



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
Instituto de Biociências de Botucatu



Dissertação de Mestrado

**MECANISMO POTENCIAL DE PROTEÇÃO DE  
MICRORNAS NA EXPRESSÃO DE ENDOTELINA-1 EM  
CÉLULAS ENDOTELIAIS INCUBADAS COM PLASMA DE  
PRÉ-ECLÂMPTICAS**

**MAYARA CALDEIRA DIAS**

Botucatu – SP

2016



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
Instituto de Biociências de Botucatu



**MECANISMO POTENCIAL DE PROTEÇÃO DE  
MICRORNAS NA EXPRESSÃO DE ENDOTELINA-1 EM  
CÉLULAS ENDOTELIAIS INCUBADAS COM PLASMA DE  
PRÉ-ECLÂMPTICAS**

**MAYARA CALDEIRA DIAS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração: Farmacologia.

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Valéria Cristina Sandrim**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Farmacologia),  
UNESP**

**Botucatu – SP**

**2016**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCN. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Dias, Mayara Caldeira.

Mecanismo potencial de proteção de microRNAs na expressão de endotelina-1 em células endoteliais incubadas com plasma de pré-eclâmpticas / Mayara Caldeira Dias. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Valéria Cristina Sandrim

Capes: 21005001

1. Pré-eclâmpsia. 2. MicroRNAs. 3. Farmacologia. 4. Agentes hipotensores. 5. Endotelina-1. 6. Células endoteliais.

Palavras-chave: Anti-hipertensivo; Endotelina-1; HUVEC; Pré-eclâmpsia; microRNAs.

## AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Valéria Cristina Sandrim, por ter me concedido a oportunidade de trabalhar neste projeto. Agradeço por toda sua dedicação ao longo da execução deste projeto, por todos os ensinamentos que me foram acrescentados, tanto profissionais quanto pessoais e por ser minha inspiração de como ser uma excelente orientadora, professora e pesquisadora.

Às minhas colegas de laboratório, Naiara, Liliam, Eliane, Ana Lígia e Iael que sempre estiveram dispostas a ajudar por pura generosidade e amizade. Agradeço pela companhia, pelas conversas e discussões científicas no laboratório e por todo auxílio prestado.

Aos meus colegas de departamento, Katiussia, Zé Sérgio, Victor e Regina pelos ensinamentos em nossas conversas acadêmicas, pelos momentos de descontração e pela amizade.

Aos queridos funcionários do Departamento de Farmacologia, Hélio, “Paulão”, Luis e Cris, por estarem dispostos em todos os momentos. Agradeço pela atenção, presteza e paciência que tiveram comigo.

Ao meu melhor amigo, André “Dói”, por toda ajuda e auxílio que foram prestados, tanto para a realização deste projeto quanto para o laboratório em geral, e pelos seis anos de amizade e cumplicidade em Botucatu.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Farmacologia) da UNESP de Botucatu, por ter me recebido como aluna de mestrado e por todo o aprendizado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro do projeto.

A todos os meus amigos, colegas e professores, que, tanto de forma direta ou indireta, estiveram sempre me apoiando e torcendo por meu sucesso.

À minha família, meus pais Maria Cristina e Manoel, e minha irmã Fernanda, que em todos os momentos me deram apoio e força, e que me guiaram em meus passos sempre com muito amor, carinho e compreensão. Agradeço por tudo!

## PRÓLOGO

Esta dissertação será apresentada na forma de uma introdução geral sobre o quadro clínico gestacional chamado pré-eclâmpsia, endotelina-1 e seu envolvimento nesta doença e sobre os microRNAs e sua relação com a pré-eclâmpsia e endotelina-1, seguido por um manuscrito referente ao projeto de dissertação conforme as normas da revista *Journal of Hypertension* à qual foi submetido para publicação.

# SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL .....	1
Introdução a Pré-eclâmpsia .....	1
Endotelina-1 .....	6
Endotelina-1 e Pré-eclâmpsia.....	9
MicroRNAs .....	12
MicroRNAs e Pré-eclâmpsia.....	14
MicroRNAs e ET-1 .....	15
JUSTIFICATIVA .....	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	16
MANUSCRITO REFERENTE AO PROJETO DE MESTRADO .....	23
RESUMO .....	23
Potential protective mechanism by miRNAs on endothelin-1 expression in endothelial cells incubated with plasma from preeclampsia .....	24
ABSTRACT .....	25
INTRODUCTION.....	26
METHODS .....	27
<i>Study population</i> .....	27
<i>Endothelial cell culture and plasma incubation</i> .....	28
<i>RNA isolation</i> .....	28
<i>PCR-array analysis for mRNA expression</i> .....	28
<i>RNA expression by RT-qPCR</i> .....	29
<i>MiRNAs selection</i> .....	29
<i>MiRNA expression by RT-qPCR</i> .....	30
<i>Measurement of ET-1 concentration</i> .....	30
<i>Statistical Analysis</i> .....	30
RESULTS .....	31
Effects of plasma incubation on gene expression in HUVECs by PCR-array .....	31
<i>EDN1</i> expression and ET-1 levels in HUVECs incubated with plasma from pregnant women before and after the onset of preeclampsia symptoms .....	31
Antihypertensive therapy responsiveness .....	32
Expression of miRNAs predicted to target <i>EDN1</i> in HUVECs incubated with plasma from preeclampsia and healthy pregnant .....	32
Plasma ET-1 levels in patients with preeclampsia .....	33

DISCUSSION .....	34
REFERENCES.....	37
ACKNOWLEDGEMENTS .....	40
AUTHOR CONTRIBUTIONS .....	40
TABLES.....	41
FIGURE LEGEND .....	42
FIGURE 1 .....	43
SUPPLEMENTARY INFORMATION.....	44
LIST OF ABBREVIATIONS .....	49

## **INTRODUÇÃO GERAL**

### **Introdução a Pré-eclâmpsia**

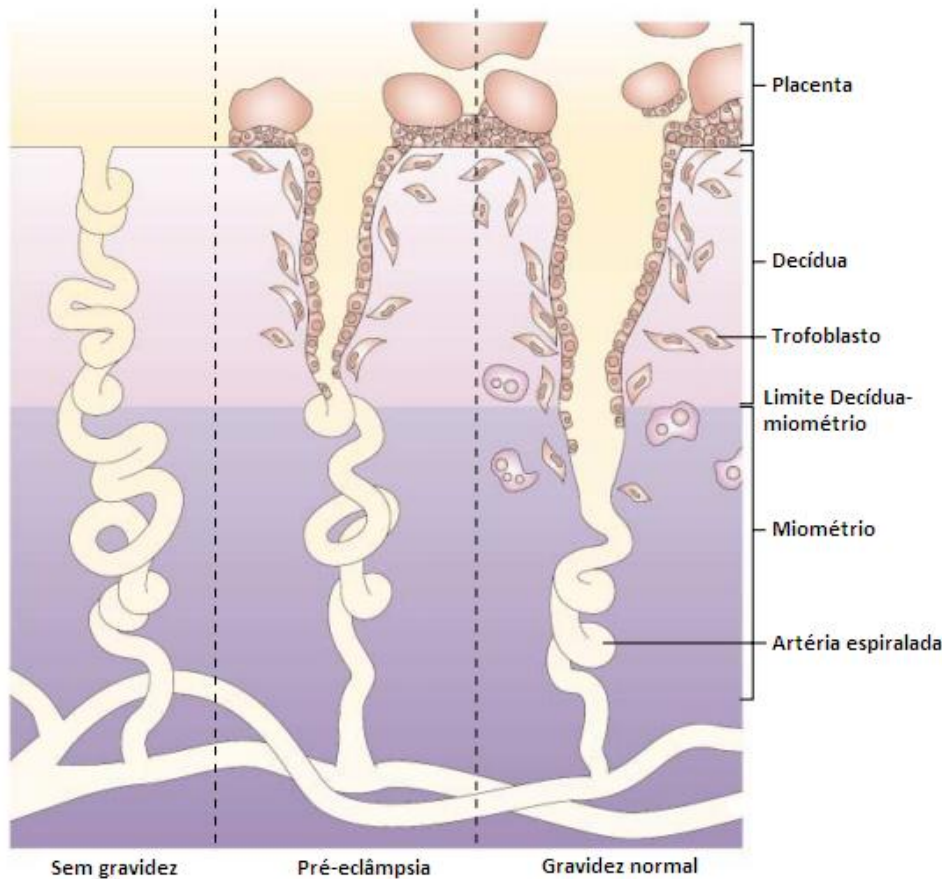
A pré-eclâmpsia é a principal causa de mortalidade e morbidade entre as gestantes no Brasil e em outros países, e afeta de 2-8% de todas as gestações (DULEY, 2009; HUTCHEON; LISONKOVA; JOSEPH, 2011; LAURENTI; JORGE; GOTLIEB, 2004). Ela é definida como um quadro clínico em que, após a 20ª semana de gestação, a gestante apresenta hipertensão, caracterizada por pressão arterial sistólica acima de 140 mmHg e a diastólica acima de 90 mmHg em duas tomadas de pressão, com intervalo de 4 horas, em repouso, acompanhada por proteinúria (0,3 g/L em urina 24 horas) (“Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy.”, 2000). O aumento da pressão sanguínea acompanhado por proteinúria pode causar diversas complicações, tanto para a gestante como para o feto. Na gestante, podem ocorrer efeitos deletérios sobre vários sistemas, principalmente o vascular, o hepático, o renal e o cerebral. Já em relação ao feto, este pode ter problemas de crescimento, parto prematuro e morte (DULEY, 2009; HUTCHEON; LISONKOVA; JOSEPH, 2011).

Diversos fatores de risco foram identificados na pré-eclâmpsia. A prevalência de pré-eclâmpsia é maior em primigestas, sendo duas a três vezes maior em relação às mulheres que tiveram pelo menos uma gestação anterior (DEIS et al., 2008; DILDY; BELFORT; SMULIAN, 2007; DUCKITT; HARRINGTON, 2005; LUO et al., 2007). O histórico de pré-eclâmpsia em gestação anterior também é um fator de risco, sendo que mulheres que tiveram pré-eclâmpsia em uma gestação prévia possuem um risco ainda maior de desenvolver pré-eclâmpsia em uma gestação subsequente (LIE et al., 1998). Outro fator de risco é histórico familiar de pré-eclâmpsia, a incidência da doença é maior em gestantes que possuem mãe, avós ou irmãs que desenvolveram pré-eclâmpsia (CHESLEY; ANNITTO; COSGROVE, 1968; CINCOTTA; BRENNECKE, 1998; LIE et al., 1998). Além disso, distúrbios e doenças pré-existentes como obesidade (SIBAI et al., 1995; STONE et al., 1994), diabetes (SIDDIQI et al., 1991), hipertensão crônica (SIBAI et al., 1995) e doença renal (DEKKER et al., 1995) também foram identificados como fatores de risco na pré-eclâmpsia.



Pré-eclâmpsia pode ser classificada em precoce (< 34 semanas) ou tardia (≥ 34 semanas), de acordo com a idade gestacional do diagnóstico. A pré-eclâmpsia precoce é menos comum (prevalência de 12% de todos os casos de pré-eclâmpsia) e apresenta maiores riscos de complicações maternas e fetais do que a pré-eclâmpsia tardia. Já esta última representa a maioria dos casos (88% de prevalência) e apresenta menor comprometimento do crescimento fetal e resultados perinatais mais favoráveis em relação à precoce. Ainda é desconhecido se esses tipos de pré-eclâmpsia, precoce ou tardia, possuem mecanismos fisiopatológicos diferentes ou se são apenas gradações da doença (LISONKOVA; JOSEPH, 2013; VON DADELSZEN; MAGEE; ROBERTS, 2003).

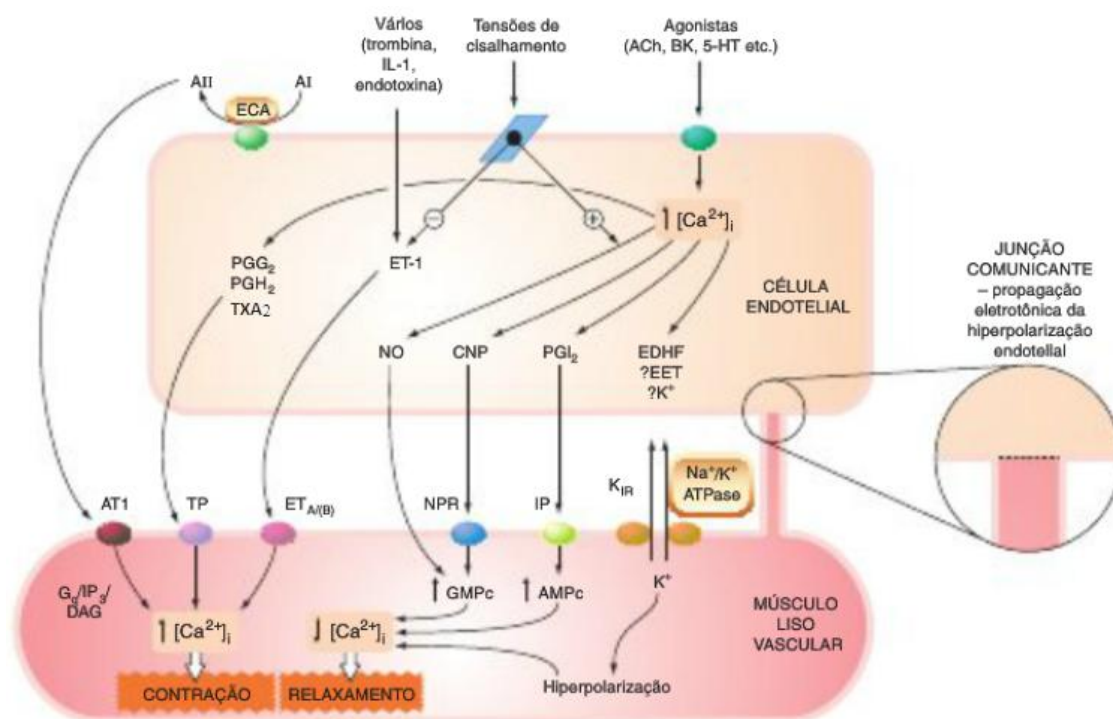
A fisiopatologia da pré-eclâmpsia ainda não está completamente elucidada. Fatores maternos relacionados à predisposição genética, má adaptação imunológica à gravidez e doenças vasculares pré-existentes podem estar envolvidos na origem desta doença, porém atualmente é amplamente aceito que a isquemia da placenta é um fator primordial. Durante o início do segundo trimestre da gestação (18-20 semanas), instala-se um processo de “pseudovasculogênese”, que consiste na migração dos citotrofblastos em direção as arteríolas uterinas espiraladas onde sofrem diferenciação em células com fenótipo endotelial. Neste processo há um remodelamento gradual da camada endotelial destes vasos e destruição do tecido elástico-muscular das artérias e arteríolas, tornando-as mais dilatadas. O remodelamento das artérias uterinas espiraladas resulta na formação de um sistema local de baixa resistência arteriolar que é essencial ao aumento do suprimento sanguíneo para o desenvolvimento e crescimento do feto. Na pré-eclâmpsia, este processo não ocorre devidamente, portanto a invasão das artérias espiraladas do útero é incompleta (KHONG et al., 1986; ZHOU; DAMSKY; FISHER, 1997). Logo, a média do diâmetro das artérias espiraladas dessas gestantes é metade daquela observada na gravidez normal (PRIDJIAN; PUSCHETT, 2002), o que impede uma resposta adequada ao aumento da demanda do fluxo sanguíneo que ocorre durante a gestação, diminuindo a perfusão útero-placentária, provocando isquemia da placenta (Figura 1).



**Figura 1.** Remodelamento das artérias uterinas espiraladas em gravidez normal, com pré-eclâmpsia e sem gravidez (Imagem reproduzida e adaptada de MOFFETT-KING, 2002).

Sugere-se que a isquemia útero-placentária ocasiona a liberação de fatores placentários na circulação materna, levando a uma disfunção endotelial vascular por todo organismo materno (HLADUNEWICH; KARUMANCHI; LAFAYETTE, 2007; MUTTER; KARUMANCHI, 2008). Diversas evidências suportam este entendimento da doença, onde os sinais clínicos e sintomas da pré-eclâmpsia envolvendo a vasculatura materna tem ligação com essas substâncias circulantes. Por exemplo, a incubação *in vitro* de soro/plasma de mulheres com pré-eclâmpsia induz a injúria de células endoteliais, através de alterações de expressão gênica (CALICCHIO et al., 2013; KRONBORG; KNUDSEN; MARTENSEN, 2008; MACKENZIE et al., 2012), produção alterada de fatores vasoativos (KIPRONO et al., 2013b; SCALERA; SCHLEMBACH; BEINDER, 2001) e danos por estresse oxidativo (ENGLISH et al., 2013; SANKARALINGAM; XU; DAVIDGE, 2010; SCALERA et al., 2002). O início da doença se dá pelas alterações placentárias associadas posteriormente a um endotélio materno predisposto.

A partir da teoria da isquemia placentária, afirma-se que a fisiopatologia da pré-eclâmpsia ocorre em dois estágios: estágio 1, isquemia da placenta, e estágio 2, disfunção endotelial (SARGENT; BORZYCHOWSKI; REDMAN, 2007). Esta disfunção se manifesta através da produção desregulada de fatores vasoativos, como endotelina-1 (ET-1), espécies reativas de oxigênio (EROs) e outras espécies reativas e tromboxano (TXA<sub>2</sub>). O endotélio produz fatores de contração (EDCFs) e relaxamento (EDRFs) que atuam na musculatura lisa vascular, logo esses fatores possuem uma ação importante na regulação da resistência vascular e da pressão sanguínea (Figura 2). Quando a produção desses fatores está desregulada, a vasculatura está predisposta à vasoconstrição, aderência leucocitária e inflamação (ALI; KHALIL, 2015; LAMARCA; GILBERT; GRANGER, 2008).



**Figura 2.** Fatores vasoativos derivados do endotélio. 5-HT, 5-hidroxitriptamina; A, angiotensina; ECA, enzima conversora de angiotensina; ACh, acetilcolina; AMPc, monofosfato cíclico de adenosina; AT<sub>1</sub>, receptor AT<sub>1</sub> da angiotensina; BK, bradicinina; CNP, peptídeo natrourético C; DAG, diacilglicerol; EDHF, fator hiperpolarizante derivado do endotélio; EET, ácido epoxieicosatetraenóico; ET-1, endotelina-1; ET<sub>A/(B)</sub>, receptores A e (B) de endotelina; GMPc, monofosfato cíclico de guanosina; Gq, proteína G; IL-1, interleucina-1; IP, receptor de prostanóide I; IP<sub>3</sub>, 1,4,5-trifosfato de inositol; K<sub>IR</sub>, canal de potássio retificador de entrada; Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, bomba eletrogênica; NPR, receptor de peptídeo natriurético; NO, óxido nítrico; PG, prostaglandina; PGI<sub>2</sub>, prostaciclina; TP, receptor de prostanóide T,

TXA<sub>2</sub>, tromboxano A<sub>2</sub>. (Imagem reproduzida e adaptada de RANG & DALE, FARMACOLOGIA, 7ª EDIÇÃO).

Atualmente, o tratamento definitivo da pré-eclâmpsia é o parto. Dependendo de fatores como idade gestacional, gravidade, bem-estar fetal e presença ou não de complicações, a interrupção da gravidez é indicada. Entretanto, a instalação precoce da doença aumenta a chance de prematuridade, e conseqüentemente, aumento da morbidade e mortalidade perinatal (CHURCHILL; DULEY, 1996). Assim, na tentativa de prevenir tais complicações, várias condutas têm sido propostas quando não é possível ou recomendável interromper a gravidez, como corticoterapia para aceleração da maturidade pulmonar fetal e expansão do volume plasmático; hospitalização com repouso materno; terapia anticonvulsivante com o sulfato de magnésio e tratamento com anti-hipertensivos.

A terapia anti-hipertensiva é a mais utilizada, sendo os fármacos adotados a metildopa, a nifedipina, a hidralazina e o labetalol (não aprovado para uso clínico no Brasil) (NETO; SOUZA; AMORIM, 2010). A metildopa é um agonista  $\alpha_2$ -adrenérgico. Ela é captada pelos neurônios noradrenérgicos onde é convertida em  $\alpha$ -metilnoradrenalina, que não é desaminada no interior do neurônio pela MAO, logo ela se acumula e desloca a noradrenalina das vesículas sinápticas. A  $\alpha$ -metilnoradrenalina liberada do neurônio noradrenérgico é menos potente que a noradrenalina nos receptores  $\alpha_1$  e, portanto, menos eficaz na indução de vasoconstrição. Porém, ela é mais potente nos receptores pré-sinápticos  $\alpha_2$ , logo o mecanismo de retroalimentação auto-inibitória é estimulado, reduzindo assim, a liberação do neurotransmissor, contribuindo para a ação hipotensora (RANG et al., 2007).

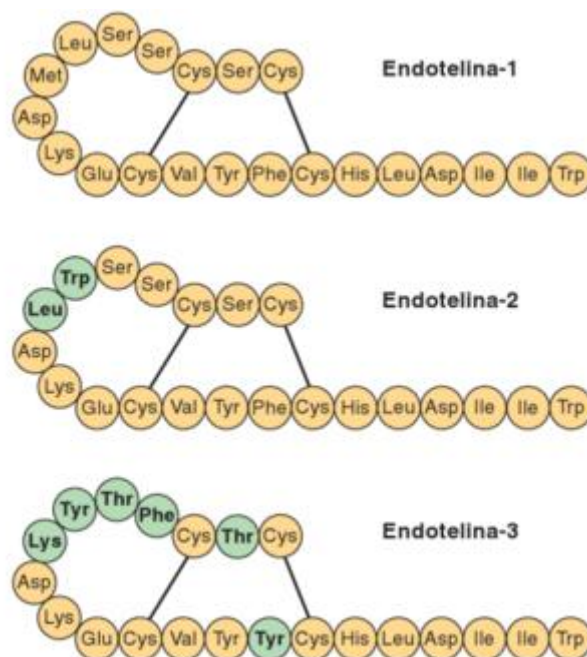
Já a nifedipina é um bloqueador de canais de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) de alta voltagem (tipo L). Ela pertence à classe das diidropiridinas, que possuem ação preferencial nos canais de cálcio no músculo liso vascular. Ao bloquear a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , a contração muscular é inibida, resultando no efeito hipotensor. A hidralazina é um vasodilatador periférico usada em crise hipertensiva, porém seu mecanismo de ação ainda é desconhecido, e o que se sabe é que ela interfere com a ação do inositol trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) sobre a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático. Por sua vez, o labetalol é um  $\alpha$  e  $\beta$ -bloqueador. Sua ação bloqueando receptores  $\alpha_1$  no músculo liso vascular resulta em vasorelaxamento, que contribui para o efeito hipotensor. Já sua ação bloqueando

receptores  $\beta$ -adrenérgicos resulta em redução do débito cardíaco, redução da liberação de renina e redução da atividade simpática, e, conseqüentemente, resulta na redução da pressão arterial (RANG et al., 2007).

Porém, um grande número de pré-eclâmpticas não respondem ao tratamento anti-hipertensivo, e isso torna o quadro clínico muito mais grave em termos de morbidade e mortalidade quando comparado com as responsivas. A partir dessa observação, pesquisadores criaram um critério de responsividade a este tratamento, e mostraram que há diferenças no perfil genético de alguns marcadores entre as gestantes com pré-eclâmpsia responsivas e não-responsivas ao tratamento com anti-hipertensivos (SANDRIM et al., 2010).

## Endotelina-1

As endotelinas constituem uma família de peptídeos vasoativos que possuem funções fisiológicas importantes em tecidos normais, como moduladoras do tônus vascular, diferenciação dos tecidos, proliferação celular e produção de hormônios. A família das endotelinas compreende três isoformas, que são produtos de genes diferentes: endotelina-1, endotelina-2 e endotelina-3, sendo que a endotelina-1 é a mais abundante (Figura 3) (NELSON et al., 2003; STRUCK; MORGENTHALER; BERGMANN, 2005).

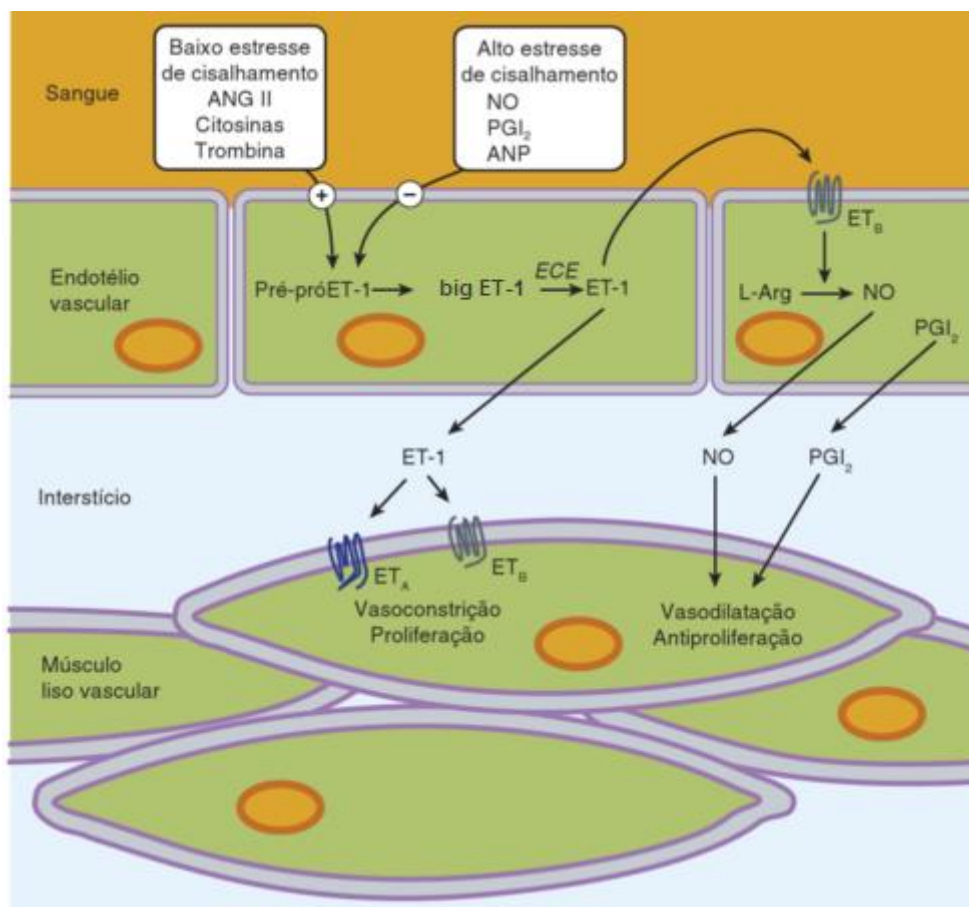


**Figura 3.** Estruturas das endotelinas humanas. Os resíduos de aminoácidos que diferem da endotelina-1 estão indicados em verde. (Imagem reproduzida e adaptada de HAMMER & MCPHEE, FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA, 7ª EDIÇÃO).

A endotelina-1 (ET-1) é um peptídeo vasoconstritor potente que foi isolado originalmente em células endoteliais, porém é sintetizada e secretada por diversos tipos celulares, incluindo os sinciciotrofoblastos da placenta (MALASSINÉ et al., 1993; YANAGISAWA; KURIHARA; KIMURA, 1988). Nas células musculares lisas vasculares, a ET-1 estimula a constrição (ISHIDA et al., 1989), proliferação (KOMURO et al., 1988), migração (KOHNO et al., 1998) e síntese de matriz extracelular (RODRIGUEZ-VITA et al., 2005). A ET-1 tem sido implicada como um importante fator no desenvolvimento da disfunção endotelial, pois nessa condição, há um aumento de sua produção (BÖHM; PERNOW, 2007).

O gene que codifica a ET-1 é o *EDNI*, localizado no cromossomo 6. Fatores físicos, bioquímicos e humorais regulam a transcrição desse gene estimulando a síntese da pré-pro-endotelina-1. Esse precursor é então transformado pelas endopeptidases em big-endotelina-1, que é funcionalmente inativa. As enzimas conversoras de endotelina (ECEs), quimases e metaloproteinases clivam a big-endotelina, liberando a forma ativa da ET-1 com 21 aminoácidos. A big-endotelina é convertida em ET-1 no interior e na superfície da célula endotelial, bem como na superfície das células musculares lisas (BÖHM; PERNOW, 2007).

Os efeitos biológicos da ET-1 são traduzidos por dois subtipos de receptores farmacologicamente distintos, o ET<sub>A</sub> e o ET<sub>B</sub>, ambos os quais são acoplados a proteína G (RUBANYI; POLOKOFF, 1994). Na vasculatura, o receptor ET<sub>A</sub> está localizado principalmente nas células musculares lisas e medeia a vasoconstrição (Figura 2). A ET-1 pode também induzir efeitos vasoconstritores indiretos, através da geração de TXA<sub>2</sub> derivado do endotélio (TADDEI; VANHOUTTE, 1993). O receptor ET<sub>B</sub> se localiza principalmente nas células endoteliais, mas também está presente na musculatura lisa do vaso. A estimulação de ET<sub>B</sub> endotelial resulta na liberação de óxido nítrico (NO) e prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) (DE NUCCI et al., 1988), que provocam vasodilatação, porém a estimulação de ET<sub>B</sub> na musculatura lisa resulta em vasoconstrição. Logo, o efeito final produzido pela ET-1 é determinado pela localização de seus receptores e pelo equilíbrio entre receptores ET<sub>A</sub> e ET<sub>B</sub> (Figura 4).



**Figura 4.** Produção de ET-1 no endotélio vascular e seus efeitos sobre as células musculares lisas mediados pelos receptores  $ET_A$  e  $ET_B$ . ANG II, angiotensina 2; ANP, peptídeo natriurético atrial; ECE, enzima conversora de endotelina; ET-1, endotelina-1;  $ET_{A(B)}$ , receptores A e (B) de endotelina; NO, óxido nítrico;  $PGI_2$ , prostaciclina. (Imagem reproduzida e adaptada de KATZUNG, FARMACOLOGIA BÁSICA E CLÍNICA, 12ª EDIÇÃO).

Devido ao fato da ET-1 exercer seus efeitos através da ligação com receptores, é possível utilizar antagonistas para esses receptores com a finalidade de bloquear os efeitos da ET-1. Diversos estudos já foram realizados utilizando antagonistas seletivos e não-seletivos de  $ET_A$  e  $ET_B$  (CARDILLO et al., 1999, 2004), e um deles demonstrou que o uso de antagonista não-seletivo destes receptores (TAK-044) produziu um maior grau de vasodilatação em pacientes hipertensos do que em normotensos (TADDEI et al., 1999). Com base nessas evidências, indústrias farmacêuticas desenvolveram medicamentos para tratamento de hipertensão que atuam através do antagonismo de receptores de  $ET_A$  e  $ET_B$  como, por exemplo, a bosentana (TRACLEER, 2001).

## Endotelina-1 e Pré-eclâmpsia

Diversas doenças cardiovasculares estão associadas à produção elevada de ET-1, incluindo hipertensão (ALEXANDER et al., 2001c; DENG; DAY; SCHIFFRIN, 1996), insuficiência cardíaca congestiva (SCHIFFRIN, 1995) e insuficiência renal crônica (KASSAB et al., 1998). Em relação à pré-eclâmpsia, também há uma associação entre a ET-1 e a fisiopatologia da doença. Por exemplo, estudos demonstraram que os níveis circulantes de ET-1 estão significativamente elevados em gestantes com pré-eclâmpsia em relação às saudáveis, sendo que há uma correlação positiva entre os níveis circulantes de ET-1 e a severidade dos sintomas (BAKSU et al., 2005; MALTARIS et al., 2005; NISHIKAWA et al., 2000; TAYLOR et al., 1990). Além disso, um estudo revelou que esse aumento nos níveis da ET-1 pode ser parcialmente atribuído a um aumento na atividade da ECE na circulação materna da gestante com pré-eclâmpsia (AJNE et al., 2003). Essas diferenças nos níveis de ET-1 têm sido implicadas no aumento da contratilidade das artérias uterinas em modelos experimentais *ex vivo* (MALTARIS et al., 2005).

Estudos também demonstraram que há um aumento nos níveis do mRNA da pré-pró-endotelina, além do aumento da ET-1 em si, em uma variedade de tecidos proveniente de gestante com pré-eclâmpsia, sugerindo o envolvimento da ET-1 na etiologia da doença (FAXÉN et al., 1997; NAPOLITANO et al., 2000). Há também evidências de que a metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2), que pode clivar a big-endotelina em ET-1, está significativamente aumentada na pré-eclâmpsia, indicando uma correlação entre MMP-2 e a ET-1 (MYERS et al., 2005; NARUMIYA et al., 2001). Além disso, em placentas retiradas de gestantes saudáveis quando incubadas com ET-1 exógena há um aumento significativo na expressão de marcadores de estresse oxidativo, que têm sido implicados como fatores importantes no desencadeamento da disfunção endotelial e da hipertensão na pré-eclâmpsia. O mesmo estudo também revelou que a ET-1 causa uma diminuição na proliferação de células provenientes de uma linhagem celular de trofoblastos (JEG-3), sugerindo a participação da ET-1 na falha da invasão trofoblástica nos estágios iniciais da pré-eclâmpsia (FIORE et al., 2005).

Devido às limitações presentes em estudos com gestantes, modelos experimentais foram desenvolvidos a fim de se estudar a etiologia e o desenvolvimento da pré-



eclâmpsia. Dentre eles, foi criado o modelo animal de redução de pressão de perfusão uterina (RUPP), que restringe de forma mecânica o fluxo sanguíneo da placenta levando a hipóxia e isquemia. Esse modelo tem sido utilizado em roedores e primatas e mimetiza as características fisiopatológicas da pré-eclâmpsia nos humanos, incluindo hipertensão, desequilíbrio angiogênico, proteinúria e disfunção endotelial (ABITBOL et al., 1977; ALEXANDER et al., 2001b; MAKRIS et al., 2007). Em relação a ET-1, estudos utilizando esse modelo demonstraram que os níveis de mRNA da pré-pró-endotelina estavam significativamente aumentados nas zonas cortical e medular renal. Além disso, a administração de um antagonista seletivo de receptor ET<sub>A</sub> não teve efeitos em ratas prenhas saudáveis, porém no grupo RUPP a hipertensão foi normalizada pelo antagonista (ALEXANDER et al., 2001a). É evidente que a hipertensão observada no modelo RUPP é dependente do aumento da produção de ET-1 e de sua sinalização via receptor ET<sub>A</sub>.

Outro modelo animal é o de elevação das concentrações do receptor FMS-like tirosina quinase-1 solúvel (sFlt-1), através de administração direta ou de superexpressão viral. O sFlt-1 é um receptor solúvel que antagoniza fatores angiogênicos como VEGF e PlGF, logo possui uma ação antiangiogênica e sua elevação leva a hipertensão, lesão renal e proteinúria, que são todos sintomas da pré-eclâmpsia (BERGMANN et al., 2010; BRIDGES et al., 2009; GILBERT et al., 2010; LI et al., 2007; MAYNARD et al., 2003; MURPHY et al., 2010; SUNDERLAND; HENNESSY; MAKRIS, 2011; SUZUKI et al., 2009). Através desse modelo, um estudo revelou que a administração de sFlt-1 em ratas prenhas aumentou significativamente os níveis de mRNA da pré-pró-endotelina no córtex renal e que a co-administração de um antagonista seletivo de ET<sub>A</sub> normalizou a hipertensão causada pela infusão de sFlt-1 (MURPHY et al., 2010).

Além dos modelos *in vivo* de estudo da pré-eclâmpsia, também foi desenvolvido um modelo *in vitro*, através da incubação de soro/plasma de gestantes com pré-eclâmpsia em células endoteliais. Esse modelo se baseia no fato de o plasma dessas gestantes conterem fatores liberados pela placenta que levam a disfunção endotelial materna. Os resultados utilizando esse modelo *in vitro* em relação a ET-1 são discrepantes. Estudos mais antigos observaram que a produção de ET-1 está diminuída em células endoteliais incubadas com plasma de gestantes com pré-eclâmpsia em relação às gestantes saudáveis (BRANCH; DUDLEY; MITCHELL, 1991; ZAMMIT; WHITWORTH; BROWN, 1996), enquanto outros estudos mais recentes mostraram que a produção de

ET-1 está aumentada em gestantes com pré-eclâmpsia (KIPRONO et al., 2013a; SCALERA; SCHLEMBACH; BEINDER, 2001). Houve um estudo que não demonstrou diferença significativa nesta produção (GALLERY et al., 1995). Estas discrepâncias na literatura podem ser devido a diferenças nos protocolos experimentais utilizados, como tempo de incubação e proliferação das células, porcentagem de plasma incubado e viabilidade e tipo celular utilizado (linhagens imortalizadas ou células primárias).

Um estudo realizado utilizando o modelo *in vitro* usou soro de ratas prenhas submetidas ao RUPP para a incubação de células endoteliais, sendo que o plasma oriundo desse grupo estimulou maior liberação de ET-1 pelas células endoteliais do que o plasma obtido de ratas prenhas saudáveis (ROBERTS et al., 2006).

Por fim, ET-1 também tem sido implicada na indução do estresse oxidativo e estresse de retículo endoplasmático na pré-eclâmpsia. O estresse oxidativo possui um papel importante na fisiopatologia da pré-eclâmpsia, sugerido por diversos estudos que mostraram o aumento de produtos oriundos do estresse oxidativo na pré-eclâmpsia em relação a gestantes saudáveis (AYDIN et al., 2004; GUPTA et al., 2009; HUBEL, 1999; TAKAGI et al., 2004). Também há evidências de que a suplementação durante a gestação com L-arginina e vitaminas antioxidantes ajuda na redução do índice de pré-eclâmpsia, como demonstrado em um estudo conduzido com uma população de alto-risco para a doença (VADILLO-ORTEGA et al., 2011). Um estudo demonstrou que a ET-1 possui um papel na indução do estresse oxidativo na pré-eclâmpsia através do tratamento com ET-1 de humanas explantadas e células trofoblásticas (JEG-3). Foi observado um aumento nas concentrações de malondialdeído e diminuição de antioxidantes (glutathiona e ácido ascórbico). O malondialdeído é um dos metabólitos secundários derivados da peroxidação lipídica, um mecanismo essencial no dano oxidativo, e suas concentrações estão aumentadas na pré-eclâmpsia (FIORE et al., 2005). Logo, nesse estudo o efeito da ET-1 foi induzir o estresse oxidativo.

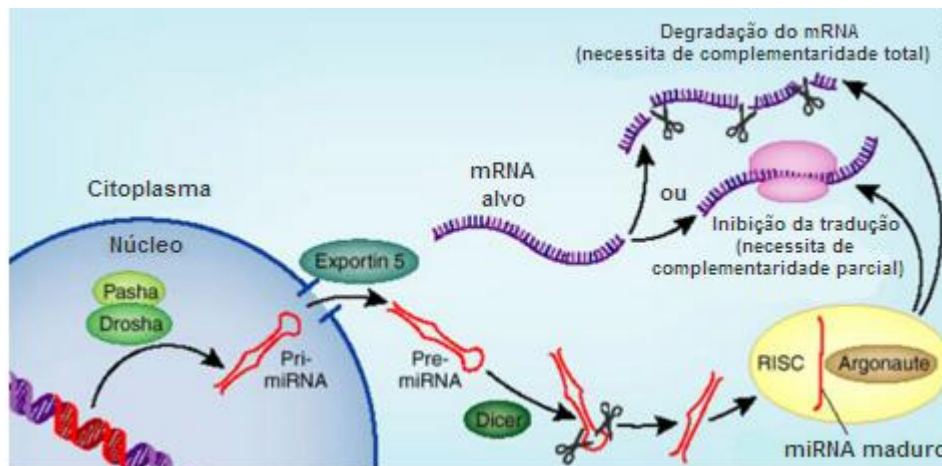
Em relação ao estresse do retículo endoplasmático (RE), há evidências de que este pode estar envolvido na fisiopatologia da pré-eclâmpsia (YUNG et al., 2008), que juntamente com o estresse oxidativo, pode explicar os vastos sintomas da doença. Quanto a ET-1, ela parece ser uma causa potencial do estresse do RE na pré-eclâmpsia, através de sua atuação por receptores  $ET_B$  que ativam a via  $PCL/IP_3$  induzindo a

liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do RE e, conseqüentemente, estimulando o estresse (JAIN et al., 2012). O envolvimento dessa via foi confirmado utilizando-se inibidores que agem em diferentes estágios e por silenciamento utilizando siRNA do receptor  $\text{ET}_B$ , sendo que todos bloquearam a indução do estresse pela ET-1.

## MicroRNAs

Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de RNA (aproximadamente de 22-25 nucleotídeos) não-codificantes, que regulam a expressão gênica a nível epigenético, ou seja, modificam o genoma sem alterar a sequência do DNA, através de sua ligação com a região 3'UTR do mRNA alvo, reprimindo a tradução (BARTEL, 2009; CUELLAR; MCMANUS, 2005). Eles são importantes no controle da diferenciação celular, proliferação e apoptose, e estão envolvidos na regulação da expressão gênica de diversos processos patológicos, como diabetes, câncer e neurodegeneração (CUELLAR; MCMANUS, 2005; FENG; RUIZ; CHAKRABARTI, 2013; HASHIMOTO; AKIYAMA; YUASA, 2013; THOMSON; BRACKEN; GOODALL, 2011).

De forma resumida, um miRNA primário (pri-miRNA) é transcrito ou produzido no núcleo. Ele é processado ou modificado pela enzima *Drosha* e exportado para o citoplasma pela Exportin 5. No citoplasma, agora chamado pré-miRNA, é novamente processado por outra enzima, a *Dicer*, formando o miRNA maduro. O miRNA maduro se associa a um complexo ou conjunto de enzimas chamado RISC e reprime ou inibe a síntese de proteínas pela clivagem do mRNA, através da complementaridade total de bases entre o miRNA e o mRNA, o que é mais comum em plantas, ou pode apenas impedir sua leitura, através de uma complementaridade parcial (Figura 5) (AXTELL; WESTHOLM; LAI, 2011; SHUKLA; SINGH; BARIK, 2011).



**Figura 5.** Biogênese e mecanismo de ação dos miRNAs. miRNA, microRNA; mRNA, RNA mensageiro; RISC, complexo de indução do silenciamento do RNA. (Imagem reproduzida e adaptada de MACK, 2007).

Sequências de miRNAs maduros são altamente conservadas entre espécies e um único gene pode ser regulado por diferentes miRNAs (SOON; KIARIS, 2013). Por outro lado, um miRNA pode regular um grande número de genes-alvo (REGE et al., 2013; SOON; KIARIS, 2013). Além disso, os miRNAs são diferentemente expressos nos tecidos, ou seja, eles são expressos de forma tecido-específico (BARTEL, 2009).

A desregulação dos miRNAs geralmente resulta em função celular prejudicada e desenvolvimento de patologias, logo os miRNAs possuem um relevante potencial terapêutico. Diversos estudos foram feitos utilizando miRNAs moduladores, como miRNAs miméticos e inibidores (antagomiRs), e esses moduladores foram capazes de restaurar a função celular normal em determinadas patologias, como a hipertensão (BÁTKAI; THUM, 2012). Os miRNAs miméticos são pequenas moléculas de RNA de dupla fita, quimicamente modificadas, que são projetadas para mimetizar miRNAs maduros endógenos, resultando na diminuição da tradução do mRNA alvo. Já os antagomiRs são pequenas moléculas de RNA de fita simples, quimicamente modificadas, feitas para se ligarem especificamente a miRNAs endógenos de forma a inibi-los, resultando no aumento da tradução do mRNA alvo do miRNA endógeno (MONTGOMERY; VAN ROOIJ, 2011). Devido a esses estudos realizados com moduladores de miRNAs, vários miRNAs estão sendo estudados com o intuito de utilizá-los como terapias em diversas patologias, como câncer, hepatite e doenças cardiovasculares (BRODERICK; ZAMORE, 2011). Indústrias farmacêuticas foram

criadas especificamente para o desenvolvimento de miRNAs terapêuticos, e muitos destes já estão em fase clínica de teste (BRODERICK; ZAMORE, 2011).

### **MicroRNAs e Pré-eclâmpsia**

Poucos estudos relacionados aos miRNAs foram realizados em pré-eclâmpsia, sendo que a maioria utilizou placenta como material de análise (HU et al., 2009; PINELES et al., 2007; WANG et al., 2012; ZHU et al., 2009). Nesses estudos, perfis de expressão de miRNAs distintos foram observados em pré-eclâmpsia, sugerindo a participação desses no processo da doença.

Fortes evidências sugerem que os miRNAs possuem um papel importante na patogenia da disfunção endotelial e na redução da capacidade angiogênica na hipertensão (BÁTKAI; THUM, 2012). Muitos miRNAs específicos e seus respectivos alvos que estão envolvidos na angiogênese já foram identificados, como por exemplo o miR-17, 20a, 20b, 21 e o 126, e alguns deles estão alterados em placentas oriundas de gestantes que tiveram pré-eclâmpsia (SABATEL et al., 2011; WANG et al., 2008, 2012). Estudos também identificaram um grupo de miRNAs reguladores de hipóxia, condição existente na fisiopatologia da pré-eclâmpsia. Esse inclui o miR-21, 23a, 23b, 30b, 93, 103, 107, 181a, 181b, 181c, 192, 195, 210, 213, que são induzidos em resposta a hipóxia em várias linhagens celulares (DONKER et al., 2007; HEBERT et al., 2007; HUA et al., 2006; KULSHRESHTHA et al., 2007). Diversos grupos observaram alteração na expressão de miRNAs reguladores de hipóxia em placentas oriundas de gestantes com pré-eclâmpsia, como o miR-210 (ENQUOBAHRIE et al., 2011; PINELES et al., 2007; ZHANG et al., 2012).

Por serem relativamente estáveis e expressos de forma tecido-específico, os miRNAs podem ser candidatos ideais como biomarcadores. Estudos foram realizados a fim de se investigar o perfil de expressão de miRNAs em pré-eclâmplicas para encontrar miRNAs que pudessem servir como biomarcadores para a predição de pré-eclâmpsia (LUQUE et al., 2014; URA et al., 2014). Em um estudo que analisou a expressão de miRNAs circulantes identificou 19 miRNAs diferentemente expressos em mulheres que posteriormente desenvolveram pré-eclâmpsia em relação a mulheres que permaneceram saudáveis, sendo que o miR-1233 exibiu a maior expressão diferencial, logo foi sugerido que este que o miR-1233 pudesse ser utilizado como um potencial

biomarcador para predição de pré-eclâmpsia (URA et al., 2014). Porém, outro estudo realizado que também investigou o perfil de expressão de miRNAs circulantes em mulheres que posteriormente desenvolveram pré-eclâmpsia e mulheres que permaneceram saudáveis não encontrou diferença significativa entre os grupos (LUQUE et al., 2014). Logo, os perfis de expressão de miRNAs encontrados por diferentes grupos de pesquisa são conflitantes, que provavelmente se devem a metodologias distintas empregadas para o estudo do perfil de expressão de miRNAs. Por exemplo, diferentes partes da placenta apresentam perfis de expressão diferentes, devido a sua natureza heterogênea de composição (ZHAO; MOLEY; GRONOWSKI, 2013).

### **MicroRNAs e ET-1**

Através da busca em bancos online de dados de miRNAs, como microRNA.org (BETEL et al., 2008), TargetScan (AGARWAL et al., 2015), miRWalk (DWEET; GRETZ, 2015) e miRBase (KOZOMARA; GRIFFITHS-JONES, 2014), sabe-se que há miRNAs validados e preditos que possuem como alvo gene EDN1, por exemplo o miR-1 (FENG et al., 2014). Foi observado que células endoteliais expostas a altas concentrações de glicose possuem uma produção de ET-1 aumentada e a expressão do miR-1 diminuída comparadas com as células expostas a uma baixa concentração de glicose, e a transfecção de um miRNA mimético do miR-1 foi capaz de reverter esta produção aumentada.

## **JUSTIFICATIVA**

Pelo o exposto, pouco estudos foram conduzidos em relação ao papel dos miRNAs na pré-eclâmpsia, sendo que a maioria deles investigou o perfil de miRNAs na placenta, com resultados encontrados mais especificamente a isquemia e hipóxia placentária. Outros estudos investigaram o perfil de miRNAs circulantes, a fim de se encontrar biomarcadores para a predição de pré-eclâmpsia. Porém, poucos estudos foram realizados em relação aos miRNAs e a disfunção endotelial, e não há nenhum estudo que investiga em específico a ET-1. É preciso que pesquisas sejam realizadas para que se entenda a relação entre a expressão de miRNAs, a produção de ET-1 e a pré-eclâmpsia, que foi um dos objetivos do atual projeto de mestrado.

Além disso, a questão da responsividade ao tratamento anti-hipertensivo na pré-eclâmpsia também deve ser investigada. Sugere-se que há diferenças no perfil genético de alguns marcadores entre as gestantes com pré-eclâmpsia responsivas e não-responsivas ao tratamento com anti-hipertensivos, entretanto não há estudos que investigaram o perfil de miRNAs. Com base nisso, o outro objetivo do projeto foi investigar a expressão de determinados miRNAs que possuem como alvo o gene EDN1 e a produção de ET-1, comparando pré-eclâmpticas responsivas e não-responsivas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABITBOL, M. M. et al. Experimental toxemia of pregnancy in the monkey, with a preliminary report on renin and aldosterone. **The American journal of pathology**, v. 86, n. 3, p. 573–90, mar. 1977.
- AGARWAL, V. et al. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. **eLife**, v. 4, 12 ago. 2015.
- AJNE, G. et al. Endothelin converting enzyme (ECE) activity in normal pregnancy and preeclampsia. **Hypertension in pregnancy**, v. 22, n. 3, p. 215–24, jan. 2003.
- ALEXANDER, B. T. et al. Endothelin type a receptor blockade attenuates the hypertension in response to chronic reductions in uterine perfusion pressure. **Hypertension**, v. 37, n. 2 Pt 2, p. 485–9, fev. 2001a.
- ALEXANDER, B. T. et al. Reduced uterine perfusion pressure during pregnancy in the rat is associated with increases in arterial pressure and changes in renal nitric oxide. **Hypertension**, v. 37, n. 4, p. 1191–5, abr. 2001b.
- ALEXANDER, B. T. et al. Enhanced renal expression of preproendothelin mRNA during chronic angiotensin II hypertension. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 280, n. 5, p. R1388–92, maio 2001c.
- ALI, S. M.; KHALIL, R. A. Genetic, immune and vasoactive factors in the vascular dysfunction associated with hypertension in pregnancy. **Expert opinion on therapeutic targets**, p. 1–21, 21 ago. 2015.
- AXTELL, M. J.; WESTHOLM, J. O.; LAI, E. C. Vive la différence: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. **Genome biology**, v. 12, n. 4, p. 221, jan. 2011.
- AYDIN, S. et al. Plasma malondialdehyde, superoxide dismutase, sE-selectin, fibronectin, endothelin-1 and nitric oxide levels in women with preeclampsia. **European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology**, v. 113, n. 1, p. 21–5, 15 mar. 2004.
- BAKSU, B. et al. Plasma nitric oxide, endothelin-1 and urinary nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate levels in hypertensive pregnant women. **International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics**, v. 90, n. 2, p. 112–7, ago. 2005.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 215–33, 23 jan. 2009.
- BÁTKAI, S.; THUM, T. MicroRNAs in hypertension: mechanisms and therapeutic targets. **Current hypertension reports**, v. 14, n. 1, p. 79–87, fev. 2012.
- BERGMANN, A. et al. Reduction of circulating soluble Flt-1 alleviates preeclampsia-like symptoms in a

- mouse model. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 14, n. 6B, p. 1857–67, jun. 2010.
- BETEL, D. et al. The microRNA.org resource: targets and expression. **Nucleic acids research**, v. 36, n. Database issue, p. D149–53, jan. 2008.
- BÖHM, F.; PERNOW, J. The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease. **Cardiovascular Research**, v. 76, n. 1, p. 8–18, 2007.
- BRANCH, D. W.; DUDLEY, D. J.; MITCHELL, M. D. Preliminary evidence for homeostatic mechanism regulating endothelin production in pre-eclampsia. **Lancet (London, England)**, v. 337, n. 8747, p. 943–5, 20 abr. 1991.
- BRIDGES, J. P. et al. Oxidative Stress Contributes to Soluble Fms-Like Tyrosine Kinase-1 Induced Vascular Dysfunction in Pregnant Rats. **American Journal of Hypertension**, v. 22, n. 5, p. 564–568, 1 maio 2009.
- BRODERICK, J. A.; ZAMORE, P. D. MicroRNA therapeutics. **Gene Therapy**, v. 18, n. 12, p. 1104–1110, 2011.
- CALICCHIO, R. et al. Preeclamptic plasma induces transcription modifications involving the AP-1 transcriptional regulator JDP2 in endothelial cells. **American Journal of Pathology**, v. 183, n. 6, p. 1993–2006, 2013.
- CARDILLO, C. et al. Role of endothelin in the increased vascular tone of patients with essential hypertension. **Hypertension**, v. 33, n. 2, p. 753–8, fev. 1999.
- CARDILLO, C. et al. Enhanced vascular activity of endogenous endothelin-1 in obese hypertensive patients. **Hypertension**, v. 43, n. 1, p. 36–40, jan. 2004.
- CHESLEY, L. C.; ANNITTO, J. E.; COSGROVE, R. A. The familial factor in toxemia of pregnancy. **Obstetrics and gynecology**, v. 32, n. 3, p. 303–11, set. 1968.
- CHURCHILL, D.; DULEY, L. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 1996.
- CINCOTTA, R. B.; BRENNECKE, S. P. Family history of pre-eclampsia as a predictor for pre-eclampsia in primigravidas. **International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics**, v. 60, n. 1, p. 23–7, jan. 1998.
- CUELLAR, T. L.; MCMANUS, M. T. MicroRNAs and endocrine biology. **The Journal of endocrinology**, v. 187, n. 3, p. 327–32, dez. 2005.
- DE NUCCI, G. et al. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 24, p. 9797–800, dez. 1988.
- DEIS, S. et al. Development of a nomogram to predict occurrence of preeclampsia. **European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology**, v. 137, n. 2, p. 146–51, abr. 2008.
- DEKKER, G. A. et al. Underlying disorders associated with severe early-onset preeclampsia. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 173, n. 4, p. 1042–8, out. 1995.
- DENG, L. Y.; DAY, R.; SCHIFFRIN, E. L. Localization of sites of enhanced expression of endothelin-1 in the kidney of DOCA-salt hypertensive rats. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 7, n. 8, p. 1158–64, ago. 1996.
- DILDY, G. A.; BELFORT, M. A.; SMULIAN, J. C. Preeclampsia recurrence and prevention. **Seminars in perinatology**, v. 31, n. 3, p. 135–41, jun. 2007.
- DONKER, R. B. et al. The expression of Argonaute2 and related microRNA biogenesis proteins in normal and hypoxic trophoblasts. **Molecular human reproduction**, v. 13, n. 4, p. 273–9, abr. 2007.



- DUCKITT, K.; HARRINGTON, D. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 330, n. 7491, p. 565, 12 mar. 2005.
- DULEY, L. The Global Impact of Pre-eclampsia and Eclampsia. **Seminars in Perinatology**, v. 33, n. 3, p. 130–137, 2009.
- DWEEP, H.; GRETZ, N. miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. **Nature methods**, v. 12, n. 8, p. 697, 30 jul. 2015.
- ENGLISH, F. A. et al. Inhibition of lectin-like oxidized low-density lipoprotein-1 receptor protects against plasma-mediated vascular dysfunction associated with pre-eclampsia. **American Journal of Hypertension**, v. 26, n. 2, p. 279–286, 2013.
- ENQUOBAHRIE, D. A. et al. Placental microRNA expression in pregnancies complicated by preeclampsia. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 204, n. 2, p. 178.e12–21, fev. 2011.
- FAXÉN, M. et al. Differences in mRNA expression of endothelin-1, c-fos and c-jun in placentas from normal pregnancies and pregnancies complicated with preeclampsia and/or intrauterine growth retardation. **Gynecologic and obstetric investigation**, v. 44, n. 2, p. 93–6, jan. 1997.
- FENG, B. et al. MiRNA-1 regulates endothelin-1 in diabetes. **Life Sciences**, v. 98, n. 1, p. 18–23, 2014.
- FENG, B.; RUIZ, M. A.; CHAKRABARTI, S. Oxidative-stress-induced epigenetic changes in chronic diabetic complications. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 91, n. 3, p. 213–20, mar. 2013.
- FIORE, G. et al. Endothelin-1 triggers placental oxidative stress pathways: putative role in preeclampsia. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 90, n. 7, p. 4205–10, jul. 2005.
- GALLERY, E. D. et al. Effect of serum on secretion of prostacyclin and endothelin-1 by decidual endothelial cells from normal and preeclamptic pregnancies. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 173, n. 3 Pt 1, p. 918–923, 1995.
- GILBERT, J. S. et al. Recombinant vascular endothelial growth factor 121 infusion lowers blood pressure and improves renal function in rats with placental ischemia-induced hypertension. **Hypertension**, v. 55, n. 2, p. 380–5, fev. 2010.
- GUPTA, S. et al. Lipid peroxidation and antioxidant status in preeclampsia: a systematic review. **Obstetrical & gynecological survey**, v. 64, n. 11, p. 750–9, nov. 2009.
- HASHIMOTO, Y.; AKIYAMA, Y.; YUASA, Y. Multiple-to-multiple relationships between microRNAs and target genes in gastric cancer. **PloS one**, v. 8, n. 5, p. e62589, jan. 2013.
- HEBERT, C. et al. High mobility group A2 is a target for miRNA-98 in head and neck squamous cell carcinoma. **Molecular cancer**, v. 6, p. 5, jan. 2007.
- HLADUNEWICH, M.; KARUMANCHI, S. A.; LAFAYETTE, R. Pathophysiology of the clinical manifestations of preeclampsia. **Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN**, v. 2, n. 3, p. 543–549, 2007.
- HU, Y. et al. Differential expression of microRNAs in the placentae of Chinese patients with severe pre-eclampsia. **Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC**, v. 47, n. 8, p. 923–9, jan. 2009.
- HUA, Z. et al. MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia. **PloS one**, v. 1, p. e116, jan. 2006.
- HUBEL, C. A. Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)**, v. 222, n. 3, p. 222–35, dez. 1999.
- HUTCHEON, J. A.; LISONKOVA, S.; JOSEPH, K. S. Epidemiology of pre-eclampsia and the other hypertensive disorders of pregnancy. **Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology**, v.

25, n. 4, p. 391–403, ago. 2011.

ISHIDA, N. et al. Differential activities of two distinct endothelin family peptides on ileum and coronary artery. **FEBS letters**, v. 247, n. 2, p. 337–40, 24 abr. 1989.

JAIN, A. et al. Endothelin-1 induces endoplasmic reticulum stress by activating the PLC-IP(3) pathway: implications for placental pathophysiology in preeclampsia. **The American journal of pathology**, v. 180, n. 6, p. 2309–20, jun. 2012.

KASSAB, S. et al. Endothelin-A receptor antagonism attenuates the hypertension and renal injury in Dahl salt-sensitive rats. **Hypertension**, v. 31, n. 1 Pt 2, p. 397–402, jan. 1998.

KHONG, T. Y. et al. Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. **British journal of obstetrics and gynaecology**, v. 93, n. 10, p. 1049–59, out. 1986.

KIPRONO, L. V et al. Progesterone blunts vascular endothelial cell secretion of endothelin-1 in response to placental ischemia. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 209, n. 1, p. 44.e1–6, jul. 2013a.

KIPRONO, L. V. et al. Progesterone blunts vascular endothelial cell secretion of endothelin-1 in response to placental ischemia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 209, n. 1, p. 44.e1–44.e6, 2013b.

KOHNO, M. et al. Effect of the endothelin family of peptides on human coronary artery smooth-muscle cell migration. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 31 Suppl 1, p. S84–9, jan. 1998.

KOMURO, I. et al. Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. **FEBS letters**, v. 238, n. 2, p. 249–52, 10 out. 1988.

KOZOMARA, A.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. **Nucleic acids research**, v. 42, n. Database issue, p. D68–73, jan. 2014.

KRONBORG, C. S.; KNUDSEN, U. B.; MARTENSEN, P. M. Differential regulation of the interferon induced gene ISG12A by serum from healthy and preeclamptic pregnancies. **Cytokine**, v. 42, n. 1, p. 105–112, 2008.

KULSHRESHTHA, R. et al. Regulation of microRNA expression: the hypoxic component. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 6, n. 12, p. 1426–31, 15 jun. 2007.

LAMARCA, B. D.; GILBERT, J.; GRANGER, J. P. Recent progress toward the understanding of the pathophysiology of hypertension during preeclampsia. **Hypertension**, v. 51, n. 4 PART 2 SUPPL., p. 982–988, 2008.

LAURENTI, R.; JORGE, M. H. P. D. M.; GOTLIEB, S. L. D. A mortalidade materna nas capitais brasileiras: algumas características e estimativa de um fator de ajuste. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 4, p. 449–460, 2004.

LI, Z. et al. Recombinant Vascular Endothelial Growth Factor 121 Attenuates Hypertension and Improves Kidney Damage in a Rat Model of Preeclampsia. **Hypertension**, v. 50, n. 4, p. 686–692, 27 ago. 2007.

LIE, R. T. et al. Fetal and maternal contributions to risk of pre-eclampsia: population based study. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 316, n. 7141, p. 1343–7, 2 maio 1998.

LISONKOVA, S.; JOSEPH, K. S. Incidence of preeclampsia: risk factors and outcomes associated with early- versus late-onset disease. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 209, n. 6, p. 544.e1–544.e12, dez. 2013.

LUO, Z.-C. et al. The effects and mechanisms of primiparity on the risk of pre-eclampsia: a systematic review. **Paediatric and perinatal epidemiology**, v. 21 Suppl 1, p. 36–45, jul. 2007.

LUQUE, A. et al. Usefulness of circulating microRNAs for the prediction of early preeclampsia at first-trimester of pregnancy. **Scientific reports**, v. 4, p. 4882, 2014.

- MACK, G. S. MicroRNA gets down to business. **Nature biotechnology**, v. 25, n. 6, p. 631–8, jun. 2007.
- MACKENZIE, R. M. et al. Endothelial FOS expression and pre-eclampsia. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 119, n. 13, p. 1564–1571, 2012.
- MAKRIS, A. et al. Uteroplacental ischemia results in proteinuric hypertension and elevated sFLT-1. **Kidney international**, v. 71, n. 10, p. 977–84, maio 2007.
- MALASSINÉ, A. et al. Localization and production of immunoreactive endothelin-1 in the trophoblast of human placenta. **Cell and tissue research**, v. 271, n. 3, p. 491–7, mar. 1993.
- MALTARIS, T. et al. Increased uterine arterial pressure and contractility of perfused swine uterus after treatment with serum from pre-eclamptic women and endothelin-1. **Clinical Science**, v. 109, n. 2, p. 209–215, 1 ago. 2005.
- MAYNARD, S. E. et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. **The Journal of clinical investigation**, v. 111, n. 5, p. 649–58, mar. 2003.
- MOFFETT-KING, A. Natural killer cells and pregnancy. **Nature reviews. Immunology**, v. 2, n. 9, p. 656–63, set. 2002.
- MONTGOMERY, R. L.; VAN ROOIJ, E. Therapeutic advances in MicroRNA targeting. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 57, n. 1, p. 1–7, jan. 2011.
- MURPHY, S. R. et al. Role of endothelin in mediating soluble fms-like tyrosine kinase 1-induced hypertension in pregnant rats. **Hypertension**, v. 55, n. 2, p. 394–8, fev. 2010.
- MUTTER, W. P.; KARUMANCHI, S. A. Molecular mechanisms of preeclampsia. **Microvascular Research**, v. 75, n. 1, p. 1–8, jan. 2008.
- MYERS, J. E. et al. MMP-2 levels are elevated in the plasma of women who subsequently develop preeclampsia. **Hypertension in pregnancy**, v. 24, n. 2, p. 103–15, jan. 2005.
- NAPOLITANO, M. et al. Expression and relationship between endothelin-1 messenger ribonucleic acid (mRNA) and inducible/endothelial nitric oxide synthase mRNA isoforms from normal and preeclamptic placentas. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 85, n. 6, p. 2318–23, jun. 2000.
- NARUMIYA, H. et al. Matrix metalloproteinase-2 is elevated in the plasma of women with preeclampsia. **Hypertension in pregnancy**, v. 20, n. 2, p. 185–94, jan. 2001.
- NELSON, J. et al. The endothelin axis: emerging role in cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 2, p. 110–6, fev. 2003.
- NETO, C. N.; SOUZA, A. S. R. DE; AMORIM, M. M. R. Tratamento da pré-eclâmpsia baseado em evidências. **Rev Bras Ginecol Obstet. Rio de Janeiro**, v. 32, p. 459–468, 2010.
- NISHIKAWA, S. et al. The relationship between serum nitrate and endothelin-1 concentrations in preeclampsia. **Life sciences**, v. 67, n. 12, p. 1447–54, 11 ago. 2000.
- PINELES, B. L. et al. Distinct subsets of microRNAs are expressed differentially in the human placentas of patients with preeclampsia. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 196, n. 3, p. 261.e1–6, mar. 2007.
- PRIDJIAN, G.; PUSCHETT, J. B. Preeclampsia. Part 1: clinical and pathophysiologic considerations. **Obstetrical & gynecological survey**, v. 57, n. 9, p. 598–618, set. 2002.
- RANG, H. P. et al. *Farmacologia*. 6ª edição. Rio de Janeiro. Elsevier, 2007.
- REGE, S. D. et al. Noncoding RNAs in Neurodegenerative Diseases. **ISRN neurology**, v. 2013, p. 375852, jan. 2013.
- Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure

in Pregnancy. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 183, n. 1, p. S1–S22, jul. 2000.

ROBERTS, L. et al. Enhanced endothelin synthesis by endothelial cells exposed to sera from pregnant rats with decreased uterine perfusion. **Hypertension**, v. 47, n. 3, p. 615–8, mar. 2006.

RODRIGUEZ-VITA, J. et al. Endothelin-1, via ETA receptor and independently of transforming growth factor-beta, increases the connective tissue growth factor in vascular smooth muscle cells. **Circulation research**, v. 97, n. 2, p. 125–34, 22 jul. 2005.

RUBANYI, G. M.; POLOKOFF, M. A. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. **Pharmacological reviews**, v. 46, n. 3, p. 325–415, set. 1994.

SABATEL, C. et al. MicroRNA-21 exhibits antiangiogenic function by targeting RhoB expression in endothelial cells. **PloS one**, v. 6, n. 2, p. e16979, jan. 2011.

SANDRIM, V. C. et al. eNOS haplotypes affect the responsiveness to antihypertensive therapy in preeclampsia but not in gestational hypertension. **The pharmacogenomics journal**, v. 10, n. 1, p. 40–45, 2010.

SANKARALINGAM, S.; XU, H.; DAVIDGE, S. T. Arginase contributes to endothelial cell oxidative stress in response to plasma from women with preeclampsia. **Cardiovascular Research**, v. 85, n. 1, p. 194–203, 2010.

SARGENT, I. L.; BORZYCHOWSKI, A. M.; REDMAN, C. W. G. Immunoregulation in normal pregnancy and pre-eclampsia: an overview. **Reproductive biomedicine online**, v. 14 Spec No, p. 111–7, jan. 2007.

SCALERA, F. et al. Serum from healthy pregnant women reduces oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 103, n. 1, p. 53–57, 2002.

SCALERA, F.; SCHLEMBACH, D.; BEINDER, E. Production of vasoactive substances by human umbilical vein endothelial cells after incubation with serum from preeclamptic patients. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v. 99, n. 2, p. 172–178, 2001.

SCHIFFRIN, E. L. Endothelin: potential role in hypertension and vascular hypertrophy. **Hypertension**, v. 25, n. 6, p. 1135–43, jun. 1995.

SHUKLA, G. C.; SINGH, J.; BARIK, S. MicroRNAs: Processing, Maturation, Target Recognition and Regulatory Functions. **Molecular and cellular pharmacology**, v. 3, n. 3, p. 83–92, jan. 2011.

SIBAI, B. M. et al. Risk factors for preeclampsia in healthy nulliparous women: a prospective multicenter study. The National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 172, n. 2 Pt 1, p. 642–8, fev. 1995.

SIDDIQI, T. et al. Hypertension during pregnancy in insulin-dependent diabetic women. **Obstetrics and gynecology**, v. 77, n. 4, p. 514–9, abr. 1991.

SOON, P.; KIARIS, H. MicroRNAs in the tumour microenvironment: big role for small players. **Endocrine-related cancer**, v. 20, n. 5, p. R257–67, out. 2013.

STONE, J. L. et al. Risk factors for severe preeclampsia. **Obstetrics and gynecology**, v. 83, n. 3, p. 357–61, mar. 1994.

STRUCK, J.; MORGENTHALER, N. G.; BERGMANN, A. Proteolytic processing pattern of the endothelin-1 precursor in vivo. **Peptides**, v. 26, n. 12, p. 2482–6, dez. 2005.

SUNDERLAND, N.; HENNESSY, A.; MAKRIS, A. Animal models of pre-eclampsia. **American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)**, v. 65, n. 6, p. 533–41, jun. 2011.

SUZUKI, H. et al. Effect of Recombinant Placental Growth Factor 2 on Hypertension Induced by Full-Length Mouse Soluble fms-Like Tyrosine Kinase 1 Adenoviral Vector in Pregnant Mice. **Hypertension**, v. 54, n. 5, p. 1129–1135, 28 set. 2009.

- TADDEI, S. et al. Vasoconstriction to endogenous endothelin-1 is increased in the peripheral circulation of patients with essential hypertension. **Circulation**, v. 100, n. 16, p. 1680–3, 19 out. 1999.
- TADDEI, S.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent contractions to endothelin in the rat aorta are mediated by thromboxane A<sub>2</sub>. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 22 Suppl 8, p. S328–31, jan. 1993.
- TAKAGI, Y. et al. Levels of oxidative stress and redox-related molecules in the placenta in preeclampsia and fetal growth restriction. **Virchows Archiv : an international journal of pathology**, v. 444, n. 1, p. 49–55, jan. 2004.
- TAYLOR, R. N. et al. Women with Preeclampsia have Higher Plasma Endothelin Levels than Women with Normal Pregnancies. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 71, n. 6, p. 1675–1677, dez. 1990.
- THOMSON, D. W.; BRACKEN, C. P.; GOODALL, G. J. Experimental strategies for microRNA target identification. **Nucleic acids research**, v. 39, n. 16, p. 6845–53, 1 set. 2011.
- TRACLEER: bosentana. Fernanda Mendes. Ontario: Patheon, [2001]. Bula de remédio.
- URA, B. et al. Potential role of circulating microRNAs as early markers of preeclampsia. **Taiwanese journal of obstetrics & gynecology**, v. 53, n. 2, p. 232–4, jun. 2014.
- VADILLO-ORTEGA, F. et al. Effect of supplementation during pregnancy with L-arginine and antioxidant vitamins in medical food on pre-eclampsia in high risk population: randomised controlled trial. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 342, p. d2901, jan. 2011.
- VON DADELSZEN, P.; MAGEE, L. A.; ROBERTS, J. M. Subclassification of Preeclampsia. **Hypertension in Pregnancy**, v. 22, n. 2, p. 143–148, jan. 2003.
- WANG, S. et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. **Developmental cell**, v. 15, n. 2, p. 261–71, ago. 2008.
- WANG, W. et al. Preeclampsia up-regulates angiogenesis-associated microRNA (i.e., miR-17, -20a, and -20b) that target ephrin-B2 and EPHB4 in human placenta. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 97, n. 6, p. E1051–9, jun. 2012.
- YANAGISAWA, M.; KURIHARA, H.; KIMURA, S. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **nature**, 1988.
- YUNG, H. et al. Evidence of placental translation inhibition and endoplasmic reticulum stress in the etiology of human intrauterine growth restriction. **The American journal of pathology**, v. 173, n. 2, p. 451–62, ago. 2008.
- ZAMMIT, V. C.; WHITWORTH, J. A.; BROWN, M. A. Preeclampsia: The effects of serum on endothelial cell prostacyclin, endothelin, and cell membrane integrity. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 174, n. 2, p. 737–743, 1996.
- ZHANG, Y. et al. Elevated levels of hypoxia-inducible microRNA-210 in pre-eclampsia: new insights into molecular mechanisms for the disease. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 16, n. 2, p. 249–59, fev. 2012.
- ZHAO, Z.; MOLEY, K. H.; GRONOWSKI, A. M. Diagnostic potential for miRNAs as biomarkers for pregnancy-specific diseases. **Clinical biochemistry**, v. 46, n. 10-11, p. 953–60, jul. 2013.
- ZHOU, Y.; DAMSKY, C. H.; FISHER, S. J. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One cause of defective endovascular invasion in this syndrome? **The Journal of clinical investigation**, v. 99, n. 9, p. 2152–64, 1 maio 1997.
- ZHU, X. et al. Differential expression profile of microRNAs in human placentas from preeclamptic pregnancies vs normal pregnancies. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 200, n. 6, p. 661.e1–7, jun. 2009.

## MANUSCRITO REFERENTE AO PROJETO DE MESTRADO

### RESUMO

Estudos demonstraram que a incubação de plasma de gestantes que posteriormente desenvolveram pré-eclâmpsia em células endoteliais prejudica o funcionamento dessas células, porém nenhum estudo examinou a expressão de microRNAs em células endoteliais incubadas com plasma dessas gestantes. Este estudo investigou os efeitos da incubação do plasma de gestantes que posteriormente desenvolveram pré-eclâmpsia e gestantes que permaneceram saudáveis na expressão de 84 genes relacionados à biologia da célula endotelial através de PCR-array em células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs). Em células incubadas com plasma de gestantes que posteriormente desenvolveram pré-eclâmpsia, a expressão do gene *EDNI*, que codifica a ET-1, estava significativamente aumentada em relação às gestantes que permaneceram saudáveis. Em seguida, a expressão de *EDNI* e os níveis de ET-1 foram quantificados em HUVECs incubadas com plasma de gestantes que já desenvolveram pré-eclâmpsia e gestantes saudáveis. A expressão de *EDNI* foi similar nos grupos, porém os níveis de ET-1 estavam reduzidos após o desenvolvimento da pré-eclâmpsia. Posteriormente, foi realizada a expressão de microRNAs, preditos em atuar no gene *EDNI*, nas HUVECs. A expressão dos microRNAs miR-125a, 125b, let-7a, let-7b e let-7c estava aumentada em HUVECs incubadas com plasma de gestantes pré-eclâmplicas. Correlações inversas significativas entre a expressão dos microRNAs da família let-7 e os níveis de ET-1 foram encontradas após o desenvolvimento da pré-eclâmpsia, principalmente em células incubadas com plasma de gestantes pré-eclâmplicas que são não-responsivas ao tratamento com anti-hipertensivos. Portanto, este estudo propõe a regulação pelos microRNAs como forma de explicar a diminuição nos níveis de ET-1 quando a pré-eclâmpsia já está estabelecida. Os resultados sugerem que os microRNAs podem ser um mecanismo protetor na pré-eclâmpsia, através da supressão dos níveis de ET-1.

**Palavras-chave:** pré-eclâmpsia; endotelina-1; microRNAs; HUVECs; anti-hipertensivos

**TITLE PAGE****Potential protective mechanism by miRNAs on endothelin-1 expression in endothelial cells incubated with plasma from preeclampsia**

Mayara Caldeira-Dias<sup>1</sup>, Marcelo R. Luizon<sup>1</sup>, Elenice Deffune<sup>2</sup>, Jose E. Tanus-Santos<sup>3</sup>, Robson F. Carvalho<sup>4</sup>, Heloíza Bettiol<sup>5</sup>, Viviane C. Cardoso<sup>5</sup>, Ricardo C. Cavalli<sup>6</sup>, and Valeria C. Sandrim<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, Institute of Biosciences of Botucatu, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, Distrito Rubiao Junior, SP, 18618-000, Brazil.

<sup>2</sup>Blood Transfusion Center, Cell Engineering Laboratory, Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, 18618-000, Brazil.

<sup>3</sup>Department of Pharmacology, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirao Preto, SP, 14049-900, Brazil.

<sup>4</sup>Department of Morphology, Institute of Biosciences of Botucatu, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, Distrito Rubiao Junior, SP, 18618-000, Brazil

<sup>5</sup>Department of Pediatrics, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirao Preto, SP, 14049-900, Brazil.

<sup>6</sup>Department of Gynecology and Obstetrics, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, Ribeirao Preto, SP, 14049-900, Brazil.

**\*Author for correspondence: Valeria C. Sandrim** – Department of Pharmacology, Institute of Biosciences of Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, Distrito Rubiao Junior, SP, Brazil, Zip-code 18618-000 – E-mail: valeria.sandrim@ibb.unesp.br

***Brief short title*** – ET-1 and miRs in HUVECs treated with plasma

**Competing financial interests:**

The authors declare no competing financial interests

## ABSTRACT

**Objectives of the study:** Plasma from pregnant women who subsequently developed preeclampsia was shown to impair the endothelial function in endothelial cells. However, no study has examined miRNA expression in endothelial cells incubated with plasma from preeclamptic women. **Methods:** We examined the effects of plasma incubation from pregnant who subsequently developed preeclampsia (cases) and from healthy pregnant (controls) on the expression of 84 genes related to endothelial cell biology using PCR-array in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Results:** Higher *EDNI* expression and ET-1 levels were found in cases. Next, we quantified *EDNI* expression and ET-1 levels in HUVECs incubated with plasma from pregnant who had already developed preeclampsia and healthy pregnant. While *EDNI* expression was similar between groups, ET-1 levels were reduced after preeclampsia development. We then examined whether miRNAs that were predicted to target *EDNI* could modulate ET-1 levels in HUVECs. Inverse correlations between the expression of miRNAs of let-7 family and ET-1 levels were found after preeclampsia development and in patients nonresponsive to antihypertensive therapy. **Conclusions:** We propose that regulation by miRNAs as a mechanism explaining the decreased ET-1 levels when the symptoms of preeclampsia are already established. Our findings suggest that miRNAs may be a protective mechanism in preeclampsia, by suppressing ET-1 levels.

**Key-words:** preeclampsia; endothelin-1; microRNAs; HUVEC; antihypertensive



## INTRODUCTION

Preeclampsia is a multisystem syndrome characterized by hypertension and proteinuria that occurs after 20 weeks of gestation <sup>1</sup>. Preeclampsia affects approximately 2 to 8% of all pregnancies and is the main cause of maternal and fetal morbidity and mortality <sup>2,3</sup>. In preeclampsia, the ischemic placental tissue produces and releases factors and debris into the maternal circulation leading to endothelial dysfunction, and the subsequent multisystem dysfunction characteristic of preeclampsia <sup>4,5</sup>. Interestingly, plasma taken from pregnant women who subsequently developed preeclampsia was shown to impair the endothelial function in myometrial vessels <sup>6</sup> and to dysregulate *c-FOS* expression in endothelial cells <sup>7</sup>. In addition, the incubation of serum or plasma from women with clinical symptoms of preeclampsia also induced alterations of endothelial cells *in vitro* <sup>8,9</sup>, such as the modified expression of the potent vasoconstrictor peptide endothelin-1 (ET-1) <sup>10,11</sup>.

ET-1 is the most abundant member of endothelins family, and is synthesized and secreted by a variety of cell types, including syncytiotrophoblast and endothelial cells <sup>12</sup>. The effects of ET-1 are mediated by its interaction with endothelin A and B receptors, which trigger signaling events in a broad variety of target tissues <sup>13,14</sup>. Due to its potent vasoconstrictor effect, ET-1 has been extensively studied in preeclampsia <sup>15–18</sup>. Recently, ET-1 was suggested to promote oxidative and endoplasmic reticulum stress in preeclampsia <sup>19</sup>.

Interestingly, microRNAs (miRNAs) are mechanistically involved in the regulation of the ET-1 gene (*EDN1*), and miR-1 was shown to regulate *EDN1* in glucose-induced endothelial cell damage <sup>20</sup>. MiRNAs are small (18–24 nt) endogenous noncoding single-stranded RNAs that post-transcriptionally regulate gene expression by repressing protein expression <sup>21</sup>. Mounting evidence for alterations in miRNA expression has been found in placental tissue and plasma or serum from preeclampsia compared to healthy pregnant, suggesting that miRNAs may contribute to preeclampsia <sup>22–26</sup>. However, no study has examined miRNA expression in endothelial cells incubated with plasma from preeclamptic women.

In the present study, we first evaluated the expression of 84 genes critically involved in endothelial cell biology using PCR-array in endothelial cells incubated with plasma from pregnant women who subsequently developed preeclampsia (i.e., the

plasma was collected before the onset of clinical symptoms; cases), and with plasma from pregnant who remained healthy during gestation (controls). *EDNI* gene showed the highest difference in expression between case and control groups. Therefore, we examined the ET-1 expression levels in endothelial cells incubated with plasma from pregnant women who had already developed preeclampsia (i.e., the plasma was collected after the onset of clinical symptoms) and from healthy pregnant (control group). Next, we examined whether miRNAs that putatively target *END1* could modulate the ET-1 levels in endothelial cells. Finally, we quantified the circulating ET-1 levels in plasma samples from subjects in all the study groups to validate our *in vitro* findings.

## **METHODS**

### ***Study population***

This study was approved by the Institutional Review Board at Ribeirão Preto Medical School, Brazil, and subjects gave written informed consent. Regarding samples collected before clinical symptoms of preeclampsia, subjects were evaluated between 20 to 25 week of gestation, and plasma samples were collected at the moment, before the onset of clinical symptoms from pregnant women who subsequently developed preeclampsia (case group). Inclusion criterion was to have performed the first ultrasound exam before 20 weeks of gestation. Exclusion criterion was multiple pregnancies. As the control group, we used plasma samples from pregnant women who remained healthy along the pregnancy. Regarding the samples collected after clinical symptoms of preeclampsia, pregnant (both controls and cases) were on ambulatory of our hospital. All samples were stored and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Preeclampsia was characterized as systolic blood pressure (SBP)  $\geq 140$  mmHg and diastolic blood pressure (DBP)  $\geq 90$  mmHg on two occasions more than 4 hours apart, occurring after 20 weeks of gestation in a previously normotensive women, in association with proteinuria ( $\geq 300$  mg/24-hour urine)<sup>44</sup>. Preeclampsia patients were clinically classified as responsive and nonresponsive according to the responsiveness criteria to antihypertensive therapy previously established by our group, as described in detail elsewhere<sup>45</sup>. We have increased the sample size to increase the statistical power in the studies with plasma biomarkers.

### ***Endothelial cell culture and plasma incubation***

The human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) line (CRL 2873) was obtained from American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA, USA). HUVECs were cultured in DMEM medium (Gibco, CA, USA) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (FCS) (Gibco), 50 µg/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin and 0,5 µg/ml amphotericin B (Gibco) at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> incubator. Cells were expanded in 75-cm<sup>2</sup> tissue culture flasks (Corning, Costar, Netherlands) and after reaching 80% confluence, they were detached from the flask surface by trypsin/EDTA (0.5/0.2 mg/ml in phosphate-buffered saline, PBS) and split at a 1:3 ratio into 25-cm<sup>2</sup> flasks. At passage 3, HUVECs were resuspended in DMEM medium and re-plated in 48-well tissue culture plates (Corning), where they were grown to 80% confluence for plasma incubation. After reaching confluence, the medium was removed and the cells were washed twice in PBS. Then, cells were incubated in medium with 20% (v/v) plasma from healthy pregnant or preeclamptic patients for 24 hours at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

### ***RNA isolation***

Total RNA from HUVECs incubated with plasma from healthy pregnant and preeclamptic patients was isolated using the miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Leusden, Netherlands) according to the manufacturer's protocol. Quantification and purity of isolated RNA was performed using the NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Scientific, MA, USA), which was consistently found to be pure.

### ***PCR-array analysis for mRNA expression***

RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Human Endothelial Cell Biology (Qiagen®-PAHS-015ZC) was used to verify the expression of 84 genes related to endothelial cell biology, as well as five housekeeping genes. Before gene expression analysis using RT<sup>2</sup> Profiler PCR Arrays, the RT<sup>2</sup> RNA QC PCR Array (Qiagen®) was performed to assess the quality of isolated RNA, according to the manufacturer's protocol. The array contains controls for RNA integrity, the presence of inhibitors of reverse transcription and PCR amplification, and the presence of genomic or other DNA contamination. All RNA samples were consistently found to be intact and pure.

For the PCR array, total RNA was converted into cDNA using the RT<sup>2</sup> First Strand Kit (Qiagen®), according to the manufacturer's protocol. Real time PCR was performed

using the RT<sup>2</sup> SYBR Green qPCR Mastermix (Qiagen®) contained 1350 µL of SYBR Green Master Mix, 1248 µL of RNase-free water and 102 µL of cDNA from each sample in a 2700 µL final volume per plate. The thermal cycling was performed using the following cycling conditions: 10 minutes at 95°C, 40 two-step cycles of 15 seconds at 95°C and 60 seconds at 60°C, and a final step for the dissociation curve. Relative quantification was calculated using the comparative  $\Delta\Delta C_T$  method<sup>46</sup>.

### ***RNA expression by RT-qPCR***

In order to validate the differential mRNA expression findings in the PCR-array, real time PCR was performed using the KiCqStart Universal SYBR Green qPCR (Sigma-Aldrich, Poole, UK). For the real time PCR, the same isolated RNAs used in the PCR array were used as templates using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, ON, Canada) according to the manufacturer's protocol. Each reaction contained 10 µL KiCqStart SYBR Green qPCR Ready Mix, 300 nM of the each primer (forward and reverse), and variable amount of nuclease-free water and 5 µL of cDNA in a 20 µL final volume. The following primers were synthesized by Sigma-Aldrich: *EDN1*, forward 5'CAAGCAGGAAAAGAACTCAG-3' and reverse 5'CTGGTTTGTCTTAGGTGTTC-3'; *HPRT1*, forward 5'ATAAGCCAGACTTTGTTGG-3' and reverse 5'ATAGGACTCCAGATGTTTCC-3'. The *HPRT1* gene was chose as endogenous control as it was the housekeeping gene most stable in the samples based on the housekeeping genes panel from the RT<sup>2</sup> RNA QC PCR Array (Qiagen®). Thermal cycling was performed using the following cycling conditions: 10 minutes at 95°C, 40 two-step cycles of 15 seconds at 95°C and 60 seconds at 60°C, and a final step for the dissociation curve for both primers. Relative quantification was calculated using the comparative  $\Delta\Delta C_T$  method<sup>46</sup>. *HPRT1* was used as reference gene in the next steps because it was the most stable gene in PCR-array.

### ***MiRNAs selection***

We selected validated and predicted miRNAs to target messenger RNA (mRNA) of the *EDN1* gene using the following criteria (Table S1):

- 1- Based on bioinformatics analysis using two databases (Microna.org and miRWalk 2.0<sup>47</sup>);
- 2- The predicted miRNAs found using the databases were selected based on two sub-criteria:

2.1- MiRNAs expressed in human umbilical vein endothelial cell line (HUVEC)<sup>48</sup>;

2.2- MiRNAs reported or associated with preeclampsia<sup>22-24</sup>.

### ***MiRNA expression by RT-qPCR***

Reverse transcription (RT) was performed using the miScript II RT kit (Qiagen®), according to the manufacturer's protocol. The reaction was performed from total isolated RNA using miScript HiSpec Buffer, which selectively convert mature miRNAs and certain small nucleolar RNAs and small nuclear RNAs into cDNA. For the real time PCR, the miScript SYBR® Green PCR Kit (Qiagen®) were used and each reaction contained 10 µL of QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 2 µL of universal primer, 2 µL of each primer of miRNA, 4 µL of nuclease-free water and 2 µL in cDNA in a 20 µL final volume. The primers of the selected miRNAs were obtained from Qiagen®. The thermal cycling was performed using the following cycling conditions: 15 minutes at 95°C, 40 three-step cycles of 15 seconds at 94°C, 30 seconds at 55°C and 30 seconds at 70°C, and a final step for the dissociation curve. Relative quantification was calculated using the comparative  $\Delta\Delta C_T$  method<sup>46</sup> and normalization was performed to U6 snRNA. In all PCR reactions each sample were performed in duplicate.

### ***Measurement of ET-1 concentration***

The ET-1 concentrations in the HUVECs culture supernatants and plasma samples were measured using enzyme-linked immunosorbent assay kit Quantikine® ELISA Endothelin-1 (R&D Systems, GmbH, Germany) according to the manufacturer's protocol.

### ***Statistical Analysis***

Clinical characteristics and ET-1 levels were compared between preeclampsia groups and their respective controls using t-test. One-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc tests were performed to compared the responsive (R) and nonresponsive (NR) subgroups of preeclampsia patients and control. Pearson's correlation coefficients were used in the correlation analysis. These statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, CA, USA). Gene and miRNA expression data

were analyzed by GeneGlobe Data Analysis Center (Qiagen®) online platform. For all tests, P value <0.05 (two-tailed) was considered significant.

## RESULTS

### Effects of plasma incubation on gene expression in HUVECs by PCR-array

The schematic diagram of the study workflow is shown in Figure S1. We compared the effect of plasma samples from pregnant women who subsequently developed preeclampsia (cases) and from pregnant who remained healthy during gestation (controls) on the gene expression using PCR-array in Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs). The clinical characteristics of the women whose plasma samples were collected and used to perform the *in vitro* studies are shown in Table 1. We observed increased systolic blood pressure (SBP) and reduced newborn weight (NBW) in cases compared to controls.

Out of the 84 genes involved in endothelial cell biology, we found higher expression of *END1* in HUVECs incubated with plasma samples from cases compared to those incubated with plasma samples from controls. Two methods of normalization were tested to evaluate the differences in mRNAs expressions between the groups: one based on manual normalization using housekeeping genes (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *HPRT1*, *RPL0*), and another based on full plate normalization. In both analysis, *END1* expression was upregulated in HUVECs incubated with plasma samples from cases compared to controls (Fold change of 2.3, P=0.002 and fold change of 2.5, P=0.000, respectively).

### *END1* expression and ET-1 levels in HUVECs incubated with plasma from pregnant women before and after the onset of preeclampsia symptoms

The *END1* expression and ET-1 levels in the supernatant of endothelial cells are shown in Figure 1A. HUVECs incubated with plasma from pregnant who subsequently developed preeclampsia showed higher *EDNI* expression ( $1.02 \pm 0.10$  vs.  $2.3 \pm 0.28$ , P=0.002) and ET-1 level ( $1.22 \pm 0.12$  vs.  $0.95 \pm 0.08$  pg/mL, P=0.040) compared to controls (Figure 1A; Before, left bars).

We next examined the *EDNI* expression and ET-1 levels in HUVECs incubated with plasma from women who had already developed preeclampsia and matched

controls (i.e., healthy pregnant). The clinical characteristics of pregnant women are shown in Table 1. We observed increased SBP, diastolic blood pressure (DBP) and reduced NBW values in the preeclampsia group compared to the control group. Interestingly, while the *EDNI* expression was similar between groups ( $1.02 \pm 0.21$  vs.  $1.19 \pm 0.21$ ,  $P=0.570$ ), the ET-1 levels were reduced in preeclampsia ( $1.78 \pm 0.21$  pg/mL vs.  $1.23 \pm 0.13$  pg/mL respectively,  $P=0.040$ ) compared to controls (Figure 1A, After, right bars).

#### **Antihypertensive therapy responsiveness**

We then examined the *EDNI* expression and ET-1 values in patients with preeclampsia clinically classified as responsive (R) or nonresponsive (NR) to the antihypertensive therapy. We found similar levels of *EDNI* expression between the R and NR subgroups ( $1.37 \pm 0.32$  vs  $1.02 \pm 0.23$ ,  $P>0.050$ ; Figure 1B), and reduced ET-1 levels in the NR subgroup compared to R group ( $1.10 \pm 0.12$  pg/mL vs  $1.85 \pm 0.29$  pg/mL,  $P=0.040$ , respectively; Figure 1B).

#### **Expression of miRNAs predicted to target *EDNI* in HUVECs incubated with plasma from preeclampsia and healthy pregnant**

Based on the differences in ET-1 levels between the HUVECs incubated with plasma from women who subsequently developed preeclampsia and from women who had already developed preeclampsia compared to their respective controls (Before and After in the Figure 1A, respectively), we hypothesized that some epigenetic mechanism could regulate ET-1 production by HUVECs. Therefore, we examined whether miRNAs that were predicted to target *EDNI* could modulate the ET-1 levels in HUVECs. We evaluated the expression of nine miRNAs (let-7a, let-7b, let-7c, miR-1, miR-125a, miR-125b, miR-135a, miR-144 and miR-199), and the reference control (RNU6-2). Four miRNAs were not expressed under our conditions (miR-1, miR-135a, miR-144 and miR-199). We found significant differences in miRNAs expression between cases and controls, both before and after preeclampsia development (Figure 1C). Importantly, the expressions of all miRNAs examined were higher after compared to before the development of preeclampsia symptoms. No significant difference in miRNAs expression was found between the R and NR subgroups (data not shown).

Next, we performed correlations analyses of miRNAs expression with ET-1 levels in control and case groups, including the responsive and nonresponsive subgroups (Table 2). Interestingly, we found significant inverse correlations between miRNAs levels of the let-7 family (a, b and c) and ET-1 levels in the group with preeclampsia, and notably in the NR subgroup of preeclampsia patients (Table 2).

In addition, we analyzed the miRNAs let-7a, b and c seed sequences between several species using the Geneious software 4.8.5 (<http://www.geneious.com/>)<sup>27</sup> (Table S2). The results between species showed a high conservation of the nucleotide sequences, which contributes to confirm the interaction between these miRNAs and *EDNI* in HUVECs. Furthermore, we performed a bioinformatic prediction of the interactions between these miRNAs and *EDNI* using the RNAhybrid software (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>)<sup>28</sup>, which finds the minimum free energy (MFE) of hybridization and provides potential binding sites through nucleotide base complementarity. The MFEs were within accepted ranges (Figure S2).

#### **Plasma ET-1 levels in patients with preeclampsia**

Finally, we increased the sample size and quantified the plasma ET-1 levels in all the study groups in order to validate our *in vitro* findings. The clinical characteristics of each group and ET-1 values are shown in Table 3. For both the plasma samples collected before and after the onset of clinical symptoms of preeclampsia, we observed increased SBP and DBP in the preeclampsia groups (including the R and NR subgroups) compared to controls (healthy). Conversely, all preeclampsia and NR groups presented lower GA at delivery and NBW values compared to healthy controls. The NR subgroup showed reduced GA at delivery and NBW values compared to the R subgroup. We found higher ET-1 levels in women who subsequently developed preeclampsia compared to controls ( $P=0.020$ / Before, Table 3). Conversely, we found lower plasma ET-1 levels in women who had already developed preeclampsia compared to healthy ( $P=0.050$ ; After, Table 3). Regarding antihypertensive therapy responsiveness, the NR subgroup showed lower ET-1 levels compared to R subgroup ( $P=0.050$ , Table 3).



## DISCUSSION

This was the first study to evaluate the effects of plasma from pregnant with preeclampsia on expression of gene critically affecting endothelial cell biology using PCR-array. Our main findings are that plasma from pregnant women who subsequently developed preeclampsia (case group) increased *EDNI* expression in HUVECs as compared to plasma from healthy pregnant (control). However, *EDNI* expression was similar when pregnant had already shown the clinical symptoms of preeclampsia. Interestingly, although ET-1 levels in both supernatant and plasma were higher in the case group compared to the control group before the onset of symptoms, these levels were lower after the onset of symptoms of preeclampsia.

Discordant findings have been reported regarding the effects on ET-1 levels in endothelial cells incubated with plasma (collected after the onset of preeclampsia symptoms) from preeclamptic women<sup>10,29-31</sup>. An increased production of ET-1 was reported in endothelial cells incubated with serum (20%, v/v) from preeclamptic women compared with serum from normal pregnancy for 24h<sup>10</sup>. Conversely, other studies showed decreased ET-1 levels<sup>29,30</sup>, which are in agreement with our findings. However, it is important to note that these controversial findings may have resulted from differences in the experimental protocols, such as the percentage of serum concentration used during the incubation, time of incubation and proliferation, viability and type of HUVEC used (primary or immortalized cell line). In addition, no study had focused on the incubation with plasma collected before the onset of preeclampsia symptoms.

A possible explanation to our findings is that some protective mechanisms against ET-1 synthesis may have occurred. Interestingly, protective mechanisms against cell damage in preeclampsia were recently reported<sup>32</sup>. For example, the member of the small heat shock protein family HSP27 was induced in placental tissue from preeclamptic women activating a protective mechanism against oxidative and mechanical stress<sup>32</sup>. In the present study, we suggest that miRNAs may modulate ET-1 levels in HUVECs. Indeed, several studies have shown alterations in miRNAs expression in placental tissue and in plasma or serum from preeclampsia compared to healthy pregnant, suggesting a potential contribution of miRNAs in preeclampsia<sup>22-26</sup>.

We found higher miRNAs expression in preeclampsia groups both before and after the onset of preeclampsia symptoms. However, we found that *EDNI* expression

was similar between the preeclamptic groups and their respective controls. Since the expression of miRNAs increases in preeclampsia, such findings suggest that these miRNAs may be responsible for the decreased ET-1 production observed in preeclampsia. Therefore, we hypothesize that there might be a protective mechanism against the effects of ET-1, including the vasoconstriction, which is evident in pregnant with preeclampsia.

Interestingly, while most studies support the role of miRNAs in the disease pathophysiology<sup>25,33–36</sup>, our findings may suggest a beneficial effect of miRNAs in preeclampsia. In order to further support our hypothesis, we correlated the miRNAs expression with ET-1 levels in control (healthy) and preeclampsia groups, including the R and NR subgroups to antihypertensive therapy. We found a significant inverse correlation between miRNAs levels of the let-7 family (a, b and c) and ET-1 in the preeclampsia group, but not in healthy controls. Notably, this correlation was remarkable in the NR subgroup of preeclampsia patients. Therefore, these findings suggest that these miRNAs may have a relevant protective role in the NR patients.

Furthermore, the interaction between miRNAs and *EDNI* was confirmed by luciferase reporter assays. The let-7c inhibited luciferase activity by >50%, and let-7b also slightly suppressed the luciferase activity in gastric cancer cells<sup>37</sup>. Moreover, the interaction between miR-125a, miR-125b and *EDNI* was also reported in Human Embryonic Kidney cells (HEK293A)<sup>38</sup>. These functional studies validate the interaction between these miRNAs and *EDNI*, further supporting our hypothesis that these miRNAs modulate ET-1 levels, and this might reflect a protective mechanism. Notably, let-7e was upregulated in plasma samples from hypertensive patients compared to healthy controls, suggesting a role for the let-7 family members in hypertension<sup>39</sup>.

To our knowledge, the only study regarding the ET-1 levels in plasma samples from the first trimester of pregnancy (before the onset of symptoms) found higher ET-1 levels in samples from women who subsequently developed mild-severe preeclampsia and eclampsia<sup>40</sup>. These results are in agreement with our findings, and suggest that ET-1 may be a useful biomarker to help identify women at risk of developing preeclampsia. Plasma ET-1 levels in samples from pregnant women who had already developed preeclampsia were also lower than those found in the control group. However, this

finding is not in agreement with previous studies reporting significant increases in ET-1 levels in plasma from pregnant with preeclampsia compared with normal pregnant<sup>15-17</sup>.

In addition to vasoconstriction, ET-1 has pro-angiogenic effects<sup>41</sup>. ET-1 promotes HUVEC proliferation, migration, and invasion in a dose-dependent manner, mainly by activating endothelin receptors<sup>41</sup>. Since preeclampsia is characterized by an antiangiogenic status, these effects of ET-1 may reflect a protective mechanism. Moreover, the let-7 miRNA family plays an important role in angiogenesis<sup>42,43</sup>. Interestingly, let-7a, let-7b, let-7c, let-7f and let-7g were reduced by more than 30% in HUVECs through Droscha and Dicer knockdown, and this reduction significantly impairs the sprout formation<sup>42</sup>. In addition, the hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) induced let-7 expression in HUVECs, which targets argonaute 1 (*AGO1*) resulting in the translational desuppression of vascular endothelial growth factor (*VEGF*) mRNA, and consequently the suppression of angiogenesis<sup>43</sup>. Taken together, these findings suggest that the miRNAs let-7a, b and c may stimulate angiogenesis in preeclampsia, beyond the protective mechanism against vasoconstriction caused by ET-1.

In conclusion, we showed that ET-1 plasma levels decrease when the symptoms of preeclampsia are already established, which may reflect regulatory mechanisms underlying ET-1 actions in preeclamptic women. We propose here that one of these regulatory mechanisms may result from gene expression regulation by miRNAs, as we found significant inverse correlations between the expressions of the let-7a, b and c and the ET-1 levels in preeclamptic patients, but not in healthy pregnant. Our findings provide evidence that ET-1 play an important role in the development of preeclampsia, and suggest that ET-1 may be a useful biomarker to help identify women at risk to develop preeclampsia.

## REFERENCES

1. Sibai, B., Dekker, G. & Kupferminc, M. Pre-eclampsia. *Lancet* **365**, 785–799 (2005).
2. Duley, L. The Global Impact of Pre-eclampsia and Eclampsia. *Semin. Perinatol.* **33**, 130–137 (2009).
3. Hutcheon, J. A., Lisonkova, S. & Joseph, K. S. Epidemiology of pre-eclampsia and the other hypertensive disorders of pregnancy. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **25**, 391–403 (2011).
4. Roberts, J. M. Preeclampsia: what we know and what we do not know. *Semin. Perinatol.* **24**, 24–8 (2000).
5. Powe, C. E., Levine, R. J. & Karumanchi, S. A. Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. *Circulation* **123**, 2856–69 (2011).
6. Myers, J., Mires, G., Macleod, M. & Baker, P. In preeclampsia, the circulating factors capable of altering in vitro endothelial function precede clinical disease. *Hypertension* **45**, 258–263 (2005).
7. MacKenzie, R. M. *et al.* Endothelial FOS expression and pre-eclampsia. *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.* **119**, 1564–1571 (2012).
8. Wu, C., Huang, F., Sui, R. & Sun, J. Preeclampsia serum upregulates CD40/CD40L expression and induces apoptosis in human umbilical cord endothelial cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **10**, 28 (2012).
9. Calicchio, R. *et al.* Preeclamptic plasma induces transcription modifications involving the AP-1 transcriptional regulator JDP2 in endothelial cells. *Am. J. Pathol.* **183**, 1993–2006 (2013).
10. Scalera, F., Schlembach, D. & Beinder, E. Production of vasoactive substances by human umbilical vein endothelial cells after incubation with serum from preeclamptic patients. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **99**, 172–178 (2001).
11. Kiprono, L. V, Wallace, K., Moseley, J., Martin, J. & Lamarca, B. Progesterone blunts vascular endothelial cell secretion of endothelin-1 in response to placental ischemia. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **209**, 44.e1–6 (2013).
12. Malassiné, A., Cronier, L., Mondon, F., Mignot, T. M. & Ferré, F. Localization and production of immunoreactive endothelin-1 in the trophoblast of human placenta. *Cell Tissue Res.* **271**, 491–7 (1993).
13. Yanagisawa, M., Kurihara, H. & Kimura, S. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* (1988). at <<http://web.mit.edu/hst527/www/readings/Lecture11/Nature.pdf>>
14. Mazzuca, M. Q. *et al.* Downregulation of microvascular endothelial type B endothelin receptor is a central vascular mechanism in hypertensive pregnancy. *Hypertension* **64**, 632–43 (2014).
15. Vural, P. Nitric oxide / endothelin-1 in preeclampsia. **317**, 65–70 (2002).
16. Aydin, S. *et al.* Plasma malondialdehyde, superoxide dismutase, sE-selectin, fibronectin, endothelin-1 and nitric oxide levels in women with preeclampsia. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **113**, 21–5 (2004).

17. Bernardi, F., Constantino, L., MacHado, R., Petronilho, F. & Dal-Pizzol, F. Plasma nitric oxide, endothelin-1, arginase and superoxide dismutase in pre-eclamptic women. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* **34**, 957–963 (2008).
18. Verdonk, K. *et al.* Association studies suggest a key role for endothelin-1 in the pathogenesis of preeclampsia and the accompanying renin-angiotensin-aldosterone system suppression. *Hypertension* **65**, 1316–23 (2015).
19. Jain, A. Endothelin-1: a key pathological factor in pre-eclampsia? *Reprod. Biomed. Online* **25**, 443–9 (2012).
20. Feng, B., Cao, Y., Chen, S., Ruiz, M. & Chakrabarti, S. MiRNA-1 regulates endothelin-1 in diabetes. *Life Sci.* **98**, 18–23 (2014).
21. Bartel, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**, 215–33 (2009).
22. Li, H., Ge, Q., Guo, L. & Lu, Z. Maternal plasma miRNAs expression in preeclamptic pregnancies. *Biomed Res. Int.* **2013**, (2013).
23. Xu, P. *et al.* Variations of microRNAs in human placentas and plasma from preeclamptic pregnancy. *Hypertension* **63**, 1276–1284 (2014).
24. Wu, L. *et al.* Circulating microRNAs are elevated in plasma from severe preeclamptic pregnancies. *Reproduction* **143**, 389–97 (2012).
25. Jiang, F. *et al.* Upregulation of microRNA-335 and microRNA-584 contributes to the pathogenesis of severe preeclampsia through downregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Mol. Med. Rep.* (2015). doi:10.3892/mmr.2015.4018
26. Yan, T. *et al.* MicroRNA-126 regulates EPCs function: implications for a role of miR-126 in preeclampsia. *J. Cell. Biochem.* **114**, 2148–59 (2013).
27. Kearse, M. *et al.* Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* **28**, 1647–9 (2012).
28. Rehmsmeier, M., Steffen, P., Hochsmann, M. & Giegerich, R. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA* **10**, 1507–17 (2004).
29. Branch, D. W., Dudley, D. J. & Mitchell, M. D. Preliminary evidence for homeostatic mechanism regulating endothelin production in pre-eclampsia. *Lancet (London, England)* **337**, 943–5 (1991).
30. Zammit, V. C., Whitworth, J. a & Brown, M. a. Endothelium-derived prostacyclin: effect of serum from women with normal and hypertensive pregnancy. *Clin. Sci. (Lond)*. **82**, 383–388 (1992).
31. Gallery, E. D., Rowe, J., Campbell, S. & Hawkins, T. Effect of serum on secretion of prostacyclin and endothelin-1 by decidual endothelial cells from normal and preeclamptic pregnancies. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **173**, 918–923 (1995).
32. Abdulsid, A. & Lyall, F. Heat shock protein 27 expression is spatially distributed in human placenta and selectively regulated during preeclampsia. *J. Reprod. Immunol.* **101-102**, 89–95 (2014).
33. Anton, L., Olarerin-George, A. O., Hogenesch, J. B. & Elovitz, M. A. Placental expression of miR-517a/b and miR-517c contributes to trophoblast dysfunction and preeclampsia. *PLoS One* **10**, e0122707 (2015).

34. Luo, R. *et al.* MicroRNA-210 contributes to preeclampsia by downregulating potassium channel modulatory factor 1. *Hypertension* **64**, 839–45 (2014).
35. Li, X., Li, C., Dong, X. & Gou, W. MicroRNA-155 inhibits migration of trophoblast cells and contributes to the pathogenesis of severe preeclampsia by regulating endothelial nitric oxide synthase. *Mol. Med. Rep.* **10**, 550–4 (2014).
36. Wang, Y. *et al.* miR-16 inhibits the proliferation and angiogenesis-regulating potential of mesenchymal stem cells in severe pre-eclampsia. *FEBS J.* **279**, 4510–24 (2012).
37. Tsai, K.-W. *et al.* Emerging role of microRNAs in modulating endothelin-1 expression in gastric cancer. *Oncol. Rep.* **33**, 485–93 (2015).
38. Li, D. *et al.* MicroRNA-125a/b-5p inhibits endothelin-1 expression in vascular endothelial cells. *J. Hypertens.* **28**, 1646–54 (2010).
39. Li, S. *et al.* Signature microRNA expression profile of essential hypertension and its novel link to human cytomegalovirus infection. *Circulation* **124**, 175–84 (2011).
40. Shaarawy, M. & Abdel-Magid, a M. Plasma endothelin-1 and mean arterial pressure in the prediction of pre-eclampsia. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* **68**, 105–111 (2000).
41. Salani, D. *et al.* Endothelin-1 induces an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Am. J. Pathol.* **157**, 1703–11 (2000).
42. Kuehbachner, A., Urbich, C., Zeiher, A. M. & Dimmeler, S. Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ. Res.* **101**, 59–68 (2007).
43. Chen, Z. *et al.* Hypoxia-responsive miRNAs target argonaute 1 to promote angiogenesis. *J. Clin. Invest.* **123**, 1057–67 (2013).
44. Brown, M. A., Lindheimer, M. D., Swiet, M. de, Assche, A. Van & Moutquin, J.-M. THE CLASSIFICATION AND DIAGNOSIS OF THE HYPERTENSIVE DISORDERS OF PREGNANCY: STATEMENT FROM THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR THE STUDY OF HYPERTENSION IN PREGNANCY (ISSHP). *Hypertens. Pregnancy* **20**, ix–xiv (2001).
45. Sandrim, V. C. *et al.* eNOS haplotypes affect the responsiveness to antihypertensive therapy in preeclampsia but not in gestational hypertension. *Pharmacogenomics J.* **10**, 40–45 (2010).
46. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
47. Dweep, H. & Gretz, N. miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nat. Methods* **12**, 697 (2015).
48. McCall, M. N. *et al.* MicroRNA profiling of diverse endothelial cell types. *BMC Med. Genomics* **4**, 78 (2011).

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This study was funded by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brazil) and by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-Brazil). MR Luizon is a Young Talent Attraction Fellow from the CNPq-Brazil. We thank Helio Kushima for technical assistance in ELISA experiments and Ana Livia de Carvalho Bovolato for assistance in HUVEC culture and plasma incubation.

## **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

MCD designed the study, performed most of the experiments and was involved in the statistical analyses and in the manuscript writing. MRL performed analysis and was involved in the manuscript writing. ED directed the endothelial cell culture and plasma incubation experiments in her laboratory. RFC contributed ideas to the miRNA expression and its analyses and supervised the RT-qPCR experiments performed in his laboratory. RCC, HB and VCC were involved in the patient recruitment and samples collection and manuscript revision. JETS was involved in study designed. VCS co-designed and directed the study, performed most of the statistical analyses, had a role in the patient recruitment and samples collection and was involved in the manuscript writing. All authors reviewed the manuscript.

## TABLES

**Table 1.** Clinical characteristics of the women whose plasma samples were collected before and after the onset of clinical symptoms of preeclampsia, and used to performed *in vitro* studies. Values are the means  $\pm$  S.D. or percentage. \*  $P < 0.05$  vs controls.

Parameters	Clinical characteristics			
	Before		After	
	Controls	Cases	Healthy	Preeclampsia
N	6	6	10	15
Gestational age at sampling (weeks)	23 $\pm$ 2	23 $\pm$ 2	36 $\pm$ 2	35 $\pm$ 3
Age (years)	28 $\pm$ 5	28 $\pm$ 4	27 $\pm$ 5	26 $\pm$ 5
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	28 $\pm$ 4	30 $\pm$ 6	30 $\pm$ 4	31 $\pm$ 6
Systolic blood pressure (mmHg)	107 $\pm$ 9	118 $\pm$ 14*	113 $\pm$ 7	133 $\pm$ 12*
Diastolic blood pressure (mmHg)	65 $\pm$ 6	77 $\pm$ 15	73 $\pm$ 6	85 $\pm$ 8*
Newborn weight (g)	3825 $\pm$ 440	1942 $\pm$ 378*	3485 $\pm$ 225	2954 $\pm$ 805*

**Table 2.** Pearson correlation coefficients between Delta C<sub>T</sub> of miRNAs and ET-1 levels (plasma collected after the onset of clinical symptoms of preeclampsia).

miRNA	Antihypertensive Responsiveness			
	Healthy Pregnant	Preeclampsia	R	NR
miR-125a	-0.15 (P=0.6)	-0.47 (P=0.09)	0.10 (P=0.7)	-0.66 (P=0.07)
miR-125b	-0.41 (P=0.2)	-0.02 (P=0.9)	0.52 (P=0.2)	-0.69 (P=0.06)
let-7 <sup>a</sup>	-0.03 (P=0.9)	<b>-0.74 (P=0.003)</b>	-0.06 (P=0.8)	<b>-0.72 (P=0.04)</b>
let-7b	-0.01 (P=0.9)	<b>-0.76 (P=0.002)</b>	0.12 (P=0.7)	<b>-0.66 (P=0.08)</b>
let-7c	-0.06 (P=0.8)	<b>-0.78 (P=0.001)</b>	-0.03 (P=0.9)	<b>-0.70 (P=0.05)</b>



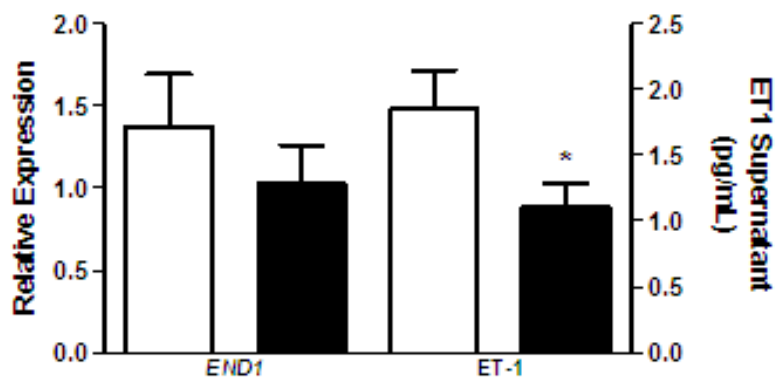
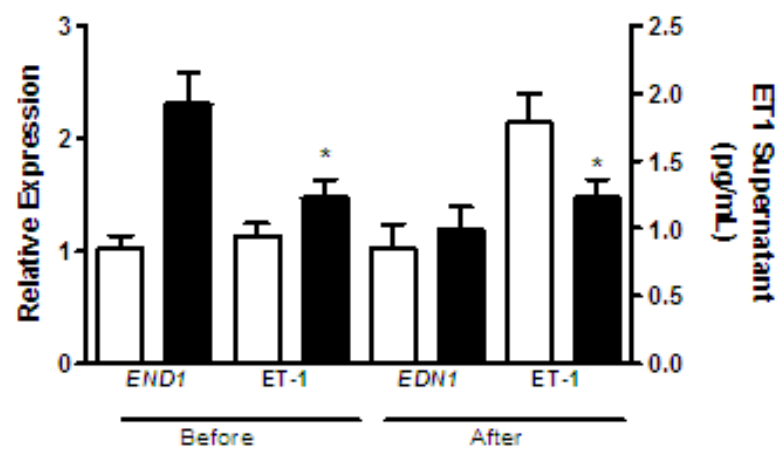
**Table 3.** Clinical characteristics of groups of patients from which plasma samples were used to quantify ET-1 levels. Values are the means  $\pm$  S.D. or percentage. \*  $P < 0.05$  vs. controls, #  $P < 0.05$  vs. Responsive.

Parameters	Clinical symptoms				Antihypertensive therapy responsiveness in preeclampsia	
	Before		After		Responsive	Non Responsive
	Control	Case	Healthy	Preeclampsia		
N	45	29	21	22	12	10
Gestational age of sampling (weeks)	24 $\pm$ 2	36 $\pm$ 4*	37 $\pm$ 2	35 $\pm$ 3*	36 $\pm$ 4	34 $\pm$ 3*
Age (years)	27 $\pm$ 6	28 $\pm$ 6	24 $\pm$ 5	27 $\pm$ 7	25 $\pm$ 6	29 $\pm$ 7
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	29 $\pm$ 4	31 $\pm$ 6	32 $\pm$ 5	33 $\pm$ 7	34 $\pm$ 8	32 $\pm$ 6
Systolic blood pressure (mmHg)	110 $\pm$ 10	142 $\pm$ 18*	113 $\pm$ 9	140 $\pm$ 14*	134 $\pm$ 15*	152 $\pm$ 17*#
Diastolic blood pressure (mmHg)	66 $\pm$ 6	85 $\pm$ 11*	71 $\pm$ 7	86 $\pm$ 10*	83 $\pm$ 11*	96 $\pm$ 12*#
Nulliparous (%)	36	38	57	45	58	30
Newborn weight (g)	2687 $\pm$ 963	2687 $\pm$ 963*	3393 $\pm$ 344	2819 $\pm$ 950*	3162 $\pm$ 633	2362 $\pm$ 1137*#
ET-1 levels (pg/mL)	0.61 $\pm$ 0.21	0.75 $\pm$ 0.29*	2.23 $\pm$ 1.3	1.53 $\pm$ 0.8*	1.80 $\pm$ 1.0	1.09 $\pm$ 0.4*

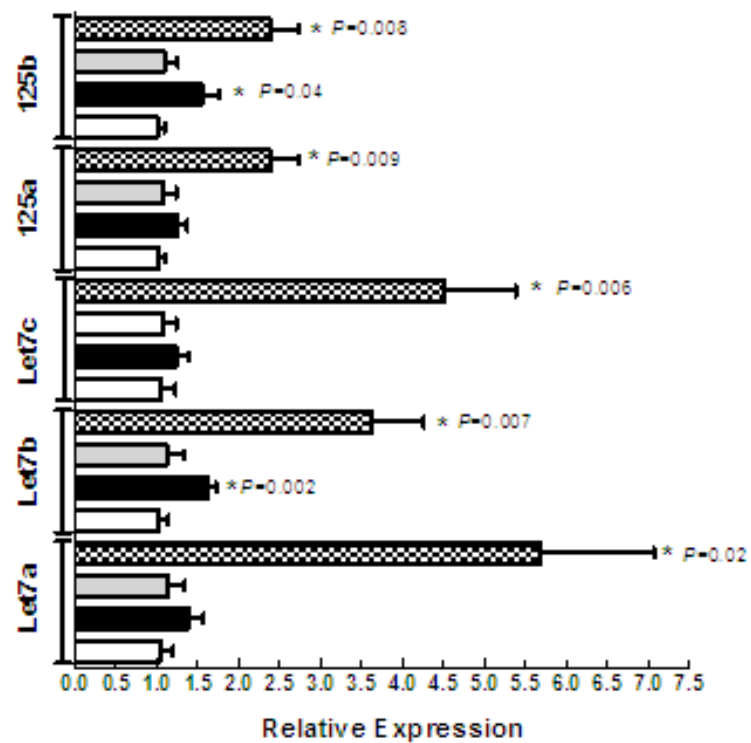
## FIGURE LEGEND

**Figure 1. Panel (A).** *EDNI* expression in endothelial cells and ET-1 levels in the supernatant from cells incubated with plasma from preeclampsia (black column) and respective control (white column) before (left bars) and after (right bars) preeclampsia signals and symptoms. **Panel (B).** *EDNI* expression in endothelial cells and ET-1 levels in the supernatant from cells incubated with plasma from preeclamptic women responsive (white column) or nonresponsive (black column) to antihypertensive therapy. The means of *EDNI* expression ( $2^{-\Delta\Delta C_q}$ ) are displayed in the Y-axis, left side and the means of ET-1 levels (pg/mL) are displayed in the Y-axis, right side. \* $P < 0.05$  vs. control (A) and vs. Responsive group (B). **Panel (C).** MiRNA expressions in endothelial cells from cultures incubated with plasma from pregnant women who subsequently develop preeclampsia (black column) vs. respective control (white column); from pregnant women who has already developed preeclampsia (crosshatch column) vs. respective control (grey column). \*  $P < 0.05$  vs. respective control.

FIGURE 1



A



B

C

## SUPPLEMENTARY INFORMATION

Title of the manuscript:

**Potential protective mechanism by miRNAs on endothelin-1 expression in endothelial cells incubated with plasma from preeclampsia**

**Author list:**

Mayara Caldeira-Dias<sup>1</sup>, Marcelo R. Luizon<sup>1</sup>, Elenice Deffune<sup>2</sup>, Jose E. Tanus-Santos<sup>3</sup>, Robson F. Carvalho<sup>4</sup>, Heloísa Bettiol<sup>5</sup>, Viviane C. Cardoso<sup>5</sup>, Ricardo C. Cavalli<sup>6</sup>, and Valeria C. Sandrim<sup>1,\*</sup>

**Table S1.** Selected miRNAs used in real time RT-PCR.

Mirna	AccessionNumber (miRBase)	Validated/Predicted	Catalog Number	Sequence 5' →3'	Expressed HUVEC (Reference)	Reported Preeclampsia (Reference)
<b>let-7a</b>	MI0000060	Predicted (mirWalk <sup>47</sup> /microrna.org)	MS00031220	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	McCall et al. (14)	-
<b>let-7b</b>	MI0000063	Validated <sup>37</sup>	MS00003122	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU	McCall et al. (14)	-
<b>let-7c</b>	MI0000064	Validated <sup>37</sup>	MS00003129	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	McCall et al. (14)	-
<b>miR-1</b>	MI0000437	Validated (mirWalk <sup>47</sup> /microrna.org)	MS00008358	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU	-	-
<b>miR-125a</b>	MI0000469	Validated <sup>38</sup>	MS00003423	UCCCUGAGACCCUUUAACCUGUGA	-	Li et al. (10)
<b>miR-125b</b>	MI0000446	Validated <sup>38</sup>	MS00006629	UCCCUGAGACCCUAACUUGUGA	McCall et al. (14)	Li et al. (10)
<b>miR-135a</b>	MI0000452	Predicted (microrna.org)	MS00008624	UAUGGCCUUUUUAUUCUAUGUGA	McCall et al. (14)	-
<b>miR-144</b>	MI0000460	Predicted (microrna.org)	MS00020328	UACAGUAUAGAUGAUGUACU	-	Li et al. (10) Wu et al.(12)
<b>miR-199</b>	MI0000242	Validated (mirWalk <sup>47</sup> /microrna.org)	MS00006741	CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC	McCall et al. (14)	Li et al. (10)

**Table S2.** Seed sequences of miRNAs let-7a, b and c between several species.

Species	Order	miR-let-7 <sup>a</sup>
Gorilla gorilla	Primates	UGAGGUAGUAGGUUGUAU-AGU-
Homo sapiens	Primates	UGAGGUAGUAGGUUGUAU-AGUU
Macaca mulatta	Primates	UGAGGUAGUAGGUUGUAU-AGUU
Pongo pygmaeus	Primates	UGAGGUAGUAGGUUGUAU-AGUU
Pan troglodytes	Primates	UGAGGUAGUAGGUUGUAU-AGUU
Cricetulus griseus	Rodentia	UGAGGUAGUAGGUUGUAU-AGUU
Mus musculus	Rodentia	UGAGGUAGUAGGUUGUAU-AGUU
Rattus norvegicus	Rodentia	UGAGGUAGUAGGUUGUAU-AGUU
Bos taurus	Artiodactyla	UGAGGUAGUAGGUUGUAU-AGUU
Capra hircus	Artiodactyla	UGAGGUAGUAGGUUGUAU-AGUU
Ovis Áries	Artiodactyla	UGAGGUAGUAGGUUGUAU-AGUU
Sus scrofa	Artiodactyla	UGAGGUAGUAGGUUGUAU-AGUU
Equus caballus	Perissodactyla	UGAGGUAGUAGGUUGUAU-AGUU
Canis familiaris	Carnivora	UGAGGUAGUAGGUUGUAU-AGUU
Monodelphis domestica	Didelphimorphia	UGAGGUAGUAGGUUGUAU-AGUU
Sarcophilus harrisii	Dasyuromorphia	UGAGGUAGUAGGUUGUAU-AGU-
Gallus gallus	Galliformes	UGAGGUAGUAGGUUGUAU-AGUU
Taeniopygia guttata	Passeriformes	UGAGGUAGUAGGUUGUAU-AGUU
Anolis carolinensis	Squamata	UGAGGUAGUAGGUUGUAU-AGUU
Ophiophagus hannah	Squamata	UGAGGUAGUAGGUUGUAU-AGUU
Xenopus tropicalis	Anura	UGAGGUAGUAGGUUGUAU-AGUU
Cyprinus carpio	Cypriniformes	UGAGGUAGUAGGUUGUAU-AGUU
Danio rerio	Cypriniformes	UGAGGUAGUAGGUUGUAU-AGUU
Fugu rubripes	Tetraodontiformes	UGAGGUAGUAGGUUGUAU-AGUU
Ictalurus punctatus	Siluriformes	UGAGGUAGUAGGUUGUAU-AGUU
Oryzias latipes	Beloniformes	UGAGGUAGUAGGUUGUAU-AGUU
Paralichthys olivaceus	Pleuronectiformes	UGAGGUAGUAGGUUGUAU- GUU
Salmo salar	Salmoniformes	UGAGGUAGUAGGUUGUAU-AGUU
Tetraodon nigroviridis	Tetraodontiformes	UGAGGUAGUAGGUUGUAU-AGUU
Branchiostoma belcheri	Amphioxiformes	UGAGGUAGUAGGUUGUAU-AGUU
Branchiostoma floridae	Amphioxiformes	UGAGGUAGUAGGUUGUAU-AGUU
Petromyzon marinus	Petromyzontiformes	UGAGGUAGUAGGUUGUAU-AGUU
Manduca sexta	Lepidoptera	UGAGGUAGUAGGUUGUAU-AG--
Schmidtea mediterranea	Tricladida	UGAGGUAG A GUUG AU A U-
Ciona intestinalis	<u>Enterogona</u>	UGAGGUAGUAGGUU U -AGU-
Ciona savignyi	<u>Enterogona</u>	UGAGGUAGUAGGUU UAU AGU-

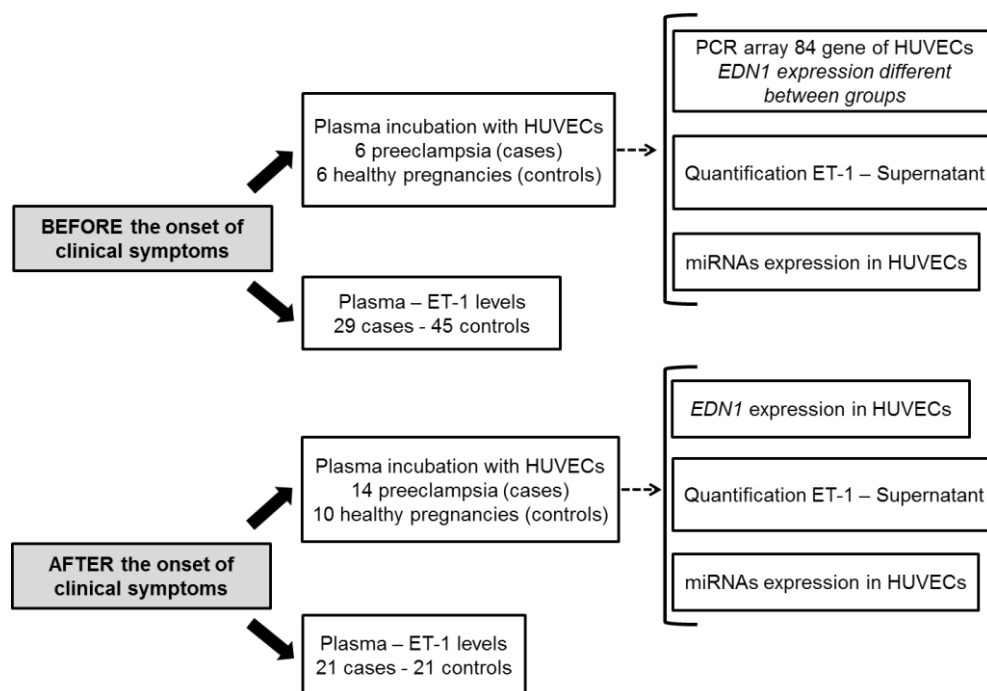
Species	Order	miR-let-7b
Gorilla gorilla	Primates	UGAGGUAGUAGGUUGUG-UGGU-
Homo sapiens	Primates	UGAGGUAGUAGGUUGUG-UGGUU
Macaca mulatta	Primates	UGAGGUAGUAGGUUGUG-UGGUU

Pongo pygmaeus	Primates	<u>UGAGGUAGUAGGUUGUG</u> -UGGUU
Pan troglodytes	Primates	<u>UGAGGUAGUAGGUUGUG</u> -UGGUU
Cricetulus griseus	Rodentia	<u>UGAGGUAGUAGGUUGUG</u> -UGGUU
Mus musculus	Rodentia	<u>UGAGGUAGUAGGUUGUG</u> -UGGUU
Rattus norvegicus	Rodentia	<u>UGAGGUAGUAGGUUGUG</u> -UGGUU
Bos taurus	Artiodactyla	<u>UGAGGUAGUAGGUUGUG</u> -UGGUU
Capra hircus	Artiodactyla	<u>UGAGGUAGUAGGUUGUG</u> -UGGUU
Ovis Áries	Artiodactyla	<u>UGAGGUAGUAGGUUGUG</u> -UGGU-
Canis familiaris	Carnivora	<u>UGAGGUAGUAGGUUGUG</u> -UGGUU
Monodelphis domestica	Didelphimorphia	<u>UGAGGUAGUAGGUUGUG</u> -UGGUU
Ornithorhynchus anatinus	Monotremata	<u>UGAGGUAGUAGGUUGUG</u> -UGGUU
Gallus gallus	Galliformes	<u>UGAGGUAGUAGGUUGUG</u> -UGGUU
Taeniopygia guttata	Passeriformes	<u>UGAGGUAGUAGGUUGUG</u> -UGGUU
Anolis carolinensis	Squamata	<u>UGAGGUAGUAGGUUGUG</u> -UGGU-
Ophiophagus hannah	Squamata	<u>UGAGGUAGUAGGUUGUG</u> -UGGUU
Xenopus tropicalis	Anura	<u>UGAGGUAGUAG</u> UUGUG-U GUU
Cyprinus carpio	Cypriniformes	<u>UGAGGUAGUAGGUUGUG</u> -UGGUU
Danio rerio	Cypriniformes	<u>UGAGGUAGUAGGUUGUG</u> -UGGUU
Fugu rubripes	Tetraodontiformes	<u>UGAGGUAGUAGGUUGUG</u> -UGGUU
Ictalurus punctatus	Siluriformes	<u>UGAGGUAGUAGGUUGUG</u> -UGGU-
Oryzias latipes	Beloniformes	<u>UGAGGUAGUAGGUUGUG</u> -UGGU-
Paralichthys olivaceus	Pleuronectiformes	<u>UGAGGUAGUAGGUUGUG</u> -UGGUU
Salmo salar	Salmoniformes	<u>UGAGGUAGUAGGUUGUG</u> -UGGUU
Tetraodon nigroviridis	Tetraodontiformes	<u>UGAGGUAGUAGGUUGUG</u> -UGGUU
Petromyzon marinus	Petromyzontiformes	<u>UGAGGUAGUAGGUU</u> UG-U GUU
Schmidtea mediterranea	Tricladida	<u>UGAGGUAG</u> GUUG-G UG U
Ciona intestinalis	<u>Enterogona</u>	<u>UGAGGUAGUAGGUU</u> UG UG U-
Ciona savignyi	<u>Enterogona</u>	<u>UGAGGUAGUAGGUU</u> UG UG U-
Oikopleura dioica	Copelata	<u>UGAGGUAGU</u> -GGUUGU U G U

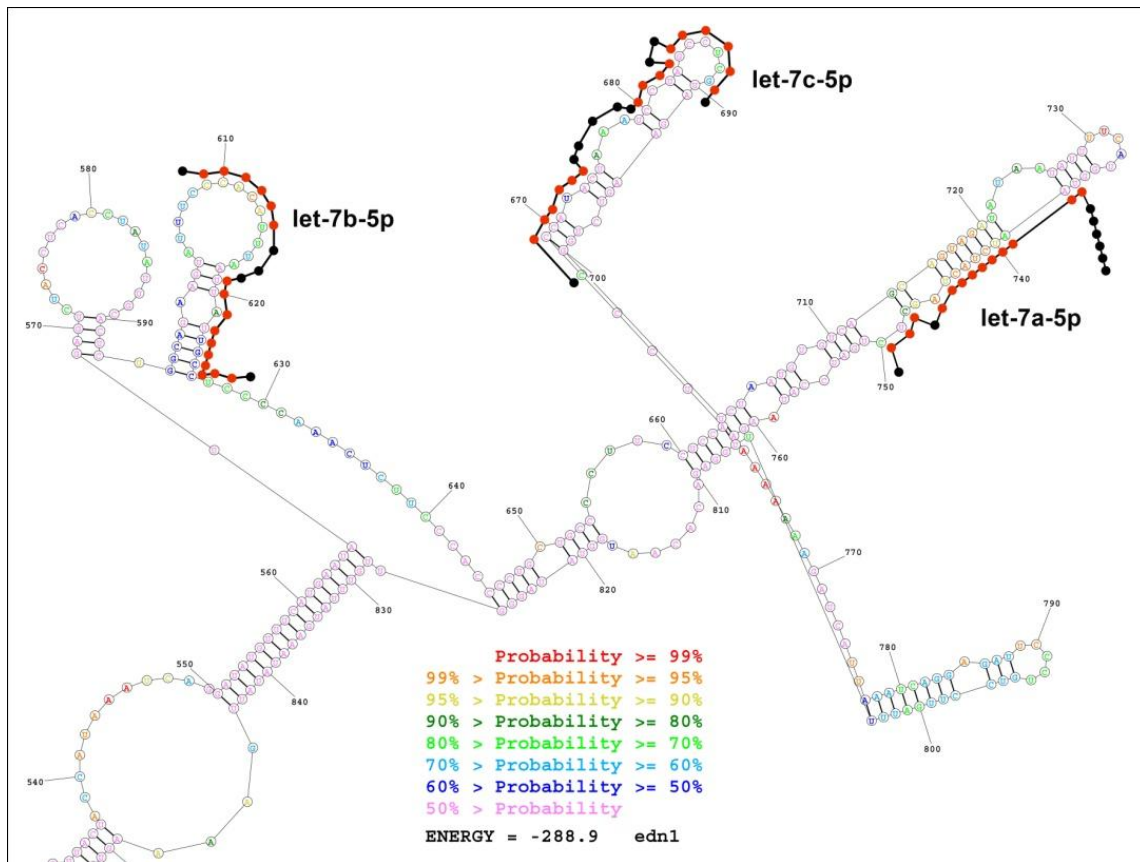
Species	Order	miR-let-7c
Gorilla gorilla	Primates	-- <u>UGAGGUAGUAGGUUGUAU</u> -GGU--
Homo sapiens	Primates	-- <u>UGAGGUAGUAGGUUGUAU</u> -GGUU-
Macaca mulatta	Primates	-- <u>UGAGGUAGUAGGUUGUAU</u> -GGUU-
Pongo pygmaeus	Primates	-- <u>UGAGGUAGUAGGUUGUAU</u> -GGUU-
Pan troglodytes	Primates	-- <u>UGAGGUAGUAGGUUGUAU</u> -GGUU-
Mus musculus	Rodentia	-- <u>UGAGGUAGUAGGUUGUAU</u> -GGUU-
Rattus norvegicus	Rodentia	-- <u>UGAGGUAGUAGGUUGUAU</u> -GGUU-
Bos taurus	Artiodactyla	-- <u>UGAGGUAGUAGGUUGUAU</u> -GGUU-
Capra hircus	Artiodactyla	-- <u>UGAGGUAGUAGGUUGUAU</u> -GGUU-
Ovis Áries	Artiodactyla	-- <u>UGAGGUAGUAGGUUGUAU</u> -GGUU-
Sus scrofa	Artiodactyla	-- <u>UGAGGUAGUAGGUUGUAU</u> -GGUU-
Equus caballus	Perissodactyla	-- <u>UGAGGUAGUAGGUUGUAU</u> -GGUU-
Canis familiaris	Carnivora	-- <u>UGAGGUAGUAGGUUGUAU</u> -GGUU-
Eptesicus fuscus	Chiroptera	<u>UGAGGUAGUAGGUUGUAU</u> -GGUU

Ornithorhynchus anatinus	Monotremata	--UGAGGUAGUAGGUUGUAU-GGUU-
Gallus gallus	Galliformes	--UGAGGUAGUAGGUUGUAU-GGUU-
Taeniopygia guttata	Passeriformes	--UGAGGUAGUAGGUUGUAU-GGUU-
Anolis carolinensis	Squamata	--UGAGGUAGUAGGUUGUAU-GGUU-
Ophiophagus hannah	Squamata	--UGAGGUAGUAGGUUGUAU-GGUU-
Xenopus tropicalis	Anura	--UGAGGUAGUAGGUUGUAU-GGUU-
Danio rerio	Cypriniformes	--UGAGGUAGUAGGUUGUAU-GGUU-
Hippoglossus hippoglossus	Pleuronectiformes	--UGAGGUAGUAGGUUGUAU-GGUU-
Ictalurus punctatus	Siluriformes	--UGAGGUAGUAGGUUGUAU-GGUU-
Oryzias latipes	Beloniformes	--UGAGGUAGUAGGUUGUAU-GGU--
Salmo salar	Salmoniformes	--UGAGGUAGUAGGUUGUAU-GGUU-
Petromyzon marinus	Petromyzontiformes	--UGAGGUAGUAG UUGUAU-GGUU-
Schmidtea mediterranea	Tricladida	--UGAGGUAGU-G U A GGUU-
Ciona intestinalis	Enterogona	--UGAGGUAGUAGGUU UAU GU--
Ciona savignyi	Enterogona	--UGAGGUAGUAGGUU U G U--
Oikopleura dioica	Copelata	- UGAGGUAGUAGGUU U G ---

**Figure S1.** Schematic diagram of the study workflow.



**Figure S2.** Prediction of the interactions between miRNAs let-7a, b and c and *EDN1*.



## LIST OF ABBREVIATIONS

*EDN1* - endothelin-1 gene

ET-1 - Endothelin-1

miRNAs - microRNAs

HUVEC - Human umbilical vein endothelial cell

FCS - Fetal calf serum

HEK293A - Human Embryonic Kidney cells

AGO1 - Argonaute 1

VEGF - Vascular endothelial growth factor