

**UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PELOTAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E COMPORTAMENTO**

**CAINÁ CORRÊA DO AMARAL**

**EXPRESSÃO DO MIRNA 423-5P NO CICLO GRAVÍDICO-PUERPERAL: SUA  
ASSOCIAÇÃO COM HIPERTENSÃO NA GESTAÇÃO E COM O  
DESENVOLVIMENTO DO BEBÊ AOS 3 MESES DE IDADE.**

Pelotas

2023

**CAINÁ CORRÊA DO AMARAL**

**EXPRESSÃO DO MIRNA 423-5P NO CICLO GRAVÍDICO-PUERPERAL: SUA ASSOCIAÇÃO COM HIPERTENSÃO NA GESTAÇÃO E COM O DESENVOLVIMENTO DO BEBÊ AOS 3 MESES DE IDADE.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento da Universidade Católica de Pelotas como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Saúde e Comportamento.

Orientador: Ricardo Tavares Pinheiro

Pelotas

2023

**EXPRESSÃO DO MIRNA 423-5P NO CICLO GRAVÍDICO-PUERPERAL: SUA ASSOCIAÇÃO COM HIPERTENSÃO NA GESTAÇÃO E COM O DESENVOLVIMENTO DO BEBÊ AOS 3 MESES DE IDADE.**

Conceito final: \_\_\_\_\_ [L]  
[SEP]

Aprovado em: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA:**

---

Prof(a). Dr(a). Fernanda Pedrotti Moreira

---

Prof(a). Dr(a). Clarissa Ribeiro Bastos

---

Prof(a). Dr(a). Carolina Scholl

---

Orientador – Prof. Dr. Ricardo Tavares Pinheiro

## Ficha catalográfica

Amaral, Cainá Corrêa do

**Expressão do miR-423-5p no ciclo gravídico-puerperal:** sua associação com hipertensão na gestação e com o desenvolvimento do bebê aos 3 meses de idade./ Cainá Corrêa do Amaral - Pelotas: UCPEL, 2023.

129 f.

Orientador: Ricardo Tavares Pinheiro

Tese (doutorado) - Universidade Católica de Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento. - Pelotas, BR-RS, 2023.

1. MicroRNA. 2. Gestação. 3. Desenvolvimento infantil. 4. Hipertensão. 5. Biomarcador. I. Pinheiro, Ricardo Tavares. II. Título.

Bibliotecária responsável: Cristiane de Freitas Chim CRB 10/1233

**Dedicatória**

*À minha mãe Caiçara Corrêa, aos meus avós Francisca Rosales Corrêa e Fernando Rodrigues Corrêa, e ao meu noivo Tiago Fernandez Garcia pelo apoio e amor incondicional durante a minha trajetória.*

## **Agradecimentos**

Durante a minha trajetória acadêmica tive o prazer de conhecer inúmeras pessoas, as quais levo para a vida, diante disso, devo a todos o meu agradecimento. Inicialmente agradeço a Deus por sempre abençoar meu caminho. Agradeço a minha família, principalmente minha mãe Caiçara, meus avós Francisca e Fernando por todo apoio e incentivo, além do amor incondicional, sem vocês eu não chegaria até aqui. Agradeço também ao meu noivo Tiago, por todos esses anos de amor e companheirismo, além de dividirmos a vida, estamos juntos na pesquisa desde o início. Agradeço imensamente por estares ao meu lado em todos os momentos me apoiando e incentivando, és fundamental na minha trajetória.

Agradeço também ao Grupo GPCell ao qual faço parte há quase 10 anos, todo o meu crescimento profissional e acadêmico foram ainda melhores com o auxílio e incentivo da Prof. Fernanda Nedel, a qual me proporcionou diversas experiências, as quais sou extremamente grata. Agradeço principalmente as amigas que levo para a vida Geovanna, Roberta e Bruna, vocês foram fundamentais na minha trajetória e com total certeza ela foi mais leve com vocês ao meu lado. A todos os IC's que fizeram parte do grupo e tive o prazer de conviver, meu muito obrigada, cresci muito com vocês. Agradeço a todo o pessoal do laboratório, os quais tive o prazer de conviver por quase 10 anos, tivemos muitas trocas de conhecimentos, aprendizados e análises, além de momentos de descontração e comemoração. Foi com o GPCell e no laboratório que descobri o meu amor pela ciência.

Gostaria de agradecer especialmente ao Prof. Ricardo Pinheiro e a Prof. Jéssica Trettim por aceitarem o desafio de estar comigo na reta final do doutorado e não medirem esforços para me auxiliar e incentivar a chegarmos no melhor resultado final. A vocês o

meu muito obrigada! Agradeço também a toda equipe e participantes do projeto “Gravidez Cuidada, Bebê saudável”, sem vocês nada seria possível a realização, obrigada!

Agradeço a banca avaliadora por ter aceito o convite para avaliar e agregar seus conhecimentos ao trabalho, vocês são fundamentais nesse processo. Agradeço a Universidade Católica de Pelotas, instituição que faço parte desde o início da graduação, até os dias atuais como aluna e colaboradora, gratidão às oportunidades. Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Comportamento e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), o qual estive desde o mestrado e o doutorado, ambos com bolsa, o que permitiu minha formação e dedicação às atividades.

Sou imensamente grata a todos que cruzaram meu caminho e também a todas as vivências e oportunidades que tive durante meus 10 anos de ciência, espero continuar traçando minha trajetória rodeada de pessoas as quais tive o prazer de conhecer e conviver até aqui.

## RESUMO

Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs, contendo cerca de 22 nucleotídeos, não codificantes que regulam a expressão gênica ligando-se a alvos específicos de RNA mensageiro e promovendo sua degradação e/ou inibindo a sua tradução. A gestação é uma condição fisiológica regulada também por fatores genéticos e ambientais. Congruentemente, alguns estudos sugerem que a expressão de miRNA pode ser alterada em resposta a essas mudanças. Assim, é proposto na literatura que os miRNAs respondem às mudanças fisiológicas durante a gestação a fim de facilitar o sucesso do processo de gravidez, enquanto a desregulação dos miRNAs é capaz de causar ou contribuir para o desenvolvimento de distúrbios ou desfechos negativos da gestação, tanto para a mãe quanto para o bebê. Assim, o objetivo da presente tese foi avaliar o papel dos miRNAs no ciclo gravídico-puerperal. No primeiro artigo, o objetivo foi associar o miRNA-423-5p com a hipertensão na gestação, e no segundo artigo objetivou-se relacionar a expressão do miRNA materno com o desenvolvimento dos bebês aos 3 meses de idade. Trata-se de um estudo transversal e um longitudinal, respectivamente, ambos aninhados a um projeto maior de base populacional, realizado em uma cidade do Sul do Brasil. As mães responderam a um questionário semiestruturado e a variável hipertensão foi identificada no pré-natal. Os bebês foram avaliados aos três meses de idade quanto ao desenvolvimento cognitivo através da Bayley Scales of Infant and Toddler Development III. Amostras de sangue das mães foram obtidas para extração de RNA do soro e análise da expressão de miRNA por qRT-PCR. Os dados foram analisados no SPSS 26.0 através dos testes estatísticos mais adequados para cada objetivo do estudo. Dentre os resultados encontrados, o primeiro artigo incluiu 171 gestantes com e sem hipertensão diagnosticada pré-natal. Os resultados mostram que a idade gestacional média da amostra foi de 16,18

semanas (DP±5,51). A regressão logística para o desfecho hipertensão pré-natal mostra associação com IMC e hsa-miR-423-5p. Em relação ao miRNA, quanto maior a expressão de hsa-miR-423-5p, menor a chance da gestante apresentar hipertensão pré-natal [OR 0,55 (0,35; 0,85, p = 0,007)]. No segundo artigo, foram incluídas 87 díades (mãe-bebê). A idade gestacional média foi de 15,86 semanas (DP±5,55). Foi encontrada uma associação do miRNA materno com o desenvolvimento cognitivo infantil, à medida que o miR-423-5p materno aumenta, o desenvolvimento cognitivo dos bebês aumenta em 2,40 (IC 95% 0,37; 4,43, p = 0,021) aos três meses de idade. Em suma, almeja-se a utilização deste miRNA como biomarcador da hipertensão na gestação e do desenvolvimento neurocognitivo infantil detectável no período pré-natal, permitindo assim o planejamento de intervenções precoces.

**Palavras-chave:** microRNA, gestação, hipertensão, desenvolvimento infantil, biomarcador.

## ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) are small, non-coding RNAs containing around 22 nucleotides that regulate gene expression by binding to specific messenger RNA targets and promoting their release and/or inhibiting their translation. Pregnancy is a physiological condition also regulated by genetic and environmental factors. Congruently, some studies suggest that miRNA expression may be altered in response to these changes. Thus, it is proposed in the literature that miRNAs respond to physiological changes during pregnancy to facilitate the success of the pregnancy process, while the dysregulation of miRNAs is capable of causing or contributing to the development of disorders or negative pregnancy outcomes, both for mother and baby. Thus, the objective of this thesis was to evaluate the role of miRNAs in the pregnancy-puerperal cycle. In the first article, the objective was to associate miRNA-423-5p with hypertension during pregnancy, and in the second article, the objective was to relate the expression of maternal miRNA with the development of babies at 3 months of age. This is a cross-sectional and longitudinal study, respectively, both nested within a larger population-based project, carried out in a city in southern Brazil. The mothers responded to a semi-structured questionnaire and the hypertension variable was identified prenatally. Babies were assessed at three months of age for cognitive development using the Bayley Scale of Infant and Toddler Development III. Blood samples from mothers were obtained for removal of RNA from serum and analysis of miRNA expression by qRT-PCR. Data were analyzed in SPSS 26.0 using the most appropriate statistical tests for each study objective. Among the results found, the first article included 171 pregnant women with and without prenatal hypertension. The results show that the average gestational age of the sample was 16.18 weeks ( $SD\pm 5.51$ ). Logistic regression for prenatal hypertension stage shows association with BMI and hsa-miR-423-5p. In relation to miRNA, the higher the expression of hsa-miR-423-5p, the

lower the chance of the pregnant woman having prenatal hypertension [OR 0.55 (0.35; 0.85,  $p = 0.007$ )]. In the second article, 87 days (mother-baby) were included. The average gestational age was 15.86 weeks ( $SD \pm 5.55$ ). An association of maternal miRNA with infant cognitive development was found, as maternal miR-423-5p increases, infants' cognitive development increases by 2.40 (95% CI 0.37; 4.43,  $p = 0.021$ ) at three months of age. In short, the aim is to use this miRNA as a biomarker of hypertension during pregnancy and child neurocognitive development detectable in the prenatal period, thus allowing the planning of early interventions.

**Keywords:** microRNA, pregnancy, hypertension, child development, biomarker.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Representação gráfica da biogênese de miRNA.....	26
<b>Figura 2:</b> Representação gráfica do estudo de Cai et al. 2017 acerca dos miRNAs encontrados no útero e na placenta.....	34
<b>Quadro 1:</b> Estratégias de busca .....	24
<b>Quadro 2:</b> Cronograma .....	53
<b>Figure 1:</b> hsa-miR-423-5p expression in the serum of pregnant women with and without hypertension .....	84
<b>Graphical abstract:</b> .....	85
<b>Figure 1:</b> Scatter plot correlating the Bayley III composite cognitive development score and hsa-miR-423-5p. ....	105

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> – Sample distribution according to characteristics of pregnant women in the city of Pelotas .....	82
<b>Tabela 2</b> – Logistic regression for the outcome of antenatal hypertension.....	83
<b>Tabela 1</b> – Sample characterization.....	106
<b>Tabela 2</b> – Multivariate analysis according to the cognitive development score of babies at 90 days of life .....	107

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABEP	Associação brasileira de empresas de pesquisa
ACC	<i>American College of Cardiology</i>
AD	<i>American Heart Association</i>
AGO2	Argonauta 2
AHA	Doença de Alzheimer
ANOVA	Análise da variância
Bayley-III	Bayley Scales of Infant and Toddler Development - 3ªedição
BDI-II	Inventário de depressão de Beck
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
dPCR	Reação em Cadeia da Polimerase digital
HTR-8/SVneo	Linhagem de células de trofoblásticas
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INCT	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia
LANEC	Laboratório de Neurociências Clínicas
miRNA	microRNA
MINI-Plus	Mini international neuropsychiatric interview
mmHg	Milímetros de mercúrio
mRNA	RNA mensageiro
NPM 1	Nucleofosmina 1
PA	Pressão arterial
PE	Pré eclâmpsia
Pitx3	Fator de transcrição Pituitária homeobox 3
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real quantitativo
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
SNC	Sistema Nervoso Central
SPSS	Statistical Package for Social Science for Windows
TCC	Terapia cognitivo comportamental

TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
cTNT	Troponina cardíaca T
UCPel	Universidade Católica de Pelotas

## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>PROJETO.....</b>	<b>18</b>
<b>1 IDENTIFICAÇÃO.....</b>	<b>19</b>
1.1 Título .....	19
1.2 Doutoranda .....	19
1.3 Orientador .....	19
1.4 Instituição .....	19
1.5 Curso .....	19
1.6 Linha de pesquisa .....	19
1.7 Data .....	19
<b>2 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
<b>4 HIPÓTESES .....</b>	<b>23</b>
<b>5 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>24</b>
<b>6 MÉTODO .....</b>	<b>46</b>
6.1 Delineamento .....	46
6.2 Participantes .....	46
6.3 Procedimentos e instrumentos.....	48
6.4Análise dos dados.....	51
6.5Aspectos éticos .....	51
6.6Cronograma .....	52
6.7Orçamento .....	53
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>54</b>
<b>ARTIGO1.....</b>	<b>69</b>
<b>ARTIGO 2.....</b>	<b>86</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>109</b>

<b>APÊNDICES .....</b>	<b>111</b>
Apêndice 1: Protocolo Kit de purificação de RNA mir Vana PARIS.....	111
Apêndice 2: Protocolo Kit de síntese avançada de cDNA de miRNA.....	116
Apêndice 3: Protocolo kit Taq Man Fast Advanced Master Mix .....	120
Apêndice 4: Folheto instrutivo sobre estimulação precoce.....	123
Apêndice 5: Orçamento para análise dos microRNAs.....	124
<b>ANEXOS .....</b>	<b>125</b>
Anexo A: Carta de aprovação no comitê de ética .....	125
Anexo B: Termo de consentimento livre e esclarecido para gestantes maiores de idade .....	127
Anexo C: Termo de consentimento livre e esclarecido para gestantes menores de idade .....	128

## APRESENTAÇÃO

A presente tese de doutorado é apresentada como requisito parcial para obtenção do título de doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento (PPGSC) da Universidade Católica de Pelotas (UCPel). Tem como objetivo avaliar o papel dos miRNAs no ciclo gravídico-puerperal, associando com a hipertensão na gestação, e com o desenvolvimento dos bebês aos 3 meses de idade. Este volume está dividido em três partes. A primeira parte refere-se ao projeto de pesquisa intitulado “Expressão do miRNA-423-5p no ciclo gravídico-puerperal: sua associação com hipertensão na gestação e com o desenvolvimento do bebê aos 3 meses de idade”, qualificado em 17 de outubro de 2023 pela banca avaliadora formada pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Pedrotti Moreira e pela Prof. Dr. Luciana de Avila Quevedo. O projeto se subdivide em: identificação, introdução, objetivos e hipóteses, revisão de literatura, metodologia e referências. A segunda parte deste volume contempla os dois artigos resultantes do projeto de pesquisa. Os artigos estão apresentados conforme as normas dos periódicos aos quais foram submetidos. O primeiro artigo, intitulado “Expression of hsa-miR-423-5p during pregnancy is associated with antenatal hypertension”, que será submetido ao periódico scientific reports e teve como objetivo avaliar a expressão de hsa-miR-423-5p em gestantes com e sem hipertensão identificada no pré-natal. O segundo artigo, intitulado “Maternal hsa-miR-423-5p is associated with the cognitive development of babies in pregnant women without mental disorders”, está em revisão no periódico Frontiers in Human Neuroscience e teve como objetivo investigar a associação entre a expressão materna de has-miR-423-5p durante o primeiro e segundo trimestre de gravidez e o desenvolvimento neurocognitivo aos 90 dias de vida em bebês. A terceira parte contempla as considerações finais da tese e posteriormente encontram-se os apêndices e anexos do projeto.

**PARTE 1**  
**PROJETO**

## **1.IDENTIFICAÇÃO**

**1.1 Título:** Expressão do miRNA 423-5p no ciclo gravídico-puerperal: sua associação com hipertensão na gestação e com o desenvolvimento do bebê aos 3 meses de idade.

**1.2 Doutoranda:** Cainá Corrêa do Amaral

**1.3 Orientador:** Prof. Dr Ricardo Tavares Pinheiro

**1.4 Instituição:** Universidade Católica de Pelotas (UCPel)

**1.5 Curso:** Doutorado em Saúde e Comportamento

**1.6 Linha de pesquisa:** Saúde materno infantil

**1.7 Data:** Outubro de 2023

## 2. INTRODUÇÃO

Os miRNAs são RNAs pequenos, contendo cerca de 22 nucleotídeos, não codificantes que regulam a expressão gênica ligando-se a alvos específicos de RNA mensageiro (mRNA) e promovendo sua degradação e/ou inibindo a sua tradução. Apenas um miRNA é capaz de regular centenas de mRNAs e, como resultado, ter efeitos substanciais nas redes de expressão gênica. Conseqüentemente, os padrões de expressão de miRNA podem ser especialmente ricos em informações biológicas, uma vez que a variação na expressão de centenas de RNAs mensageiros pode, até certo ponto, ser refletida nos padrões de expressão de um ou alguns miRNAs que os regulam (Pritchard, Cheng, et al., 2012; Towler et al., 2015).

Nos últimos anos, os papéis notáveis dos miRNAs nos processos celulares em condições saudáveis ou doentes têm sido cada vez mais reconhecidos (Aghdam et al., 2019; Davoodvandi et al., 2021; Mirzaei & Hamblin, 2020; Razavi et al., 2021; Sadri Nahand et al., 2020). Visto isso, vários estudos têm demonstrado que a eliminação das principais enzimas no processamento do miRNA resulta em parada embrionária ou mesmo morte embrionária (Alisch et al., 2007; Bernstein et al., 2003; Suh et al., 2010), indicando assim a importância dos miRNAs na regulação da gestação (Xu et al., 2021).

A gestação é uma condição fisiológica regulada também por fatores genéticos e ambientais. Congruentemente, muitos estudos sugerem que a expressão de miRNA pode ser alterada em resposta a essas mudanças (Khorram et al., 2010; Kulshreshtha et al., 2007; Qiu et al., 2012). Assim, é proposto na literatura que os miRNAs respondem às mudanças fisiológicas durante a gestação a fim de facilitar o sucesso do processo de gravidez, enquanto a desregulação dos miRNAs é capaz de causar ou contribuir para o desenvolvimento de distúrbios ou desfechos negativos da gestação, tanto para a mãe quanto para o bebê (Cai et al., 2017).

Além disso, vale salientar que durante a gravidez ocorrem várias adaptações cruciais no sistema cardiovascular que são necessárias para a progressão de uma gestação bem-sucedida (Sanghavi & Rutherford, 2014). A má adaptação do sistema cardiovascular durante a gravidez em mulheres previamente saudáveis pode levar a complicações que podem causar mortalidade materna e fetal (Graves & Davis, 2018; Mogos et al., 2018). Dados crescentes demonstram expressão alterada de miRNA circulante na gravidez afetada por complicações cardiovasculares (Cai et al., 2017; Morales-Prieto et al., 2013). Ao longo das últimas duas décadas, os miRNAs circulantes e específicos do tecido tornaram-se de crescente interesse como moduladores e biomarcadores de fisiopatologia, diagnóstico e prognóstico em uma variedade de distúrbios cardiovasculares (Aryan et al., 2020).

Em consonante, salienta-se que os primeiros 1.000 dias de vida, abrange desde a concepção até os dois anos após o parto, constituindo um período único de importância no desenvolvimento infantil. Esta fase coincide com o rápido crescimento e expansão do sistema nervoso central (SNC) infantil, conferindo uma sensibilidade particular dos processos de neurodesenvolvimento às influências ambientais (Cusick & Georgieff, 2016; Krebs et al., 2017). A arquitetura anatômica do cérebro é predominantemente determinada neste momento, mediada pela complexa interação entre a estrutura genética do bebê e seu ambiente circundante. Portanto, as experiências de adversidades durante a gestação e o pós-parto podem ter consequências desde a infância até a idade adulta para resultados neurocognitivos (Fox et al., 2010; Lockyer et al., 2021; Schwarzenberg & Georgieff, 2018). Diante de todo o exposto, o objetivo da presente tese é avaliar a papel dos miRNAs no ciclo gravídico-puerperal, associando com a hipertensão na gestação e com o desenvolvimento dos bebês aos 3 meses de idade.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Artigo 1**

##### ***3.1.1 Objetivo Geral***

Avaliar a expressão dos miRNAs (hsa-miR-423-5p, hsa-miR-451a, hsa-miR221-3p, hsa-miR16-5p e hsa-miR-17-5p) nas gestantes com e sem hipertensão identificada no período pré-natal.

##### ***3.1.2 Objetivos Específicos***

Avaliar as características das gestantes da amostra do estudo.

Analisar a interação entre a expressão dos miRNAs (hsa-miR-423-5p, hsa-miR-451a, hsa-miR221-3p, hsa-miR16-5p e hsa-miR-17-5p) nas gestantes e a hipertensão pré-natal.

#### **3.2 Artigo 2**

##### ***3.2.1 Objetivo Geral***

Correlacionar a expressão do hsa-miR-423-5p materno com o escore de desenvolvimento cognitivo dos bebês.

##### ***3.2.2 Objetivos Específicos***

Avaliar as características das gestantes e dos bebês amostra do estudo.

Avaliar o desenvolvimento cognitivo dos bebês aos 3 meses de idade.

Correlacionar a expressão do hsa-miR-423-5p materno com o escore de desenvolvimento cognitivo dos bebês.

## **4. HIPÓTESES**

### **4.1 Hipóteses do Artigo 1**

As gestantes estarão entre o primeiro e segundo trimestre gestacional, serão em maioria de classe socioeconômica C, idade entre 24 e 29 anos, entre 9 e 11 anos de estudo e multíparas.

Gestantes que apresentarem menor expressão do hsa-miR-423-5p terão maior risco de desenvolver hipertensão no pré-natal.

### **4.2 Hipóteses do Artigo 2**

As gestantes estarão entre o primeiro e segundo trimestre gestacional, serão em maioria de classe socioeconômica C, idade entre 24 e 29 anos, com ensino médio completo, multíparas, que planejaram a gestação. Quanto aos bebês, em maioria nascerão a termo e serão amamentados exclusivamente por pelo menos 6 meses.

Os bebês apresentarão um bom desempenho cognitivo na avaliação, com a maioria pontuando acima de 90.

Bebês de mães com maior expressão do hsa-miR-423-5p nos primeiros trimestres de gestação, apresentarão maiores escores de desenvolvimento cognitivo aos 3 meses de idade.

## 5. REVISÃO DE LITERATURA

### Estratégias de busca

Foi realizada uma pesquisa nas bases de dados Pubmed com os seguintes descritores: microRNA; miR-423-5p; pregnancy; hypertension; brain, child development e cognitive development. Nenhum filtro foi adicionado e os artigos foram selecionados para a revisão quando estavam de acordo com a temática da presente tese, ou seja, abordando o miR-423-5p na gestação, na hipertensão e no desenvolvimento infantil. A partir dos artigos encontrados, foram selecionados os estudos que mais se aproximaram do objetivo do presente trabalho, sendo incluídos na revisão um total de 95 artigos. As combinações dos descritores e o número de artigos encontrados estão demonstrados no quadro abaixo.

**Quadro 1:** Estratégias de busca

<b>Descritores</b>	<b>Pubmed</b>
microRNA AND pregnancy	3.085
mir-423-5p	304
miR-423-5p AND pregnancy	10
miR-423-5p AND hypertension	11
mir-423-5p AND brain	26
miR-423-5p AND child development	3
miR-423-5p AND pregnancy AND hypertension	2
miR-423-5p AND pregnancy AND child development	0

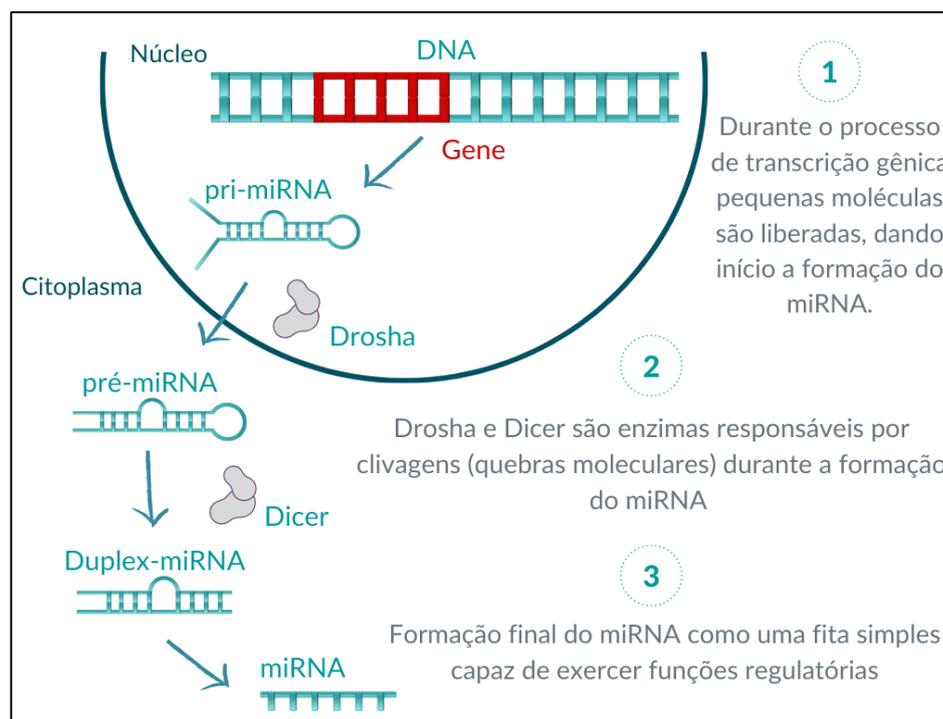
## 5.1 Introdução aos miRNAs

Os miRNAs são RNAs pequenos (~22 nucleotídeos), não codificantes, que regulam a expressão gênica ligando-se a alvos específicos de RNA mensageiro (mRNA) e promovendo sua degradação e/ou inibindo a sua tradução. Apenas um miRNA pode regular centenas de mRNAs e, como resultado, ter efeitos substanciais nas redes de expressão gênica. Consequentemente, os padrões de expressão de miRNA podem ser especialmente ricos em informações biológicas, uma vez que a variação na expressão de centenas de RNAs mensageiros pode, até certo ponto, ser refletida nos padrões de expressão de um ou alguns miRNAs que os regulam (Pritchard, Cheng, et al., 2012; Towler et al., 2015).

O perfil de expressão de miRNA provou ser útil para identificar miRNAs que são importantes na regulação de uma série de processos, incluindo o desenvolvimento do organismo e o estabelecimento e manutenção da diferenciação tecidual. Nesse sentido, os miRNAs demonstraram ser muito mais estáveis do que os mRNAs em uma variedade de tipos de amostras - incluindo plasma e soro sanguíneo, urina e blocos de emissão fixa de formalina. Ademais, também são mensuráveis com sensibilidade muito maior do que as proteínas. Diante disso, há um interesse considerável no desenvolvimento de miRNAs como biomarcadores para diversas aplicações de diagnóstico molecular, incluindo câncer, doenças cardiovasculares, autoimunes, etc (Pritchard, Cheng, et al., 2012).

Para compreender melhor sobre os miRNAs é necessário compreender sua biogênese demonstrada na figura abaixo (Figura 1). Durante o processo de transcrição gênica são liberadas pequenas moléculas conhecidas como miRNAs primários (primi-miRNA), os quais são clivados por uma enzima chamada Drosha e transformados em um miRNA precursor (pré-miRNA), ainda no núcleo. Posteriormente o pré-miRNA é exportado para o citoplasma e processado pela enzima Dicer formando um duplex de

miRNA: miRNA composto por miRNA de fita simples derivado das regiões 5' (5p) e 3' (3p) do precursor. Quando o duplex é desenrolado, uma das fitas é carregada no complexo RISC (3p), enquanto a outra fita passageira (miR) geralmente é degradada (5p). Nesse momento se dá a formação do miRNA maduro, com total capacidade de exercer suas funções regulatórias (Finnegan & Pasquinelli, 2013; Mohr & Mott, 2015).



**Figura 1:** Representação gráfica da biogênese de miRNA. (Fonte: autor)

Assim, a biogênese de miRNAs maduros ocorre por meio de um processo de várias etapas, que começa com a clivagem do transcrito primário (conhecido como pri-miRNA) para produzir um precursor de miRNA em grampo de aproximadamente 70 a 100 nucleotídeos (conhecido como pré-miRNA) e posterior clivagem para produzir o miRNA maduro. Isso significa que os pré e pri-miRNAs precisam ser distinguidos dos miRNAs maduros nas análises de perfis. Por fim, os miRNAs maduros são carregados no complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), onde são ligados por um membro

da família Argonaute (AGO) de proteínas de ligação ao RNA. Dessa forma, é importante considerar que diferentes espécies maduras de miRNA podem ser produzidas a partir de uma única molécula de pré-miRNA (Finnegan & Pasquinelli, 2013; Pritchard, Cheng, et al., 2012).

Os miRNAs que migram para fora das células e entram nos fluidos corporais, são chamados de miRNAs circulantes. De acordo com a literatura, aproximadamente 90% dos miRNAs circulantes formam complexos com proteínas, incluindo Ago2, NPM 1 (nucleofosmina 1) e lipoproteína de alta densidade, enquanto os outros 10% dos miRNAs circulantes são secretados em exossomos, que são microvesículas derivadas de endossomos que se fundem com a membrana plasmática (Czech & Hannon, 2011; Kozomara & Griffiths-Jones, 2011; Podolska et al., 2011; Wyman et al., 2011).

Nesse sentido, os miRNAs circulantes estão sendo considerados biomarcadores promissores para diferentes aspectos que tangem a saúde e a doença humana. Ademais, eles atendem a vários critérios para serem considerados um biomarcador preferível, incluindo alta especificidade, fácil acessibilidade e sensibilidade. A sensibilidade dos miRNAs foi demonstrada e seus níveis podem variar de acordo com a progressão da doença ou com a resposta à terapia. De posse dessas vantagens, os miRNAs fornecem um método não invasivo para o diagnóstico, prognóstico, e progressão da doença, bem como possibilita orientar o tratamento e avaliar a sua capacidade de resposta (Ho et al., 2022).

## **5.2 Métodos de detecção dos miRNAs**

Os métodos de processamento de amostra e extração de RNA podem ter um impacto significativo nos resultados do perfil de miRNAs, principalmente em amostras propensas à degradação. Assim, a heterogeneidade celular é uma consideração importante em estudos de perfis de miRNA envolvendo tecidos porque mudanças na proporção de

diferentes tipos de células podem influenciar os perfis de expressão obtidos. Isso é especialmente pertinente para o perfil de miRNA porque muitos miRNAs são expressos de maneira específica para cada tecido (Pritchard, Cheng, et al., 2012).

Para alguns tipos de amostras, os métodos de preparação e extração de miRNA podem necessitar de otimização, com base na compreensão do tipo de amostra que está sendo investigada e no conhecimento das variáveis que influenciam a eficiência da extração ou causam mudanças qualitativas nos perfis de miRNA. Diante disso, ressalta-se o plasma sanguíneo humano, pois este é um tipo de espécime desafiador devido aos altos níveis de atividade endógena de RNase. Embora os miRNAs plasmáticos endógenos sejam protegidos da RNase em seu estado nativo, eles podem ser degradados em segundos após extraídos, sugerindo que os métodos de extração de RNA que falham em inativar completa e rapidamente a RNase não são adequados para amostras de plasma ou soro (Chim et al., 2008; Mitchell et al., 2008; Pritchard, Cheng, et al., 2012).

Além disso, para esses tipos de amostra, outras variáveis “pré-analíticas”, como condições de centrifugação, contagem de glóbulos brancos e hemólise de glóbulos vermelhos, também podem influenciar drasticamente a natureza e a quantidade de miRNA extraído do plasma, indicando que eles precisam ser considerados nos ensaios experimentais (McDonald et al., 2011; Pritchard, Kroh, et al., 2012). Ainda, vale salientar, como exposto acima, que os miRNAs existem em pelo menos dois estados físicos distintos no sangue – dentro de vesículas/exossomos ou associados a pequenos complexos proteicos contendo AGO2 – sugerindo que as condições de processamento de amostras que alteram o conteúdo da vesícula influenciarão nos perfis de miRNA (Pritchard, Cheng, et al., 2012).

Curiosamente, durante a gravidez, o número de exossomos no plasma materno parece aumentar significativamente a partir do primeiro trimestre (Sarker et al., 2014), e

atinge um nível máximo no termo (Jin e Menon, 2018). De acordo com Sabapatha et al., 2006, estima-se que a concentração de exossomos no sangue periférico materno seja 20 vezes maior do que no controle não gestante. Em consonante, Salomon et al., 2014 sugere que os níveis retornem aqueles similares aos das não gestantes dentro de 48 horas após o parto.

Visto que, os exossomos são definidos como uma forma de microvesículas derivadas de endossomos que se fundem com a membrana plasmática (Czech & Hannon, 2011; Kozomara & Griffiths-Jones, 2011), vale salientar que o seu empacotamento é necessário para proteger os miRNAs da digestão de RNases em fluidos corporais (Wang et al., 2008). O exossomo que contém miRNAs pode entrar nas células vizinhas por captação endocítica, fusão de membrana ou integração com receptores específicos na superfície celular e afetar alvos de mRNA remotamente desde a sua origem (Hammerle-Fickinger et al., 2010; Weber et al., 2010) com base na especificidade da célula de origem, do conteúdo do exossomo e na variação dependendo da condição fisiológica e patológica (Hammerle-Fickinger et al., 2010).

Ademais, o estudo de Lättekivi e colaboradores, caracterizou vesículas extracelulares no soro sanguíneo de pacientes com psoríase crônica em placas com e sem artrite psoriática em comparação com um grupo controle saudável. Além disso, os autores descobriram várias vesículas extracelulares enriquecidas com miRNAs entre os pacientes avaliados, e uma representação significativa de vias metabólicas e funcionais potencialmente relacionadas à doença (Lättekivi et al., 2022). Dessa forma, a literatura vem relatando o papel das vesículas como mediadoras da comunicação intercelular para processos fisiopatológicos em doenças complexas e estas podem ser encontradas no soro humano (Berumen Sánchez et al., 2021; Lo et al., 2021; Pitt et al., 2016; Yu et al., 2021).

Como citado no tópico anterior e demonstrado na figura 1, as moléculas de miRNA passam por três formas: miRNAs primários, precursores e maduros. Para analisar os miRNAs primários e precursores, devido aos seus tamanhos, a detecção e quantificação dessas moléculas é semelhante aos mRNAs. Porém, o miRNA maduro é mais difícil de detectar devido ao seu pequeno tamanho. Entretanto, com o avanço da tecnologia, a detecção e quantificação de miRNA tornou-se mais fácil e eficiente. Nesse sentido, vários métodos moleculares têm sido utilizados para detectar e quantificar miRNA, incluindo Northern blot, PCR em tempo real, PCR digital, microarray e sequenciamento (Ho et al., 2022).

Northern blot pode ser utilizado para quantificar miRNAs e foi o primeiro método usado para fazer isso. É um método eficaz para detectar miRNAs com base em sondas específicas e é considerado um padrão-ouro para provar se uma nova molécula é de miRNA através da identificação do tamanho do RNA. O princípio deste método é baseado na separação do miRNA total ou do próprio RNA total em um gel de poliácridamida desnaturante. Após a separação, o RNA é transferido para uma membrana de nitrocelulose ou nylon e fixado com calor ou luz ultravioleta. Em seguida, uma sonda com marcação específica de miRNA é então hibridizada com miRNA complementar na membrana e assim a molécula é detectada (Ho et al., 2022).

O PCR quantitativo com transcriptase reversa (qRT-PCR) ajuda a detectar e quantificar miRNAs mais rapidamente e com maior sensibilidade em comparação com o Northern blot. No entanto, ao utilizar o qRT-PCR, o design adequado dos primers é crucial para trabalhar com membros distintos de uma família de miRNA desejada. Nesse sentido, para poder detectar o miRNA, várias modificações são feitas nas quais o comprimento dos miRNAs é aumentado pela adição de uma sequência poli A ou um loop de haste. No poli (A) RT-PCR em tempo real, o comprimento do miRNA maduro é

primeiro aumentado pela adição de uma cauda poli A na extremidade 3' do miRNA através da polimerase Poly A. As moléculas maduras de miRNA são então convertidas em cDNAs por primers oligo T. A PCR quantitativa é subsequentemente realizada na qual um primer específico para o miRNA alvo e um primer universal para o poli A são utilizados. No qRT-PCR os primers haste-loop são utilizados para realizar a transcrição reversa a fim de converter miRNA em cDNA. O tamanho do cDNA formado pela transcriptase reversa haste-alça ou transcriptase reversa haste-laço poli (A) é de cerca de 70 a 80 nucleotídeos. Com esse tamanho, o cDNA pode ser reconhecido por SYBR green ou Taqman Real-time PCR, no qual uma sonda Taqman é normalmente construída para se ligar à fita reversa do miRNA maduro. RT-PCR quantitativo com primers LNA é semelhante ao poli (A) RT-PCR em tempo real. No entanto, este método usa primers nos quais os nucleotídeos normais são substituídos por LNA. O LNA é um grupo de análogos de ácido nucleico que contém uma ponte metileno ligando o oxigênio 2' e o carbono 4' na porção ribose. A utilização de um primer LNA aumenta a afinidade de ligação e, portanto, a especificidade. O RT-PCR quantitativo, portanto, é uma ferramenta poderosa para a quantificação de miRNA (Ho et al., 2022).

A PCR digital (dPCR) ajuda a quantificar o miRNA dividindo uma reação de PCR em milhares de reações de PCR. Existem duas plataformas principais de dPCR: dPCR baseada em gotas (QX100 e RainDrop) e dPCR baseada em chip (QuantStudio 12k e BioMark) com um volume determinado de um nanolitro. O design de primers para PCR digital é semelhante ao PCR quantitativo convencional. Resultados negativos e positivos de reações individuais serão realizados estatisticamente para determinar a concentração alvo de miRNA no volume inicial da amostra. Considera-se que este método produz quantificação absoluta, pois não há necessidade de construir uma curva padrão como seria realizado no qPCR. Ademais existem nomenclaturas para a análise de acordo com o

fabricante, se a separação de amostras individuais for em pequenas gotas de óleo, o método é denominado PCR digital ou emulsão dPCR. Será chamado de chip-dPCR se a solução de reação for dividida em pequenos orifícios na superfície do microchip. Não obstante, vale salientar que a dPCR demonstra alta precisão e tem sido eficaz para a quantificação absoluta do miRNA alvo no soro quando comparado com a PCR em tempo real (Ho et al., 2022).

Ademais, uma série de moléculas de miRNA podem ser detectadas e quantificadas usando técnicas como *microarray* de miRNA ou sequenciamento de próxima geração (NGS, miRNA-Seq). Essas técnicas podem fornecer perfis completos de expressão de miRNA, porém o Microarray só pode medir miRNAs conhecidos e requer uma quantidade substancial de materiais de partida. Por outro lado, o NGS solicita menos material de entrada e pode identificar novos miRNAs. No entanto, a preparação da biblioteca de um sequenciamento NGS é complexa e pode adicionar viés substancial ao sequenciamento. Crucialmente, diferentes métodos de preparação de biblioteca podem resultar em variações nos dados de saída (Ho et al., 2022).

Uma das principais abordagens baseia-se na transcrição reversa de miRNA para cDNA, seguida por reação em cadeia da polimerase quantitativa (qRT-PCR), com monitoramento em tempo real do acúmulo do produto da reação (ou seja, “PCR em tempo real”). Um aspecto atraente é a facilidade de incorporação no fluxo de trabalho para laboratórios familiarizados com PCR em tempo real. A fim de dimensionar esta abordagem para o perfil de miRNA, as reações são realizadas de forma altamente paralela e de alto rendimento, ou seja, centenas de reações qRT-PCR medindo diferentes miRNAs usando as mesmas condições de reação (Pritchard, Cheng, et al., 2012). Com um número crescente de miRNA reconhecidos na literatura e com o avanço de abordagens em

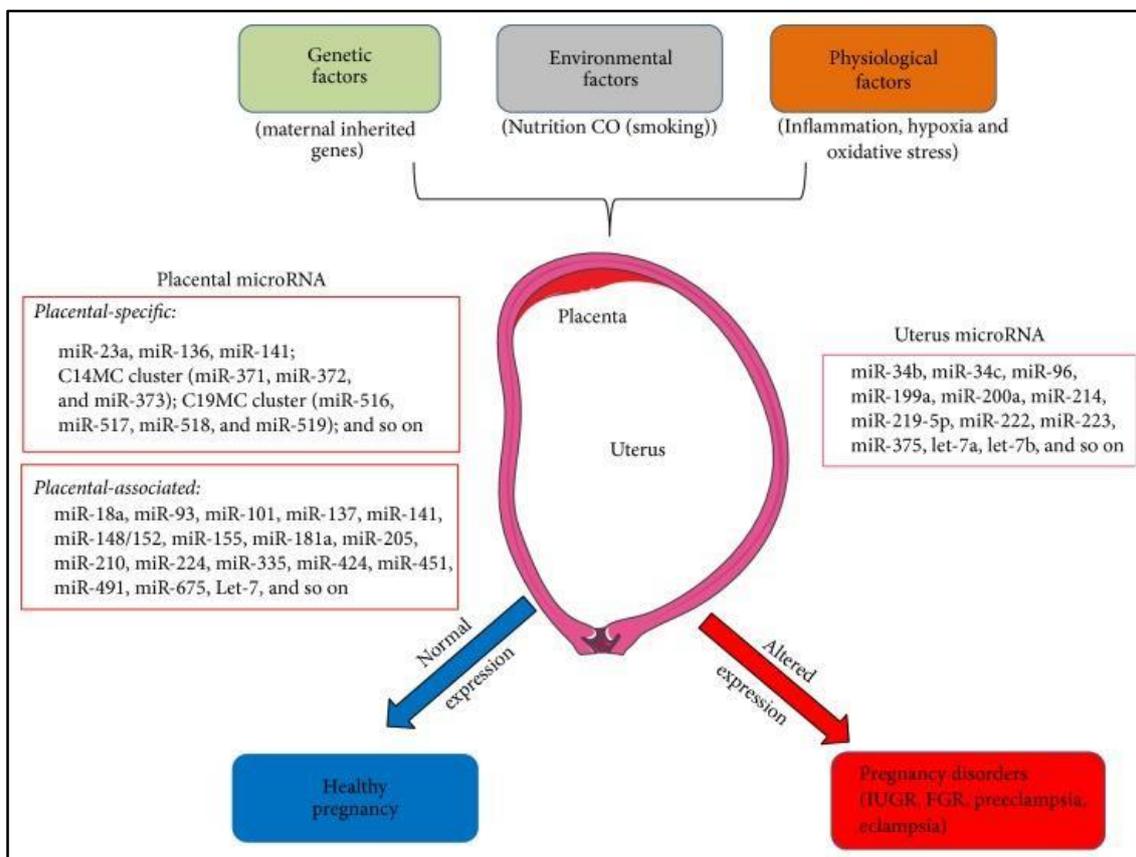
ambientes clínicos, é cada vez mais provável que marcadores específicos de miRNA contribuam para a saúde humana (Backes et al., 2016).

### **5.3 MiRNAs na fisiopatologia da gestação**

Nos últimos anos, os papéis notáveis dos miRNAs nos processos celulares em condições de saúde e doença têm sido cada vez mais reconhecidos (Aghdam et al., 2019; Davoodvandi et al., 2021; Mirzaei & Hamblin, 2020; Razavi et al., 2021; Sadri Nahand et al., 2020). Visto isso, vários estudos têm demonstrado que a eliminação das principais enzimas no processamento do miRNA resulta em parada embrionária ou mesmo morte embrionária (Alisch et al., 2007; Bernstein et al., 2003; Suh et al., 2010), indicando assim a importância dos miRNAs na regulação do processo gravídico (Xu et al., 2021).

Em consoante, a gestação é uma condição fisiológica regulada também por fatores genéticos (por exemplo, genes herdados da mãe), ambientais (por exemplo, nutrição) e fisiológicos (por exemplo, inflamação, hipóxia). Congruentemente, muitos estudos sugerem que a expressão de miRNA pode ser alterada em resposta a essas mudanças (Khorram et al., 2010; Kulshreshtha et al., 2007; Qiu et al., 2012). Assim, é proposto na literatura que os miRNAs respondem às mudanças fisiológicas durante a gestação a fim de facilitar o sucesso do processo de gravidez, enquanto a desregulação dos miRNAs é capaz de causar ou contribuir para o desenvolvimento de distúrbios ou desfechos negativos da gravidez, tanto para a mãe quanto para o bebê (Cai et al., 2017). Nesse sentido, Cai e colaboradores trazem a imagem abaixo (Figura 2) a fim de demonstrar os miRNAs descritos na literatura encontrados na placenta e no útero. Segundo os autores diante das influências externas capazes de alterar a expressão dos miRNAs a gestação poderá decorrer de maneira saudável ou mãe e bebê estarão predispostos a desordens da

gestação como, restrição de crescimento intrauterino, preeclampsia, eclampsia, parto prematuro, etc (Cai et al., 2017).



**Figura 2:** Representação gráfica do estudo de Cai et al. 2017 acerca dos miRNAs encontrados no útero e na placenta

De fato, numerosos estudos mostraram alterações nos perfis de miRNA durante a gravidez associado à complicações materno fetais (Cai et al., 2017; Morales-Prieto et al., 2013). Vários tipos de células secretam ativamente miRNAs na circulação e, portanto, podem mediar o *crosstalk* entre diferentes tipos de células ou órgãos e, simultaneamente, representar biomarcadores de doenças (Ottaviani et al., 2018). Nesse contexto, tem sido demonstrado que muitos miRNAs que são diferencialmente expressos no soro ou plasma materno se originam da placenta (Kotlabova et al., 2011; Miura et al., 2010). De acordo com a literatura, mais de 1.000 miRNAs maduros já foram identificados em genomas

humanos (Friedländer et al., 2014), entre os quais mais de 600 miRNAs foram encontrados na placenta humana (Mouillet et al., 2015). Além disso, estudos *in vitro* e *in vivo* revelaram os papéis vitais desses miRNAs derivados da placenta na regulação do comportamento das células trofoblásticas e na ocorrência de doenças relacionadas a gestação (Awamleh & Han, 2020; Dong et al., 2020; Xu et al., 2014). Além das funções de silenciamento intracelular, uma característica atraente dos miRNAs derivados da placenta é sua capacidade de ser liberado para a circulação materna e, assim, potencialmente direcionar várias células maternas para fornecer um meio hormonal de comunicação intercelular entre a mãe e o feto (X. Chen et al., 2012; Xu et al., 2021)

Os miRNAs associados à placenta são expressos de forma ubíqua na placenta e em outros tecidos e mostram diferentes perfis de expressão em várias idades gestacionais de células trofoblásticas, tecido placentário e plasma materno. Um total de 45 miRNAs foram identificados como expressos diferencialmente nas células trofoblásticas no primeiro e terceiro trimestres gestacionais, com 58% desses miRNAs sendo associados à diretamente a placenta (Morales-Prieto et al., 2012). Um estudo recente sobre perfis de miRNA em placenta humana identificou 191 miRNAs expressos diferencialmente entre placentas do primeiro e terceiro trimestre. Além disso, o estudo revelou que os miRNAs oncogênicos, angiogênicos e antiapoptóticos foram expressos predominantemente nas placentas do primeiro trimestre, enquanto a expressão de miRNAs relacionados à diferenciação celular e supressão tumoral foi predominante nas placentas do terceiro trimestre (Gu et al., 2013).

Como os miRNAs são conhecidos por serem liberados na circulação, esforços têm sido feitos para identificar os perfis de expressão desses miRNAs na circulação materna e explorar seu potencial diagnóstico (Sandrim et al., 2016; Wittmann & Jäck, 2010; Yang et al., 2011). Assim, Kotlabova e colaboradores, testaram a expressão de alguns miRNAs

específicos da placenta conhecidos e encontraram sete membros do cluster C19MC no plasma (Kotlabova et al., 2011). Em um estudo de acompanhamento, a expressão desses sete miRNAs foi aumentada na circulação de mulheres que estavam no início da gestação e posteriormente desenvolveram distúrbios da gravidez (Hromadnikova et al., 2012).

Outrossim, no soro de gestantes, os miRNAs associados à placenta foram significativamente elevados em comparação a mulheres não grávidas e seus níveis de expressão correlacionados com os estágios da gravidez (Gilad et al., 2008). Além disso, um grupo de miRNAs regulados por hipóxia e específicos da placenta aumentou 1,84 vezes no plasma de mulheres com restrição de crescimento fetal (Mouillet et al., 2010). Contudo é importante ressaltar que a expressão desses miRNAs na placenta foi reduzido quando comparado com gestantes saudáveis, o que sugere uma correlação inversa da expressão de miRNAs circulatórios e placentários. Desse modo, é válido ressaltar o importante papel dos miRNAs no decorrer da gestação, suscitando-os como biomarcadores tanto a nível placentário quando a nível periférico através do plasma e do soro materno, o que torna plausível sua análise sem oferecer riscos a mãe e ao bebê.

#### **5.4 MiRNAs na hipertensão arterial durante a gestação**

Segundo as novas diretrizes publicadas em 2017 pelo *American College of Cardiology* (ACC) e pela *American Heart Association* (AHA), a avaliação da hipertensão arterial pode ser simplificada da seguinte maneira: Normal: < 120 x 80 milímetros de mercúrio (mmHg); Elevada: 120 a 129 x 80 mm Hg; Hipertensão Estágio 1: 130 a 139 x 80 a 89 mm Hg; e Hipertensão Estágio 2  $\geq$  140 x 90 mmHg (Roberts et al., 2013; Zhang et al., 2018).

A hipertensão durante a gestação pode ser classificada em crônica ou gestacional. Define-se como hipertensão crônica quando a PA sistólica se encontra  $\geq$  140 mmHg ou a

PA diastólica  $\geq 90$  mmHg em 2 ocasiões antes da gestação ou antes de 20 semanas de gestação. A hipertensão crônica complica aproximadamente 1 a 5% de todas as gestações. Já a hipertensão gestacional se desenvolve após 20 semanas de gestação (tipicamente depois das 37 semanas) e persiste até 6 semanas pós-parto; acontece em aproximadamente 5 a 10% de todas as gestações, com mais frequência em gestações múltiplas (Roberts et al., 2013). Contudo, os dois tipos de hipertensão aumentam o risco de pré-eclâmpsia e eclâmpsia, além de outras causas da morbidade ou mortalidade materna, incluindo encefalopatia hipertensiva, acidente vascular encefálico, insuficiência renal, insuficiência ventricular esquerda, síndrome HELLP (hemólise, aumento das enzimas hepáticas e plaquetopenia).

Além disso, há a morbimortalidade fetal que aumenta em razão da diminuição do fluxo sanguíneo uteroplacentário, que pode causar vasoespasmo, restrição de crescimento intrauterino, hipóxia e descolamento prematuro da placenta. Os resultados são piores se a hipertensão é grave, ou seja, PA sistólica  $\geq 160$  mmHg, PA diastólica  $\geq 110$  mmHg, ou acompanhada por insuficiência renal (Roberts et al., 2013).

Diante disso, vale salientar que durante a gravidez ocorrem várias adaptações cruciais no sistema cardiovascular que são necessárias para a progressão de uma gestação bem-sucedida (Sanghavi & Rutherford, 2014). A má adaptação do sistema cardiovascular durante a gravidez em mulheres previamente saudáveis pode levar a complicações que podem causar mortalidade materna e fetal (Graves & Davis, 2018; Mogos et al., 2018). Dados crescentes demonstram expressão alterada de miRNA circulante na gravidez afetada por complicações cardiovasculares (Cai et al., 2017; Morales-Prieto et al., 2013). Ao longo das últimas duas décadas, os miRNAs circulantes e específicos do tecido tornaram-se de crescente interesse como moduladores e biomarcadores de fisiopatologia,

diagnóstico e prognóstico em uma variedade de distúrbios cardiovasculares (Aryan et al., 2020).

O sistema cardiovascular materno sofre diversas alterações durante a gravidez. O fluxo sanguíneo aumenta para atender às necessidades metabólicas dos órgãos maternos e do feto (L. X. Liu & Arany, 2014). O volume sanguíneo aumenta aproximadamente 45% acima dos níveis pré-gravidez. O volume sistólico, a frequência cardíaca e o volume diastólico final aumentam, resultando em aumento do débito cardíaco (Sanghavi & Rutherford, 2014). Assim, o débito cardíaco aumenta até 50% acima dos níveis pré-gravidez em cerca de 16 a 20 semanas de gestação (Hall et al., 2011). Tanto a pressão arterial sistólica quanto a diastólica diminuem no primeiro e segundo trimestres (Hall et al., 2011; Soma-Pillay et al., 2016). No entanto, a pressão arterial aumenta no terceiro trimestre, retornando à linha de base no final da gravidez (Soma-Pillay et al., 2016). Para atender a essas alterações hemodinâmicas durante a gravidez, o coração sofre alterações estruturais e funcionais (Aryan et al., 2020).

Em consoante, vias de sinalização molecular cardíaca são ativadas na hipertrofia induzida pela gravidez de maneira distinta daquelas ativadas durante a hipertrofia patológica (Timofeeva et al., 2018). Nesse sentido, algumas vias demonstraram ser reguladas por miRNAs. De acordo com Guo e colaboradores, 2018, a expressão do miR-423-5p no plasma sanguíneo de gestações normais e PE foi detectada usando o ensaio RT-qPCR. Os resultados mostraram que a expressão de miR-423-5p foi aumentada no plasma sanguíneo de mulheres grávidas com PE (N=20) em comparação com o plasma sanguíneo de mulheres grávidas saudáveis (Normal, N=20), indicando que o miR-423-5p pode estar implicado na patogênese da PE. Além disso, os autores demonstraram que o miR-423-5p foi capaz de suprimir a proliferação, a migração e a invasão celular, além de

facilitar a apoptose celular em células HTR-8/SVneo , uma linhagem de células de trofoblásticas(Guo et al., 2018).

O estudo de Zhang e colaboradores em 2018, encontrou correlações negativas significativas da expressão dos miRNAs com hipertensão em pacientes adultos de ambos os sexos: miR-133a-3p (r: 0,175, P = 0,031), miR-199a-3p (r: 0,293, P <0,001), miR-1-3p (r: 0,276, P = 0,001), miR -208a-3p (r: 0,299, P <0,001), miR-423-5p (r: 0,299, P <0,001), miR-223-3p (r: 0,337, P <0,001), miR-122-5p (r: 0,368, P <0,001). Em contraste, níveis estatisticamente aumentados de miR-18b-5p (r: -0,259, P = 0,001), miR-20b-5p (r: -0,306, P = 0,001), miR-548c-3p (r: -0,231, P = 0,007), miR-499a-5p (r: -0,244, P = 0,005) foram observados em pacientes adultos com hipertensão. Além disso, os autores descrevem ter encontrado os quatro melhores biomarcadores para hipertensão (miR-122-5p, miR-199a-3p, 208a-3p, miR-423-5p e miR-223-5p) e identificado a melhor combinação desses miRNAs (199a -3p, 208a-3p, 122-5p e 223-3p), fornecendo mais informações sobre miRNAs como biomarcadores de hipertensão. Ainda, quatro desses miRNAs (miR-1-3p, miR-20b-5p, miR-548c-3p, miR-499a-5p) foram significativamente correlacionados com Troponina cardíaca T (cTNT), indicando que esses miRNAs podem ser usados como indicadores de infarto do miocárdio (Zhang et al., 2018).

Não obstante, vale salientar que medidas preventivas para transtornos hipertensivos na gestação são particularmente importantes para melhorar os desfechos, visto que o não tratamento pode causar diversas complicações. Assim, a determinação de biomarcadores periféricos é de suma importância no intuito de identificar a hipertensão o mais precoce possível para que intervenções sejam planejadas e os impactos na mãe e no bebê sejam mínimos.

## 5.5 Papel dos miRNAs no cérebro

No início da vida, “o desenvolvimento cerebral depende de mecanismos complexos e interligados durante a gestação e os meses pós-natais, com intensas interações entre fatores genéticos, epigenéticos e ambientais”(Dubois et al., 2014).

Em acordo com o exposto acima, evidências científicas têm demonstrado a expressão de muitos miRNAs regulados dinamicamente durante a neurogênese, a maturação neuronal e o desenvolvimento cerebral (Cheng et al., 2009; Kapsimali et al., 2007; C. Liu et al., 2010). Para descrever melhor a relevância dos miRNAs nesse processo, a literatura demonstra que a deleção genética da enzima Dicer interrompe a biogênese do miRNA (figura 1) e por isso é uma estratégia amplamente utilizada para investigar o papel dos miRNAs nos processos de neurodesenvolvimento. Nesse sentido, estudos em modelos animais foram realizados ao longo do tempo a fim de identificar o real papel dos miRNAs diretamente no cérebro. O estudo realizado por Giraldez e colaboradores utilizou peixe-zebra deficientes em Dicer, os quais exibiram defeitos marcados no desenvolvimento neural, e através de uma injeção de miR-430, um miRNA abundante no cérebro, muitos defeitos foram recuperados (Giraldez et al., 2005).

Em estudos realizados com camundongos, a deleção de Dicer resultou em déficits no desenvolvimento do cérebro, falha no desenvolvimento do fenótipo neuronal, atrofia neuronal, defeitos graves de crescimento e até mesmo morte precoce (Huang et al., 2010). A deficiência da enzima Dicer geralmente coincide com o acúmulo neuronal de proteínas tipicamente associadas a distúrbios neurodegenerativos (Bilen et al., 2006). Nesse sentido, identifica-se a hiperfosforilação da Tau endógena, uma proteína associada a microtúbulos que é um componente importante dos emaranhados neurofibrilares

característicos da doença de Alzheimer (AD) e outras demências, e foi detectada em camundongos com deleção de Dicer em todo o prosencéfalo (Hébert et al., 2010).

Além disso, miRNAs específicos têm sido implicados na diferenciação neuronal e na manutenção do fenótipo neuronal (H. Chen et al., 2010; Mellios et al., 2011; Vo et al., 2010). Por exemplo, o miR-133b é enriquecido nos neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo do cérebro dos mamíferos, e possui a capacidade de regular a maturação e a função dos neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo por meio de um circuito de feedback negativo envolvendo o fator de transcrição Pituitária homeobox 3 (Pitx3) (Tognini et al., 2011). Em consonância, o miR-124 foi descrito com capacidade de promover a expressão gênica neuronal na diferenciação de células progenitoras neurais através da linhagem celular de células tronco embrionárias (Smirnova et al., 2005). Além disso, o miR-132 demonstrou ser rapidamente regulado positivamente no córtex visual primário de roedores recém-nascidos após a abertura dos olhos e foi retardado pela criação no escuro (Mellios et al., 2011). Por outro lado, a privação monocular reduziu a expressão de miR-132 no córtex contralateral ao olho privado de luz (Tognini et al., 2011). Esses achados mostram que os miRNAs regulam o desenvolvimento e a manutenção de neurônios saudáveis e que a disfunção do miRNA pode contribuir para anormalidades do neurodesenvolvimento e distúrbios neurodegenerativos (Im & Kenny, 2012).

## **5.6 Desenvolvimento infantil**

Atualmente, é amplamente reconhecido que os primeiros 1.000 dias de vida, abrangendo a concepção até dois anos após o parto, constituem um período único de importância no desenvolvimento infantil. Esta fase coincide com o rápido crescimento e expansão do sistema nervoso central (SNC) infantil, conferindo uma sensibilidade particular dos processos de neurodesenvolvimento às influências ambientais (Cusick &

Georgieff, 2016; Krebs et al., 2017). A arquitetura anatômica do cérebro é predominantemente determinada neste momento, mediada pela complexa interação entre a estrutura genética do bebê e seu ambiente circundante. Portanto, as experiências de adversidades durante a primeira infância podem ter consequências ao longo da vida, principalmente para resultados neurocognitivos (Fox et al., 2010; Lockyer et al., 2021; Schwarzenberg & Georgieff, 2018).

A avaliação neurocomportamental neonatal tornou-se um componente padronizado e comum dos cuidados clínicos prestados aos recém-nascidos. As primeiras edições de avaliações neurocomportamentais neonatais datam de 1900 e enfatizavam principalmente a avaliação da organização e maturação do SNC (El-Dib et al., 2011; Gardner et al., 2006). Avaliações mais recentes incluem itens que enfocam o desenvolvimento neurocomportamental do recém-nascido, relacionando o desenvolvimento do sistema nervoso com o comportamento funcional no ambiente pós-natal (Brown & Spittle, 2014; Hammock & Levitt, 2006). Medidas neurocomportamentais baseadas na força destacam a importância de avaliar as capacidades do bebê de acordo com o meio de desenvolvimento do bebê (El-Dib et al., 2011).

A avaliação sistemática da maturidade e organização do SNC neonatal envolve a avaliação de reflexos primitivos, movimentos espontâneos/induzidos e comportamentos sensoriais (Brown & Spittle, 2014; El-Dib et al., 2011; Majnemer & Snider, 2005). Comportamentos reflexivos e sensoriais sofrem rápidas mudanças sequenciais no período neonatal (El-Dib et al., 2011), e, como tal, são construtos neurofisiológicos úteis para discriminar a função comprometida do SNC em neonatos de alto risco versus neonatos saudáveis. Além da função do SNC, a avaliação do perfil neurocomportamental do recém-nascido envolve a avaliação de três capacidades principais: atividade motora

ativa/passiva, estado-organização/regulação da excitação, e atenção/habilidades interativas. A Teoria Sinativa da Organização Comportamental Neonatal conceitua o desenvolvimento infantil como a organização progressiva e a integração de cinco domínios, incluindo: fisiologia, controle motor, estado-organização/excitação, capacidade de atenção/interação e autorregulação (Als, 1982; Nugent, 2015). Quando os domínios são integrados e sincronizados ajudam um bebê maduro a administrar as informações sensoriais e regular o seu comportamento.

De 1 a 12 meses de idade, uma das principais tarefas de desenvolvimento do bebê é regular seu comportamento através de mecanismos modulatórios neurofisiológicos básicos, como desvincular-se de estímulos adversos e engajar-se em comportamentos auto tranquilizadores, no intuito de modular altos níveis de excitação e/ou angústia (Berger et al., 2007; Nugent, 2015). Dos 9 aos 12 meses de idade, a regulação sensório-motora melhora constantemente à medida que as habilidades motoras amadurecem, facilitando o comportamento simples direcionado a um objetivo, bem como o redirecionamento do comportamento quando necessário. À medida que as habilidades de atenção focada e de atenção alternada se desenvolvem em paralelo com as habilidades de regulação sensório-motora, os bebês são cada vez mais capazes de regular a reatividade e o estresse emocional (Berger et al., 2007; Rothbart et al., 2008).

Nesse sentido, nota-se a primeira infância como um período crítico no desenvolvimento, pois ganhos rápidos nos domínios físico, cognitivo e socioemocional constituem os “blocos de construção” do crescimento posterior das crianças e devem ser acompanhados. Os múltiplos domínios do desenvolvimento infantil estão interligados. Por exemplo, uma boa nutrição durante os primeiros anos é importante para o desenvolvimento físico saudável e melhora o crescimento cognitivo e socioemocional (Bornstein et al., 2012). A capacidade de resposta no relacionamento pai-filho promove

um desenvolvimento socioemocional saudável e leva a melhores resultados físicos e cognitivos (Zaff et al., 2003). Assim, o desenvolvimento do bebê e da criança depende da interdependência significativa dos fluxos de desenvolvimento (Wilks et al., 2010).

Diante dos dados descritos acima, é reforçada a ideia de que os primeiros 1000 dias de vida se tornaram cada vez mais conhecidos como uma “oportunidade de ouro” para moldar o desenvolvimento cognitivo, emocional e comportamental de uma criança, visto que grande parte da estrutura e capacidade cerebral é formada por volta dos 3 anos de idade (Cusick & Georgieff, 2016; Derbyshire & Obeid, 2020).

Estudar como o cérebro humano saudável se desenvolve é importante para entender os mecanismos patológicos precoces e avaliar a influência de eventos fetais ou perinatais na vida adulta. O desenvolvimento do cérebro depende de mecanismos complexos e interligados, especialmente durante a gestação e os primeiros meses pós-natais, com intensas interações entre fatores genéticos, epigenéticos e ambientais. Embora o cérebro do bebê seja organizado desde cedo, não é um cérebro adulto em miniatura: as alterações cerebrais regionais são assíncronas e prolongadas, ou seja, as regiões sensório-motoras se desenvolvem cedo e rapidamente, enquanto as regiões associativas se desenvolvem mais tarde e lentamente ao longo de décadas (Dubois et al., 2014).

O desenvolvimento cognitivo é considerado a base da inteligência. A avaliação da inteligência de bebês e crianças pequenas depende da progressão em dois domínios do desenvolvimento: resolução de problemas e linguagem. As crianças avançam nesses domínios aprendendo, onde aprender requer a capacidade de direcionar e manter a atenção, bem como a capacidade de manipular informações. Aspectos-chave do desenvolvimento cognitivo incluem memória, competência representacional, atenção e velocidade de processamento. O desenvolvimento cognitivo bem-sucedido requer progresso em todos esses domínios (Wilks et al., 2010).

Nesse sentido, segundo Jean Piaget, o desenvolvimento cognitivo é dividido em 4 estágios principais: sensório-motor, pré-operatório, operatório concreto e operatório formal. O primeiro estágio compreende a faixa etária do nascimento aos 18-24 meses de idade, ou seja, os primeiros 1000 dias de vida. Nesse período a criança possui uma inteligência prática, baseada na manipulação e percepção de objetos concretos. Ela só se manifesta quando há objetos ao alcance dos bebês. É neste estágio que há um aumento na capacidade sensorial e motora. Nos primeiros meses de vida, o bebê se adapta a partir de reflexos, desenvolvendo aos poucos a consciência e a intencionalidade das ações motoras. Ele também se concentra apenas no que pode perceber imediatamente pelos sentidos, se um objeto não está à vista, para a criança ele não existe. Outra característica deste estágio do desenvolvimento cognitivo é a passagem de uma percepção egocêntrica do mundo para um maior interesse nas outras pessoas. O bebê adquire progressivamente uma consciência sobre o mundo externo e sobre como os outros percebem este mundo (Newton et al., 2005).

Diante de todo o exposto, nota-se a relevância em investigar e acompanhar o desenvolvimento dos bebês desde o período pré-natal, contudo a literatura apresenta lacunas nessa temporalidade, principalmente no que tange aspectos biológicos maternos e os impactos na vida dos bebês. Nesse sentido, é necessário almejar métodos de identificação precoce, para que possamos intervir o mais cedo possível nas crianças a fim de minimizar os impactos que poderão aparecer ao longo da vida por situações vivenciadas pela mãe durante a gestação.

## **6. MÉTODO**

### **6.1 Delineamento**

Trata-se de um estudo aninhado a um projeto maior de base populacional, realizado em uma cidade do Sul do Brasil, intitulado “Transtornos neuropsiquiátricos maternos no ciclo gravídico-puerperal: detecção e intervenção precoce e suas consequências na tríade familiar”, sob coordenação do professor doutor Ricardo Tavares Pinheiro, financiado pela Fundação Bill e Melinda Gates. Os artigos previstos para a referida tese tratam-se de uma proposta de estudo transversal (artigo 1) e um estudo longitudinal (artigo 2), cujas subamostras foram selecionadas a partir do projeto maior.

### **6.2 Participantes**

#### ***6.2.1 Captação da amostra***

O processo de amostragem do projeto maior foi realizado em múltiplos estágios, tendo setores censitários delimitados pelo Instituto Brasileiro de Estatística (IBGE) como unidades amostrais primárias. Assim, foram listados 488 setores censitários da zona urbana da cidade de Pelotas de acordo com a malha do Censo de 2010 para o sorteio sistemático de 244 setores (50% do total). Após, os moradores de todas as casas dos setores sorteados, receberam uma visita realizada por bolsistas treinados, para a identificação dos domicílios com gestantes nas primeiras 24 semanas de gestação. E estas foram convidadas a participar da pesquisa. A captação da amostra inicial foi finalizada no ano de 2016, compreendendo 983 gestantes no baseline.

Baseado nisso, selecionamos uma subamostra para a presente tese, na qual foram selecionadas as gestantes que tiveram suas amostras de miRNA amplificadas previamente.

### **6.2.2 Cálculo amostral**

O número estimado de mulheres para o estudo maior, entre os três trimestres gestacionais, por setor censitário foi de 7,8, o que acarretaria uma amostra de 1.903 gestantes, porém a amostra foi composta apenas por mulheres no primeiro e segundo trimestre, assim a amostra final ficou em torno de 983 mulheres.

Para a subamostra foram definidos critérios de inclusão a partir da amplificação prévia de miRNAs em parte da amostra mencionada acima. A posteriori será realizado um cálculo de poder de amostra de acordo com a metodologia de cada artigo.

### **6.2.3 Critérios de inclusão**

- Estar grávida e no máximo na 24<sup>o</sup> semana de gestação no momento da captação inicial (artigos 1 e 2);
- Residir nos setores censitários pré-estabelecidos na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil no momento da captação inicial (artigos 1 e 2);
- Consentir a participação no estudo e avaliações propostas (artigos 1 e 2);
- Aceitar a coleta de material biológico (artigos 1 e 2);
- Análise de miRNA prévio (artigos 1 e 2).
- Participar da avaliação pós-parto permitindo a avaliação do desenvolvimento do bebê (artigo 2);

### **6.2.4 Critérios de exclusão**

- Gestantes que não tiveram a amostra de miRNA amplificada (artigos 1 e 2).
- Apresentar sintomas de ansiedade, depressão ou risco de suicídio (artigos 1 e 2);

## **6.3 Procedimentos e instrumentos**

### **6.3.1 Coleta de dados**

A coleta de dados, para avaliação das mães, foi prevista em dois momentos: o primeiro, chamado de *baseline*, momento em que a gestante foi identificada, antes das 24 semanas gestacionais. E o segundo momento, 3 meses após o parto, chamada de avaliação pós-natal, além das mães, os bebês também foram avaliados quanto ao seu desenvolvimento de acordo com a escala mencionada a seguir. Ambas as etapas são compostas de aplicação de questionários, utilizando-se métodos e escalas previamente validados. As equipes de coleta de dados e de material biológico foram previamente treinadas.

Dentre as variáveis utilizadas estão: idade, escolaridade, classificação socioeconômica, índice de massa corporal (IMC), primiparidade, planejamento da gestação, idade gestacional, hipertensão no pré-natal, escore de desenvolvimento dos bebês e quantificação dos miRNAs maternos.

### **6.3.2 Instrumentos para coleta de dados**

Foi utilizado um questionário semiestruturado onde as variáveis citadas anteriormente foram coletadas. A variável idade foi coletada como contínua e posteriormente categorizada em tercil, assim como a escolaridade coletada e anos de estudo e posteriormente categorizada. O Critério de Classificação Econômica Brasil do ano de 2015 foi aplicado para determinar a classe social das gestantes participantes, seguindo os procedimentos recomendados pela ABEP. O IMC foi realizado com base no peso e altura da gestante. As variáveis primiparidade, planejamento da gestação, e hipertensão foram coletadas como dicotômicas (Sim ou Não). Já a idade gestacional, o escore de desenvolvimento infantil e a expressão dos miRNAs são variáveis numéricas.

O desenvolvimento cognitivo do bebê aos 3 meses de idade foi mensurado pela *Bayley Scales of Infant and Toddler Development*, em sua 3ª edição (Bayley-III). O Bayley-III é um conjunto de escalas administradas individualmente em crianças de 1 a 42 meses de idade, avaliando cinco domínios do desenvolvimento infantil: cognição, linguagem (receptiva e expressiva), motricidade (fina e grossa), socioemocional e comportamento adaptativo. Para este estudo será utilizado o domínio cognitivo, que é medido através da observação do comportamento do bebê diante de diversos estímulos feitos por avaliadores devidamente treinados. Apesar do Bayley-III não ser adaptado para o Brasil, um estudo recente fez a adaptação transcultural dos domínios cognitivo, linguagem e motricidade para crianças brasileiras. As escalas mostraram boa confiabilidade, com coeficientes  $\alpha$  de Cronbach  $\geq 0,95$  (Madaschi; Mecca; Macedo; Paula, 2016). Entretanto, por não haver tabelas normativas para a população brasileira, utilizaremos em nossas análises o escore composto das escalas, ajustado para idade e prematuridade, e não o percentil. Quanto maior o escore, melhor o desenvolvimento infantil.

### ***6.3.3 Coleta de material biológico***

A coleta de material biológico das gestantes para a extração de miRNA aconteceu em todas as etapas, concomitantemente a coleta de dados. As amostras de sangue total foram coletadas por punção venosa periférica no turno da manhã entre 8:00 e 12:00 horas, e encaminhadas para o Laboratório de Neurociências Clínicas (LANEC), da UCPel. O sangue foi centrifugado a 3000 rcf por 10 minutos a 4°C. Uma vez encerrado o ciclo de centrifugação, o soro fica suspenso, e ao fundo do tubo fica formado o coágulo. Subsequentemente, o soro foi aliquotado com 800 $\mu$ l em cada microtubo (ependorff), e armazenados a -80°C para posterior extração de miRNA.

#### **6.3.4 Extração do RNA total e análise dos miRNAs**

Para analisar a expressão dos miRNAs no soro humano, inicialmente o RNA total será isolado, em detrimento ao procedimento para pequenos RNAs, visto que o RNA total permite avaliar criticamente a qualidade do RNA e posteriormente quantificá-lo. O RNA total será extraído utilizando o Kit de purificação de RNA e proteína nativa mir Vana™ PARIS™ (ThermoFisher Scientific), seguindo as normas do fabricante em protocolo simplificado pré-estabelecido (Apêndice 1). A utilização desse kit prevê o preparo das soluções contidas no mesmo, para subsequentemente, promover o rompimento e realização da extração da porção orgânica das amostras, o isolamento final de RNA para purificação e obtenção do RNA total. O RNA total isolado será convertido em DNA complementar (cDNA), utilizando o Kit de síntese avançada de cDNA de miRNA TaqMan™ (ThermoFisher Scientific) através de protocolo simplificado pré-estabelecido (Apêndice 2). Subsequentemente, será realizada uma reação de pré-amplificação, utilizando sondas de pré-amplificação. Todas as reações desse processo serão executadas conforme sugerem os protocolos dos fabricantes. De posse das amostras de cDNA, essas deverão ser mantidas em -80°C até a análise pela técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR). A técnica de RT-PCR será utilizada para detectar a expressão dos miRNAs (hsa-miR-423-5p, hsa-miR-451a, hsa-miR221-3p, hsa-miR16-5p e hsa-miR-17-5p). Para esse processo, será utilizado o kit Taq Man Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific), conforme as especificações do fabricante, através de protocolo simplificado pré-estabelecido (Apêndice 3). Os valores de CT serão normalizados de acordo com o método delta CT com o controle endógeno (hsa-miR-17-5p). Para determinar o valor  $\Delta$ CT correspondente, o valor CT dos miRNAs do gene alvo foi subtraído do valor CT do hsa-miR-17-5p.

#### **6.4 Processamento e análise de dados**

O processamento dos dados no estudo maior, foi realizado através de dupla entrada no programa Epi-Info 6.04d com checagem automática no momento da digitação. Além disso, foi testado no mesmo software inconsistências de digitação comparando as duas entradas de dados.

Para o tratamento estatístico dos dados do presente projeto de tese será utilizado o programa SPSS 26.0. Para a comparação de variáveis contínuas com distribuição normal entre os grupos de pacientes serão utilizados o teste t de Student ou análise da variância (ANOVA), e o teste do qui-quadrado para a comparação entre variáveis normais. Para a análise da interação entre os fatores será realizada regressão logística binária (artigo 1), regressão linear e correlação de spearman (artigo 2). Valores de  $p \leq 0,05$  serão considerados estatisticamente significativos.

#### **6.5 Aspectos éticos**

O estudo maior foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UCPel, sob o número de protocolo 1.729.653. Assim, seguem em anexo a Carta de Aceite da Instituição (Anexo A), bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para gestantes maiores (Anexo B) e menores de idade (Anexo C).

##### **6.5.1 Riscos**

Este estudo pode apresentar risco mínimo às gestantes pela coleta sanguínea e possível mobilização de sentimentos ou sintomas decorrentes da aplicação dos questionários, bem como ao receber orientação sobre possíveis dificuldades em relação ao desenvolvimento de seus filhos.



Apresentação dos resultados parciais e finais em eventos científicos		X		X			X	X
Defesa da Tese								X

### 6.7 Orçamento

O presente projeto é parte de um estudo maior financiado pela Fundação Bill e Melinda Gates, pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT), contemplado pelo valor total de R\$449.379,80. Para a referente proposta não há custo adicionais. Maiores detalhes sobre os custos de extração dos miRNAs podem ser visualizados no apêndice 5.

**REFERÊNCIAS**

- Aghdam, A. M., Amiri, A., Salarinia, R., Masoudifar, A., Ghasemi, F., & Mirzaei, H. (2019). MicroRNAs as diagnostic, prognostic, and therapeutic biomarkers in prostate cancer. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 29(2). <https://doi.org/10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2019025273>
- Alisch, R. S., Jin, P., Epstein, M., Casparly, T., & Warren, S. T. (2007). Argonaute2 is essential for mammalian gastrulation and proper mesoderm formation. *PLoS Genetics*, 3(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030227>
- Als, H. (1982). Toward a synactive theory of development: Promise for the assessment and support of infant individuality. *Infant Mental Health Journal*, 3(4). [https://doi.org/10.1002/1097-0355\(198224\)3:4<229::AID-IMHJ2280030405>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1097-0355(198224)3:4<229::AID-IMHJ2280030405>3.0.CO;2-H)
- Aryan, L., Medzikovic, L., Umar, S., & Eghbali, M. (2020). Pregnancy-associated cardiac dysfunction and the regulatory role of microRNAs. In *Biology of Sex Differences* (Vol. 11, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s13293-020-00292-w>
- Awamleh, Z., & Han, V. K. M. (2020). Potential pathophysiological role of microRNA 193b-5p in human placentae from pregnancies complicated by preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Molecular Biology Reports*, 47(9). <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05705-y>
- Backes, C., Meese, E., & Keller, A. (2016). Specific miRNA Disease Biomarkers in Blood, Serum and Plasma: Challenges and Prospects. *Molecular Diagnosis and Therapy*, 20(6). <https://doi.org/10.1007/s40291-016-0221-4>

- Berger, A., Kofman, O., Livneh, U., & Henik, A. (2007). Multidisciplinary perspectives on attention and the development of self-regulation. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 82, Issue 5). <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.06.004>
- Bernstein, E., Kim, S. Y., Carmell, M. A., Murchison, E. P., Alcorn, H., Li, M. Z., Mills, A. A., Elledge, S. J., Anderson, K. V., & Hannon, G. J. (2003). Dicer is essential for mouse development. *Nature Genetics*, 35(3). <https://doi.org/10.1038/ng1253>
- Berumen Sánchez, G., Bunn, K. E., Pua, H. H., & Rafat, M. (2021). Extracellular vesicles: mediators of intercellular communication in tissue injury and disease. In *Cell Communication and Signaling* (Vol. 19, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00787-y>
- Bilen, J., Liu, N., & Bonini, N. M. (2006). A new role for microRNA pathways: Modulation of degeneration induced by pathogenic human disease proteins. In *Cell Cycle* (Vol. 5, Issue 24). <https://doi.org/10.4161/cc.5.24.3579>
- Bornstein, M. H., Britto, P. R., Nonoyama-Tarumi, Y., Ota, Y., Petrovic, O., & Putnick, D. L. (2012). Child development in developing countries: Introduction and methods. *Child Development*, 83(1). <https://doi.org/10.1111/j.1467-8624.2011.01671.x>
- Brown, N., & Spittle, A. (2014). Neurobehavioral Evaluation in the Preterm and Term Infant. *Current Pediatric Reviews*, 10(1). <https://doi.org/10.2174/157339631001140408121310>
- Cai, M., Kolluru, G. K., & Ahmed, A. (2017). Small Molecule, Big Prospects: MicroRNA in Pregnancy and Its Complications. In *Journal of Pregnancy* (Vol. 2017). <https://doi.org/10.1155/2017/6972732>
- Chen, H., Shalom-Feuerstein, R., Riley, J., Zhang, S. D., Tucci, P., Agostini, M., Aberdam, D., Knight, R. A., Genchi, G., Nicotera, P., Melino, G., & Vasa-Nicotera, M. (2010). miR-7 and miR-214 are specifically expressed during neuroblastoma

differentiation, cortical development and embryonic stem cells differentiation, and control neurite outgrowth in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394(4). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.03.076>

Chen, X., Liang, H., Zhang, J., Zen, K., & Zhang, C. Y. (2012). Secreted microRNAs: A new form of intercellular communication. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 22, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.12.001>

Cheng, L. C., Pastrana, E., Tavazoie, M., & Doetsch, F. (2009). MiR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche. *Nature Neuroscience*, 12(4). <https://doi.org/10.1038/nn.2294>

Chim, S. S. C., Shing, T. K. F., Hung, E. C. W., Leung, T. Y., Lau, T. K., Chiu, R. W. K., & Lo, Y. M. D. (2008). Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clinical Chemistry*, 54(3). <https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.097972>

Cusick, S. E., & Georgieff, M. K. (2016). The Role of Nutrition in Brain Development: The Golden Opportunity of the “First 1000 Days.” *Journal of Pediatrics*, 175. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.05.013>

Czech, B., & Hannon, G. J. (2011). Small RNA sorting: Matchmaking for argonauts. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 12, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/nrg2916>

Davoodvandi, A., Marzban, H., Goleij, P., Sahebkar, A., Morshedi, K., Rezaei, S., Mahjoubin-Tehran, M., Tarrahimofrad, H., Hamblin, M. R., & Mirzaei, H. (2021). Effects of therapeutic probiotics on modulation of microRNAs. In *Cell Communication and Signaling* (Vol. 19, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00668-w>

Derbyshire, E., & Obeid, R. (2020). Choline, neurological development and brain function: A systematic review focusing on the first 1000 days. In *Nutrients* (Vol. 12, Issue 6). <https://doi.org/10.3390/nu12061731>

- Dong, D., Khoong, Y., Ko, Y., & Zhang, Y. (2020). microRNA-646 inhibits angiogenesis of endothelial progenitor cells in pre-eclamptic pregnancy by targeting the VEGF-A/HIF-1 $\alpha$  axis. *Experimental and Therapeutic Medicine*. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8929>
- Dubois, J., Dehaene-Lambertz, G., Kulikova, S., Poupon, C., Hüppi, P. S., & Hertz-Pannier, L. (2014). The early development of brain white matter: A review of imaging studies in fetuses, newborns and infants. In *Neuroscience* (Vol. 276). <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.12.044>
- El-Dib, M., Massaro, A. N., Glass, P., & Aly, H. (2011). Neurodevelopmental assessment of the newborn: An opportunity for prediction of outcome. In *Brain and Development* (Vol. 33, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2010.04.004>
- Finnegan, E. F., & Pasquinelli, A. E. (2013). MicroRNA biogenesis: Regulating the regulators. In *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* (Vol. 48, Issue 1). <https://doi.org/10.3109/10409238.2012.738643>
- Fox, S. E., Levitt, P., & Nelson, C. A. (2010). How the timing and quality of early experiences influence the development of brain architecture. In *Child Development* (Vol. 81, Issue 1). <https://doi.org/10.1111/j.1467-8624.2009.01380.x>
- Friedländer, M. R., Lizano, E., Houben, A. J. S., Bezdán, D., Bález-Coronel, M., Kudla, G., Mateu-Huertas, E., Kagerbauer, B., González, J., Chen, K. C., LeProust, E. M., Martí, E., & Estivill, X. (2014). Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs. *Genome Biology*, 15(4). <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-4-r57>
- Gardner, J. M., Karmel, B. Z., Freedland, R. L., Lennon, E. M., Flory, M. J., Miroshnichenko, I., Phan, H. T. T., Barone, A., & Harin, A. (2006). Arousal, Attention, and Neurobehavioral Assessment in the Neonatal Period: Implications for Intervention

and Policy. *Journal of Policy and Practice in Intellectual Disabilities*, 3(1).

<https://doi.org/10.1111/j.1741-1130.2006.00049.x>

Gilad, S., Meiri, E., Yogev, Y., Benjamin, S., Lebanony, D., Yerushalmi, N., Benjamin, H., Kushnir, M., Cholakh, H., Melamed, N., Bentwich, Z., Hod, M., Goren, Y., & Chajut, A. (2008). Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS ONE*, 3(9).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003148>

Giraldez, A. J., Cinalli, R. M., Glasner, M. E., Enright, A. J., Thomson, J. M., Baskerville, S., Hammond, S. M., Bartel, D. P., & Schier, A. F. (2005). MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science*, 308(5723).

<https://doi.org/10.1126/science.1109020>

Graves, C. R., & Davis, S. F. (2018). Cardiovascular Complications in Pregnancy.

*Circulation*, 137(12). <https://doi.org/10.1161/circulationaha.117.031592>

Gu, Y., Sun, J., Groome, L. J., & Wang, Y. (2013). Differential miRNA expression profiles between the first and third trimester human placentas. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 304(8).

<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00660.2012>

Guo, L., Liu, Y., Guo, Y., Yang, Y., & Chen, B. (2018). MicroRNA-423-5p inhibits the progression of trophoblast cells via targeting IGF2BP1. *Placenta*, 74.

<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2018.12.003>

Hall, M. E., George, E. M., & Granger, J. P. (2011). El corazón durante el embarazo.

*Revista Espanola de Cardiologia*, 64(11). <https://doi.org/10.1016/j.recesp.2011.07.009>

Hammerle-Fickinger, A., Riedmaier, I., Becker, C., Meyer, H. H. D., Pfaffl, M. W., & Ulbrich, S. E. (2010). Validation of extraction methods for total RNA and miRNA from bovine blood prior to quantitative gene expression analyses. *Biotechnology Letters*, 32(1).

<https://doi.org/10.1007/s10529-009-0130-2>

Hammock, E. A. D., & Levitt, P. (2006). The discipline of neurobehavioral development: The emerging interface of processes that build circuits and skills. In *Human Development* (Vol. 49, Issue 5). <https://doi.org/10.1159/000095581>

Hébert, S. S., Papadopoulou, A. S., Smith, P., Galas, M. C., Planel, E., Silahtaroglu, A. N., Sergeant, N., Buée, L., & de Strooper, B. (2010). Genetic ablation of dicer in adult forebrain neurons results in abnormal tau hyperphosphorylation and neurodegeneration. *Human Molecular Genetics*, *19*(20). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq311>

Ho, P. T. B., Clark, I. M., & Le, L. T. T. (2022). MicroRNA-Based Diagnosis and Therapy. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 13). <https://doi.org/10.3390/ijms23137167>

Hromadnikova, I., Kotlabova, K., Doucha, J., Dlouha, K., & Krofta, L. (2012). Absolute and relative quantification of placenta-specific microRNAs in maternal circulation with placental insufficiency - Related complications. *Journal of Molecular Diagnostics*, *14*(2). <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2011.11.003>

Huang, T., Liu, Y., Huang, M., Zhao, X., & Cheng, L. (2010). Wnt1-cre-mediated conditional loss of Dicer results in malformation of the midbrain and cerebellum and failure of neural crest and dopaminergic differentiation in mice. *Journal of Molecular Cell Biology*, *2*(3). <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjq008>

Im, H. I., & Kenny, P. J. (2012). MicroRNAs in neuronal function and dysfunction. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 35, Issue 5). <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.01.004>

Kapsimali, M., Kloosterman, W. P., de Bruijn, E., Rosa, F., Plasterk, R. H. A., & Wilson, S. W. (2007). MicroRNAs show a wide diversity of expression profiles in the developing and mature central nervous system. *Genome Biology*, *8*(8). <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-8-r173>

Khorram, O., Han, G., Bagherpour, R., Magee, T. R., Desai, M., Ross, M. G., Chaudhri, A. A., Toloubeydokhti, T., & Pearce, W. J. (2010). Effect of maternal undernutrition on vascular expression of micro and messenger RNA in newborn and aging offspring. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 298(5). <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00704.2009>

Kotlabova, K., Doucha, J., & Hromadnikova, I. (2011). Placental-specific microRNA in maternal circulation - identification of appropriate pregnancy-associated microRNAs with diagnostic potential. *Journal of Reproductive Immunology*, 89(2). <https://doi.org/10.1016/j.jri.2011.02.006>

Kozomara, A., & Griffiths-Jones, S. (2011). MiRBase: Integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 39(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1027>

Krebs, N. F., Lozoff, B., & Georgieff, M. K. (2017). Neurodevelopment: The impact of nutrition and inflammation during infancy in low-resource settings. *Pediatrics*, 139. <https://doi.org/10.1542/peds.2016-2828G>

Kulshreshtha, R., Ferracin, M., Wojcik, S. E., Garzon, R., Alder, H., Agosto-Perez, F. J., Davuluri, R., Liu, C.-G., Croce, C. M., Negrini, M., Calin, G. A., & Ivan, M. (2007). A MicroRNA Signature of Hypoxia. *Molecular and Cellular Biology*, 27(5). <https://doi.org/10.1128/mcb.01395-06>

Lättekivi, F., Guljavina, I., Midekessa, G., Viil, J., Heath, P. R., Bæk, R., Jørgensen, M. M., Andronowska, A., Kingo, K., & Fazeli, A. (2022). Profiling Blood Serum Extracellular Vesicles in Plaque Psoriasis and Psoriatic Arthritis Patients Reveals Potential Disease Biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7). <https://doi.org/10.3390/ijms23074005>

- Liu, C., Teng, Z. Q., Santistevan, N. J., Szulwach, K. E., Guo, W., Jin, P., & Zhao, X. (2010). Epigenetic regulation of miR-184 by MBD1 governs neural stem cell proliferation and differentiation. *Cell Stem Cell*, 6(5). <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.02.017>
- Liu, L. X., & Arany, Z. (2014). Maternal cardiac metabolism in pregnancy. In *Cardiovascular Research* (Vol. 101, Issue 4). <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu009>
- Lo, T. W., Figueroa-Romero, C., Hur, J., Pacut, C., Stoll, E., Spring, C., Lewis, R., Nair, A., Goutman, S. A., Sakowski, S. A., Nagrath, S., & Feldman, E. L. (2021). Extracellular Vesicles in Serum and Central Nervous System Tissues Contain microRNA Signatures in Sporadic Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2021.739016>
- Lockyer, F., McCann, S., & Moore, S. E. (2021). Breast milk micronutrients and infant neurodevelopmental outcomes: A systematic review. In *Nutrients* (Vol. 13, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/nu13113848>
- Majnemer, A., & Snider, L. (2005). A comparison of developmental assessments of the newborn and young infant. In *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews* (Vol. 11, Issue 1). <https://doi.org/10.1002/mrdd.20052>
- McDonald, J. S., Milosevic, D., Reddi, H. V., Grebe, S. K., & Algeciras-Schimnich, A. (2011). Analysis of circulating microRNA: Preanalytical and analytical challenges. *Clinical Chemistry*, 57(6). <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.157198>
- Mellios, N., Sugihara, H., Castro, J., Banerjee, A., Le, C., Kumar, A., Crawford, B., Strathmann, J., Tropea, D., Levine, S. S., Edbauer, D., & Sur, M. (2011). MiR-132, an experience-dependent microRNA, is essential for visual cortex plasticity. *Nature Neuroscience*, 14(10). <https://doi.org/10.1038/nn.2909>

- Mirzaei, H., & Hamblin, M. R. (2020). Regulation of Glycolysis by Non-coding RNAs in Cancer: Switching on the Warburg Effect. In *Molecular Therapy - Oncolytics* (Vol. 19). <https://doi.org/10.1016/j.omto.2020.10.003>
- Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogosova-Agadjanyan, E. L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K. C., Allen, A., Lin, D. W., Urban, N., Drescher, C. W., Knudsen, B. S., Stirewalt, D. L., Gentleman, R., Vessella, R. L., Nelson, P. S., Martin, D. B., & Tewari, M. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(30). <https://doi.org/10.1073/pnas.0804549105>
- Miura, K., Miura, S., Yamasaki, K., Higashijima, A., Kinoshita, A., Yoshiura, K. I., & Masuzaki, H. (2010). Identification of pregnancy-associated microRNAs in maternal plasma. *Clinical Chemistry*, *56*(11). <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.147660>
- Mogos, M. F., Piano, M. R., McFarlin, B. L., Salemi, J. L., Liese, K. L., & Briller, J. E. (2018). Heart Failure in Pregnant Women. *Circulation: Heart Failure*, *11*(1). <https://doi.org/10.1161/circheartfailure.117.004005>
- Mohr, A. M., & Mott, J. L. (2015). Overview of microRNA biology. In *Seminars in Liver Disease* (Vol. 35, Issue 1). <https://doi.org/10.1055/s-0034-1397344>
- Morales-Prieto, D. M., Chaiwangyen, W., Ospina-Prieto, S., Schneider, U., Herrmann, J., Gruhn, B., & Markert, U. R. (2012). MicroRNA expression profiles of trophoblastic cells. *Placenta*, *33*(9). <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.05.009>
- Morales-Prieto, D. M., Ospina-Prieto, S., Chaiwangyen, W., Schoenleben, M., & Markert, U. R. (2013). Pregnancy-associated miRNA-clusters. *Journal of Reproductive Immunology*, *97*(1). <https://doi.org/10.1016/j.jri.2012.11.001>

- Mouillet, J. F., Chu, T., Hubel, C. A., Nelson, D. M., Parks, W. T., & Sadovsky, Y. (2010). The levels of hypoxia-regulated microRNAs in plasma of pregnant women with fetal growth restriction. *Placenta*, *31*(9). <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.07.001>
- Mouillet, J. F., Ouyang, Y., Coyne, C. B., & Sadovsky, Y. (2015). MicroRNAs in placental health and disease. In *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (Vol. 213, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.05.057>
- Newton JT, Harrison V. The cognitive and social development of the child. *Dent Update*. 2005 Jan-Feb;32(1):33-4, 37-8. <https://10.12968/denu.2005.32.1.33>. PMID: 15739662.
- Nugent, J. K. (2015). The Newborn Behavioral Observations (NBO) System as a form of intervention and support for new parents. *Zero to Three*, *36*(1). Ottaviani, L., Sansonetti, M., & da Costa Martins, P. A. (2018). Myocardial cell-to-cell communication via microRNAs. In *Non-coding RNA Research* (Vol. 3, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.ncrna.2018.05.004>
- Pitt, J. M., Kroemer, G., & Zitvogel, L. (2016). Extracellular vesicles: Masters of intercellular communication and potential clinical interventions. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 126, Issue 4). <https://doi.org/10.1172/JCI87316>
- Podolska, A., Kaczkowski, B., Litman, T., Fredholm, M., & Cirera, S. (2011). How the RNA isolation method can affect microRNA microarray results. *Acta Biochimica Polonica*, *58*(4). [https://doi.org/10.18388/abp.2011\\_2221](https://doi.org/10.18388/abp.2011_2221)
- Pritchard, C. C., Cheng, H. H., & Tewari, M. (2012). MicroRNA profiling: Approaches and considerations. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 13, Issue 5). <https://doi.org/10.1038/nrg3198>
- Pritchard, C. C., Kroh, E., Wood, B., Arroyo, J. D., Dougherty, K. J., Miyaji, M. M., Tait, J. F., & Tewari, M. (2012). Blood cell origin of circulating microRNAs: A cautionary

note for cancer biomarker studies. *Cancer Prevention Research*, 5(3).  
<https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0370>

Qiu, C., Chen, G., & Cui, Q. (2012). Towards the understanding of microRNA and environmental factor interactions and their relationships to human diseases. *Scientific Reports*, 2. <https://doi.org/10.1038/srep00318>

Razavi, Z. S., Tajiknia, V., Majidi, S., Ghandali, M., Mirzaei, H. R., Rahimian, N., Hamblin, M. R., & Mirzaei, H. (2021). Gynecologic cancers and non-coding RNAs: Epigenetic regulators with emerging roles. In *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (Vol. 157). <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2020.103192>

Roberts, J. M., August, P. A., Bakris, G., Barton, J. R., Bernstein, I. M., Druzin, M., Gaiser, R. R., Granger, J. P., Jeyabalan, A., Johnson, D. D., Karumanchi, S. A., Lindheimer, M., Owens, M. Y., Saade, G. R., Sibai, B. M., Spong, C. Y., Tsigas, E., Joseph, G. E., O'Reilly, N., ... Ngaiza, K. (2013). Hypertension in pregnancy: Executive summary. *Obstetrics and Gynecology*, 122(5).  
<https://doi.org/10.1097/01.AOG.0000437382.03963.88>

Rothbart, M. K., Posner, M. I., & Kieras, J. (2008). Temperament, Attention, and the Development of Self-Regulation. In *Blackwell Handbook of Early Childhood Development*. <https://doi.org/10.1002/9780470757703.ch17>

Sadri Nahand, J., Moghoofei, M., Salmaninejad, A., Bahmanpour, Z., Karimzadeh, M., Nasiri, M., Mirzaei, H. R., Pourhanifeh, M. H., Bokharaei-Salim, F., Mirzaei, H., & Hamblin, M. R. (2020). Pathogenic role of exosomes and microRNAs in HPV-mediated inflammation and cervical cancer: A review. In *International Journal of Cancer* (Vol. 146, Issue 2). <https://doi.org/10.1002/ijc.32688>

Sandrim, V. C., Eleuterio, N., Pilan, E., Tanus-Santos, J. E., Fernandes, K., & Cavalli, R. (2016). Plasma levels of increased miR-195-5p correlates with the sFLT-1 levels in

preeclampsia. *Hypertension in Pregnancy*, 35(2).

<https://doi.org/10.3109/10641955.2015.1122034>

Sanghavi, M., & Rutherford, J. D. (2014). Cardiovascular physiology of pregnancy.

*Circulation*, 130(12). <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.009029>

Schwarzenberg, S. J., & Georgieff, M. K. (2018). Advocacy for improving nutrition in the first 1000 days to support childhood development and adult health. *Pediatrics*, 141(2).

<https://doi.org/10.1542/peds.2017-3716>

Smirnova, L., Gräfe, A., Seiler, A., Schumacher, S., Nitsch, R., & Wulczyn, F. G. (2005).

Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *European Journal of Neuroscience*, 21(6). <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.03978.x>

Soma-Pillay, P., Nelson-Piercy, C., Tolppanen, H., & Mebazaa, A. (2016). Physiological changes in pregnancy. *Cardiovascular Journal of Africa*, 27(2).

<https://doi.org/10.5830/CVJA-2016-021>

Suh, N., Baehner, L., Moltzahn, F., Melton, C., Shenoy, A., Chen, J., & Blelloch, R.

(2010). MicroRNA Function Is Globally Suppressed in Mouse Oocytes and Early Embryos. *Current Biology*, 20(3). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.12.044>

Timofeeva, A. V., Gusar, V. A., Kan, N. E., Prozorovskaya, K. N., Karapetyan, A. O.,

Bayev, O. R., Chagovets, V. V., Kliver, S. F., Iakovishina, D. Y., Frankevich, V. E., &

Sukhikh, G. T. (2018). Identification of potential early biomarkers of preeclampsia.

*Placenta*, 61. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.11.011>

Tognini, P., Putignano, E., Coatti, A., & Pizzorusso, T. (2011). Experience-dependent

expression of miR-132 regulates ocular dominance plasticity. *Nature Neuroscience*, 14(10). <https://doi.org/10.1038/nn.2920>

Towler, B. P., Jones, C. I., & Newbury, S. F. (2015). Mechanisms of regulation of mature

miRNAs. *Biochemical Society Transactions*, 43. <https://doi.org/10.1042/BST20150157>

Vo, N. K., Cambronne, X. A., & Goodman, R. H. (2010). MicroRNA pathways in neural development and plasticity. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 20, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.04.002>

Wang, W. X., Wilfred, B. R., Baldwin, D. A., Isett, R. B., Ren, N., Stromberg, A., & Nelson, P. T. (2008). Focus on RNA isolation: Obtaining RNA for microRNA (miRNA) expression profiling analyses of neural tissue. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1779(11). <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2008.01.005>

Weber, J. A., Baxter, D. H., Zhang, S., Huang, D. Y., Huang, K. H., Lee, M. J., Galas, D. J., & Wang, K. (2010). The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical Chemistry*, 56(11). <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.147405>

Wilks, T., Gerber, R. J., & Erdie-Lalena, C. (2010). Developmental milestones: Cognitive development. In *Pediatrics in Review* (Vol. 31, Issue 9). <https://doi.org/10.1542/pir.31-9-364>

Wittmann, J., & Jäck, H. M. (2010). Serum microRNAs as powerful cancer biomarkers. In *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* (Vol. 1806, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2010.07.002>

Wyman, S. K., Knouf, E. C., Parkin, R. K., Fritz, B. R., Lin, D. W., Dennis, L. M., Krouse, M. A., Webster, P. J., & Tewari, M. (2011). Post-transcriptional generation of miRNA variants by multiple nucleotidyl transferases contributes to miRNA transcriptome complexity. *Genome Research*, 21(9). <https://doi.org/10.1101/gr.118059.110>

Xu, P., Ma, Y., Wu, H., & Wang, Y. L. (2021). Placenta-Derived MicroRNAs in the Pathophysiology of Human Pregnancy. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 9). <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.646326>

Xu, P., Zhao, Y., Liu, M., Wang, Y., Wang, H., Li, Y. X., Zhu, X., Yao, Y., Wang, H., Qiao, J., Ji, L., & Wang, Y. L. (2014). Variations of microRNAs in human placentas and

plasma from preeclamptic pregnancy. *Hypertension*, 63(6).

<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02647>

Yang, Q., Lu, J., Wang, S., Li, H., Ge, Q., & Lu, Z. (2011). Application of next-generation sequencing technology to profile the circulating microRNAs in the serum of preeclampsia versus normal pregnant women. *Clinica Chimica Acta*, 412(23–24).

<https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.07.029>

Yu, B., Xiao, M., Yang, F., Xiao, J., Zhang, H., Su, L., Zhang, X., & Li, X. (2021). MicroRNA-431-5p encapsulated in serum extracellular vesicles as a biomarker for proliferative diabetic retinopathy. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 135.

<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2021.105975>

Zhang, X., Wang, X., Wu, J., Peng, J., Deng, X., Shen, Y., Yang, C., Yuan, J., & Zou, Y.

(2018). The diagnostic values of circulating miRNAs for hypertension and bioinformatics analysis. *Bioscience Reports*, 38(4). <https://doi.org/10.1042/BSR20180525>

**PARTE 2****ARTIGOS**

## ARTIGO 1

O artigo será submetido ao periódico Scientific Reports após a defesa da tese.

### **EXPRESSION OF HSA-MIR-423-5P DURING PREGNANCY IS ASSOCIATED WITH ANTENATAL HYPERTENSION.**

**Authors:** Cainá Corrêa do Amaral<sup>a</sup>; Fernanda Nedel<sup>b</sup>; Camila Perelló Ferrúa<sup>a</sup>; Tiago Fernandez Garcia<sup>a</sup>; Geovanna Peter Corrêa<sup>b</sup>; Roberta Giorgi<sup>a</sup>; Bruna Godinho Corrêa<sup>a</sup>; Victoria Duquia da Silva<sup>a</sup>; Aline Longoni dos Santos<sup>a</sup>; Adriano Martimbianco de Assis<sup>a</sup>; Luciana de Avila Quevedo<sup>a</sup>; Gabriele Cordenonzi Ghisleni<sup>a</sup>; Mariana Bonati de Matos<sup>a</sup>; Karen Amaral Tavares Pinheiro<sup>c</sup>; Jéssica Puchalski Trettim<sup>a</sup>; Ricardo Tavares Pinheiro<sup>a\*</sup>

- a. Post-Graduate Program in Health and Behavior, Catholic University of Pelotas, Pelotas, RS, 96010-901, Brazil.
- b. Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.
- c. Federal University of Rio Grande, Rio Grande, RS, Brazil

**\*Corresponding author:** Programa de Pós-graduação em Saúde e Comportamento, Universidade Católica de Pelotas, Rua Félix da Cunha, 412, postal code: 96010-901, Pelotas, RS, Brazil. Tel.: +55 53 2128 8408; fax: +55 53 2128 8229. E-mail address: ricardop@terra.com.br (Ricardo Tavares Pinheiro)\*

**Abstract**

Hypertension is a complication in pregnancy that is associated with an increased risk of morbidity and mortality for the mother, fetus, and newborn. MicroRNA molecules respond to physiological changes during pregnancy in order to facilitate successful pregnancy, however, dysregulation is capable of causing or contributing to the development of disorders or negative outcomes. Thus, the objective of the study was to evaluate the expression of hsa-miR-423-5p in pregnant women with and without hypertension identified in the antenatal period. This cross-sectional study included a population-based cohort study, carried out in a city in southern Brazil. Blood samples from mothers were obtained for RNA extraction from serum and analysis of miRNA expression by qRT-PCR. This study included 171 pregnant women with and without hypertension diagnosed antenatal. The results show the mean gestational age within the sample was 16.18 weeks ( $SD \pm 5.51$ ). Logistic regression for the outcome of antenatal hypertension shows an association with BMI and hsa-miR-423-5p. In relation to miRNA, the higher the expression of hsa-miR-423-5p, the lower the chance of the pregnant woman presenting antenatal hypertension [OR 0.55 (0.35; 0.85,  $p = 0.007$ )]. In this sense, it is possible to aim the miRNA as a biomarker of hypertension detectable in the antenatal period, thus allowing the planning of early interventions, with the aim of minimizing the risks inherent to such a complication.

**Keywords:** Pregnancy, hypertension, antenatal, microRNA, biomarker.

## Introduction

Hypertension in pregnancy is diagnosed if systolic BP (SBP)  $\geq 140$  mmHg and/or diastolic BP (DBP)  $\geq 90$  mmHg, measured in the office or in hospital; it has to be confirmed, preferably on 2 separate occasions or at least 15 min apart in severe hypertension (i.e.  $\geq 160/110$  mmHg in the obstetric literature which usually recognizes only mild and severe hypertension rather than the three grades used by the European hypertension guidelines) <sup>[1,2]</sup>.

It is a condition with high incidence and mortality, the hypertension prevails in almost half of the Brazilian population and evolves worldwide in mortality, being a longitudinally progressive epidemic. In pregnant women, the prevalence of hypertension is equally high, considering pre-existing conditions and those who develop the condition during pregnancy. With a high percentage of incidence in Brazil and around the world, the hypertension manifests itself in pregnant women of all ages and is the biggest cause of maternal death in obstetrics <sup>[2]</sup>. Therefore, hypertensive diseases complicate around 10% of pregnancies and are associated with an increased risk of morbidity and mortality for the mother, fetus and newborn <sup>[3]</sup>. Additionally, women with a history of hypertensive disease are at greater risk of developing cardiovascular disease prematurely later in life <sup>[1]</sup>.

Since pregnancy is a physiological condition also regulated by genetic, environmental and physiological factors, many studies suggest that miRNA expression can be altered in response to these changes <sup>[4-6]</sup>. Thus, it is proposed in the literature that microRNAs (miRNAs) are small molecules capable of regulating gene transcription at the post-transcriptional level. Such molecules respond to physiological changes during pregnancy in order to facilitate the success of the pregnancy process, while the dysregulation of

miRNAs is capable of causing or contributing to the development of disorders or negative pregnancy outcomes for both mother and baby <sup>[7]</sup>.

However, it is worth highlighting that preventive measures for hypertensive disorders during pregnancy are particularly important to improve outcomes, as non-treatment can cause several complications. Therefore, the determination of peripheral biomarkers is extremely important in order to identify hypertension as early as possible so that interventions can be planned and the impacts on the mother and baby are minimal. Thus, the objective of the study was to evaluate the expression of hsa-miR-423-5p in pregnant women with and without hypertension identified in the antenatal period.

## **Material and methods**

### **Design**

This cross-sectional study that was taken from a population-based cohort study, carried out in a city in southern Brazil. The research ethics committee of the Catholic University of Pelotas, under opinion number 1.729.653, approved the cohort project to which it is linked. For more details on sample capture, read the publications by Pinheiro et al., 2021, 2022 <sup>[8,9]</sup>. This study included 171 pregnant women with and without hypertension diagnosed antenatal. The inclusion criteria were pregnant women who had their miRNAs previously amplified, which were divided into those with and without hypertension according to the response in the questionnaire administered. Pregnant women who already had hypertension before pregnancy or were diagnosed antenatal but were taking medication for hypertension were excluded.

## **Instruments**

The economic evaluation of the participants was carried out using the ABEP classification, with the levels categorized as follows: A + B (high levels), C (medium levels), and D + E (low levels) ([www.abep.org](http://www.abep.org)).

Maternal variables, such as age and education (collected in complete years and subsequently categorized into tertiles), gestational age in weeks, first pregnancy (yes/no), and planned pregnancy (yes/no), were collected using questions from the generally structured questionnaire. Body Mass Index (BMI) was assessed by weight/height<sup>2</sup> (kg/m<sup>2</sup>), with weight measured using an anthropometric scale and height using a stadiometer.

Hypertension was identified during the antenatal period and self-reported by the pregnant woman at the time of the interview according to the question: “During this pregnancy, you have mentioned some of these diseases so far: Hypertension? (no/yes)” It is worth mentioning that self-report of hypertension was validated by Chrestani et al. in 2009 with 84.3% sensitivity, 87.5% specificity, 73.9% positive predictive value and 93.0% negative predictive value <sup>[10]</sup>.

## **Blood sample collection and processing**

Blood samples were obtained by venipuncture (10 mL) from all pregnant women. The serum blood was immediately centrifuged at 3000 g for 10 min at 4°C and the supernatant was transferred to RNase/DNase-free tubes and stored at – 80 °C until RNA extraction.

### **RNA extraction and qRT-PCR analysis**

Total RNA was extracted from serum using a mirVana PARIS kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol. The RNA was reverse transcribed to cDNA using TaqMan miRNA Assays (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol. Quantitative PCR was performed using a TaqMan Fast Advanced Master Mix kit (Thermo Fisher Scientific). Thermal cycling was conducted according to the manufacturer's recommended program, and all experiments were duplicated. The TaqMan miRNA Assays used in this study and their Taqman assay IDs are as follows: miR-423-5p (478090\_mir), miR-451a (478107\_mir), miR-221-3p (477981\_mir), miR-16-5p (477981\_mir). The CT values were normalized using the delta CT method with the endogenous controls (miR-17-5p / 478447\_mir). To determine the corresponding  $\Delta$ CT value, the CT value of the target gene miRNAs was subtracted from the miR-17-5p CT value.

### **Statistical analysis**

Data analysis to investigate the association of gestational levels of hsa-miR-423-5p with the outcome of hypertension was performed with crude logistic regression and subsequently adjusted for maternal age, gestational weeks, primiparity, planned pregnancy, socioeconomic level, maternal education and maternal gestational BMI. The significance level considered was 0.05.

### **Results**

The data analyzed were from 171 women in the antenatal period. The mean gestational age within the sample was 16.18 weeks (SD $\pm$ 5.51); the most prevalent socioeconomic level was C (65.5%), followed by A+B (22.6%) and D+E (11.9%). Mean

maternal age was 27,0 years ( $SD\pm 5,5$ ) and maternal schooling was 10,5 completed years of study ( $SD\pm 3,4$ ). The overall mean of has-miR-423-5p was -0.16 ( $SD\pm 1,4$ ), has-miR-451a was -6.54 ( $SD\pm 0,8$ ), has-miR-221-3p was 0.01 ( $SD\pm 1,6$ ) and has-miR-16-5p -2.43 ( $SD\pm 0,7$ ), table 1. In addition, figure 1 shows the expression of has-miR-423-5p in pregnant women with and without hypertension.

Logistic regression for the outcome of antenatal hypertension shows an association with BMI and hsa-miR-423-5p. Therefore, it is worth highlighting that the higher the BMI, the greater the chance of having antenatal hypertension [OR 1.12 (1.00; 1.25,  $p = 0.044$ )]. In relation to miRNA, the higher the expression of hsa-miR-423-5p, the lower the chance of the pregnant woman presenting antenatal hypertension [OR 0.55 (0.35; 0.85,  $p = 0.007$ )], data presented in Table 2.

## Discussion

This study investigated the influence of miRNA expression on antenatal hypertension and confirmed the hypothesis that increased expression of hsa-miR423-5p decreases the chances of pregnant women experiencing antenatal hypertension. It is worth highlighting that our results are innovative and relevant, given that antenatal hypertension is an important complication of pregnancy in addition to being one of the main causes of maternal and fetal morbidity and mortality <sup>[3]</sup>.

Charkiewicz et al., 2022 analyzed samples from hypertensive men and identified an increase in the expression of the miRNAs miR-145-5p, miR-1-3p, miR-423-5p, which are suggested by the authors as potential biomarkers of hypertension and/or or coronary disease <sup>[11]</sup>. In this sense, it is possible to perceive the potential role of miR-423-5p, which was the miRNA analyzed in our study. miR-423-5p is described in several processes in

the literature, however what draws attention is its role in the cell cycle, apoptosis and mitochondrial function, confirmed by Zhu et al., when analyzing the pathways and mechanisms of miRNA action in cardiomyocytes (H9C2 cells). In this context, the authors suggest miR-423-5p as a possible therapeutic target for the treatment of cardiovascular diseases <sup>[12]</sup>.

In agreement with our findings, Zhao et al. found a decreased expression of miR-423-5p in patients with essential hypertension. The author suggests that this finding occurs through the regulatory role of the miRNA on the non-coding developmental regulatory RNA adjacent to the LncRNA FOXF1 (FENDRR), a critical gene in the development of vascular diseases, in the miR-423-5p / NADPH Oxidase 4 axis (Nox4). According to the authors' result, the expression of miR-423-5p was identified to be lower in patients with essential hypertension than in controls, emphasizing the protective roles of miR-423-5p in hypertension. Furthermore, the authors suggest that miR-423-5p may exert its influence on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) through binding Nox4 <sup>[13]</sup>.

Based on the data found and the existing literature, the association found by Zhao et al., is suggested, as a possible route of action of miR-423-5p also in the antenatal period, predisposing to hypertension in pregnant women <sup>[13]</sup>. The increase in miR-423-5p in the first trimester of pregnancy may be able to reduce FENDRR levels, protecting pregnant women from developing hypertension. According to published studies, FENDRR presents a competitive binding with miR-423-5p <sup>[14]</sup>, which further reinforces the suggested hypothesis. Furthermore, the authors indicate that miR-423-5p in HUVECs can facilitate cell proliferation and migration, in addition to retaining cell apoptosis <sup>[13]</sup>, an important role in arterial hypertension, since hypertension is closely related to the reduction of endothelial homeostasis, cells main components of the vasculature, capable

of regulating vascular homeostasis by modulating processes of vascular dilation, regulation of blood pressure and chemical cytokines and chemical mediators <sup>[15]</sup>.

Furthermore, it is seen in the literature that a dysregulation in the expression of miRNAs associated with cardiovascular diseases during the first trimester of pregnancy, more precisely between 10 and 13 weeks, is capable of predisposing hypertensive diseases during pregnancy, such as hypertension and pre-eclampsia <sup>[16]</sup>. The gestational age mentioned is close to that found in our study, in this context, we highlight the relevance of observing this period, as it is at the beginning of pregnancy that most fetal formation occurs. This fact can lead to several negative outcomes for the mother and baby, such as intrauterine growth restriction, low birth weight, prematurity, and even fetal malformations <sup>[3,17]</sup>.

Another important fact is that maternal BMI is also associated with an increased chance of developing hypertension. This fact is already established in the literature <sup>[18]</sup>, including through systematic reviews and meta-analysis <sup>[19]</sup>. Therefore, studies have shown that an increase in maternal BMI is associated with complications during pregnancy that affect both mother and baby, such as hypertension, diabetes mellitus, pre-eclampsia, fetal macrosomia, and increased cesarean section rates <sup>[18,20]</sup>.

Pregnant women who develop hypertension in the antenatal period have a high-risk pregnancy that requires monitoring. Therefore, early identification of hypertension is essential for monitoring pregnant women, facilitating the initiation of preventive measures. During antenatal care, assessing the risk of developing hypertension involves analyzing demographic and maternal characteristics, as well as clinical and obstetric presentations according to risk factors <sup>[21,22]</sup>. Although this approach continues to be used in clinical settings, it may not be the most accurate method for predicting gestational

hypertension <sup>[23]</sup>, which is why the search for biomarkers that can be used to identify hypertension in antenatal care is so necessary and relevant.

Finally, it is worth highlighting that our results demonstrate the association of microRNA and BMI with antenatal hypertension. Therefore, it is essential to emphasize the need for in vitro and in vivo studies to clarify the reasons why miR-423-5p is capable of predisposing to hypertension. Furthermore, studies are needed to clarify the mechanism of action of miRNA in the context of hypertension diagnosed during antenatal care, which is a limitation of our study. However, we highlight the relevance of analyzing samples of pregnant women in a population-based study, which allows us to evaluate in a representative way of society.

### **Funding**

This work was supported by the Ministry of Health (DECIT) Brazil, CNPq/Brazil (Process 401726/2015-0 APP/Call 47/2014), Bill & Melinda Gates Foundation (INV-007186/OPP1142172) and INCT-EN (National Institute of Science and Technology, Brazil).

### **Acknowledgments**

This work was supported by CNPq/Brazil, the Bill & Melinda Gates Foundation, and the Ministry of Health/INCT-DCEN (National Institute of Science and Technology). Also, we thank all families who participated in our study.

### **Conflict of Interest**

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

## References

1. Williams, B. *et al.* 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Journal of Hypertension* vol. 36 Preprint at <https://doi.org/10.1097/HJH.0000000000001940> (2018).
2. Sousa, M. G. de *et al.* Epidemiology of arterial hypertension in pregnant. *Einstein (Sao Paulo)* **18**, (2019).
3. Cífková, R. Hypertension in Pregnancy: A Diagnostic and Therapeutic Overview. *High Blood Pressure and Cardiovascular Prevention* vol. 30 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s40292-023-00582-5> (2023).
4. Khorram, O. *et al.* Effect of maternal undernutrition on vascular expression of micro and messenger RNA in newborn and aging offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **298**, (2010).
5. Kulshreshtha, R. *et al.* A MicroRNA Signature of Hypoxia. *Mol Cell Biol* **27**, (2007).
6. Qiu, C., Chen, G. & Cui, Q. Towards the understanding of microRNA and environmental factor interactions and their relationships to human diseases. *Sci Rep* **2**, (2012).
7. Cai, M., Kolluru, G. K. & Ahmed, A. Small Molecule, Big Prospects: MicroRNA in Pregnancy and Its Complications. *Journal of Pregnancy* vol. 2017 Preprint at <https://doi.org/10.1155/2017/6972732> (2017).
8. Pinheiro, R. T. *et al.* Antenatal depression: Efficacy of a pre-post therapy study and repercussions in motor development of children during the first 18 months postpartum. Study: “Pregnancy care, healthy baby”. *J Psychiatr Res* **148**, (2022).
9. Pinheiro, R. T. *et al.* Brief cognitive behavioral therapy in pregnant women at risk of postpartum depression: Pre-post therapy study in a city in southern Brazil. *J Affect Disord* **290**, (2021).

10. Chrestani, M. A. D., dos Santos, I. da S. & Matijasevich, A. M. Self-reported hypertension: Validation in a representative cross-sectional survey. *Cad Saude Publica* **25**, (2009).
11. Charkiewicz, A. E. *et al.* The diagnostic potential of novel biomarkers of hypertension in men. *Archives of Medical Science* **18**, (2022).
12. Zhu, X. & Lu, X. MiR-423-5p inhibition alleviates cardiomyocyte apoptosis and mitochondrial dysfunction caused by hypoxia/reoxygenation through activation of the wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway via targeting MYBL2. *J Cell Physiol* **234**, (2019).
13. Zhao, X., Wang, C., Liu, M., Meng, F. & Liu, K. LncRNA FENDRR Servers as a Possible Marker of Essential Hypertension and Regulates Human Umbilical Vein Endothelial Cells Dysfunction via miR-423-5p/Nox4 Axis. *Int J Gen Med* **15**, (2022).
14. Yu, Z. *et al.* Long Non-coding RNA FENDRR Acts as a miR-423-5p Sponge to Suppress the Treg-Mediated Immune Escape of Hepatocellular Carcinoma Cells. *Mol Ther Nucleic Acids* **17**, (2019).
15. Wu, G., Jose, P. A. & Zeng, C. Noncoding RNAs in the regulatory network of hypertension. *Hypertension* vol. 72 Preprint at <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11126> (2018).
16. Hromadnikova, I., Kotlabova, K. & Krofta, L. Cardiovascular Disease-Associated MicroRNA Dysregulation during the First Trimester of Gestation in Women with Chronic Hypertension and Normotensive Women Subsequently Developing Gestational Hypertension or Preeclampsia with or without Fetal Growth Restriction. *Biomedicines* **10**, (2022).

17. Kazmi, N. *et al.* Hypertensive Disorders of Pregnancy and DNA Methylation in Newborns. *Hypertension* **74**, (2019).
18. Krsman, A. *et al.* Correlation between increased maternal body mass index and pregnancy complications. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **27**, (2023).
19. Heslehurst, N. *et al.* Association between maternal adiposity measures and adverse maternal outcomes of pregnancy: Systematic review and meta-analysis. *Obesity Reviews* vol. 23 Preprint at <https://doi.org/10.1111/obr.13449> (2022).
20. McDowell, M., Cain, M. A. & Brumley, J. Excessive Gestational Weight Gain. *Journal of Midwifery and Women's Health* vol. 64 Preprint at <https://doi.org/10.1111/jmwh.12927> (2019).
21. Zhang, J. *et al.* Early prediction of preeclampsia and small-for-gestational-age via multi-marker model in Chinese pregnancies: A prospective screening study. *BMC Pregnancy Childbirth* **19**, (2019).
22. Erkamp, J. S. *et al.* Population screening for gestational hypertensive disorders using maternal, fetal and placental characteristics: A population-based prospective cohort study. *Prenat Diagn* **40**, (2020).
23. Górczewski, W. *et al.* Role of First Trimester Screening Biochemical Markers to Predict Hypertensive Pregnancy Disorders and SGA Neonates—A Narrative Review. *Healthcare (Switzerland)* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3390/healthcare11172454> (2023).

### Figure legends

**Figure 1:** hsa-miR-423-5p expression in the serum of pregnant women with and without hypertension ( $p < 0.05$ ).

## Tables

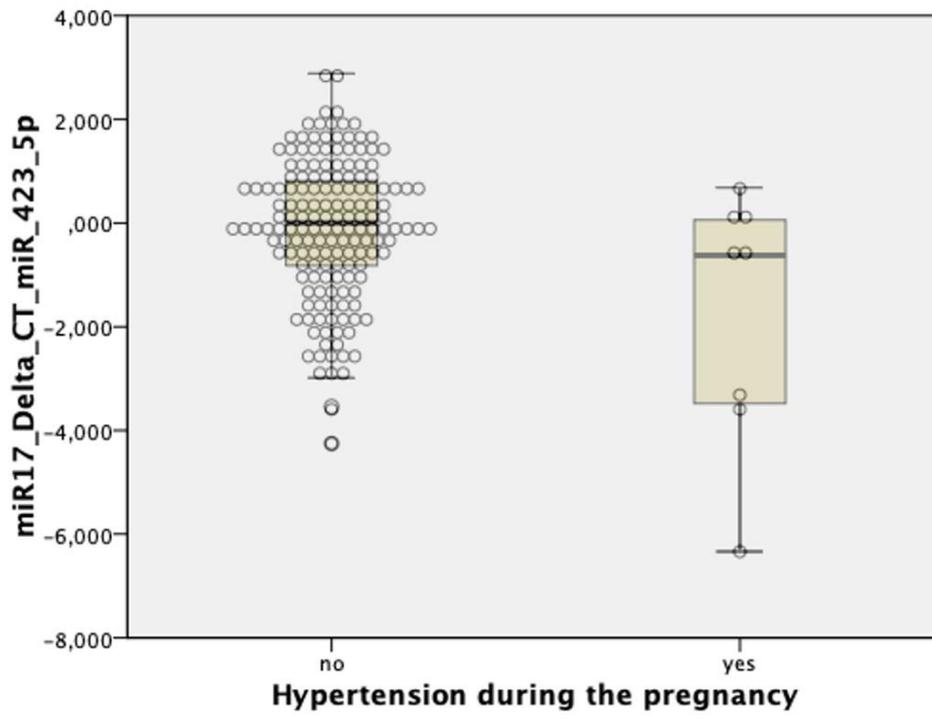
**Table 1:** Sample distribution according to characteristics of pregnant women in the city of Pelotas. (N=171)

Variables	N/Mean	%/SD
<b>Age</b>		
Up to 23 years	44	25.7
Between 24 and 29 years old	70	40.9
30 years or older	57	33.3
<b>Previous pregnancy</b>		
No	68	39.8
Yes	103	60.2
<b>Socioeconomic class</b>		
A and B	38	22.6
C	110	65.5
D and E	20	11.9
<b>Schooling</b>		
Up to 8 years of study	40	23.8
Between 9 and 11 years of study	83	26.8
12 years of study or more	45	49.4
<b>Gestacional age</b>	16.18	5.51
<b>Body mass index</b>	27.24	5.53
<b>Hsa-miR-423-5p</b>	-0.162	1.439
<b>Hsa-miR-451a</b>	-6.544	0.872
<b>Hsa-miR-221-3p</b>	0.014	1.667
<b>Hsa-miR-16-5p</b>	-2.432	0.749
<b>Hypertension during the antenatal period</b>		
No	163	95.3
Yes	8	4.7

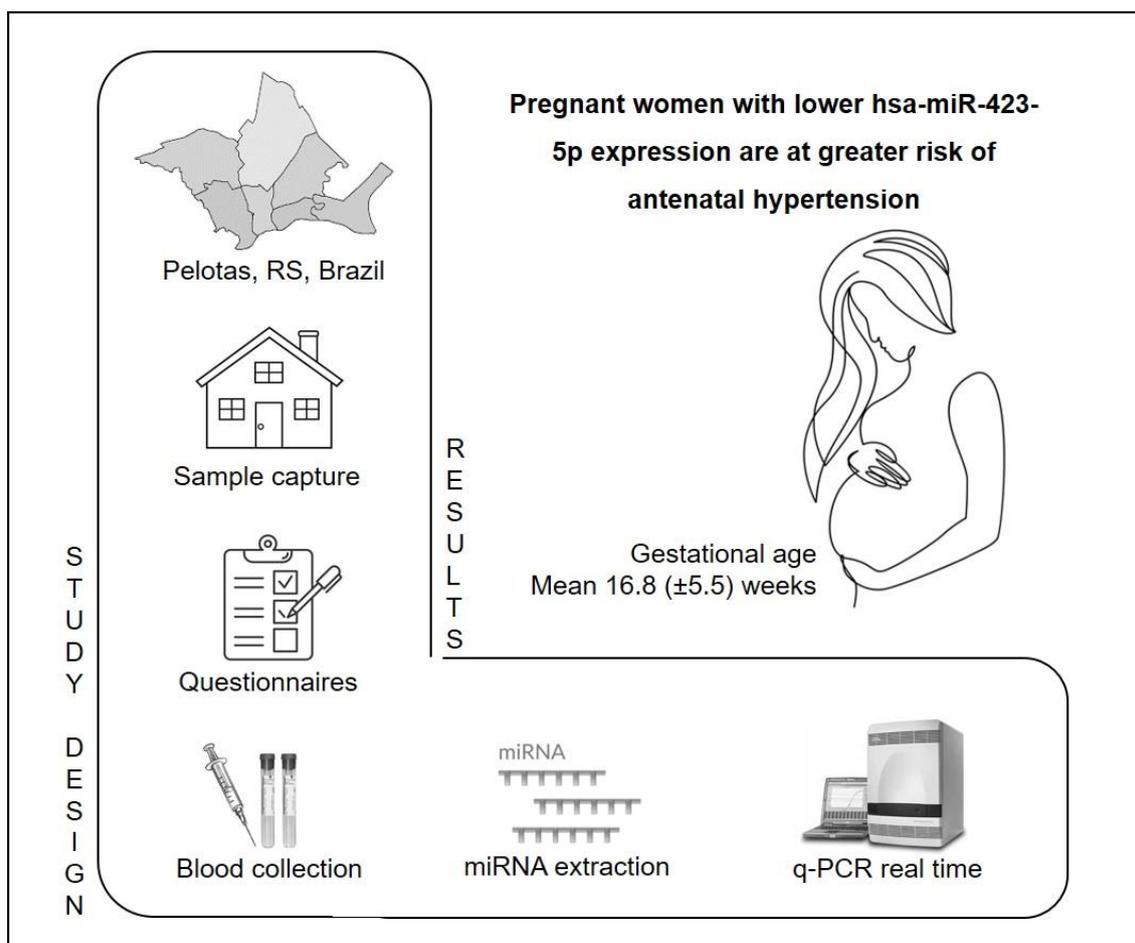
**Table 2:** Logistic regression for the outcome of antenatal hypertension.

<b>Variables</b>	<b>OR (CI 95%)</b>	<b>p-value</b>
Age (Up to 23 years*)	0.31 (0.03;3.69)	0.354
<b>Previous pregnancy (No*)</b>	0.70 (0.11;4.70)	0.715
<b>Socioeconomic class (Class A and B*)</b>	0.26 (0.01;5.14)	0.378
Schooling (Up to 8 years of study*)	0.74 (0.03;16.95)	0.849
<b>Gestacional age</b>	1.00 (0.07;4.29)	0.951
<b>Hsa-miR-451a</b>	0.78 (0.31;1.93)	0.587
<b>Hsa-miR-221-3p</b>	1.30 (0.92;1.85)	0.138
<b>Hsa-miR-16-5p</b>	0.67 (0.22;2.08)	0.492
<b>Body mass index</b>	<b>1.12 (1.00;1.25)</b>	<b>0.044*</b>
<b>Hsa-miR-423-5p</b>	<b>0.55 (0.35;0.85)</b>	<b>0.007*</b>

Figure 1



## Graphical Abstract Image



## Graphical Abstract Text

**Graphical abstract:** We demonstrate the study design and the results found. Our results show that reduced expression of hsa-miR-423-5p increases the chances of pregnant women experiencing hypertension in the antenatal period.

**ARTIGO 2**

Artigo submetido ao periódico: *Frontiers in human neuroscience*

Status da submissão: Revisão independente, atualizado dia 22/11/23

**MATERNAL HSA-MIR-423-5P IS ASSOCIATED WITH THE COGNITIVE  
DEVELOPMENT OF BABIES IN PREGNANT WOMEN WITHOUT MENTAL  
DISORDERS**

Cainá Corrêa do Amaral<sup>1</sup>, Fernanda Nedel<sup>2</sup>, Camila Perelló Ferrúa<sup>1</sup>, Tiago Fernandez Garcia<sup>1</sup>, Geovanna Peter Corrêa<sup>2</sup>, Roberta Giorgi<sup>1</sup>, Aline Longoni dos Santos<sup>1</sup>, Adriano Martimbianco de Assis<sup>1</sup>, Luciana de Avila Quevedo<sup>1</sup>, Gabriele Cordenonzi Ghisleni<sup>1</sup>, Mariana Bonati de Matos<sup>1</sup>, Karen Amaral Tavares Pinheiro<sup>3</sup>, Jéssica Puchalski Trettim<sup>1</sup>, Ricardo Tavares Pinheiro<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Post-Graduate Program in Health and Behavior, Catholic University of Pelotas, Pelotas, RS, 96010-901, Brazil

<sup>2</sup>Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

<sup>3</sup>Federal University of Rio Grande, Rio Grande, RS, Brazil.

**\*Correspondence:**

Corresponding Author

ricardop@terra.com.br (Ricardo Tavares Pinheiro)

**Keywords:** microRNA; pregnancy; babies; cognitive development; retinoic acid.

## Abstract

**Background:** MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs capable of regulating gene expression post-transcriptionally. MiRNAs are recognized as key regulators of diverse biological and developmental processes. During the pregnancy-puerperal cycle, numerous changes occur in the female body for the formation, growth, and development of the baby. After birth, there is a critical period in child development, as rapid gains in the physical, cognitive, and socio-emotional domains constitute the “building blocks” of children's later growth. **Objective:** was to investigate the association between maternal expression of has-miR-423-5p during the first and second trimester of pregnancy and neurocognitive development at 90 days of life in infants. **Methods:** This is a longitudinal study included in a population-based cohort study, carried out in a city in southern Brazil. The Bayley III was used to assess the outcome of the babies' cognitive development. Blood samples from mothers were obtained for RNA extraction from serum and analysis of miRNA expression by qRT-PCR. **Results:** 87 dyads (mother-baby) were included. The average gestational age was 15.86 weeks ( $SD\pm 5.55$ ). An association of maternal miRNA with infant cognitive development was found, as maternal miR-423-5p increases, infants' cognitive development increases by 2.40 (95% CI 0.37; 4.43,  $p = 0.021$ ) at three months of age. **Conclusion:** In this sense, it is possible to aim to use this miRNA as a biomarker of child neurocognitive development detectable in the prenatal period, thus allowing the planning of early interventions.

## Introduction

MicroRNAs (miRNAs) are highly conserved short 18–25 nucleotide noncoding RNAs that bind and post-transcriptionally regulate messenger RNA (mRNA). MiRNAs regulate mRNA by binding to a short core sequence in the 3' untranslated region (UTR) of mRNA or non-coding RNAs (Tay et al., 2011) and lead to inhibition of translation or target mRNA degradation (Simonson & Das, 2015; Vishnoi & Rani, 2017). Importantly, miRNAs can target epigenetic regulators, which play a role in fetal metabolic programming (Sookoian et al., 2013), mediating long-term effects on target cells and developing organs and tissues. Epigenetic factors and miRNAs have been shown to be reciprocally regulated (Floris et al., 2015; Pasquinelli, 2012). Thus, miRNAs are recognized as key regulators of diverse biological and developmental processes in eukaryotes such as cell proliferation and differentiation, maintenance of tissue identity, apoptosis and immune system development (Floris et al., 2016).

Based on this, attention is drawn to the pregnancy-puerperal cycle, a period of numerous changes in the female organism and several processes triggered for the formation of the fetus, in addition to the growth and development of the baby. The biological dialogue between a mother and her offspring starts from the embryo's implantation in the uterus and continues during fetal life via the maternal–placental–fetal axis (Power & Schulkin, 2013). In this period, the expression of miRNAs is ubiquitous; they are present in cells and body fluids of both maternal and fetal origin (Floris et al., 2016).

After birth, there is a critical period in child development, as rapid gains in physical, cognitive, and socio-emotional domains constitute the “building blocks” of children's later growth. The multiple domains of child development are interconnected. For

example, good nutrition during the early years is essential for healthy physical development and enhances cognitive and socio-emotional growth (Bornstein et al., 2012). Responsiveness in the parent-child relationship promotes healthy socio-emotional development and improves physical and cognitive outcomes. Thus, infant and child development depends on the significant interdependence of developmental streams (Wilks et al., 2010).

Cognitive development is considered the foundation of intelligence. Assessment of infant and toddler intelligence depends on progression in two developmental domains: problem solving and language. Children advance in these domains by learning. Learning requires the ability to direct and sustain attention, as well as the ability to manipulate information. Key aspects of cognitive development include memory, representational competence, attention, and processing speed. Successful cognitive development requires progress in all these domains (Wilks et al., 2010).

In view of all this, the epigenetic role of miRNAs in the gestational period with fetal interaction is observed. Therefore, in this study, we investigated the association between has-miR-423-5p expression in mentally healthy pregnant women during the first and second trimester of pregnancy and neurocognitive development at 90 days of life in babies. In order to identify the possible impacts of changes in maternal miRNAs on the development of their children.

## **Material and methods**

### **3.1. Design**

This study was taken from a longitudinal study carried out in a city in southern Brazil. The research ethics committee of the Catholic University of Pelotas, under opinion

number 1,729,653, approved the cohort project to which it is linked. For more details about sample capture, read the publications (Pinheiro et al., 2021, 2022). The study design is similar to that carried out by Nedel et al., 2023, in which dyads (mother-baby) were included. However, our exclusion criteria were mood disorders, anxiety disorders or suicidal ideation until the moment of evaluation and collection of biological material, which is our differential. Therefore, 60 days after the initial assessment, all women were re-evaluated in relation to the presence of mental health disorders, thus ensuring that these pregnant women did not present the aforementioned disorders during this period, which differentiates our sample from the study carried out by Nedel et al., 2023, that it was not exclusive to manifest mental health disorders at any time.

### **3.2. Instruments**

The Bayley Scale of Infant and Toddler Development III (Bayley-III) was used to evaluate the cognitive development outcome of babies 90 days after birth through scores. The economic evaluation of the participants was carried out using the ABEP classification, with the levels categorized as follows: A + B (high levels), C (medium levels), and D + E (low levels) ([www.abep.org](http://www.abep.org)).

Maternal variables, such as age and education (collected in complete years and subsequently categorized into tertiles), gestational age in weeks, first pregnancy (yes/no), and planned pregnancy (yes/no), were collected using questions from the generally structured questionnaire. Body Mass Index (BMI) was assessed by weight/height<sup>2</sup> (kg/m<sup>2</sup>), with weight measured using an anthropometric scale and height using a stadiometer. The prematurity variables were collected from the baby's medical records and the mother answered questions about breastfeeding.

### **3.3. Blood sample collection and processing**

Blood samples were obtained by venipuncture (10 mL) from all pregnant women. The serum blood was immediately centrifuged at 3000 g for 10 min at 4 °C and the supernatant was transferred to RNase/DNase-free tubes and stored at – 80 °C until RNA extraction.

### **3.4. RNA extraction and qRT-PCR analysis**

Total RNA was extracted from serum using a mirVana PARIS kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol. The RNA was reverse transcribed to cDNA using TaqMan miRNA Assays (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's protocol. Quantitative PCR was performed using a TaqMan Fast Advanced Master Mix kit (Thermo Fisher Scientific). Thermal cycling was conducted according to the manufacturer's recommended program, and all experiments were duplicated. The TaqMan miRNA Assays used in this study and their Taqman assay IDs are as follows: miR-423-5p (478090\_mir). The CT values were normalized using the delta CT method with the endogenous controls (miR-17–5p). To determine the corresponding  $\Delta$ CT value, the CT value of the target gene miRNAs was subtracted from the miR-17–5p CT value.

### **3.5. Statistical analysis**

Data analysis to investigate the association of gestational levels of hsa-miR-423-5p with the outcome of child cognitive performance at 90 days was performed with crude linear regression and subsequently adjusted for maternal age, gestational weeks, primiparity, planned pregnancy, socioeconomic level, maternal education, maternal

gestational BMI, prematurity and exclusive breastfeeding. The significance level considered was 0.05.

## Results

The data analyzed were from 87 dyads (mother-infant) with assessment of the infants 90 days postpartum. The mean gestational age within the sample was 15.86 weeks (SD±5.55); the most prevalent socioeconomic level was C (66.7%), followed by A+B (20.7%) and D+E (12.6%). Mean maternal age was 27.66 years (SD±5.40) and maternal schooling was 10.4 completed years of study (SD±3.34). The overall mean of has-miR-423-5p was -0.06 (SD±1.6) and the composite cognitive development score by Bayley III was 101.09 (SD±11.80), table 1.

In the scatter plot, Fig. 1, shows a significant correlation between has-miR-423-5p and the cognitive development score ( $p=0.021$ ). Collinearity diagnoses demonstrate tolerance  $>0.1$  and VIF  $<10$ , not indicating multicollinearity between any of the tested variables.

Linear regression for the outcome of childhood neurocognitive development shows the association between miR-423-5p and the domain of cognitive development. As maternal miR-423-5p increases, it increases by 2.26 (CI 95% 0.36; 4.16,  $p = 0.020$ ) the average cognitive development of babies at three months of age. When analyzing the adjusted regression model, it also showed an association with cognitive development, as maternal miR-423-5p increases, the average cognitive development of babies increases by 2.40 (CI95% 0.37; 4.43,  $p = 0.021$ ) at three months of age, data shown in Table 2.

## Discussion

This study investigated the influence of maternal miRNA expression on the cognitive development of 90-day-old infants and confirmed the hypothesis that hsa-miR423-5p in mentally healthy pregnant women is associated with the cognitive development scores of infants at 3 months of age. It is important to highlight that these results are independent of maternal mental disorders, as this was an exclusion criterion for our study, thus highlighting that all mothers were mentally healthy. In this study, we chose to select mothers without any previous diagnosis and thus exclusively report changes in the gestational period and the impacts on the cognitive development of babies, which differentiates us from studies published to date.

The contribution of this study is the identification of miR-423-5p expression levels in maternal blood and its ability to influence the cognitive development of infants at 90 days of age, which suggests a probable biomarker to be used in the future. In addition, we call attention to the study previously published by the group (Nedel et al.), which showed that the expression of specific microRNAs in the maternal blood during pregnancy would be associated with the cognitive development of babies, however it was also evident that the presence of mood disorders during pregnancy were also associated with child development deficit in this period. A question of reverse causality and another question of possible mediation of the child development outcome was posed. How to answer whether it is gestational depression that alters the expression of microRNAs or vice versa? Would the alteration in infant development manifest itself without the presence of mood disorders and anxiety during pregnancy? Thus, when it was impossible to answer the first question, which is a limitation of the study, we selected mothers without mental disorders in order to reduce the influence of depression and gestational anxiety as confounders of cognitive development. The answer to that question is that we present.

The association found highlighted the influence of maternal miRNA on the fetus, which can be justified in two ways, direct or indirect exposure. In direct exposure, miRNAs pass directly from mother to fetus through the placenta, influencing the baby's neurodevelopment. However, this association can also be perceived through indirect exposure, in which miRNAs affect signaling pathways, which control the baby's development. Both situations are viable, as the literature has increasingly reinforced the developmental origins of health and disease (DOHaD) hypothesis, which postulates that the perinatal environment can impact fetal health and adult life. According to a literature review by Lapehn and Paquette, 2022, including 28 articles published between 2016 and 2021, these studies linked maternal exposures to health outcomes such as birth weight, fetal growth, or infant neurobehavior (Lapehn & Paquette, 2022). Among the justification for studies to modulate the fetus are microRNAs that are expressed in the placenta and are involved in fetal and maternal signaling through circulation in the maternal circulation within extracellular vesicles known as exosomes (Mitchell et al., 2015). The identification of placental-specific miRNAs secreted into maternal blood from exosomes is an area of growing interest as a non-invasive biomarker for pregnancy health (Mouillet et al., 2015), as it is analyzed from peripheral venous blood collection, as performed in our study. Most epigenetic methods of genetic control are studied in the placenta; however, its application to specific prenatal exposures and postnatal health outcomes is a growing area of research, given the relevance of the topic.

To further resource our findings, both forms of maternal miRNA influence on the infant can affect embryology and thus lead to outcomes in fetal brain development. Our sample was evaluated for serum levels of hsa-miR423-5p at around 15 weeks of gestation, on average. During this period, the rate of neurogenesis and neuronal migration is accelerated, as relatively small perturbations can significantly alter the structure and

function of the maturing brain, as demonstrated in the study by Zhan et al., 2013, which created a time-spatial atlas of human fetal brain development in the second trimester of pregnancy (Zhan et al., 2013).

To talk about the role of miR-423-5p in brain development, we found a study published in 2019 by Mao et al., which stated a direct interaction of miR-423-5p, miR-485-5p, and miR-666-3p with expression of cytochrome P450, family 26, subfamily B, polypeptide 1 (Cyp26b1). The authors performed a Western blot assay that revealed that miR-423-5p, miR-485-5p, and miR-666-3p reduced the protein level of Cyp26b1 in Schwann cells in cell culture, demonstrating that these miRNAs can regulate the expression of Cyp26b in these cells (Mao et al., 2019).

With these data, it is possible to hypothesize a pathway between maternal miRNA expression and the baby's cognitive development at 3 months of age. Our results demonstrate a positive association between maternal miRNA and the baby's development score, so it is possible to infer that the increase in miR-423-5p found in our study is capable of regular levels of Cyp26b1 levels, as found by Mao et al., 2019. From this, it is seen in the literature that cytochrome is capable of controlling the diffusion of retinoic acid (RA) in our cells, that is, the activity of Cyp26b1 regulates the levels of RA (Ross & Zolfaghari, 2011). Continuing our hypothesis, it is possible that the increase in maternal miR-423-5p regulates the levels of Cyp26b1 and, consequently, the levels of RA.

Based on this, it is worth highlighting that RA reaches the human body through the intake of vitamin A, which is essential for embryonic development (Ghyselinck & Duester, 2019). AR plays a fundamental role in the formation of the embryo since the period of organogenesis. Vitamin A deficiency during pregnancy can result in a set of defects and malformations in the fetus, referred to as vitamin A deficiency syndrome (See

et al., 2008). On the other hand, excessive intake of vitamin A, AR or acidic retinoid analogues is highly teratogenic and induces abnormalities that are not very different from deficiency, including defects in the craniofacial, central nervous, and cardiovascular systems (Ross & Zolfaghari, 2011).

In this sense, it should be noted that a relationship between RA and brain development has already been established. The literature suggests that AR plays a crucial role in neurogenesis (Bonnet et al., 2008; Dutta et al., 2023; Park et al., 2016), as well as in synaptic plasticity, including in adult patients (Lenz et al., 2021). The physiological actions of RA begin early in development and continue throughout life. In this sense, it was demonstrated by Shibata et al. 2021 that AR signaling is required for proper gene expression in the prefrontal cortex, spinogenesis, and long-range connectivity (Shibata et al., 2021).

Furthermore, the relationship between vitamin A, brain development and cognitive development is evident. An in vivo study performed by Jiang et al. 2012 demonstrates that vitamin A deficiency is capable of impairing postnatal cognitive function, causing learning and spatial memory deficits in rats (Jiang et al., 2012). In 2018, Lai et al published a study demonstrating that vitamin A deficiency induces autism-like behaviors in rats (Lai et al., 2018). Both studies show us the important role of vitamin A and RA in cognitive development, especially concerning the gestational period and maternal lifestyle about the consequences and legacies passed on to the fetus which can remain throughout the life of the mother child. Furthermore, the relationship between vitamin A, brain development and cognitive development is evident. An in vivo study performed by Jiang et al. 2012 demonstrates that vitamin A deficiency is capable of impairing postnatal cognitive function, causing learning and spatial memory deficits in rats (Jiang et al., 2012). In 2018, Lai et al published a study demonstrating that vitamin A deficiency

induces autism-like behaviors in rats (Lai et al., 2018). Both studies show us the important role of vitamin A and RA in cognitive development, especially concerning the gestational period and maternal lifestyle about the consequences and legacies passed on to the fetus which can remain throughout the life of the mother child. Especially when it comes to maternal nutrition, as it is already seen in the literature how much it impacts the baby's neurodevelopment (Nyaradi et al., 2013; Heland et al., 2022; Cortés-Albornoz et al., 2021)

Cognitive development is a process that begins very early when the individual is still an embryo and receives the entire genetic, physical, emotional, affective, and biological load from their parents (Kadic & Kurjak, 2018). From birth onwards, and stimuli that caregivers provide to the child, to gestation conditions and general care for the baby and mother are fundamental for good development. As it is such an important topic, it is necessary to know the hereditary and environmental factors that can compromise the growth of fetuses and children, mainly with the aim of preventing and identifying risk situations to provide care as early as possible and avoid future impacts on the health of children.

Finally, it is essential to emphasize the need for in vitro and in vivo studies to clarify the reasons why miR-423-5p is capable of influencing the mother-infant trajectory with direct or indirect effects on cognitive development. Furthermore, studies are needed to clarify the mechanism of action of miRNA in the context of neurodevelopment during pregnancy and also whether this relationship remains over time, as neuroplasticity at this stage of life may combine differences in neurodevelopment, mitigating the effects observed in babies over three months of age.

## **Conclusion**

In summary, an association was found between the expression of hsa-miR-423-5p in the peripheral blood of mentally healthy pregnant women during the first and second trimester of pregnancy and the cognitive development scores of infants at 3 months of age. This is a pioneering study on the subject, in this sense, it is expected that in the future, with more studies, this miRNA can be used as a biomarker of child neurocognitive development detectable in the prenatal period, thus allowing the planning of early interventions.

## **Conflict of Interest**

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

## **Author Contributions**

CCA: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing- Original draft, Visualization. FN: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing - Review and editing, Supervision. CPF: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing- Original draft. TFG: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing- Original draft. GPC: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing- Original draft. RG: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing- Original draft. ALS: Writing - Review and editing. AMA: Writing - Review and editing, Supervision. LAQ: Writing - Review and editing, Supervision. GCG: Writing - Review and editing, Supervision. MBM: Writing - Review and editing, Supervision. KATP: Writing - Review and editing,

Supervision. JPT: Conceptualization, Validation, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing - Review and editing, Supervision. RTP: Formal analysis, Investigation, Resources, Writing - Review and editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

## **Funding**

This work was supported by the Ministry of Health (DECIT) Brazil, CNPq/Brazil (Process 401726/2015-0 APP/Call 47/2014), Bill & Melinda Gates Foundation (INV-007186/OPP1142172) and INCT-EN (National Institute of Science and Technology, Brazil).

## **Acknowledgments**

This work was supported by CNPq/Brazil, the Bill & Melinda Gates Foundation, and the Ministry of Health/INCT-DCEN (National Institute of Science and Technology). Also, we thank all families who participated in our study.

## **Reference styles**

Bonnet, E., Touyarot, K., Alfons, S., Pallet, V., Higuieret, P., & Abrous, D. N. (2008). Retinoic acid restores adult hippocampal neurogenesis and reverses spatial memory deficit in vitamin A deprived rats. *PLoS ONE*, 3(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003487>

Bornstein, M. H., Britto, P. R., Nonoyama-Tarumi, Y., Ota, Y., Petrovic, O., & Putnick, D. L. (2012). Child development in developing countries: Introduction and methods. *Child Development*, 83(1). <https://doi.org/10.1111/j.1467-8624.2011.01671.x>

Cortés-Albornoz MC, García-Guáqueta DP, Velez-van-Meerbeke A, Talero-Gutiérrez C. (2021) Maternal Nutrition and Neurodevelopment: A Scoping Review. *Nutrients*, 13(10). <https://doi.org/10.3390/nu13103530>

Dutta, S., Pal, D., & Rao, M. R. S. (2023). Retinoic Acid-Mediated Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells to Neuronal Cells. [https://doi.org/10.1007/7651\\_2023\\_480](https://doi.org/10.1007/7651_2023_480)

Floris, I., Descamps, B., Vardeu, A., Mitić, T., Posadino, A. M., Shantikumar, S., Sala-Newby, G., Capobianco, G., Mangialardi, G., Howard, L., Dessole, S., Urrutia, R., Pintus, G., & Emanuelli, C. (2015). Gestational Diabetes Mellitus Impairs Fetal Endothelial Cell Functions Through a Mechanism Involving MicroRNA-101 and Histone Methyltransferase Enhancer of Zester Homolog-2. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35(3). <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304730>

Floris, I., Kraft, J. D., & Altosaar, I. (2016) Roles of microRNA across prenatal and postnatal periods. In *International Journal of Molecular Sciences* 17(12). <https://doi.org/10.3390/ijms17121994>

Ghyselinck, N. B., & Duester, G. (2019) Retinoic acid signaling pathways. *Development (Cambridge)*, 146(13). <https://doi.org/10.1242/dev.167502>

Heland S, Fields N, Ellery SJ, Fahey M and Palmer KR (2022) The role of nutrients in human neurodevelopment and their potential to prevent neurodevelopmental adversity. *Frontiers Nutritional* 9(992120). <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.992120>

Jiang, W., Yu, Q., Gong, M., Chen, L., Wen, E. Y., Bi, Y., Zhang, Y., Shi, Y., Qu, P., Liu, Y. X., Wei, X. P., Chen, J., & Li, T. Y. (2012) Vitamin A deficiency impairs postnatal cognitive function via inhibition of neuronal calcium excitability in hippocampus. *Journal of Neurochemistry*, 121(6). <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07697.x>

Kadic, A. S., & Kurjak, A. (2018). Cognitive Functions of the Fetus. In *Ultraschall in der Medizin* (Vol. 39, Issue 2). <https://doi.org/10.1055/s-0043-123469>

Lai, X., Wu, X., Hou, N., Liu, S., Li, Q., Yang, T., Miao, J., Dong, Z., Chen, J., & Li, T. (2018) Vitamin A Deficiency Induces Autistic-Like Behaviors in Rats by Regulating the RAR $\beta$ -CD38-Oxytocin Axis in the Hypothalamus. *Molecular Nutrition and Food Research*, 62(5). <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700754>

Lapehn, S., & Paquette, A. G. (2022). The Placental Epigenome as a Molecular Link Between Prenatal Exposures and Fetal Health Outcomes Through the DOHaD Hypothesis. In *Current Environmental Health Reports* (Vol. 9, Issue 3). <https://doi.org/10.1007/s40572-022-00354-8>

Lenz, M., Kruse, P., Eichler, A., Straehle, J., Beck, J., Deller, T., & Vlachos, A. (2021). All-trans retinoic acid induces synaptic plasticity in human cortical neurons. *ELife*, 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.63026>

Mao, S., Zhang, S., Zhou, S., Huang, T., Feng, W., Gu, X., & Yu, B. (2019). A Schwann cell-enriched circular RNA circ-Ankib1 regulates Schwann cell proliferation following peripheral nerve injury. *FASEB Journal*, 33(11). <https://doi.org/10.1096/fj.201900965R>

Mitchell, M. D., Peiris, H. N., Kobayashi, M., Koh, Y. Q., Duncombe, G., Illanes, S. E., Rice, G. E., & Salomon, C. (2015). Placental exosomes in normal and complicated pregnancy. In *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (Vol. 213, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.07.001>

Mouillet, J. F., Ouyang, Y., Coyne, C. B., & Sadovsky, Y. (2015). MicroRNAs in placental health and disease. In *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (Vol. 213, Issue 4). <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.05.057>

Nyaradi A, Li J, Hickling S, Foster J and Oddy WH (2013) The role of nutrition in children's neurocognitive development, from pregnancy through childhood. *Frontiers in Human Neuroscience* 7 (97). <https://doi.org/10.3389/fnhum.2013.00097>

Nedel, F., Ferrúa, C. P., do Amaral, C. C., Corrêa, G. P., Silveira, R. G., Trettim, J. P., da Cunha, G. K., Klug, A. B., Ardais, A. P., Fogaça, T. B., Pinheiro, K. A. T., Bast, R. K. S. S., Ghisleni, G., de M Souza, L. D., de Matos, M. B., Quevedo, L. de A., & Pinheiro, R. T. (2023). Maternal expression of miR-let-7d-3p and miR-451a during gestation influences the neuropsychomotor development of 90 days old babies: “Pregnancy care, healthy baby” study. *Journal of Psychiatric Research*, 158. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2022.12.021>

Park, J. C., Jeong, W. J., Kim, M. Y., Min, D. S., & Choi, K. Y. (2016). Retinoic-acid-mediated HRas stabilization induces neuronal differentiation of neural stem cells during brain development. *Journal of Cell Science*, 129(15). <https://doi.org/10.1242/jcs.184366>

Pasquinelli, A. E. (2012). MicroRNAs and their targets: Recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 13, Issue 4). <https://doi.org/10.1038/nrg3162>

Pinheiro, R. T., Souza, L. D. de M., Trettim, J. P., de Matos, M. B., Pinheiro, K. A. T., da Cunha, G. K., Rubin, B. B., Scholl, C. C., Stigger, R. S., Motta, J. V. dos S., de Oliveira, S. S., Ghisleni, G., Nedel, F., & Quevedo, L. de A. (2022). Antenatal depression: Efficacy of a pre-post therapy study and repercussions in motor development of children during the first 18 months postpartum. Study: “Pregnancy care, healthy baby.” *Journal of Psychiatric Research*, 148. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2022.01.061>

Pinheiro, R. T., Trettim, J. P., de Matos, M. B., Pinheiro, K. A. T., da Silva, R. A., Martins, C. R., da Cunha, G. K., Coelho, F. T., Motta, J. V. dos S., Coelho, F. M. da C., Ghisleni, G., Nedel, F., Ardais, A. P., Stigger, R. S., Quevedo, L. de A., & Souza, L. D. de M. (2021). Brief cognitive behavioral therapy in pregnant women at risk of postpartum depression: Pre-post therapy study in a city in southern Brazil. *Journal of Affective Disorders*, 290. <https://doi.org/10.1016/j.jad.2021.04.031>

Power, M. L., & Schulkin, J. (2013). Maternal regulation of offspring development in mammals is an ancient adaptation tied to lactation. In *Applied and Translational Genomics* (Vol. 2, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.atg.2013.06.001>

Ross, A. C., & Zolfaghari, R. (2011). Cytochrome P450s in the regulation of cellular retinoic acid metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 31. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-072610-145127>

See, A. W. M., Kaiser, M. E., White, J. C., & Clagett-Dame, M. (2008). A nutritional model of late embryonic vitamin A deficiency produces defects in organogenesis at a high penetrance and reveals new roles for the vitamin in skeletal development. *Developmental Biology*, 316(2). <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.10.018>

Shibata, M., Pattabiraman, K., Lorente-Galdos, B., Andrijevic, D., Kim, S. K., Kaur, N., Muchnik, S. K., Xing, X., Santpere, G., Sousa, A. M. M., & Sestan, N. (2021). Regulation of prefrontal patterning and connectivity by retinoic acid. *Nature*, 598(7881). <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03953-x>

Simonson, B., & Das, S. (2015). MicroRNA Therapeutics: the Next Magic Bullet? *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 15(6). <https://doi.org/10.2174/1389557515666150324123208>

Sookoian, S., Gianotti, T. F., Burgueño, A. L., & Pirola, C. J. (2013). Fetal metabolic programming and epigenetic modifications: A systems biology approach. In *Pediatric Research* (Vol. 73, Issues 4–2). <https://doi.org/10.1038/pr.2013.2>

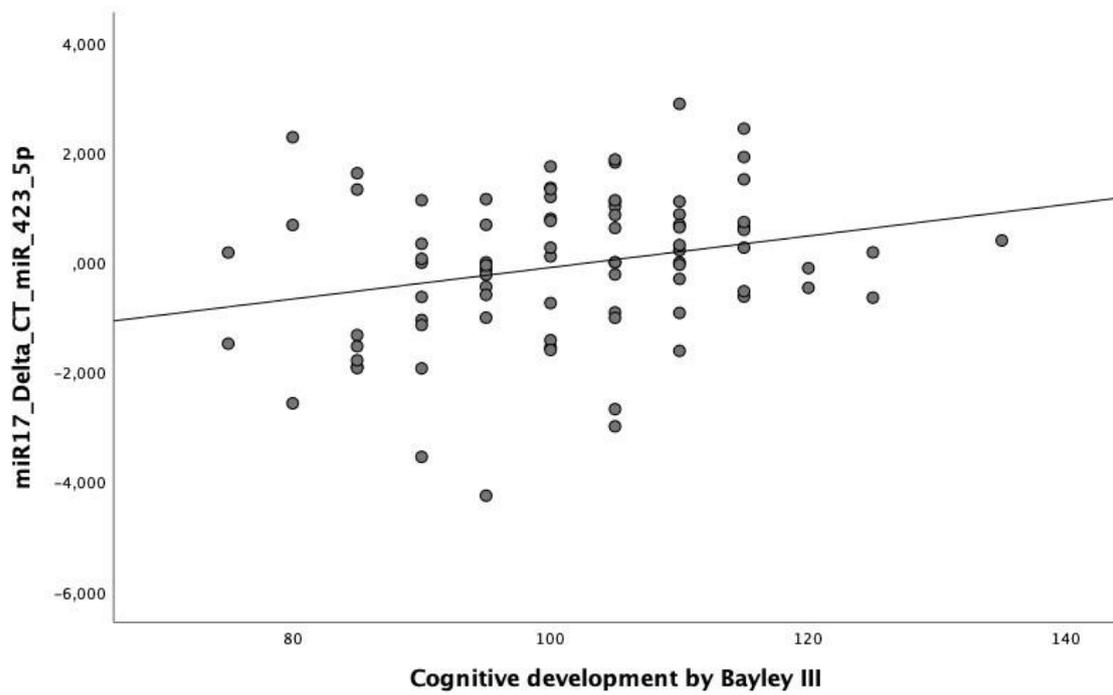
Tay, Y., Kats, L., Salmena, L., Weiss, D., Tan, S. M., Ala, U., Karreth, F., Poliseno, L., Provero, P., Di Cunto, F., Lieberman, J., Rigoutsos, I., & Pandolfi, P. P. (2011). Coding-independent regulation of the tumor suppressor PTEN by competing endogenous mRNAs. *Cell*, 147(2), 344–357. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.029>

Vishnoi, A., & Rani, S. (2017). MiRNA biogenesis and regulation of diseases: An overview. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1509). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6524-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6524-3_1)

Wilks, T., Gerber, R. J., & Erdie-Lalena, C. (2010). Developmental milestones: Cognitive development. In *Pediatrics in Review* (Vol. 31, Issue 9). <https://doi.org/10.1542/pir.31-9-364>

Zhan, J., Dinov, I. D., Li, J., Zhang, Z., Hobel, S., Shi, Y., Lin, X., Zamanyan, A., Feng, L., Teng, G., Fang, F., Tang, Y., Zang, F., Toga, A. W., & Liu, S. (2013). Spatial-temporal atlas of human fetal brain development during the early second trimester. *NeuroImage*, 82. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2013.05.063>

Figure



**Figure 1.** Scatter plot correlating the Bayley III composite cognitive development score and hsa-miR-423-5p, p-value = 0.021\*.

## Tables

**Table 1:** Sample characterization

Variables	N/Mean	%/SD
<b>Age</b>		
Up to 23 years	16	18.4
Between 24 and 29 years old	37	42.5
30 years or older	34	39.1
<b>Previous pregnancy</b>		
No	36	41.4
Yes	51	58.6
<b>Planned pregnancy</b>		
No	24	27.6
Yes	63	72.4
<b>Socioeconomic class</b>		
A and B	18	20.7
C	58	66.7
D and E	11	12.6
<b>Schooling</b>		
Elementary school	19	21.8
High school	44	50.6
University education	24	27.6
<b>Prematurity</b>		
No	78	89.7
Yes	7	8.0
<b>Exclusive breastfeeding</b>		
No	39	44.8
Yes	46	52.9
<b>Gestacional age</b>	15.86	5.55
<b>Body mass index</b>	27.87	5.50
<b>hsa-miR-423-5p</b>	-0.06	1.36
<b>Cognitive development score</b>	101.09	11.80

**Table 2:** Multivariate analysis according to the cognitive development score of babies at 90 days of life.

Variables	Crude analysis		Adjusted analysis	
	RR (CI 95%)	p-value	RR (CI 95%)	p-value
Age (Up to 23 years*)	1.84 (-1.60;5.29)	0.290	0.27 (-4.02;4.56)	0.900
Body mass index	-0.16 (-0.62;0.30)	0.499	-0.20 (-0.68;0.27)	0.398
Previous pregnancy (No*)	-1.22 (-6.35;3.91)	0.638	-0.47 (-6.90;5.95)	0.882
Planned pregnancy (No*)	-2.08 (-7.73;3.56)	0.465	-1.77 (-7.90;4.37)	0.568
Socioeconomic class (Class A and B*)	-1.31 (-5.73;3.10)	0.556	0.83 (-4.69;6.35)	0.764
Schooling (Elementary school*)	2.56 (-1.00;6.13)	0.157	2.59 (-1.09;6.28)	0.165
Prematurity (No*)	-8.16 (-17.41;1.09)	0.083	-5.77 (-15.78;4.24)	0.255
Exclusive breastfeeding (No*)	1.92 (-3.21;7.04)	0.459	2.47 (-2.86;7.80)	0.359
Gestational age	-0.15 (-0.61;0.31)	0.511	-0.10 (-0.60;0.40)	0.700
<b>hsa-miR-423-5p</b>	<b>2.26 (0.36;4.16)</b>	<b>0.020*</b>	<b>2.40 (0.37;4.43)</b>	<b>0.021*</b>

**PARTE 3**  
**CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os miRNAs vem sendo apresentados na literatura nas últimas décadas, baseado nisso, enfatizamos a importância em estudá-los diante da inovação da temática. Quando pensamos no ciclo gravídico puerperal, nota-se ainda mais a relevância de analisar moléculas regulatórias que fazem parte desse processo e que podem acarretar desfechos positivos ou negativos, tanto para o sucesso da gestação quanto para o desenvolvimento dos bebês.

Os resultados obtidos na presente tese demonstram que o aumento na expressão do miR-423-5p entre o primeiro e segundo trimestre gestacional é capaz de diminuir o risco de as gestantes desenvolverem hipertensão no pré-natal. Diante disso, é possível pensar futuramente no miRNA como um biomarcador a ser analisado junto aos exames do primeiro trimestre de gestação e a partir dos resultados traçar planos e metas junto com a gestante a fim de prevenir a hipertensão, por exemplo, quando o miRNA da gestante estiver com sua expressão diminuída.

Além disso, como descrito nos resultados do segundo artigo, a expressão do miR-423-5p no sangue materno demonstrou uma correlação positiva com o desenvolvimento cognitivo dos bebês aos 3 meses de idade. Baseado nisso, e com o pensamento na prevenção e promoção de saúde, a partir da detecção do miRNA no primeiro trimestre gestacional, pode ser possível implementar métodos de intervenção precoce para estímulo dos bebês, no intuito de melhorar o seu desenvolvimento cognitivo, fazendo com que as crianças tenham pouco ou, até mesmo, nenhum prejuízo cognitivo.

Frente a revisão teórica realizada para a elaboração do projeto da presente tese, é notória a escassez na literatura em relação a estudos com miRNA e hipertensão na gestação e também com desenvolvimento cognitivo. Sendo assim, evidencia-se que os resultados encontrados e os artigos elaborados são inovadores, pioneiros e incipientes na

temática, o que nos permite também reforçar a importância da realização de mais estudos para que com o aumento do número de evidências reforce as nossas hipóteses e assim seja possível estar cada vez mais perto de consolidar o miRNA como um biomarcador de hipertensão pré-natal e de desenvolvimento cognitivo dos bebês.

## APÊNDICES

### Apêndice 1: Protocolo simplificado do Kit mirVana PARIS

#### 1. Resumo dos procedimentos do Kit mirVana PARIS

##### - Rompimento das amostras e extração orgânica

Para isolar o RNA, a amostra é misturada com 2x Denaturing Solution e submetido ao Acid-Phenol: Clorofórmio, que promove a purificação do RNA e remove quantidade significativa de DNA.

##### - Purificação final do RNA sobre o filtro

Os procedimentos são distintos para a purificação do RNA total ou para RNAs de menos de 200 bases (Iremos utilizar a purificação do RNA Total\*).

##### - Purificação final do RNA total

Adiciona-se etanol nas amostras. As amostras serão filtradas através do Filter Cartridge, um filtro contendo um dispositivo de fibra de vidro que vai imobilizar o RNA. O filtro é lavado e finalmente o RNA é eluído com uma solução de baixa força iônica.

**Observação:** para obter RNA para perfil da expressão de miRNA recomenda-se o protocolo para isolar RNA total. Isso faz com que seja possível avaliar criticamente a qualidade do RNA para verificar se está adequado para análise, bem como sua quantidade. A população de miRNA deve ser purificada antes da “rotulagem” das amostras para análise desse miRNA.

#### 2. Procedimentos mirVana PARIS

##### - Preparação das soluções

- Adicionar 375 µl de 2-mercaptoetanol em uma garrafa rotulada 2x Denaturing Solution. Misturar bem.

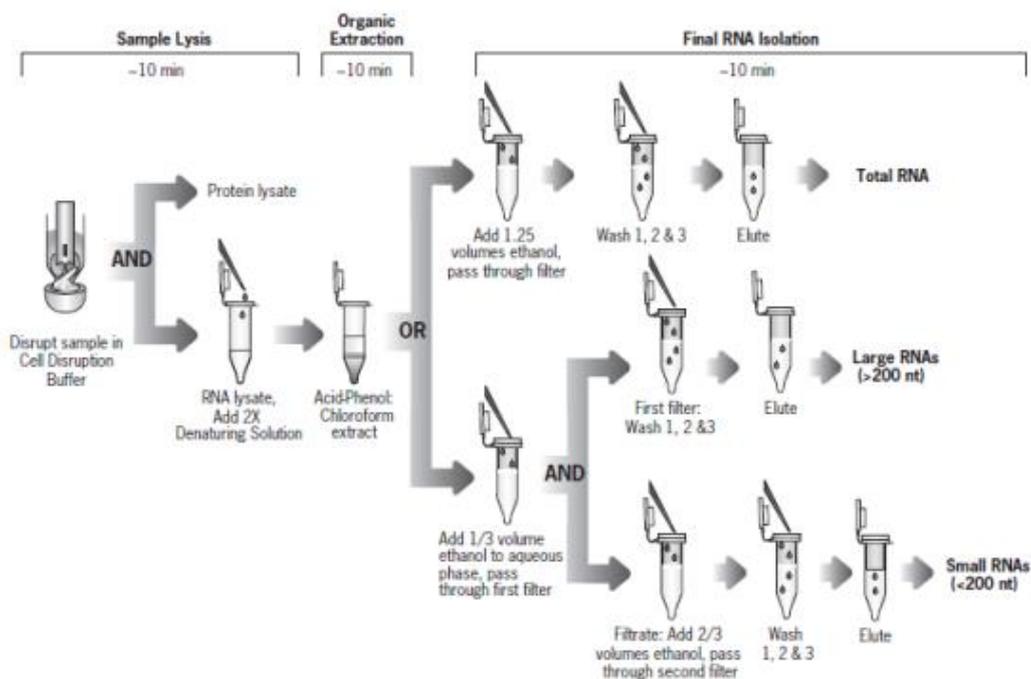
**Observação:** 2x Denaturing Solution pode solidificar a 4°C. Para evitar a solidificação a solução pode ser armazenada, por um mês, em temperatura ambiente. Caso tenha havido a solidificação, deve-se aquecer a solução a 37°C com eventuais agitações até estar em completa solução.

- **Wah solution 1:** Adicionar 21 mL de ACS etanol 100% na garrafa rotulada miRNA Wash Solution. Misturar bem.
- **Wash solution 2/3:** Adicionar 40 mL de ACS grade etanol 100% na garrafa rotulada Wash Solution 2/3. Misturar bem.

**Observação:** um precipitado pode ser formado nos dias seguintes da mistura, pois o EDTA saiu da mistura. Assim, basta deixar esses cristais no frasco ao remover a Wash Solution para o uso.

#### - Extração orgânica para amostras líquidas

- Misturar em um ependorfe 625 µl da amostra com igual volume de 2x Denaturing Solution (625 µl), a temperatura ambiente.



**Observação:** Se o volume de amostra for menor que 100 µl, adiciona-se Cell Disruption Buffer para tornar o volume maior que 100 µl e imediatamente misturar o mesmo volume de 2x Denaturing Solution.

- Incubar a mistura no gelo, por 5 minutos.
- Adicionar 1250 µl de Acid-Phenol: Clorofórmio ao volume total da amostra somado com 2x Denaturing Solution.

**Observação:** Certifique-se de retirar a fase contendo Acid-Phenol: Clorofórmio. Não o tampão aquoso que se encontra na parte superior da mistura.

- Vórtex de 30 à 60 segundos para misturar.
- Centrifugação por 5 minutos em velocidade máxima, maior ou igual a 10.000 g, em temperatura ambiente para separar a mistura em fase aquosa e orgânica.
- Depois de centrifugar, a interfase deve ser compacta, caso não seja, deve-se repetir a centrifugação.
- Remover a fase aquosa e transferir para um novo tubo cuidadosamente \*Anotar o volume transferido.

#### **- Isolamento Final de RNA**

- O RNA pode ser eluído em qualquer água livre de nuclease ou em Elution Solution. A Elution Solution é livre de nucleasse 0.1M EDTA, assim, deve-se estar atento se isso pode interferir no tipo de amostra usada, se sim, preferir a água.
- A Elution Solution ou a água livre de nuclease deve ser pré-aquecida até 95°C para uso na eluição do RNA no filtro.
- Se o etanol 100% estiver armazenado gelado, deve-se deixá-lo atingir a temperatura ambiente para usar no Isolamento Final do RNA.
- Rotação para centrifugação do Filter Cartridges deve ser à 10.000 g.

**Observação:** a partir desse ponto os procedimentos para o isolamento do RNA total e para o isolamento de RNA com espécies de RNA com menos de 200 nucleotídeos são distintos. Como esse protocolo trata de isolar o RNA para obtenção final de microRNA, optou-se por mencionar os procedimentos apenas para o isolamento do RNA total.

#### **- Procedimentos para Isolamento Total de RNA**

- Adicionar 1.25 volumes de etanol 100% na fase aquosa e misturar por inversão.

Exemplo: se forem 300 µl de fase aquosa, serão 375 µl de etanol.

- Filtragem da mistura lisado/etanol: Para cada amostra, colocar um Filter Cartridge em um Collection Tube.

- Pipetar a mistura lisado/etanol sobre o filtro.

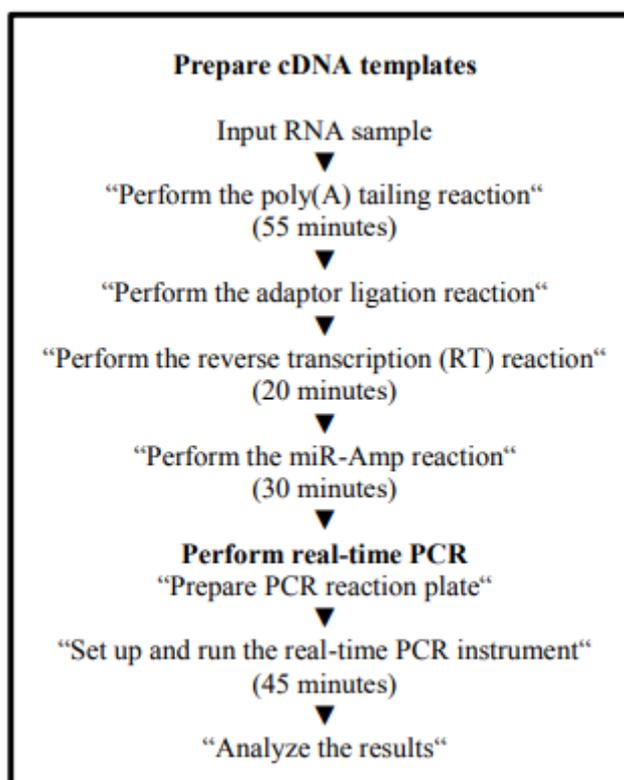
**Observação:** O máximo de mistura colocada em cada filtro é de 700 µl por vez, contudo um mesmo filtro pode ser usado para mais de uma aplicação, no caso da amostra ter volume maior que 700 µl.

- Centrifugar por cerca de 30 segundos ou até toda a mistura passar via filtro.
- Descartar o conteúdo que passou pelo filtro e repetir até que toda a mistura lisado/etanol tenha sido filtrada filtro. Guardar os Collection Tubes para usar nos passos de lavagem.
- Aplicar 700 µl da Solution 1 de lavagem no filtro.
- Centrifugar por cerca de 15 segundos, para a solução passar pelo filtro.
- Descartar o conteúdo que foi filtrado e recolocar o filtro no mesmo Collection Tube.
- Aplicar 500 µl de Solution 2/3 de lavagem sobre o filtro, como no item anterior.

Fazer esse procedimento duas vezes.

- Descartar o conteúdo filtrado da última lavagem, recolocar o filtro no mesmo Collection Tube e “spin the assembly” por 1 minuto para remover algum fluido residual do filtro.
- Eluir o RNA com 100 µl de Elution Solution á 95°C ou água livre de nuclease: Transferir o filtro para um Collection Tube novo. Aplicar 100 µl de Elution Solution (95°C) ou da água livre de nuclease no centro do filtro e fechar a tampa.
- Centrifugar por cerca de 30 segundos para recuperar o RNA.
- Coletar o eludato (que contém o RNA) e armazenar em – 20°C ou em menor temperatura.

**Apêndice 2:** Protocolo simplificado para obtenção de cDNA, via Taq Man Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit.



### 1. Amostra de entrada de RNA

Será utilizado entre 1 e 10 ng de RNA total por reação (concentração da amostra deverá ser  $\leq 5$  ng/ $\mu$ l);

Utilizar 2  $\mu$ l da amostra eluente por reação (obtida do procedimento de isolamento da amostra);

### 2. Executar a reação de retalhamento da cauda poli(A)

Descongelar as amostras e reagentes para a síntese de cDNA;

Passar os componentes delicadamente no vórtex;

Centrifugar rapidamente (spin) para “descer” o conteúdo e remover bolhas;

Em um eppendorfe preparar o mix para reação da cauda poli(A):

Component	1 Rxn	4 Rxns <sup>[1]</sup>	10 Rxns <sup>[1]</sup>
10X Poly(A) Buffer	0.5 µL	2.2 µL	5.5 µL
ATP	0.5 µL	2.2 µL	5.5 µL
Poly(A) Enzyme	0.3 µL	1.3 µL	3.3 µL
RNase-free water	1.7 µL	7.5 µL	18.7 µL
<b>Total Poly(A) Reaction Mix volume</b>	<b>3.0 µL</b>	<b>13.2 µL</b>	<b>33 µL</b>

<sup>[1]</sup> Volumes include 10% overage.

Passar o mix delicadamente no vórtex;

Centrifugar rapidamente (spin) para “descer” o conteúdo e remover bolhas;

Adicionar 5 µl de Proteína Inibidora de RNase por poço;

Adicionar 2 µl de amostra por poço; Adicionar 3 µl do mix por poço;

Fechar a placa e passá-la no vórtex delicadamente;

Centrifugar rapidamente (spin) para “descer” o conteúdo e remover bolhas;

Colocar a placa no termociclador:

Step	Temperature	Time
Polyadenylation	37°C	45 minutes
Stop reaction	65°C	10 minutes
Hold	4°C	Hold

### 3. Realizar a reação de ligação do adaptador

Em um eppendorfe preparar o “Ligation Reaction Mix”:

Component	1 Rxn	4 Rxns <sup>[1]</sup>	10 Rxns <sup>[1]</sup>
5X DNA Ligase Buffer	3 µL	13.2 µL	33 µL
50% PEG 8000 <sup>[2]</sup>	4.5 µL	19.8 µL	49.5 µL
25X Ligation Adaptor	0.6 µL	2.6 µL	6.6 µL
RNA Ligase	1.5 µL	6.6 µL	16.5 µL
RNase-free water	0.4 µL	1.8 µL	4.4 µL
<b>Total Ligation Reaction Mix volume</b>	<b>10 µL</b>	<b>44 µL</b>	<b>110 µL</b>

<sup>[1]</sup> Volumes include 10% overage.

<sup>[2]</sup> 50% PEG 8000 is very viscous, follow the Important statement below to ensure accurate pipetting.

\*50% PEG 8000 – temperatura ambiente → segura a pipeta dentro do material por cerca de 10 segundos e espera ele entrar na ponteira, pois é muito viscoso e quando vai descartá-lo proceder da mesma forma;

Passar o mix delicadamente no vórtex;

Centrifugar rapidamente (spin) para “descer” o conteúdo e remover bolhas;

Adicionar 10 µl do mix em cada poço (totalizando nesse momento um volume de 15 µl por poço);

Fechar a placa e passá-la no vórtex ou shaker (1900 RPM por 1 minuto);

Centrifugar rapidamente (spin) para “descer” o conteúdo e remover bolhas;

Colocar a placa no termociclador:

Step	Temperature	Time
Ligation	16°C	60 minutes
Hold	4°C	Hold

#### 4. Realizar a reação de transcrição reversa

Em um eppendorfe preparar “RT reaction Mix”:

Component	1 Rxn	4 Rxns <sup>[1]</sup>	10 Rxns <sup>[1]</sup>
5X RT Buffer	6 µL	26.4 µL	66 µL
dNTP Mix (25 mM each)	1.2 µL	5.3 µL	13.2 µL
20X Universal RT Primer	1.5 µL	6.6 µL	16.5 µL
10X RT Enzyme Mix	3 µL	13.2 µL	33 µL
RNase-free water	3.3 µL	14.5 µL	36.3 µL
<b>Total RT Reaction Mix volume</b>	<b>15 µL</b>	<b>66 µL</b>	<b>165 µL</b>

<sup>[1]</sup> Volumes include 10% overage.

Passar o mix delicadamente no vórtex;

Centrifugar rapidamente (spin) para “descer” o conteúdo e remover bolhas;

Adicionar 15 µl do mix em cada poço (totalizando nesse momento um volume de 30 µl por poço);

Fechar a placa e passá-la no vórtex ou shaker;

Centrifugar rapidamente (spin) para “descer” o conteúdo e remover bolhas;

Colocar a placa no termociclador:

Step	Temperature	Time
Reverse transcription	42°C	15 minutes
Stop reaction	85°C	5 minutes
Hold	4°C	Hold

## 5. Realizar a reação de amplificação do microRNA

Em um eppendorfe preparar a “miR-Amp reaction mix”:

Component	1 Rxn	4 Rxns <sup>[1]</sup>	10 Rxns <sup>[1]</sup>
2X miR-Amp Master Mix	25 µL	110 µL	275 µL
20X miR-Amp Primer Mix	2.5 µL	11 µL	27.5 µL
RNase-free water	17.5 µL	77 µL	192.5 µL
<b>Total miR-Amp Reaction Mix volume</b>	<b>45 µL</b>	<b>198 µL</b>	<b>495 µL</b>

<sup>[1]</sup> Volumes include 10% overage.

Passar o mix delicadamente no vórtex;

Centrifugar rapidamente (spin) para “descer” o conteúdo e remover bolhas;

Adicionar 45 µl do mix por poço em uma placa nova;

Adicionar 5 µl do produto “RT Reaction” em cada poço (totalizando nesse momento um volume 50 µl por poço);

Fechar a placa e passá-la no vórtex;

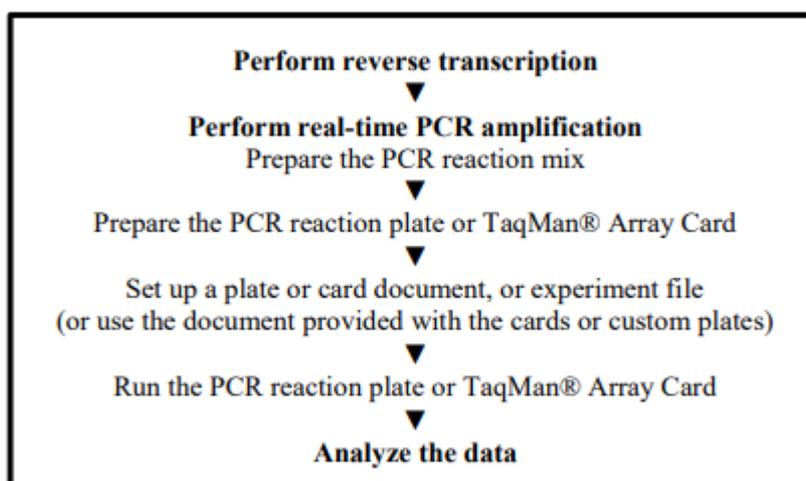
Centrifugar rapidamente (spin) para “descer” o conteúdo e remover bolhas;

Colocar a placa no termociclador:

Step	Temperature	Time	Cycles
Enzyme activation	95°C	5 minutes	1
Denature	95°C	3 seconds	14
Anneal/Extend	60°C	30 seconds	
Stop reaction	99°C	10 minutes	1
Hold	4°C	Hold	1

**Apêndice 3:** Protocolo simplificado do kit para RT-PCR, TaqMan Fast Advanced Master

Mix

**1. Executar o PCR**

Descongelar o Taq Man Fast Advanced Master Mix; Misturar completamente, mas de modo delicado;

**2. Preparar o mix para reação de PCR**

Preparar PCR reaction mix;

Preparar diluições de cDNA (5 µl do produto de reação do miR-Amp e 45 µl de 0.1X TE buffer);

Preparar o mix:

Component	Volume per reaction	
	384-well plate	96- or 48-well plates <sup>[1]</sup>
TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2X)	5.00 µL	10.00 µL
Nuclease-Free Water <sup>[2]</sup>	2.00 µL	4.00 µL
TaqMan® Advanced miRNA Assay (20X)	0.50 µL	1.00 µL
cDNA (1:10 dilution)	2.50 µL	5.00 µL
<b>Total volume per reaction</b>	<b>10.00 µL</b>	<b>20.00 µL</b>

<sup>[1]</sup> Standard and Fast.

<sup>[2]</sup> Adjust the volume of Nuclease-Free Water for a larger volume of cDNA.

Misturar o mix gentilmente (não inverter a garrafa);

Centrifugar para “levar a mistura” para o fundo do eppendorf;

### 3. Preparar a placa para reação de PCR

Transferir o volume apropriado do mix para cada um dos poços em uma placa de reação óptica (15 µl do PCR reaction mix);

Adicionar 5 µl do cDNA diluído em cada poço da placa para reação, totalizando nesse momento volume de 20 µl;

Fechar a placa com filme óptico adesivo;

Passar a placa num vórtex delicadamente;

Centrifugar brevemente; Aplicar na placa uma almofada de compressão (se necessário no sistema de RT-PCR utilizado);

### 4. Configurar um arquivo ou documento de placa

Configurar um arquivo ou documento de placa no software do RT-PCR usando as seguintes condições:

Real-time PCR system	Polymerase activation <sup>[1]</sup>	PCR (40 cycles)	
	Hold 95°C	Denature 95°C	Anneal / extend 60°C
<ul style="list-style-type: none"> <li>• QuantStudio™ 3 and 5 Real-Time PCR Instruments</li> <li>• QuantStudio™ 6 and 7 Flex Real-Time PCR System</li> <li>• QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System</li> <li>• 7900HT Real-Time PCR Instrument</li> <li>• 7900HT Fast Real-Time PCR Instrument</li> <li>• ViiA™ 7 Real-Time PCR System</li> <li>• StepOne™ Real-Time PCR System</li> <li>• StepOnePlus™ Real-Time PCR System</li> </ul>	20 seconds	1 second	20 seconds
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 7500 Fast Real-Time PCR System</li> <li>• 7500 Real-Time PCR System</li> </ul>	20 seconds	3 seconds	30 seconds

<sup>[1]</sup> To activate AmpliTaq™ Fast DNA Polymerase.

Selecionar o bloco apropriado (se essa opção for aplicável ao sistema de RT-PCR utilizado);

Selecionar o tipo de experimento (se essa opção for aplicável ao sistema de RT-PCR);

Selecionar Taq Man Reagentes para detectar a sequência alvo (se essa opção for aplicável ao sistema de RT-PCR);

Selecionar um modo de corrida:

Real-time PCR system	Run mode
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 7900HT Real-Time PCR Instrument</li> <li>• 7900HT Fast Real-Time PCR Instrument (384-Well and Standard 96-Well Block Modules)</li> <li>• 7500 Real-Time PCR System</li> </ul>	<b>Standard</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• QuantStudio™ 3 and 5 Real-Time PCR Instruments</li> <li>• QuantStudio™ 6 and 7 Flex Real-Time PCR System</li> <li>• QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System</li> <li>• ViiA™ 7 Real-Time PCR System</li> <li>• StepOne™ Real-Time PCR System</li> <li>• StepOnePlus™ Real-Time PCR System</li> <li>• 7900HT Fast Real-Time PCR Instrument (Fast 96-Well Block Module)</li> <li>• 7500 Fast Real-Time PCR System</li> </ul>	<b>Fast</b>

#### **Introduzir as amostras:**

- numa placa de 384 poços, volume de amostra de 10 µl;
- numa placa de 96 ou 48 poços, volume de amostra de 20 µl;

#### **5. Executar a reação na placa de PCR**

Abrir o documento criado referente ao arquivo que corresponde a placa analisada no software;

Carregar a placa de reação;

Começar a corrida;

#### **5. Análise dos dados**

Será realizado um teste de normalidade Shapiro-Wilk, teste T não alternativo, calculados usando GraphPad Prism5 e SPSS 20 e considerando o valor de p maior que 0.05 estatisticamente significativo.

## Apêndice 4: Folheto instrutivo sobre estimulação precoce.

### Desenvolvendo a Motricidade Ampla

- Coloque o seu bebê em diferentes posições para estimular que ele dê chutes, se espreguice e mova a cabeça.
- Organize espaços dentro de casa e/ou fora de casa nos quais seu filho(a) possa se mover amplamente.

### Desenvolvendo Habilidades Sociais-Emocionais

- Incline-se perto do seu bebê e fale sobre seus olhos brilhantes, suas bochechas redondas ou grande sorriso. Mantenha sua face animada e sua voz bem viva enquanto você se move vagarosamente da direita para a esquerda para chamar a atenção do seu bebê.
- Quando você estiver com o seu bebê em momentos tranquilos toque o seu bebê suavemente acariciando seus braços, pernas, barriga, costas, pés e mãos ajudando e enojando seu filho(a) a relaxar.
- Estimule o seu bebê a sorrir e gargalhar e fazer outras expressões faciais de prazer. Diga palavras animadas ou faça coisas engraçadas para que seu filho(a) responda com alegria.
- Comece imitando gestos e sons de seu filho(a) e pouco a pouco estimule que ele(a) imite suas expressões faciais, sons e movimentos.

### Desenvolvendo o Comportamento Adaptativo

- Deixe que seu filho(a) tente completar uma tarefa sozinho(a) assim que possível.
- Tente manter algumas regras em relação a higiene e organização.

#### Telefones para contato:

(53) 991237350 / (53) 21288246



Universidade Católica de Pelotas  
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento

### Informações para os cuidadores



Nome: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

## O que nós avaliamos em seu filho(a)?

Nós avaliamos o desenvolvimento Cognitivo, da Linguagem e Motor. No questionário que você completou, temos informações sobre o desenvolvimento Social-Emocional e o Comportamento.

**Avaliação Cognitiva** – olhamos como seu filho(a) pensa, reage, e aprende as coisas do mundo.

**Avaliação da Linguagem** – olhamos como seu filho(a) entende sons, palavras e comandos, bem como, como ele se comunica com gestos, sons e palavras.

**Avaliação da Motricidade fina** – olhamos como seu filho(a) usa as mãos e os dedos para fazer as coisas acontecerem.

**Avaliação da Motricidade ampla** – olhamos como e o quanto o seu filho(a) move o seu corpo.

## Algumas dicas de atividades para você e seu filho:

### Desenvolvendo Habilidades Cognitivas

#### Habilidades Cognitivas Prematuras

- Providencie brinquedos e objetos brilhantes, coloridos para o seu bebê olhar e tocar.
- Proporcione ao seu bebê experimentar ambientes diferentes levando-o para caminhadas e visitando lugares novos.
- Permita que seu bebê explore diferentes texturas e sensações (mantendo a segurança do seu bebê sempre em mente!)

### Desenvolvendo habilidades de linguagem

#### Do nascimento até os 2 anos

- Mantenha contato "olho no olho" e fale com o seu bebê utilizando jeitos e ênfases diferentes. Por exemplo, aumente o tom da sua voz para indicar uma pergunta.
- Limite a risada e as expressões faciais do seu bebê.
- Ensine o seu bebê a imitar as suas ações, incluindo bater palmas, atirar beijos, brincadeiras com os dedos e esconde-esconde (com paninho no rosto).
- Fale como você dá banho, alimenta e veste o seu bebê. Fale sobre o que você está fazendo, onde você está indo, o que vocês vão fazer quando você voltar e o que e quem vocês vão ver.
- Cante para o seu bebê, incluindo canções de ninar e músicas infantis com rimas.
- Identifique as cores.
- Conte coisas enquanto seu filho(a) assiste.
- Use gestos como abanar quando está dizendo tchau para ajudar a entender o sentido.
- Reconheça e elogie tentativas de se comunicar.
- Em palavras simples fale coisas para o seu bebê como: "A mamãe está aqui. A mamãe te ama. Onde está o bebê? Aqui está o bebê."
- Ensine seu bebê a fazer sons como "ma", "da", "bu" e "ba".
- Leia para o seu filho(a). Algumas vezes não é necessário ler o livro por inteiro mas descrever as figuras já é interessante. Escolha livros mais durinhos que tenha figuras grandes e coloridas, sem muitos detalhes.

#### Desenvolvendo a Motricidade Fina

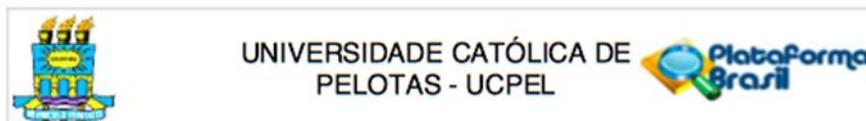
- Brinque de fantoche com os dedos.
- Use uma lanterna iluminando o teto. Deixe que a criança deite de costas e acompanhe o movimento da luz visualmente.

**Apêndice 5:** Orçamento para análise dos microRNAs.

<b>Produto</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Valor</b>
Kit miRvana Paris	3	7.794,00
cDNA Kit	3	5.459,00
Primers	6	6.000,00
TaqMan Fast Advanced Master Mix	1	6.325,67
Plásticos PCR	-	1.137,20
Material de bancada e coleta	-	1.500,00

## ANEXOS

## Anexo A: Carta de Aceite do Comitê de Ética em Pesquisa



Continuação do Parecer: 1.729.653

avaliadas após 60 da primeira intervenção com as gestantes e 90 dias após o parto. O questionário que será empregado está incluído na documentação do projeto presente na Plataforma Brasil;

2) Avaliar a satisfação e as atitudes das gestantes com relação a imagem corporal, especialmente no que diz respeito ao ganho de peso durante a gestação. Os dados serão coletados após 60 dias da primeira avaliação com as gestantes e 90 dias após o parto através de uma escala denominada "Escala de Atitudes em Relação ao Ganho de Peso na Gestação";

3) Avaliar o reflexo vermelho no fundo do olho dos bebês. Esta avaliação é decorrência direta da realização do "teste do olhinho", que é preconizado pelo Ministério da Saúde. O teste será realizado por estudantes de medicina devidamente treinados para esta finalidade, sob acompanhamento de médico da área;

4) Avaliar o desenvolvimento da morfologia fetal, a movimentação do concepto e avaliação do líquido amniótico através de ecografia obstétrica no segundo trimestre da gravidez. Este procedimento de rotina não agrega riscos a mãe e nem ao bebê, sendo inclusive oportuna sua realização sistemática.

**Objetivo da Pesquisa:**

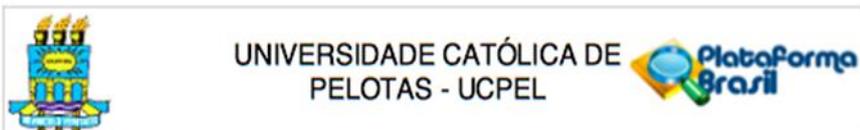
Avaliar a eficácia de intervenções terapêuticas para prevenir e tratar a depressão gestacional e do pós-parto, e concomitantemente identificar marcadores biológicos intimamente relacionados aos transtornos psiquiátricos, visando o desenvolvimento de um conjunto de testes que crie uma alternativa mais eficaz para a prevenção, diagnóstico e tratamento da depressão gestacional e pós-parto e da saúde da criança.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Não há riscos potenciais envolvidos tendo em vista a abordagem considerada quando da aplicação dos instrumentais previstos no projeto. Por sua vez, os benefícios são amplos, abrangendo a prevenção, diagnóstico e o tratamento da TDM de maneira mais abrangente, bem como a saúde do bebê. Todas as investigações estão acompanhadas dos respectivos procedimentos de orientação e o respectivo tratamento das pessoas envolvidas, quando necessário.

O adendo que está sendo avaliado objetiva a realização de quatro medidas que não estavam previstas no projeto. Nenhuma delas gera risco para mãe ou bebê, sendo duas delas

Endereço:	Rua Félix da Cunha, 412		
Bairro:	Centro	CEP:	96.010-000
UF:	RS	Município:	PELOTAS
Telefone:	(53)2128-8023	Fax:	(53)2128-8298
		E-mail:	cep@ucpel.tche.br



Continuação do Parecer: 1.729.653

rotineiramente preconizadas no acompanhamento pre e perinatal. O princípio da beneficência e fortalecido com a garantia de realização destas medidas preconizadas, as quais nem sempre efetivadas pelo SUS em tempo hábil.

O TCLE empregado no projeto faz parte da documentação fornecida e as quatro medidas incluídas já estão cobertas pelo caráter amplo do mesmo.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa se caracteriza por significativa relevância, tanto pela modernidade e importância das medidas previstas, como também pelo o objetivo de criar instrumentos mais eficazes para lidar com a TDM e a saúde do bebê.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os termos de apresentação obrigatória foram contemplados na documentação do projeto e estão de acordo com o recomendado.

**Recomendações:**

Não há recomendações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

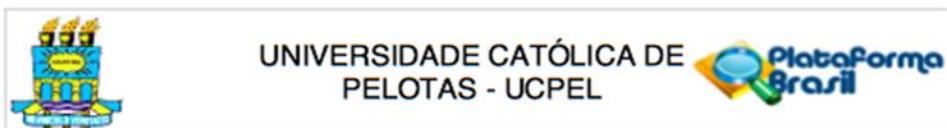
O projeto é atual, de grande significado social e com objetivos relevantes.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_784477 E1.pdf	30/08/2016 10:01:49		Aceito
Outros	Adendogates.pdf	30/08/2016 09:56:56	RICARDO TAVARES PINHEIRO	Aceito
Outros	cep_rtp_justificativa.pdf	31/07/2015 17:10:51		Aceito
Outros	MOTOR SCALE.pdf	30/07/2015 19:45:48		Aceito
Outros	MINI 500 Plus (1).pdf	30/07/2015 19:38:48		Aceito
Outros	Instrumento Gates MOCA.pdf	30/07/2015 19:34:51		Aceito
Outros	Instrumento GATES.pdf	30/07/2015 19:29:25		Aceito

Endereço: Rua Felix da Cunha, 412  
 Bairro: Centro CEP: 96.010-000  
 UF: RS Município: PELOTAS  
 Telefone: (53)2128-8023 Fax: (53)2128-8298 E-mail: oep@ucpel.tche.br



Continuação do Parecer: 1.729.653

Outros	declar serv psiquiatria.pdf	30/07/2015 09:35:34		Aceito
Outros	Carta_de_Apresentação_Ricardo_Pinheiro.pdf	30/07/2015 09:32:12		Aceito
Folha de Rosto	Comite_de_ética_Ricardo_Pinheiro (1).pdf	30/07/2015 09:31:04		Aceito
Outros	Professores e link do lattes.pdf	30/07/2015 09:30:08		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto Gattes CEP.pdf	29/07/2015 23:30:08		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE Gattes.pdf	29/07/2015 23:26:42		Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

PELOTAS, 15 de Setembro de 2016

---

Assinado por:  
Sandro Schreiber de Oliveira  
(Coordenador)

Endereço: Rua Felix da Cunha, 412  
Bairro: Centro CEP: 96.010-000  
UF: RS Município: PELOTAS  
Telefone: (53)2128-8023 Fax: (53)2128-8298 E-mail: oep@ucpel.tche.br

## Anexo B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para gestantes maiores de idade.



**UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PELOTAS  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA VIDA E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E COMPORTAMENTO  
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

### DADOS DE IDENTIFICAÇÃO:

**Pesquisador Responsável:** Ricardo Tavares Pinheiro

**Contatos:** E-mail: gravidezciudadabebesaudavel@gmail.com; Telefones: (53)2128-8246

**Você está sendo convidada a participar como voluntária e autorizar a participação de seu bebê, da pesquisa “Transtornos neuropsiquiátricos maternos no ciclo gravídico-puerperal: detecção e intervenção precoce e suas consequências na triade familiar”.**

### OBJETIVO E JUSTIFICATIVA

Avaliar a eficácia de intervenções terapêuticas para prevenir e tratar a depressão gestacional e do pós-parto, e identificar fatores que possam estar alterados no sangue e que se relacionem aos transtornos psiquiátricos. Dessa forma procura-se uma alternativa mais eficaz para a prevenção, diagnóstico e tratamento da depressão gestacional, pós-parto e do desenvolvimento da criança.

### PROCEDIMENTOS

Você será avaliada por testes psicológicos e será coletada pequena amostra de sangue da veia do seu braço no primeiro e segundo trimestre da gestação, assim como noventa dias após o nascimento do seu bebê. Nesta ocasião também será realizada avaliação sobre o desenvolvimento do seu bebê e coleta de pequena quantidade de saliva dele. Após as mulheres que apresentarem risco ou depressão serão divididas em dois grupos de psicoterapia.

### DESCONFORTOS, RISCOS E BENEFÍCIOS:

Será utilizado material totalmente descartável evitando riscos de contaminação e a coleta realizada por equipe treinada. Em caso de vermelhidão ou desconforto local, você pode entrar em contato a qualquer momento com o pessoal de nossa equipe.

A participação no estudo pode trazer riscos ao perceber que apresenta depressão gestacional e/ou pós-parto, assim como na coleta do sangue. Sobre saber que apresenta depressão ou risco para depressão, isso poderá lhe trazer o benefício de ser tratada pela equipe da pesquisa. O sangue e a saliva do bebê ficarão armazenados em freezer para análises clínicas posteriores.

### GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SEGREDO:

Você será esclarecida sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar e é livre para recusar sua participação ou de seu filho(a), assim como interromper a participação a qualquer momento. A participação é voluntária e a recusa em participar não lhe trará qualquer prejuízo. Os pesquisadores irão tratar a sua identidade em segredo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada com o responsável pela pesquisa e outra será fornecida a você.

### CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO E RESSARCIMENTO:

A participação no estudo não lhe trará despesas, mas também não haverá nenhum tipo de pagamento.

**Eu, \_\_\_\_\_, fui informada dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Declaro que concordo em participar deste estudo.**

**Declaro também aceitar que meu/minha filho(a) \_\_\_\_\_ participe da avaliação.**

Pelotas, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura Entrevistador(a) Assinatura da Participante

**Anexo C: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para gestantes menores de idade.**

**UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PELOTAS  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA VIDA E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E COMPORTAMENTO  
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO:**

**Pesquisador Responsável:** Ricardo Tavares Pinheiro

**Contatos:** E-mail: gravidezciudadabebesaudavel@gmail.com; Telefones: (53)2128-8246

Eu, \_\_\_\_\_, na condição de \_\_\_\_\_, autorizo \_\_\_\_\_, a participação como voluntária, assim como a de seu bebê, na pesquisa "Transtornos neuropsiquiátricos maternos no ciclo gravídico-puerperal: detecção e intervenção precoce e suas consequências na tríade familiar".

**OBJETIVO E JUSTIFICATIVA**

Avaliar a eficácia de intervenções terapêuticas para prevenir e tratar a depressão gestacional e do pós-parto, e identificar fatores que possam estar alterados no sangue e que se relacionem aos transtornos psiquiátricos. Dessa forma procura-se uma alternativa mais eficaz para a prevenção, diagnóstico e tratamento da depressão gestacional, pós-parto e do desenvolvimento da criança.

**PROCEDIMENTOS**

Você será avaliada por testes psicológicos e será coletada pequena amostra de sangue da veia do seu braço no primeiro e segundo trimestre da gestação, assim como noventa dias após o nascimento do seu bebê. Nesta ocasião também será realizada avaliação sobre o desenvolvimento do seu bebê e coleta de pequena quantidade de saliva dele. Após as mulheres que apresentarem risco ou depressão serão divididas em dois grupos de psicoterapia.

**DESCONFORTOS, RISCOS E BENEFÍCIOS:**

Será utilizado material totalmente descartável evitando riscos de contaminação e a coleta realizada por equipe treinada. Em caso de vermelhidão ou desconforto local, você pode entrar em contato a qualquer momento com o pessoal de nossa equipe.

A participação no estudo pode trazer riscos ao perceber que apresenta depressão gestacional e/ou pós-parto, assim como na coleta do sangue. Sobre saber que apresenta depressão ou risco para depressão, isso poderá lhe trazer o benefício de ser tratada pela equipe da pesquisa. O sangue e a saliva do bebê ficarão armazenados em freezer para análises clínicas posteriores.

**GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SEGREDO:**

Você será esclarecida sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar e é livre para recusar sua participação ou de seu filho(a), assim como interromper a participação a qualquer momento. A participação é voluntária e a recusa em participar não lhe trará qualquer prejuízo. Os pesquisadores irão tratar a sua identidade em segredo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada com o responsável pela pesquisa e outra será fornecida a você.

**CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO E RESSARCIMENTO:**

A participação no estudo não lhe trará despesas, mas também não haverá nenhum tipo de pagamento.

Eu, \_\_\_\_\_, fui informado(a) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Declaro que autorizo e concordo com a participação de \_\_\_\_\_, neste estudo, assim como seu/sua filho(a) \_\_\_\_\_ participem da avaliação.

Pelotas, \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 201\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura Entrevistador(a) Assinatura do Responsável