Available online at  
**ScienceDirect**  
 www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France  
**EM|consulte**  
 www.em-consulte.com



## LETTER TO THE EDITOR/LETRE AU RÉDACTEUR

### Is the S405F mutation in *Candida albicans* *ERG11* gene sufficient to confer resistance to fluconazole?



#### *La mutation S405F dans le gène ERG11 de Candida albicans est-elle suffisante pour conférer une résistance au fluconazole ?*

Fluconazole resistance in *Candida albicans* has been favored by the indiscriminate use of the fluconazole (FLZ) in clinical practice. Until now, many different mechanisms of FLZ resistance were described and may occur simultaneously in resistant isolates [2]. One of these mechanisms is caused by missense mutations in *ERG11* gene leading to a decrease in the affinity of the FLZ for its enzyme target, 14 $\alpha$ -demethylase [2]. To date, more than 140 different missense mutations have been detected in *ERG11* gene of clinical isolates of *C. albicans*. Among them, S405F is one of the most known mutations associated to FLZ resistance and responsible to an increase of 4 (four) fold in minimal inhibition concentration (MIC) values when cloned into a *Saccharomyces cerevisiae* strain [1,4,5]. In addition, this mutation is often found associated with other mutations, as Y132H, in resistant isolates [1,4,5].

The *ERG11* gene from 32 *C. albicans* clinical isolates was amplified by PCR with previously described primers [3] and sequenced in both strands. FLZ susceptibility was evaluated

by the microdilution reference procedure of EUCAST for fermentative yeasts. As result, a total of 11 different missense mutations were identified (A61V, D116E, K128T, Y132F, E266D, S279F, L321F, S405F, V437I, R467I and V488I) among FLZ-susceptible and FLZ-resistant isolates (Table 1).

Unexpectedly, the S405F mutation generally known to be strongly associated to FLZ resistance, was found in two different FLZ-susceptible *C. albicans* isolates (isolate 29–0.25 mg/L; and isolate 30–0.5 mg/L; Table 1). These data were confirmed by a second round of susceptibility test, PCR and sequencing were performed. The isolate 29 and 30 were obtained respectively from a biopsy of esophagus and from blood of two different hospitalized patients under FLZ therapy. The S405F mutation was identified by a change from a wild cytosine (C) to a thymine (T) at the 1214 bp position according to the first ATG codon of the ORF of *ERG11* gene. This mutation was found to be homozygous in both cases and no association with other mutations was detected (Table 1). In addition, the S405F mutation was not found in any other resistant isolates.

These results suggest that S405F mutation singly might not be sufficient to lead to a resistant phenotype in *C. albicans*. However, mutations in *ERG11* gene are only one of the mechanisms that may lead to FLZ resistance and should not be taken into consideration singly. In these two cases, a compensatory mechanism might be acting, such as the downregulation of *ERG11* gene, which might cause low level MICs.

**Table 1** Site of isolation, fluconazole MIC values and missense mutations found in clinical isolates of *Candida albicans*.  
 Site de l'isolement, valeurs de MIC pour les fluconazole et mutations faux-sens trouvées dans des isolats cliniques de *Candida albicans*.

Isolate number	Site of isolation	MIC value (mg/L)	Missense mutations
01	Mouth	32	A61A/V, D116D/E, E266E/D, S279F, V437V/I
02	Oropharynx	64	R467I
03	Blood	0.12	–
04	Blood	0.25	–
05	Blood	0.25	–
06	Blood	0.25	V437V/I
07	Blood	0.25	–
08	Mouth	32	Y132F
09	Blood	0.12	–

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.04.001>  
 1156-5233/© 2014 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Autores: V. Oliveira-Carvalho, G.M.B. Del Negro



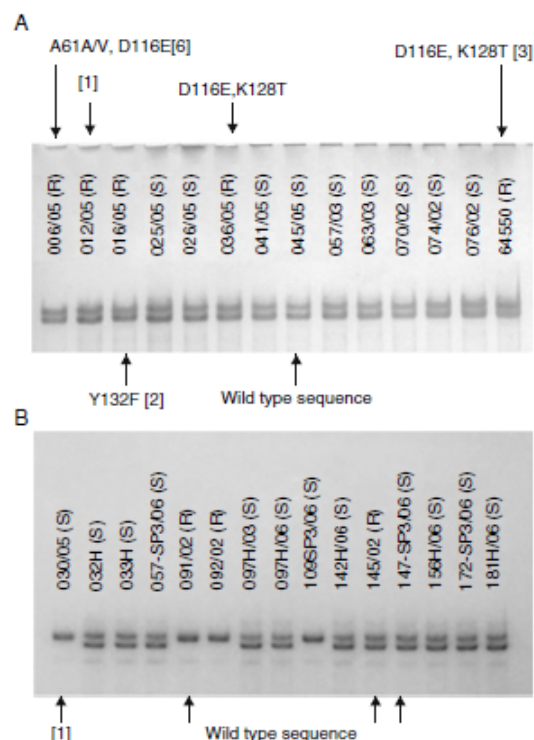
## Letter to the Editor

**SSCP is not suitable as screening technique to detect mutations in *ERG11* gene from *Candida* species****El método molecular SSCP no permite la detección de mutaciones en el gen *ERG11* de *Candida***

To date, many molecular mechanisms of fluconazole (FLZ) resistance in *Candida* species have been described and may occur simultaneously in resistant isolates.<sup>4</sup> One of the most studied mechanisms is characterized by missense mutations in *ERG11* gene, leading to a decrease in the affinity of the FLZ for its enzyme target, 14 $\alpha$ -demethylase. The identification of these mutations is based on the sequencing of the *ERG11* open reading frame (ORF) followed by computational analysis of translated codons. However, the cost of the sequencing for a large number of samples is high and expensive for many laboratories. The single-strand conformational polymorphism (SSCP) is a mutation-screening technique widely used for its simplicity and high resolution, detecting changes even at a single base level. This ability is because a single-stranded DNA folds differently from another if it differs by a single base, resulting in different mobility in electrophoresis gels.<sup>2</sup> In this light, we evaluated the usefulness of SSCP as a screening method to detect mutations in *ERG11* gene.

In this study, a total of 87 *Candida* clinical isolates (32 *Candida albicans*, 34 *Candida tropicalis*, 11 *Candida parapsilosis* complex, six *Candida glabrata* and four *Candida krusei*) were evaluated. Molecular identification and susceptibility testing were previously performed.<sup>1</sup> To improve the SSCP efficiency, we amplified the *ERG11* gene of each species in four PCR products around 400 bp using previously described primers.<sup>1</sup> These four PCR products cover together the entire ORF. Once amplified, each PCR product was denatured by 15 min at 95 °C after addition of 1:1 running buffer (formamide 98%, EDTA 10 mM, bromophenol blue 0.05% and xylene cyanol 0.05%), chilled by 5 min in ice and then loaded in SSCP gels. The electrophoresis were performed in 6% polyacrylamide gels (glycerol 5% added) under the following conditions: 45 mA at 10 °C by 5.5 h in 1 × TBE buffer (tris–borate–EDTA). Gels were fixed in ethanol 10% for 30 min and then submitted to silver staining.<sup>3</sup> The same PCR products were further purified, and both strands sequenced and compared to their respective migration patterns on SSCP gels.

Because the SSCP is able to detect mutations in a single base (point mutations), we expected the isolates with mutated sequences to show different SSCP patterns when compared to the wild sequence isolates. However, the results observed were not the expected, and we could not draw a correlation between SSCP patterns and the presence of mutations. Indeed, we observed that some PCR products with the same SSCP pattern exhibited different number of mutations or even their absence (Fig. 1). In the same way,



**Fig. 1.** (A) SSCP gel of the first ~400 bp of *ERG11* gene of *Candida albicans* clinical isolates showing different mutations (indicated by arrows) at the same electrophoresis pattern. (B) SSCP gel of the last ~400 bp of *ERG11* gene of *Candida tropicalis* clinical isolates showing different electrophoresis patterns with the same wild type sequence. Silence mutations are presented in brackets and heterozygosity by a slash.

some different SSCP patterns showed the same wild type sequence. The susceptibility data could not be either linked to SSCP patterns. In other words, susceptible and resistant isolates shared the same patterns. These results were observed in all the four PCR products from all five species, suggesting the SSCP is not a reliable screening technique to detect mutations in *ERG11* gene from *Candida* clinical isolates. On the other hand, different results might be reached when analyzing shorter PCR products (<400 bp) once the SSCP sensitivity is highly influenced by both length of the DNA amplicon as well as the GC content.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2014.10.001>

1130-1406/© 2014 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Oliveira-Carvalho V, Del Negro GMB. SSCP is not suitable as screening technique to detect mutations in *ERG11* gene from *Candida* species. Rev Iberoam Micol. 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2014.10.001>

Autores: V. Oliveira-Carvalho, G.M.B. Del Negro

# Determinants of peak $VO_2$ in heart transplant recipients

*Determinantes do pico de  $VO_2$  em transplantados cardíacos*

Vitor Oliveira Carvalho<sup>1</sup>, PhD; Guilherme Veiga Guimarães<sup>1</sup>, PhD; Marcelo Luiz Campos-Vieira<sup>1</sup>, PhD; Aparecida Maria Catai<sup>1</sup>, PhD; Vagner Oliveira-Carvalho<sup>1</sup>, MSc; Silvia Moreira Ayub-Ferreira<sup>1</sup>, PhD; Edimar Alcides Bocchi<sup>1</sup>, PhD

DOI 10.5935/1678-9741.20140055

RBCCV 44205-1608

## Abstract

**Objective:** To establish the determinants of the peak  $VO_2$  in heart transplant recipients.

**Methods:** Patient's assessment was performed in two consecutive days. In the first day, patients performed the heart rate variability assessment followed by a cardiopulmonary exercise test. In the second day, patients performed a resting echocardiography. Heart transplant recipients were eligible if they were in a stable condition and without any evidence of tissue rejection diagnosed by endomyocardial biopsy. Patients with pacemaker, noncardiovascular functional limitations such as osteoarthritis and chronic obstructive pulmonary disease were excluded from this study.

**Results:** Sixty patients (68% male, 48 years and 64 months following heart transplantation) were assessed. Multivariate analysis selected the following variables: receptor's gender ( $P=0.001$ ), receptor age ( $P=0.049$ ), receptor Body Mass Index ( $P=0.005$ ), heart rate reserve ( $P<0.0001$ ), left atrium diameter ( $P=0.016$ ). Multivariate analysis showed  $r=0.77$  and  $r^2=0.6$  with  $P<0.001$ . Equation:  $\text{peak}VO_2 = 32.851 - 3.708 (\text{receptor gender}) - 0.067 (\text{receptor age}) - 0.318 (\text{receptor BMI}) + 0.145 (\text{heart rate reserve}) - 0.111 (\text{left atrium diameter})$ .

**Conclusion:** The determinants of the peak  $VO_2$  in heart transplant recipients were: receptor sex, age, Body Mass Index, heart rate reserve and left atrium diameter. Heart rate reserve was the unique variable positively associated with peak  $VO_2$ . This data suggest the importance of the sympathetic reinnervation in peak  $VO_2$  in heart transplant recipients.

**Descriptors:** Heart Transplantation. Exercise. Exercise Tolerance.

## Resumo

**Objetivo:** Estabelecer os determinantes do  $VO_2$  pico em transplantados de coração.

**Métodos:** Avaliação do paciente foi realizada em dois dias consecutivos. No primeiro dia, os pacientes realizaram a avaliação da variabilidade da frequência cardíaca seguida de um teste de esforço cardiopulmonar. No segundo dia, os pacientes realizaram ecocardiografia de repouso. Os transplantados foram elegíveis se estivessem em uma condição estável e sem qualquer evidência de rejeição diagnosticada por biópsia endomiocárdica. Pacientes com marca-passo, limitações funcionais não cardiovasculares,

<sup>1</sup>Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (InCor HC-FMU/USP), São Paulo, Brazil.

This study was carried out at Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (InCor HC-FMU/USP), São Paulo, Brazil in association with Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos - UFScar, São Carlos, SP, Brazil and Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de Sergipe (UFS), Aracaju, SE, Brazil.

Financial support: FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo), protocol: 07137-3.

No conflict of interest.

Correspondence address:

Vitor Oliveira Carvalho  
Universidade Federal de Sergipe (UFS)  
Departamento de Fisioterapia/Hospital Universitário  
Rua Cláudio Batista, s/n - Aracaju, SE, Brazil - Zip code: 49060-000  
E-mail vitor.ufs@gmail.com

Article received on December 3<sup>rd</sup>, 2013  
Article accepted on February 24<sup>th</sup>, 2014



## Letter to the Editor

# Considerations on miR-208a Silencing in Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity

Vagner Oliveira-Carvalho and Edimar Alcides Bocchi

*Núcleo de Insuficiência Cardíaca do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (InCor HC-FMUSP), 05403-900 São Paulo, SP, Brazil*

Correspondence should be addressed to Vagner Oliveira-Carvalho; vagnercarvalho@usp.br

Received 13 July 2015; Accepted 17 September 2015

Academic Editor: Andreas Daiber

Copyright © 2015 V. Oliveira-Carvalho and E. A. Bocchi. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

In the last two decades, one family of regulatory RNAs called microRNAs (miRNAs) has fundamentally transformed our understanding of how gene networks are regulated. Currently, the study of miRNAs represents one of the most exciting areas of the modern cardiology research.

Unlike the wide range of RNAs encoded by the human genome this RNA variety has been noted for its unique ability to modulate an enormous and complex regulatory network of gene expression. To date, more than 2500 miRNAs were identified (miRBase v21) in the human genome and many of them are implicated in cardiovascular development, function, and disease [1]. Among all identified cardiovascular miRNAs, a heart-enriched miRNA called miR-208a has earned much attention not only as a critical player for the heart health and disease, but also as a potential biomarker and therapeutic target [2]. miR-208a is a member of a miRNA family that also includes miR-208b and is encoded by an intronic region of the *Myh6* gene that encodes  $\alpha$ -myosin heavy chain, the predominant heavy-chain contractile protein in the adult heart [2]. Since miR-208a is a key modulator of many heart functions, alterations in its expression levels are frequently associated with pathological cardiac dysfunctions, such as hypertrophy, fibrosis, arrhythmias, contractile dysfunction, conduction abnormalities, fibrillation, and cardiac remodeling [2]. Indeed, an overexpression of miR-208a promotes deterioration in cardiac function, as indicated by decreased fractional shortening [3]. On the other hand, the therapeutic inhibition of miR-208a leads to a reduction in cardiac remodeling and

improvement in survival and cardiac function during heart disease [4].

In this present issue, Tony and colleagues [5] reported very interesting findings regarding the potential of miR-208a silencing against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice. In brief, the authors administered 20 mg/kg of doxorubicin (DOX) as a single dose and after 7 days the mice hearts were harvested and analyzed. As a result, the authors showed a 4-fold increase in miR-208a expression and a pronounced downregulation of GATA4 in the control group. Meanwhile, the other group, pretreated with miR-208a antagomir, showed an attenuation of miR-208a expression and a restoration of GATA4 levels. On the other hand, pretreated mice showed an increase in the expression level of the antiapoptotic gene BCL-2 and a decreased apoptosis when compared with control group.

The miR-208a silencing described here is particularly interesting because DOX is the first-line drug in the treatment of many types of cancer. Despite its beneficial therapeutic effects, cardiomyopathy and heart failure are observed when DOX is chronically administered for several weeks [6]. Although several cardioprotective therapies have been proposed, cardiotoxicity remains a major concern of oncologists in cancer therapeutic practice [7–9].

Although there are some studies regarding the involvement of miRNAs in DOX-induced cardiotoxicity, to our knowledge, this was the first study to evaluate miR-208a as a therapeutic target in this issue. However, a contradictory

## Letter to the Editor

Journal of  
Applied Toxicology

Received 24 April 2015,

Revised 29 April 2015,

Accepted 29 April 2015

Published online in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jat.3185

Dear Editor,

**Circulating miR-208a fails as a biomarker of doxorubicin-induced cardiotoxicity in breast cancer patients**

Doxorubicin (DOX) is the first-line drug in the treatment of breast cancer. Despite its beneficial therapeutic effects, cardiomyopathy and heart failure are observed when DOX is chronically administered for several weeks (Octavia *et al.* 2012). Although several cardioprotective therapies have been proposed, cardiotoxicity remains a major concern of oncologists in cancer therapeutic practice (Fadillioğlu *et al.* 2003; Fadillioğlu *et al.* 2004; Alpsoy *et al.* 2013a, 2013b). Among all biomarkers of myocardial injury, cardiac troponins are the most used for its good sensitivity and integration in hospital routine. However, cardiac troponins are released in plasma only after membrane and tissue damage has occurred. Therefore, the development of new approaches to detect the cardiotoxic effects of DOX in the earlier stages is still required. Recent studies have suggested that circulating miR-208a (a heart-specific microRNA) may serve as useful earlier biomarker of heart injury and drug-induced cardiotoxicity (Oliveira-Carvalho *et al.* 2013; Liu *et al.* 2014; Xiao *et al.* 2014; Nishimura *et al.* 2015). However, the potential of miR-208a as a biomarker of DOX-induced cardiotoxicity in clinical samples was not yet been elucidated.

In brief, 59 female patients with breast cancer under the first round of chemotherapy with doxorubicin were enrolled in this study. Patients received a cumulative dose of doxorubicin (60 mg m<sup>-2</sup>; Bergamo), cyclophosphamide (600 mg m<sup>-2</sup>; Baxter) and paclitaxel (80 mg m<sup>-2</sup>; Blau) or docetaxel (75 mg m<sup>-2</sup>; Glenmark) during 3, 6, 9 and 12 weeks of treatment. Radiotherapy was indicated only after the end of the treatment; information about the surgery is not available. Cardiac troponin I (cTnI; assessed by Centaur Advia), left ventricle ejection fraction (LVEF; assessed by echocardiography) and plasmatic levels of miR-208a were measured in serial samples (0, 3, 6, 9 and 12 weeks). Patients that developed cardiotoxicity were grouped and compared with patients that did not. The study protocol was approved by the ethics committee at Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo and complies with the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from each patient.

Peripheral blood was collected in 4-ml tubes with EDTA and centrifuged at 2000 g for 15 min at 4°C. Plasma samples were transferred to 1.5-ml microtubes and stored at -70°C. Small RNAs (>200 nt) were isolated from 200 µl of plasma by a miRNeasy Plasma/Serum kit (Qiagen). Cel-miR-39 was spiked in prior RNA isolation for data normalization. Reverse transcription was performed with a TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies) using a fixed volume of 5 µl of RNA sample as an input. Circulating levels of miR-208a were measured by RT-qPCR in triplicate using TaqMan MicroRNA Assays (Life Technologies) inputting 1.33 µl of cDNA. RT-qPCR reactions were plotted in plates of 384 wells and measured in QuantStudio 12 K Flex (Life Technologies). A heart tissue sample was also included as a positive control. All reactions were performed according to the manufacturer's protocol.

As a result, seven patients (11, 86%) developed cardiotoxicity. Serum levels of cTnI were increased from 6.3 (±0.2) to 31 pg ml<sup>-1</sup> (±3.2) in the non-cardiotoxicity group whereas from 8.3 (±1.9) to

123.4 pg ml<sup>-1</sup> (±10.0) in cardiotoxicity patients. The serum levels of cTnI ≥ 40 pg ml<sup>-1</sup> (reference value) indicate myocardial injury. A decrease in the left ventricular function evaluation from 65.71 (±1.97) to 56.80 (±6.59) was also observed in cardiotoxicity patients whereas it was preserved in non-cardiotoxicity patients.

In contrast, miR-208a was not detected in any sample from both the groups even at a troponin peak at 12 weeks. The positive control (heart tissue sample) was amplified as expected. A new round of RNA isolation, reverse transcription and RT-qPCR was performed to confirm the results. miR-1 was also included as an endogenous positive control. However, miR-208a remained undetectable whereas miR-1 amplified in all samples showing the miRNA viability and absence of inhibitors.

Although previously published studies have suggested miR-208a as a heart injury biomarker (Liu *et al.* 2014; Xiao *et al.* 2014; Nishimura *et al.* 2015) these results clearly show that miR-208a was not circulating in the bloodstream of breast cancer patients with DOX-induced cardiotoxicity. In fact, these studies evaluated circulating levels of miR-208a under acute conditions. However, Nishimura *et al.* (2015) showed that after a single administration of a high DOX dose in rat the circulating level of miR-208a as well as cardiac troponins (cTnI and cTnT) did not change significantly whereas miR-1, miR-133a/b and miR-206 were increased. These results suggest that the toxic acute effect of DOX occurs apparently in skeletal muscle prior to myocardial damage.

Indeed, in a study conducted by Vacchi-Suzzi *et al.* (2012), the expression level of miR-208a in mice hearts decreases during the DOX treatment (cumulative doses) similarly with its encoding gene *Myh6*. In parallel, miR-208b and *Myh7* increase their levels indicating a myosin switch that is associated with pathological cardiac remodeling. These results support our findings and partially explain the lack of miR-208a in the bloodstream of patients with DOX-induced cardiotoxicity.

In light of these results, we believe miR-208a is not released into the bloodstream by the DOX-injured heart and, therefore, is not useful as a biomarker of DOX-induced cardiotoxicity in breast cancer patients. These results reflect the species differences in miRNA rearrangement indicating that what happens in rodents do not necessarily translate to the human clinical setting. However, the search for new target miRNAs is still required and should not be discouraged.

**Competing Interests**

The authors declare that they have no competing interests.

VAGNER OLIVEIRA-CARVALHO<sup>a\*</sup>  
LUDMILA RODRIGUES PINTO FERREIRA<sup>b</sup>  
and EDIMAR ALCIDES BOCCCHI<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Núcleo de Insuficiência Cardíaca do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (InCor HC-FMUSP), São Paulo, Brazil

<sup>b</sup>Laboratório de Imunologia do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (InCor HC-FMUSP), São Paulo, Brazil

\*Correspondence to: vagnercarvalho@usp.br



## Anexo B – Trabalhos apresentados durante período de doutoramento.

e122 *Circulation Research* December 4, 2015

## 2015 AHA Late-Breaking Basic Science Abstracts

## Late-Breaking Basic Science I

23060  
Validation Of Circulating MicroRNAs As Biomarkers In Heart Failure In Two Large Independent Cohorts

Antoni Bayes-Genis<sup>1</sup>, David Lanfear<sup>2</sup>, Maurice de Ronde<sup>3</sup>, Josep Lupón<sup>1</sup>, Joost Leenders<sup>4</sup>, Elisabet Zamora<sup>1</sup>, L. Keok Williams<sup>2</sup>, De Antonio Marta<sup>5</sup>, Zhen Liu<sup>6</sup>, Koos Zwinderman<sup>7</sup>, Sara-Joan Pinto-Sietsma<sup>8</sup>, Yigal Pinto<sup>9</sup>; <sup>1</sup>Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>2</sup>Henry Ford Hospital, Detroit, MI; <sup>3</sup>Academic Med Cntr, Univ of Amsterdam, Amsterdam, Netherlands; <sup>4</sup>Mimex BV, Amsterdam, Netherlands; <sup>5</sup>Germans Trias i Pujol Hosp, Badalona, Spain

**Background:** Small studies suggested circulating microRNAs (circmiRNAs) as biomarkers for Heart Failure (HF). However, standardized approaches and quality assessment are not established, and results have been inconsistent, with little replication between studies. We aimed to implement quality standards to enable comparison between cohorts and assess which circmiRNAs may add prognostic information in HF. **Methods:** We measured 15 circmiRNAs in two independent cohorts totaling >2000 subjects. Cohort I (Barcelona) comprised of n=843 chronic HF patients. Cohort II from Detroit comprised n= 1384 chronic HF patients (892 HFREF; 492 HFpEF). Each sample was measured in duplicate, and normalized to an abundant and stable circmiRNA (miR-486-5p). Algorithms were installed to define each circmiRNA measurement as "valid", "unmeasurable" or "invalid". This allowed inclusion of valid low-level circmiRNA measurements while reducing noise from false amplification signals. **Results:** In general, between 20–40% of measurements were "invalid", while miR-499a\_5p and -208a were "unmeasurable" in the majority of patients in both cohorts. Higher levels of circmiRNAs-133b, -1254, -622, -208a and -499a\_5p were significantly associated with risk of death in both cohorts, with hazard ratios ranging from 1.103 to 1.365 per log increase (p-values 0.001 to 0.05). However, adding these circmiRNAs to established predictors (age, renal function and NTproBNP) did not further augment the c-stat beyond 0.71 (cohort I) or 0.78 (cohort II). **Conclusion:** We developed stringent quality assessment for circmiRNA testing, and for the first time robustly validate the association of circmiRNAs 208a, -499a\_5p, -133b, -1254 and -622 with risk of death in HF patients. However, circmiRNA levels failed to incrementally improve prognostication offered by current biomarkers, possibly due to the relative high number of invalid measurements. This highlights the shortcomings of current PCR-based technology. Novel technologies under study that improve signal-noise ratios may enhance the prognostic performance of circmiRNAs.

**Author Disclosures:** A. Bayes-Genis: None. D. Lanfear: Research Grant; Significant; Janssen. M. de Ronde: None. J. Lupón: None. J. Leenders: Employment; Significant; Employed by biomarker company with IP rights related to miRNA. E. Zamora: None. L. Williams: None. D. Marta: None. Z. Liu: Employment; Significant; Employed by biomarker company with IP rights related to miRNA. K. Zwinderman: None. S. Pinto-Sietsma: None. Y. Pinto: Ownership Interest; Modest; owns shares biomarker company with IP rights related to miRNA.

**Key Words:** MicroRNA; Heart Failure; Biomarkers

23109  
Downregulation Of TNF-alpha by In Vivo CRISPR-Cas9 Genome Editing To Treat Cardiac Fibrosis in Diabetic Mice

Yangxin Li<sup>1</sup>, Bin Liu<sup>2</sup>, Bei-bei Lan<sup>1</sup>, Lian-bo Shao<sup>1</sup>, Lu-lu Zhang<sup>1</sup>, Yu Zhang<sup>1</sup>, Peng-li Xiao<sup>1</sup>, Xue-yan Jiang<sup>3</sup>, Qiu-xiong Lin<sup>4</sup>, Fan Li<sup>5</sup>, Yong-jian Geng<sup>6</sup>, Xi-yong Yu<sup>7</sup>; <sup>1</sup>Institute for Cardiovascular Science & Dept of Cardiovascular Surgery, First Affiliated Hosp of Soochow Univ, Suzhou, China; <sup>2</sup>Jilin Univ, Changchun, China; <sup>3</sup>Guangdong General Hosp, Guangzhou, China; <sup>4</sup>Ji Lin Univ, Changchun, China; <sup>5</sup>Univ of Texas Health Science Cntr, Houston, TX; <sup>6</sup>Guangdong Cardiovascular Institute and Med Resh Cntr of Guangdong General Hosp, Guangzhou Med Univ, Guangzhou, China

**Introduction:** Cardiac fibrosis is the leading cause of cardiac dysfunction in patients with diabetes. Currently, there is no effective treatment to prevent the onset of this condition. Inflammation is a hallmark of diabetes associated with heart diseases and TNF-alpha is a key factor involved in inflammation. We tested whether downregulation of TNF-alpha could prevent cardiac fibrosis in diabetic mice. **Methods and Results:** Diabetes was induced in C57BL/6 mice by injecting streptozotocin (STZ, 55 mg/kg/day) for 5 days. Citrate buffer was injected as control. One week after STZ injection, blood glucose levels significantly increased in diabetic C57BL/6 mice (336 ± 26 mg/dl) compared to control (108 ± 21 mg/dl). The increased blood glucose was accompanied by increased cardiac fibrosis (MassonTricrome), and increased TNF-alpha mRNA and protein expression in heart tissue. To assess whether genome editing using a clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas9 system can efficiently introduce loss-of-function mutation into the endogenous TNF-alpha gene in vivo, we constructed lentivirus expressing CRISPR-Cas9 and a CRISPR guide RNA targeting TNF-alpha. The lentivirus particles were transplanted

into the heart as high as >50% by surveyor assay. No off-target mutagenesis was detected in other tissues such as lung and liver. The CRISPR/Cas9 based knockdown approach resulted in decreased cardiac fibrosis (MassonTricrome), accompanied by reduced expression of TNF-alpha in heart assessed by PCR, Western blot and immunostaining. No significant change of other inflammatory cytokines including IL-6 was observed in the hearts. Furthermore, the CRISPR/Cas9 approach did not alter cell proliferation (BrdU staining) and cell survival (TUNEL assay) in heart. **Conclusion:** This study demonstrates that inflammation contributes to cardiac fibrosis via TNF-alpha signaling pathway, and suggests that diabetes related cardiac fibrosis may be prevented by downregulation of TNF-alpha via novel CRISPR-Cas9 approach.

**Author Disclosures:** Y. Li: None. B. Liu: None. B. Lan: None. L. Shao: None. L. Zhang: None. Y. Zhang: None. P. Xiao: None. X. Jiang: None. Q. Lin: None. F. Li: None. Y. Geng: None. X. Yu: None.

**Key Words:** CRISPR/Cas9; Inflammation; cardiac fibrosis; TNF-alpha

22946  
Cardiac-Specific Knock-out of the Histone Methyltransferase Smyd1 Leads to Coordinated Downregulation of Energy Metabolism

Junko Shibayama, Dane W Barton, Li Wang, Tatiana N Yuzyuk, James Cox, Alexey V Zaitsev, Sarah Franklin; Univ of Utah, Salt Lake City, UT

**Background:** Global regulatory mechanisms controlling the complex metabolic remodeling which occurs during the onset of heart failure are still poorly understood. However, recent advances have suggested a synergistic link between epigenetic regulation and cellular metabolism, although how this interplay is carried out in the heart is largely unknown. Our recent analyses of chromatin binding proteins differentially regulated during cardiac hypertrophy and failure identified the histone methyltransferase Smyd1. To determine the role of Smyd1 in the adult myocardium we generated inducible, cardiac-specific Smyd1 knockout (Smyd1-KO) mice, which exhibit cellular hypertrophy, chamber remodeling and cardiac dysfunction. In addition, bioinformatics analysis of transcripts differentially expressed in Smyd1-KO heart tissue, before heart function declined, showed that cellular metabolism was the most perturbed biological process in these animals and suggests that Smyd1 may be a key regulator of energy metabolism. **Methods and Results:** To investigate this hypothesis we carried out metabolomic and gene expression analysis of Smyd1-KO heart tissue to comprehensively characterize the abundance of energetics-related transcripts and metabolites in these animals. Interestingly, our results revealed systemic dysfunction in energy substrate metabolism characterized by downregulation of fatty acid beta-oxidation (observed as a decrease in PPAR-α, carnitine-palmitoyltransferase I, carnitine transporter OCTN2 and myocardial carnitine content [43% reduction]) and branched-chain amino acid (BCAA) oxidation (observed as a 2-fold accumulation of all BCAAs and the decreased expression of PP2Cm, an key activator of BCAA catabolism). In addition, our results identified a dramatic increase in myocardial lactate and alanine (340% and 170% respectively), concomitant with decreased expression of pyruvate dehydrogenase E1 β, indicative of glycolytic impairment. **Conclusion:** Overall, this study identifies a novel role for Smyd1 in regulating energy metabolism in the heart and provides key insights into the epigenetic mechanisms modulating metabolic disorders such as heart failure.

**Author Disclosures:** J. Shibayama: None. D.W. Barton: None. L. Wang: None. T.N. Yuzyuk: None. J. Cox: None. A.V. Zaitsev: None. S. Franklin: None.

**Key Words:** Cardiac hypertrophy/failure; Smyd1 (histone methyltransferase); Epigenetics; Cardiac energetics; Metabolomics/Transcriptomics

23147  
Circulating miR-1 And miR-133b Correlate With Subclinical Myocardial Injury In Breast Cancer Patients Under Doxorubicin Treatment

Vagner Oliveira-Carvalho, Ludmila R Ferreira, Danielle P Borges, Sílvia M Ayub-Ferreira, Mônica S Avila, Sara M Brandão, Fátima Cruz, Edécio Cunha-Neto, Edimar A Bocchi; Instituto do Coração, São Paulo, Brazil

**Introduction:** Myocardial injury is one of the major concerns when doxorubicin (DOX) is chronically administered for several weeks and may lead to cardiomyopathy and heart failure. Recently, circulating microRNAs (c-miRNAs) have been suggested as potential biomarkers of myocardial injury and drug-induced cardiotoxicity. However, the potential of c-miRNAs as biomarkers of DOX-induced cardiotoxicity in a clinical setting was not assessed. Therefore, the aim of this study is to evaluate the cardiotoxic effects of DOX on the circulating levels of miR-1, miR-133b, miR-146a, miR-208a, miR-208b and miR-423-5p in breast cancer patients. **Methods:** In brief, 59 female patients (50,02±8,64 age) received 4 cycles of chemotherapy with cumulative doses of 60 mg/m<sup>2</sup> DOX during



---

**Anexo C – Atuações como revisor durante o período de doutoramento.**

2012 – Atual	Cardiovascular Therapeutics (Oxford, UK)
2012 – Atual	Journal of Cardiothoracic Surgery (London, UK)
2013 – Atual	Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters (Amsterdam, NLD)
2013 – Atual	Brazilian Journal of Infectious Disease (Salvador, BRA)
2013 – Atual	Pharmacogenetics and Genomics (Washington, USA)
2014 – Atual	Experimental Biology and Medicine (London, UK)
2014 – Atual	Biological Trace Element Research (New Jersey, USA)
2014 – Atual	Herz (Munich, GER)
2014 – Atual	Clinics (São Paulo, BRA)
2014 – Atual	Journal of Physiology and Biochemistry (Pamplona, ESP)
2015 – Atual	Cellular Physiology and Biochemistry (Basel, SUI)
2016 – Atual	Biomarkers in Cancer (Auckland, NZL)

**Anexo D** – Número de citações e índice 'h' por indicadores de produtividade.**Indicador:** SCOPUS**Oliveira-Carvalho, Vagner**

Hospital das Clinicas da FMUSP, Sao Paulo, Brazil

Author ID: 55315619500

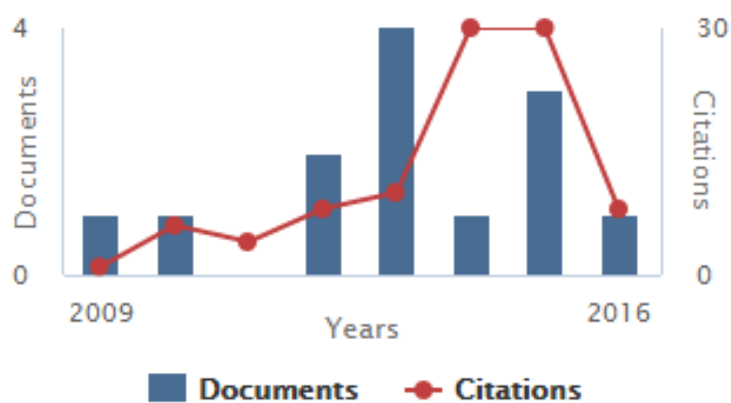
Documents: 13

Citations: 97 total citations by 90 documents

*h*-index: 6 ?

Co-authors: 20

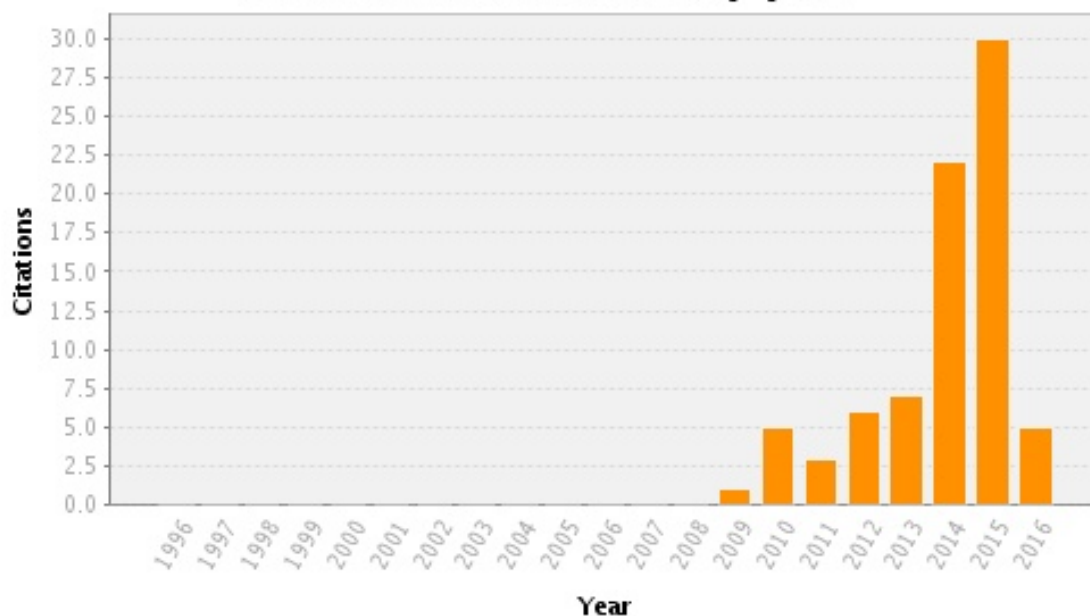
Subject area: Medicine , Biochemistry, Genetics and Molecular Biology

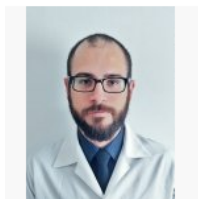


**Indicador: ISI Web of Knowledge**

<b>Oliveira-Carvalho, Vagner</b>	<a href="#">Return to Search Page</a>	<a href="#">Get A Badge</a>	<a href="#">ResearcherID Labs</a>
ResearcherID: I-4124-2013			
Other Names: Carvalho, VO			
E-mail: <a href="mailto:vagnercarvalho@usp.br">vagnercarvalho@usp.br</a>			
URL: <a href="http://www.researcherid.com/rid/I-4124-2013">http://www.researcherid.com/rid/I-4124-2013</a>			
Subject: Biochemistry & Molecular Biology; Genetics & Heredity			
ORCID: <a href="http://orcid.org/0000-0002-1194-9380">http://orcid.org/0000-0002-1194-9380</a>			
My URLs: <a href="http://lattes.cnpq.br/7775544686800920">http://lattes.cnpq.br/7775544686800920</a>			

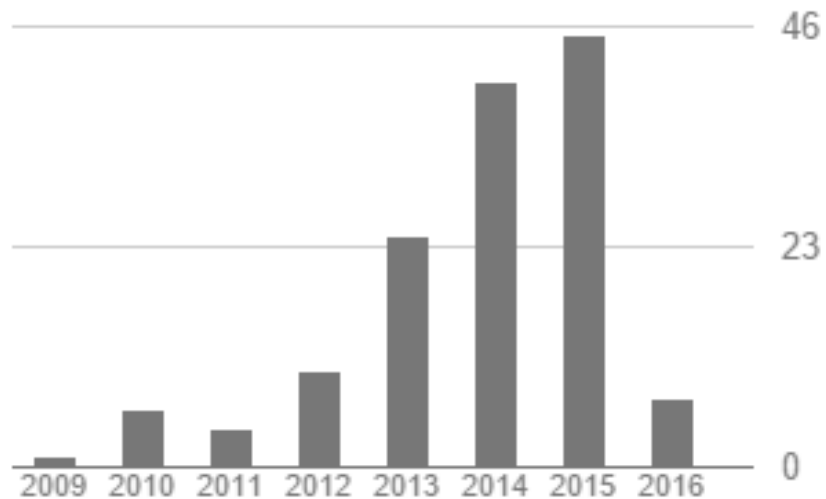
Total Articles in Publication List: **11**  
 Articles With Citation Data: **10**  
 Sum of the Times Cited: **79**  
 Average Citations per Article: **7.90**  
 h-index: **6**  
 Last Updated: **03/07/2016 15:12**  
 GMT

**Citation Distribution by year**

**Indicador:** Google Scholar**Vagner Oliveira-Carvalho**[Seguir](#)

PhD cand. Faculdade de Medicina da [Universidade de São Paulo](#)  
[Molecular Genetics](#)  
E-mail confirmado em [usp.br](#) - [Página inicial](#)

<b>Índices de citações</b>	<b>Todos</b>	<b>Desde 2011</b>
Citações	144	134
Índice h	7	7
Índice i10	7	7

**Citações por ano**

## **10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- [1] Bocchi EA, Guimarães G, Tarasoutshi F, Spina G, Mangini S, Bacal F. Cardiomyopathy, adult valve disease and heart failure in South America. *Heart*. 2009;95:181-189.
- [2] Jemal A, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun M. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2009; 59(4):225-249.
- [3] Lloyd-Jones D, Adams R, Carnethon M, De Simone G, Ferguson TB, Flegal K, Ford E, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern S, Ho M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lackland D, Lisabeth L, Marelli A, McDermott M, Meigs J, Mozaffarian D, Nichol G, O'Donnell C, Roger V, Rosamond W, Sacco R, Sorlie P, Stafford R, Steinberger J, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Wong N, Wylie-Rosett J, Hong Y. Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 2009;119(3):480-486.
- [4] Cardinale D, Colombo A., Cipolla C. Prevention and treatment of cardiomyopathy and heart failure in patients receiving cancer chemotherapy. *Curr Treat Options Cardiovasc Me*. 2008;10(6):486-495.
- [5] Felker GM, Thompson RE, Hare JM, Hruban RH, Clemetson DE, Howard DL, Baughman KL, Kasper EK. Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2000;342(15):1077-84.
- [6] Rhoden W, Hasleton P, Brooks N. Anthracyclines and the heart. *Br Heart J*. 1993;70(6):499-502.
- [7] Perez EA, Suman VJ, Davidson NE, Kaufman PA, Martino S, Dakhil SR, Ingle JN, Rodeheffer RJ, Gersh BJ, Jaffe AS. Effect of doxorubicin plus cyclophosphamide on left ventricular ejection fraction in patients with breast cancer in the North Central Cancer Treatment Group N9831 Intergroup Adjuvant Trial. *J Clin Oncol*. 2004;22(18):3700-4.
- [8] Wouters KA, Kremer LC, Miller TL, Herman EH, Lipshultz SE. Protecting against anthracycline-induced myocardial damage: a review of the most promising strategies. *Br J Haematol*. 2005;131(5):561-78.

- [9] Ng R, Better N, Green MD. Anticancer agents and cardiotoxicity. *Semin Oncol.* 2006;33(1):2-14.
- [10] Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2000;21(18):1502-13.
- [11] Cardinale D, Sandri MT, Colombo A, Colombo N, Boeri M, Lamantia G, Civelli M, Peccatori F, Martinelli G, Fiorentini C, Cipolla CM. Prognostic value of troponin I in cardiac risk stratification of cancer patients undergoing high-dose chemotherapy. *Circulation.* 2004;109(22):2749-54.
- [12] O'Brien PJ. Cardiac troponin is the most effective translational safety biomarker for myocardial injury in cardiotoxicity. *Toxicology.* 2008;245(3):206-18.
- [13] Singal PK, Iliskovic N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 1998;339(13):900-5.
- [14] Oliveira-Carvalho V, Carvalho VO, Bocchi EA. The emerging role of miR-208a in the heart. *DNA Cell Biol.* 2013;32(1):8-12.
- [15] Prasanth KV, Spector DL. Eukaryotic regulatory RNAs: an answer to the 'genome complexity' conundrum. *Genes Dev.* 2007;21(1):11-42.
- [16] Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science.* 2001;294(5543):862-4.
- [17] Erdmann VA, Szymanski M, Hochberg A, Groot N, Barciszewski J. Non-coding, mRNA-like RNAs database Y2K. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(1):197-200.
- [18] Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* 2004;14(10A):1902-10.
- [19] Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(5):376-85.
- [20] Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004;23(20):4051-60.
- [21] Shruti K, Shrey K, Vibha R. Micro RNAs: tiny sequences with enormous

- potential. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;407(3):445-9.
- [22] Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 2003;425(6956):415-9.
- [23] Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*. 2004;432(7014):231-5.
- [24] Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*. 2004;303(5654):95-8.
- [25] Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 2003;17(24):3011-6.
- [26] Hutvágner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*. 2001;293(5531):834-8.
- [27] Lund E, Dahlberg JE. Substrate selectivity of exportin 5 and Dicer in the biogenesis of microRNAs. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2006;71:59-66.
- [28] Schwarz DS, Hutvágner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 2003;115(2):199-208.
- [29] Krol J, Sobczak K, Wilczynska U, Drath M, Jasinska A, Kaczynska D, Krzyzosiak WJ. Structural features of microRNA (miRNA) precursors and their relevance to miRNA biogenesis and small interfering RNA/short hairpin RNA design. *J Biol Chem*. 2004;279(40):42230-9.
- [30] Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*. 2003;115(2):209-16.
- [31] Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev*. 2006;20(5):515-24.
- [32] Miranda KC, Huynh T, Tay Y, Ang YS, Tam WL, Thomson AM, Lim B, Rigoutsos I. A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell*. 2006;126(6):1203-17.
- [33] Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase:



- microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 2006;34:D140-4.
- [34] Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, Dreyfuss G, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M, Matzke M, Ruvkun G, Tuschl T. A uniform system for microRNA annotation. *RNA.* 2003;9(3):277-9.
- [35] Callis TE, Pandya K, Seok HY, Tang RH, Tatsuguchi M, Huang ZP, Chen JF, Deng Z, Gunn B, Shumate J, Willis MS, Selzman CH, Wang DZ. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *J Clin Invest.* 2009;119(9):2772-86.
- [36] van Rooij E, Quiat D, Johnson BA, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Kelm RJ Jr, Olson EN. A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. *Dev Cell.* 2009;17(5):662-73.
- [37] Satoh M, Minami Y, Takahashi Y, Tabuchi T, Nakamura M. Expression of microRNA-208 is associated with adverse clinical outcomes in human dilated cardiomyopathy. *J Card Fail.* 2010;16(5):404-10.
- [38] Stelzer JE, Brickson SL, Locher MR, Moss RL. Role of myosin heavy chain composition in the stretch activation response of rat myocardium. *J Physiol.* 2007;579:161-73.
- [39] van Rooij E, Olson EN. MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *J Clin Invest.* 2007;117(9):2369-76.
- [40] Beuvink I, Kolb FA, Budach W, Garnier A, Lange J, Natt F, Dengler U, Hall J, Filipowicz W, Weiler J. A novel microarray approach reveals new tissue-specific signatures of known and predicted mammalian microRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(7):e52.
- [41] Zhu H, Fan GC. Extracellular/circulating microRNAs and their potential role in cardiovascular disease. *Am J Cardiovasc Dis.* 2011;1(2):138-149.
- [42] Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, Xiao T, Schafer J, Lee ML, Schmittgen TD, Nana-Sinkam SP, Jarjoura D, Marsh CB. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One.* 2008;3(11):e3694.

- [43] Ji X, Takahashi R, Hiura Y, Hirokawa G, Fukushima Y, Iwai N. Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury. *Clin Chem*. 2009;55(11):1944-9.
- [44] Wang G, Zhu J, Zhang J, Li Q, Li Y, He J, Qin Y, Jing Q. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J*. 2010;31(6):659-66.
- [45] Gidlöf O, Andersson P, van der Pals J, Götberg M, Erlinge D. Cardiospecific microRNA plasma levels correlate with troponin and cardiac function in patients with ST elevation myocardial infarction, are selectively dependent on renal elimination, and can be detected in urine samples. *Cardiology*. 2011;118(4):217-26.
- [46] Corsten MF, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, Wagner DR, Staessen JA, Heymans S, Schroen B. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010;3(6):499-506.
- [47] Devaux Y, Vausort M, Goretti E, Nazarov PV, Azuaje F, Gilson G, Corsten MF, Schroen B, Lair ML, Heymans S, Wagner DR. Use of circulating microRNAs to diagnose acute myocardial infarction. *Clin Chem*. 2012;58(3):559-67.
- [48] Kuwabara Y, Ono K, Horie T, Nishi H, Nagao K, Kinoshita M, Watanabe S, Baba O, Kojima Y, Shizuta S, Imai M, Tamura T, Kita T, Kimura. Increased microRNA-1 and microRNA-133a levels in serum of patients with cardiovascular disease indicate myocardial damage. *Circ Cardiovasc Genet*. 2011;4(4):446-54.
- [49] Wu AH, Feng YJ. Biochemical differences between cTnT and cTnI and their significance for diagnosis of acute coronary syndromes. *Eur Heart J*. 1998;19:N25-9.
- [50] Abbas NA, John RI, Webb MC, Kempson ME, Potter AN, Price CP, Vickery S, Lamb EJ. Cardiac troponins and renal function in nondialysis patients with chronic kidney disease. *Clin Chem*. 2005;51(11):2059-66.
- [51] Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods*. 2010;50(4):298-301.
- [52] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T)

- method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101-8.
- [53] Roberts TC, Coenen-Stass AM, Wood MJ. Assessment of RT-qPCR normalization strategies for accurate quantification of extracellular microRNAs in murine serum. *PLoS One.* 2014;9(2):e89237.
- [54] Cardinale D, Colombo A, Bacchiani G, Tedeschi I, Meroni C, Veglia F, Civelli M, Lamantia G, Colombo N, Curigliano G, Fiorentini C, Cipolla C. Early detection of anthracycline cardiotoxicity and improvement with heart failure therapy. *Circulation.* 2015;131(22):1981-8.
- [55] Oliveira-Carvalho V, da Silva M, Guimarães G, Bacal F, Bocchi EA. MicroRNAs: new players in heart failure. *Mol Biol Rep.* 2013;40(3):2663-2670.
- [56] Desai V, Kwekel J, Vijay V, Moland C, Herman E, Lee T, Han T, Lewis S, Davis K, Muskhelishvili L, Kerr S, Fuscoe J. Early biomarkers of doxorubicin-induced heart injury in a mouse model. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014;281(2):221-229.
- [57] Nishimura Y, Kondo C, Morikawa Y, Tonomura Y, Torii M, Yamate J, Uehara T. Plasma miR-208 as a useful biomarker for drug-induced cardiotoxicity in rats. *J Appl Toxicol.* 2015;35(2):173-180.
- [58] Vacchi-Suzzi C, Bauer Y, Berridge B, Bongiovanni S, Gerrish K, Hamadeh H, Letzkus M, Lyon J, Moggs J, Paules R, Pognan F, Staedtler F, Vidgeon-Hart M, Grenet O, Couttet P. Perturbation of microRNAs in rat heart during chronic doxorubicin treatment. *PLoS One.* 2012;7(7):e40395.
- [59] Horie T, Ono K, Nishi H, Nagao K, Kinoshita M, Watanabe S, Kuwabara Y, Nakashima Y, Takanabe-Mori R, Nishi E, Hasegawa K, Kita T, Kimura T. Acute doxorubicin cardiotoxicity is associated with miR-146a-induced inhibition of the neuregulin-ErbB pathway. *Cardiovasc Res.* 2010;87(4):656-64.
- [60] Goren Y, Kushnir M, Zafrir B, Tabak S, Lewis B, Amir O. Serum levels of microRNAs in patients with heart failure. *Eur J Heart Fail.* 2012;14(2):147-54.
- [61] Thomé J, Mendoza M, Cheuiche A, La Porta V, Silvello D, Dos Santos K, Andrades M, Clausell N, Rohde L, Biolo A. Circulating microRNAs in obese and lean heart failure patients: A case-control study with computational target prediction analysis. *Gene.* 2015;574(1):1-10.

- [62] Tijssen A, Creemers E, Moerland P, de Windt L, van der Wal A, Kok W, Pinto Y. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. *Circ Res*. 2010;106(6):1035-9.
- [63] Thum T, Galuppo P, Wolf C, Fiedler J, Kneitz S, van Laake L, Doevendans P, Mummery C, Borlak J, Haverich A, Gross C, Engelhardt S, Ertl G, Bauersachs J. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation*. 2007;116:258–267.
- [64] Oliveira-Carvalho V, Carvalho VO, Silva MM, Guimarães GV, Bocchi EA. MicroRNAs: a new paradigm in the treatment and diagnosis of heart failure?. *Arq Bras Cardiol*. 2012;98(4):362-9.
- [65] Luo P, He T, Jiang R, Li G. MicroRNA-423-5p targets O-GlcNAc transferase to induce apoptosis in cardiomyocytes. *Mol Med Rep*. 2015;12(1):1163-8.
- [66] Oliveira-Carvalho V, Ferreira L, Bocchi E. Circulating miR-208a fails as a biomarker of doxorubicin-induced cardiotoxicity in breast cancer patients. *J Appl Toxicol*. 2015;35(9):1071-2.
- [67] Xiao J, Shen B, Li J, Lv D, Zhao Y, Wang F, Xu J. Serum microRNA-499 and microRNA-208a as biomarkers of acute myocardial infarction. *Int J Clin Exp Med*. 2014;7(1):136-41.
- [68] Liu L, Aguirre S, Eving W, Hirakawa B, May J, Palacio K, Wang J, Zhang Y, Stevens G. miR-208a as a biomarker of isoproterenol-induced cardiac injury in Sod2<sup>+/-</sup> and C57BL/6J wild-type mice. *Toxicol Pathol*. 2014;42(7):1117-29.
- [69] Gulati G, Heck S, Ree A, Hoffmann P, Schulz-Menger J, Fagerland M, Gravdehaug B, von Knobelsdorff-Brenkenhoff F, Bratland A, Storås T, Hagve T, Røsjø H, Steine K, Geisler J, Omland T. Prevention of cardiac dysfunction during adjuvant breast cancer therapy (PRADA): a 2 × 2 factorial, randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial of candesartan and metoprolol. *Eur Heart J*. 2016; (In Press) pii: ehw022.
- [70] Ai J, Zhang R, Li Y, Pu J, Lu Y, Jiao J, Li K, Yu B, Li Z, Wang R, Wang L, Li Q, Wang N, Shan H, Li Z, Yang B. Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;391(1):73-7.

- [71] Zhou Z, Mao A, Wang X, Duan X, Yao Y, Zhang C. Urine and serum microRNA-1 as novel biomarkers for myocardial injury in open-heart surgeries with cardiopulmonary bypass. *PLoS One*. 2013;8(4):e62245.
- [72] Wang E, Nie Y, Zhao Q, Wang W, Huang J, Liao Z, Zhang H, Hu S, Zheng Z. Circulating miRNAs reflect early myocardial injury and recovery after heart transplantation. *J Cardiothorac Surg*. 2013;8:165.
- [73] Octavia Y, Tocchetti C, Gabrielson K, Janssens S, Crijns H, Moens A. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;42(6):1213-1225.
- [74] Lee S, Lim S, Ham O, Lee S, Lee C, Park J, Lee J, Seo H, Yun I, Han S, Cha M, Choi E, Hwang K. ROS-mediated bidirectional regulation of miRNA results in distinct pathologic heart conditions. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;465(3):349-55.
- [75] Wang L, Yuan Y, Li J, Ren H, Cai Q, Chen X, Liang H, Shan H, Fu Z, Gao X, Lv Y, Yang B, Zhang Y. MicroRNA-1 aggravates cardiac oxidative stress by post-transcriptional modification of the antioxidant network. *Cell Stress Chaperones*. 2010;20(3):411-20.
- [76] Shan Z, Lin Q, Deng C, Zhu J, Mai L, Liu J, Fu Y, Liu X, Li Y, Zhang Y, Lin S, Yu X. miR-1/miR-206 regulate Hsp60 expression contributing to glucose-mediated apoptosis in cardiomyocytes. *FEBS Lett*. 2010;584:3592e3600.
- [77] Tang Y, Zheng J, Sun Y, Wu Z, Liu Z, Huang G. MicroRNA-1 regulates cardiomyocyte apoptosis by targeting Bcl-2. *Int. Heart J*. 2009;50:377e387.
- [78] Yu X, Song Y, Geng Y, Lin Q, Shan Z, Lin S, Li Y. Glucose induces apoptosis of cardiomyocytes via microRNA-1 and IGF-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;376(3):548-552.
- [79] Montgomery R, Hullinger T, Semus H, Dickinson B, Seto A, Lynch J, Stack C, Latimer P, Olson E, van Rooij E. Therapeutic Inhibition of miR-208a Improves Cardiac Function and Survival During Heart Failure. *Circulation*. 2011;124(14):1537-47.
- [80] Wahlquist C, Jeong D, Rojas-Muñoz A, Kho C, Lee A, Mitsuyama S, van Mil A, Park W, Sluijter J, Doevendans P, Hajjar R, Mercola M. Inhibition of miR-25 improves cardiac contractility in the failing heart. *Nature*. 2014;508(7497):531-

5.

[81] Lovren F, Pan Y, Quan A, Singh K, Shukla P, Gupta N, Steer B, Ingram A, Gupta M, Al-Omran M, Teoh H, Marsden P, Verma S. MicroRNA-145 targeted therapy reduces atherosclerosis. *Circulation*. 2012;126(11):S81-90.