

## **EXPRESSÃO DE MICRORNA NA FIBRILHAÇÃO AURICULAR: CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO E AVALIAÇÃO DA REPERCUSSÃO FISIOPATOLÓGICA**

---

Cortez-Dias, Nuno<sup>1</sup>; Costa, Marina<sup>2</sup>; Carvalho, Rita<sup>2</sup>; Magalhães, Andreia<sup>1</sup>; Lima da Silva, Gustavo<sup>1</sup>; Calisto, Carina<sup>3</sup>; Galego, Xavier<sup>4</sup>; Arruda Pereira, Ricardo<sup>4</sup>; Carpinteiro, Luís<sup>1</sup>; Sousa, João<sup>1</sup>; Nobre, Ângelo<sup>4</sup>; Pinto, Fausto J.<sup>1</sup>; Enguita, Francisco J.<sup>2</sup>

1. Serviço de Cardiologia, Hospital de Santa Maria, Centro Hospitalar de Lisboa Norte
2. Unidade de Biologia Celular, Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina de Lisboa
3. Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Santa Maria, Centro Hospitalar de Lisboa Norte
4. Serviço de Cirurgia Cardiorácica, Hospital de Santa Maria, Centro Hospitalar de Lisboa Norte

A Fibrilhação Auricular (FA) é a arritmia cardíaca mantida mais comum, tendo grande impacto na saúde pública. A FA condiciona elevada morbi-mortalidade, com aumento em cinco vezes do risco de acidente vascular cerebral, em três vezes de insuficiência cardíaca, além de acréscimo do risco de eventos hemorrágicos (associados à terapêutica anticoagulante), do risco de demência vascular e do encurtamento da esperança de vida.

A fisiopatologia da FA é simultaneamente heterogénea e complexa, decorrendo de uma multiplicidade de mecanismos fisiopatológicos que, não estando totalmente esclarecidos, se sabe estarem implicados na alteração da formação e propagação dos impulsos eléctricos, aliados a alterações das propriedades eléctricas e estruturais da aurícula desencadeadas pela própria activação auricular de elevada frequência. A disrupção da homeostasia do  $\text{Ca}^{2+}$ , com aumento da sua concentração citosólica, assume um papel central na fisiopatologia da remodelagem eléctrica e decorre de (1) alterações na função dos canais  $\text{Ca}^{2+}$  da membrana sarcoplasmática, determinadas por mutações, hiperfosforilações e modulações anómalas das suas proteínas acessórias (juntofilina, triadina, calsequestrina e juntinha), facilitam a saída de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático; (2) activação da calmodulina cinase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  que, para além de potenciar a saída de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático, permite a activação de genes envolvidos na hipertrofia e regulação dos fluxos iónicos transmembranares, (3) sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro do retículo sarcoplasmático, mediada pela desinibição da  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase por hiperfosforilação do fosfolambano e diminuição da sarcolipina, e (4) alterações na função ou expressão do canal de troca de sódio.

Os microRNAs (miRNAs) são moléculas de RNA não codificante de pequenas dimensões ( $\approx 22$  nucleótidos) com elevada conservação filogenética. Estão presentes dentro das células em grande quantidade, com perfis de transcrição que variam em função do tipo celular, e numa dada célula ao longo do tempo em função da sua actividade biológica. Desempenham funções de regulação pós-transcricional da expressão génica, através da diminuição da expressão de mRNAs alvo. A regulação pós-transcricional mediada pelos miRNAs depende da sua ligação a uma sequência complementar,

geralmente na terminação 3'UTR do mRNA alvo. É o grau de complementaridade entre o miRNA e o mRNA, nomeadamente na porção entre o 2º e o 8º nucleótidos - *seed region* - que determina o tipo de mecanismo de regulação pós-transcricional. Se a complementaridade for total, ocorre degradação do mRNA e por conseguinte supressão da sua tradução; se a complementaridade for apenas parcial, ocorre inibição da iniciação da tradução com redução da expressão dos genes correspondentes. Embora a potência da inibição induzida por cada miRNA seja reduzida, o seu efeito global é significativo já que a acção dos miRNAs se caracteriza pela sua pleiotropia e redundância. Tal significa que cada miRNA poderá ter vários mRNA alvos, induzindo supressão a diferentes níveis de uma mesma via metabólica ou interferindo em diferentes vias metabólicas em simultâneo. Além disso, um mRNA poderá ser simultaneamente alvo de vários miRNAs que, actuando em conjunto, potenciarão o efeito inibitório da sua tradução. Estabelecem-se assim vias complexas e intrincadas de regulação pós-transcricional, que contribuirão para a regulação “fina” da quantidade da proteína alvo sintetizada.

Vários estudos recentes têm sugerido a implicação da desregulação dos miRNAs na fisiopatologia de doenças cardiovasculares como a insuficiência cardíaca ou a doença coronária. No que respeita ao envolvimento dos miRNAs na fisiopatologia da FA, os conhecimentos são ainda rudimentares.

O presente estudo teve como objectivo investigar a participação dos miRNAs na fisiopatologia da FA através da comparação do padrão global de expressão de miRNA em função do ritmo cardíaco e do volume auricular esquerdo (vAE). Tratou-se de um estudo observacional de doentes com valvulopatia mitral requerendo tratamento cirúrgico. O miRNoma foi caracterizado nas amostras de tecido auricular esquerdo por sequenciação directa usando técnica de deep sequencing e foi comparado em função do ritmo cardíaco e vAE por testes não paramétricos e de correlação linear. Efectuou-se a predição bioinformática dos genes-alvo (*miRWalk*) e os seus efeitos biológicos potenciais foram analisados no que respeita à fisiologia miocárdica e à sua implicação noutras doenças com reconhecidas perturbações dos fluxos iónicos transmembranares (*Ontology Analysis*).

Foram avaliados 18 doentes, dos quais cinco com FA permanente, cinco com FA paroxística e dez sem história de disritmia auricular. A idade mediana dos doentes foi de 68 anos [Distribuição Inter-Quartil (DIQ): 58-75] e 50% eram do sexo feminino (N=9). As características demográficas, clínicas e ecocardiográficas da população são detalhadas na Tabela 1.

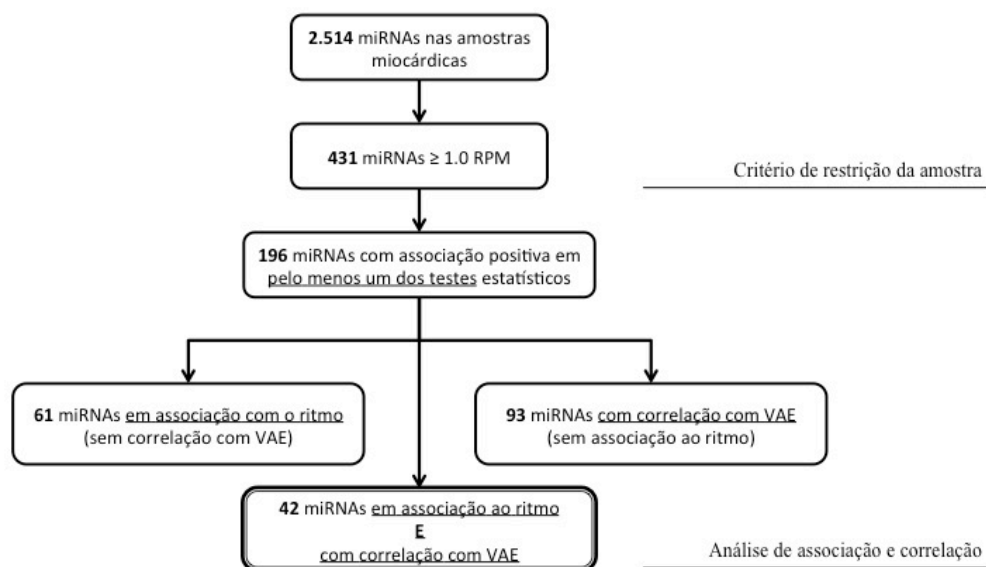
**Tabela 1. Caracterização da amostra.**

	<b>FA Permanente</b> (N=5) <sup>±</sup>	<b>FA Paroxística</b> (N=5) <sup>±</sup>	<b>Ritmo Sinusal</b> (N=8) <sup>±</sup>
<b>Características demográficas</b>			
Sexo masculino	3 (60%)	2 (40%)	4 (50%)
Idade, anos, mediana (DIQ)	75 (65-76)	73 (67-75)	61 (49-70)
<b>Fatores de risco cardiovasculares</b>			
Hipertensão	3 (75%)	3 (60%)	5 (63%)
Diabetes	0	0	1 (14%)
Dislipidémia	3 (75%)	2 (40%)	5 (71%)
<b>Doenças valvulares<sup>§</sup>:</b>			
Regurgitação aórtica*	0	0	3 (38%)
Regurgitação mitral	4 (80%)	5 (100%)	6 (75%)
Estenose mitral	2 (40%)	1 (20%)	2 (25%)
Regurgitação tricúspide*	3 (60%)	0	1 (13%)
<b>Dimensões cardíacas</b>			
Volume AE, mL, mediana (DIQ)	228 (132-276)	139 (134-152)	92 (80-101)
Volume AD, mL, mediana (DIQ)	63 (57-97)	44 (36-48)	38 (29-44)
Volume VE, mL, mediana (DIQ)	100 (71-130)	103 (93-104)	98 (79-138)

§ Consideradas apenas as disfunções valvulares de gravidade pelo menos moderada. \* Todos os doentes apresentavam doença mitral (regurgitação e/ou estenose), sendo a regurgitação aórtica ou tricúspide valvulopatias coexistentes

AE – Aurícula Esquerda, AD – Aurícula Direita, VE – Ventrículo Esquerdo.

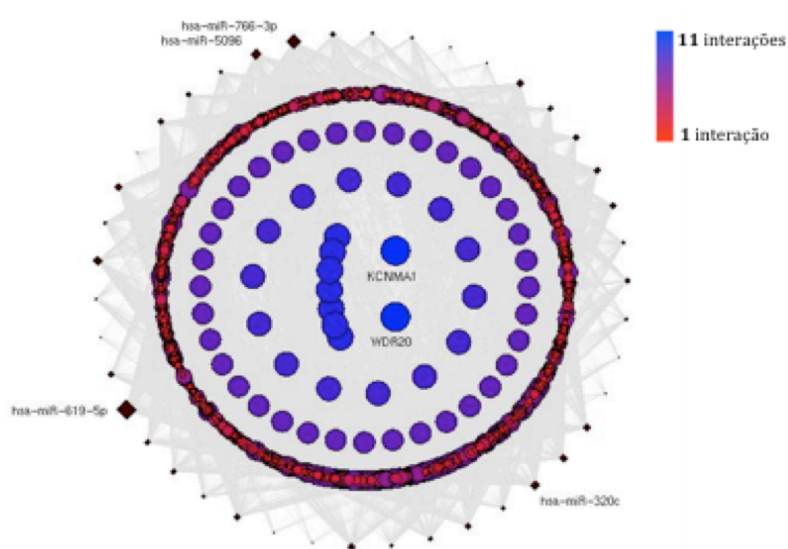
Por sequenciação directa dos fragmentos de RNA de pequena dimensão, foram identificados e quantificados os miRNAs presentes nas amostras de miocárdio auricular. 431 miRNAs apresentaram nível médio de expressão igual ou superior a 1,0 RPM, tendo os mesmos constituído o objecto de estudo para as análises seguintes. Destes, 196 miRNAs exibiram associação ao ritmo cardíaco e/ou ao vAE. Cerca de 61 miRNAs exibiram associação apenas ao ritmo cardíaco (diferença estatisticamente significativa em pelo menos uma das comparações) e 93 miRNAs apresentaram correlação apenas com o vAE - Figura 1. Seleccionaram-se 42 miRNAs de interesse, com expressão diferencial associada à FA, por exibirem variação da sua expressão com o ritmo cardíaco e, simultaneamente, apresentarem correlação com o vAE. Dos 42 miRNAs diferencialmente expressos, seis apresentavam-se *down-regulated* (miR-135a-5p, miR-152-3p, miR-26a-5p, miR-28-5p, miR-301a-5p, miR-454-3p) nas amostras de miocárdio auricular esquerdo dos doentes com FA, encontrando-se os restantes 36 miRNAs *up-regulated*, comparativamente às amostras dos doentes em ritmo sinusal.



**Figura 1. Análise da associação do padrão de expressão de miRNAs relativamente ao ritmo cardíaco e volume auricular esquerdo (VAE).**

A potência do efeito regulatório de cada miRNA sobre a expressão de um dado gene é previsivelmente reduzida. Por isso, para que seja atingido um efeito biologicamente relevante, é expectável a acção conjugada de múltiplos miRNAs sobre esse gene. Desta forma, a redundância das interações dos miRNAs com os genes-alvo previstos pode ser utilizada como um parâmetro da sua relevância: quanto maior for o número de miRNAs diferencialmente expressos que tenham como alvo um determinado gene, mais relevante será o efeito biológico esperado nesse alvo previsto. Tendo por base a predição bioinformática (*miRWalk 2.0*), foram previstos 13.542 genes-alvo para os 42 miRNA diferencialmente expressos em contexto de FA, num total de 29.641 interações (Figura 2). Detectou-se significativa redundância de actuação dos miRNA, na medida em que diversos genes-alvo seriam passíveis de modulação simultânea por vários dos 42 miRNAs diferencialmente expressos.

Destacou-se um grupo de 23 genes que são alvos previstos de pelo menos nove miRNAs. Tal sugere que possam estar sujeitos a intensa regulação pós-transcricional e que, neste contexto, poderão estar envolvidos na fisiopatologia da FA. Entre estes 23 genes, destacam-se seis genes-alvo cujas funções biológicas conhecidas são facilmente relacionáveis com os fenómenos de remodelagem eléctrica ou estrutural associados à progressão da arritmia (Tabela 2).



**Figura 2. Diagrama de interações entre os miRNAs diferencialmente expressos e os genes-alvo previstos (NAVIGATOR 2.3).** Os losângulos à periferia representam os 42 miRNAs e as bolas representam os seus 13.542 genes-alvo potenciais, distribuídos em círculos concêntricos de acordo com o número de miRNA de que presumivelmente serão alvos: o círculo mais periférico corresponde a genes-alvo de 1 a 7 dos miRNA analisados; o seguinte aos genes-alvo de 8 miRNAs; o mais interno corresponde aos genes-alvo de 9 miRNA; o pequeno arco central e as duas bolas maiores à sua direita correspondem aos genes-alvo de 10 e 11 dos miRNA estudados, respectivamente.

**Tabela 2. Genes de interesse presumivelmente alvos de pelo menos 9 dos 42 miRNAs em estudo**

Símbolo	Nome	Função	Grau <sup>‡</sup>	Up <sup>§</sup>	Down <sup>†</sup>
<b>KCNMA1</b>	Canal de grande condutância de K <sup>+</sup> activado pelo Ca <sup>2+</sup> (BK) 1	Permite o influxo de K <sup>+</sup> após potencial de acção ou aumento de concentração intracelular de Ca <sup>2+</sup>	11	8	3
<b>TAB1</b>	Cinase activadora de TGFβ 1/ Proteína de ligação a MAP3K7 1	Reguladora da MAPKp38 e da MAP3K7, que medeia várias cascatas de sinalização intracelular, nomeadamente induzidas pelo TGFβ	10	9	1
<b>PPM1B</b>	Fosfatase de Proteínas dependente de Mg <sup>2+</sup> /Mn <sup>2+</sup> 1B	Reguladora negativa de vias de resposta ao <i>stress</i> – TNFα/NFκB	10	8	2
<b>ARSB</b>	Arissulfatase B	Degradação de glicosaminoglicanos nos lisossomas	10	10	0
<b>TCF21</b>	Factor de transcrição 21	Associado a vias de cardiomorfogénese e de transdução de sinal MAPK	9	8	1
<b>ASPH</b>	Beta-hidroxilase de aspartato	Proteína juncional do retículo sarcoplasmático, envolvida na homeostasia do Ca <sup>2+</sup> intracelular.	9	7	2

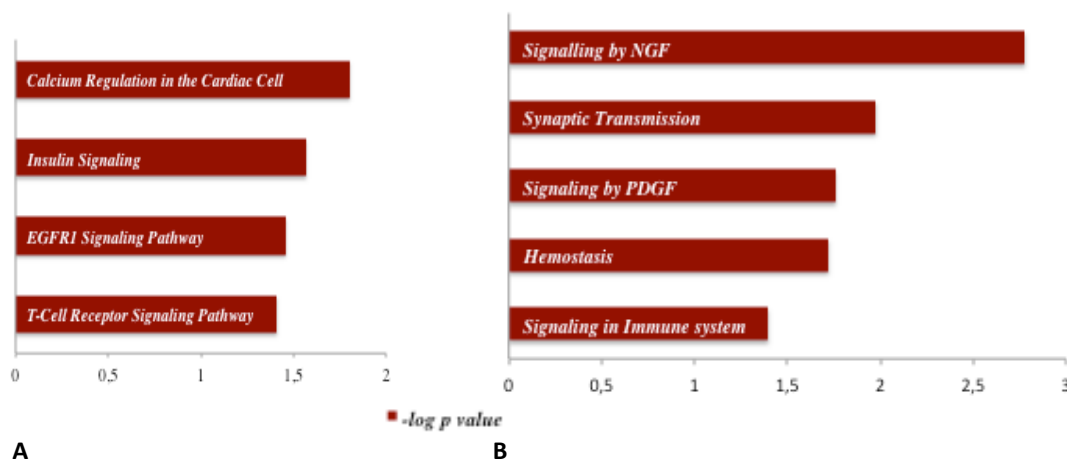
<sup>‡</sup> Número de miRNAs (dos 42 em estudo) de que o gene é presumivelmente alvo.

<sup>§</sup> Quantidade de miRNAs *up-regulated*, do total daqueles que interagem presumivelmente com o gene.

<sup>†</sup> Quantidade de miRNAs *down-regulated*, do total daqueles que interagem presumivelmente com o gene.

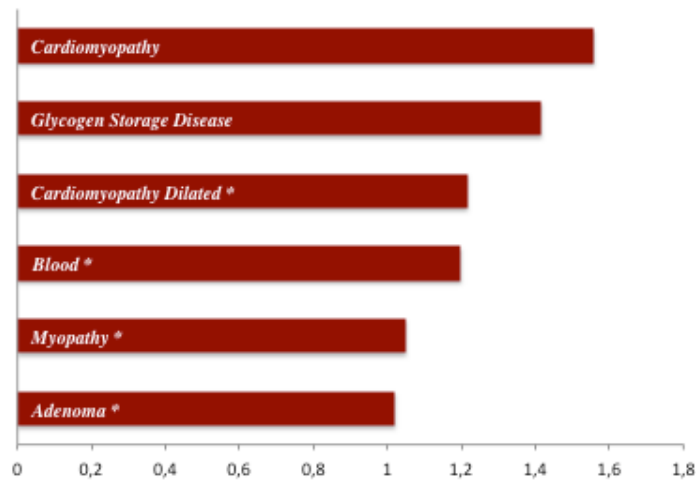
MAP3K7 - *Mitogen-activated protein kinase 7*, MAPKp38 - *Mitogen-activated protein kinase p38*, TGFβ - *Tumor Growth Factor β*, TNFα/NFκB - *Tumor Necrosis Factor α/Nuclear Factor-κappa B*, MAPK - *Mitogen-activated protein kinase*

Procedeu-se à previsão dos efeitos biológicos principais dos genes que tenham constituído alvos previstos de pelo menos dois dos 42 miRNAs diferencialmente expressos no contexto de FA mediante análise de ontologia genética referente às categorias vias metabólicas, processos biológicos e funções moleculares. Do total de 13.542 genes-alvo, 8.092 foram identificados como alvos previstos de pelo menos dois miRNAs diferencialmente expressos no contexto de FA. A análise de ontologia genética revelou que a maioria dos genes-alvo previstos está implicada em funções de organização e programação celular – Figura 3. Além disso, são também as funções de organização e programação celular que predominaram entre os genes sujeitos a maior número de interações com os miRNAs. Os genes-alvo previstos exibiram também intensa relação com a homeostasia intracelular do Ca<sup>2+</sup> e com a regulação dos fluxos iónicos transmembranares dos cardiomiócitos.



**Figura 3.** Vias metabólicas enriquecidas pelo conjunto de genes presumivelmente alvos dos 42 miRNAs em estudo, de acordo com a aplicação *Enrichr*. A. Segundo *WikiPathways*. B. Segundo *Reactome*.

Recorrendo à base de dados OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*), analisou-se o envolvimento dos genes-alvo previstos noutras patologias com substrato genético conhecido (Figura 4). Verificou-se uma forte associação destes genes-alvo com as miocardiopatias ( $P = 0,027$ ). Esta relação foi particularmente relevante entre os genes-alvo dos miRNAs sobre-expressos, sendo estatisticamente significativa para a miocardiopatia dilatada ( $P = 0,045$ ) e doenças de deposição de colagénio ( $P=0,020$ ). A associação à miocardiopatia dilatada será em particular justificada pela partilha dos genes *TCAP*, *MYBPC3*, *TPM1*, *DES*, *TAZ*, *LMNA*, *LDB3*, *ABCC9*, *PLN*, *PSEN2* e *TMPO*. Importará ainda registar a associação no limiar da significância estatística com as arritmias ventriculares ( $P = 0,054$ ), motivada em particular pela partilha de genes causadores da síndrome do QT longo (*KCNJ2*, *ANK2*, *KCNE1*, *CACNA1C*, *KCNH2* e *KCNQ1*).



**Figura 4. Patologias com componente genético conhecido genes-alvo dos miRNAs diferencialmente expressos em contexto de FA.**

Em conclusão, os nossos resultados revelam que a FA se acompanha de modificações do perfil global de expressão de miRNAs. Identificámos um grupo de miRNAs diferencialmente expressos com genes-alvo previstos potencialmente relevantes, relacionados com a regulação da homeostasia intracelular do  $\text{Ca}^{2+}$ , fluxos iónicos transmembranares e vias de sinalização celular. Tal que sugere, pela primeira vez, a implicação de alterações da regulação pós-transcricional da expressão génica na fisiopatologia da FA.