

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

BRENO PINHEIRO ROSSONI

**Avaliação do perfil sérico dos microRNAs 21, 126 e 181b em pacientes com
tromboangeíte obliterante**

Ribeirão Preto (SP)

2023

BRENO PINHEIRO ROSSONI

Avaliação do perfil sérico dos microRNAs 21, 126 e 181b em pacientes com tromboangiíte obliterante

Versão Original

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

Área de Concentração: Clínica Cirúrgica

Orientador: Edwaldo Edner Joviliano

Ribeirão Preto

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo, pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Rossoni, Breno Pinheiro

**Avaliação do perfil sérico dos microRNAs 21, 126 e 181b em
pacientes com tromboangeíte obliterante**

63p.: il.;

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor. Área de concentração: Clínica Cirúrgica.

Orientador: Prof. Dr. Edwaldo Edner Joviliano

1. Tromboangeíte Obliterante. 2. Doença de Buerger. 3. MicroRNA-21.
4. MicroRNA-126. 5. MicroRNA-181b.

Nome: ROSSONI, Breno Pinheiro

Título: Avaliação do perfil sérico dos microRNAs 21, 126 e 181b em pacientes com tromboangeíte obliterante.

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Dedicatória

À minha esposa, Juliana, e à minha filha, Marina, razões do meu esforço em me tornar uma pessoa melhor todos os dias.

Aos meus pais, Vívian e Aristides, que me permitiram o acesso às oportunidades e me incentivaram a alcançar meus objetivos.

À minha irmã, Brenda, que sempre me apoiou e comemorou ao meu lado.

Agradecimentos

A Deus, por me dar vida e saúde para trilhar meus caminhos.

À minha esposa Juliana, por todo amor, carinho, cuidado e atenção dedicados à nossa família. Sem isso, não conseguiria concluir esse objetivo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edwaldo Edner Joviliano, exemplo de médico, professor e ser humano que me traz inspiração para os desafios da vida.

Aos meus mestres que me ensinaram sobre Cirurgia Vasculare e Endovascular no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

À Prof. Daniela Pretti da Cunha Tirapelli - que tanto me auxiliou na execução do trabalho, na análise e interpretação dos resultados - agradeço a confiança e paciência com o meu aprendizado.

A todos os profissionais e alunos do Laboratório de Doenças Cardiovasculares e Função Endotelial do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP/USP, em especial ao Fermino Sanches Lizarte Neto, agradeço a paciência e ajuda nas dosagens e leituras das amostras.

A todos os profissionais do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, agradeço pela cessão do espaço para esta pesquisa, aquisição do material necessário e pelo apoio através do recurso humano no ambulatório, na coleta, no armazenamento das amostras, na realização dos exames de imagem.

À CAPES – o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código do financiamento 001.

E finalmente aos pacientes, que disponibilizaram seu tempo e confiaram sua saúde neste projeto.

RESUMO

ROSSONI, B. P. **Avaliação do perfil sérico dos microRNAs 21, 126 e 181b em pacientes com tromboangeíte obliterante.** Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Introdução: Diversos estudos demonstraram a participação de subprodutos da via do NF- κ B na tromboangeíte obliterante, contudo não se sabe sobre o envolvimento de microRNAs 21, 126 e 181b que são relacionados a essa via de ativação da doença.

Métodos: Analisamos a dosagem sérica dos miR-21, miR-126 e miR-181b em pacientes com TAO em dois momentos separados por 6 meses (grupos TAO-1 e TAO-2) e comparamos com três grupos controle saudáveis tabagistas (TAB), ex-tabagistas (EXTAB) e que nunca fumaram (NTAB).

Resultados: Três pacientes ativaram a doença entre os períodos TAO-1 e TAO-2, com elevação dos microRNAs estudados. Identificamos uma hiperexpressão do miR-21 em TAO-2 em relação a NTAB (IC 5,37-21,45; $p < 0,01$); EXTAB (IC 1,46-18,14; $p = 0,02$) e TAB (IC 0,97-16,13; $p = 0,03$). MiR-126 mostrou hiperexpressão em TAO-2 em relação a NTAB (IC 3,36-30,95. $p = 0,02$). MiR-181b mostrou hiperexpressão em relação a NTAB (IC 0,27-14,18. $p = 0,04$). Os grupos com histórico de tabagismo apresentaram médias maiores dos microRNAs estudados, porém sem diferença estatística.

Conclusão: Os níveis séricos dos microRNAs 21, 126 e 181b estão superexpressos em pacientes com TAO e parecem se correlacionar com períodos de maior atividade da doença, porém mais estudos com maior número de pacientes são necessários para validar eventual processo de utilização dos mesmos como marcadores de atividade da doença.

Palavras-Chave: Tromboangeíte Obliterante. Doença de Buerger. MicroRNA-21. MicroRNA-126. MicroRNA-181b.

ABSTRACT

ROSSONI, B. P. **Evaluation of the serum level of microRNAs 21, 126 e 181b in thromboangiitis obliterans patients.** Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Introduction: Several studies have demonstrated the participation of by-products of the NF- κ B pathway in thromboangiitis obliterans, however, the involvement of microRNAs 21, 126 and 181b that are related to this pathway in TAO activation is unknown.

Methods: We analyzed the serum levels of miR-21, miR-126 and miR-181b in TAO patients at two times separated by 6 months (TAO-1 and TAO-2 groups) and compared them with three healthy control groups with smokers (SC), former smokers (FSC) and never smokers (NSC).

Results: Three patients activated the disease between periods TAO-1 and TAO-2, with elevation of the studied microRNAs. We identified an overexpression of miR-21 in TAO-2 compared to NSC (CI 5.37-21.45; $p < 0.01$); FSC (CI 1.46-18.14; $p = 0.02$) and SC (CI 0.97-16.13; $p = 0.03$). MiR-126 showed overexpression in TAO-2 relative to NSC (CI 3.36-30.95. $p = 0.02$). MiR-181b showed overexpression relative to NSC (CI 0.27-14.18. $p = 0.04$). The groups with a history of smoking had higher means of the microRNAs studied, but without statistical difference.

Conclusion: Serum levels of microRNAs 21, 126 and 181b are upregulated in TAO patients and seem to correlate with periods of greater disease activity, but further studies with a larger number of patients are needed to validate an eventual process of using them as biomarkers of disease activity.

Keywords: Thromboangiitis Obliterans. Buerger Disease. MicroRNA-21. MicroRNA-126. MicroRNA-181b.

LISTA DE TABELA E QUADROS

Tabela 1. Descrição das variáveis de acordo com os grupos	29
Tabela 2. Descrição do miR-21 de acordo com os grupos	31
Tabela 3. Comparação das médias do miR-21 entre os grupos TAO e controles ...	33
Tabela 4. Evolução dos miR-21 em pacientes com ativação da TAO	33
Tabela 5. Descrição do miR-126 de acordo com os grupos	34
Tabela 6. Comparação das médias do miR-126 entre os grupos TAO e controles .	36
Tabela 7. Evolução dos miR-126 em pacientes com ativação da TAO	36
Tabela 8. Descrição do miR-181b de acordo com os grupos	37
Tabela 9. Comparação das médias do miR-181b entre os grupos TAO e controles	39
Tabela 10. Evolução dos miR-181b em pacientes com ativação da TAO	39
Tabela 11. Resultados das comparações entre os momentos de coleta do grupo TAO (TAO1 – TAO2)	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Taxa de incidência e distribuição mundial da TAO	8
Figura 2. Arteriografia de paciente com TAO	10
Figura 3. Oclusão arterial da Tromboangeíte Obliterante na fase aguda em corte transversal	11
Figura 4. Oclusão arterial da Tromboangeíte Obliterante na fase crônica em corte transversal	12
Figura 5. Cicatrização de úlcera isquêmica 3 meses após enxerto de células autólogas de lipoaspirado	14
Figura 6. Representação da via do NF-kB em um macrófago circulante após reconhecimento de lesões de membrana endotelial desencadeadas por aumento do estresse oxidativo ou do shear stress	17
Figura 7. Fluxograma do desenho de estudo, inclusão e exclusão de pacientes e controles	24
Figura 8. Ação dos miRNAs 21, 126, 181b na ativação do NF-kB em pacientes com TAO	43
Figura 9. Ação medicamentosa sobre microRNA-21	44

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Dosagens do miR-21 de acordo com os grupos	32
Gráfico 2. Dosagens do miR-126 de acordo com os grupos	35
Gráfico 3. Dosagens do miR-181b de acordo com os grupos	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAA – Aneurisma da Aorta Abdominal
AVC – Acidente Vascular Cerebral
BRA – Bloqueadores do Receptor de Angiotensina
Ct – Threshold Cycle
DAC – Doença Arterial Coronariana
DAOP – Doença arterial obstrutiva periférica
DAMPs – Receptores de Padrões Associados ao Dano Celular
DEPC – Dicarbonato de Dietila
DLP – Dislipidemia
DM – Diabetes Mellitus
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EUA – Estados Unidos da América
HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica
HCFMRP-USP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA – Sistema de Antígeno Leucocitário Humano
HMGB-1 – High mobility group Box-1
ICAM-1 – Molécula de adesão intercelular-1
IECA – Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina
IFN- γ – Interferon-gama
IgA – Imunoglobulina A
IgG – Imunoglobulina G
IgM – Imunoglobulina M
IL-1 – Interleucina 1
IL-12 – Interleucina 12
IL-2 – Interleucina 2
IL-33 – Interleucina 33
IL-6 – Interleucina 6

ITB – Índice Tornozelo-Braquial
MAPK – Proteínas quinases ativadas por mitógeno
MiR-21 – MicroRNA-21
MiR-126 – MicroRNA-126
MiR-181b – MicroRNA-181b
MMP – Matrix metalloproteinases
MMP-1 – Metaloproteinases de Matriz 1
MMP-9 – Metaloproteinases de Matriz 9
MyD88 – Fator de diferenciação Mielóide 88
NF-κB – Fator Nuclear Kappa B
NLRP3 – Domínio Pirina da Família NLR contendo 3
PAMPs – Receptores Associados a Padrões de Patógenos
PBS – Phosphate-Buffered Saline
PCR – Proteína C Reativa
PCR – Reação em Cadeia de Polimerase
PRRs – Receptores Associados a Padrões
RAGE – Receptores para Produtos Finais de Glicação Avançados
RNA – Ácido Ribonucleico
TAO – Tromboangeíte Obliterante
TIMP-3 – Inibidor de Metaloproteinase 3
TLR – Receptores Toll-Like
TLR-2 – Receptores toll-like 2
TLR-4 – Receptores toll-like 4
TNF-alfa - Fator de necrose tumoral-alfa
VCAM-1 – Vascular Cell Adhesion Molecule 1

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA	7
1.1. Tromboangeíte Obliterante	7
1.1.1. Patogênese da Tromboangeíte Obliterante	14
1.1.1.1. Resposta inflamatória exacerbada	15
1.1.1.2. Mecanismos auto-imunes	17
1.1.1.3. Influência Genética	18
1.2. MicroRNA	19
1.2.1. MicroRNA-21	20
1.2.2. MicroRNA-126	21
1.2.3. MicroRNA-181b	22
2. OBJETIVO	23
3. PACIENTES E MÉTODOS	23
3.1. Pacientes	23
3.2. Métodos	25
3.2.1. Seleção dos alvos	25
3.2.2. Extração de RNA	25
3.2.3. Síntese de DNA complementar (cDNA) para microRNAs	26
3.2.4. RQ-PCR dos microRNAs miR-21, miR-126 e miR-181b	26
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
5. RESULTADOS	28
5.1. MicroRNA 21	30
5.2. MicroRNA 126	34
5.3. MicroRNA 181b	37
6. DISCUSSÃO	40
6.1. Avaliação dos microRNAs	41
7. CONCLUSÃO	46
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
9. APÊNDICES	56
Termo de consentimento livre e esclarecido (Grupo estudo)	56
Termo de consentimento livre e esclarecido (Grupo controle)	59
	13

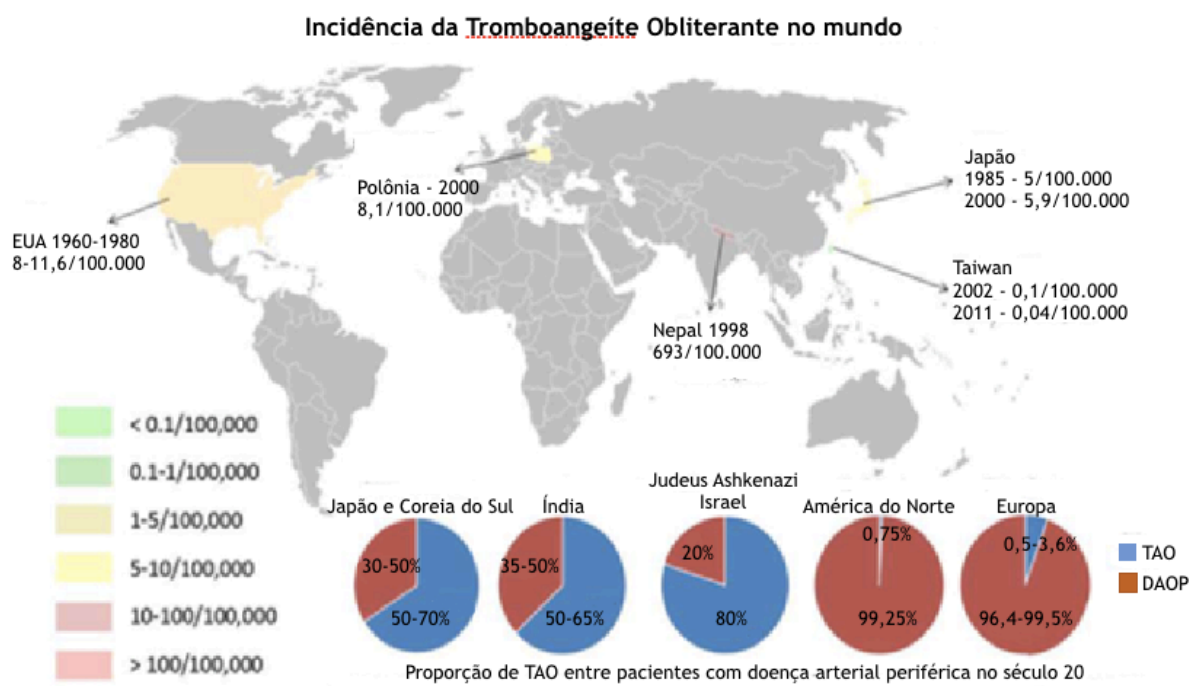
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA

1.1. Tromboangeíte Obliterante

A Tromboangeíte Obliterante (TAO), ou Doença de Buerger, é uma vasculite de pequenos e médios vasos, com acometimento preferencial dos territórios infrapoplíteos e infrabraquiais. Desenvolve-se mais comumente em homens com menos de 45 anos e sua prevalência é fortemente ligada ao tabagismo. Embora a primeira descrição detalhada da doença tenha sido realizada por Buerger em 1908, sua patogênese não é totalmente compreendida. Sabe-se que a doença se manifesta com inflamação não supurativa da parede vascular, com oclusões trombóticas, diferentemente da patogênese da aterosclerose e outras vasculites (SUN et al., 2017).

A prevalência mundial da TAO é estimada em 5-12 casos para 100.000 pessoas e sua distribuição varia de acordo com a região, sendo mais elevada na Ásia e no Leste Europeu (AKAR; DURDU, 2014). Alguns países apresentam incidência anual maior do que a média do restante do mundo, como o Nepal, onde em 1998 foram diagnosticados 693 casos para cada 100.000 habitantes (SUN et al., 2017).. Atualmente, a TAO está em declínio nos EUA, provavelmente em função da redução do consumo do tabaco.

Figura 1. Taxa de incidência e distribuição mundial da TAO



Fonte: SUN et al., 2017

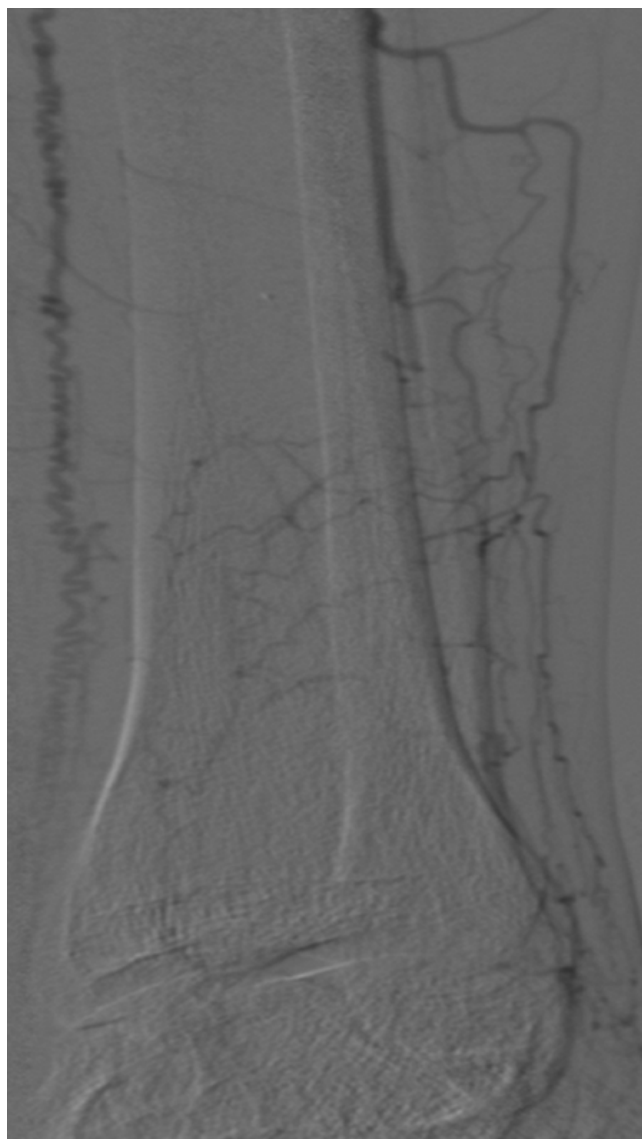
Nas primeiras séries de casos descritas, a TAO se manifestava quase que exclusivamente em homens, com cerca de 90-95% dos casos descritos em pacientes do sexo masculino. Mas há aumento da proporção de mulheres acometidas em estudos mais recentes, provavelmente decorrente do crescimento do tabagismo entre as pessoas desse gênero (KAUFFMAN; SITRÂNGULO JUNIOR, 2016).

Clinicamente, se manifesta com todo o espectro da isquemia de membros: desde claudicação não limitante, passando por claudicação limitante, dor em repouso até a formação de lesões tróficas. Em função do caráter progressivo da doença e do acometimento distal periférico que muitas vezes é de difícil revascularização, a doença cursa com altas taxas de amputação: 25% nos primeiros 5 anos após o diagnóstico, 38% após 10 anos e 46% após 20 anos (COOPER et al., 2004). Artralgias recorrentes de grandes articulações e até mesmo artrites podem aparecer como sinais prodrômicos anos antes do quadro isquêmico se desenvolver, assim como a tromboflebite migratória que chega a atingir 65% dos doentes (AKAR; DURDU, 2014; KAUFFMAN; SITRÂNGULO JUNIOR, 2016). Alterações vasculares funcionais, como o fenômeno de Raynaud, são descritas em 30-50% dos casos (HARTMANN; MOHOKUM; SCHLATTMANN, 2012).

Ainda não há critérios diagnósticos universalmente aceitos para a doença (AKAR; DURDU, 2014). Em 1983, Shionoya descreveu a TAO com base em 5 critérios: 1 - história de tabagismo, 2 - início dos sintomas antes dos 50 anos, 3 - oclusões arteriais infrapoplíteas, 4 - envolvimento do membro superior ou flebite migratória, 5 - ausência de outros fatores de risco para doença aterosclerótica além do tabagismo (SHIONOYA, 1983). Esses critérios são tradicionais, no entanto, nem todos os doentes os completam plenamente (KAUFFMAN; SITRÂNGULO JUNIOR, 2016).

As angiografias desses pacientes mostram características específicas, mas não patognomônicas. Lesões segmentares oclusivas com predominância infrapoplíteia, inclusive das artérias digitais, seguidas de redes de artérias colaterais espiraladas, descritas como em “saca-rolhas” ou sinal de Martorell, com artérias proximais sem doença ateroscleróticas, são achados comuns da TAO. Esse sinal é decorrente do desenvolvimento dos *vasa vasorum* e *vasa nervorum* (BAS et al., 2016). No entanto, outras vasculites podem apresentar achados semelhantes, como no Lupus Eritematoso Sistêmico, na Síndrome CREST e a vasculite reumatoide, por exemplo. A ultrassonografia Doppler auxilia na propedêutica, contudo também não é conclusiva para o diagnóstico.

Figura 2. Arteriografia de paciente com TAO.



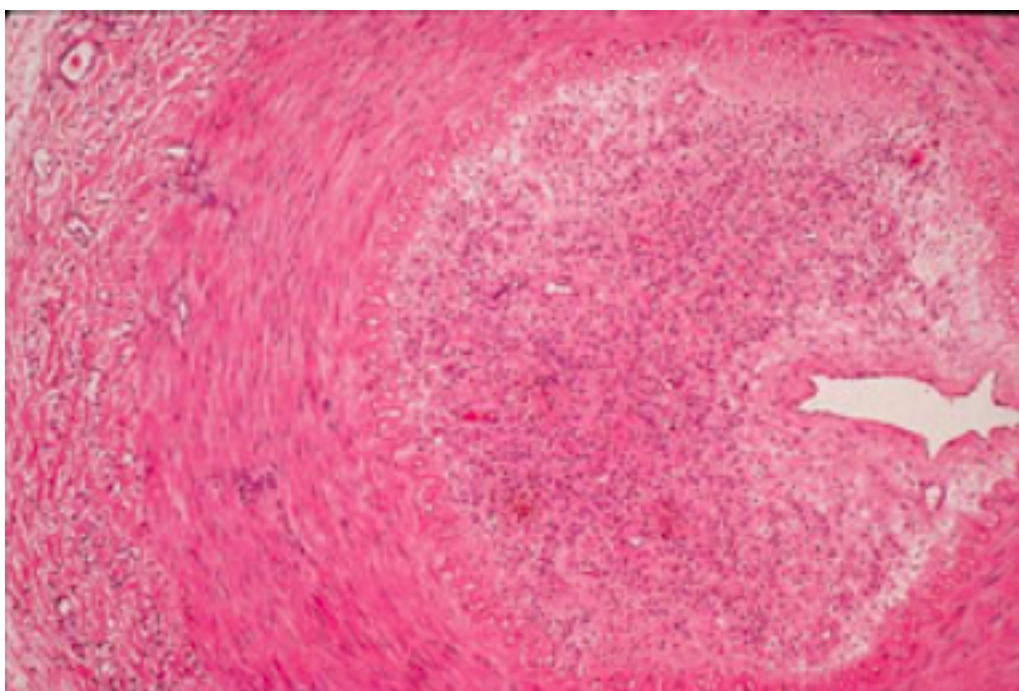
Observe o acometimento trombótico em artérias infrapoplíteas e as artérias espiraladas em “saca-rolhas” decorrentes do desenvolvimento dos *vasa nervorum* e *vasa vasorum*. Fonte: D'ALESSIO et al., 2019.

Os exames laboratoriais não apresentam resultados específicos na TAO. Marcadores inflamatórios como a proteína C reativa e a velocidade de hemossedimentação usualmente se apresentam normais ou discretamente aumentados e tampouco se correlacionam com a atividade da doença. Dellibera-Joviliano et al. (2012a) mostraram maior nível sérico de interleucinas 1-beta, 4, 17 e 23 (DELLALIBERA-JOVILIANO et al., 2012a), bem como das metaloproteinases 1 e

9 (DELLALIBERA-JOVILIANO et al., 2012b), todavia esses marcadores não são utilizados na prática clínica diária.

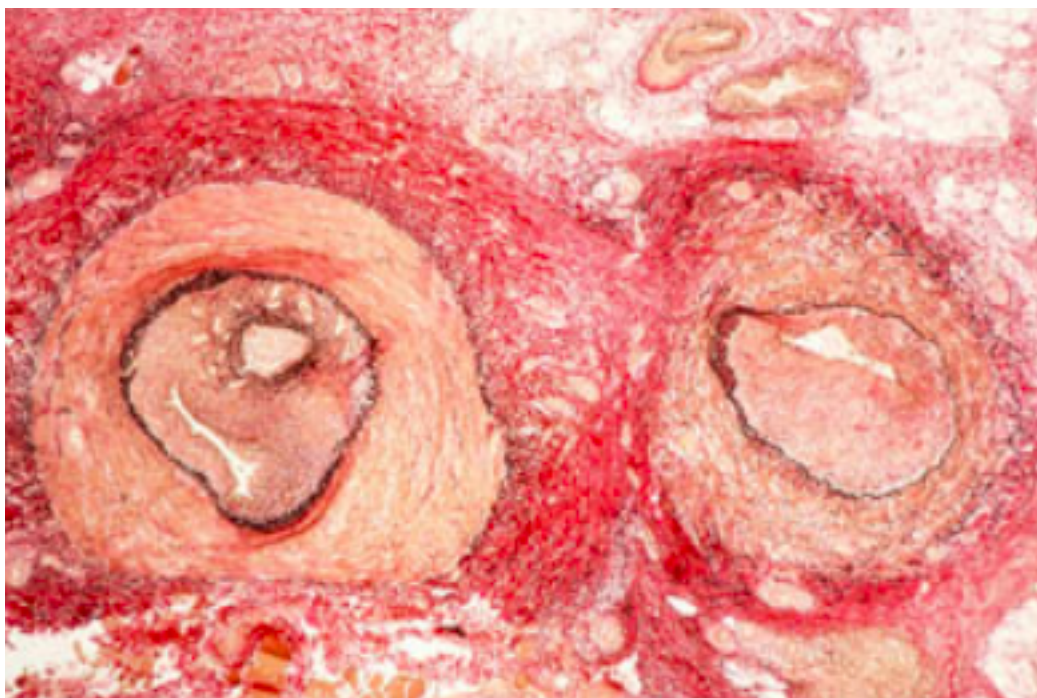
A biópsia confirma o diagnóstico, mas raramente é realizada. Diferentemente da aterosclerose e de outras vasculites, a lesão estrutural da parede vascular é precedida pela trombose. Na fase aguda, observam-se trombos inflamatórios ricos em neutrófilos, mononucleares e células gigantes multinucleares, além de um pobre e espaçado acometimento da parede vascular, com níveis normais de reagentes de fase aguda e ausência de marcadores imunológicos. A lâmina elástica é poupada. Na fase subaguda há organização do trombo e a arquitetura vascular permanece preservada. A inflamação, na fase crônica, não está presente e surge a fibrose vascular (KETHA; COOPER, 2013).

Figura 3. Oclusão arterial da Tromboangeíte Obliterante na fase aguda em corte transversal.



Observe o trombo intraluminal com grande celularidade, com presença de células gigantes, mononucleares e polimorfonucleares, sem inflamação ou destruição da camada média. Fonte: KETHA; COOPER, 2013

Figura 4. Oclusão arterial da Tromboangeíte Obliterante na fase crônica em corte transversal.



Observe a evolução da fibrose na adventícia e a manutenção estrutural da membrana elástica e da camada média. Fonte: KETHA; COOPER, 2013

A primeira medida a ser instituída no tratamento da TAO é a interrupção do tabagismo. Essa é a principal forma de minimizar a progressão da doença, e talvez a única a prevenir amputações a longo prazo, uma vez que não há terapia que seja especificamente voltada para o controle da inflamação. Procura-se, em paralelo, o controle da isquemia. Contudo, a revascularização nem sempre é simples de se realizar visto que o leito distal é progressivamente acometido pela inflamação e oclusão vascular e os resultados a longo prazo dependem da cessação do uso do tabaco.

As revascularizações de membros nem sempre são fáceis. Ainda assim Graziani et al. (2012), mostraram 100% de salvamento de membros e 84% de melhora clínica em 19 pacientes consecutivos de 2005 a 2010 classificados de Rutherford 3-5 durante seguimento por 23 meses com o tratamento endovascular (GRAZIANI et al., 2012). Uma recente meta-análise de 15 estudos, em sua maioria coortes retrospectivas, envolveu dados de 601 pacientes e mostrou patência primária para revascularizações endovasculares de 65,7% em 12 meses e 50,7% em 36 meses,

com 94,1% de salvamento de membros em 12 meses e 89,1% em 36 meses. Esses resultados devem ser vistos com parcimônia em função da qualidade dos estudos envolvidos na meta-análise (GALYFOS et al., 2022).

A simpatectomia lombar é uma opção para vasodilatação periférica do membro inferior e melhora da isquemia crítica, com cicatrização de feridas. Há apenas um estudo clínico prospectivo que compara essa terapia com o uso de análogos de prostaglandina. Concluiu-se que com o uso das prostaglandinas houve controle da dor e redução significativamente maior no tamanho de úlceras, porém o nível de evidência é baixo em função da perda de seguimento elevada (20% do grupo da simpatectomia), e falta de informação sobre tempo livre de amputações (BOZKURT et al., 2006; CACIONE et al., 2004).

Recentemente, foi publicado um caso de sucesso de cicatrização de uma ferida isquêmica em paciente com TAO utilizando a técnica de Coleman. Nessa técnica, faz-se infiltração anestésica local do tecido adiposo onde se realiza o lipoaspirado. O produto é levado à centrifugação por 3 minutos, com separação da fase aquosa da oleosa. Somente a fase aquosa, onde se encontram as células troncos derivadas dos estromas adiposo e vascular, é injetada próxima à região isquêmica. A técnica conseguiu gerar a cicatrização pós-amputação de gangrena do quinto pododáctilo em cerca de 90 dias, a despeito da impossibilidade de revascularização por ausência de leito distal, conforme apresentado nas figuras abaixo. O uso de enxertos celulares autólogos de frações derivadas do tecido adiposo, embora ainda careça de estudos, mostra-se como uma técnica muito promissora para diversos tratamentos de feridas complexas (D'ALESSIO et al., 2019).

Figura 5. Cicatrização de úlcera isquêmica 3 meses após enxerto de células autólogas de lipoaspirado



Fonte: D'ALESSIO et al., 2019

Infelizmente, o volume de estudos envolvendo pacientes com TAO é pequeno e poucas são as propostas de novos tratamentos. Ainda não foram realizadas pesquisas envolvendo imunobiológicos inibidores do TNF-alfa, como o infliximab, embora a ação dessa interleucina seja marcante nas fases ativas da doença. Estudos envolvendo mecanismos fisiopatológicos são fundamentais para a busca de novos métodos diagnósticos e novos alvos terapêuticos.

1.1.1. Patogênese da Tromboangeíte Obliterante

A correlação da TAO com o uso de tabaco é conhecida. O tabagismo é considerado não só um gatilho para início da doença, mas também se relaciona fortemente com o prognóstico. Pacientes que permanecem fumando apresentam maior risco de se submeter a amputações, enquanto a interrupção desse hábito reduz o risco (OHTA; ISHIOASHI; HOSAKA, 2004). Contudo, não se compreende completamente como fumar desencadeia a vasculite. Três fatores importantes na patogênese da doença são descritos abaixo: uma resposta inflamatória exacerbada após uma agressão endotelial pelo cigarro, mecanismos autoimunes, e influência genética. É necessário entendê-los como complementares na patogênese da TAO.

1.1.1.1. Resposta inflamatória exacerbada

A via do fator nuclear kappa B (NF- κ B) é composta por uma família de fatores induzíveis cujos alvos no DNA levam a transcrição de proteínas citoplasmáticas que atuam em diversos processos biológicos a depender da célula envolvida. Em macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e linfócitos, a ativação do NF- κ B é fundamental para a sinalização das respostas inflamatória e imune que culmina com liberação de interleucinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, e TNF-alfa, recrutamento e diferenciação de novas células de defesa. No endotélio, por outro lado, o a sinalização para estímulo do NF- κ B resulta em aumento de expressão de proteínas de membrana como ICAM-1, VCAM-1, metaloproteinases MMP-1 e MMP-9, e-selectina. Essa ativação acontece por duas vias principais: a canônica e a não-canônica.

A sinalização da via canônica se desenvolve principalmente por intermédio de receptores de citocinas como TNF-alfa, e receptores associados a padrões (PRRs) que atuam em macrófagos, células dendríticas ou neutrófilos. Tais PRRs, são divididos em duas grandes classes: a primeira, dos receptores associados a padrões de patógenos (PAMPs), tendo como principais exemplos os receptores Toll-Like (TLR) que reconhecem lipopolissacarídeos específicos das membranas celulares de bactérias gram negativas, bem como receptores NOD-like (NLRP3), RIG-I-like, dentre outros. A segunda, dos receptores que reconhecem padrões associados ao dano celular (DAMPs), como os receptores para produtos finais de glicação avançados (RAGE) que identificam a proteína nuclear HMGB-1 para ativar o NF- κ B (YANG et al., 2005)

Essa via atua, portanto, de maneira intensa na imunidade inata, bem como desencadeia a imunidade adaptativa com ativação e diferenciação de linfócitos T com participação da IL-33.

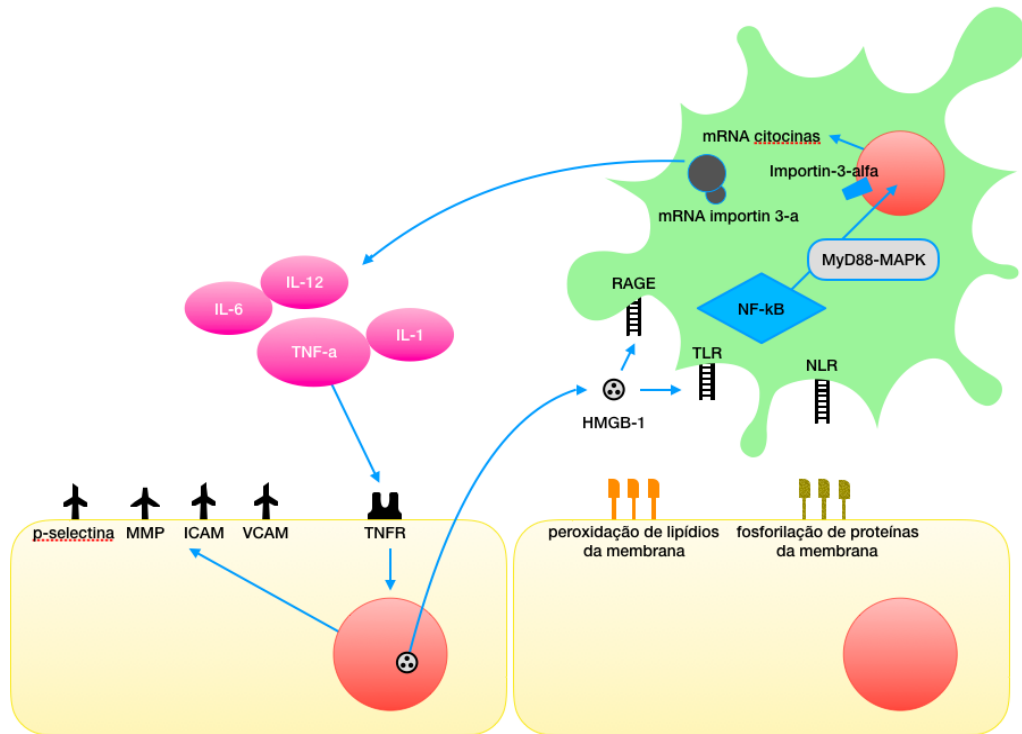
A via não-canônica, por outro lado, responde a estímulos específicos que atuam de forma suplementar à imunidade inata, bem como na regulação da imunidade adaptativa por meio da sinalização de diferenciação e expressão de receptores específicos na membrana dos linfócitos T. (LIU et al., 2017)

A lesão endotelial parece ser o primeiro passo de uma cascata que desencadeia a trombose arterial (KETHA; COOPER, 2013) e dois mecanismos moleculares inflamatórios ligados ao NF- κ B são propostos (SUN et al., 2017).

Acredita-se que radicais livres provenientes da fumaça do cigarro aumentam estresse oxidativo e liberação de óxido nítrico que reage com o ânion superóxido, levando à peroxidação de lipídios de membrana. A lesão da membrana celular endotelial recém-instalada é reconhecida por receptores DAMPs, inicia o processo de sinalização do NF- κ B via MyD88-MAPK e ativa a imunidade inata, com liberação de IL-1, IL-6, IL-12, e TNF-alfa, por macrófagos, células dendríticas e neutrófilos. Há aumento da expressão de proteínas de adesão da membrana endotelial como VCAM-1, ICAM-1 e metaloproteinases MMP-1 e MMP-9. Essa via de resposta inflamatória é demonstrada na figura 6. (MORRIS et al., 2020)

Em um mecanismo semelhante, sugere-se que alterações hemodinâmicas associadas aos vasoespasmos decorrentes do tabagismo causam aumento do estresse da membrana das células endoteliais com fosforilação de proteínas de membrana reconhecida por receptores RAGE ou por reconhecimento via HMGB-1 e consequente ativação da via NF- κ B. (LIU et al., 2018). Há liberação de IL-1, IL-6, IL-12, TNF-a, levando à disfunção endotelial, com expressão de ICAM, VCAM, MMP, p-selectina e que precipita eventos trombóticos na TAO.

Figura 6. Representação da via do NF- κ B em um macrófago circulante após reconhecimento de lesões de membrana endotelial desencadeadas por aumento do estresse oxidativo ou do shear stress.



Fonte: LIU et al., 2018

1.1.1.2. Mecanismos auto-imunes

Há mais de 40 anos a hipótese de autoimunidade na TAO é defendida desde o estudo de Gulati et al. (1982), que mostraram autoanticorpos (várias classes de imunoglobulinas IgM, IgG e IgA) e depósitos de C3 na parede vascular de 10 pacientes acometidos pela doença (GULATI et al., 1982). Diversos estudos mostraram a infiltração da parede vascular por linfócitos T nas fases iniciais da doença. Linfócitos CD4 e CD8 infiltram a camada basal e macrófagos estão presentes nos trombos e na íntima. Níveis séricos de anticorpos contra *Rickettsias* e *Porphyromonas gingivalis*, de autoanticorpos como anti-elastina, anticorpos contra colágeno do tipo I e III e outros anticorpos direcionados à parede arterial também estão aumentados. Ou seja, tanto a via humoral quanto celular parecem estar envolvidas na patogênese da TAO (KETHA; COOPER, 2013).

Em uma pesquisa recente, foi demonstrado aumento sérico do nível de receptores TLR-2 e TLR-4, bem como de neopterin, um subproduto do metabolismo do interferon-gama (IFN- γ) em macrófagos, monócitos e células endoteliais e, portanto, fortemente correlacionada com a ativação da imunidade adaptativa. O autor sugere que a participação de bactérias intracelulares pode ser fundamental no desenvolvimento da TAO. Essa hipótese se correlaciona com a proposição de bactérias da cavidade oral, possivelmente em situações de baixa higiene em tabagistas, podem desencadear a doença (MOHARERI et al., 2018; PINGLE et al., 2008)

No entanto, todos esses marcadores também se correlacionam com a ativação do NF- κ B e, por isso, ainda há questionamentos sobre a relação causa-efeito desses achados. Da mesma forma, ainda não sabemos porque a TAO não se desenvolve em pessoas com exposição aos patógenos estudados, mesmo em situações de higiene oral inadequadas, mas não fumam.

Assim, seja por ações de radicais livres de oxigênio, seja por efeito hemodinâmico, ou ainda por ativação por mecanismos autoimunes, a lesão endotelial inicial parece ativar o NF- κ B que leva à expressão de moléculas de adesão como a VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina. Há liberação de TNF- α e por consequência quimiotaxia de leucócitos (HALACHEVA et al., 2002) associada a citocinas inflamatórias como as interleucinas IL-1, IL-4, IL-17, IL-23 (DELLALIBERA-JOVILIANO et al., 2012a).

1.1.1.3. Influência Genética

A distribuição epidemiológica irregular pode ser explicada por uma maior susceptibilidade à doença decorrente de influências genéticas. Países asiáticos como a Índia, Japão, Israel e especialmente o Nepal apresentam prevalência da doença maior do que os países ocidentais. Essa discrepância pode estar associada ao complexo de histocompatibilidade principal. É o que propõem McLoughlin et al. (1976) quando mostram aumento da prevalência da doença nos HLA A-9 e HLA B-5, e Otawa et al. (1974) com aumento nos HLA A, HLA BW, além da ausência da doença nos japoneses estudados com HLA A-12 (MCLOUGHLIN et al. 1976; OTAWA et al., 1974). Em Israel, maior frequência da doença associada ao HLA DR4 e menor

associada ao HLA DRW6 foi descrita (PAPA et al., 1992). Um estudo japonês identificou que um polimorfismo de um nucleotídeo (SNP) da região 3' não codificante (UTR) do gene MyD88 se associou fortemente com o desenvolvimento da TAO em tabagistas (CHEN et al., 2011). Essa via atua na sinalização TLR-NF-kB no desenvolvimento da doença. Outro estudo com a população chinesa identificou três SNPs associados ao gene da IL-17 com forte correlação com a TAO (SHI et al., 2016).

Assim, acredita-se, atualmente, que o desenvolvimento da TAO passa pela suscetibilidade genética de pessoas expostas ao tabagismo e, possivelmente, a infecções crônicas da cavidade oral, com uma resposta inflamatória/imune exacerbada ainda a ser definitivamente elucidada. Dentre diversos reguladores estudados recentemente, os MicroRNAs surgiram como importantes mediadores da transcrição proteica e, por consequência, da expressão gênica, fortemente relacionados à inflamação vascular e à aterosclerose, mas até então sem estudos específicos relacionados a TAO.

1.2. MicroRNA

Cerca de 80% do DNA humano é transcrito, porém apenas 1-2% do RNA gerado é traduzido em proteínas. Durante muito tempo, acreditou-se que os non-coding RNAs (ncRNA) não tinham função e que eram apenas artefatos de transcrição ou resquícios da evolução. No entanto, novos trabalhos indicaram que os ncRNAs participam ativamente da regulação da tradução proteica, sinalização para degradação do RNA mensageiro (mRNA) e conseqüentemente na expressão gênica (CARNINCI et al., 2005; CHENG et al., 2005; DERRIEN et al., 2012; DJEBALI et al., 2012).

Diversas classes de ncRNAs são descritas, cada uma com funções regulatórias sob estudo, sejam pequenos RNAs nucleares e nucleolares, Y-RNAs, além dos microRNAs (miRNA) que são os mais estudados. Tratam-se de pequenas seqüências de 19-22 nucleotídeos, ncRNAs funcionais e muito conservados que surgiram como reguladores pós-transcrição e atuam na estabilização da tradução do mRNA correspondente (WAHLESTEDT, 2013; RINN; CHANG, 2012; KLOOSTERMAN; PLASTERK, 2006). Logo, os miRNAs surgiram como alvos terapêuticos na regulação da tradução de proteínas diretamente ligadas a doenças, como as cardiovasculares,

neoplasias, AIDS, ou fatores de risco cardiovasculares como tabagismo, hipercolesterolemia, envelhecimento vascular, dentre outros (MAEGDEFESSEL, 2014).

1.2.1. MicroRNA-21

Por ser encontrado em hiperexpressão em diversas neoplasias, o miRNA-21 se tornou alvo de muitos estudos. Foi associado a angiogênese no desenvolvimento tumoral (ZHAO et al., 2013), apoptose (LAN et al., 2015), necrose (MA et al., 2015) e um dos principais motivos da escolha para esse trabalho: a nicotina promoveu aumento da dosagem sérica do miRNA-21 como um importante mecanismo no desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Em um estudo da Universidade de Stanford, modelos murinos de desenvolvimento aneurismáticos com infusão de elastase pancreática e angiotensina II mostraram que o aumento da expressão do miRNA-21 está associado a redução da apoptose das células musculares lisas da parede vascular e proteção contra o desenvolvimento do aneurisma da aorta abdominal (AAA), ao passo que a injeção sistêmica de um antagonista do miRNA-21 levou ao aumento do tamanho dos AAA (MAEGDEFESSEL et al., 2012). Nesse estudo, a suplementação de nicotina gerou aumento da expressão do miRNA-21 também nas células endoteliais. Foi descrito, também, a ação da IL-6 com aumento da expressão do miRNA-21 nas células do experimento. Conclui-se que a modulação da expressão do miRNA-21 é um alvo potencial no tratamento dos AAA (MAEGDEFESSEL et al., 2012).

Outro estudo realizado com culturas de células de câncer gástrico mostrou que a nicotina promove aumento da expressão do miRNA-21 e confirmou que NF-kB é um alvo direto deste microRNA (SHIN et al., 2011).

Hu et al. (2016) estudaram a angiogênese em células umbilicais humanas. Houve aumento do miRNA-21 após 4 horas de privação de glicose e oxigênio e retorno aos níveis basais após 24h de descanso. Houve também aumento da expressão das MMP-2 e MMP-9 associadas a exposição de um mimetizador do miRNA-21 e redução associada ao antagonista do mesmo miRNA por meio da ação na TIMP-3. Concluiu-se nesse modelo de isquemia e reperfusão que o miRNA-21 tem

uma ação protetora e promotora da angiogênese com ação direta nas MMP-2 e MMP-9 via TIMP-3 (HU et al. 2016).

Em um recente experimento com macrófagos murinos estimulados por LPS, foi observado aumento do miR-21 e consequente aumento do mRNA de TNF-alfa, IL-1 e IL-6. Nas mesmas células estimuladas, foi administrado um inibidor do miR-21 que resultou em uma redução das citocinas descritas. A conclusão foi que o miR-21 atua diretamente na via do NF-kB com liberação de IL-1, IL-6 e TNF-alfa. Essa via é fundamental no desenvolvimento da TAO. (ZHAO et al., 2021)

Por fim, as respostas inflamatórias reguladas pelo miR-21 em diversos modelos de estudo observadas em modelos experimentais ou em investigação de outras doenças, também se encontram ativadas em pacientes com TAO. É evidente que a via canônica do NF-kB, seja por ativação de receptores PAMPs como TLR-4 ou NLRP3 via MyD88-MAPK ou ainda por ativação de receptores DAMPs como RAGE via HMGB-1, desencadeia a produção de interleucinas inflamatórias descritas na patogênese da TAO, a saber, IL-1, IL-6, IL-12, IL-33, TNF-alfa, bem como expressão de proteínas de membrana VCAM-1, ICAM-1, MMP-1, MMP-9, e-selectina. Essa correlação nos fez considerar a hipótese que o miR-21 atua diretamente na atividade inflamatória da TAO e motivou a escolha desse alvo para estudo (OLIVIERI et al., 2021).

1.2.2. MicroRNA-126

Fortemente relacionado a processos inflamatórios e à angiogênese, o miR-126 é restrito ao endotélio. Deleções deste microRNA em ratos levaram à morte do embrião associada a sangramento e desenvolvimento vascular inadequado (WANG et al., 2008).

Em ratos com deleção do gene ApoE, que são utilizados como modelos de diabéticos, bem como em células humanas do endotélio da veia umbilical (HUVECs) o miRNA-126 foi associado à regulação pós-transcrição da HMGB-1 em condições hiperglicêmicas, mas não em situações de glicemia normal. Isto é, o aumento da expressão do miR-126 se correlaciona com a redução do mRNA da HMGB-1 transcrito, bem como dos produtos subseqüentes dessa via, como o TNF-alfa e marcadores da ativação do NF-kB (TANG et al, 2017). Da mesma forma o aumento

do miRNA-126 nas células endoteliais levou a uma redução da expressão da proteína de membrana VCAM-1 (HARRIS et al., 2008), relacionada a adesão de leucócitos em células estimuladas pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e também em hiperexpressão na TAO (HALACHEVA et al., 2002). A avaliação do miR-126 como alvo desse estudo foi proposta, portanto, em função da ação anti-inflamatória descrita em vias ativadas na TAO.

1.2.3. MicroRNA-181b

Em estudo de 2015, o miRNA-181b foi descrito como potencial anti-inflamatório na cascata ligada à aterosclerose. Em modelo com células endoteliais e células musculares lisas sintéticas foi demonstrado que alterações na força de cisalhamento do fluxo vascular promovem a secreção de citocinas inflamatórias (IL-1 e IL-6) e conseqüentemente do NF-kB. Células endoteliais expostas a tais alterações de fluxo aumentam sua produção de miRNA-181b com efeitos ateroprotetores (CHIU et al., 2007; CHIU et al., 2011). Anos posteriores, Ma et al. (2016) confirmaram a ação anti-inflamatória e ateroprotetora desse microRNA por meio da ação sobre o TNF- α inibindo o NF-kB por regulação negativa da importin-3-alfa, uma proteína fundamental na translocação do NF-kB do citoplasma para o núcleo. Esse estudo mostrou a redução da expressão da E-selectina em células endoteliais, redução do tamanho da placa aterosclerótica, redução da infiltração por macrófagos e aumento da deposição de colágeno após a distribuição direta de miRNA-181b por nanopartículas às células endoteliais (MA et al., 2016). Essa via da inflamação encontra-se ativa na TAO como descrito previamente, logo, o miRNA-181b pode também ter ações anti-inflamatórias na TAO.

Diante do exposto, percebe-se que o estudo mais detalhado da patogênese da TAO é fundamental para o melhor entendimento da doença, com a proposição de critérios diagnósticos mais precisos, bem como desenvolvimento de novas opções terapêuticas. Como a TAO apresenta características inflamatórias, imunomediadas, com influência genética, informações sobre os MicroRNAs associados à doença podem ser valiosas. Este trabalho busca contribuir para o esclarecimento dessa lacuna na fisiopatologia da TAO.

2. OBJETIVO

Avaliar expressão sérica dos microRNAs miR-21, miR-126 e miR-181b em pacientes com Tromboangeíte Obliterante em dois momentos intercalados por 6 meses e compará-las com as dosagens do grupo controle de indivíduos saudáveis tabagistas, ex-tabagistas e não tabagistas.

Correlacionar a expressão dos microRNAs miR-21, miR-126 e miR-181b com a atividade clínica da doença nos indivíduos com Tromboangeíte Obliterante.

3. PACIENTES E MÉTODOS

3.1. Pacientes

Identificamos 79 pacientes do Ambulatório de Cirurgia Vascular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) por busca ativa nos registros de prontuários pelo CID I-73.1 (Doença de Buerger). Em revisão de informações do prontuário, 64 pacientes preenchem 4 ou 5 critérios de Shionoiya descritos no item 2.1, em fase ativa ou inativa da doença. As informações foram confirmadas por contato telefônico e os pacientes foram convidados a participar do estudo. Desses, 20 compareceram, concordaram em participar e assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (Anexo 1) e foram submetidos a coletas de 20 ml de sangue periférico para análise.

Foram realizadas dosagens plasmáticas dos miRNA-21, miRNA-126 e miRNA-181b em dois momentos separados por seis meses de intervalo ao longo do ano de 2018 e 2019. Dois pacientes foram excluídos após a aplicação do TCLE por identificação de fatores de confusão. O primeiro por infecção por HIV e uso de terapia retroviral identificado durante entrevista pré-coleta. O segundo, por falecimento decorrente de carcinoma espinocelular de orofaringe e falecimento ao longo do intervalo entre a primeira e segunda coletas.

Como grupo controle foram selecionadas 29 pessoas (independente do grupo étnico, idade e sexo) não portadores de TAO, tabagistas ativos, ex-tabagistas e não tabagistas. No grupo controle, foram incluídos indivíduos que não apresentem

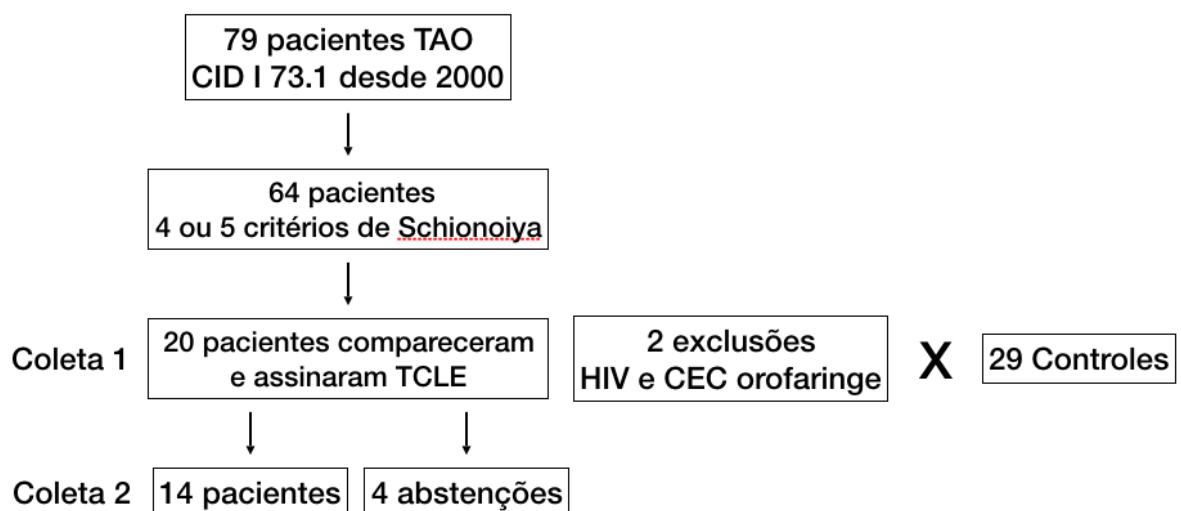
claudicação intermitente, e que apresentem índice tornozelo-braquial (ITB) maior que 0,9.

Critério de inclusão: Foram incluídos no presente estudo pacientes atendidos no Ambulatório de Cirurgia Vascular e Endovascular HCFMRP-USP que autorizarem o termo de consentimento livre esclarecido e que apresentavam 4 ou 5 critérios de Shionoya, conforme descrito no item 2.1, com ou sem arteriografia compatível com os achados descritos nesse mesmo item para TAO.

Critérios de exclusão: Pacientes com doenças subjacentes como outras vasculites, doença arterial obstrutiva periférica ou doença aterosclerótica oclusiva em outros territórios), HIV, neoplasias ou doenças que podem servir de fator de confusão por conhecida atividade dos alvos nas suas patogêneses. Não foram aceitos no grupo controle pacientes com ITB menor que 0,9.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP (CAAE 86060218.7.0000.5440).

Figura 7. Fluxograma do desenho de estudo, inclusão e exclusão de pacientes e controles



3.2. Métodos

Todos os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP/USP. Para análise da expressão dos miRNAs miR-21, miR-126 e miR-181b foram realizadas as seguintes etapas: extração de RNA, síntese de cDNA e RQ-PCR.

3.2.1. Seleção dos alvos

Os alvos foram selecionados com base na literatura descrita e em ferramentas de bioinformática que descrevem associação com as vias propostas e com base nos dados clínicos descritos na introdução deste trabalho.

Neste estudo foi obtido um panorama da expressão dos miRNAs, associados a vias moleculares de NF-kB, IL-1, IL-6, TNF-alfa, VCAM-1, p-selectina, Os miRNAs selecionados foram analisados pela ferramenta MirPath V.3, disponível online no Diana Tools (VLACHOS et al., 2015). Esta ferramenta identifica as vias de sinalização da base de dados KEGG (KEGG PATHWAY, 2022) que potencialmente são reguladas pela expressão dos miRNAs. Assim, foram selecionados 3 microRNAs: miR-21; miR-126; miR-181b. Os alvos foram confirmados baseado no banco de dados do miRTPath V3.0 (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/download.php>).

3.2.2. Extração de RNA

As amostras de sangue foram coletadas em tubos EDTA em quantidade aproximada de 4 mL e posteriormente centrifugadas por 15 minutos a 3000 rpm. O precipitado (hemácias e *buffy coat*) foi transferido para tubo falcon estéril e livre de RNase de 50 mL e a esse foi acrescentado 20 mL de tampão para lise de glóbulos vermelhos. Após manter 15 min em gelo, centrifugou-se novamente por 10 min a 3000 rpm. O sobrenadante foi descartado, obtendo-se o *pellet* que foi ressuscitado em 250 mL de PBS (*phosphate-buffered saline*) e 750 mL de Trizol (*Invitrogen*, EUA) e transferido para um tubo *ependorf* de 1,5 mL.

Foi acrescentado 200µl de clorofórmio, agitando-se vigorosamente por 15 segundos. A solução final foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm e a fase aquosa (superior) de cada *ependorf* foi transferida para novos tubos. O RNA foi precipitado com 500µl de álcool isopropílico 100% e permaneceu a -80°C por pelo menos 12 horas.

Após esse período, a amostra foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm, desprezando-se o sobrenadante a seguir. Foi acrescentado 1000µl de etanol 70% seguido de centrifugação refrigerada por 15 minutos a 14.000 rpm, novamente desprezando-se o sobrenadante. O *pellet* foi seco por inversão e permanência em temperatura ambiente por alguns minutos. A seguir a amostra foi ressuspensa com água tratada com DEPC com volume final de 15 mL. Esse material foi, em seguida, aliquoteado, identificado e armazenado a - 80°C.

Para a verificação da integridade do RNA obtido, as amostras foram analisadas em *Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies)* com RNA 6000 Pico chip. Também utilizamos um equipamento *Thermo Scientific NanoDrop 2000*, um espectrofotômetro que fornece a concentração de RNA em uma amostra de 1 a 2µl. Além da concentração, este aparelho nos fornece valores de razão referentes à pureza das amostras (razão 260/280).

3.2.3. Síntese de DNA complementar (cDNA) para microRNAs

Realizamos a transcrição reversa utilizando o kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems)*. Para a síntese do cDNA do miRNA para cada 5ng de RNA, foi adicionado 0,75µl de *RT Buffer*, 0,075µl de dNTP's, 1,5µl de Primers específicos (miRNA ou controle endógeno) e 0,5µl da enzima *MultiScribe™*, 0,094µl de RNase out (1.9U), completando com água DEPC para um volume final de 7,5µl. As amostras foram levadas para um termociclador por 30 min a 16°C, 30 min a 42°C, 5 min a 85°C e resfriadas a 4°C, posteriormente as amostras foram armazenadas em freezer -20°C. Antes de utilizar o cDNA sintetizado na reação de PCR em tempo real, foi diluído 1:4 em água DEPC.

3.2.4. RQ-PCR dos microRNAs miR-21, miR-126 e miR-181b

O método de PCR em tempo real foi utilizado para a análise quantitativa da expressão dos microRNAs, utilizamos os sistemas disponíveis comercialmente *TaqMan Assay-on-demand*, compostos por oligonucleotídeos e sondas (*Applied Biosystems*).

Considerando-se as diferenças causadas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, os valores de *Threshold cycle* (Ct) determinados para as diferentes amostras, foram normalizados. O Ct determinado para uma amostra (para um determinado miRNA) foi subtraído do Ct determinado para um *house-keeping* (neste caso o U6) na mesma amostra, originando o chamado Δ Ct. Assim, o número de ciclos que separa o Δ Ct de uma amostra do Δ Ct do calibrador, neste caso foi utilizada a média das amostras do grupo controle, tendo como resultado $\Delta\Delta$ Ct. Esta diferença, em termos de nível de expressão gênica relativa, é obtida de forma aproximada, aplicando a fórmula $2^{-\Delta\Delta C}$

As reações de amplificação por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) quantitativo em tempo real (RQ-PCR) foram realizadas em duplicata numa placa de 96 poços, utilizando o reagente *Taqman Master Mix* (*Applied Biosystems*, EUA). A reação teve um volume final de 10 μ l, utilizando 5 μ l do reagente específico *Taqman Master Mix*, 0,5 μ l de cada sonda específica e 4,5 μ l de cDNA diluído. Um aparelho de detecção de PCR em tempo real *7500 Fast Real Time PCR System* (*Applied Biosystems*) foi utilizado juntamente com o *software 7500 Sequence Detection System* (*Applied Biosystems*) para a obtenção dos valores de Ct.

As condições padrão de amplificação serão 95°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (anelamento e extensão simultânea). Os dados foram então exportados para planilhas do *software Excel* para cálculo dos valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$. Estabelecemos um *threshold* de 0,1 para o endógeno e também para os miRs estudados e o desvio entre as amostras considerado foi um valor de até 0,5.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente foi realizada uma análise exploratória dos dados. Para se compararem as médias dos grupos controle e TAO, foi ajustado um modelo de regressão linear. Para se compararem as médias dos dois momentos de coleta do

grupo TAO, foi utilizado um modelo linear de efeitos mistos. Os modelos lineares de efeitos mistos (efeitos aleatórios e fixos) são utilizados na análise de das respostas de um mesmo indivíduo na forma de agrupamentos (réplicas), ou seja, a suposição de independência entre observações num mesmo grupo não é adequada (SCHALL, 1991; LITTEL et al., 1996).

Foram estimados os contrastes ortogonais para se verificar as possíveis diferenças entre os grupos. Foi utilizado o procedimento PROC MIXED do software SAS versão 9.4. (SAS Institute, 2013).

5. RESULTADOS

Após análise dos critérios de inclusão e exclusão, 18 pacientes com TAO do ambulatório de Cirurgia Vascular do HCFMRP-USP foram submetidos a coletas de amostras sanguíneas. Dentre eles, 14 eram tabagistas e 4 ex-tabagistas (1 havia cessado há menos de 6 meses). A idade média foi de 46,7 anos. Os grupos comparados eram homogêneos quanto a sexo, raça e idade. Não houve diferença estatística entre as comorbidades do grupo TAO comparadas aos Controles. O grupo TAO também apresentava maior quantidade de tabagistas, com maior carga tabágica, porém sem diferença estatisticamente significativa. Além disso, o uso de ácido acetilsalicílico (AAS), cilostazol e estatinas foi maior no grupo com os pacientes com tromboangeíte obliterante.

Concordaram em participar 29 indivíduos para formação de um grupo controle. Destes, 11 eram tabagistas no momento da coleta, 8 eram ex-tabagistas (2 haviam parado de fumar há menos de 6 meses) e 10 nunca fumaram. A comparação entre os dois grupos é exposta na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição das variáveis de acordo com os grupos.

Variável	Ex- tabagista n = 8 (17.4)	Não- tabagista n = 9 (19.6)	Tabagista n = 11 (23.9)	TAO n = 18 (39.1)	p-valor
Idade - média (DP)&	46.8 (13.13)	40.0 (9.19)	49.7 (9.83)	46.7 (7.37)	0.14
Sexo - n (%)#					
Feminino	6(75.00)	4(44.44)	5(45.45)	9(50.00)	0.58
Masculino	2(25.00)	5(55.56)	6(54.55)	9(50.00)	
Raça - n (%)#					
Amarela	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	1(5.56)	0.98
Branca	3(37.50)	4(44.44)	5(45.45)	8(44.44)	
Parda	4(50.00)	3(33.33)	3(27.27)	4(22.22)	
Preta	1(12.50)	2(22.22)	3(27.27)	5(27.78)	
Cessou há mais de 6m - n (%)#	6(75.00)	0(0.00)	0(0.00)	3(16.67)	
Cessou há menos de 6m - n (%)#	2(25.00)	0(0.00)	0(0.00)	1(5.56)	
Cigarro industrial - n (%)#	7(87.50)	0(0.00)	11(100.00)	16(88.89)	
Cigarro de palha - n (%)#	1(12.50)	0(0.00)	5(45.45)	4(22.22)	
Outro tipo de cigarro - n (%)#	2(28.57)	0(0.00)	3(27.27)	1(5.56)	
Carga tabágica - média (DP) &	19.8 (13.59)	-	24.5 (14.40)	38.3 (23.27)	0.13
HAS - n (%)#	2(25.00)	0(0.00)	2(18.18)	7(38.89)	0.15
DM - n (%)#	1(12.50)	0(0.00)	2(18.18)	0(0.00)	0.13
DLP - n (%)#	1(12.50)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0.17
Obesidade - n (%)#	2(25.00)	0(0.00)	1(9.09)	4(22.22)	0.44
DPOC - n (%)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	*
DAC - n (%)#	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	2(10.53)	0.65
AVC - n (%)#	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	3(15.79)	0.34

AAS - n (%)#	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	16(88.89)	< 0.01
Clopidogrel - n (%)#	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	2(10.53)	0.65
Cilostazol - n (%)#	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	16(88.89)	< 0.01
Estatina - n (%)#	1(12.50)	0(0.00)	0(0.00)	12(66.67)	< 0.01
IECA - n (%)#	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	4(22.22)	0.13
BRA - n (%)#	0(0.00)	0(0.00)	1(9.09)	1(5.56)	1.00

&: teste não paramétrico de Kruskal-Wallis; #: teste exato de Fisher.

HAS, hipertensão arterial sistêmica; DM, diabetes mellitus; DLP, dislipidemia; DAC, doença arterial coronariana; AVC, acidente vascular cerebral; IECA, inibidores da enzima conversora de angiotensina; BRA, bloqueadores do receptor de angiotensina.

Dentre os 18 pacientes com TAO, 14 realizaram uma segunda coleta de sangue após 6 meses da primeira (4 pacientes se abstiveram e decidiram por não continuar no estudo). Três pacientes foram considerados com ativação da doença, demonstrada por piora clínica e surgimento de novas lesões tróficas ou dor em repouso (Rutherford 4, ou 5), ou piora do ITB para valor inferior a 0,6 ao longo do estudo. Um deles foi submetido a revascularização do membro com angioplastia infrapoplíteia com balão seguida de simpatectomia lombar. Outro piorou claudicação com progressão de Rutherford 2 para 3. Por último, um paciente apresentou piora do ITB de 0,6 para 0,4, embora manteve-se clinicamente estável com claudicação Rutherford 2. Outros quatro pacientes apresentavam lesões tróficas estáveis desde a admissão no estudo, sem piora ou cicatrização ao longo do seguimento. Para tais, não foi considerada nova ativação da doença.

5.1. MicroRNA 21

Foi observado um aumento da expressão sérica do miR-21 com diferença estatisticamente significativa quando comparada a segunda dosagem do grupo estudo com os grupos controle não tabagista (IC 5,37 - 21,45, $p < 0,01$), controle ex-tabagista (IC 1,46 - 18,14, $p = 0,02$) e controle tabagista (IC 0,97 - 16,13, $p = 0,03$). As médias dos grupos são apresentadas na tabela 2.

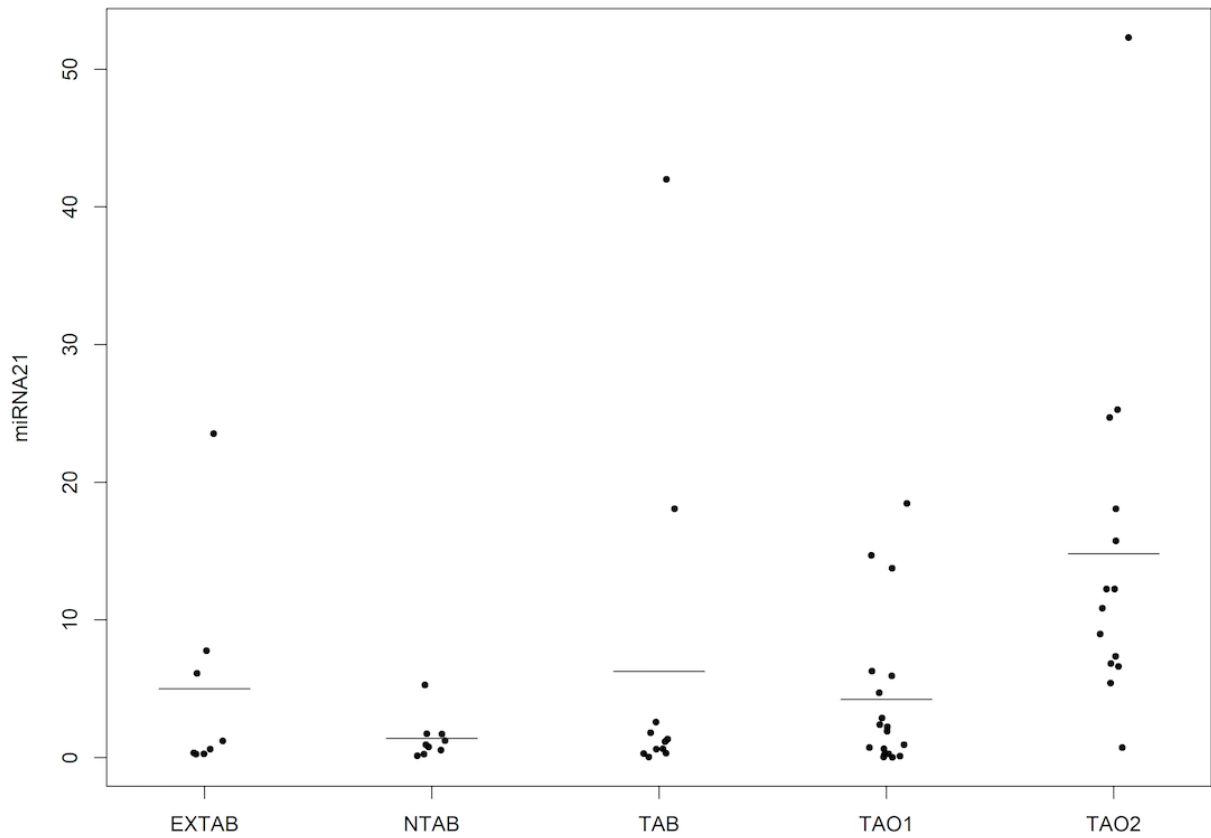
Tabela 2. Descrição do miR-21 de acordo com os grupos.

	Grupo	n	Média	DP	Mínimo	1º quartil	Mediana	3º quartil	Máximo
	NTAB	9	1,4	1,56	0,12	0,53	0,94	1,71	5,28
	EXTAB	8	5,01	8,04	0,25	0,31	0,9	6,94	23,53
miR-21	TAB	11	6,26	12,94	0,03	0,32	1,16	2,57	42
	TAO1	18	4,23	5,66	0,02	0,28	2,07	5,93	18,45
	TAO2	14	14,81	12,89	0,72	6,82	11,54	18,08	52,31

NTAB - grupo controle não tabagista; EXTAB – grupo controle ex-tabagista, TAB – grupo controle tabagista; TAO1 - primeira coleta do grupo Tromboangeite Obliterante, TAO2 – segunda coleta do grupo Tromboangeite Obliterante.

O grupo controle composto por não tabagistas apresentou a menor média das dosagens séricas do miR-21, embora essa diferença tenha se mostrado com significância estatística apenas quando comparada ao grupo TAO-2. Da mesma forma, o grupo não tabagista apresentou resultados mais homogêneos, com menor desvio padrão em sua distribuição. O grupo TAO-2, por sua vez, apresentou a maior média das dosagens do miR-21, com maior desvio padrão. Essa relação entre os grupos é mostrada no gráfico 1.

Gráfico 1. Dosagens do miR-21 de acordo com os grupos.



TAB – grupo controle tabagista; NTAB - grupo controle não tabagista; EXTAB – grupo controle ex-tabagista, TAO1 - primeira coleta do grupo Tromboangeíte Obliterante, TAO2 – segunda coleta do grupo Tromboangeíte Obliterante.

As comparações detalhadas das médias do miR-21 entre os grupos estudados e controles são demonstradas na tabela 3.

Tabela 3. Comparação das médias do miR-21 entre os grupos TAO e controles.

Variável	Comparações	Diferença médias	entre LI IC95%	LS IC 95%	p-valor
miR-21	TAB - NTAB	4,86	-3,60	13,32	0,25
	TAB - EXTAB	1,25	-7,50	9,99	0,78
	TAB - TAO1	2,03	-5,18	9,23	0,58
	TAO2 - TAB	8,55	0,97	16,13	0,03
	EXTAB -NTAB	3,61	-5,53	12,76	0,43
	TAO1 - NTAB	2,84	-4,85	10,52	0,46
	TAO2 - NTAB	13,41	5,37	21,45	<0,01
	EXTAB - TAO1	0,78	-7,22	8,77	0,85
	TAO2 - EXTAB	9,80	1,46	18,14	0,02

TAB – grupo controle tabagista; NTAB - grupo controle não tabagista; EXTAB – grupo controle ex-tabagista, TAO1 - primeira coleta do grupo Tromboangeíte Obliterante, TAO2 – segunda coleta do grupo Tromboangeíte Obliterante. LI IC95%: limite inferior do intervalo de confiança 95%; LS IC95%: limite superior do intervalo de confiança 95%.

A evolução do miR-21 nos três pacientes que apresentaram ativação da doença é descrita na tabela 4. Não houve diferença estatística na dosagem do miR-21 entre os pacientes com lesões tróficas estáveis, sem nova ativação da doença, com a média dos grupos TAO.

Tabela 4. Evolução dos miR-21 em pacientes com ativação da TAO.

Paciente	TAO1	TAO2	ITB1	ITB2	Condição clínica
102	18,45	52,30	0,4	Sem fluxo	Revascularizado por angioplastia distal com Balão + simpatectomia lombar. Realizou amputação de lesão trófica Rutherford 5.
94	13,74	10,84	0,6	0,4	Estável ao longo do estudo. Claudicante Rutherford 2
81	0,04	25,26	0,6	0,5	Piora da claudicação. Progressão de Rutherford 2 para Rutherford 3.

5.2. MicroRNA 126

Foi observado um aumento da expressão sérica do miR-126 com diferença estatisticamente significativa quando comparada a segunda dosagem do grupo estudo com o grupo controle não tabagista (IC 3,36 – 30,95, $p=0,02$). As médias dos grupos são apresentadas na tabela 5.

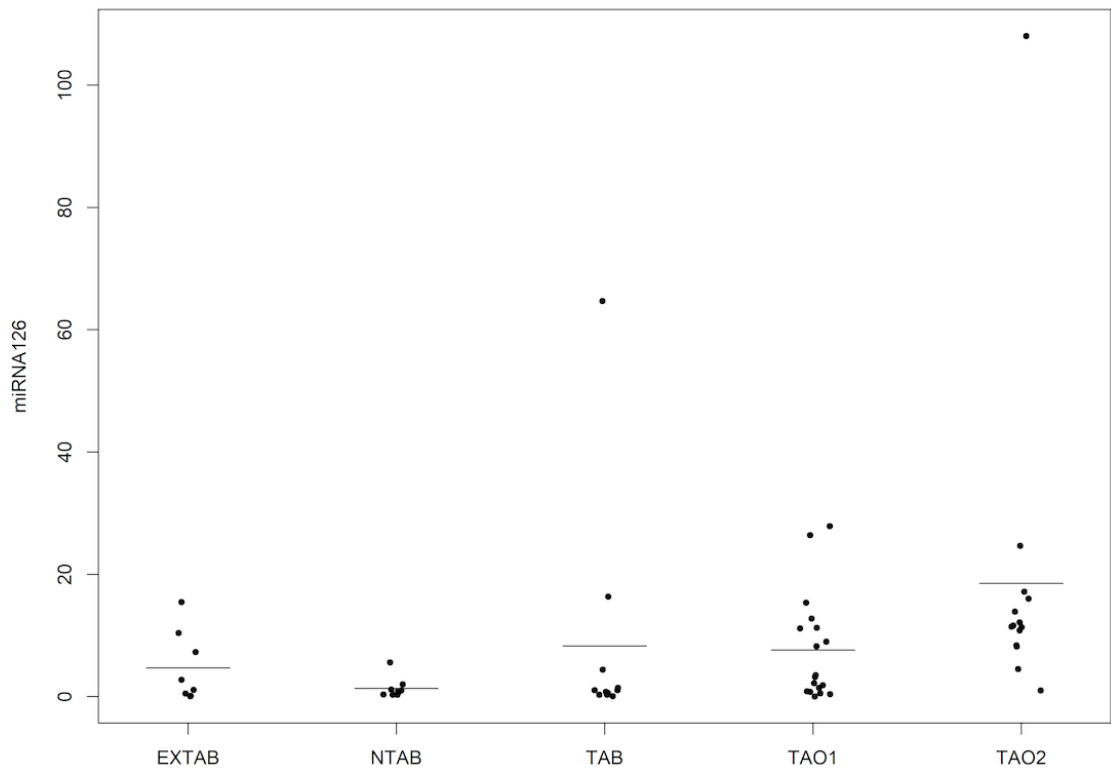
Tabela 5. Descrição do miR-126 de acordo com os grupos.

	Grupo	N	Média	DP	Mínimo	1º quartil	Mediana	3º quartil	Máximo
miR-126	NTAB	9	1,36	1,67	0,3	0,35	0,85	1,15	5,57
	EXTAB	8	4,7	5,76	0,07	0,29	1,91	8,84	15,45
	TAB	11	8,27	19,29	0,05	0,31	1,03	4,39	64,67
	TAO1	18	7,6	8,63	0,01	0,86	3,36	11,25	27,86
	TAO2	14	18,51	26,37	1,02	8,37	11,53	16,01	108,03

NTAB - grupo controle não tabagista; EXTAB – grupo controle ex-tabagista, TAB – grupo controle tabagista; TAO1 - primeira coleta do grupo Tromboangeíte Obliterante, TAO2 – segunda coleta do grupo Tromboangeíte Obliterante.

Assim com observado com o miR-21, o grupo controle composto por não tabagistas apresentou a menor média das dosagens séricas do miR-126, embora essa diferença tenha se mostrado com significância estatística apenas quando comparada ao grupo TAO-2. Da mesma forma, o grupo não tabagista apresentou resultados mais homogêneos, com menor desvio padrão em sua distribuição. O grupo TAO-2, por sua vez, apresentou a maior média das dosagens do miR-126, com maior desvio padrão. Essa relação entre os grupos é mostrada no gráfico 2.

Gráfico 2. Dosagens do miR-126 de acordo com os grupos.



TAB – grupo controle tabagista; NTAB - grupo controle não tabagista; EXTAB – grupo controle ex-tabagista, TAO1 - primeira coleta do grupo Tromboangeíte Obliterante, TAO2 – segunda coleta do grupo Tromboangeíte Obliterante.

As comparações detalhadas das médias do miR-126 entre os grupos estudados e controles são demonstradas na tabela 6.

Tabela 6. Comparação das médias do miR-126 entre os grupos TAO e controles.

Variável	Comparações	Diferença entre médias	LI IC95%	LS IC 95%	p-valor
miRNA126	TAB - NTAB	6,91	-7,61	21,43	0,34
	TAB - EXTAB	3,57	-11,44	18,58	0,64
	TAB - TAO1	0,67	-11,69	13,03	0,91
	TAO2 - TAB	10,24	-2,77	23,26	0,12
	EXTAB -NTAB	3,34	-12,35	19,03	0,67
	TAO1 - NTAB	6,24	-6,95	19,42	0,35
	TAO2 - NTAB	17,15	3,36	30,95	0,02
	TAO1 - EXTAB	2,90	-10,83	16,62	0,67
	TAO2 - EXTAB	13,81	-0,50	28,13	0,06

TAB – grupo controle tabagista; NTAB - grupo controle não tabagista; EXTAB – grupo controle ex-tabagista, TAO1 - primeira coleta do grupo Tromboangeite Obliterante, TAO2 – segunda coleta do grupo Tromboangeite Obliterante. LI IC95%: limite inferior do intervalo de confiança 95%; LS IC95%: limite superior do intervalo de confiança 95%.

A evolução do miR-126 nos três pacientes que apresentaram ativação da doença é descrita na tabela 7. Não houve diferença estatística na dosagem do miR-126 entre os pacientes com lesões tróficas estáveis, sem nova ativação da doença, com a média dos grupos TAO.

Tabela 7. Evolução dos miR-126 em pacientes com ativação da TAO.

Paciente	TAO1	TAO2	ITB1	ITB2	Condição clínica
102	26,40	108,0 2	0,4	Sem fluxo	Revascularizado por angioplastia distal com Balão + simpatectomia lombar. Realizou amputação de lesão trófica Rutherford 5.
94	12,75	13,87	0,6	0,4	Estável ao longo do estudo. Claudicante Rutherford 2
81	0,38	24,66	0,6	0,5	Piora da claudicação. Progressão de Rutherford 2 para Rutherford 3.

5.3. MicroRNA 181b

Foi observado um aumento da expressão sérica do miR-181b com diferença estatisticamente significativa quando comparada a segunda dosagem do grupo estudo com o grupo controle não tabagista (IC 0,27 – 14,18, $p=0,04$). Uma amostra do grupo controle tabagista, quatro amostras do grupo TAO1 e três amostras do grupo TAO2 apresentaram resultados indeterminados. As médias dos grupos são apresentadas na tabela 8.

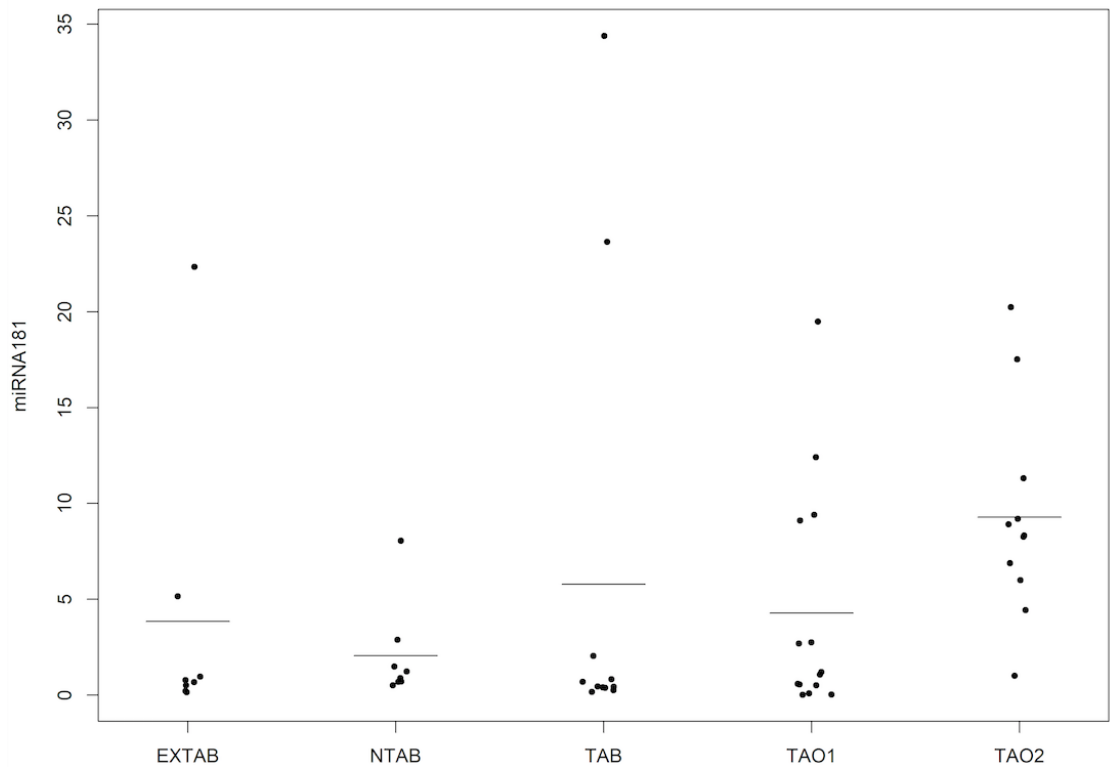
Tabela 8. Descrição do miR-181b de acordo com os grupos.

	Grupo	N	Média	DP	Mínimo	1º quartil	Mediana	3º quartil	Máximo
miR-181	NTAB	8	2,06	2,54	0,51	0,7	1,06	2,19	8,05
	EXTAB	8	3,85	7,65	0,16	0,36	0,72	3,06	22,34
	TAB	11	5,79	11,74	0,17	0,38	0,45	2,04	34,39
	TAO1	14	4,28	5,99	0,02	0,52	1,13	9,1	19,48
	TAO2	11	9,28	5,5	1,01	5,99	8,33	11,31	20,24

NTAB - grupo controle não tabagista; EXTAB – grupo controle ex-tabagista, TAB – grupo controle tabagista; TAO1 - primeira coleta do grupo Tromboangeíte Obliterante, TAO2 – segunda coleta do grupo Tromboangeíte Obliterante.

Assim como foi observado nos miR-21 e miR-126, o grupo controle composto por não tabagistas apresentou a menor média das dosagens séricas do miR-181b, embora essa diferença tenha se mostrado com significância estatística apenas quando comparada ao grupo TAO-2. Da mesma forma, o grupo não tabagista apresentou resultados mais homogêneos, com menor desvio padrão em sua distribuição. No entanto, O grupo TAO-2 por sua vez, apresentou a maior média das dosagens do miR-181b, com os resultados com distribuição mais heterogênea, com maior variação em comparação aos demais grupos. Essa relação entre os grupos é mostrada no gráfico 3.

Gráfico 3. Dosagens do miR-181b de acordo com os grupos.



TAB – grupo controle tabagista; NTAB - grupo controle não tabagista; EXTAB – grupo controle ex-tabagista, TAO1 - primeira coleta do grupo Tromboangeíte Obliterante, TAO2 – segunda coleta do grupo Tromboangeíte Obliterante

As comparações detalhadas das médias do miR-181b entre os grupos estudos e controles são demonstradas na tabela 9.

Tabela 9. Comparação das médias do miR-181b entre os grupos TAO e controles.

Variável	Comparações	Diferença médias	entre LI IC95%	LS IC 95%	p-valor
miR-181b	TAB - NTAB	3,73	-3,22	10,69	0,29
	TAB - EXTAB	1,94	-5,01	8,90	0,58
	TAB - TAO1	1,51	-4,52	7,54	0,62
	TAO2 - TAB	3,49	-2,89	9,87	0,28
	EXTAB -NTAB	1,79	-5,69	9,28	0,63
	TAO1 - NTAB	2,22	-4,41	8,86	0,50
	TAO2 - NTAB	7,22	0,27	14,18	0,04
	TAO1 - EXTAB	0,43	-6,20	7,07	0,90
	TAO2 - EXTAB	5,43	-1,52	12,39	0,12

TAB – grupo controle tabagista; NTAB - grupo controle não tabagista; EXTAB – grupo controle ex-tabagista, TAO1 - primeira coleta do grupo Tromboangeite Obliterante, TAO2 – segunda coleta do grupo Tromboangeite Obliterante. LI IC95%: limite inferior do intervalo de confiança 95%; LS IC95%: limite superior do intervalo de confiança 95%.

A evolução do miR-181b nos três pacientes que apresentaram ativação da doença é descrita na tabela 10. Não houve diferença estatística na dosagem do miR-181b entre os pacientes com lesões tróficas estáveis, sem nova ativação da doença, com a média dos grupos TAO.

Tabela 10. Evolução dos miR-181b em pacientes com ativação da TAO.

Paciente	TAO1	TAO2	ITB1	ITB2	Condição clínica
102	9,39	20,23	0,4	Sem fluxo	Revascularizado por angioplastia distal com Balão + simpatectomia lombar. Realizou amputação de lesão trófica Rutherford 5.
94	indeterminada	11,31	0,6	0,4	Estável ao longo do estudo. Claudicante Rutherford 2
81	0,08	17,51	0,6	0,5	Piora da claudicação. Progressão de Rutherford 2 para Rutherford 3.

Quando comparamos os dois momentos da amostra dos pacientes com TAO, isto é, comparando os grupos TAO1 e TAO2, observamos uma diferença significativa em todos os microRNAs estudados, com maior média no segundo momento da coleta (TAO2), conforme é apresentado na tabela 11.

Tabela 11. Resultados das comparações entre os momentos de coleta do grupo TAO (TAO1 – TAO2).

Variável	Diferença entre médias	LI IC95%	LS IC95%	IC p-valor
miRNA21	-11,33	-17,32	-5,34	<0,01
miRNA126	-12,42	-24,52	-0,32	0,04
miRNA181	-6,43	-10,47	-2,40	<0,01

LI IC95%: limite inferior do intervalo de confiança 95%; LS IC95%: limite superior do intervalo de confiança 95%

6. DISCUSSÃO

Estamos há mais de um século da descrição de Buerger sobre uma doença progressiva que causa trombozes arteriais e leva amputações de membros de uma maneira diferente da aterosclerose. Mesmo assim, ainda não compreendemos completamente a patogênese da TAO e pessoas jovens seguem sofrendo amputações anualmente. Acredita-se que a doença seja desencadeada pelo hábito de fumar em pessoas predispostas geneticamente ou de forma adquirida, através de infecções da cavidade oral. Porém, os gatilhos para ativação da doença permanecem obscuros. Por isso, é evidente a necessidade do estudo das vias inflamatórias dos momentos de atividade da TAO no intuito de prevenir amputações.

Ainda na década de 1980, Shionoya descreveu critérios clínicos diagnósticos para a TAO que envolviam o acometimento de pessoas tabagistas com menos de 50 anos e sem outros fatores de risco para aterosclerose. Em suas descrições iniciais, a TAO acometia especialmente homens, mas a prevalência da doença mudou ao longo dos anos à medida que o hábito de fumar foi assumido também pelas mulheres. Em nosso estudo, comparamos pacientes com TAO diagnosticados a partir desses critérios, com controles sem a doença tabagistas, ex-tabagistas ou que nunca fumaram. Os

grupos foram homogêneos quanto a idade (todos com média inferior a 50 anos), raça, comorbidades e sexo, com 50% de homens e mulheres no grupo TAO.

Algumas medicações são mais utilizadas nos grupos TAO quando comparadas aos controles. São elas, AAS, estéticas, cilostazol e os inibidores da enzima conversora de angiotensina, embora nesse último não se tenha observado diferença estatisticamente significativa. Esse ponto é importante, uma vez que os microRNAs atuam em diversos processos biológicos em nosso organismo, a depender da célula em que se encontram e tais medicações podem interferir em seus metabolismos.

6.1. Avaliação dos microRNAs

Cerca de 98% do genoma humano é transcrito em RNAs que não são traduzidos em proteínas, isto é, os noncoding RNAs (ncRNA). Dentre os ncRNAs, há uma classe de pequenas sequências de 18-22 nucleotídeos que atuam interrompendo a ação de RNAs mensageiros e bloqueando a tradução proteica: os microRNAs. (BALLANTYNE; MCDONALD; BAKER, 2016). Assim, os microRNAs se apresentam como reguladores dos mais diversos processos biológicos no organismo humano.

Acredita-se que o tabagismo leve ao aumento do estresse oxidativo em pacientes com TAO. Os radicais livres de oxigênio circulantes reagem com o NO e produzem a peroxidação de lipídios da membrana endotelial. Ou ainda, que os vasoespasmos ocasionados induzem a fosforilação de proteínas da membrana celular. Essas alterações são reconhecidas por receptores TLR ou NLR que ativam a via do NF-κB que desencadeiam a produção de citocinas inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF-α, aumentam a expressão de proteínas de membrana para ancoragem como MMP-1, MMP-9, VCAM, ICAM e criam um intenso ambiente inflamatório.

O miR-21 sofre ação do tabagismo e atua diretamente na ativação da via do NF-κB e conseqüente aumento dos seus subprodutos. (ZHAO et al., 2021). Essa via é fortemente associada à disfunção endotelial que parece ser o passo inicial para o desenvolvimento das trombooses dos pequenos vasos, como foi demonstrado por Dellalibera-Joviliano ao mostrar aumento do TNF-α, IL-1 MMP1 e MMP9 em pacientes com TAO. (DELLALIBERA-JOVILIANO et al., 2012a; DELLALIBERA-JOVILIANO et al., 2012b)

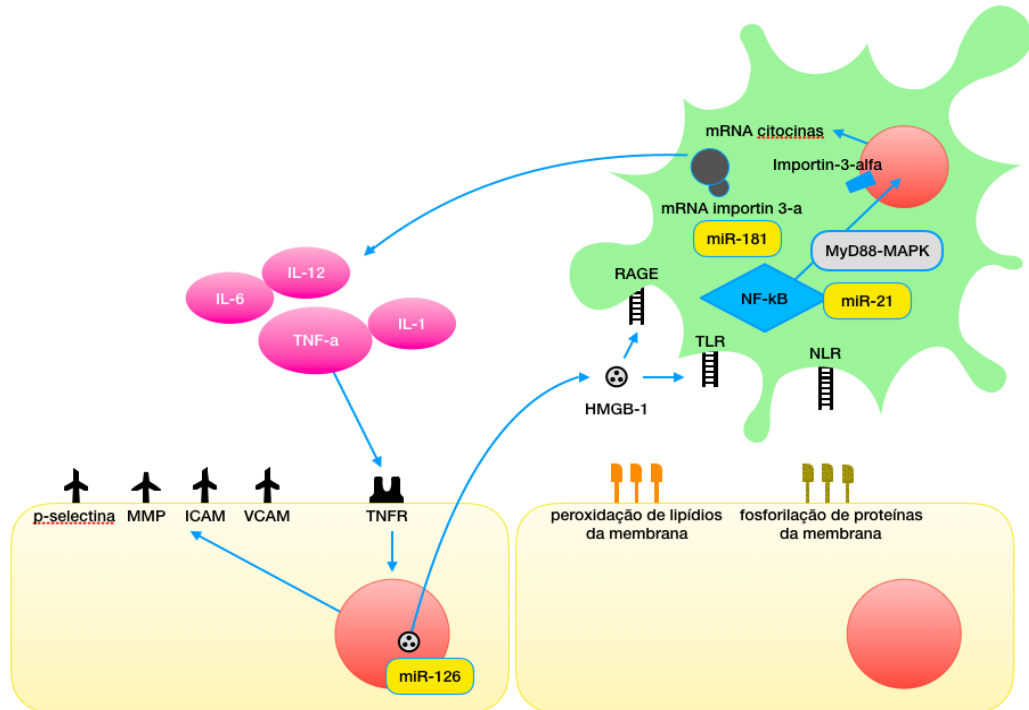
Em nosso estudo, observamos uma média menor do miR-21 em pessoas que nunca fumaram. Nos controles tabagistas e ex-tabagistas, essa média é maior, porém sem significância estatística como demonstrado na Tabela 3 (respectivamente, $p=0,25$ e $p=0,43$). Mesmo assim, é notório que nos grupos controles tabagistas e ex-tabagistas, a distribuição do miR-21 é mais heterogênea, com alguns indivíduos apresentando resultados destoantes, bem acima da média geral. Isso sugere que o hábito de fumar leva a uma maior atividade inflamatória em algumas pessoas, ou em alguns momentos da vida. Interessante observar que essa atividade pode ser persistente, uma vez que esse mesmo padrão é observado nos ex-tabagistas, mesmo dentre os que pararam de fumar há mais de 6 meses.

Quando analisamos os resultados dos grupos TAO1 e TAO2, esse achado é ainda mais evidente, com aumento das médias em relação aos não tabagistas, e uma maior dispersão do miR-21, quando comparado com todos os controles. Esse resultado é mais importante no grupo TAO2, onde as diferenças se mostram com significância estatística ($p<0,01$ para grupo não tabagista, $p=0,02$ para o grupo ex-tabagista e $p=0,03$ para grupo tabagista).

O microRNA 126 atua como regulador pós-transcrição do HMGB-1. Essa proteína nuclear, quando no ambiente extracelular, é reconhecida por receptores DAMPs do tipo RAGE e ativa a via do NF- κ B. Essa situação ocorre tanto em condições de necrose ou por exportação do HMGB-1 em respostas inflamatórias. No grupo TAO2, observamos uma maior expressão desse microRNA em relação aos controles não tabagistas. Acreditamos que essa observação seja decorrente de uma resposta anti-inflamatória aos estímulos desencadeantes da TAO.

O microRNA-181b atua por meio da inibição da tradução do mRNA da Importin-3-alfa. Essa proteína realiza o transporte do NF- κ B para o núcleo celular, um passo importante na sinalização para produção de seus subprodutos. Alterações das forças de cisalhamento do fluxo sanguíneo provocam aumento da produção do miR-181b como resposta anti-inflamatória. Por isso, sua atividade é vista como anti-inflamatória. Da mesma forma, no grupo TAO2 podemos observar uma maior ativação desse microRNA, possivelmente associada a uma resposta anti-inflamatória, embora não completamente eficaz, decorrente da hiperativação do NF- κ B. A figura 8 resume os mecanismos de ação relacionados aos microRNAs propostos na ativação da TAO.

Figura 8. Ação dos miRNAs 21, 126, 181b na ativação do NF- κ B em pacientes com TAO.

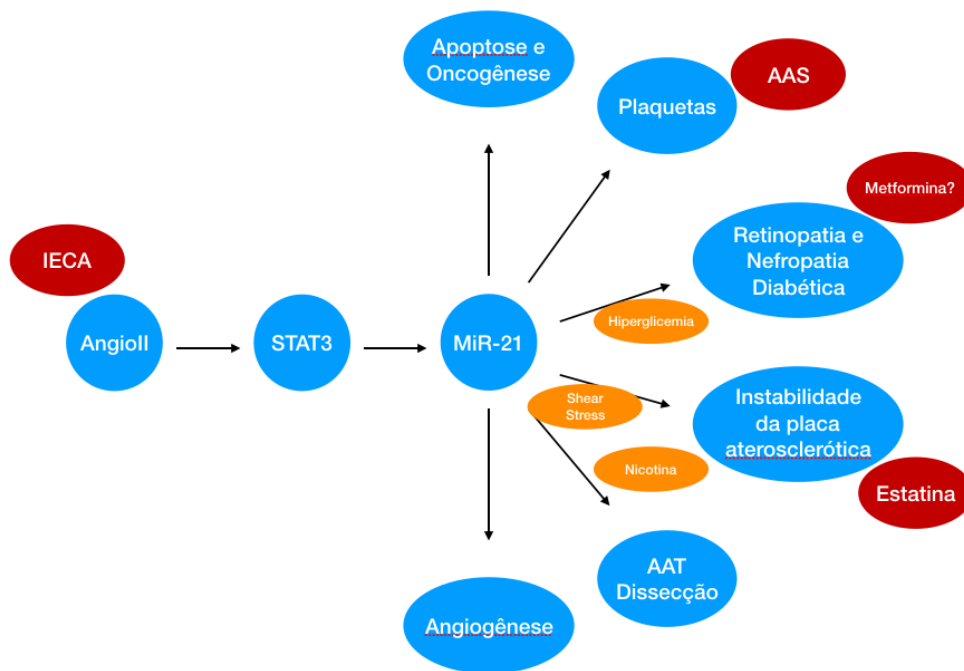


Os microRNAs 21, 126 e 181b participam de diversos processos inflamatórios vasculares, incluindo a aterosclerose, o que suscita uma discussão importante: as medicações utilizadas no tratamento da TAO, como AAS, estatinas, cilostazol e até mesmo os IECAs podem interferir nos resultados das coletas.

Existem associações estabelecidas para o uso do AAS com a redução dos níveis do miR-21 e da via do NF- κ B em modelos de avaliação de outras doenças, como câncer gástrico (ZHANG; TAN; MA, 2017), doença de parkinson (ZHANG; TAN; MA, 2017) e lesões cardíacas induzidas por radiação (VICZENCZOVA et al., 2017). O mesmo acontece para as estatinas, com observação de efeito inibitório da rosuvastatina sobre o miR-21, na via HMGB-1/TLR4 e seus subprodutos em modelos de lesão hepática por colestase (NABIH; EL-KHARASHI, 2019) ou ainda, inibição do miR-21 pela atorvastatina em lesões endoteliais por dislipidemia (ZHANG et al., 2018). Seguindo a mesma linha, observamos que as estatinas reduzem o nível plasmático do miR-21 em pacientes com angina instável (ZHANG et al., 2015).

No endotélio, encontramos mais uma possível influência medicamentosa: a ação dos inibidores da enzima conversora de angiotensina nos microRNAs. Isso porque a angiotensina II promove a fosforilação do STAT3 que ativa sua via de angiogênese através da indução da transcrição do miR-21, o que leva a expressão de proteínas de adesão e interleucinas. Essa via está envolvida na progressão e instabilidade de placas ateroscleróticas. Não se sabe, contudo, se esse é o mesmo mecanismo que leva a trombose vascular na TAO (CHEN et al., 2019). A figura 9 demonstra possíveis ações do miR-21 conforme a situação em que se encontra.

Figura 9. Ação medicamentosa sobre microRNA-21.



Fonte: RONDINA, 2015; ZHANG, 2015; MASSIMI, 2018, CHEN, 2019.

IECA: Inibidores da enzima conversora da angiotensina; Angioll: Angiotensina II; STAT3: signal transducer and activator of transcription 3; AAS: ácido acetilsalicílico; AAT: aneurisma da aorta torácica

Quanto ao miR-126, é conhecida a ação do AAS em sua inibição direta e modulação da atividade plaquetária. (PASEBAN et al., 2020). Entretanto, diferentemente do miR-21, a ação das estatinas leva ao aumento dos níveis séricos do miR-126 associados à aterosclerose (PAN et al., 2017) e em modelos de infarto agudo do miocárdio (FEI et al., 2016).

Não há estudos a respeito da influência do cilostazol sobre os microRNAs analisados, tampouco em relação a AAS, estatinas e IECA sobre os miR-126 e miR-181b. Os mir-21 e miR-126 foram mais estudados até hoje e há mais informações do que sobre o miR-181b. Mesmo assim, ainda não são completamente compreendidos. E, mesmo que não haja muitos estudos esclarecendo a ação das doenças e das demais medicações sobre o miR-181b, é possível que suas vias de expressão também sofram influências.

Outro ponto a ser analisado é a influência de lesões isquêmicas que podem justificar a ativação da via do NF-kB por sua atividade inflamatória. Não foi observado aumento significativo da produção dos microRNAs estudados em associação à existência de lesões tróficas estáveis ou em cicatrização. No entanto, em pacientes que ativaram a doença ao longo do estudo, isto é, que pioraram o ITB para inferior a 0,6, ou ainda, que desenvolveram novas lesões, o nível dos microRNAs aumentou de forma importante, muito embora o número de pacientes envolvidos não permita a análise estatística adequada (tabelas 4 7 e 10). Esse achado sugere que os microRNAs estudados podem se correlacionar com a atividade da doença, todavia mais estudos com maior número de pacientes, possivelmente multicêntricos e com o maior tempo de seguimento são necessários.

Foi observado, também, uma diferença estatística na comparação dos microRNAs estudados entre os grupos TAO1 e TAO2, como apresentado na Tabela 11. Essa diferença ocorre principalmente em função dos pacientes que apresentaram ativação da doença e elevação muito significativa dos valores dos microRNAs. Isso vai de encontro ao que se observa na evolução da TAO, isto é, uma evolução com surtos e remissões, que não ocorre de caráter linear. Uma hipótese que fomenta discussão é que os pacientes que optaram por não participar do estudo e não retornaram nas consultas, tendem a estar assintomáticos, em fase inativa da doença, com consequente aumento da média do grupo TAO2.

Assim, sugerimos que o hábito de fumar em pessoas predispostas geneticamente induz um aumento do estresse oxidativo e à peroxidação de lipídios de membrana, ou ainda, vasoespasmos e aumento das forças de cisalhamento desencadeiam fosforilação de proteínas de membrana. Essas alterações da membrana endotelial são reconhecidas por receptores TLR e NLR em macrófagos, células dendríticas e neutrófilos. Nessas pessoas, isso leva a um descontrole inflamatório na

via do NF- κ B por meio da atividade exagerada do miR-21, com aumento da produção de TNF- α , IL-1, expressão de proteínas de membrana como MMP, VCAM, aumento da produção e exportação de HMGB-1 regulada pelo miR-126. Há uma contra-resposta inflamatória ineficaz por meio da ativação do miR-181b. Essa hiperatividade inflamatória gera uma importante disfunção endotelial, recrutamento de macrófagos, neutrófilos que culmina na trombose de pequenos vasos.

7. CONCLUSÃO

O hábito de fumar tende a provocar aumento da expressão dos microRNAs 21, 126 e 181b, possivelmente relacionados à inflamação vascular, que se perpetua mesmo após a interrupção do tabagismo.

Os níveis séricos dos microRNAs 21, 126 e 181b estão superexpressos em pacientes com TAO e parecem se correlacionar com esses períodos de maior atividade da doença, porém mais estudos com maior número de pacientes são necessários para validar eventual processo de utilização dos mesmos como marcadores de atividade da doença.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAR, A.; DURDU, S. **Thromboangiitis Obliterans** (Buerger's Disease). In: Elsevier, editor. *Rutherford's Vascular Surgery*. 1. 8th ed., p. 1167-86, 2014.

BALLANTYNE, M. D.; MCDONALD, R. A.; BAKER, A. H. lncRNA/MicroRNA interactions in the vasculature. **Clin Pharmacol Ther.**, v.99, n. 5, p. 494-501, 2016. doi: 10.1002/cpt.355.

BAŞ, A.; DIKICI, A. S.; GÜLŞEN, F.; SAMANCI, C.; MIHMANLI, I.; BEŞIRLI, K. et al. Corkscrew Collateral Vessels in Buerger Disease: Vasa Vasorum or Vasa Nervorum. **J Vasc Interv Radiol.**, v. 27, n. 5, p. 735-9, 2016. doi: 10.1016/j.jvir.2016.01.133.

BOZKURT, A. K.; KÖKSAL, C.; DEMIRBAS, M. Y.; ERDOĞAN, A.; RAHMAN, A.; DEMIRKILIÇ, U.; et al. A randomized trial of intravenous iloprost (a stable prostacyclin analogue) versus lumbar sympathectomy in the management of Buerger's disease. **Int Angiol.**, v. 25, n. 2, p. 162-8, 2006. PMID: 16763533.

CACIONE, D. G.; MORENO, D. H.; NAKANO, L. C.; BAPTISTA-SILVA, J. C. Surgical sympathectomy for Buerger's disease. **JRSM Open**, v. 8, n. 8, p. 1-8, 2017. doi: 10.1177/2054270417717666

CARNINCI, P.; KASUKAWA, T.; KATAYAMA, S.; GOUGH, J.; FRITH, M. C.; MAEDA, N.; et al. The transcriptional landscape of the mammalian genome. **Science**, v. 309, n. 5740, p. 1559-63, 2005. doi: 10.1126/science.1112014

CHEN, L. Y.; WANG, X.; QU, X. L.; PAN, L. N.; WANG, Z. Y.; LU, Y. H.; et al. Activation of the STAT3/microRNA-21 pathway participates in angiotensin II-induced angiogenesis. **J Cell Physiol.**, v. 234, n. 11, p. 19640-19654, 2019. doi: 10.1002/jcp.28564.

CHEN, Z.; NAKAJIMA, T.; INOUE, Y. et al. A single nucleotide polymorphism in the 3'-untranslated region of MyD88 gene is associated with Buerger disease but not with Takayasu arteritis in Japanese. **J Hum Genet**, v. 56, n. 7, p. 545-7, 2011. <https://doi.org/10.1038/jhg.2011.44>

CHENG, J.; KAPRANOV, P.; DRENKOW, J.; DIKE, S.; BRUBAKER, S.; PATEL, S.; et al. Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution. **Science**, v. 308, n. 5725, p. 1149-54, 2005. doi: 10.1126/science.1108625.

CHIU, J. J.; CHEN, L. J.; LEE, C. I.; LEE, P. L.; LEE, D. Y.; TSAI, M. C.; et al. Mechanisms of induction of endothelial cell E-selectin expression by smooth muscle cells and its inhibition by shear stress. **Blood**, v. 110, n. 2, p. 519-28, 2007. doi: 10.1182/blood-2006-08-040097.

CHIU, J. J.; CHIEN, S. Effects of disturbed flow on vascular endothelium: pathophysiological basis and clinical perspectives. **Physiol Rev.**, v. 91, n. 1, p. 327-87, 2011. doi: 10.1152/physrev.00047.2009.

COOPER, L. T.; TSE, T. S.; MIKHAIL, M. A.; MCBANE, R. D.; STANSON, A. W.; BALLMAN, K. V. Long-term survival and amputation risk in thromboangiitis obliterans (Buerger's disease). **J Am Coll Cardiol.**, v. 44, n. 12, p. 2410-1, 2004. doi: 10.1016/j.jacc.2004.09.029

D'ALESSIO, I.; SETTEMBRINI, A. M.; ROMAGNOLI, S.; DI, L. G.; DOMANIN, M.; GABRIELLI, L. Successful Fat Grafting in a Patient With Thromboangiitis Obliterans. **Adv Skin Wound Care**, v. 32, n. 12, p. 1-4, 2019. doi: 10.1097/01.ASW.0000604192.77577.6f.

DELLALIBERA-JOVILIANO, R.; JOVILIANO, E. E.; SILVA, J. S.; EVORA, P. R. Activation of cytokines corroborate with development of inflammation and autoimmunity in thromboangiitis obliterans patients. **Clin Exp Immunol.**, v. 170, n. 1, p. 28-35, 2012a. doi: 10.1111/j.1365-2249.2012.04624.x.

DELLALIBERA-JOVILIANO, R.; JACOB-FERREIRA, A. L.; JOVILIANO, E. E.; TANUS-SANTOS, J. E.; EVORA, P. R. Imbalanced matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 activities in patients with thromboangiitis obliterans. **Vasc Med.**, v. 17, n. 2, p. 73-8, 2012b. doi: 10.1177/1358863X11435979.

DERRIEN, T.; JOHNSON, R.; BUSSOTTI, G.; TANZER, A.; DJEBALI, S.; TILGNER, H.; et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. **Genome Res.**, v. 22, n. 9, p. 1775-89, 2012. doi: 10.1101/gr.132159.111.

DJEBALI, S.; DAVIS, C. A.; MERKEL, A.; DOBIN, A.; LASSMANN, T.; MORTAZAVI, A.; et al. Landscape of transcription in human cells. **Nature**, v. 489, n. 7414, p. 101-8, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature11233>

FEI, L.; ZHANG, J.; NIU, H.; YUAN, C.; MA, X. Effects of Rosuvastatin and MiR-126 on Myocardial Injury Induced by Acute Myocardial Infarction in Rats: Role of Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A). **Med Sci Monit.**, v. 22, p. 2324-34, 2016. doi: 10.12659/msm.896983.

GALYFOS, G.; LIAKOPOULOS, D.; CHAMZIN, A.; SIGALA, F.; FILIS, K. A systematic review and meta-analysis of early and late outcomes after endovascular angioplasty among patients with thromboangiitis obliterans and chronic limb ischemia. **J Vasc Surg.**, v. 26, n. S0741-5214(22)02318-7, p. 1-10, 2022. doi: 10.1016/j.jvs.2022.09.017.

GRAZIANI, L.; MORELLI, L.; PARINI, F.; FRANCESCHINI, L.; SPANO, P.; CALZA, S.; et al. Clinical outcome after extended endovascular recanalization in Buerger's disease in 20 consecutive cases. **Ann Vasc Surg.**, v. 26, n. 3, p. 387-95, 2012. doi: 10.1016/j.avsg.2011.08.014.

GULATI, S. M.; MADHRA, K.; THUSOO, T. K.; NAIR, S. K.; SAHA, K. Autoantibodies in thromboangiitis obliterans (Buerger's disease). **Angiology**, v. 33, n. 10, p. 642-51, 1982. doi: 10.1177/000331978203301003

HALACHEVA, K.; GULUBOVA, M. V.; MANOLOVA, I.; PETKOV, D. Expression of ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and TNF-alpha on the endothelium of femoral and iliac arteries in thromboangiitis obliterans. **Acta Histochem.**, v. 104, n. 2, p. 177-84, 2002. doi: 10.1078/0065-1281-00621

HARRIS, T. A.; YAMAKUCHI, M.; FERLITO, M.; MENDELL, J. T.; LOWENSTEIN, C. J. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 5, p. 1516-21. 2008. doi: 10.1073/pnas.0707493105.

HARTMANN, P.; MOHOKUM, M.; SCHLATTMANN, P. The association of Raynaud syndrome with thromboangiitis obliterans--a meta-analysis. **Angiology**, v. 63, n. 4, p. 315-9, 2012. doi: 10.1177/0003319711414868.

HU, J.; NI, S.; CAO, Y.; ZHANG, T.; WU, T.; YIN, X.; et al. The Angiogenic Effect of microRNA-21 Targeting TIMP3 through the Regulation of MMP2 and MMP9. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0149537, 2016. doi: 10.1371/journal.pone.0149537.

KAUFFMAN, P.; SITRÂNGULO JUNIOR, C. **Tromboangiite Obliterante**. In: Koogan G, editor. Doenças Vasculares Periféricas. 2. 5a. ed., p. 1354-61, 2016.

KEGG PATHWAY. **Kegg Pathway Database**. Disponível em <<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>>. Acesso em [20 set 2022].

KETHA, S. S.; COOPER, L. T. The role of autoimmunity in thromboangiitis obliterans (Buerger's disease). **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1285, p. 15-25, 2013. doi: 10.1111/nyas.12048.

KLOOSTERMAN, W. P.; PLASTERK, R. H. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. **Dev Cell.**, v. 11, n. 4, p. 441-50, 2006. doi: 10.1016/j.devcel.2006.09.009.

LAN, F.; PAN, Q.; YU, H.; YUE, X. Sulforaphane enhances temozolomide-induced apoptosis because of down-regulation of miR-21 via Wnt/ β -catenin signaling in glioblastoma. **J Neurochem.**, v. 134, n. 5, p. 811-8, 2015. doi: 10.1111/jnc.13174.

LITTELL, R. C.; MILLIKEN, G. A.; SROUP, W.W.; WOLFINGER, R. D. **SAS System for Mixed Models**, Cary, NC: SAS Institute Inc. 1996.

LIU, C.; KONG, X.; WU, X.; WANG, X.; GUAN, H.; WANG, H.; WANG, L.; JIN, X.; YUAN, H. Alleviation of A disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10) on thromboangiitis obliterans involves the HMGB1/RAGE/ NF- κ B pathway. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 505, n. 1, p. 282-289, 2018. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.09.002.

LIU, T.; ZHANG, L.; JOO, D.; SUN, S. C. NF- κ B signaling in inflammation. **Signal Transduct Target Ther.**, v. 2, n. 17023, p. 1-9, 2017. doi: 10.1038/sigtrans.2017.23.

MA, S.; TIAN, X. Y.; ZHANG, Y.; MU, C.; SHEN, H.; BISMUTH, J.; et al. E-selectin-targeting delivery of microRNAs by microparticles ameliorates endothelial inflammation and atherosclerosis. **Sci Rep.**, v. 6, n. 22910, p. 1-11, 2016. doi: 10.1038/srep22910.

MA, X.; CONKLIN, D. J.; LI, F.; DAI, Z.; HUA, X.; LI, Y.; et al. The oncogenic microRNA miR-21 promotes regulated necrosis in mice. **Nat Commun.**, v. 6, n. 7151, p. 1-13, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms8151>

MAEGDEFESSEL, L. The emerging role of microRNAs in cardiovascular disease. **J Intern Med.**, v. 276, n. 6, p. 633-44, 2014. doi: 10.1111/joim.12298.

MAEGDEFESSEL, L.; AZUMA, J.; TOH, R.; DENG, A.; MERK, D. R.; RAIESDANA, A.; et al. MicroRNA-21 blocks abdominal aortic aneurysm development and nicotine-augmented expansion. **Sci Transl Med.**, v. 4, n. 122, p. 122ra22, 2012. doi: 10.1126/scitranslmed.3003441.

MASSIMI, I.; ALEMANNI, L.; GUARINO, M. L.; GUERRIERO, R.; FRATI, L.; BIASUCCI, L.; et al. MiR-21 role in aspirin-dependent PPAR α and multidrug resistance protein 4 upregulation. **Res Pract Thromb Haemost.**, v. 2, n. 3, p. 596-606, 2018. doi: 10.1002/rth2.12104.

MCLOUGHLIN, G. A.; HELSBY, C. R.; EVANS, C. C.; CHAPMAN, D. M. Association of HLA-A9 and HLA-B5 with Buerger's disease. **Br Med J.**, v. 2, n. 6045, p. 1165-6, 1976. doi: 10.1136/bmj.2.6045.1165.

MOHARERI, M.; MIRHOSSEINI, A.; MEHRABAN, S.; FAZELI B. Thromboangiitis obliterans episode: autoimmune flare-up or reinfection? **Vascular Health and Risk Management**, v.14, p. 247-251, 2018. DOI: 10.2147/VHRM.S172047

MORRIS, G.; PURI, B. K.; OLIVE, L.; CARVALHO, A.; et al. Endothelial dysfunction in neuroprogressive disorders-causes and suggested treatments. **BMC Medicine**, v. 18, n. 305, p. 1-31, 2020. <https://doi.org/10.1186/s12916-020-01749-w>

NABIH, E. S.; EL-KHARASHI, O. A. Targeting HMGB1/TLR4 axis and miR-21 by rosuvastatin: role in alleviating cholestatic liver injury in a rat model of bile duct ligation. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v. 392, n. 1, p. 37-43, 2019. doi: 10.1007/s00210-018-1560-y.

OHTA, T.; ISHIOASHI, H.; HOSAKA, M.; SUGIMOTO, I. Clinical and social consequences of Buerger disease. **J Vasc Surg.**, v. 39, n. 1, p. 176-80, 2004. doi: 10.1016/j.jvs.2003.08.006.

OLIVIERI, F.; PRATTICCHIZZO, F.; GIULIANI, A.; MATAACCHIONE, G.; RIPPO, M. R.; SABBATINELLI, J.; BONAFÈ, M. miR-21 and miR-146a: The microRNAs of inflammaging and age-related diseases. **Ageing Res Rev.**, v. 70, n. 101374, 2021. doi: 10.1016/j.arr.2021.101374.

OTAWA, T.; JUGI, T.; KAWANO, N.; MISHIMA, Y.; TOYAMA, H. Letter: HL-A antigens in thromboangiitis obliterans. **JAMA**, v. 230, n. 8, p. 1128, 1974. doi: 10.1001/jama.230.8.1128.

PAN, X.; HOU, R.; MA, A.; WANG, T.; WU, M.; ZHU, X.; YANG, S.; XIAO, X. Atorvastatin Upregulates the Expression of miR-126 in Apolipoprotein E-knockout Mice with Carotid Atherosclerotic Plaque. **Cell Mol Neurobiol.**, v. 37, n. 1, p. 29-36, 2017. doi: 10.1007/s10571-016-0331-x.

PAPA, M.; BASS, A.; ADAR, R.; HALPERIN, Z.; SCHNEIDERMAN, J.; BECKER, C. G.; et al. Autoimmune mechanisms in thromboangiitis obliterans (Buerger's disease): the role of tobacco antigen and the major histocompatibility complex. **Surgery**, v. 111, n.5, p. 527-31, 1992. PMID: 1598672.

PASEBAN, M.; MARJANEH, R. M.; BANACH, M.; RIAHI, M. M.; BO, S.; SAHEBKAR, A. Modulation of microRNAs by aspirin in cardiovascular disease. **Trends Cardiovasc Med.**, v. 30, n. 5, p. 249-254, 2020. doi: 10.1016/j.tcm.2019.08.005.

PINGLE, S. K.; TUMANE, R. G.; JAWADE, A. A. Neopterin: Biomarker of cell-mediated immunity and potent usage as biomarker in silicosis and other occupational diseases. **Indian J Occup Environ Med.**, v. 12, n. 3, p. 107-111, 2008. doi:10.4103/0019-5278.44690

RINN, J. L.; CHANG, H. Y. Genome regulation by long noncoding RNAs. **Annu Rev Biochem.**, v. 81, p. 145-66, 2012. doi: 10.1146/annurev-biochem-051410-092902.

RONDINA, M. T.; WEYRICH, A. S. Regulation of the genetic code in megakaryocytes and platelets. **J Thromb Haemost.**, v. 13, Suppl 1, p. S26-32, 2015. doi: 10.1111/jth.12965.

SAS Institute Inc. **SAS/STAT® User's Guide**, Version 9.2, Cary, NC: SAS Institute Inc., 2013.

SCHALL, R. Estimation in generalized linear models with random effects. **Biometrika**, v. 78, n. 4, p 719-727, 1991. <https://doi.org/10.1093/biomet/78.4.719>

SHI, Z. F.; FANG, Q. B.; LIMU, S.; JIAREKE, T.; GE, X. H. Association Between Three SNPs and Thromboangiitis Obliterans in Xinjiang Uyghur Population. **Genet Test Mol Biomarkers**, v. 20, n. 2, p. 55-62, 2016. doi: 10.1089/gtmb.2015.0264.

SHIN, V. Y.; JIN, H.; NG, E. K.; CHENG, A. S.; CHONG, W. W.; WONG, C. Y.; et al. NF- κ B targets miR-16 and miR-21 in gastric cancer: involvement of prostaglandin E receptors. **Carcinogenesis**, v. 32, n. 2, p. 240-5, 2011. doi: 10.1093/carcin/bgq240.

SHIONOYA, S. What is Buerger's disease? **World J Surg.**, v. 7, n. 4, p. 544-51, 1983. <https://doi.org/10.1007/BF01655948>

SUN, X. L.; LAW, B. Y.; de SEABRA RODRIGUES DIAS, I. R.; MOK, S. W. F.; HE, Y. Z.; WONG, V. K. Pathogenesis of thromboangiitis obliterans: Gene polymorphism and immunoregulation of human vascular endothelial cells. **Atherosclerosis**, v. 265, p. 258-65, 2017. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.08.009.

TANG, S. T.; WANG, F.; SHAO, M.; WANG, Y.; ZHU, H. Q. MicroRNA-126 suppresses inflammation in endothelial cells under hyperglycemic condition by targeting HMGB1. **Vascul Pharmacol.**, v. 88, p. 48-55, 2017. doi: 10.1016/j.vph.2016.12.002.

VICZENCZOVA, C.; KURA, B.; EGAN BENOVA, T.; YIN, C.; KUKREJA, R. C.; SLEZAK, J.; TRIBULOVA, N.; SZEIFFOVA BACOVA, B. Irradiation-Induced Cardiac Connexin-43 and miR-21 Responses Are Hampered by Treatment with Atorvastatin and Aspirin. **Int J Mol Sci.**, v. 19, n. 4, p. 1128, 2018. doi: 10.3390/ijms19041128.

VLACHOS, I. S.; ZAGGANAS, K.; PARASKEVOPOULOU, M. D.; GEORGAKILAS, G.; KARAGKOUNI, D.; VERGOULIS, T.; DALAMAGAS, T.; HATZIGEORGIOU, A. G. DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. **Nucleic Acids Res.**, v. 43, n. W1 p. W460-6, 2015. doi: 10.1093/nar/gkv403.

WAHLESTEDT, C. Targeting long non-coding RNA to therapeutically upregulate gene expression. **Nat Rev Drug Discov.**, v. 12, n. 6, p. 433-46, 2013. doi: 10.1038/nrd4018.

WANG, S.; AURORA, A. B.; JOHNSON, B. A.; QI, X.; MCANALLY, J.; HILL, J. A.; et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. **Dev Cell**, v. 15, n. 2, p. 261-71, 2008. doi: 10.1016/j.devcel.2008.07.002.

YANG, H.; WANG, H.; CZURA, C. J.; TRACEY, K. J. The cytokine activity of HMGB1. **J Leukoc Biol.**, v. 78, n. 1, p. 1-8, 2005. doi: 10.1189/jlb.1104648.

ZHANG, J. J.; ZHANG, Y. Z.; PENG, J. J.; LI, N. S.; XIONG, X. M.; MA, Q. L.; LUO, X. J.; LIU, B.; PENG, J. Atorvastatin exerts inhibitory effect on endothelial senescence in hyperlipidemic rats through a mechanism involving down-regulation of miR-21-

5p/203a-3p. **Mech Ageing Dev.**, v. 169, p. 10-18, 2018. doi: 10.1016/j.mad.2017.12.001.

ZHANG, J.; REN, J. Y.; CHEN, H.; HAN, G. P. Statins decreases expression of five inflammation-associated microRNAs in the plasma of patients with unstable angina. **Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**, v. 47, n. 5, p. 761-8, 2015. PMID: 26474612.

ZHANG, W.; TAN, Y.; MA, H. Combined aspirin and apatinib treatment suppresses gastric cancer cell proliferation. **Oncol Lett.**, v. 14, n. 5, p. 5409-5417, 2017. doi: 10.3892/ol.2017.6858.

ZHAO, B.; SHI, Z.; ZHANG, S.; LIU, C.; XIE, J.; ZHAO, W. miR-21 promotes expression of NF- κ B and NLRP3 in mouse RAW264.7 cells by inhibiting A20. **Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi**, v. 37, n. 2, p. 140-145, 2021. PMID: 33504420

ZHAO, Y.; XU, Y.; LUO, F.; XU, W.; WANG, B.; PANG, Y.; et al. Angiogenesis, mediated by miR-21, is involved arsenite-induced carcinogenesis. **Toxicol Lett**, v. 223, n. 1, p. 35-41, 2013. doi: 10.1016/j.toxlet.2013.08.020.

9. APÊNDICES

Termo de consentimento livre e esclarecido (Grupo estudo)

Título do estudo: AVALIAÇÃO DO PERFIL DE MICRORNA EM PACIENTES COM TROMBOANGEÍTE OBLITERANTE.

Marcadores em investigação: Quantificações plasmáticas dos microRNAs 21, 126, 181b. Nome do investigador principal: Breno Pinheiro Rossoni.

Instituição: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – HCFMRP-USP.

Introdução:

Você está sendo convidado para participar de um estudo de pesquisa clínica que envolve a doação de pequenas amostras de sangue, cerca de três colheres de sopa (30ml) em consultas de seguimento da Tromboangeíte Obliterante. As sobras das amostras de sangue que não forem usadas, serão desprezadas.

Este documento descreve o estudo para o qual você está sendo convidado a participar e o que o estudo envolverá. Leia este documento com cuidado e não hesite em fazer qualquer pergunta a qualquer momento.

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária. Cabe a você decidir se quer participar ou não. Se decidir participar, você receberá uma cópia assinada deste documento para guardar. Ainda, se decidir participar, você pode mudar de idéia em qualquer momento e se retirar do estudo sem dar explicações. Isso não irá afetar o padrão de assistência médica que recebe.

Natureza e objetivo do estudo:

Este estudo de pesquisa clínica está sendo conduzido por seu médico para avaliar algumas substâncias presentes no seu sangue como marcadores da doença Tromboangeíte Obliterante. Você está sendo convidado a participar neste estudo de pesquisa clínica porque é portador de Tromboangeíte Obliterante, uma doença que ainda não se conhece por completo como ocorre seu desenvolvimento, embora seja

clara a sua relação com o tabagismo. Ainda não há tratamento específico que busque a cura dessa doença. Mesmo assim, há diversas opções terapêuticas que buscam controlar os sintomas e as sequelas causadas pela atividade da doença.

Ao participar desse trabalho você contribuirá para entender melhor a Tromboangeíte Obliterante, o que é fundamental para o desenvolvimento de novos tratamentos.

TCLE ESTUDO VERSÃO 2 Atualizado em 06/06/2018 1

Duração do estudo:

A sua participação como voluntário deverá ter a duração máxima de 6 meses.

Procedimentos do estudo:

Marco 0: Entraremos em contato para atendimento em consulta no ambulatório de cirurgia vascular e esclareceremos dúvidas sobre o estudo.

Marco dia 1: Você comparecerá ao ambulatório de cirurgia vascular para coleta de amostra de sangue.

Marco 6 meses: Novo retorno será solicitado para coleta de outra amostra de sangue.

Riscos e benefícios:

A coleta de sangue trará dor leve e pode deixar um hematoma (marca roxa) no local da picada. O estudo não trará benefício direto para você. Não se sabe se os dados obtidos com a coleta de sangue irão ajudar a descobrir meios (medicações, etc.) para melhorar o tratamento da Tromboangeíte Obliterante.

É possível que a sociedade possa se beneficiar deste estudo. Existe uma possibilidade de que as informações obtidas neste estudo possam ajudar no desenvolvimento futuro de um novo tratamento para pacientes portadores dessa doença.

Custos, não remuneração e compensação:

Não haverá remuneração e nem ressarcimento de despesas com transporte e/ou alimentação, uma vez que você virá nos retornos regulares e não por causa da pesquisa.

Confidencialidade:

A garantia de sigilo dos seus dados, de acordo com as normas brasileiras, será assegurada. Os tubos coletados serão numerados, sendo de conhecimento exclusivo do pesquisador principal a que paciente corresponderá o número identificador (por exemplo: tubos 1 são amostras de sangue do paciente José Antônio).

Todos os pacientes desse estudo serão acompanhados/atendidos em suas consultas de seguimento pelo investigador principal o qual realizará as coletas de sangue. No entanto, existem riscos mínimos de quebra de privacidade e/ou confiabilidade.

Participação voluntária:

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária; você não é obrigado a participar. Seu tratamento e relacionamento com seu médico não serão afetados pela sua decisão de participar ou não deste estudo. Caso você se recuse a participar deste estudo, você não será penalizado de nenhuma forma e sua decisão não prejudicará qualquer cuidado médico ao qual você tem direito.

TCLE ESTUDO VERSÃO 2 Atualizado em 06/06/2018 2

Outras informações importantes:

O investigador principal deste estudo médico é o Dr. Breno Pinheiro Rossoni, que pode ser encontrada no seguinte endereço: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – HCFMRP-USP – Av. Bandeirantes, 3900 – 9º andar – Departamento de Cirurgia e Anatomia – Campus Universitário – Monte Alegre – CEP: 14049-900 – Ribeirão Preto/SP e telefone (horário comercial) 16 3602 2593 e celular: 27 98148-1168. Este estudo foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP- USP (016)3602-2228.

Se você concorda em participar desse projeto, por favor assine abaixo.

Nome do paciente: _____ (a ser preenchido pelo paciente)

Assinatura do paciente: _____ (ou nome e assinatura do representante legal, se aplicável)

Data: _____

Nome da testemunha: _____

Assinatura da testemunha: _____ (se aplicável)

Data: _____

Investigador / subinvestigador ou pessoa que conduziu a discussão sobre o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Confirmo que expliquei pessoalmente a natureza, propósito, duração, efeitos e riscos previsíveis do estudo ao paciente acima mencionado.

Nome: _____

Assinatura: _____ Data: _____

TCLE ESTUDO VERSÃO 2 Atualizado em 06/06/2018 3

Termo de consentimento livre e esclarecido (Grupo controle)

Título do estudo: AVALIAÇÃO DO PERFIL DE MICRORNA EM PACIENTES COM TROMBOANGEÍTE OBLITERANTE.

Marcadores em investigação: Quantificações plasmáticas dos microRNAs 21, 126, 181b. Nome do investigador principal: Breno Pinheiro Rossoni

Instituição: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – HCFMRP-USP.

Introdução:

Você está sendo convidado para participar de um estudo de pesquisa clínica que envolve a doação de pequenas amostras de sangue, cerca de três colheres de sopa (30ml). As sobras das amostras de sangue que não forem usadas, serão desprezadas.

Este documento descreve o estudo para o qual você está sendo convidado a participar e o que o estudo envolverá. Leia este documento com cuidado e não hesite em fazer qualquer pergunta a qualquer momento. Sua participação neste estudo é totalmente voluntária. Cabe a você decidir se quer participar ou não.

Se decidir participar, você receberá uma cópia assinada deste documento para guardar. Ainda, se decidir participar, você pode mudar de idéia em qualquer momento e se retirar do estudo sem dar explicações. Isso não irá afetar o padrão de assistência médica que recebe.

Natureza e objetivo do estudo:

Este estudo de pesquisa clínica está sendo conduzido por seu médico para avaliar algumas substâncias presentes no seu sangue como marcadores da doença Tromboangeíte Obliterante. Você está sendo convidado a participar neste estudo de pesquisa clínica porque não possui Tromboangeíte Obliterante. As dosagens realizadas serão comparadas com as dosagens nos pacientes portadores da doença nas fases ativa e inativa.

Ao participar desse trabalho você estará contribuindo para entender melhor a Tromboangeíte Obliterante, o que é fundamental para o desenvolvimento de novos tratamentos.

TCLE CONTROLE Versão 2 atualizado em 06/06/2018 1

Duração do estudo:

A sua participação como voluntário deverá ter a duração de 1 dia.

Procedimentos do estudo:

Marco 0: Entraremos em contato para atendimento em consulta no ambulatório de cirurgia vascular e esclareceremos dúvidas sobre o estudo.

Marco 1 mês: Você comparecerá ao ambulatório de cirurgia vascular para coleta de amostra de sangue.

Marco 6 meses: Novo retorno será solicitado para coleta de outra amostra de sangue.

Riscos e benefícios:

Não há risco a realização do exame clínico vascular e não há riscos quanto a contaminação, pois os materiais utilizados serão descartáveis. A coleta de sangue trará dor leve e pode deixar um hematoma (marca roxa) no local da picada.

O estudo não trará benefício direto para você. Não se sabe se os dados obtidos com a coleta de sangue irão ajudar a descobrir meios (medicações, etc.) para melhorar o tratamento da Tromboangiíte Obliterante.

É possível que a sociedade possa se beneficiar deste estudo. Existe uma possibilidade de que as informações obtidas neste estudo possam ajudar no desenvolvimento futuro de um novo tratamento para pacientes portadores dessa doença.

Participação voluntária:

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária. Você poderá decidir não participar ou interromper sua participação no estudo em qualquer momento, sem dar razão. Você não será penalizado e não perderá benefícios aos quais tem direito.

Seu médico irá informá-lo sobre quaisquer informações importantes que se tornem disponíveis durante o estudo e que possam afetar sua vontade em continuar participando neste estudo.

Custos, não remuneração e compensação:

O estudo não requererá nenhum custo para o paciente quanto a material utilizado. Não haverá remuneração e nem ressarcimento de despesas com transporte e/ou alimentação.

Confidencialidade:

A garantia de sigilo dos seus dados, de acordo com as normas brasileiras, será assegurada. Os tubos coletados serão numerados, sendo de conhecimento exclusivo do pesquisador principal a que paciente corresponderá o número identificador. No entanto, existem riscos mínimos de quebra de privacidade e/ou confiabilidade.

Outras informações importantes:

O investigador principal deste estudo médico é o Dr. Breno Pinheiro Rossoni, que pode ser encontrada no seguinte endereço: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – HCFMRP-USP – Av. Bandeirantes, 3900 – 9o andar – Departamento de Cirurgia e Anatomia – Campus Universitário – Monte Alegre – CEP: 14049-900 – Ribeirão Preto/SP e telefone (horário comercial) 16 3602 2593 e celular: 27 98148 1168. Este estudo foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP (016)3602-2228.

Se você concorda em participar desse projeto, por favor assinie abaixo.

Nome do paciente: _____ (a ser preenchido pelo paciente)

Assinatura do paciente: _____ (ou nome e assinatura do representante legal, se aplicável)

Data: _____

Nome da testemunha: _____

Assinatura da testemunha: _____ (se aplicável)

Data: _____

Investigador / subinvestigador ou pessoa que conduziu a discussão sobre o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Confirmo que expliquei pessoalmente a natureza, propósito, duração, efeitos e riscos previsíveis do estudo ao paciente acima mencionado.

Nome: _____

Assinatura: _____ Data:

TCLE CONTROLE Versão 2 atualizado em 06/06/2018 3