UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área de Análises Clínicas

Pesquisa de miRNAs Circulantes, Potenciais Biomarcadores de
Aterosclerose Subclínica em Indivíduos Euglicêmicos e Pré-
Diabéticos

Magda Elizabeth Graciano Saldarriaga

Dissertação Apresentada à Faculdade
de Ciências Farmacêuticas para a
Obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Titular Mario H. Hirata

São Paulo

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área de Análises Clínicas

Pesquisa de miRNAs Circulantes, Potenciais Biomarcadores de
Aterosclerose Subclínica em Indivíduos Euglicêmicos e Pré-
Diabéticos

Magda Elizabeth Graciano Saldarriaga

Versão Original

Dissertação Apresentada à Faculdade
de Ciências Farmacêuticas para a
Obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Titular Mario H. Hirata

São Paulo

2017

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

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

S162p Saldarriaga, Magda Elizabeth Graciano
Pesquisa de miRNAs circulantes, potenciais biomarcadores de aterosclerose subclínica em indivíduos euglicêmicos e pré-diabéticos / Magda Elizabeth Graciano Saldarriaga. -- São Paulo, 2017.
120p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Hirata, Mario Hiroyuki

1. Biologia molecular 2. Aterosclerose 3. Doença cardiovascular
I. T. II. Hirata, Mario Hiroyuki, orientador.

574.88 CDD

Magda Elizabeth Graciano Saldarriaga

Pesquisa de miRNAs Circulantes, Potenciais Biomarcadores de Aterosclerose
Subclínica em Indivíduos Euglicêmicos e Pré-diabéticos

Comissão Julgadora
da
Dissertação para Obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata
Orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2017.

Aos meus pais, Gloria e Heriberto.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter permitido que eu esteja aqui hoje e que recorresse este caminho de novos conhecimentos, ao lado de grandes pessoas que contribuíram a esta realização;

A mi orientador, Professor Mario Hirata, por ter me acolhido no seu laboratório e ter me guiado durante esta caminhada;

Aos pacientes e voluntários que participaram do estudo pela disposição e amizade;

Ao Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, em cabeça da Dra. Amanda Guerra de Moraes Rego Sousa, por colocar a disposição sua infraestrutura e funcionários para a realização deste estudo;

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas por ter me permitido fazer parte dessa nobre morada do conhecimento;

À professora Rosário por ter acompanhado de perto este processo;

A Cristina, por todos os ensinamentos, mas principalmente, por ter sido uma grande amiga que me acolheu na sua São Paulo;

Aos funcionários do Instituto Dante Pazzanese por tudo o suporte durante esta caminhada. Cilene da tomografia; Carmen e Maria do oitavo andar; o Senhor José Luiz do Vascular e a Néia do laboratório clínico. Doutores Marcelo Ferraz Sampaio, Ibraim Masciarelli Francisco Pinto, Rodrigo Bellio de Mattos Barretto, Ana Cláudia Gomes Pereira Petisco, Mohamed Hassan Saleh, Adriana Bertolami, Lara Reinel de Castro e Neire Niara Ferreira. Sem eles nada disso teria acontecido;

Ao pessoal do LIMC, Jéssica, Gisele, Lin, Helena, Adriana Thais, Elisangela, Ana, Larissa. Mais do que colegas foram meus amigos;

A os meus amigos do LBMAD que se tornaram a minha família no Brasil: Aécio, Juliana, Vivian, Brayan, Lígia, Bruna, Gabriela, Jóas, Marina;

A Laure por todos os dias de coleta;

A Duván e Paula, meus amigos da Colômbia, obrigada pela amizade e companhia;

À agência de fomento CNPq, pela bolsa e os recursos para a execução da pesquisa;

Finalmente, não poderia deixar de agradecer a minha família por ter acreditado e ter me impulsado cada dia. Alejandro meu companheiro de vida, sem você isso não teria sido possível.

De coração, muito obrigada!

RESUMO

SALDARRIAGA, M.E.G. **Pesquisa de miRNAs circulantes, potenciais biomarcadores de aterosclerose subclínica em indivíduos euglicêmicos e pré-diabéticos.** 2017. 120f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

As doenças cardiovasculares e o diabetes melito fazem parte das DCNT prioritárias da OMS, devido às altas taxas de morbimortalidade e incapacidade que geram a cada ano. Estima-se que no mundo existam 387 milhões de diabéticos e outros 316 milhões de pessoas com características de risco, como pré-diabete. Cerca de 60% dos pacientes com DM2 desenvolvem doença cardiovascular, a qual inicia de forma concomitante aos distúrbios do metabolismo da glicose, podendo existir mecanismos fisiopatológicos comuns entre as doenças. Metade dos eventos coronarianos, inclusive a morte súbita, ocorrem em indivíduos assintomáticos, evidenciando a necessidade de novos marcadores precoces, já que em muitos deles a morte é a primeira manifestação. Recentemente, tem sido sugerido que os miRNAs envolvidos na regulação da expressão gênica podem ser caracterizados como biomarcadores em diversas doenças. Nosso objetivo é identificar alterações no perfil de miRNAs circulantes em indivíduos euglicêmicos e pré-diabéticos com e sem aterosclerose subclínica, utilizando a tecnologia de qPCR *Arrays*, com a finalidade de identificar candidatos a biomarcadores moleculares dessa condição. Encontrou-se que a aterosclerose subclínica esteve associada com o envelhecimento, a menopausa, etnia branca, dislipidemia, resistência à insulina, o aumento da adiposidade, leptina e do TNF- α . O aumento do miR98-5p e a diminuição dos miRNAs miR-212-3p, miR-145-5p, miR-93-5p, miR15a-5p, miR-19a-3p, miR32-5p levaram a ativação da via de sinalização da aterosclerose. Os resultados sugerem que a inflamação foi o principal mecanismo associado com o desenvolvimento de aterosclerose subclínica neste estudo.

Palavras-chave: Pré-diabete, aterosclerose subclínica, Diabetes Melito tipo 2, doença arterial coronariana, miRNAs, biomarcadores.

ABSTRACT

SALDARRIAGA, M.E.G. **Search of circulating miRNAs, potential biomarkers of subclinical atherosclerosis in euglycemic and pre-diabetic subjects.** 2017. 120f. Dissertation (Master's degree) – School of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2017.

Cardiovascular Disease and Diabetes *Mellitus* are relevant NCDs for the WHO. It's estimated that, worldwide, there are 387 millions of diabetics and 316 millions of people with risk characteristics like prediabetes. About 60% of patients with T2DM develops cardiovascular disease, which starts at the same time as disorders of glucose metabolism, there may be common pathophysiological mechanisms among diseases. Half of coronary events, including sudden death, occurs in asymptomatic individuals. This fact, highlights the need for new early markers of the disease, especially in asymptomatic patients, since in many of them, death is the first manifestation. It has been recently suggested that miRNAs involved in pos-transcriptional regulation of gene expression, could be characterized as biomarkers of diseases. Our goal is to identify changes in the profile of circulating microRNAs in euglycemic and prediabetic patients with or without subclinical atherosclerosis, by quantitative Polymerase Chain Reaction array (qPCR *Array*) in order to find molecular biomarkers of this condition. We found that subclinical atherosclerosis was associated with aging, menopause, white ethnicity, dyslipidemia, insulin resistance, increased adiposity, leptin and TNF- α . The up-regulation of miR98-5p and the down-regulation miR-212-3p, miR-145-5p, miR-93-5p, miR15a-5p, miR-19a-3p, miR32-5p led to activation of the signaling pathway of atherosclerosis. The results suggest that inflammation was the main mechanism associated with the development of subclinical atherosclerosis in this study.

Keywords: Prediabetes, subclinical atherosclerosis, type 2 diabetes mellitus, coronary heart disease, miRNAs, biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Progressão da alteração do metabolismo da glicose.....	26
Figura 2 - Curso das complicações do diabetes	27
Figura 3 - Biogênese dos miRNAs.....	29
Figura 4 - Mecanismo de ação dos miRNAs.....	30
Figura 5 - Metabolismos dos miRNAs circulantes.	31
Figura 6 - Papel dos miRNAs no desenvolvimento da aterosclerose.....	34
Figura 7- Fluxograma do estudo	36
Figura 8 - Critérios diagnósticos de diabetes e seus estágios intermediários.....	39
Figura 9 - Fluxograma da análise de miRNAs	42
Figura 10 - Síntese de cDNA utilizando o <i>kit miScript II RT</i>	44
Figura 11 - Desenho da placa de Controle de qualidade	45
Figura 12 - Desenho da placa <i>miScript miRNA PCR array Human miFinder 384 HC</i>	47
Figura 13 - Algoritmo de predição de alvos de miRNAs no <i>Ingenuity®</i> , utilizando o “ <i>miRNA target Filter</i> ”.....	50
Figura 14 - Gráfico da distribuição dos grupos por idade, etnia, menopausa e dislipidemia.....	54
Figura 15 - Gráfico da distribuição dos grupos segundo o perfil glicêmico	57
Figura 16 - Gráficos de dispersão da distribuição dos grupos segundo a concentração da ApoB-100 e Leptina	58
Figura 17- Resultados do controle de qualidade das amostras de cDNA incluídas no perfil de miRNAs	60
Figura 18 - Gráficos de barras representando a distribuição dos grupos para as variáveis sedentarismo, HAS e classificação por IMC.....	62
Figura 19 - Gráfico de caixas com barras de erro representando a distribuição dos grupos segundo o IMC, CA e PAD.....	62
Figura 20 - miRNAs desregulados nos pacientes com pré-diabete.....	68
Figura 21 - miRNAs desregulados nos pacientes com aterosclerose subclínica	69
Figura 22 - miRNAs desregulados nos pacientes com aterosclerose subclínica e Pré-diabete	71
Figura 23 - Resumo do Protocolo da Pesquisa e Resultados.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Perfil clínico e biodemográfico dos pacientes classificados segundo o perfil glicêmico e a aterosclerose subclínica	53
Tabela 2- Perfil antropométrico dos pacientes classificados segundo o perfil glicêmico e a aterosclerose subclínica	55
Tabela 3- Perfil bioquímico dos pacientes distribuídos nos grupos de glicemia e aterosclerose subclínica	56
Tabela 4- Perfil inflamatório e adipocinas dos pacientes distribuídos nos grupos de glicemia e aterosclerose subclínica.	58
Tabela 5- Perfil clínico e biodemográfico dos pacientes incluídos no perfil de miRNAs, classificados nos grupos glicemia e aterosclerose subclínica.....	61
Tabela 6- Perfil antropométrico dos pacientes incluídos no perfil de miRNAs, classificados nos grupos glicemia e aterosclerose subclínica	63
Tabela 7- Perfil bioquímico dos pacientes incluídos no perfil de miRNAs, classificados nos grupos glicemia e aterosclerose subclínica	63
Tabela 8- Perfil de expressão dos miRNAs nos grupos de glicemia e a aterosclerose	66

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. miRNAs com Expressão Aumentada	65
Quadro 2. miRNAs com Expressão Diminuída	65
Quadro 3. miRNAs desregulados nos pacientes com pré-diabete.	67
Quadro 4. miRNAs desregulados nos pacientes com aterosclerose subclínica.	69
Quadro 5. miRNAs desregulados nos pacientes com aterosclerose subclínica e pré-diabete.	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA – Associação Americana de Diabetes
ADAMTS7 – Metalopeptidasa ADAM com trombospondina tipo 1 motivo 7
AGE – Produtos de Glicação Avançada
AGJ – Alteração da Glicemia de Jejum
AGL – Ácidos Graxos Livres
ALOX5 – Lipooxigenase 5
ALT – Alanina Transaminase
ANOVA – Análise de Variâncias
ApoA – Apolipoproteína A I
ApoB – Apolipoproteína B
ApoB-100 – Apolipoproteína B isoforma 100
ARIC – Atherosclerosis Risk in Communities
AST – Aspartato Transaminase
ATG – Alteração da Tolerância à Glicose
AVC – Acidente Vascular Cerebral
BCL2 – Regulador de apoptose BCL2
CA – Circunferência Abdominal
cDNA – DNA complementar
Ce – *Spike-in* Cel-miR-39
CHD – Coronary Heart Disease
COL1A2 – Colágeno Tipo I alfa 2
Ct – Ciclo de *Threshold*
CXCL12 – Quimiocina CXC de linfócitos 12
CXCL8 – Quimiocina CXC de linfócitos 8, Precursor da IL-8
DAC – Doença Arterial Coronariana
DCNT – Doenças Crônicas não Transmissíveis
DCV – Doença Cardiovascular
DLP – Dislipidemia
DM – Diabetes Melito
DM1 – Diabetes Melito Tipo 1
DM2 – Diabetes Melito tipo 2
DMG – Diabetes Melito Gestacional
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs – Dideoxirribonucleotídeos trifosfatados
DPP – Programa de Prevenção do Diabetes
EC – Escore de Cálcio
EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EMI – Espessura Médio Intimal
eNO – Óxido Nítrico endotelial
ERF – Escóre de Risco de *Framingham*
Eu-Neg – Euglicemia aterosclerose negativa

Eu-Pos – Euglicemia ateroesclerose positiva
FCF – Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FGFR1 – Receptor 1 do Fator de Crescimento de Fibroblastos
FID, IDF – Federação Internacional de Diabetes
Glicemia 2h – Glicemia 2 horas pós-carga de 75gramos de dextrosol®
GRB2 – Proteína 2 ligada ao Receptor de Fator de Crescimento
GTP – Guanosina Trifosfato
HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica
Hb – Hemoglobina
HbA1c – Hemoglobina Glicada
HDLc – Colesterol da Lipoproteína de Alta Densidade
HOMA – Modelo de avaliação da Homeostase da Insulina
HOMA2 – Modelo atualizado de avaliação da Homeostase da Insulina
HOMA-%B – Modelo de avaliação da Homeostase– Porcentagem de Produção das células Beta
HOMA-%S – Modelo de avaliação da Homeostase– Porcentagem de sensibilidade
HOMA-IR – Modelo de avaliação da Homeostase– Porcentagem de Resistência à Insulina
hsa – *homo sapiens*
IAM – Infarto Agudo do Miocárdio
ICAM-1 – Molécula de Adesão intercelular 1
IDPC – Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
IL-1-β – Interleucina 1 Beta
IL-6 – Interleucina-6
IL-8 – Interleucina-8
IMC – Índice de Massa Corpórea
IMS – Isquemia Miocárdica Silenciosa
IPA – *Ingenuity Pathway Analysis*
IRS1 – Substrato 1 do Receptor de Insulina
JAK1 – Janus quinase 1
LDLc – Colesterol da Lipoproteína de Baixa Densidade
LEP – Leptina
LIMC – Laboratório de Investigação Molecular em Cardiologia
MAP2K4 – Proteína Cinase 4 ativada por mitógeno de dupla especificidade
MAPK3 – Proteína Cinase 3 ativada por mitógeno
MCP-1 – Proteína Quimioatraente de Monócitos 1
MESA – Estudo Multi-Étnico da Aterosclerose
miR, miRNA – microRNA
miRTC – Controle Transcrição Reversa
MMP – Metaloproteinase de Matriz
MMP1 – Metaloproteinase de matriz 1
MMP3 – Metaloproteinase de matriz 3
MMP9 – Metaloproteinase de matriz 9
mRNA – Ácido Ribonucleico Mensageiro
M-SCF – Fator Estimulante de Colônias de Monócitos
NCD –Non-Communicable Diseases

NEO – Estudo *The Netherlands Epidemiology of Obesity*
NO – Óxido Nítrico
Oligo-dT – Oligonucleotídeo de Timina
OMS – Organização Mundial de Saúde
OR – Odds Ratio
p – Valor de p
PAD – Pressão Arterial Diastólica
PAI-1 – Inibidor do Ativador do Plasminogênio 1
PAS – Pressão Arterial Sistólica
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PCRus – Proteína C Reativa ultrasensível
PoliA – Poli adenina
PPARG – Receptor Ativado por Proliferador do Peroxissoma Gama
PPC – Controle Positivo da PCR
Pré-Neg – Pré-diabete aterosclerose negativa
Pré-Pos – Pré-diabete aterosclerose positiva
Pré-miRNA – miRNA precursor
Pri-miRNA – miRNA primário
PRKD1 – Proteína cinasa D1
PTPN11 – Proteína tirosina fosfatase, não-receptor tipo 11
QC – Controle de Qualidade
qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real Quantitativa
RELA – Fator de Transcrição p65
RISC – Complexo de Silenciamento Induzido por RNA
RNA – Ácido Ribonucleico
ROS – Espécies Reativas de Oxigênio
rpm – Revoluções por minuto
RT-qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real Quantitativa com transcriptase inversa
SBD – Sociedade Brasileira de Diabetes
SM – Síndrome Metabólica
SN1 – SNORD61
SN2 – SNORD68
SN3 – SNORD 72
SN4 – SNORD95
SN5 – SNORD96A
SN6 – RNU6B/RNU6-2
T2DM – *Type 2 Diabetes Mellitus*
T3 – Triiodotironina
T4 – Tiroxina
T4L – Tiroxina Livre
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- β – Fator de Transformação do Crescimento Beta
TNF, TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alfa
TOTG – Teste Oral de Tolerância à Glicose

TSH – Hormônio Estimulante da Tireoide

USG – Ultrassonografia

USP – Universidade de São Paulo

UTR – Região Não-Traduzida

VCAM-1 – Molécula de adesão da Célula Vascular-1

VLDLc – Colesterol da Lipoproteína de Muito Baixa Densidade

VSMC – Células Vasculares Musculares Lisas

WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	19
1.1	EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA CARDIOVASCULAR E O DIABETE MELITO	19
1.3	DIABETE MELITO TIPO 2 (DM2).....	25
1.4	PRÉ-DIABETE E DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA	27
1.5	BIOLOGIA DOS microRNAs	28
1.6	RELAÇÃO ENTRE OS miRNAs, O DM E A DAC.....	31
2.1	OBJETIVO GERAL	35
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
3.	PACIENTES E MÉTODOS	36
3.1	CASUÍSTICA.....	37
3.1.1	Critérios de não Inclusão	38
3.1.2	Considerações éticas.....	38
3.4	AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	40
3.5	DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS	41
3.6	ANÁLISES DOS microRNAs	42
3.6.1	Extração de miRNA.....	42
3.6.2	Síntese de cDNA	43
3.6.3	Controle de qualidade das amostras de cDNA para o Array de miRNAs.....	44
3.6.4	Perfil de miRNAs pela qPCR Array	46
3.6.5	Análises bioinformáticas	47
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	51
5.	RESULTADOS	52
5.1.1	Características Clínicas e Biodemográficas	52
5.1.2	Medidas Antropométricas	54
5.1.3	Características Bioquímicas.....	55
5.2	PERFIL DE miRNAs UTILIZANDO <i>RT-qPCR ARRAY</i>	59
5.2.1	Controle de Qualidade	59
5.2.2	Características dos pacientes incluídos no perfil de miRNAs.....	59
5.2.3	Perfil de Expressão de miRNAs durante a Pré-diabete e Aterosclerose	64
5.3	ANÁLISE DE PREDIÇÃO DE ALVOS.....	67
5.3.1	Grupo Pré-diabéticos sem Aterosclerose	67
5.3.2	Grupo Euglicêmicos com Aterosclerose.....	68
5.3.3	Grupo Pré-diabéticos com aterosclerose.....	70
6.	DISCUSSÃO	72
7.	CONCLUSÕES	83
8.	LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	84
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
	ANEXOS.....	97
	ANEXO A: Normograma do estudo MESA para avaliação da espessura médio-intimal carotídea.	98

.....	98
ANEXO B: Normograma do estudo Bogalusa para avaliação de espessura médio-intimal carotídea.	99
ANEXO C: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	100
ANEXO D: Parecer CEP Faculdade de Ciências Farmacêuticas	102
ANEXO E: Parecer CEP Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia	107
ANEXO F: TCLE Seção de Tomografia	112
ANEXO G: Ficha Clínica	113
ANEXO H: Ficha do aluno Sistema Janus-USP.....	116
.....	118
.....	119
ANEXO I: Informações para os Membros da Banca Julgadora	120

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA CARDIOVASCULAR E O DIABETE MELITO

As Doenças Cardiovasculares (DCV) e o Diabetes Melito (DM) fazem parte das quatro doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) priorizadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) por serem responsáveis por 82% das mortes por DCNT (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). Segundo a Federação Internacional de Diabetes (FID), em 2015, 5,1 milhões de falecimentos a cada ano são atribuíveis ao diabetes e dezenas de milhões de pessoas sofrem complicações incapacitantes e potencialmente letais. No mundo há 415 milhões de pessoas com diabetes (50% delas ainda não foram diagnosticadas) e outros 318 milhões com características de risco identificáveis como pré-diabetes, diabetes gestacional e resistência à insulina (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015) (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2014). Se nada for feito, até o ano de 2040 esse número aumentará para 642 milhões de pessoas com diabetes e 481 milhões em alto risco. Cinquenta por cento dessas mortes ocorrem em indivíduos em idade produtiva (menores de 60 anos), pelo que as despesas mundiais da doença, estimadas em 673 mil milhões de dólares poderiam ser ainda maiores (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2013).

Estados Unidos e Brasil são os países da América com o maior número de casos. Em 2015 o diabetes afetava 29,3 milhões de pessoas nos Estados Unidos, cerca de 12,8% da população (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2014). No Brasil, o total de diabéticos em 2010 era de 7,6 milhões e em 2015 alcançou 14,3 milhões, uma cifra maior do que a projetada para o ano de 2030 (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2014) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2014). Nesse panorama mundial, o DM tipo 2 (DM2) é responsável por 90% desses casos e acredita-se que as taxas de prevalência aumentem ainda mais devido às mudanças globais no estilo de vida, na alimentação e ao envelhecimento da população (COLAGIURI, 2010).

O cenário das DCVs é ainda mais preocupante, pois são a principal causa de morte e incapacidade no mundo; em 2012 causaram 17,5 milhões de mortes, 31% de todas as mortes registradas, onde 7,4 milhões foram devidas à Doença Arterial Coronariana (DAC) e 6,7 a

Acidente Vascular Cerebral (AVC) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). Estima-se que em 2030 o número de mortes por DCV alcançará os 23,3 milhões de pessoas e se prevê que continuará sendo a principal causa de morte no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

Os dados da América Latina, incluindo o Brasil, são semelhantes: cerca de 30% das mortes no Brasil são devidas à DCV, principalmente DAC e AVC, e 40% das mortes ocorrem antes dos 60 anos de idade (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2013)(TAYLOR, 2010). Particularmente nos indivíduos diabéticos, a DAC e o AVC são as principais complicações crônicas, responsáveis por 60% das mortes nessa população (GO et al., 2014).

As altas taxas de morbidade e mortalidade e o alto custo socioeconômico que acarretam essas doenças têm alarmado todas as agências de saúde e sociedades científicas, as quais vêm propondo planos para prevenir seu desenvolvimento e complicações (FEDERACIÓN INTERNACIONAL DE DIABETES, 2011) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGÍA, 2014). Os principais fatores de risco para o desenvolvimento de DCV - tabagismo, obesidade, sedentarismo, dietas inadequadas, hipertensão arterial, hiperglicemia e as dislipidemias - são também fatores predisponentes para a resistência à insulina; (MCGILL H.C. et al., 2000). A maioria desses fatores são modificáveis e, em muitos casos, até reversíveis, se intervenções acessíveis como perda de peso, dietas baixas em gorduras totais e saturadas e rotinas de exercício aeróbico pelos menos três vezes por semana são adotadas (KNOWLER et al., 2002)(LINDSTRÖM et al., 2006).

1.2 FISIOPATOLOGIA DA DAC

As DCVs correspondem aos transtornos do coração e dos vasos sanguíneos e se classificam em dois grupos segundo a sua fisiopatologia: 1) DCVs devidas à aterosclerose e 2) outros tipos de DCVs que incluem as cardiopatias congênitas, reumáticas, miocardiopatias e arritmias cardíacas, entre outras (BASTA; SCHMIDT; DE CATERINA, 2004). As doenças cardiovasculares devidas à aterosclerose compreendem a DAC, o AVC e as doenças da aorta e outras artérias, como o aneurisma. Nesse grupo, a DAC e o AVC são as que apresentam as mais altas taxas de prevalência e óbitos, como já foi exposto na seção anterior.

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que acomete principalmente artérias de médio e grande calibre (EPSTEIN; ROSS, 1999). Estudos *post-mortem* avaliando corações de jovens que lutaram na guerra do Vietnã demonstraram que pelo menos 50% dos indivíduos apresentava algum grau de aterosclerose, indicando que a doença aterosclerótica inicia na infância e na adolescência (MCGILL H.C. et al., 2000).

A doença se desenvolve em resposta a uma agressão endotelial com formação inicial da estria gordurosa, caracterizada pelo depósito de lipídeos e pela presença de células inflamatórias (LIBBY, 2006). Fatores como a elevação do colesterol LDL, diminuição do colesterol HDL, tabagismo, hipertensão arterial, hiperglicemia, obesidade e a resistência à insulina têm sido associados com o desenvolvimento da aterosclerose; isto, devido à disfunção endotelial que produzem, fazendo-o permeável às lipoproteínas plasmáticas e propenso à adesão dos leucócitos (EPSTEIN; ROSS, 1999).

Na hiperglicemia crônica as moléculas de glicose agem direta ou indiretamente sobre o endotélio. Causam diminuição de fatores protetores no endotélio como o óxido nítrico endotelial (eNO), aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela mitocôndria devido ao estresse oxidativo e, glicação não enzimática de macromoléculas como o colágeno e LDLs (BASTA; SCHMIDT; DE CATERINA, 2004)(PANENI et al., 2013). Essas moléculas ativam o fator de transcrição NF- κ B, principal regulador da resposta inflamatória, com a consequente proliferação de células inflamatórias, liberação de citocinas e expressão de moléculas de adesão (CHAIT; BORNFELDT, 2009) (BAKER; HAYDEN; GHOSH, 2011).

As células endoteliais quando ativadas expressam moléculas de adesão (VCAM-1, ICAM-1, E-seletina), fatores de crescimento de monócitos (M-CSF) e quimiocinas como o fator quimiotático de monócitos (MCP-1), para recrutar mononucleares ao local da lesão arterial. Por sua vez, esses monócitos atraídos ao sítio, proliferam e se diferenciam em macrófagos que expressam receptores *scavengers* para fagocitar as LDLs oxidadas, transformando-se, assim, nas células espumosas típicas da estria gordurosa; ademais produzem também citocinas pró inflamatórias IL-6, TNF- α , IL-1, entre outras (LIBBY, 2006).

Conforme a estria gordurosa evolui, essas citocinas pró inflamatórias produzidas pelos macrófagos estimulam as células do músculo liso (VSMC) a migrarem da camada média à

intima e produzir matriz extracelular, base da lesão avançada. A capa fibrosa vai cobrindo a lesão e os macrófagos começam a morrer, formando um núcleo necrótico rico em lipídeos e moléculas pró inflamatórias. Simultaneamente, os linfócitos atraídos ao sítio da lesão através da sinalização mediada pelas citocinas produzidas pelas células endoteliais e os macrófagos, induzem mais estímulos inflamatórios e produzem metaloproteinases (MMPs) que degradam a matriz, fragilizando a capa fibrosa (HANSSON, 2005).

Existem dois tipos de placas, as estáveis com predomínio de fibras colágenas e células musculares lisas; e as placas moles ou instáveis com maior atividade inflamatória, proteolítica, núcleo lipídico e necrótico proeminente e, capa fibrosa frágil. A identificação precoce dessas placas instáveis tem grande relevância clínica, já que podem-se romper e liberar o conteúdo altamente trombogênico na luz da artéria, ativar a cascata da coagulação com a subsequente formação do trombo, o qual pode obstruir de forma significativa a luz do vaso, provocando um infarto do miocárdio, AVC ou até a morte súbita (TOTH, 2008).

Nas artérias coronárias, as placas aparecem de preferência nos locais de maior turbulência de fluxo sanguíneo, como as ramificações das artérias epicárdicas (CHEN et al., 2012). A localização da obstrução influencia no tamanho da área do miocárdio que sofre isquemia. Isso determina a gravidade das manifestações clínicas, que vão desde a diminuição da capacidade de aumentar o fluxo para responder a situações de maior necessidade de oxigênio pelo miocárdio, até a produção de isquemia miocárdica em repouso com um mínimo de esforço (STEG et al., 2012).

A fase assintomática ou pré clínica da aterosclerose é conhecida como aterosclerose subclínica. A identificação dos pacientes durante este período tem muita relevância, já que podem ocorrer infartos do miocárdio em até 60% dos pacientes assintomáticos, o que aumenta ainda mais o risco de morte por DAC (SAJADIEH et al., 2005)(BARTHELEMY; LE FEUVRE; TIMSIT, 2007). Muitas rupturas das placas são clinicamente silenciosas. Marcas de cicatrização associadas a aumento de células musculares nas placas fibrosas têm sido observadas *post-mortem* em indivíduos com morte súbita, fenômeno conhecido como Isquemia miocárdica silenciosa (IMS) (TOTH, 2008). Nos pacientes diabéticos a IMS é dois a quatro vezes mais frequente do que nos indivíduos não diabéticos, além de serem fortes preditores de eventos coronarianos e morte precoce nessa população (COSSON et al., 2011).

Atualmente, são utilizados diversos escores de risco (Escore de *Framingham* ou ERF, Escore de *Reynolds*, escore global, entre outros) baseados em análises de regressão de estudos populacionais de grande porte para estimar o risco cardiovascular, a fim de iniciar ações precoces de prevenção primária ou secundária nos indivíduos identificados como de alto risco, e desse modo evitar desfechos fatais e incapacidades. A escolha de um ou outro escore depende das características da população a estudar e se a avaliação é a longo ou curto prazo (XAVIER et al., 2013). Contudo, os escores tradicionais apresentam problemas de subestimação ou superestimação em indivíduos de alto ou baixo risco, respectivamente (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2013).

Para melhorar a predição de risco nos indivíduos classificados em risco médio, tem sido proposta a utilização de critérios agravantes que permitam reclassificar adequadamente essas pessoas. A presença de aterosclerose subclínica identificada mediante exames de imagem, parâmetros bioquímicos e clínicos têm auxiliado nessa ré estratificação (XAVIER et al., 2013).

1.2.1 AVALIAÇÃO DA ATEROSCLEROSE SUBCLÍNICA

1.2.1.1 Escore de cálcio (EC)

A quantificação do cálcio nas artérias coronárias é feita mediante a tomografia computadorizada de múltiplos detectores sincronizada ao eletrocardiograma, sem a utilização de contraste endovenoso. O método se baseia na atenuação dos raios X pela presença de cálcio nas artérias descrito por Agatston em 1990, o qual leva em consideração o produto da área total calcificada, multiplicada por um fator derivado da densidade máxima (MCCLELLAND et al., 2006).

Múltiplos estudos mostraram que o EC é um bom preditor de DAC. No estudo *Multi-Ethnic Study in Atherosclerosis (MESA)*, mais de 6 mil indivíduos assintomáticos tiveram o EC quantificado e foi visto que a presença de aterosclerose subclínica (EC positivo) aumentava 7,7 vezes o risco de IAM ou morte por DAC nos indivíduos com EC entre 100 e 400, e 9,7 vezes para EC maiores do que 300 (MCCLELLAND et al., 2006).

Atualmente, a *Diretriz de dislipidemias e de aspectos da Diabetes Mellitus relacionados a cardiologia* da Sociedade Brasileira de Cardiologia, considera o EC como um

fator agravante que permite reclassificar os indivíduos numa categoria de risco maior. Os valores do EC podem ser dados tanto em números absolutos quanto por percentis ajustados para idade, sexo e etnia, sendo que os mais utilizados estão baseados no estudo MESA (SARA et al., 2014).

1.2.1.2 Medida da espessura médio-intimal das artérias carótidas

As artérias carótidas têm um componente muscular pequeno e predomínio da camada íntima. O aumento na espessura médio-intimal (EMI), medida pela ultrassonografia (USG) modo B, identifica e quantifica doença vascular subclínica e risco cardiovascular de forma não invasiva, sensível e reprodutível (STEIN et al., 2008).

Diversos estudos têm mostrado associação entre aumento da EMI e incidência de DAC e AVC, tornando-a uma ferramenta valiosa para avaliação de aterosclerose subclínica, auxiliando na reclassificação dos pacientes de risco intermediário pelo ERF (HURST et al., 2007). A ultrassonografia, além da medida da EMI, permite também identificar placas nas carótidas, que também são preditoras de doença cardiovascular (WYMAN et al., 2006).

O exame da parede inclui a medida da parede distal das artérias carótidas comuns, além de um escaneamento através das carótidas extra craniais para identificar placas, aumentando a sensibilidade para detectar doença vascular subclínica. A placa é definida, segundo o consenso de Mannheim, como “uma estrutura focal que se destaca no lúmen arterial pelo menos 0,5 mm ou 50% do EMI circundante; ou demonstra um engrossamento maior ou igual a 1,5 mm” (WYMAN et al., 2006).

Para utilizar a ultrassonografia de carótidas como método de avaliação do risco de DCV, devem-se seguir protocolos estabelecidos em estudos populacionais de grande porte que descreveram valores de EMI em percentis para idade, sexo e etnia, como os estudos *MESA*, *Atherosclerosis Risk in Communities Study (ARIC)* ou *Bogalusa Heart Study*. Valores de EMI maiores ou iguais ao percentil 75 são considerados altos e indicam risco cardiovascular aumentado; valores entre os percentis 25 e 75 são considerados intermediários e indicam risco moderado. Valores menores ou iguais ao percentil 25 são considerados como baixo risco (CHAMBLESS et al., 1997).

1.3 DIABETE MELITO TIPO 2 (DM2)

O DM é uma doença caracterizada por hiperglicemia crônica devida à resistência à insulina e alteração da função ou massa das células beta do pâncreas. O DM se classifica em quatro grupos: DM tipo 1 (DM1), Diabete Melito tipo 2 (DM2), Diabete Melito Gestacional (DMG) e, tipos específicos de diabete devido a outras causas como síndromes monogênicas ou induzida por fármacos ou químicos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

O DM2 que corresponde a 90-95% dos casos aparece como consequência da interação de fatores de risco genéticos, epigenéticos e metabólicos (obesidade) que levam a uma hiperglicemia crônica devida a menor taxa de secreção da insulina, resistência a esse hormônio nos principais órgãos metabólicos do corpo, produção excessiva de glicose pelo fígado e dislipidemia (TREVISAN; VEDOVATO; TIENGO, 1998).

Durante as etapas iniciais do desenvolvimento da doença, a tolerância à glicose permanece próxima à normalidade embora haja resistência à insulina devido ao incremento da produção de insulina pelas células β do pâncreas. Ao evoluir, a resistência acompanhada da hiperinsulinemia compensatória faz com que as ilhotas pancreáticas não consigam manter esse estado, dando início à alteração da tolerância à glicose (ATG), caracterizada por aumentos na concentração de glicose pós-prandial (NATHAN et al., 2007). A diminuição na secreção da insulina e o aumento da produção de glicose pelo fígado terminam em diabete franca com hiperglicemia de jejum (AGJ) e insuficiência das células β (ABDUL-GHANI; TRIPATHY; DEFRONZO, 2006) (**Figura 1**).

A cronicidade da doença foi demonstrada em um estudo publicado em 2009, no qual foi feita uma análise retrospectiva dos dados de glicemia de jejum, glicemia 2 horas pós-carga no TOTG, *HOMAS* e *HOMA β* de um outro estudo prospectivo de 13 anos de seguimento de 6.538 participantes sem diabetes ao início. Os investigadores demonstraram mediante análises ajustados para sexo, idade e etnia, que as concentrações de glicose, a sensibilidade à insulina e secreção das células beta mudam pelo menos três a seis anos antes do diagnóstico do DM2. Ademais, nos pacientes que desenvolveram diabetes, foram observados incrementos lineares das glicemias de jejum e 2h pós-carga, seguidos de um incremento acelerado três a seis anos antes do diagnóstico. O *HOMAS* mostrou uma queda linear durante pelo menos cinco anos

antes ao diagnóstico e o *HOMA β* aumentou entre quatro a três anos antes, seguido de uma queda até o momento do diagnóstico (TABÁK et al., 2009).

Os critérios diagnósticos de diabetes utilizados mundialmente são valores de glicose no jejum ≥ 126 mg/dl ou 2 horas pós carga no TOTG >200 mg/dl ou hemoglobina glicada (HbA1c) $\geq 6,5\%$. Portanto, valores de glicose no jejum entre 100-125 mg/dl e 140-199 mg/dl na TOTG são catalogados como AGJ ou ATG, respectivamente, e os indivíduos são considerados pré-diabéticos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015).

Para a HbA1c não existe ainda consenso para estabelecer o estado de pré-diabete; segundo a ADA (*American Diabetes Association*), os valores de 5,7% apresentam uma sensibilidade de 66% e uma especificidade de 88% para predizer o desenvolvimento de DM2 durante os próximos 6 anos, enquanto que a OMS estabelece valores entre 6% e 6,4% como alto risco de evoluir a DM (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2014).

Figura 1 - Progressão da alteração do metabolismo da glicose

Fonte: Adaptado de Montero, A.C 2007. Na figura é ilustrada a progressão da alteração no metabolismo dos carboidratos. Nas etapas iniciais da pré-diabete há resistência à insulina acompanhada de um pequeno aumento nas concentrações de glicose e hiperinsulinemia compensatória. Quando as células beta não podem manter a secreção de insulina, a resistência insulínica persiste ao tempo que há um aumento significativo da glicemia, constituindo um quadro de diabetes melito tipo 2.

1.4 PRÉ-DIABETE E DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA

A pré-diabete foi definida em 2002 pela ADA e o Departamento de Saúde dos Estados Unidos como uma categoria de alteração da glicose na qual os indivíduos ainda não reúnem os critérios diagnósticos para o diabetes, mas possuem valores de glicemia de jejum e pós-prandial muito altos para serem considerados normais (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2005).

A pré-diabete constitui um grupo de risco elevado para o desenvolvimento de diabetes e doença cardiovascular (40% de risco durante os primeiros cinco anos) devido à coexistência de obesidade, resistência à insulina, dislipidemia com triglicérides aumentados e HDL diminuído, e hipertensão. A presença de risco vascular e resistência à insulina de forma simultânea indicam que a aterosclerose começa antes do estabelecimento do DM2, diferente do observado nas complicações microvasculares (retinopatia, nefropatia, neuropatia) associadas diretamente às condições de hiperglicemia intensa, conforme ilustrado na **Figura 2** (RYDÉN et al., 2013). Entre as pessoas com DM2, aproximadamente 60% desenvolvem doença cardiovascular aterosclerótica, uma complicação mais severa e custosa do que a retinopatia.

Figura 2 - Curso das complicações do diabetes

Fonte: Adaptado de Rydén, L. et al., 2003. Na figura se mostra que as complicações macrovasculares do diabetes melito tipo 2 iniciam ao tempo que aparece a alteração da tolerância a glicose; antes do ponto de corte estabelecido para o diagnóstico do diabetes.

Mais da metade da mortalidade e grande parte de morbidade das pessoas com DM estão relacionadas à doença aterosclerótica; metade dos eventos coronarianos agudos, incluindo a morte súbita, ocorrem em pacientes assintomáticos (INTZILAKIS et al., 2012).

Particularmente no grupo de pacientes com DM2, a DAC subclínica afeta 20-35% dos pacientes com fatores de risco adicionais e 35-70% deles já têm estenose coronariana significativa na angiografia (NORHAMMAR et al., 2002)(RYDÉN et al., 2013). Estudos clínicos para identificar a prevalência e o prognóstico da DAC subclínica em pré-diabéticos mostraram um aumento do risco em 2,5 vezes para infarto do miocárdio ou morte em indivíduos de média idade e maiores, os quais apresentavam aumento da glicose de jejum e isquemia miocárdica silenciosa (INTZILAKIS et al., 2012).

Considerando esses resultados, parece evidente a natureza progressiva do DM2 e da DAC, e que os mecanismos fisiopatológicos subjacentes da alteração do metabolismo dos carboidratos estão também envolvidos na progressão da DAC. No entanto, ainda não é bem estabelecido o mecanismo molecular da relação entre o aumento da aterogenicidade, hiperglicemia e à resistência à insulina. Entende-se que uma melhor compreensão dos mecanismos patológicos subjacentes e à identificação de biomarcadores para a predição de risco cardiovascular em indivíduos pré-diabéticos poderiam impactar a mortalidade por DAC e aliviar os altos custos dessas doenças.

1.5 BIOLOGIA DOS microRNAs

Os microRNAs (miRNAs), identificados pela primeira vez durante o estudo do desenvolvimento dos estágios larvais de *Caenorhabditidis elegans*, são pequenas moléculas bem conservadas de RNA não-codificadoras de aproximadamente 19 a 23 nucleotídeos, que agem como reguladores negativos da expressão gênica a nível pós transcricional (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993).

Em 2001, demonstrou-se que os miRNAs encontravam-se expressos também em humanos e em *Drosophila*, evidenciando que eram moléculas reguladoras evolutivamente bem conservadas. Estes descobrimentos geraram posteriores estudos para compreender a estrutura, função e biogênese dos miRNAs e agora sabe-se que estas moléculas estão presentes em plantas, animais e organismos eucariotos unicelulares (SCHÖLER et al., 2010). Nos mamíferos os miRNAs controlam aproximadamente 60% dos genes codificadores de

proteínas, e só nos humanos já foram descritos mais do que 2000 miRNAs (MELO; MELO, 2014).

Os genes dos miRNAs se encontram nas regiões exônicas, intrônicas ou intergênicas e são transcritos pela RNA polimerase II como um precursor primário (pri-miRNA) de várias kilobases. No núcleo, sofrem clivagem pelo complexo microprocessador constituído pela RNase Drosha e a proteína de união a RNA DGCR8, formando o miRNA precursor (pre-miRNA), estrutura em forquilha de 70 nucleotídeos. O pre-miRNA é exportado ao citoplasma com ajuda da exportina 5 e Ran-GTP onde sofre um segundo processo de clivagem pela enzima Dicer, formando um duplex de miRNA de 19 a 25 nucleotídeos. Uma das fitas é incorporada no Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC) para servir como guia de união ao mRNA na região 3'UTR. A outra fita geralmente é degradada rapidamente (HA; KIM, 2014) (**Figura 3**).

Figura 3 - Biogênese dos miRNAs

Adaptado de Strubberg; Madison, 2017. A biogênese dos miRNAs inicia no núcleo com a transcrição dos pri-miRNAs pela RNA polimerase II. Em seguida, o pri-miRNA sofre uma clivagem no complexo microprocessador Drosha-DGCR8 gerando o pre-miRNA de aproximadamente 70 nucleotídeos. Esse pre-miRNA é exportado para o citoplasma e sofre a segunda clivagem pela enzima Dicer formando o duplex de miRNA. Uma das fitas do duplex de miRNA é incorporada no RISC e serve como guia ao se ligar na região 3'UTR do mRNA para produzir sua degradação ou o bloqueio da tradução no ribossomo. RNA pol II= RNA polimerase II; Pri-miRNA= microRNA primário; DGCR8= Proteína de união a RNA DGCR8; Ago= Argonauta; RISC= Complexo de Silenciamento Induzido por RNA.

Os miRNAs se ligam aos mRNAs principalmente através da região *seed*, que inclui os nucleotídeos de dois até oito da sua sequência. Uma alta homologia ou sequência idêntica desta região permite agrupá-los em famílias devido à capacidade de bloquear grupos parecidos de mRNAs. Análises bioinformáticas indicam que vários miRNAs podem regular um mesmo mRNA e, da mesma forma, um miRNA pode regular diferentes mRNAs (DAVIS-DUSENBERY; HATA, 2010).

A inibição da expressão ocorre por pareamento perfeito de bases entre a região *seed* do miRNA e sequências complementares da região 3'UTR do mRNA ou pelo pareamento imperfeito à essa região dos mRNAs, produzindo degradação dos mRNAs ou repressão da expressão gênica por desestabilização, respectivamente (MELO; MELO, 2014)(DAVIS-DUSENBERY; HATA, 2010) (**Figura 4**).

Figura 4 - Mecanismo de ação dos miRNAs.

Fonte: Saldarriaga, M.E.G., 2017. RISC= Complexo de Silenciamento Induzido por RNA; miRNA= microRNA; mRNA= RNA mensageiro.

Outra característica relevante dos miRNAs é sua presença em todas as células e nos fluidos corporais (soro, plasma, urina, saliva, entre outros), empacotados dentro de exossomos, micropartículas, corpos apoptóticos ou ligados a HDL ou proteínas fixadoras de RNA, como a argonauta 2 e Nucleofosmina 1 (ROME, 2013) (**Figura 5**). A capacidade de ligarem-se a outras moléculas lhes confere grande estabilidade quando presentes na circulação

e a notável característica de biomarcadores acessíveis para a avaliação de diversos estados patológicos. Os miRNAs circulantes mostraram estar envolvidos em processos de comunicação celular mediante sua ligação específica às células, nas quais regulam a expressão gênica e, conseqüentemente, o metabolismo (KOSAKA et al., 2010). Estes descobrimentos criaram um novo horizonte de estudo sobre a participação destes miRNAs extracelulares no desenvolvimento de diversas doenças, incluindo o DM2 e a doença cardiovascular.

Figura 5 - Metabolismos dos miRNAs circulantes.

Fonte: Adaptado de Rome, 2013. Na figura se mostram as diferentes formas em que os miRNAs se encontram na circulação, i.e. Ligados a HDL, empacotados em microvesículas, ligado a proteínas fixadoras de RNA ou livres. HDL= Lipoproteína de Alta Densidade; miRNA= microRNA.

1.6 RELAÇÃO ENTRE OS miRNAs, O DM E A DAC

Por sua natureza reguladora, os miRNAs podem participar como reguladores de processos biológicos normais mas também do desenvolvimento de doenças, nas quais seu perfil de expressão encontra-se alterado. Estudos de deleções das enzimas envolvidas na biogênese dos miRNAs (*Dicer*) no tecido cardíaco resultaram em morte precoce ou pós-natal,

indicando que alterações na biogênese dos miRNAs pode contribuir à patogênese e progressão da doença cardiovascular (SMALL; FROST; OLSON, 2010).

Os miRNAs têm sido também propostos como biomarcadores do DM, baseado na expressão alterada durante as condições de hiperglicemia (HAMAR, 2012). Estudos recentes mostraram o papel destas pequenas moléculas no desenvolvimento das complicações do diabetes como a nefropatia, neuropatia, retinopatia e a doença cardiovascular (SHANTIKUMAR; CAPORALI; EMANUELI, 2012)(MCCLELLAND; KANTHARIDIS, 2014).

Herrera e colaboradores (2010) reportaram vários miRNAs, miR-222, miR-27a, miR-29a, miR-195 e miR-103 com expressão aumentada no fígado, tecido adiposo e músculo de ratas hiperglicêmicas, assim como em adipócitos expostos a condições de hiperglicemia, indicando que eles poderiam estar participando nos eventos celulares precoces do desenvolvimento do DM2. O miR-222 foi o miRNA com maior expressão diferencial no tecido adiposo entre as grupos de ratos estudados (hiperglicêmicos, com alteração da glicose e normoglicêmicos) e tem sido associado também com o processo inflamatório desencadeado durante a aterogênese. (CHEN et al., 2012).

Em outro estudo publicado por Karolina e colaboradores (2011), foram encontrados 8 miRNAs diferencialmente expressos em vários tecidos de ratas (sangue total, tecido adiposo, fígado, músculo esquelético e pâncreas) e sangue de pacientes, todos com DM2; o miR-146a, miR-182 e miR-30d estiveram diminuídos enquanto que o miR-150, miR-192, miR-29a, miR-320a e miR-144 se encontravam altamente expressos nos cinco tecidos. Neste estudo, os pesquisadores também encontraram diferenças entre os perfis de miRNAs de pacientes com pré-diabetes e aqueles com DM2; o miR-30d encontrava-se aumentado na AGJ associado a um aumento na produção de insulina e diminuído no DM2 com redução da transcrição do gene da insulina estimulada por glicose (KAROLINA et al., 2011).

Um estudo mais recente identificou 10 miRNAs circulantes associados com o DM2, alguns deles aumentados, como o miR-140-5p, miR-142-3p e miR-222. Outros encontraram-se diminuídos, como o miR-423-5p, miR-125b, miR-192, miR-195, miR-130b, miR-532-5p e miR-126. Baseados nesses resultados, foi proposto um perfil de 4 miRNAs miR-142-3p, miR-423-5p, miR-195 e miR-126 que predizem o DM2 com uma acurácia de 89% (ORTEGA et al., 2014).

Párrizas e colaboradores identificaram dois miRNAs biomarcadores de pré-diabete, miR-192 e miR-193b, que normalizaram sua expressão após uma intervenção de exercício, em ambos, ratos e humanos, portanto, poderiam ser usados como uma nova ferramenta diagnóstica e de monitoração do tratamento nos pacientes com DM2 (PÁRRIZAS et al., 2015).

Vários desses miRNAs associados com a patogênese do DM têm sido associados também com a doença cardiovascular. A secreção de micropartículas e corpos apoptóticos contendo miRNAs com atividade ateroprotetora foi descrita nas células endoteliais (ROME, 2013). Zernecke e colaboradores (2009) encontraram 5 miRNAs que prediziam o desenvolvimento de DM2 em 10 anos em 52% dos indivíduos, sendo um deles o miR-126. A baixa expressão desse miRNA nos corpos apoptóticos em presença de hiperglicemia foi correlacionada com DAC subclínica manifestada, principalmente, pela alteração dos mecanismos protetores do endotélio.

Durante a formação da lesão aterosclerótica, o miR-126 é liberado em corpos apoptóticos pelas células endoteliais em apoptose ativando a angiogênese e a reparação endotelial via CXCL12, recrutando progenitores vasculares. No curso do DM2, esses progenitores encontram-se diminuídos e com a função alterada (ZERNECKE et al., 2009)(ZAMPETAKI et al., 2010).

Diversos estudos já foram feitos para avaliar a participação dos miRNAs no processo inflamatório durante o desenvolvimento da doença cardiovascular. miRNAs membros da família miR-200 (miR-200b, miR-200c e miR-429) encontraram-se aumentados em células musculares lisas (VSMC) de aortas de ratas diabéticas. Esse aumento foi associado com a expressão de genes de moléculas pro inflamatórias (ciclooxygenase-2 e MCP-1) e a consequentemente a ligação dos monócitos às VSMC; permitindo concluir que a regulação positiva da família miR-200 leva a aumento a inflamação vascular durante o DM (REDDY et al., 2012) (**Figura 6**).

Múltiplos estudos têm sido desenvolvidos para compreender-se a participação dos miRNAs na alteração da homeostase da glicose e a DCV. Muitos deles concordam em que o perfil de miRNAs circulante está bem correlacionado com o perfil expressado nos tecidos envolvidos nas doenças, fortalecendo a ideia de usar os miRNAs circulantes como biomarcadores de predição e diagnóstico. No entanto, a falta de padronização nos métodos

utilizados, as diferenças inerentes aos próprios indivíduos (doenças associadas, estilo de vida, idade, medicamentos), o tamanho amostral e o tipo de amostra utilizada fazem que os resultados dos estudos apresentem dificuldades para serem levados ao campo clínico (ROME, 2013)(KAROLINA et al., 2011).

Considerando em conjunto o potencial dos miRNAs como biomarcadores, seu valor prognóstico e a falta de estudos sobre a regulação epigenética da DAC subclínica, é nosso propósito estudar se o perfil de miRNAs circulantes de pacientes com pré-diabete estão associados à doença aterosclerótica subclínica e se possuem uma marca diferencial que os qualifique como biomarcadores dessa doença.

Figura 6 - Papel dos miRNAs no desenvolvimento da aterosclerose.

Fonte: Adaptado de Hosin A.A. et al., 2014. Na figura se esquematizam alguns exemplos de miRNAs envolvidos no desenvolvimento e progressão da aterosclerose. Setas para cima indicam aumento e para abaixo indicam diminuição das moléculas. LDLs= Lipoproteínas de Baixa Densidade; VCAM= Molécula de Adesão Celular Vascular; miR= microRNA; NO= Oxido Nítrico; eNO= Oxido Nítrico endotelial; TNF-α= Fator de Necrose Tumoral alfa; IL-6= Interleucina 6; VSMC= Células Vasculares Musculares Lisas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar miRNAs circulantes, potenciais biomarcadores de aterosclerose subclínica em indivíduos euglicêmicos e pré-diabéticos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a associação dos parâmetros clínicos, biodemográficos e bioquímicos com a presença de aterosclerose subclínica em indivíduos euglicêmicos e pré-diabéticos;
- Identificar o perfil de miRNAs circulantes em indivíduos euglicêmicos e pré-diabéticos com e sem aterosclerose subclínica;
- Identificar os genes regulados por esses miRNAs desregulados e seu rol na fisiopatologia da aterosclerose subclínica, mediante uma análise *in silico* utilizando o programa *Ingenuity Pathways Analysis*;
- Identificar a associação dos principais miRNAs desregulados na aterosclerose subclínica com parâmetros clínicos, biodemográficos e bioquímicos.

3. PACIENTES E MÉTODOS

Foram convidados indivíduos sem diagnóstico estabelecido de DM2 ou doença aterosclerótica em nenhum segmento arterial para o estudo junto ao Hospital Dante Pazzanese de Cardiologia. Conforme as recomendações da ADA determinamos a glicemia de jejum, o TOTG e a HbA1c e, fizemos também a angiotomografia de coronárias e o *doppler* de carótida para classificar os participantes em 4 grupos segundo o estado glicêmico e a presença de aterosclerose subclínica, respectivamente.

Indivíduos de cada grupo foram selecionados para fazer um perfil de miRNAs utilizando a tecnologia de RT-qPCR arrays. Em seguida, utilizando o *software Ingenuity®* fizemos uma análise *in silico* para prever os genes alvos dos miRNAs desregulados nos pacientes que pudessem estar envolvidos na fisiopatologia da aterosclerose subclínica (**Figura 7**). A metodologia utilizada é descrita em detalhe a seguir.

Figura 7- Fluxograma do estudo

Fonte: Saldarriaga, M.E.G., 2017. DM2= Diabetes melito tipo 2; TCLE= Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; CA= Circunferência Abdominal; IMC= Índice de Massa Corpórea; TOTG= teste Oral de Tolerância a Glicose; PCRus= Proteína C Reativa ultrasensível; Angio-TC= Angiotomografia de coronárias; cDNA= DNA complementar; PPC= Controle Positivo PCR; miRTC= Controle Transcrição Reversa; miRNA= microRNA; mRNA= RNA mensageiro; QC= Controle de Qualidade; EU= Euglicêmico; PRE= Pré-diabético; Eu-Neg= Euglicêmico sem aterosclerose; Eu-Pos= Euglicêmico com aterosclerose; Pré-Neg= Pré-diabético sem aterosclerose; Pré-Pos= Pré-diabético com aterosclerose.

3.1 CASUÍSTICA

Foram convidados a comparecer ao ambulatório do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia para participar da pesquisa 192 indivíduos entre 30 e 74 anos sem diagnóstico estabelecido de diabetes melito, nem doença aterosclerótica em qualquer segmento arterial. Do total, 37 pacientes foram excluídos (15 foram diagnosticados com diabetes melito tipo 2 após os exames de glicemia e 22 desistiram de participar ou não completaram o protocolo de estudo), portanto, no final incluiu-se 155 indivíduos classificados em 4 grupos: Euglicêmicos sem aterosclerose (Eu-Neg, n=27), euglicêmicos com aterosclerose (Eu-Pos, n=29), pré-diabéticos sem aterosclerose (Pré-Neg, n=35) e pré-diabéticos com aterosclerose (Pré-Pos, n=64). Para todos os casos, o grupo Eu-Neg foi considerado como o controle nas análises estatísticas e de expressão dos miRNAs.

Todos os participantes que cumpriram com os critérios de inclusão e que voluntariamente aceitaram participar do estudo como consta no termo de consentimento, tiveram os dados sócio demográficos (gênero, idade, endereço, ocupação), do estilo de vida (exercício físico, dieta, tabagismo), clínicos (consumo de medicamentos, doenças atuais, antecedentes de doenças pessoais e familiares e tensão arterial) e antropométricos (peso, altura, circunferência abdominal, circunferência do quadril e composição corporal) registrados.

A hipertensão arterial foi definida como PAS $\geq$ 140mmHg ou PAD $\geq$ 90mmHg, ou em uso de medicamentos anti-hipertensivos. Foi considerada dislipidemia quando o colesterol LDL foi $\geq$ 160mg/dL, o colesterol HDL foi $<$ 40mg/dL em homens e $<$ 50mg/dL em mulheres ou quando as concentrações de triglicérides foram $>$ 200mg/dL ou houve uso de medicamentos para controlar os lipídeos (XAVIER et al., 2013).

Foi considerado tabagista ativo o indivíduo que fumava um ou mais cigarros ou qualquer quantidade ou tipo de tabaco há pelo menos um mês; e ex-tabagista o indivíduo que interrompeu o uso de cigarro ou tabaco há mais de um mês. Foi considerado etilismo quando o indivíduo consumiu $>$ 7 doses de álcool durante a semana. Na atividade física, foi considerado como regular qualquer exercício realizado por no mínimo 30 minutos, 3 vezes por semana. Quem não praticaram atividade física regularmente foram considerados sedentários. O IMC foi calculado pela relação entre a massa e a altura ao quadrado (kg/m^2), considerando-se: normopeso, $\text{IMC} < 25 \text{ kg/m}^2$; sobrepeso, $\text{IMC} \geq 25 \text{ kg/m}^2$ e $< 30 \text{ kg/m}^2$; e obesidade, $\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$.

A avaliação bioquímica e a determinação da presença de aterosclerose subclínica foi realizada conforme descrito nas seções 3.2 e 3.3.

3.1.1 Critérios de não Inclusão

Indivíduos com desordens endócrinas relacionadas com alteração da homeostase da glicose, portadores de doença hepática, renal, hemorrágica ou gastrointestinal grave, neoplasias, outros tipos de doença cardiovascular e mulheres grávidas não foram incluídos no estudo.

3.1.2 Considerações éticas

Este estudo foi submetido à aprovação pelos comitês de ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (CAAE: 36625714.9.0000.0067) e do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (CAAE: 36625714.9.3001.5462). O objetivo do estudo, protocolo de pesquisa, assim como as contribuições do trabalho foram apresentados a cada voluntário, que ao concordar, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Para a realização da tomografia computadorizada cardíaca, os pacientes assinaram também o termo de consentimento do próprio setor (**ANEXO C, D, E, F**).

3.2 AVALIAÇÃO DO ESTADO GLICÊMICO

A classificação dos pacientes como euglicêmicos ou pré-diabéticos foi realizada baseada na dosagem da glicemia após 12 horas de jejum, o teste de tolerância oral a glicose de 2 horas com 75g de dextrosol® e a medida da HbA1c. Os resultados dos testes de glicemia foram avaliados segundo os critérios da ADA descritos no *Standards of Medical Care in Diabetes-2015* (**Figura 8**). Foi considerada pré-diabete quando pelo menos um dos testes teve valores alterados, a saber: Glicemia de jejum 100-125 mg/dL, TOTG entre 140-199 ou HbA1c entre 5,7-6,4%.

Figura 8 - Critérios diagnósticos de diabetes e seus estágios intermediários

Fonte: Saldarriaga, M.E.G., 2017. DM2= Diabetes Melito tipo 2; Gli= glicemia de jejum; TOTG= Teste Oral de Tolerância a Glicose.

3.3 AVALIAÇÃO DA ATEROSCLEROSE SUBCLÍNICA

A caracterização da aterosclerose subclínica esteve baseada no resultado do escore de cálcio e/ou presença de placas não calcificadas na angiotomografia de coronárias, assim como na medida da EMI e/ou a presença de placas no *doppler* de carótida. A presença de pelo menos um marcador de aterosclerose em um dos 2 exames classificou o indivíduo como positivo para aterosclerose subclínica.

3.3.1 Escore de cálcio e identificação de placas não calcificadas

De acordo com os protocolos estabelecidos na seção médica de tomografia do IDPC, sob a coordenação do Prof Dr. Ibraim Masciarelli Francisco Pinto, foi realizada a angiotomografia das artérias coronárias em tomógrafo de múltiplos detectores, realizando cortes axiais de 2,5 mm de espessura, sem a utilização de meio de contraste iodado, com sincronização cardíaca prospectiva para avaliação do escore de cálcio no território das artérias coronárias. Em seguida, obtiveram-se imagens transversais de 0,6 mm de espessura, com sincronização cardíaca retrospectiva, após a injeção endovenosa de meio de contraste iodado, não iônico para a angiotomografia. As imagens foram submetidas à reconstrução e análise em estação de trabalho computadorizada com programas específicos para avaliação coronariana.

Nas situações em que não foi possível realizar a angiotomografia, devido a alergia ao iodo, frequência cardíaca elevada, o quando o paciente se negou a receber meio de contraste, foi calculado unicamente o escore de cálcio. Para o diagnóstico de aterosclerose subclínica, foi considerado positivo um escore de cálcio diferente de zero ou a presença de placas não calcificadas na angiotomografia. O EC também foi analisado de forma quantitativa e segundo os critérios do estudo MESA, considerando-se o percentil para idade, sexo e etnia.

3.3.2 EMI e placas nas artérias carótidas

A medida da espessura médio-intimal (EMI) e a presença de placas nas artérias carótidas extracranianas foram realizadas na Divisão de Ultrassonografia do IDPC utilizando o equipamento de ultrassonografia de alta resolução modo-B, sob coordenação do Dr. Rodrigo Bellio de Mattos Barretto com colaboração do Dr. Mohamed Hassan Saleh e a Dra Ana Cláudia Gomes Pereira Petisco.

Os valores da EMI foram avaliados segundo o normograma estabelecido no estudo MESA para indivíduos maiores de 45 anos, e no estudo Bogalusa para indivíduos menores de 45 anos, que levam em consideração idade, sexo e raça (ANEXO A e B). Valores de EMI maiores ou iguais ao percentil 75 foram considerados como alto risco (STEIN et al., 2008) (TZOU et al., 2007). A identificação das placas foi feita baseada no consenso de Mannheim.

A aterosclerose subclínica foi considerada positiva quando o *doppler* de carótidas identificou aumento da espessura médio-intimal acima do percentil 75 para idade, gênero e etnia ou quando foi observada a presença de placas nas artérias carótidas.

3.4 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

As amostras de sangue foram colhidas em jejum de 12 horas no laboratório clínico do IDPC utilizando o sistema a vácuo com tubos *VacutainerTM* (*Becton Dickinson Company, Plymouth, Reino Unido*). Foram coletados 2 tubos com conservante fluoreto de sódio para determinação de glicose de jejum e 2 horas pós carga de 75 gramas de dextrosol®, 1 tubo com anticoagulante citrato de sódio para a coagulação, 2 tubos com anticoagulante EDTA para o hemograma e a HbA1c; 3 tubos secos para bioquímica sanguínea e quantificação de citocinas e adipocinas; assim como uma amostra de urina ocasional para realização do

uroanálise. Para o laboratório de biologia molecular foi coletado também 1 tubo seco para obtenção de soro.

No laboratório clínico, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos imediatamente depois da coleta para a obtenção de plasma e as amostras do soro foram deixadas por 10-20 minutos a temperatura ambiente para a formação de coágulo. Posteriormente, foram centrifugadas nas mesmas condições do plasma.

Para o estudo de miRNAs, as amostras de soro foram separadas por centrifugação a 4°C em 2 etapas, seguindo-se as recomendações do fabricante do kit de extração de RNA circulante: 1900 g por 10 minutos e 16000 g por 10 minutos, a fim de evitar a contaminação do soro por miRNAs provenientes da contaminação celular. As amostras de soro foram armazenadas no freezer a -80 °C até o momento da extração de miRNA.

3.5 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

As dosagens bioquímicas foram realizadas no laboratório clínico AFIP conveniado ao IDPC. Foi realizado hemograma, dosagens de glicose de jejum e 2 horas pós carga de 75 gramas de dextrosol®, perfil renal (creatinina, proteínas totais, ureia, ácido úrico), lipídico (Colesterol total, Colesterol HDL, triglicérides) hepático (ALT, AST), tireóideo (TSH, T3 total, T4 total, T4L), assim como dosagem da Proteína C Reativa ultrassensível (PCRus), insulina, hemoglobina glicada (HbA1c), apolipoproteína A (ApoA-1), apolipoproteína B 100 (ApoB-100), fibrinogênio e exame de urina, como parte da avaliação do perfil renal.

O colesterol das frações VLDL e LDL foram calculadas de acordo com a fórmula de *Friedewald* e colaboradores (FRIEDEWALD; LEVY; DONALD S. FREDRICKSON, 1972). Nos casos de hipertrigliceridemia maior a 400 mg/dL, o LDL foi dosado diretamente. A avaliação da resistência à insulina (HOMA2-IR), da porcentagem da sensibilidade dos tecidos periféricos (HOMA2-%S) e da porcentagem do funcionamento das células β (HOMA2-% β) foram feitos utilizando as concentrações de glicose e insulina basal no *Software HOMA 2 Calculator* da Universidade de Oxford, disponível em <https://www.dtu.ox.ac.uk/homacalculator/>.

Finalmente foram dosadas as citocinas IL-6, IL-1 β , TNF- α , PAI-1 e as adipocinas leptina, adiponectina e resistina utilizando um sistema multiplex com esferas magnéticas no equipamento Luminex™. Para isto foram utilizados os kits *Multiplex Human Adipokine*

Magnetic Bead Panel 1 Catálogo # HADK1MAG-61K e *Panel 2* Catálogo # HADK2MAG-61K.

3.6 ANÁLISES DOS microRNAs

Foram selecionados 30 indivíduos bem caracterizados dos 4 grupos (7 Euglicêmicos sem aterosclerose, 7 Euglicêmicos com aterosclerose, 7 pré-diabéticos sem aterosclerose e 9 pré-diabéticos com aterosclerose) para realizar o perfil dos miRNAs circulantes em amostras de soro. Os procedimentos para análise dos miRNAs são esquematizados a seguir (**Figura 9**).

Figura 9 - Fluxograma da análise de miRNAs

Fonte: Saldarriaga, M.E.G., 2017. cDNA= DNA complementar; QC= Controle de Qualidade; miRNA= microRNA; mRNA= RNA mensageiro; PCR= Reação em Cadeia da Polimerase; *Ingenuity, Pathway Analysis*= *Software* para análise predição.

3.6.1 Extração de miRNA

Para a extração do RNA extracelular de amostras de soro, incluindo a fração de miRNAs, foi utilizado o protocolo do kit para soro e plasma *miRNeasy™* (Qiagen Inc., Valencia, CA, EUA), utilizando 200 µL de soro, modificado apenas pela adição de glicogênio

(Ambion) e uma lavagem à coluna com o tampão RPE, no intuito de eliminar os resíduos de fenol e aumentar a captura de miRNAs, respetivamente (TURCHINOVICH et al., 2011).

Foi utilizado o controle *spike-in* (*C.elegans* miR-39) na concentração de $1,6 \times 10^8$ cópias/ μL , o qual é adicionado ao soro nas etapas iniciais da extração para monitorar o processo até a quantificação dos miRNAs no *array* da qPCR, assim como ajudar na normalização das amostras, como sugere o protocolo do fabricante (Qiagen Inc., Valencia, CA, EUA). Brevemente, as amostras de soro foram descongeladas a 37 °C durante 7 minutos no termobloco em agitação a 1.000 rpm. Posteriormente, 200 μL de soro foram pipetados em um tubo eppendorf de 2 mL livre de RNases e adicionado 1 mL da solução de Qiazol® com 0,6 μL de glicogênio, seguido de uma incubação após a qual foi adicionado o *spike in control*. Seguidamente foi realizada a separação de fases utilizando 200 μL de clorofórmio e a fase superior aquosa contendo os miRNAs foi purificada em colunas de sílica e eluída em 12 μL àgua livre de RNase. As amostras de RNA (contendo miRNA) foram armazenadas a -80 °C até o momento do seu processamento.

3.6.2 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA a partir do RNA total extraído das amostras de soro dos pacientes, foi utilizado o *kit miScript II RT* (Qiagen Inc., Valencia, CA, EUA) que contém o *mix miScript Reverse Transcriptase* com a transcriptase reversa e a polimerase Poli(A), o *mix miScript Nucleics* contendo os dNTPs, rATP, iniciadores oligo-dT, e um controle interno de RNA sintético [miRTC] para monitorar o desempenho da reação da transcrição reversa. Foi usado também o tampão *miScript HiSpec* que suprime a conversão em cDNA de RNAs longos, conferindo maior especificidade da reação para os miRNAs. A reação baseia-se no princípio que os miRNAs maduros não são poliadenilados por natureza, portanto, uma cauda de poli-A é adicionada ao mesmo tempo que acontece a transcrição reversa e serve como molde para o iniciador universal (oligo-dT), a partir do qual inicia a síntese da fita simples de cDNA usada na qPCR (**Figura 10**).

Na reação foram utilizados 9 μL de RNA total extraído com o *kit miRNeasy* para soro e plasma, 4 μL do tampão *miScript HiSpec*, 2 μL do *mix* com os dNTPs, 2 μL do *mix* com as enzimas de transcrição reversa e a polimerase e, 3 μL de água livre de RNases. A

reação é incubada a 37 °C durante 60 minutos, para ativar a enzima transcriptase reversa. Em seguida, a temperatura é elevada para 95 °C por 5 minutos para inativar a enzima. Seguidamente o produto total da síntese de cDNA foi diluído com 90 µL água livre de RNases e armazenado a -20 °C.

Figura 10 - Síntese de cDNA utilizando o *kit miScript II RT*

Fonte: Adaptado de Qiagen= 2012. Poly(A)= cauda de poli-adenina; Oligo-dT= oligonucleotídeo de Timina; cDNA= DNA complementar.

3.6.3 Controle de qualidade das amostras de cDNA para o *Array* de miRNAs

As amostras de cDNA diluídas foram avaliadas mediante a qPCR utilizando a placa de controle de qualidade *miScript miRNA QC PCR Array MIHS-989ZE-1* para 32 amostras (Qiagen Inc., Valencia, CA, EUA).

As placas contêm iniciadores específicos para o *Spike-in control* cel-miR-39 adicionado durante o processo de extração; 3 miRNAs (miR-16, miR-21 e miR-191) ubiquitossamente expressos nas células, tecidos e líquidos corporais, inclusive, soro e plasma; 3 snoRNAs (SNORD61, SNORD95 e SNORD96A) tipicamente expressos só em amostras de

células, tecidos e sangue total, os quais não foram considerados na análise devido ao nosso tipo de espécimen. O miRTC foi usado para avaliar o desempenho da transcrição reversa (quando utilizado o kit miScript II RT); e o PPC (Controle Positivo), para avaliar a eficiência da qPCR (**Figura 11**).

Para cada amostra foi preparado uma solução com 75 µL do *master mix QuantiTect Sybr Green*, 15 µL do *miScript Universal Primer*, 55 µL de água livre de RNase e 5 µL do cDNA do paciente previamente diluído, segundo o protocolo do fabricante. Após a preparação do *mix*, foram adicionados 10 µL em cada poço da placa, proporcionando 0,5 - 1 ng de cDNA por poço. Foram pipetadas 2 amostras de forma intercalada por fileira, avaliando-se 12 controles para cada uma delas.

A qPCR foi realizada na plataforma *QuantStudio™ 12k Flex Real-Time PCR v1.2.3* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) nas seguintes condições: 15 minutos a 95 °C para a ativação da DNA polimerase *HotStart Taq* (contida no *master mix*), seguida de 40 ciclos de 94 °C por 15 segundos, 55 °C por 30 segundos e 70 °C por 30 segundos, sendo nesta última etapa a detecção da fluorescência. Foi incluída a curva de dissociação de cada miRNA por se tratar de um sistema de detecção por *SYBR Green*.

Figura 11 - Desenho da placa de Controle de qualidade

Fonte: Qiagen, 2012. 39= *Spike-in* Cel-miR-39; 16= miR-16= 21= miR-21; 191= miR-191; 61= SNORD61; 95= SNORD95; 96= SNORD96A; miRTC= Controle Transcrição Reversa; PPC= Controle Positivo da PCR.

3.6.4 Perfil de miRNAs pela qPCR Array

Realizamos um perfil de expressão de miRNAs nas 28 amostras de pacientes bem caracterizados dos quatro grupos, representativos da população sob estudo que reuniram os quesitos de qualidade. Em cada amostra foram quantificados 372 miRNAs maduros, descritos previamente no *miRBase* (www.miRBase.org) como abundantemente expressos em amostras de soro e 12 controles, para verificar que as amostras mantiveram a mesma qualidade.

Foi utilizado o *kit miScript miRNA PCR array miFinder 384HC MIHS-3001Z* (Qiagen Inc., Valencia, CA, EUA) que contém placas de 384 poços com iniciadores específicos para 372 miRNAs e 12 controles que incluem o *Spike-in* (*C.elegans* miR-39), 5 snoRNAs (SN1, SNORD61; SN2, SNORD68; SN3, SNORD 72; SN4, SNORD95; SN5, SNORD96A; SN6, RNU6B/RNU6-2) que poderiam ser utilizados na normalização, no entanto, pelo fato de nossas amostras serem soro, não é factível utilizá-los. O miRTC e o PPC permitem avaliar novamente o desempenho da transcrição reversa e a eficiência da qPCR (**Figura 12**).

Para cada placa foi preparado um único *mix* com 2.050 µL do master *mix QuantiTect Sybr Green*, 410 µL do *miScript Universal Primer*, 1.540 µL de água livre de RNase e 100 µL do cDNA do paciente previamente diluído, segundo o protocolo do fabricante. Após a preparação do *mix*, foram adicionados 10 µL em cada poço da placa, proporcionando 0,5 - 1 ng de cDNA por poço. De igual forma que as placas de controle de qualidade, a qPCR foi realizada na plataforma *QuantStudio™ 12k Flex Real-Time PCR v1.2.3* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) nas seguintes condições: 15 minutos a 95 °C para a ativação da DNA polimerase por *HotStarTaq* (contida no master *mix*), seguida de 40 ciclos de 94 °C por 15 segundos, 55 °C por 30 segundos e 70 °C por 30 segundos, sendo nesta última etapa a detecção da fluorescência. Foi incluída a curva de dissociação de cada miRNA por se tratar de um sistema de detecção por *SYBR Green*.

Figura 12 - Desenho da placa miScript miRNA PCR array *Human* miFinder 384 HC

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
B	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
C	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
D	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
E	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
F	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144
G	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168
H	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192
I	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216
J	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
K	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264
L	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290
M	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314
N	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338
O	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360
P	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	Ce	Ce	SN1	SN2	SN3	SN4	SN5	SN6	miRTC	miRTC	PPC	PPC

Fonte: Qiagen= 2012. Poços 01 até 372 contendo iniciadores específicos para os 372 miRNAs testados na placa; Ce= *Spike-in* Cel-miR-39; SN1= SNORD61; SN2= SNORD68; SN3= SNORD 72; SN4= SNORD95; SN5= SNORD96A; SN6= RNU6B/RNU6-2; miRTC= Controle Transcrição Reversa; PPC= Controle Positivo da PCR.

3.6.5 Análises bioinformáticas

Após a quantificação das expressões de todos os miRNAs, inclusive dos controles (Eu-Neg), foi feita a análise primária dos dados. Primeiramente realizamos um estudo em conjunto de todas as placas para padronizar o valor do *Threshold* dos miRNAs entre as amostras e definimos o ponto de corte de amplificação dos miRNAs no Ct 35, de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida foram avaliadas as curvas de *Melting* para identificar a presença de produtos de amplificação inespecíficos. Para isto, foram utilizados os softwares *QuantStudio™ 12K Flex v1.2.3* e o *Expression Suite v1.0.3* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

a. Controle de Qualidade

Após a análise primária dos dados, os resultados da RT-qPCR foram analisados utilizando o software *miScript miRNA PCR Array Data Analysis Excel®*

disponibilizado no site do fabricante, o qual permite interpretar os resultados dos controles em um formato tabular.

Na análise foi verificada a eficiência da RT-qPCR mediante o cálculo da média dos Cts do PPC, que esteve dentro do intervalo aceitável (19 ± 2). Em seguida foram calculadas as diferenças entre a expressão do miRTC e o PPC para determinar se houve inibição da transcrição reversa considerando um valor de corte de 7. Foi verificado também se o *spike-in control* cel-miR-39 amplificou adequadamente, indicando que o processamento das amostras ocorreu de forma correta e não levou a perda dos miRNAs nas amostras de soro. Finalmente foi examinada a amplificação dos 3 miRNAs ubiquitosamente expressos (miR-16, miR-21 e miR-191). Os 3 snoRNAs (SNORD61, SNORD95 e SNORD96A) não foram considerados na análise devido ao nosso tipo de amostra, pois como descrito antes, eles são avaliados em amostras de células e não em fluidos corporais.

b. Perfil de miRNAs

De igual forma que no controle de qualidade, foi feita a análise primária das placas. Para a análise secundária dos resultados da RT-qPCR foi utilizado o *software* para análise de dados *Web-based miScript miRNA PCR Array* disponibilizado online pelo fabricante no site: <http://www.qiagen.com/br/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center-overview-page/>. Na análise, foram feitas duas normalizações, a primeira corrigiu a variação por reprodutibilidade utilizando o resultado da expressão do Cel-miR-39 entre as amostras. A segunda, foi a normalização das amostras com a média global dos miRNAs comumente expressos em todas as amostras ($Ct < 35$). Este *software* calcula também as métricas de qualidade para verificar novamente a aptidão das amostras e a eficiência da qPCR (WYLIE, 2011).

A expressão relativa dos miRNAs nos pacientes comparada ao grupo controle (Eu-Neg) foi calculada utilizando o método de $\Delta\Delta CT$. Resultados de *fold change* e *fold regulation* maiores do que 2 foram considerados positivos ou *up-regulated* (marcados com vermelho) e valores menores que 2 como negativos ou *down-regulated* (marcados em verde) (LIVAK, 2008).

Os valores de p foram calculados a partir de um teste t de *Student* das médias das replicatas ($2^{-\Delta CT}$) de cada miRNA, tendo como referência o grupo controle e considerando um valor de significância estatística de 0,05.

c. Análise de predição no software *Ingenuity® Pathways Analysis 6*

Os miRNAs que apresentaram um perfil de expressão diferencial (*fold change* >2,0 e $p < 0,05$), seguiram para uma análise terciária de predição de mRNAs alvos utilizando o *Ingenuity®* ou *IPA®* (*Ingenuity Systems, Ca., Redwood City, EUA*). O *IPA®* mapeia os miRNAs através do banco de dados miRBase e identifica os genes alvos baseando-se na sua sequência *seed*, utilizando os bancos de dados *TargetScan* e *TarBase*, além de um banco de dados de referências próprio (*Ingenuity Expert Findings*).

Foram realizadas análises de predição de genes alvo para os miRNAs desregulados no grupo de pré-diabéticos (Pré-Neg), ateroscleróticos (Eu-Pos) e com as duas condições (Pré-Pos). Devido ao alto número de mRNAs que podem ser regulados por um mesmo miRNA, foi necessário fazer filtros para refinar a análise de miRNAs relevantes para a nossa pesquisa.

Utilizamos o algoritmo “*miRNA target filter*” para mapear os miRNAs com alvos preditos contidos nas bases de dados do *Ingenuity*, em seguida fazer filtros para identificar miRNAs com alvos validados experimentalmente, o que reduz grandemente o número de mRNAs alvos. A continuação foram aplicados filtros baseados em critérios biológicos como a nossa doença de interesse e as rotas metabólicas que puderam estar relacionadas com ela. Finalmente foi construída uma rede com os miRNAs e mRNAs através de uma aplicação que permite estabelecer relações entre as moléculas, assim como identificar hierarquias e associações com a condição de interesse (**Figura 13**).

Os gráficos gerados pelo programa têm uma codificação de cores, símbolos e tipos de setas que indicam funções, atividade e permitem interpretar o tipo de relação entre as moléculas da rede. Desse modo, pudemos ver quais moléculas estavam sendo ativadas ou suprimidas assim como seu papel no desenvolvimento da doença.

Figura 13 - Algoritmo de predição de alvos de miRNAs no *Ingenuity®*, utilizando o “*miRNA target Filter*”

Fonte: Saldarriaga, M.E.G, 2017. miRNA= microRNAs; mRNA= RNA mensageiro.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Para a realização das análises estatísticas foi utilizado o programa estatístico SPSS versão 20.0 para Windows (IBM® Corporation, Somers, EUA) considerando significância estatística de 5 % ($p < 0,05$). Para construção dos gráficos, foi utilizado o programa *GraphPad Prism*® versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) e o *software* SPSS versão 20.0. Os resultados para as variáveis numéricas são apresentados com a mediana e intervalo interquartil (percentil 25 e 75) e para as variáveis categóricas com a frequência e a porcentagem entre parêntesis.

Para a análise de normalidade das variáveis contínuas foi utilizado o teste de *Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov*. Variáveis contínuas com distribuição normal foram analisadas posteriormente pelos testes ANOVA ou teste *t Student*, enquanto as variáveis contínuas sem distribuição normal foram avaliadas pelo teste de *Mann-Whitney e Kruskal-Wallis*. Para as variáveis categóricas foram realizados os testes de Qui-quadrado ou *Likelihood ratio*.

Foram utilizados coeficientes de correlação de *Pearson* ou de *Spearman* para variáveis numéricas, assim como ANOVA para as variáveis qualitativas para as análises de correlação entre as dosagens bioquímicas, clínicas, antropométricas e, futuramente os níveis de expressão dos miRNAs.

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DO ESTUDO

Foram convidados para participar da pesquisa 192 indivíduos sem diagnóstico prévio de DM2 ou doença aterosclerótica. Desse grupo, 37 foram excluídos, 15 por terem diagnóstico de diabetes melito tipo 2 após realizar a dosagem da glicemia, e 22 que desistiram ou não completaram o protocolo de estudo.

Conforme descrito na seção 3, os 155 participantes que reuniram os critérios de inclusão foram classificados em 4 grupos: Euglicêmicos sem aterosclerose ou controles (n=27), euglicêmicos com aterosclerose (n=29), pré-diabéticos sem aterosclerose (n=35) e pré-diabéticos com aterosclerose (n=64), aos que nos referiremos como Eu-Neg, Eu-Pos, Pré-Neg e Pré-Pos, respectivamente.

Os dados biodemográficos, antropométricos, clínicos e bioquímicos dos indivíduos selecionados no estudo são apresentados nas **Tabelas 1 a 4**.

5.1.1 Características Clínicas e Biodemográficas

Entre os 155 participantes do estudo, 57% (89) foram mulheres e 43% (66) homens. Observou-se diferença estatisticamente significativa na idade entre os grupos ($p < 0,001$), sendo que os indivíduos pertencentes ao grupo de pré-diabéticos com aterosclerose (Pré-Pos) tiveram uma mediana da idade maior, 57 anos comparada à de 43 e 50 anos dos grupos sem aterosclerose (Eu-Neg e Pré-Neg, respectivamente).

Na análise das variáveis categóricas utilizando tabelas de contingência não se observou diferenças para o gênero. Encontrou-se que a proporção de indivíduos nos grupos foi diferente segundo a etnia, menopausa e dislipidemia, indicando que existe associação entre essas variáveis com a aterosclerose subclínica e pré-diabete. A raça branca foi a mais frequente em todos os grupos e teve uma proporção maior nos grupos com aterosclerose. Observou-se que ao igual que a idade, a proporção de pacientes dislipidêmicos e com menopausa foi maior nos dois grupos com aterosclerose (**Figura 14**).

Tabela 1- Perfil clínico e biodemográfico dos pacientes classificados segundo o perfil glicêmico e a aterosclerose subclínica

	Eu-Neg n=27	Eu-Pos n=29	Pré-Neg n=35	Pré-Pos n=64	p-valor
Idade (anos)	43 (39-58) ^a	53 (46-61)	50 (43-58) ^b	57 (52-61) ^{ab}	<0,001*
Gênero Feminino	14 (52)	16 (55)	23 (66)	36 (56)	0,700**
Etnia					
Branca	11 (41)	23 (79)	15 (43)	36 (56)	0,033***
Parda	9 (33)	4 (14)	12 (34)	13 (20)	
Negra	3 (11)	2 (7,0)	7 (20)	11 (17)	
Amarela	4 (15)	0 (0,0)	1 (3,0)	4 (6,0)	
Tabagismo					
Sim	1 (4,0)	3 (10)	7 (20)	6 (9,0)	0,411***
Não	21 (78)	18 (62)	19 (54)	40 (63)	
Ex-tabagista	5 (19)	8 (28)	9 (26)	18 (28)	
Etilismo	1 (4)	3 (10)	2 (6)	3 (5)	0,728***
Sedentarismo	5 (19)	13 (45)	12 (34)	24 (38)	0,200**
Menopausa	n=14	n=16	n=23	n=36	
	7 (50)	11 (69)	12 (52)	31 (86)	0,017***
DLP	1 (4,0)	10 (35)	6 (17)	22 (34)	0,007**
HAS	10 (37)	12 (41)	17 (49)	35 (55)	0,398**
Medicamento	15 (56)	11 (38)	16 (46)	31 (48)	0,609**
IMC					
Eutrôfico	10 (37)	12 (41)	9 (26)	14 (22)	0,200**
Sobrepeso	4 (15)	9 (31)	9 (26)	14 (22)	
Obesidade	13 (48)	8 (28)	17 (49)	36 (56)	

Legenda: Os dados numéricos estão apresentados como a mediana e o intervalo interquartil (Percentil 25-Percentil 75) e os dados categóricos como o número de indivíduos e a porcentagem entre parêntesis. Eu-Neg= Euglicemia aterosclerose negativa; Eu-Pos= Euglicemia aterosclerose positiva; Pré-Neg= Pré-diabete aterosclerose negativa; Pré-Pos= Pré-diabete aterosclerose positiva; DLP= Dislipidemia; HAS= Hipertensão Arterial Sistêmica; IMC=Índice de Massa Corpórea. Os grupos foram comparados usando os testes **Kruskal-Wallis*, ***Chi-quadrado* ****Likelihood ratio*. Para as comparações múltiplas identificadas com letras, foi utilizado o teste de *Dunns*. Letras iguais ^{a,b,c} significam diferença estatística entre os grupos.

Figura 14 - Gráfico da distribuição dos grupos por idade, etnia, menopausa e dislipidemia

Fonte: Saldarriaga, M.E.G, 2017. A= Idade; B= Menopausa; C= Etnia; D= Dislipidemia. As barras de erro no gráfico de dispersão apresentam a mediana e o intervalo interquartil P25-P75. O gráfico de barras mostra o número de indivíduos em cada grupo no eixo y e a porcentagem em cima de cada barra. Eu-Neg= Euglicemia ateroesclerose negativa; Eu-Pos= Euglicemia ateroesclerose positiva; Pré-Neg= Pré-diabete ateroesclerose negativa; Pré-Pos= Pré-diabete ateroesclerose positiva. Para as variáveis numéricas os grupos foram comparados usando o teste de *Kruskal-Wallis* e pós teste de *Dunns*; e para as variáveis categóricas os testes *Chi-quadrado* e *Likelihood ratio*.

5.1.2 Medidas Antropométricas

Como mostra a **Tabela 2**, o percentual de gordura corporal foi diferente ($p=0,030$) entre o grupo controle (Eu-Neg) e os pacientes com pré-diabete e ateroesclerose subclínica (Pré-Pos), os quais tiveram uma porcentagem de gordura maior, 36% contra 30% nos controles. Não se observaram diferenças estatisticamente significantes no peso, IMC, circunferência abdominal e nas medidas da pressão arterial entre os grupos. No entanto, a CA mostrou uma tendência ao aumento no grupo Pré-Pos quando comparado aos controles ($p=0,123$).

Tabela 2- Perfil antropométrico dos pacientes classificados segundo o perfil glicêmico e a aterosclerose subclínica

	Eu-Neg	Eu-Pos	Pré-Neg	Pré-Pos	p-valor
	n=27	n=29	n=35	n=64	
Peso (Kg)	70 (63-83)	66 (58-80)	71 (63-83)	72 (64-81)	0,822*
IMC (Kg/m ²)	25 (23-29)	27 (23-31)	27 (25-31)	27 (25-30)	0,334*
CA (cm)	89 (83-98)	89 (79-101)	92 (88-100)	96 (87-101)	0,123*
	n=24	n=13	n=20	n=35	
Gordura (%)	30 (24-34) ^a	35 (28-37)	34 (27-40)	36 (29-41) ^a	0,030*
	n=23	n=28	n=34	n=61	
PAS (mmHg)	125 (115-135)	127 (116-132)	133 (112-142)	134 (120-150)	0,270*
PAD (mmHg)	81 (78-90)	80 (70-90)	83 (77-96)	86 (74-92)	0,406*

Legenda: Os resultados estão apresentados como a mediana e o intervalo interquartil (P25-P75). Eu-Neg= Euglicemia aterosclerose negativa; Eu-Pos= Euglicemia aterosclerose positiva; Pré-Neg= Pré-diabete aterosclerose negativa; Pré-Pos= Pré-diabete aterosclerose positiva; IMC=Índice de Massa Corpórea; CA=Circunferência abdominal; CQ=Circunferência quadril; CA/CQ= razão CA e CQ; PAS=Pressão Arterial Sistólica; PAD=Pressão Arterial Diastólica. Os grupos foram comparados usando o teste **Kruskal-Wallis*. Para as comparações múltiplas identificadas com letras, foi utilizado o teste de *Dunns*. Letras iguais a,b,c significam diferença estatística entre os grupos.

5.1.3 Características Bioquímicas

Encontrou-se diferença entre os grupos ($p < 0,005$) nas 3 dosagens de glicemia (glicemia de jejum, 2 horas pós-carga de 75 gramas de dextrosol® e a HbA1c) apresentaram conforme esperado, já que a classificação foi baseada nesses resultados. A glicemia de jejum e a HbA1c tiveram o mesmo comportamento, sendo maiores nos 2 grupos de pré-diabéticos. A glicemia 2 horas pós-carga só apresentou diferença entre os Eu-Neg e os Pré-Neg. A dosagem de insulina e os índices HOMA2-IR e HOMA2S, apresentaram também diferença estatística significativa entre o grupo Pré-Pos e os dos grupos com euglicemia (Eu-Neg e Eu-Pos) (**Figura 15**).

Dos componentes do perfil lipídico, o VLDLc, LDLc e os triglicerídeos tiveram valores maiores no grupo com pré-diabete e aterosclerose, no entanto, não houve diferença estatística significativa. Já a fração da ApoB-100, a apolipoproteína mais abundante nas VLDLs e LDLs, foi mais elevada no grupo Pré-Pos quando comparado ao grupo Eu-Neg ($p = 0,013$) (**Figura 16**).

Tabela 3- Perfil bioquímico dos pacientes distribuídos nos grupos de glicemia e aterosclerose subclínica

	Eu-Neg	Eu-Pos	Pré-Neg	Pré-Pos	p-valor
	n=27	n=29	n=35	n=64	
Glicemia (mg/dL)	85 (80-89) ^{ab}	87 (79-90) ^{cd}	94 (89-97) ^{ac}	94 (88-103) ^{bd}	<0,001*
Glicemia 2h (mg/dL)	94 (79-119) ^a	96 (88-109)	119 (92-148) ^a	110 (91-134)	0,005*
HbA1c (%)	5,5 (5,3-5,6) ^{ab}	5,4 (5,3-5,6) ^{cd}	5,8 (5,7-6,1) ^{ac}	5,9 (5,7-6,0) ^{bd}	<0,001*
Insulina (uU/mL)	5,2 (3,2-6,9) ^a	5,3 (3,5-9,0) ^b	6,1 (4,1-9,7)	7,8 (5,2-11,5) ^{ab}	0,004*
HOMA2β (%)	89 (64-130)	96 (68-138)	87 (65-119)	102 (72-126)	0,386*
HOMA2S (%)	125 (100-211) ^a	124 (76-185) ^b	106 (69-167)	81 (55-120) ^{ab}	0,001*
HOMA2IR (%)	0,8 (0,5-1,0) ^a	0,8 (0,5-1,3) ^b	0,9 (0,6-1,5)	1,2 (0,8-1,8) ^{ab}	0,001*
Colesterol (mg/dL)	202 (176-214)	209 (195-224)	207 (188-224)	212 (190-233)	0,192*
HDLc (mg/dL)	53 (45-62)	49 (40-61)	53 (44-65)	50 (42-58)	0,334*
LDLc (mg/dL)	118 (105-136)	132 (119-145)	131 (106-149)	133 (111-156)	0,187*
VLDL (mg/dL)	22 (16-28)	26 (19-33)	23 (14-29)	26 (19-36)	0,073*
Triglicerídios (mg/dL)	102 (80-139)	128 (94-164)	117 (72-149)	131 (95-177)	0,117*
ApoA (mg/dL)	151 (139-169)	142 (128-160)	150 (131-178)	148 (131-164)	0,518*
ApoB-100 (mg/dL)	92 (79-110) ^a	103 (92-117)	96 (82-104)	105 (94-124) ^a	0,013*
ApoB-100/ApoA	0,6 (0,5-0,7)	0,7 (0,6-0,9)	0,6 (0,5-0,8)	0,7 (0,6-0,9)	0,018*
Uréia (mg/dL)	33 (25-39)	36 (28-39)	31 (26-37)	34 (30-39)	0,274*
Creatinina (mg/dL)	0,8 (0,7-1,0)	0,8 (0,8-1,0)	0,8 (0,7-0,9)	0,8 (0,7-1,0)	0,739*
Ácido úrico (mg/dL)	4,7 (3,8-5,8)	4,6 (4,1-5,4)	4,6 (3,5-5,4)	5,4 (4,3-6,1)	0,133*
AST (UI/L)	29 (23-32)	27 (23-33)	25 (20-35)	26 (22-32)	0,758*
ALT (UI/L)	28 (25-43)	29 (26-38)	32 (26-41)	32 (24-39)	0,862*
TSH (uUI/mL)	1,85 (1,1-2,65)	1,56 (1,06-2,24)	1,64 (1,16-2,66)	2,15 (1,4-2,97)	0,149*
T4L (uUI/mL)	0,94 (0,77-1,06)	0,89 (0,72-1,06)	0,91 (0,78-0,97)	0,90 (0,74-1,0)	0,750*
	n=25	n=17	n=27	n=50	
Eritrócitos (x10 ⁶ /mm ³)	4,9 (4,5-5,2)	4,9 (4,8-5,3)	5,0 (4,8-5,6)	5,0 (4,8-5,3)	0,233*
Hb (g/dL)	14 (13-16)	15 (14-16)	14 (13-15)	15 (14-15)	0,527*

Legenda: Os resultados estão apresentados como a mediana e o intervalo interquartilico (P25-P75). Eu-Neg= Euglicemia aterosclerose negativa; Eu-Pos= Euglicemia aterosclerose positiva; Pré-Neg= Pré-diabete aterosclerose negativa; Pré-Pos= Pré-diabete aterosclerose positiva; Glicemia 2h= Glicemia 2 horas pós-carga; HbA1c= Hemoglobina Glicada; HOMA (Homeostasis Model Assessment); HOMA2β= Índice de porcentagem de células beta; HOMA2S=Índice de sensibilidade à Insulina; HOMA2-IR=Índice de resistência à insulina; HDLc= Colesterol da Lipoproteína de Alta Densidade; LDLc= Colesterol da Lipoproteína de Baixa Densidade; VLDLc= Colesterol de Lipoproteína de Muito Baixa Densidade; ApoA=Apolipoproteína A; ApoB-100= Apolipoproteína B 100; AST= Aspartato Transaminase; ALT= Alanina Transaminase; TSH= Hormônio Estimulante da Tireoide; T4L= Tiroxina Livre; Hb= Hemoglobina.

Os grupos foram comparados usando o teste **Kruskal-Wallis*. Para as comparações múltiplas identificadas com letras, foi utilizado o teste de *Dunns*. Letras iguais ^{a,b,c} significam diferença estatística entre os grupos.

Figura 15 - Gráfico da distribuição dos grupos segundo o perfil glicêmico

Fonte: Saldarriaga, M.E.G, 2017. A= Glicemia de jejum; B= Glicemia 2 horas pós-carga; C= Hemoglobina glicada; D= Insulina; E= Índice de sensibilidade à Insulina; F= Índice de resistência à insulina. As barras de erro no gráfico de dispersão apresentam a mediana e o intervalo interquartil P25-P75. Eu-Neg= Euglicemia aterosclerose negativa; Eu-Pos= Euglicemia aterosclerose positiva; Pré-Neg= Pré-diabete aterosclerose negativa; Pré-Pos= Pré-diabete aterosclerose positiva. Os grupos foram comparados usando o teste *Kruskal-Wallis* e pós teste de *Dunns*.

Quando se analisaram as dosagens dos marcadores inflamatórios e as adipocinas, encontrou-se a leptina elevada no grupo de pré-diabéticos com aterosclerose (Pré-Pos) em relação ao controle (Eu-Neg) ($p=0,021$) (**Figura 16**). Observou-se também que o $\text{TNF-}\alpha$ teve uma tendência ao aumento conforme piorava o perfil dos pacientes, estando mais elevado nos pré-diabéticos com aterosclerose, mas o nível de significância, embora próximo, não rejeitou a hipótese nula ($p=0,052$).

Figura 16 - Gráficos de dispersão da distribuição dos grupos segundo a concentração da ApoB-100 e Leptina

Saldarriaga, M.E.G, 2017. A= Apolipoproteína B₁₀₀; B= Leptina. As barras de erro no gráfico de dispersão apresentam a mediana e o intervalo interquartilico P25-P75. Eu-Neg= Euglicemia aterosclerose negativa; Eu-Pos= Euglicemia aterosclerose positiva; Pré-Neg= Pré-diabete aterosclerose negativa; Pré-Pos= Pré-diabete aterosclerose positiva. Os grupos foram comparados usando o teste *Kruskal-Wallis* e pós-teste de *Dunns*.

Tabela 4- Perfil inflamatório e adipocinas dos pacientes distribuídos nos grupos de glicemia e aterosclerose subclínica.

	Eu-Neg	Eu-Pos	Pré-Neg	Pré-Pos	p-valor
	n=27	n=29	n=35	n=64	
TNF- α (pg/mL)	3,5 (2,0-4,2)	3,7 (2,7-5,1)	3,8 (1,8-5,4)	4,0 (3,1-5,8)	0,052*
Adiponectina (μ g/mL)	18,4 (9,3-28,9)	20 (13-38)	17 (10-46)	16 (10-29)	0,382*
	n=25	n=14	n=23	n=38	
Fibrinogênio (mg/dL)	289 (229-331)	305 (269-323)	300 (270-359)	295 (250-326)	0,525*
PCRus (mg/dL)	0,9 (0,5-1,3)	0,8 (0,7-1,3)	0,8 (0,6-1,3)	0,8 (0,6-1,1)	0,821*
	n=25	n=17	n=27	n=50	
Leucócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	6,0 (4,7-7,4)	6,5 (5,3-6,9)	7,2 (5,4-8,3)	6,4 (5,2-7,6)	0,523*
Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	233 (189-297)	229 (210-250)	232 (201-319)	249 (211-276)	0,676*
	n=23	n=11	n=17	n=33	
Leptina (pg/mL)	6,6 (1,7-13) ^a	7,4 (3,6-15)	9,0 (3,7-20)	12 (4,7-23) ^a	0,021*
Resistina (ng/mL)	25,2 (18,2-39,7)	35 (19,1-38,7)	28,6 (22,6-39,1)	29,4 (16,1-52,4)	0,959*
PAI-1 (ng/mL)	59,5 (49,3-84,7)	63,4 (55,2-76,6)	77,5 (50,3-98,7)	82,6 (61,8-103,6)	0,154*
IL-6 (pg/mL)	0,78 (0,53-2,11)	1,52 (0,72-3,32)	1,28 (0,82-2,77)	1,41 (0,69-2,08)	0,223*
IL-1- β (pg/mL)	0,42 (0,39-0,57)	0,57 (0,45-1,11)	0,45 (0,32-0,56)	0,40 (0,33-0,60)	0,138*

Legenda: Os resultados estão apresentados como a mediana e o intervalo interquartilico (P25-P75). Eu-Neg= Euglicemia aterosclerose negativa; Eu-Pos = Euglicemia aterosclerose positiva; Pré-Neg =Pré-diabete aterosclerose negativa; Pré-Pos =Pré-diabete aterosclerose positiva; TNF- α = Fator de Necrose Tumoral Alfa; PAI-1= Inibidor do Ativador do Plasminogênio 1; IL-6= Interleucina 6; IL-1- β = Interleucina 1 Beta; PCRus= Proteína C Reativa ultrassensível.

Os grupos foram comparados usando o teste **Kruskal-Wallis*. Para as comparações múltiplas identificadas com letras, foi utilizado o teste de *Dunns*. Letras iguais ^{a,b,c} significam diferença estatística entre os grupos.

5.2 PERFIL DE miRNAs UTILIZANDO RT-qPCR ARRAY

5.2.1 Controle de Qualidade

Foi avaliada a qualidade de 30 amostras conforme descrito na **seção 3.6.3**. Duas amostras (CAC180 e CAC297) não reuniram os critérios de qualidade recomendados pelo fabricante dos *arrays* e foram excluídas, seguindo para a análise de expressão diferencial 28 amostras dos 4 grupos. Os resultados do controle de qualidade são apresentados na **Figura 17** tomada do *software* disponibilizado online pela Qiagen.

5.2.2 Características dos pacientes incluídos no perfil de miRNAs

O perfil de miRNAs foi realizado nas 28 amostras que cumpriram com os quesitos de qualidade definidos no protocolo do fabricante dos *arrays*, distribuídas nos quatro grupos, assim: 7 Eu-Neg, 6 Eu-Pos, 6 Pré-Neg e 9 Pré-Pos. As características clínicas, biodemográficas, antropométricas e bioquímicas dos indivíduos, são descritas nas tabelas 5 a 7.

Observou-se que da mesma forma que no grupo total, quando foi comparada a distribuição dos grupos por idade, esta foi maior no grupo Pré-Pos quando comparado aos Eu-Neg, no entanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,051$). O sedentarismo, a presença de hipertensão arterial e obesidade tiveram associação ($p<0,05$) com a pré-diabete e a aterosclerose subclínica. Conforme apresentado na **Figura 18**, a proporção de hipertensos, sedentários foi maior nos grupos com pré-diabete e aterosclerose. Da mesma forma, o sobrepeso e a obesidade foi mais prevalente nesses grupos quando comparado aos euglicêmicos sem aterosclerose.

Figura 17- Resultados do controle de qualidade das amostras de cDNA incluídas no perfil de miRNAs

Fonte: Saldarriaga, M.E.G. 2017. Na figura são mostrados os resultados de C_t da duplicata do *spike-in* controle cel-miR-39-3p, os três miRNAs endógenos (miR-16, miR-21 e miR-191), o miRTC e o PPC, assim como os gráficos de barras e as razões entre eles para avaliar o desempenho da transcrição reversa e da qPCR. C_t = ciclo de threshold; miR= miRNA; miRTC= Controle da Transcrição Reversa dos miRNAs; PPC=Controle Positivo da PCR. Acima as primeiras amostras testadas e abaixo a segunda leva de amostras.

Tabela 5- Perfil clínico e biodemográfico dos pacientes incluídos no perfil de miRNAs, classificados nos grupos glicemia e aterosclerose subclínica

	Eu-Neg n=7	Eu-Pos n=6	Pré-Neg n=6	Pré-Pos n=9	p-valor
Idade (anos)	49 (38-58) ^a	59 (54-61)	44 (39-51)	51 (48-62) ^a	0,051*
Gênero Feminino	3 (42,9)	4 (66,7)	3 (50)	2 (22,2)	0,363***
Etnia					
Branca	4 (57,1)	5 (83,3)	3 (50)	5 (55,6)	0,558***
Negra	1 (14,3)	1 (16,7)	2 (33,3)	1 (11,1)	
Parda	2 (28,6)	0 (0,0)	1 (16,7)	3 (33,3)	
Tabagismo					
Sim	0 (0,0)	3 (50)	1 (16,7)	1 (11,1)	0,081***
Não	4 (57,1)	3 (50)	2 (33,3)	3 (33,3)	
Ex-tabagista	3 (42,9)	0 (0,0)	3 (50)	5 (55,6)	
Etilismo	1 (14,3)	2 (33,3)	2 (33,3)	2 (22,2)	0,816***
Sedentarismo	0 (0,0)	4 (66,7)	1 (16,7)	3 (33,3)	0,029***
HAS	1 (14,3)	5 (83,3)	5 (83,3)	6 (66,7)	0,023***
Uso Medicamentos	3 (42,9)	2 (33,3)	5 (83,3)	5 (55,6)	0,295***
Categoria IMC					
Eutrôfico	6 (85,7)	4 (66,7)	1 (16,7)	1 (11,1)	0,015***
Sobrepeso	1 (14,3)	2 (33,3)	3 (50)	7 (77,8)	
Obesidade	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (33,3)	1 (11,1)	
Menopausa	n=3	n=4	n=3	n=2	
	2 (66,7)	3 (75)	2 (66,7)	2 (100)	0,715***

Legenda: Os dados numéricos estão apresentados como a mediana e o intervalo interquartil (P25-P75) e os dados categóricos como o número de indivíduos e a porcentagem entre parêntesis. Eu-Neg= Euglicemia aterosclerose negativa; Eu-Pos= Euglicemia aterosclerose positiva; Pré-Neg= Pré-diabete aterosclerose negativa; Pré-Pos= Pré-diabete aterosclerose positiva; HAS= Hipertensão Arterial Sistêmica; IMC=Índice de Massa Corpórea. Os grupos foram comparados usando os testes **Kruskal-Wallis* e ****Likelihood ratio*. Para as comparações múltiplas identificadas com letras, foi utilizado o teste de *Dunns*. Letras iguais ^{a,b,c} significam diferença estatística entre os grupos.

Durante a avaliação do perfil antropométrico, encontraram-se diferenças entre os grupos para as variáveis IMC (p=0,006), Circunferência Abdominal (p=0,006) e Pressão Arterial Diastólica (p=0,021). As medidas foram maiores nos grupos com pré-diabete do que nos euglicêmicos, 23 e 27 Kg/m²; 77 e 91 cm e 79 e 94 mmHg, respectivamente (**Figura 19**). O peso apresentou a mesma tendência, no entanto não atingiu o valor de significância estatística (p=0,051).

Figura 18 - Gráficos de barras representando a distribuição dos grupos para as variáveis sedentarismo, HAS e classificação por IMC

Saldarriaga, M.E.G, 2017. A= Sedentarismo; B=Hipertensão Arterial Sistêmica; C= Categorias do IMC. O gráfico de barras mostra o número de indivíduos em cada grupo no eixo y e a porcentagem em cima de cada barra. Eu-Neg= Euglicemia ateroesclerose negativa; Eu-Pos = Euglicemia ateroesclerose positiva; Pré-Neg =Pré-diabete ateroesclerose negativa; Pré-Pos =Pré-diabete ateroesclerose positiva. Os grupos foram comparados usando o teste *Likelihood ratio*.

Figura 19 - Gráfico de caixas com barras de erro representando a distribuição dos grupos segundo o IMC, CA e PAD

Saldarriaga, M.E.G, 2017. A= Índice de Massa Corpórea; B= Circunferência Abdominal; C= Pressão Arterial Diastólica. As barras de erro no gráfico de caixas no modelo de *Tukey* apresentam a mediana e o intervalo interquartil P25-P75. Eu-Neg= Euglicemia ateroesclerose negativa; Eu-Pos = Euglicemia ateroesclerose positiva; Pré-Neg = Pré-diabete ateroesclerose negativa; Pré-Pos =Pré-diabete ateroesclerose positiva. Os grupos foram comparados usando os testes *Kruskal-Wallis* e pós test de *Dunns*.

Tabela 6- Perfil antropométrico dos pacientes incluídos no perfil de miRNAs, classificados nos grupos glicemia e aterosclerose subclínica

	Eu-Neg	Eu-Pos	Pré-Neg	Pré-Pos	p-valor
	n=7	n=6	n=6	n=9	
Peso (Kg)	65 (55-70)	58 (52-67)	72 (60-89)	77 (66-82)	0,051*
IMC (Kg/m ²)	23 (22-24) ^a	23 (20-26)	27 (25-33)	27 (26-28) ^a	0,006*
CA (cm)	84 (78-85)	77 (72-82) ^a	92 (83-111)	91 (86-104) ^a	0,006*
Gordura (%)	24,6 (16,8-31,1)	28,5 (18,3-35,4)	31,9 (24,4-36,6)	29,7 (25,1-36)	0,279*
PAS (mmHg)	119 (107-129)	129 (116-167)	139 (135-157)	143 (130-148)	0,068*
PAD (mmHg)	79 (71-83) ^a	95 (78-105)	94 (91-103) ^a	87 (85-97)	0,021*

Legenda: Os resultados estão apresentados como a mediana e o intervalo interquartilico (P25-P75). Eu-Neg= Euglicemia aterosclerose negativa; Eu-Pos = Euglicemia aterosclerose positiva; Pré-Neg =Pré-diabete aterosclerose negativa; Pré-Pos =Pré-diabete aterosclerose positiva; IMC=Índice de Massa Corpórea; CA=Circunferência abdominal; CQ=Circunferência quadril; CA/CQ= razão CA e CQ; PAS=Pressão Arterial Sistólica; PAD=Pressão Arterial Diastólica. Os grupos foram comparados usando o teste **Kruskal-Wallis*. Para as comparações múltiplas identificadas com letras, foi utilizado o teste de *Dunns*. Letras iguais ^{a,b,c} significam diferença estatística entre os grupos.

Na avaliação do perfil bioquímico, só foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os euglicêmicos e os pré-diabéticos para as variáveis glicemia de jejum ($p=0,017$) e a hemoglobina glicada ($p<0,001$). Novamente, esses resultados já eram esperados pela forma de classificação dos grupos. Entretanto, o colesterol VLDL e o TNF- α , mostraram a mesma tendência do grupo total, embora não atingiram o nível de significância estatística.

Tabela 7- Perfil bioquímico dos pacientes incluídos no perfil de miRNAs, classificados nos grupos glicemia e aterosclerose subclínica

	Eu-Neg	Eu-Pos	Pré-Neg	Pré-Pos	p-valor
	n=7	n=6	n=6	n=9	
Glicemia (mg/dL)	84 (74-89)	78 (68-86) ^a	90 (83-93)	94 (86-100) ^a	0,017*
Glicemia 2h (mg/dL)	74 (64-94)	94 (71-101)	93 (81-139)	108 (83-133)	0,141*
HbA1c (%)	5,5 (5,5-5,6) ^{ab}	5,5 (5,1-5,6) ^{cd}	6,1 (5,9-6,2) ^{ac}	6,0 (5,8-6,1) ^{bd}	<0,001*
Insulina (uU/mL)	3,2 (3,0-5,2)	5,2 (3,2-5,4)	6,9 (2,8-8,3)	4,9 (4,1-10,4)	0,359*
HOMA2 β (%)	69 (64-89)	103 (51-130)	93 (75-114)	79 (62-126)	0,743*
HOMA2S (%)	211 (125-216)	133 (86-208)	94 (79-244)	132 (75-162)	0,461*
HOMA2IR (%)	0,5 (0,5-0,8)	0,6 (0,3-0,8)	1,1 (0,4-1,2)	0,8 (0,6-1,6)	0,234*
Colesterol (mg/dL)	189 (180-235)	216 (198-243)	227 (202-294)	216 (190-240)	0,528*
HDLc (mg/dL)	57 (49-71)	51 (38-70)	58 (45-84)	49 (37-62)	0,524

	Eu-Neg	Eu-Pos	Pré-Neg	Pré-Pos	p-valor
	n=7	n=6	n=6	n=9	
LDLc (mg/dL)	122 (118-143)	149 (120-163)	149 (98-176)	131 (112-166)	0,732*
VLDLc (mg/dL)	17 (11-22)	21 (16-32)	16 (6-25)	27 (19-35)	0,169*
Triglicérides (mg/dL)	85 (57-112)	105 (80-159)	94 (66-236)	137 (93-178)	0,541*
ApoA (mg/dL)	156 (151-187)	148 (127-174)	185 (127-207)	150 (132-175)	0,486*
ApoB-100 (mg/dL)	89 (85-91)	104 (96-125)	104 (93-119)	113 (98-134)	0,232*
Uréia (mg/dL)	39 (34-41)	29 (19-37)	30 (28-41)	39 (28-42)	0,414*
Creatinina (mg/dL)	0,8 (0,7-1,0)	0,8 (0,6-1,05)	1,0 (0,87-1,20)	0,9 (0,85-0,95)	0,217*
Ácido úrico (mg/dL)	5,8 (3,1-6,6)	4,6 (4,0-5,2)	5,2 (3,9-7,2)	5,9 (4,2-6,3)	0,745*
TSH (uUI/mL)	1,85 (1,48-2,65)	1,53 (1,27-2,46)	2,09 (1,08-5,35)	2,03 (0,86-4,98)	0,942*
T4L (uUI/mL)	0,72 (0,62-0,95)	0,74 (0,71-0,95)	0,78 (0,74-0,99)	0,9 (0,73-0,91)	0,548*
Eritrócitos (x10 ⁶ /mm ³)	5,0 (4,4-6,6)	4,9 (4,8-5,2)	5,0 (4,7-5,7)	5,3 (5,2-5,6)	0,217*
Hb (g/dL)	13,8 (13,0-16,5)	14,0 (9,3-15,8)	14,6 (13,8-15,5)	15,2 (15,0-16,6)	0,155*
Leucócitos (x10 ³ /mm ³)	5,1 (4,3-6,1)	6,8 (6,0-9,1)	6,2 (5,5-8,3)	5,3 (4,6-8,7)	0,105*
Plaquetas (x10 ³ /mm ³)	221 (173-242)	226 (161-245)	230 (215-292)	229 (196-276)	0,829*
Fibrinogênio (mg/dL)	286 (190-310)	277 (231-414)	294 (242-432)	288 (239-356)	0,680*
PCRus (mg/dL)	0,7 (0,5-1,0)	1,2 (0,8-1,3)	0,9 (0,8-1,5)	0,8 (0,7-1,3)	0,329*
TNF-α	2,66 (0,78-3,45)	4,22 (2,82-6,24)	3,27 (0,99-6,27)	4,25 (2,67-6,93)	0,146*

Legenda: Os resultados estão apresentados como a mediana e o intervalo interquartil (P25-P75). Eu-Neg= Euglicemia ateroesclerose negativa; Eu-Pos = Euglicemia ateroesclerose positiva; Pré-Neg =Pré-diabete ateroesclerose negativa; Pré-Pos =Pré-diabete ateroesclerose positiva; Glicemia 2h= Glicemia 2 horas pós-carga; HbA1c= Hemoglobina Glicada; HDLc= Colesterol da Lipoproteína de Alta Densidade; LDLc= Colesterol da Lipoproteína de Baixa Densidade; VLDLc= Colesterol de Lipoproteína de Muito Baixa Densidade; HOMA (*Homeostasis Model Assessment*); HOMA2β= Índice de porcentagem de células beta; HOMA2S=Índice de sensibilidade à Insulina; HOMA2-IR=Índice de resistência à insulina; ApoA=Apolipoproteína A; ApoB-100=Apolipoproteína B 100; TSH= Hormônio Estimulante da Tireoide; T4L= Tiroxina Livre; Hb= Hemoglobina; PCRus= Proteína C Reativa ultrasensível; TNFα= Fator de Necrose Tumoral alfa.

Os grupos foram comparados usando o teste **Kruskal-Wallis*. Para as comparações múltiplas identificadas com letras, foi utilizado o teste de *Dunns*. Letras iguais ^{a,b,c} significam diferença estatística entre os grupos.

5.2.3 Perfil de Expressão de miRNAs durante a Pré-diabete e Aterosclerose

Fizemos um perfil de expressão de 372 miRNAs em indivíduos euglicêmicos e pré-diabéticos com e sem ateroesclerose subclínica. Após a análise primária dos dados, um total de 162 miRNAs foram detectados em todas as amostras, dos quais 75 estiveram diferentemente expressos nas patologias (p<0,05). A expressão de 49 miRNAs esteve duas vezes mais alta nos pacientes do que nos controles (*fold change* 2.0), sendo que 38 miRNAs apresentaram expressão diminuída e 11 aumentada (**Quadros 1 e 2**).

Quadro 1. miRNAs com Expressão Aumentada

miRNAs com Expressão Aumentada								
miRNA	Fold Regulation	p valor	miRNA	Fold Regulation	p valor	miRNA	Fold Regulation	p valor
hsa-miR-361-5p	2.55	0.0473	hsa-miR-223-3p	3.37	0.0051	hsa-miR-98-5p	4.47	0.0029
hsa-miR-10b-5p	2.85	0.0232	hsa-miR-421	3.46	0.0053	hsa-miR-221-5p	6.54	0.0246
hsa-miR-182-5p	3.11	0.0445	hsa-miR-335-5p	3.89	0.0048	hsa-miR-373-5p	6.70	0.0026
hsa-miR-10a-5p	3.26	0.0320	hsa-miR-409-3p	4.35	0.0402			

Fonte: Saldarriaga, M.E.G, 2017. As análises foram realizadas no *software Web-based miScript miRNA PCR Array* que calcula a expressão relativa mediante o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ e realiza comparações entre os grupos utilizando o teste t de *Student*. Foi estabelecido um *fold change* de 2.0 e uma significância estatística de 5%. hsa=*homo sapiens*; miR= miRNA.

Quadro 2. miRNAs com Expressão Diminuída

miRNAs com Expressão Diminuída								
miRNA	Fold Regulation	p valor	miRNA	Fold Regulation	p valor	miRNA	Fold Regulation	p valor
hsa-miR-181a-3p	-2.11	0.0477	hsa-miR-1914-3p	-3.11	0.0343	hsa-miR-107	-6.22	0.0497
hsa-miR-192-5p	-2.19	0.0345	hsa-miR-22-5p	-3.89	0.0268	hsa-miR-99a-3p	-6.59	0.0394
hsa-miR-20a-5p	-2.21	0.0492	hsa-miR-381-3p	-3.95	0.0383	hsa-miR-144-3p	-7.07	0.0180
hsa-miR-101-3p	-2.22	0.0477	hsa-miR-145-5p	-4.33	0.0255	hsa-miR-181a-5p	-7.11	0.0160
hsa-miR-17-5p	-2.29	0.0260	hsa-miR-210-3p	-4.38	0.0369	hsa-miR-378a-5p	-7.18	0.0169
hsa-miR-451a	-2.31	0.0221	hsa-miR-324-5p	-4.72	0.0251	hsa-miR-142-5p	-7.58	0.0244
hsa-miR-22-3p	-2.33	0.0381	hsa-miR-33a-5p	-5.04	0.0229	hsa-miR-18b-5p	-8.62	0.0486
hsa-miR-140-3p	-2.43	0.0179	hsa-miR-345-5p	-5.08	0.0030	hsa-miR-32-5p	-8.72	0.0411
hsa-miR-106b-5p	-2.61	0.0269	hsa-miR-363-3p	-5.67	0.0332	hsa-miR-21-3p	-9.37	0.0124
hsa-miR-324-3p	-2.78	0.0198	hsa-miR-18a-3p	-5.70	0.0281	hsa-miR-1224-3p	-9.77	0.0094
hsa-miR-19a-3p	-2.79	0.0416	hsa-miR-15a-5p	-5.88	0.0384	hsa-miR-483-5p	-11.54	0.0393
hsa-miR-500a-5p	-2.99	0.0408	hsa-miR-141-3p	-6.19	0.0383	hsa-miR-212-3p	-14.76	0.0253
hsa-miR-93-5p	-3.06	0.0278	hsa-miR-124-3p	-6.19	0.0103			

Fonte: Saldarriaga, M.E.G, 2017. As análises foram realizadas no *software Web-based miScript miRNA PCR Array* que calcula a expressão relativa mediante o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ e realiza comparações entre os grupos utilizando o teste t de *Student*. Foi estabelecido um *fold change* de 2.0 e uma significância estatística de 5%. hsa=*homo sapiens*; miR= miRNA.

Encontrou-se 35 miRNAs associados com aterosclerose (grupo Eu-Pos), 29 com pré-diabete (grupo Pré-Neg) e 9 quando as duas condições se apresentaram de forma concomitante (grupo Pré-Pos). Entre os miRNAs desregulados nos ateroscleróticos, 5 tiveram aumento e 30 diminuição; nos pré-diabéticos 22 estiveram diminuídos e 7 aumentados e no grupo com as duas condições (Pré-Pos), 4 estiveram diminuídos e 5 aumentados. Ademais, houve 24 miRNAs que apresentaram alteração em mais do que um grupo (**Tabela 8**).

Tabela 8- Perfil de expressão dos miRNAs nos grupos de glicemia e a aterosclerose

Aterosclerose			Pré-diabete			Aterosclerose e Pré-diabete		
miRNA	Fold Regulation	p valor	miRNA	Fold Regulation	p valor	miRNA	Fold Regulation	p valor
hsa-miR-192-5p	-2.19	0.034456	hsa-miR-145-5p	-2.01	0.015398	hsa-miR-181a-3p	-2.11	0.047720
hsa-miR-20a-5p	-2.21	0.049218	hsa-miR-93-5p	-2.09	0.031199	hsa-miR-144-3p	-2.26	0.021880
hsa-miR-101-3p	-2.22	0.047727	hsa-miR-324-5p	-2.13	0.005009	hsa-miR-212-3p	-4.28	0.016515
hsa-miR-17-5p	-2.29	0.025967	hsa-miR-15a-5p	-2.14	0.011410	hsa-miR-32-5p	-4.44	0.018540
hsa-miR-22-3p	-2.33	0.038069	hsa-miR-22-3p	-2.14	0.016156	hsa-miR-361-5p	2.63	0.023436
hsa-miR-140-3p	-2.43	0.017890	hsa-miR-106b-5p	-2.29	0.013160	hsa-miR-98-5p	2.99	0.046601
hsa-miR-106b-5p	-2.61	0.026850	hsa-miR-451a	-2.31	0.022055	hsa-miR-409-3p	3.06	0.042977
hsa-miR-19a-3p	-2.79	0.041616	hsa-miR-18a-3p	-2.41	0.043469	hsa-miR-182-5p	3.11	0.044511
hsa-miR-500a-5p	-2.99	0.040842	hsa-miR-324-3p	-2.78	0.019782	hsa-miR-421	3.32	0.028962
hsa-miR-93-5p	-3.06	0.027804	hsa-miR-1914-3p	-3.11	0.034272			
hsa-miR-22-5p	-3.89	0.026789	hsa-miR-363-3p	-3.18	0.006502			
hsa-miR-381-3p	-3.95	0.038343	hsa-miR-345-5p	-3.45	0.038072			
hsa-miR-145-5p	-4.33	0.025526	hsa-miR-144-3p	-4.32	0.008946			
hsa-miR-210-3p	-4.38	0.036887	hsa-miR-378a-5p	-4.43	0.030485			
hsa-miR-324-5p	-4.72	0.025107	hsa-miR-33a-5p	-5.04	0.022927			
hsa-miR-345-5p	-5.08	0.003008	hsa-miR-210-3p	-5.98	0.008128			
hsa-miR-363-3p	-5.67	0.033222	hsa-miR-124-3p	-6.19	0.010332			
hsa-miR-18a-3p	-5.70	0.028085	hsa-miR-21-3p	-6.24	0.020810			
hsa-miR-15a-5p	-5.88	0.038423	hsa-miR-181a-5p	-7.11	0.016037			
hsa-miR-141-3p	-6.19	0.038335	hsa-miR-212-3p	-7.97	0.039286			
hsa-miR-107	-6.22	0.049706	hsa-miR-32-5p	-9.06	0.002439			
hsa-miR-99a-3p	-6.59	0.039439	hsa-miR-1224-3p	-9.77	0.009385			
hsa-miR-144-3p	-7.07	0.018010	hsa-miR-361-5p	2.55	0.047309			
hsa-miR-378a-5p	-7.18	0.016941	hsa-miR-335-5p	3.23	0.000548			
hsa-miR-142-5p	-7.58	0.024378	hsa-miR-223-3p	3.37	0.005074			
hsa-miR-18b-5p	-8.62	0.048573	hsa-miR-421	3.46	0.005329			
hsa-miR-32-5p	-8.72	0.041148	hsa-miR-98-5p	5.97	0.000391			
hsa-miR-21-3p	-9.37	0.012424	hsa-miR-221-5p	6.54	0.024615			
hsa-miR-483-5p	-11.54	0.039294	hsa-miR-373-5p	6.70	0.002550			
hsa-miR-212-3p	-14.76	0.025300						
hsa-miR-10b-5p	2.85	0.023185						
hsa-miR-10a-5p	3.26	0.032002						
hsa-miR-335-5p	3.89	0.004745						
hsa-miR-409-3p	4.35	0.040151						
hsa-miR-98-5p	4.47	0.002939						

Fonte: Saldarriaga, M.E.G, 2017. As análises foram realizadas no *software Web-based miScript miRNA PCR Array* que calcula a expressão relativa mediante o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ e realiza comparações entre os grupos utilizando o teste t de Student. hsa=*homo sapiens*; miR= miRNA. Cor vermelha indica *up-regulation*; cor verde indica *down-regulation*.

5.3 ANÁLISE DE PREDIÇÃO DE ALVOS

5.3.1 Grupo Pré-diabéticos sem Aterosclerose

Na análise de predição de mRNAs alvos utilizou-se a ferramenta *miRNA target Filter* do IPA®. Foram avaliados inicialmente os 29 miRNAs com expressão diferencial (22 diminuídos e 7 aumentados) no grupo Pré-Neg, resultando em 4 miRNAs duplicados (mesma região *seed*) e 27 miRNAs mapeados com 11329 mRNAs alvos.

A seguir filtrou-se miRNAs com alvos experimentalmente validados e obteve-se 21 miRNAs com 678 alvos. A continuação analisou-se os miRNAs envolvidos em doenças metabólicas e obteve-se 17 miRNAs e 223 alvos. No filtro final de rotas metabólicas de DM2 e resposta inflamatória, obteve-se 6 miRNAs com 9 mRNAs alvos (**Quadro 3**), os quais mostraram que quando desregulados em conjunto, levam a uma forte ativação dos genes envolvidos na resistência à insulina e consequente alteração do metabolismo dos carboidratos, como se mostra na **Figura 20**.

Quadro 3. miRNAs desregulados nos pacientes com pré-diabete.

miRNA	Fold Regulation	mRNAs alvo
hsa-miR-124-3p	-6,19	PRKD1, RELA
hsa-miR-145-5p	-2,01	IRS1
hsa-miR-15a-5p	-2,14	FGFR1, GRB2, MAPK3
hsa-miR-106b-5p	-2,29	TNF- α , PPARG
hsa-miR-223-3p	3,37	IRS1
hsa-miR-335-5p	3,23	PTPN11

Fonte: Saldarriaga, M.E.G, 2017. As análises foram realizadas no *software Web-based miScript miRNA PCR Array* que calcula a expressão relativa mediante o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ e realiza comparações entre os grupos utilizando o teste t de Student. hsa=*homo sapiens*; miR= miRNA. Cor vermelha indica *up-regulation*; cor verde indica *down-regulation*. miR= microRNA; mRNA= RNA mensageiro; PRKD1= Proteína cinasa D1; RELA= Fator de Transcrição p65; FGFR1=Receptor 1 do Fator de Crescimento de Fibroblastos; GRB2= Proteína 2 ligada ao Receptor de Fator de Crescimento; MAPK3= Proteína Cinasa 3 ativada por mitógeno; TNF- α = Fator de necrose Tumoral Alfa; PPARG= Receptor Ativado por Proliferador do Peroxissoma Gama; IRS1= Substrato 1 do Receptor de Insulina; PTPN11= Proteína tirosina fosfatase, não-receptor tipo 11.

Figura 20 - miRNAs desregulados nos pacientes com pré-diabete

© 2000-2016 QIAGEN. All rights reserved.

Fonte: Saldarriaga, M.E.G., 2017. PRKD1= Proteína cinasa D1; RELA= Fator de Transcrição p65; EGFR1=Receptor 1 do Fator de Crescimento de Fibroblastos; GRB2= Proteína 2 ligada ao Receptor de Fator de Crescimento; MAPK3= Proteína Cinasa 3 ativada por mitógeno; TNF= Fator de necrose Tumoral Alfa; PPARG= Receptor Ativado por Proliferador do Peroxissoma Gama; IRS1= Substrato 1 do Receptor de Insulina; PTPN11= Proteína tirosina fosfatase, não-receptor tipo 11.

5.3.2 Grupo Euglicêmicos com Aterosclerose

Conforme descrito na **Tabela 9**, foram identificados 35 miRNAs com expressão diferencial, 30 diminuídos e 5 aumentados, dos quais, 8 estiveram duplicados. 30 miRNAs foram mapeados utilizando o algoritmo de miRNAs e obteve-se 10751 mRNAs alvos; seguindo o fluxograma, filtrou-se os miRNAs com alvos experimentalmente validados resultando em 21 miRNAs com 484 alvos. A seguir, utilizou-se um filtro para doenças cardiovasculares e o número se reduziu para 20 miRNAs e 231 alvos. Para completar a análise, filtrou-se para rotas de sinalização de aterosclerose e chegou-se em 6 miRNAs com 9 mRNAs alvos (**Quadro 4**). Quando se construiu a rede de interação dos miRNAs e os genes identificados, observou-se uma regulação positiva da aterosclerose por estes miRNAs. Foi

realizado um crescimento da rede, e identificou-se a ADAMST7, uma proteína com forte associação com o processo aterosclerótico. (Figura 21).

Quadro 4. miRNAs desregulados nos pacientes com aterosclerose subclínica.

miRNA	Fold Regulation	mRNAs alvo
hsa-miR-98-5p	4,47	COL1A2
hsa-miR-15a-5p	-5,88	BCL2
hsa-miR-212-3p	-14,76	MMP9
hsa-miR-145-5p	-4,33	MMP1
hsa-miR-93-5p	-3,06	BCL2, CXCL8, JAK1, MMP3, TNF- α
hsa-miR-19a-3p	-2,79	ALOX5

Fonte: Saldarriaga, M.E.G, 2017. As análises foram realizadas no software *Web-based miScript miRNA PCR Array* que calcula a expressão relativa mediante o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ e realiza comparações entre os grupos utilizando o teste t de Student. hsa=*homo sapiens*; miR= miRNA. Cor vermelha indica *up-regulation*; cor verde indica *down-regulation*. miR= microRNA; mRNA= RNA mensageiro; COL1A2= Colágeno Tipo I alfa 2; BCL2= Regulador de apoptose BCL2; MMP9= Metaloproteinase de matriz 9; MMP1= Metaloproteinase de matriz 1; CXCL8= Precursor da IL-8; JAK1=Janus quinase 1; MMP3= Metaloproteinase de matriz 3; TNF- α =Fator de Necrose Tumoral alfa; ALOX5= Lipooxigenase 5.

Figura 21 - miRNAs desregulados nos pacientes com aterosclerose subclínica

© 2000-2016 QIAGEN. All rights reserved.

Fonte: Saldarriaga, M.E.G, 2017. COL1A2= Colágeno Tipo I alfa 2; BCL2= Regulador de apoptose BCL2; MMP9= Metaloproteinase de matriz 9; MMP1= Metaloproteinase de matriz 1; CXCL8= Precursor da IL-8; JAK1=Janus quinase 1; MMP3= Metaloproteinase de matriz 3; TNF= Fator de Necrose Tumoral alfa; ALOX5= Lipooxigenase 5; ADAMTS7= Metalopeptidasa ADAM com trombospondina tipo 1 motivo7.

5.3.3 Grupo Pré-diabéticos com aterosclerose

Seguindo o fluxograma, identificou-se 9 miRNAs (4 diminuídos e 5 aumentados) e 4828 mRNAs alvos preditos. A continuação no filtro de miRNAs com alvos experimentalmente observados, obteve-se 7 miRNAs e 169 mRNAs.

Para refinar a análise, foi aplicado um filtro por doenças, limitando aos miRNAs associados com doença cardiovascular, doenças metabólicas e resposta inflamatória, resultando em 6 miRNAs e 101 mRNAs alvo. Finalmente foi realizado um filtro de rotas de sinalização de aterosclerose e DM2, e obteve-se 3 miRNAs e 3 alvos (**Quadro 5**).

Dos 3 miRNAs identificados, miR-212-3p e miR-32-5p tiveram a sua expressão diminuída, entanto que miR-98-5p esteve aumentado. Interessantemente, apesar do pequeno número de moléculas identificadas, após o crescimento da rede com o TNF- α e a leptina que mostraram um aumento neste grupo; e os AGEs, marcadores de hiperglicemia, observamos uma forte ativação da aterosclerose. (**Figura 22**).

Quadro 5. miRNAs desregulados nos pacientes com aterosclerose subclínica e pré-diabete.

miRNA	<i>Fold Regulation</i>	mRNAs alvo
hsa-miR-98-5p	2.99	COL1A2
hsa-miR-212-3p	-4.28	MMP9
hsa-miR-32-5p	-4.44	MAP2K4

Fonte: Saldarriaga, M.E.G, 2017. As análises foram realizadas no *software Web-based miScript miRNA PCR Array* que calcula a expressão relativa mediante o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ e realiza comparações entre os grupos utilizando o teste t de Student. hsa=*homo sapiens*; miR= miRNA. Cor vermelha indica *up-regulation*; cor verde indica *down-regulation*. miR= microRNA; mRNA= RNA mensageiro; COL1A2= Colágeno Tipo I alfa 2; MMP9= Metaloproteinase de matriz 9; MAP2K4= Proteína Cinasa 4 ativada por mitógeno de dupla especificidade.

Figura 22 - miRNAs desregulados nos pacientes com aterosclerose subclínica e Pré-diabete

© 2000-2017 QIAGEN. All rights reserved.

Fonte: Saldarriaga, M.E.G, 2017. COL1A2= Colágeno Tipo I alfa 2; MMP9= Metaloproteinase de matriz 9; MAP2K4= Proteína Cinase 4 ativada por mitógeno de dupla especificidade; AGE= Produtos de Glicação Avançada; ADAMTS7= Metalopeptidase ADAM com trombospondina tipo 1 motivo 7; LEP= Leptina; TNF= Fator de Necrose Tumoral alfa.

6. DISCUSSÃO

O aumento das concentrações plasmáticas da glicose tem diversas etiologias. No caso do DM2, a resistência à insulina e a alteração subsequente da função e massa das células beta têm sido acusadas como responsáveis pela progressão e estabelecimento da doença. Adicionalmente tem sido mostrado que os estágios intermediários de alteração do metabolismo da glicose, AGJ (Alteração da Glicemia de Jejum) e ATG (Alteração da Tolerância à Glicose), constituem condições de risco incrementado para o desenvolvimento de DM2 em 10 anos.

Da mesma forma que o DM2, a doença cardiovascular aterosclerótica tem um desenvolvimento crônico e multifatorial. Embora os fatores de risco são bem conhecidos, a prevalência continua alta e constitui a principal causa de morte por DCNT.

Além das duas doenças terem a característica de cronicidade, também têm uma forte interligação. É bem conhecido que muitos dos fatores de risco são comuns às duas doenças e, que os pacientes com DM2 têm um risco incrementado para desenvolver DCV. De forma semelhante ao desenvolvimento do diabetes, a doença aterosclerótica tem uma fase subclínica que pode ter como primeira manifestação um evento agudo e as vezes a até a morte súbita. Interessantemente os estágios intermediários, pré-diabete e aterosclerose subclínica, iniciam de forma concomitante, pelo que é relevante estudar essas 2 condições de forma conjunta e tentar entender os mecanismos fisiopatológicos que são comuns a elas (INTZILAKIS et al., 2012)(THE DECODE STUDY GROUP, 2003).

Neste estudo comparou-se o comportamento da aterosclerose subclínica em indivíduos euglicêmicos e pré-diabéticos. Voluntários sem diagnóstico prévio de diabetes nem doença aterosclerótica foram classificados em quatro grupos segundo o perfil glicêmico e os resultados dos estudos de imagem cardiovascular. Avaliaram-se parâmetros biodemográficos, antropométricos, clínicos, bioquímicos e em seguida foi feito um perfil exploratório de miRNAs, em busca de potenciais biomarcadores da doença.

Os resultados deste trabalho mostraram que a HbA1c além de ser um teste mais acessível por dispensar a necessidade do jejum, foi o teste mais estável e permitiu a melhor classificação dos indivíduos. Este resultado deve-se à condição de marcador crônico da HbA1c, i.e. reflete a média de glicose sanguínea dos pacientes dois a três meses anteriores ao exame, portanto, permite avaliar conjuntamente a AGJ e a ATG (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

Quando foram avaliadas as variáveis clínicas, antropométricas e biodemográficas, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na distribuição dos pacientes nos grupos segundo o gênero, mas sim na idade, a etnia, menopausa e a dislipidemia. Estes achados estão em concordância com a literatura. O envelhecimento tem sido amplamente descrito como um dos fatores de risco principais de DCV que, na presença aterosclerose subclínica, aumenta ainda mais a incidência de eventos agudos e mortalidade nessa população (KULLER, 2006).

No caso das mulheres, desenvolvem DAC mais tarde que os homens, possivelmente devido ao papel protetor dos hormônios femininos. No entanto, na menopausa, essa proteção é perdida, o risco de doença coronariana aumenta de forma significativa e desaparece a diferença na prevalência por gênero. Entre 45 e 64 anos, uma de cada nove mulheres tem alguma forma de DCV. Após 65 anos de idade, a relação muda para uma de cada três mulheres (CELISO; GEBARA; ANDRADE, 2008), explicando por que não se observou diferença na prevalência da aterosclerose segundo o gênero neste estudo.

A maioria dos participantes se autodeclararam brancos e se observou também uma proporção maior da etnia branca nos dois grupos com aterosclerose. Este resultado está de acordo com a literatura, onde se estabelece claramente a susceptibilidade dessa etnia para desenvolver aterosclerose (MCCLELLAND et al., 2006). A dislipidemia também mostrou o mesmo comportamento, remarcando mais uma vez o seu importante papel como fator de risco no desenvolvimento e progressão das lesões ateroscleróticas (XAVIER et al., 2013).

Encontrou-se uma diferença no percentual de gordura corporal entre o grupo controle e os pacientes com pré-diabete e aterosclerose, entretanto a circunferência abdominal que apresentou a mesma tendência, não mostrou diferença estatisticamente significativa. Foram observadas também diferenças estatisticamente significantes entre os pré-diabéticos com

aterosclerose e os dois grupos euglicêmicos nas concentrações de insulina ($p=0,004$) e nos índices *HOMA2-IR* ($p=0,001$) e *HOMA2-S* ($p=0,001$); sendo maiores nos indivíduos pré-diabéticos com e sem aterosclerose.

O aumento na concentração da insulina e a diminuição progressiva da sensibilidade à insulina nos tecidos, são consistentes com os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na progressão do DM2 que cursa com resistência à insulina, seguida de hiperinsulinemia compensatória e graus variáveis de glicemia plasmática (ABDUL-GHANI; TRIPATHY; DEFRONZO, 2006). Em nosso estudo, esta alteração pode ser explicada pelo aumento da adiposidade observada na avaliação da composição corporal, já que o aumento do tecido adiposo, principalmente na área abdominal, é considerado um fator determinante no desenvolvimento da resistência à insulina. Isto devido a sua capacidade de secretar citocinas IL-6, TNF- α e ácidos graxos livres (AGL) que alteram a sensibilidade dos tecidos à insulina (BODEN, 2011).

Resulta interessante que o aumento dos marcadores de resistência à insulina, embora sem diferenças estatisticamente significantes entre os grupos Pré-Neg e o Pré-Pos, e Eu-Neg e Eu-Pos, mostrou uma tendência crescente com o agravamento dos perfis clínicos dos pacientes. Assim, o grupo com pré-diabete e aterosclerose teve as maiores concentrações de insulina e índices de resistência, além de mostrar diferença estatística significativa com o grupo que tinha aterosclerose unicamente. Podendo indicar que a interação das duas condições pode constituir um perfil de risco maior.

Um trabalho publicado em 2013, avaliou as contribuições relativas da resistência à insulina, a hiperglicemia e a gordura abdominal para o desenvolvimento de aterosclerose subclínica, medida pelo aumento da EMI em 6065 participantes do estudo *The Netherlands Epidemiology of Obesity* (NEO). Os investigadores encontraram que a resistência à insulina e a hiperglicemia estiveram associadas ao aumento do EMI de forma independente, sugerindo que cada um deles tem uma contribuição individual para o desenvolvimento de aterosclerose. Eles concluíram também que esses fenômenos podiam ser explicados em grande parte pela gordura abdominal (GAST et al., 2013).

Outro estudo associou a resistência à insulina com aterosclerose em pacientes não diabéticos que tiveram infarto agudo do miocárdio. Os pesquisadores encontraram que

conforme aumentava a resistência à insulina avaliada pelo *HOMA-IR*, aumentavam também o número de lesões estenóticas significantes na angiografia de coronárias (KARROWNI et al., 2013). Isso faz sentido quando observamos que os principais detonantes da resistência à insulina (moléculas pró inflamatórias, AGL, entre outros), têm um papel primordial na disfunção endotelial e progressão da lesão aterosclerótica.

A dislipidemia observada particularmente pelo aumento das VLDLs ricas em triglicérides e, a ApoB, a apolipoproteína presente nas próprias VLDLs e LDLs; já têm sido descrita em vários trabalhos como o resultado da alteração hepática associada à resistência à insulina. O aumento do efluxo de AGL para o fígado devido à resistência periférica à insulina produz um aumento na síntese hepática de triglicérides, diminuição na degradação da ApoB e aumento na secreção de VLDLs (JULIUS, 2003) (HAN et al., 2009) (CHOI; GINSBERG, 2011). Portanto, a resistência à insulina além de ser o principal fator subjacente na diabetes melito tipo 2, tem também um papel fundamental na alteração do metabolismo dos lipídeos, que por sua vez, constituem um fator chave no desenvolvimento das lesões ateroscleróticas.

Em relação ao perfil dos miRNAs circulantes, realizado nas 28 amostras de pacientes euglicêmicos e pré-diabéticos com e sem aterosclerose subclínica, este estudo exploratório mostrou que um número expressivo dos miRNAs analisados tiveram as expressões diminuídas. Isto indica que há uma forte ativação das moléculas envolvidas nos processos patológicos da aterosclerose subclínica e a alteração do metabolismo dos carboidratos.

Identificamos grupos diferentes de miRNAs com expressão diferencial quando os pacientes apresentavam aterosclerose, pré-diabete ou as duas condições de forma concomitante. Um miRNA, miR-212-3p, encontrou-se diminuído nos três grupos, enquanto outros três miRNAs tiveram a sua expressão alterada em dois dos grupos. O miR145-5p e miR-15a-5p diminuíram sua expressão nos pacientes pré-diabéticos e ateroscleróticos, enquanto o miR-98-5p esteve aumentado nos pacientes ateroscleróticos e os que tinham as duas condições (Pré-Pos).

No grupo de pré-diabéticos encontrou-se 6 miRNAs, miR-124-3p, miR-145-5p, miR-15a-5p, miR106b-5p, miR-223-3p e miR-335-5p com 9 alvos. A maioria dos genes identificados como alvo desses miRNAs desregulados, fazem parte da via de sinalização do receptor da insulina, i.e. o PRKD1, IRS1, GRB2, MAPK3, PPARG; resultado este que pode

ser responsável pela ativação da resistência à insulina e a alteração do metabolismo dos carboidratos observado na rede e nos resultados da avaliação bioquímica comentados antes.

No caso do IRS1, observamos uma regulação por miRNAs com expressão oposta. O miR-145-5p e o miR-15a-5p estiveram diminuídos, pelo que se esperava uma ativação do IRS1, no entanto, o aumento do miR-223-3p mostrou ter uma influência mais forte sobre o gene, resultando em uma regulação negativa e a consequente alteração da cascata de sinalização intracelular do receptor da insulina. Esse resultado é um claro exemplo da complexidade da regulação por miRNAs. Esta regulação do mesmo gene por três miRNAs com efeito oposto, pode sustenta-se pelo mecanismo fisiopatológico da pré-diabete, onde embora existe resistência insulínica, suportada pela diminuição da atividade do IRS1, outra porção das células continua funcional e, dependendo do estágio, podem aumentar sua atividade para compensar essa resistência, gerando uma hiperinsulinemia compensatória.

A proteína pró inflamatória TNF- α , e as quinases, também estiveram ativadas na rede e mostraram contribuir ao aumento da resistência à insulina, regulando negativamente o IRS1 e o PPAR γ . Esse último por sua vez, ativou o RELA (p65), uma proteína da família do NF- κ B, importante regulador da resposta inflamatória. O papel do NF- κ B nas doenças metabólicas como o DM2 e a aterosclerose tem sido bem estudado. Uma vez ativado, esse fator é responsável pela transcrição dos genes associados com sobrevivência celular, proliferação e moléculas pró inflamatórias como a IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, VCAM, ICAM, o TNF- α , INF- γ , entre outras; as quais participam na sinalização e ativação de células imunes (ESCÁRCEGA, 2010).

Vários autores coincidem em que a ativação crônica da inflamação mediada pelo NF- κ B é primordial no desenvolvimento dessas doenças metabólicas. Por outro lado, os fatores predisponentes destas doenças, como a obesidade, hiperlipidemia, hiperglicemia, o estresse oxidativo, entre outros, ativam o NF- κ B, mantendo esse ambiente inflamatório crônico que culmina em resistência insulínica, disfunção endotelial e progressão das lesões nas artérias (BASTARD et al., 2006) (BAKER; HAYDEN; GHOSH, 2011).

O miR-212-3p foi o miRNA com maior *fold change* (14,76) neste grupo de pré-diabéticos, no entanto, quando foi feita a análise de predição, ele não mostrou regular genes envolvidos na alteração do metabolismo dos carboidratos, e sim um único gene alvo,

associado exclusivamente com aterosclerose. Isto pode indicar um possível risco para desenvolver aterosclerose em indivíduos com pré-diabete, devido à presença de miRNAs com expressão alterada, reguladores de genes envolvidos na aterogênese e progressão.

Na análise de predição dos miRNAs para a aterosclerose, o miR-212-3p encontrou-se novamente diminuído e regulou positivamente a MMP9, uma proteína da família das metaloproteinases responsáveis pelo remodelamento tecidual durante processos tanto fisiológicos como patológicos de embriogênese, angiogênese, reparação tecidual, migração celular, entre outros (AMĂLINEI; CĂRUNTU; BĂLAN, 2007).

Junto com o TNF- α , a MMP9 foi uma molécula central na rede de aterosclerose, evidenciado pelo grande número de conexões que teve. Foi ativada pelas proteínas BCL2, CXCL8, JAK1, assim como por outras metaloproteinases, MMP1 e MMP3, por sua vez reguladas pelo miR-145-5p e miR-93-5p. Adicionalmente, a MMP9 mostrou ativar diretamente à aterogênese e a aterosclerose. O aumento da expressão da MMP9 na rede da aterosclerose está em concordância com a fisiopatologia da doença que se caracteriza por uma ativação da inflamação, na qual as células imunes, principalmente os macrófagos das placas ateroscleróticas, apresentam uma expressão aumentada dessa metaloproteinases. Interessantemente, o NF-K β , tem um papel central no estímulo da produção da MMP9, podendo explicar em parte, a interligação que existe entre a pré-diabete e a aterosclerose (YABLUCHANSKIY et al., 2013).

A MMP9 é considerada um biomarcador de risco de infarto do miocárdio e morte nos pacientes com aterosclerose. Em um estudo prospectivo de pacientes com DAC foi dosada a concentração inicial da MMP9. Os pesquisadores observaram que os pacientes que faleceram por causas cardiovasculares durante o período de seguimento, tiveram concentrações mais altas da MMP9 (BLANKENBERG et al., 2003). Por outro lado, um estudo utilizando um modelo *in vivo* de aterosclerose com camundongos *knockout* para ApoE, demonstrou que o aumento da forma ativa da MMP9 esteve associado com aumento de rupturas das placas. Isto configura um cenário de risco aumentado de sofrer infarto ou morte nos pacientes com essa condição, assim como uma oportunidade terapêutica para o tratamento de placas instáveis (GOUGH et al., 2006). Dado que a MMP9 foi o único alvo do miR-212 nas redes de predição neste estudo, e que este miRNA esteve desregulado nos 3 grupos,

resulta interessante validar esta regulação em modelos de aterosclerose, e investigar mais profundamente o rol desse miRNA na desestabilização das placas de aterosclerose.

Foi realizado um levantamento bibliográfico sobre o cluster miR-212/132 e encontrou-se que os dois miRNAs derivam-se do mesmo miRNA primário, têm uma sequência madura similar e compartilham a mesma região *seed*, portanto, podem regular os mesmos transcritos, mas existem resultados controversos ao respeito. O cluster miR212/132 encontra-se enriquecido nas células neuronais, mas também tem sido descrito em testículos, glândulas mamárias e no coração. Por encontrar-se principalmente no cérebro, a maioria dos trabalhos sobre este cluster estão na área de neurologia e, portanto encontraram-se poucos estudos associando-o com aterosclerose (WANET et al., 2012).

Na literatura o cluster miR212/132 têm sido caracterizado como pró-angiogênico. Um trabalho sobre hemorragia subaracnóidea aguda devida a aneurisma, observou que a expressão do miR-132-3p encontrava-se aumentada (SU et al., 2015). Esse aumento possivelmente deveu-se ao estado isquêmico ocasionado pela aneurisma, já que o miRNA é conhecido como um ativador da angiogênese, a qual, por sua vez, é ativada pela isquemia (ANAND; CHERESH, 2008).

Em 2015 foi publicado um trabalho no qual utilizaram um modelo *in vivo* de isquemia de membros inferiores em camundongos. Os pesquisadores encontraram que após a isquemia, o cluster miR212/132 apresentou um aumento significativo na sua expressão acompanhado de arteriogênese. O miR-132 apresentou expressões significativamente maiores do que o miR-212, podendo indicar que o primeiro tivesse maior atividade, o que foi posteriormente confirmado pelos pesquisadores em ensaios de hibridização *in situ*. Em seguida, utilizando o mesmo modelo de isquemia em camundongos *knockout* para o cluster miR212/132, observaram uma diminuição na perfusão nos animais, quando comparados aos camundongos nativos. Estes resultados confirmam a característica pró angiogênica do cluster, particularmente do miR132 (LEI et al., 2015).

Outro estudo realizado em 2014 mostrou a importância do cluster miR212/132 no remodelamento cardíaco estimulado por TGF- β , um agente pró-fibrótico e anti-angiogênico, que mostrou aumentar a expressão do cluster miR212/132 durante um estudo prévio deste grupo. Utilizando um modelo *in vivo* e *ex-vivo* em retinas de camundongos *knockout* para

miR212/132, os pesquisadores analisaram o papel do cluster na modulação da angiogênese. Eles encontraram que a diminuição na expressão do cluster aumentou o desenvolvimento da vasculatura via Sirt1 e GAB1 (KUMARSWAMY et al., 2014).

Em outros experimentos, com o fim de entender a controvérsia na literatura sobre a regulação da angiogênese por este cluster, os pesquisadores transfectaram o miR-212 e o miR-132 de forma independente em células endoteliais e, demonstraram que o miR-212, mas não miR-132, diminuiu a migração endotelial e a formação de tubos capilares. Da mesma forma, mostraram também que a inibição do miR-212 conseguiu reverter essa situação, o que não aconteceu com o mir-132, indicando que embora os dois miRNAs compartilhem a mesma região *seed*, podem ter funções diferentes. Este resultado foi comprovado mediante uma análise transcriptômica que evidenciou que o miR-212 e o miR-132 regulam grupos de transcritos diferentes. Finalmente eles conseguiram demonstrar que o miR-212 (mas não o miR-132) possui características anti-angiogênicas. (KUMARSWAMY et al., 2014).

Nossos resultados de predição no grupo de ateroscleróticos são consistentes com o trabalho de Kumarswamy et al. já que o miR-212 encontrou-se diminuído e mostrou produzir uma forte ativação da MMP9, portanto da atividade pró-angiogênica, o que nos permite atribuir um perfil anti-angiogênico ao miR-212 em este estudo.

Além do miR-212-3p, identificaram-se neste estudo outros cinco miRNAs desregulados, o miR-98-5p, miR-15a-5p, miR-145-5p, miR-93-5p e miR-19a-3p; todos eles reguladores de moléculas associadas com disfunção endotelial e resposta inflamatória, fundamentais no processo de formação das placas de ateroma.

Entre estes miRNAs, somente o miR-98-5p esteve aumentado, levando à diminuição da atividade do seu alvo, COL1A2, uma proteína da matriz extracelular associada com a síntese de colágeno tipo I. Em 2016, um estudo sobre reparo durante de lesões térmicas em pele e fibroblastos já tinha observado que o aumento do miR-98 causava diminuição da COL1A2, sugerindo que a diminuição deste miRNA promove a síntese de colágeno tipo I (LIU et al., 2016).

Mutações nos genes do colágeno tipo I causam variados fenótipos na pele, ossos, tendões e alterações vasculares como a dilatação da aorta ou ruptura. Portanto, a diminuição

na proteína do colágeno COL1A2 predita na análise poderia associar-se com perda da elasticidade dos vasos e risco de ruptura das placas ateroscleróticas (PONTICOS; SMITH, 2014). Esta regulação negativa da COL1A2 aunada à regulação positiva da MMP9 pelo miR-212, configuram um estado de instabilidade das placas de ateroma e um consequente aumento do risco de eventos isquêmicos neste grupo de pacientes.

O miR-93-5p teve um rol muito importante na rede, além de regular a MMP3, regulou positivamente várias moléculas pró inflamatórias (TNF- α , CXCL8, BCL2 e a JAK1). Conforme descrito nos parágrafos anteriores, esse estado inflamatório crônico, gera o ambiente propício para o desenvolvimento da aterosclerose. Trabalhos prévios já tinham mostrado a associação do miR-93 com a aterosclerose, no entanto, a regulação do miRNA nesses estudos foi oposta (aumentada) à encontrada em nosso estudo. Além do miR-93-5p encontrar-se aumentado, os genes regulados por ele nesses estudos, mostraram associação com o metabolismo de lipídeos e não com a ativação direta da inflamação, como observado em nosso trabalho (HE et al., 2015).

O BCL2 foi regulado ademais do miR-93, pelo miR-15a-5p, que se encontrou diminuído neste estudo. Na rede de predição, o BCL2 mostrou ativar o CXCL8, a MMP9 e a aterosclerose diretamente. Seu papel de regulador de apoptose foi sido descrito previamente na aterosclerose, na qual pode promover ou inibir este processo nas lesões (KUTUK; BASAGA, 2006). Finalmente, o miR-19a-3p que se encontrou diminuído, regulou de forma direta a ALOX5 e o TNF- α , que por sua vez ativaram a aterogênese e a aterosclerose na rede. Ressaltando mais uma vez o papel da inflamação nessa doença.

No último grupo Pré-Pos observou-se que dos 9 miRNAs que apresentaram expressão diferencial, só 7 tinham alvos experimentalmente validados. Após as filtragens por doenças associadas com aterosclerose, ficaram na análise o miR-98-5p, miR-212-3p e o miR-32-5p com 3 genes alvos, COL1A2, MMP9 e a MAP2K4, respectivamente. Os dois primeiros miRNAs estiveram também alterados no grupo com aterosclerose, ratificando seu papel no desenvolvimento da doença, além do que, ainda em condições de hiperglicemia, eles continuaram regulando exclusivamente moléculas associadas com aterosclerose. Como a leptina e o TNF- α apresentaram concentrações maiores no grupo de pré-diabéticos com aterosclerose, quando incorporados à rede construída para esse grupo de pacientes, mostraram estar muito ativados e conduziram a aterosclerose.

Finalmente, a ADAMTS7, uma desintegrina e metaloproteinase, identificada recentemente em uma metanálise do GWAS (realizado no programa *Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology Consortium*) que analisou dados de escore de cálcio de 9961 homens e mulheres. Variantes no gene *ADAMTS7* estiveram associadas com calcificação coronariana, uma forma de aterosclerose subclínica, assim como com seu principal desfecho, o infarto agudo do miocárdio (PSATY et al., 2009).

A partir dessa metanálise, vários trabalhos têm sido desenvolvidos para estudar o rol da ADAMTS7 na doença arterial coronariana, com resultados consistentes com os achados no GWAs. Em 2013 foi realizado o primeiro trabalho *in vivo* de validação da associação da ADAMTS7 com a aterogênese utilizando camundongos knockout para o receptor de LDL e a ApoE. Os pesquisadores encontraram que a proteína tem atividade pró aterogênica, provavelmente através da modulação positiva da migração das células vasculares (BAUER et al., 2015).

A ADAMTS7 foi identificada durante o crescimento da rede na análise de predição para os grupos com aterosclerose, na qual apresentou uma forte associação com esta doença. A proteína não mostrou ser regulada diretamente por nenhum dos miRNAs identificados neste estudo devido à que a análise esteve limitada às relações validadas experimentalmente e, até a data, não se reportam na literatura estudos associando nenhum miRNA com esta proteína.

Foi realizada a predição utilizando o software *TargetScan*® e, identificou-se o miR-29-3p como regulador, baseado na complementariedade da sua sequência *seed* à região 3' UTR da ADAMTS7, pelo que resulta muito relevante validar essa relação e quantificar a expressão do gene *ADAMTS7* na corte deste estudo.

Contudo, foi possível observar a associação entre a aterosclerose subclínica e o aumento da massa de adipócitos, a resistência à insulina, hiperlipidemia (particularmente das lipoproteínas contendo ApoB), o TNF- α e a leptina nesta amostra. Adicionalmente, encontrou-se uma acentuada diminuição na expressão dos miRNAs reguladores de genes envolvidos no desenvolvimento e progressão da alteração do metabolismo dos carboidratos como da aterosclerose.

Figura 23 - Resumo do Protocolo da Pesquisa e Resultados

Fonte: Saldarriaga, M.E.G, 2017. Os grupos foram comparados usando os testes *Kruskal-Wallis*, *Likelihood ratio* e *Dunns*. As análises dos miRNAs foram realizadas no *software Web-based miScript miRNA PCR Array* que calcula a expressão relativa mediante o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ e realiza comparações entre os grupos utilizando o teste t de *Student*. hsa=*homo sapiens*; miR= miRNA. Cor vermelha indica *up-regulation*; cor verde indica *down-regulation*. miR= microRNA; PRKD1= Proteína cinasa D1; RELA= Fator de Transcrição p65; FGFR1=Receptor 1 do Fator de Crescimento de Fibroblastos; GRB2= Proteína 2 ligada ao Receptor de Fator de Crescimento; MAPK3= Proteína Cinasa 3 ativada por mitógeno; TNF-α= Fator de necrose Tumoral Alfa; PPARG= Receptor Ativado por Proliferador do Peroxissoma Gama; IRS1= Substrato 1 do Receptor de Insulina; PTPN11= Proteína tirosina fosfatase, não-receptor tipo 11; COL1A2= Colágeno Tipo I alfa 2; BCL2= Regulador de apoptose BCL2; MMP9= Metaloproteinase de matriz 9; MMP1= Metaloproteinase de matriz 1; CXCL8= Precursor da IL-8; JAK1=Janus quinase 1; MMP3= Metaloproteinase de matriz 3; ALOX5= Lipooxigenase 5; MAP2K4= Proteína Cinasa 4 ativada por mitógeno de dupla especificidade.

7. CONCLUSÕES

- A aterosclerose subclínica teve como fatores clínicos e bioquímicos determinantes neste estudo o envelhecimento, a menopausa, dislipidemia (aumento de VLDL e ApoB-100), etnia branca, resistência à insulina, o aumento da adiposidade, leptina e do TNF- α ;
- O aumento do miR98-5p e a diminuição dos miRNAs miR-212-3p, miR-145-5p, miR-93-5p, miR15a-5p, miR-19a-3p, miR32-5p mostram estar envolvidos na patogênese da aterosclerose subclínica;
- A inflamação foi o principal mecanismo associado com o desenvolvimento de aterosclerose subclínica neste estudo;
- O miR-212-3p mostrou-se um marcador importante para o diagnóstico e prognóstico da aterosclerose subclínica via ativação direta da MMP9;
- O miR-29-3p foi predito de regular a ADAMST7, uma proteína pouco conhecida associada recentemente com aterogênese que mostrou uma forte ativação nas redes de aterosclerose subclínica. São necessários estudos de validação dessa interação, devido ao seu potencial como biomarcador de aterosclerose subclínica e a falta de estudos na literatura sobre regulação por miRNAs desta proteína.

8. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

A principal limitação do estudo consistiu na falta de validação na população total do estudo dos miRNAs identificados neste estudo exploratório, assim como a expressão gênica dos RNAs mensageiros, identificados *in silico*, como alvos dos principais miRNAs.

O tamanho amostral utilizado no perfil dos miRNAs constituiu também uma limitante neste estudo. Análises estatísticas mais robustas para fazer inferências sobre os miRNAs, não foram possíveis. No entanto, assim que for realizada a validação dos miRNAs na corte completa do estudo, estas serão feitas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-GHANI, M. a; TRIPATHY, D.; DEFRONZO, R. a. Contributions of beta-cell dysfunction and insulin resistance to the pathogenesis of impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose. **Diabetes care**, v. 29, n. 5, p. 1130–1139, 2006.

AMĂLINEI, C.; CĂRUNTU, I. D.; BĂLAN, R. A. Biology of metalloproteinases. **Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie**, v. 48, n. 4, p. 323–334, 2007.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes. **Diabetes Care**, v. 28, n. Supplement 1, p. S4–S36, 1 jan. 2005. Disponível em: <http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/diacare.28.suppl_1.S4>.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, v. 37, n. Supplement_1, p. S81–S90, 1 jan. 2014. Disponível em: <<http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/dc14-S081>>.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes--2015: Summary of Revisions. **Diabetes Care**, v. 38, n. Supplement_1, p. S4–S4, 1 jan. 2015. Disponível em: <<http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/dc13-S011>>.

ANAND, S.; CHERESH, D. A. MicroRNA-mediated Regulation of the Angiogenic Switch. **Curr Opin Hematol**, v. 141, n. 4, p. 520–529, 2008.

BAKER, R. G.; HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. NF- κ B, Inflammation, and Metabolic Disease. **Cell Metabolism**, v. 13, n. 1, p. 11–22, 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S155041311000450X>>.

BARTHELEMY, O.; LE FEUVRE, C.; TIMSIT, J. Silent Myocardial Ischemia Screening in Patients. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, n. 2, p. 285–293, mar. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302007000200018&lng=en&nrm=iso&tlng=en>.

BASTA, G.; SCHMIDT, A. M.; DE CATERINA, R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. **Cardiovascular research**, v. 63, n. 4, p. 582–92, 1 set. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15306213>>. Acesso em: 13 maio. 2014.

BASTARD, J.-P.; MAACHI, M.; LAGATHU, C.; KIM, M. J.; CARON, M.; VIDAL, H.; CAPEAU, J.; FEVE, B. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. **European cytokine network**, v. 17, n. 1, p. 4–12, mar. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16613757>>.

BAUER, R. C.; TOHYAMA, J.; CUI, J.; CHENG, L.; YANG, J.; ZHANG, X.; OU, K.; PASCHOS, G. K.; ZHENG, X. L.; PARMACEK, M. S.; RADER, D. J.; REILLY, M. P. Knockout of Adamts7, a novel coronary artery disease locus in humans, reduces atherosclerosis in mice. **Circulation**, v. 131, n. 13, p. 1202–1213, 2015.

BLANKENBERG, S.; RUPPRECHT, H. J.; POIRIER, O.; BICKEL, C.; SMIEJA, M.; HAFNER, G.; MEYER, J.; CAMBIEN, F.; TIRET, L. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. **Circulation**, v. 107, n. 12, p. 1579–1585, 2003.

BODEN, G. Obesity, insulin resistance and free fatty acids. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v. 18, n. 2, p. 139–143, abr. 2011. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=01266029-201104000-00008>>.

CELSO, O.; GEBARA, E.; ANDRADE, J. P. De. I Diretriz Brasileira sobre Prevenção de Doenças Cardiovasculares em Mulheres Climatéricas e a Influência da Terapia de Reposição Hormonal (TRH) da Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC) e da Associação Brasileira do Climatério (SOBRAC). **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 91, p. 1–23, 2008. Disponível em: <http://publicacoes.cardiol.br/consenso/2008/diretriz_dcv_mulheres.pdf?origin=publication_detail>.

CHAIT, A.; BORNFELDT, K. E. Diabetes and atherosclerosis: is there a role for hyperglycemia? **Journal of lipid research**, v. 50 Suppl, p. S335-9, abr. 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2674740&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 13 maio. 2014.

CHAMBLESS, L. E.; HEISS, G.; FOLSOM, a R.; ROSAMOND, W.; SZKLO, M.; SHARRETT, a R.; CLEGG, L. X. Association of Coronary Heart Disease Incidence with Carotid Arterial Wall Thickness and Major Risk Factors: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, 1987-1993. **American Journal of Epidemiology**, v. 146, n. 6, p. 483–494, 15 set. 1997. Disponível em: <<http://aje.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/oxfordjournals.aje.a009302>>.

CHEN, L.-J.; LIM, S. H.; YEH, Y.-T.; LIEN, S.-C.; CHIU, J.-J. Roles of microRNAs in atherosclerosis and restenosis. **Journal of biomedical science**, v. 19, n. 1, p. 79, jan. 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3438039&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

CHOI, S. H.; GINSBERG, H. N. Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 22, n. 9, p. 353–363, set. 2011. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043276011000725>>.

COLAGIURI, R. Diabetes: a pandemic, a development issue or both? **Expert review of cardiovascular therapy**, v. 8, n. 3, p. 305–9, mar. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20222807>>.

COSSON, E.; NGUYEN, M. T.; CHANU, B.; BANU, I.; CHIHEB, S.; BALTA, C.; TAKBOU, K.; VALENSI, P. Cardiovascular risk prediction is improved by adding asymptomatic coronary status to routine risk assessment in type 2 diabetic patients. **Diabetes Care**, v. 34, n. 9, p. 2101–2107, 2011.

DAVIS-DUSENBERY, B. N.; HATA, A. Mechanisms of control of microRNA biogenesis. **Journal of biochemistry**, v. 148, n. 4, p. 381–92, out. 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2981492&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 30 mar. 2014.

EPSTEIN, F. H.; ROSS, R. Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 2, p. 115–126, 14 jan. 1999. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199901143400207>>.

ESCÁRCEGA, R. O. El factor de transcripción nuclear kappa en las enfermedades humanas. **Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social**, v. 48, n. 1, p. 55–60, 2010. Disponível em: <<http://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2010/im101j.pdf>>.

FEDERACIÓN INTERNACIONAL DE DIABETES. Plan Mundial Contra la Diabetes 2011-2021. In: Nueva York. **Anais...** Nueva York: 2011. Disponível em: <<http://www.idf.org/sites/default/files/attachments/GDP-Spanish.pdf>>.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; DONALD S. FREDRICKSON. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v. 18, n. 6, p. 499–502, 1972. Disponível em: <<http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf>>. Acesso em: 29 maio. 2014.

GAST, K. B.; SMIT, J. W. a; HEIJER, M. Den; MIDDELDORP, S.; RIPPE, R. C. a; LE CESSIE, S.; DE KONING, E. J. P.; JUKEMA, J. W.; RABELINK, T. J.; DE ROOS, A.; ROSENDAAL, F. R.; DE MUTSERT, R. Abdominal adiposity largely explains associations between insulin resistance, hyperglycemia and subclinical atherosclerosis: The NEO study. **Atherosclerosis**, v. 229, n. 2, p. 423–429, 2013.

GO, A. S.; MOZAFFARIAN, D.; ROGER, V. L.; BENJAMIN, E. J.; BERRY, J. D.; BLAHA, M. J.; DAI, S.; FORD, E. S.; FOX, C. S.; FRANCO, S.; FULLERTON, H. J.; GILLESPIE, C.; HAILPERN, S. M.; HEIT, J. a; HOWARD, V. J.; HUFFMAN, M. D.; JUDD, S. E.; KISSELA, B. M.; KITNER, S. J.; LACKLAND, D. T.; LICHTMAN, J. H.; LISABETH, L. D.; MACKEY, R. H.; MAGID, D. J.; MARCUS, G. M.; MARELLI, A.;

MATCHAR, D. B.; MCGUIRE, D. K.; MOHLER, E. R.; MOY, C. S.; MUSSOLINO, M. E.; NEUMAR, R. W.; NICHOL, G.; PANDEY, D. K.; PAYNTER, N. P.; REEVES, M. J.; SORLIE, P. D.; STEIN, J.; TOWFIGHI, A.; TURAN, T. N.; VIRANI, S. S.; WONG, N. D.; WOO, D.; TURNER, M. B. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. **Journal of the American Heart Association**, v. 129, n. 3, p. e28–e292, 21 jan. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24352519>>. Acesso em: 28 abr. 2014.

GOUGH, P. J.; GOMEZ, I. G.; WILLE, P. T.; RAINES, E. W. Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 1, p. 59–69, 2006. Disponível em: <<http://www.jci.org/articles/view/25074>>.

HA, M.; KIM, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 15, n. 8, p. 509–524, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25027649>>.

HAMAR, P. Role of regulatory micro RNAs in type 2 diabetes mellitus-related inflammation. **Nucleic acid therapeutics**, v. 22, n. 5, p. 289–94, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3464406&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

HAN, S.; LIANG, C. P.; WESTERTERP, M.; SENOKUCHI, T.; WELCH, C. L.; WANG, Q.; MATSUMOTO, M.; ACCILI, D.; TALL, A. R. Hepatic insulin signaling regulates VLDL secretion and atherogenesis in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 4, p. 1029–1041, 2009.

HANSSON, G. K. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 4, p. 429–430, 28 jul. 2005. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM200507283530425>>.

HE, Y.; LIN, L.; QU, Y.; XI, B.; CAO, J.; MAO, X. Up-regulated miR-93 contributes to coronary atherosclerosis pathogenesis through targeting ABCA1. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, n. 1, p. 674–681, 2015.

HERRERA, B. M.; LOCKSTONE, H. E.; TAYLOR, J. M.; RIA, M.; BARRETT, a; COLLINS, S.; KAISAKI, P.; ARGOUT, K.; FERNANDEZ, C.; TRAVERS, M. E.; GREW, J. P.; RANDALL, J. C.; GLOYN, a L.; GAUGUIER, D.; MCCARTHY, M. I.; LINDGREN, C. M. Global microRNA expression profiles in insulin target tissues in a spontaneous rat model of type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 53, n. 6, p. 1099–109, jun. 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2860560&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 25 mar. 2014.

HURST, R. T.; NG, D. W. C.; KENDALL, C.; KHANDHERIA, B. Clinical Use of Carotid Intima-Media Thickness: Review of the Literature. **Journal of the American Society of**

Echocardiography, v. 20, n. 7, p. 907–914, jul. 2007. Disponível em:
<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S089473170700168X>>.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **Idf diabetes atlas. sixth edition**. Sixth ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2013.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas Regional Fact Sheets 2014**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.idf.org/diabetesatlas>.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **Atlas de la diabetes de la fid. séptima edición**. Séptima ed ed. Brussels, Belgium: Karakas Print, 2015.

INTZILAKIS, T.; MOURIDSEN, M. R.; ALMDAL, T. P.; HAUGAARD, S. B.; SAJADIEH, A. Impaired fasting glucose in combination with silent myocardial ischaemia is associated with poor prognosis in healthy individuals. **Diabetic Medicine**, v. 29, n. 8, p. e163–e169, 18 ago. 2012. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrg3198>>.

JULIUS, U. Influence of Plasma Free Fatty Acids on Lipoprotein Synthesis and Diabetic Dyslipidemia. **Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association**, v. 111, n. 5, p. 246–250, ago. 2003.

KAROLINA, D. S.; ARMUGAM, A.; TAVINTHARAN, S.; WONG, M. T. K.; LIM, S. C.; SUM, C. F.; JEYASEELAN, K. MicroRNA 144 Impairs Insulin Signaling by Inhibiting the Expression of Insulin Receptor Substrate 1 in Type 2 Diabetes Mellitus. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. e22839, 1 ago. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23499584>>. Acesso em: 13 fev. 2014.

KARROWNI, W.; LI, Y.; JONES, P. G.; CRESCI, S.; ABDALLAH, M. S.; LANFEAR, D. E.; MADDOX, T. M.; MCGUIRE, D. K.; SPERTUS, J. A.; HORWITZ, P. A. Insulin Resistance Is Associated With Significant Clinical Atherosclerosis in Nondiabetic Patients With Acute Myocardial Infarction. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 33, n. 9, p. 2245–2251, 1 set. 2013. Disponível em:
<<http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/ATVBAHA.113.301585>>.

KNOWLER, W. C.; BARRETT-CONNOR, E.; FOWLER, S. E.; HAMMAN, R. F.; LACHIN, J. M.; WALKER, E. a; NATHAN, D. M. Reduction in the Incidence of Type 2 Diabetes with Lifestyle Intervention or Metformin. **New England Journal of Medicine**, v. 346, n. 6, p. 393–403, 7 fev. 2002. Disponível em:
<<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa012512>>.

KOSAKA, N.; IGUCHI, H.; YOSHIOKA, Y.; TAKESHITA, F.; MATSUKI, Y.; OCHIYA, T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 23, p. 17442–52, 4 jun. 2010. Disponível em:
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2878508&tool=pmcentrez&rend>>

ertype=abstract>. Acesso em: 20 mar. 2014.

KULLER, L. H. 10-Year Follow-up of Subclinical Cardiovascular Disease and Risk of Coronary Heart Disease in the Cardiovascular Health Study. **Archives of Internal Medicine**, v. 166, n. 1, p. 71, 9 jan. 2006. Disponível em: <<http://archinte.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archinte.166.1.71>>.

KUMARSWAMY, R.; VOLKMANN, I.; BEERMANN, J.; NAPP, L. C.; JABS, O.; BHAYADIA, R.; MELK, A.; UCAR, A.; CHOWDHURY, K.; LORENZEN, J. M.; GUPTA, S. K.; BATKAI, S.; THUM, T. Vascular importance of the miR-212/132 cluster. **European Heart Journal**, v. 35, n. 45, p. 3224–3231, 2014.

KUTUK, O.; BASAGA, H. Bcl-2 protein family: Implications in vascular apoptosis and atherosclerosis. **Apoptosis**, v. 11, n. 10, p. 1661–1675, 2006.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843–54, 3 dez. 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8252621>>.

LEI, Z.; VAN MIL, A.; BRANDT, M. M.; GRUNDMANN, S.; HOEFER, I.; SMITS, M.; EL AZZOUZI, H.; FUKAO, T.; CHENG, C.; DOEVENDANS, P. A.; SLUIJTER, J. P. MicroRNA-132/212 family enhances arteriogenesis after hindlimb ischaemia through modulation of the Ras-MAPK pathway. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 19, n. 8, p. 1994–2005, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25945589>>.

LIBBY, P. Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. **The American journal of clinical nutrition**, v. 83, n. 2, p. 456S–460S, 2006.

LINDSTRÖM, J.; ILANNE-PARIKKA, P.; PELTONEN, M.; AUNOLA, S.; ERIKSSON, J. G.; HEMIÖ, K.; HÄMÄLÄINEN, H.; HÄRKÖNEN, P.; KEINÄNEN-KIUKAANNIEMI, S.; LAAKSO, M.; LOUHERANTA, A.; MANNELIN, M.; PATURI, M.; SUNDVALL, J.; VALLE, T. T.; UUSITUPA, M.; TUOMILEHTO, J. Sustained reduction in the incidence of type 2 diabetes by lifestyle intervention: follow-up of the Finnish Diabetes Prevention Study. **Lancet**, v. 368, n. 9548, p. 1673–9, 11 nov. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17098085>>.

LIU, J.; LUO, C.; YIN, Z.; LI, P.; WANG, S.; CHEN, J.; HE, Q.; ZHOU, J. Downregulation of *let-7b* promotes COL1A1 and COL1A2 expression in dermis and skin fibroblasts during heat wound repair. **Molecular Medicine Reports**, v. 13, n. 3, p. 2683–2688, 2016.

MCCLELLAND, A. D.; KANTHARIDIS, P. microRNA in the development of diabetic complications. **Clinical Science**, v. 126, n. 2, p. 95–110, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24059587>>. Acesso em: 28 abr. 2014.

MCCLELLAND, R. L.; CHUNG, H.; DETRANO, R.; POST, W.; KRONMAL, R. a.
Distribution of coronary artery calcium by race, gender, and age: Results from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). **Circulation**, v. 113, n. 1, p. 30–37, 2006.

MCGILL H.C., J.; MCMAHAN, C. a.; HERDERICK, E. E.; MALCOM, G. T.; TRACY, R. E.; JACK, P. Origin of atherosclerosis in childhood and adolescence. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, n. 5 SUPPL., 2000.

MELO, C. A.; MELO, S. A. Biogenesis and Physiology of MicroRNAs. In: FABBRI, M. (Ed.). **Non-coding RNAs and Cancer**. 1. ed. New York, NY: Springer New York, 2014. p. 5–25.

NATHAN, D. M.; DAVIDSON, M. B.; DEFRONZO, R. a.; HEINE, R. J.; HENRY, R. R.; PRATLEY, R.; ZINMAN, B.; KAHN, R. Impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance: Implications for care. **Diabetes Care**, v. 30, n. 3, p. 753–759, 2007.

NORHAMMAR, A.; TENERZ, Å.; NILSSON, G.; HAMSTEN, A.; EFENDÍĆ, S.; RYDÉN, L.; MALMBERG, K. Glucose metabolism in patients with acute myocardial infarction and no previous diagnosis of diabetes mellitus: a prospective study. **The Lancet**, v. 359, n. 9324, p. 2140–2144, 22 jun. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12090978>>.

ORTEGA, F. J.; MERCADER, J. M.; MORENO-NAVARRETE, J. M.; ROVIRA, O.; GUERRA, E.; ESTEVE, E.; XIFRA, G.; MARTÍNEZ, C.; RICART, W.; RIEUSSET, J.; ROME, S.; KARCZEWSKA-KUPCZEWSKA, M.; STRACZKOWSKI, M.; FERNÁNDEZ-REAL, J. M. Profiling of Circulating MicroRNAs Reveals Common MicroRNAs Linked to Type 2 Diabetes That Change With Insulin Sensitization. **Diabetes care**, p. 1–9, 29 jan. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24478399>>. Acesso em: 20 mar. 2014.

PANENI, F.; COSTANTINO, S.; VOLPE, M.; LÜSCHER, T. F.; COSENTINO, F. Epigenetic signatures and vascular risk in type 2 diabetes: A clinical perspective. **Atherosclerosis**, v. 230, n. 2, p. 191–197, out. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24075743>>. Acesso em: 15 fev. 2014.

PÁRRIZAS, M.; BRUGNARA, L.; ESTEBAN, Y.; GONZÁLEZ-FRANQUESA, A.; CANIVELL, S.; MURILLO, S.; GORDILLO-BASTIDAS, E.; CUSSÓ, R.; CADEFEAU, J. a.; GARCÍA-ROVES, P. M.; SERVITJA, J.-M.; NOVIALS, A. Circulating miR-192 and miR-193b Are Markers of Prediabetes and Are Modulated by an Exercise Intervention. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 100, n. 3, p. E407–E415, 2015. Disponível em: <<http://press.endocrine.org/doi/10.1210/jc.2014-2574>>.

PONTICOS, M.; SMITH, B. D. Extracellular matrix synthesis in vascular disease: hypertension, and atherosclerosis. **The Journal of biomedical Research**, v. 28, n. 1, p. 25–39, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3904172&tool=pmcentrez&rend>

ertype=abstract>.

PSATY, B. M.; O'DONNELL, C. J.; GUDNASON, V.; LUNETTA, K. L.; FOLSOM, A. R.; ROTTER, J. I.; UITTERLINDEN, A. G.; HARRIS, T. B.; WITTEMAN, J. C. M.; BOERWINKLE, E. Cohorts for Heart and Aging Research in Genomic Epidemiology (CHARGE) Consortium design of prospective meta-analyses of genome-wide association studies from 5 Cohorts. **Circulation: Cardiovascular Genetics**, v. 2, n. 1, p. 73–80, 2009.

REDDY, M. a.; JIN, W.; VILLENEUVE, L.; WANG, M.; LANTING, L.; TODOROV, I.; KATO, M.; NATARAJAN, R. Pro-inflammatory role of MicroRNA-200 in vascular smooth muscle cells from diabetic mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 32, n. 3, p. 721–729, 2012.

ROME, S. Are extracellular microRNAs involved in type 2 diabetes and related pathologies? **Clinical Biochemistry**, v. 46, n. 10–11, p. 937–945, 18 jul. 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nm.3862>>.

RYDÉN, L.; GRANT, P. J.; ANKER, S. D.; BERNE, C.; COSENTINO, F.; DANCHIN, N.; DEATON, C.; ESCANED, J.; HAMMES, H.-P.; HUIKURI, H.; MARRE, M.; MARX, N.; MELLBIN, L.; OSTERGREN, J.; PATRONO, C.; SEFEROVIC, P.; UVA, M. S.; TASKINEN, M.-R.; TENDERA, M.; TUOMILEHTO, J.; VALENSI, P.; ZAMORANO, J. L.; ACHENBACH, S.; BAUMGARTNER, H.; BAX, J. J.; BUENO, H.; DEAN, V.; EROL, C.; FAGARD, R.; FERRARI, R.; HASDAI, D.; HOES, A. W.; KIRCHHOF, P.; KNUUTI, J.; KOLH, P.; LANCELLOTTI, P.; LINHART, A.; NIHOYANNOPOULOS, P.; PIEPOLI, M. F.; PONIKOWSKI, P.; SIRNES, P. A.; TAMARGO, J. L.; TORBICKI, A.; WIJNS, W.; WINDECKER, S.; DE BACKER, G.; EZQUERRA, E. A.; AVOGARRO, A.; BADIMON, L.; BARANOVA, E.; BETTERIDGE, J.; CERIELLO, A.; FUNCK-BRENTANO, C.; GULBA, D. C.; KJEKSHUS, J. K.; LEV, E.; MUELLER, C.; NEYSES, L.; NILSSON, P. M.; PERK, J.; REINER, Z.; SATTAR, N.; SCHÄCHINGER, V.; SCHEEN, A.; SCHIRMER, H.; STRÖMBERG, A.; SUDZHAIEVA, S.; VIIGIMAA, M.; VLACHOPOULOS, C.; XUEREB, R. G. ESC Guidelines on diabetes , pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD. **European heart journal**, v. 34, n. 39, p. 3035–87, out. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23996285>>. Acesso em: 29 abr. 2014.

SAJADIEH, A.; NIELSEN, O. W.; RASMUSSEN, V.; HEIN, H. O.; HANSEN, J. F. Prevalence and prognostic significance of daily-life silent myocardial ischaemia in middle-aged and elderly subjects with no apparent heart disease. **European heart journal**, v. 26, n. 14, p. 1402–9, jul. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15774494>>. Acesso em: 17 maio. 2014.

SARA, L.; SZARF, G.; TACHIBANA, A.; SHIOZAKI, A. A.; VILLA, A. V.; DE OLIVEIRA, A. C.; DE ALBUQUERQUE, A. S.; ROCHITTE, C. E.; NOMURA, C. H.; AZEVEDO, C. F.; JASINOWODOLINSKI, D.; TASSI, E. M.; MEDEIROS, F. de M.; KAY, F. U.; JUNQUEIRA, F. P.; AZEVEDO, G. S. A.; MONTE, G. U.; PINTO, I. M. F.;

GOTTLIEB, I.; ANDRADE, J.; LIMA, J. A. C.; PARGA FILHO, J. R.; KELENDJIAN, J.; FERNANDES, J. L.; IQUIZLI, L.; CORREIA, L. C. L.; QUAGLIA, L. A.; GONCALVES, L. F. G.; AVILA, L. F.; ZAPPAROLI, M.; HADLICH, M.; NACIF, M. S.; BARBOSA, M. de M.; MINAMI, M. H.; BITTENCOURT, M. S.; SIQUEIRA, M. H. A.; SILVA, M. C.; LOPES, M. M. U.; MARQUES, M. D.; VIEIRA, M. L. R.; COELHO FILHO, O. R.; SCHVARTZMAN, P. R.; SANTOS, R. D.; CURY, R. C.; LOUREIRO, R.; CURY, R. C.; SASDELLI NETO, R.; MACEDO, R.; CERCI, R. J.; DE FARIA FILHO, R. A.; CARDOSO, S.; NAVES, T.; MAGALHAES, T. A.; SENRA, T.; BURGOS, U. M. M. C.; MOREIRA, V. de M.; ISHIKAWA, W. Y. II Diretriz de Ressonância Magnética e Tomografia Computadorizada Cardiovascular da Sociedade Brasileira de Cardiologia e do Colégio Brasileiro de Radiologia. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 103, n. 6 Supl 3, p. 1–86, 2014. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/abc.2014S006>>.

SCHÖLER, N.; LANGER, C.; DÖHNER, H.; BUSKE, C.; KUCHENBAUER, F. Serum microRNAs as a novel class of biomarkers: a comprehensive review of the literature. **Experimental hematology**, v. 38, n. 12, p. 1126–30, dez. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20977925>>. Acesso em: 1 abr. 2014.

SHANTIKUMAR, S.; CAPORALI, A.; EMANUELI, C. Role of microRNAs in diabetes and its cardiovascular complications. **Cardiovascular research**, v. 93, n. 4, p. 583–93, 15 mar. 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3291087&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 9 maio. 2014.

SMALL, E. M.; FROST, R. J. a; OLSON, E. N. MicroRNAs add a new dimension to cardiovascular disease. **Circulation**, v. 121, n. 8, p. 1022–32, 2 mar. 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2847432&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 13 maio. 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. I Diretriz Brasileira de Prevenção Cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 101, 2013.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGÍA. I DIRETRIZ SOBRE ASPECTOS ESPECÍFICOS DE DIABETES (TIPO 2) RELACIONADOS A CARDIOLOGIA. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 102, 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2013-2014. **Rio de Janeiro**, 2014.

STEG, P. G.; JAMES, S. K.; ATAR, D.; BADANO, L. P.; LUNDQVIST, C. B.; BORGER, M. a.; DI MARIO, C.; DICKSTEIN, K.; DUCROCQ, G.; FERNANDEZ-AVILES, F.; GERSHLICK, A. H.; GIANNUZZI, P.; HALVORSEN, S.; HUBER, K.; JUNI, P.; KASTRATI, A.; KNUUTI, J.; LENZEN, M. J.; MAHAFFEY, K. W.; VALGIMIGLI, M.; VAN'T HOF, A.; WIDIMSKY, P.; ZAHGER, D.; BAX, J. J.; BAUMGARTNER, H.;

CECONI, C.; DEAN, V.; DEATON, C.; FAGARD, R.; FUNCK-BRENTANO, C.; HASDAI, D.; HOES, A.; KIRCHHOF, P.; KOLH, P.; MCDONAGH, T.; MOULIN, C.; POPESCU, B. a.; REINER, Ž.; SECHTEM, U.; SIRNES, P. A.; TENDERA, M.; TORBICKI, A.; VAHANIAN, A.; WINDECKER, S.; ASTIN, F.; ÅSTRÖM-OLSSON, K.; BUDAJ, A.; CLEMMENSEN, P.; COLLET, J. P.; FOX, K. a.; FUAT, A.; GUSTIENE, O.; HAMM, C. W.; KALA, P.; LANCELLOTTI, P.; MAGGIONI, A. Pietro; MERKELY, B.; NEUMANN, F. J.; PIEPOLI, M. F.; VAN DE WERF, F.; VERHEUGT, F.; WALLENTIN, L. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. **European Heart Journal**, v. 33, n. 20, p. 2569–2619, 2012.

STEIN, J. H.; KORCARZ, C. E.; HURST, R. T.; LONN, E.; KENDALL, C. B.; MOHLER, E. R.; NAJJAR, S. S.; REMBOLD, C. M.; POST, W. S. Use of Carotid Ultrasound to Identify Subclinical Vascular Disease and Evaluate Cardiovascular Disease Risk: A Consensus Statement from the American Society of Echocardiography Carotid Intima-Media Thickness Task Force Endorsed by the Society for Vascular. **Journal of the American Society of Echocardiography**, v. 21, n. 2, p. 93–111, fev. 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0894731707008188>>.

STRUBBERG, A. M.; MADISON, B. B. MicroRNAs in the etiology of colorectal cancer: pathways and clinical implications. **Disease Models & Mechanisms**, v. 10, n. 3, p. 197 LP-214, 1 mar. 2017. Disponível em: <<http://dmm.biologists.org/content/10/3/197.abstract>>.

SU, X. W.; CHAN, A. H. Y.; LU, G.; LIN, M.; SZE, J.; ZHOU, J. Y.; POON, W. S.; LIU, Q.; ZHENG, V. Z. Y.; WONG, G. K. C. Circulating microRNA 132-3p and 324-3p Profiles in Patients after Acute Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. **Plos One**, v. 10, n. 12, p. 1–13, 2015.

TABÁK, A. G.; JOKELA, M.; AKBARALY, T. N.; BRUNNER, E. J.; KIVIMÄKI, M.; WITTE, D. R. Trajectories of glycaemia, insulin sensitivity, and insulin secretion before diagnosis of type 2 diabetes: an analysis from the Whitehall II study. **The Lancet**, v. 373, n. 9682, p. 2215–2221, 2009.

TAYLOR, J. Cardiology in Brazil: a country in development. **European heart journal**, v. 31, n. 13, p. 1541–2, jul. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20595222>>. Acesso em: 13 maio. 2014.

THE DECODE STUDY GROUP. Is the Current Definition for Diabetes Relevant to Mortality Risk From All Causes and Cardiovascular and Noncardiovascular Diseases? **Diabetes Care**, v. 26, n. 3, p. 688–696, 1 mar. 2003. Disponível em: <<http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/diacare.26.3.688>>.

TOTH, P. P. Subclinical atherosclerosis: what it is, what it means and what we can do about it. **International Journal of Clinical Practice**, v. 62, n. 8, p. 1246–1254, 28 jun. 2008.

Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1742-1241.2008.01804.x>>.

TREVISAN, R.; VEDOVATO, M.; TIENGO, A. The epidemiology of diabetes mellitus. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 13, n. 8, p. 2–5, 1998.

TURCHINOVICH, A.; WEIZ, L.; LANGHEINZ, A.; BURWINKEL, B. Characterization of extracellular circulating microRNA. **Nucleic acids research**, v. 39, n. 16, p. 7223–33, 1 set. 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3167594&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 6 maio. 2014.

TZOU, W. S.; DOUGLAS, P. S.; SRINIVASAN, S. R.; BOND, M. G.; TANG, R.; LI, S.; CHEN, W.; BERENSON, G. S.; STEIN, J. H. Distribution and predictors of carotid intima-media thickness in young adults. **Preventive cardiology**, v. 10, n. 4, p. 181–189, 2007.

WANET, A.; TACHENY, A.; ARNOULD, T.; RENARD, P. MiR-212/132 expression and functions: Within and beyond the neuronal compartment. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 11, p. 4742–4753, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global status report on noncommunicable diseases 2010**. 1st. ed. Italy: World Health Organization, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global status report on noncommunicable diseases 2014**. 2nd. ed. Switzerland: World Health Organization, 2014.

WYMAN, R. a; MAYS, M. E.; MCBRIDE, P. E.; STEIN, J. H. Ultrasound-detected carotid plaque as a predictor of cardiovascular events. **Vascular Medicine**, v. 11, n. 2, p. 123–130, 2 maio 2006. Disponível em: <<http://vmj.sagepub.com/cgi/doi/10.1191/1358863x06vm666ra>>.

XAVIER, H. T.; IZAR, M. C.; FARIA NETO, J. R.; ASSAD, M. H.; ROCHA, V. Z.; SPOSITO, A. C.; FONSECA, F. A.; SANTOS, J. E. dos; SANTOS, R. D.; BERTOLAMI, M. C.; FALUDI, A. A.; MARTINEZ, T. L. R.; DIAMENT, J.; GUIMARÃES, A.; FORTI, N. A.; MORIGUCHI, E.; CHAGAS, A. C. P.; COELHO, O. R.; RAMIRES, J. A. F. V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 101, n. 4, p. 01–22, 2013. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/abc.2013S010>>.

YABLUCHANSKIY, A.; MA, Y.; IYER, R. P.; HALL, M. E.; LINDSEY, M. L. Matrix Metalloproteinase-9: Many Shades of Function in Cardiovascular Disease. **Physiology**, v. 28, n. 6, p. 391–403, 1 nov. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24186934>>.

ZAMPETAKI, A.; KIECHL, S.; DROZDOV, I.; WILLEIT, P.; MAYR, U.; PROKOPI, M.; MAYR, A.; WEGER, S.; OBERHOLLENZER, F.; BONORA, E.; SHAH, A.; WILLEIT, J.; MAYR, M. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other

microRNAs in type 2 diabetes. **Circulation research**, v. 107, n. 6, p. 810–7, 17 set. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20651284>>. Acesso em: 28 fev. 2014.

ZERNECKE, A.; BIDZHEKOV, K.; NOELS, H.; SHAGDARSUREN, E.; GAN, L.; DENECKE, B.; HRISTOV, M.; KÖPPEL, T.; JAHANTIGH, M. N.; LUTGENS, E.; WANG, S.; OLSON, E. N.; SCHÖBER, A.; WEBER, C. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. **Science signaling**, v. 2, n. 100, p. ra81, 8 dez. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19996457>>. Acesso em: 28 abr. 2014.

ANEXOS

ANEXO A: Normograma do estudo MESA para avaliação da espessura médio-intimal carotídea.

Mean far wall-right																
Age, y/percentile	White male				White female				Black male				Black female			
	45-54	55-64	65-74	75-84	45-54	55-64	65-74	75-84	45-54	55-64	65-74	75-84	45-54	55-64	65-74	75-84
25th	0.52	0.57	0.65	0.72	0.51	0.55	0.65	0.72	0.58	0.61	0.71	0.74	0.55	0.60	0.65	0.71
50th	0.62	0.68	0.77	0.83	0.58	0.65	0.75	0.83	0.67	0.74	0.85	0.85	0.64	0.71	0.76	0.83
75th	0.71	0.81	0.92	0.97	0.67	0.76	0.87	0.93	0.80	0.92	0.99	1.02	0.74	0.81	0.92	0.96

Age, y/percentile	Chinese male				Chinese female				Hispanic male				Hispanic female			
	45-54	55-64	65-74	75-84	45-54	55-64	65-74	75-84	45-54	55-64	65-74	75-84	45-54	55-64	65-74	75-84
25th	0.54	0.56	0.62	0.66	0.55	0.54	0.59	0.67	0.53	0.60	0.65	0.71	0.51	0.57	0.65	0.63
50th	0.64	0.70	0.73	0.79	0.60	0.63	0.71	0.77	0.62	0.67	0.78	0.81	0.58	0.69	0.76	0.78
75th	0.73	0.83	0.92	0.98	0.70	0.77	0.84	0.96	0.73	0.82	0.90	0.92	0.67	0.77	0.87	0.92

Mean far wall-left																
Age, y/percentile	Chinese male				Chinese female				Hispanic male				Hispanic female			
	45-54	55-64	65-74	75-84	45-54	55-64	65-74	75-84	45-54	55-64	65-74	75-84	45-54	55-64	65-74	75-84
25th	0.55	0.57	0.62	0.69	0.49	0.52	0.58	0.64	0.55	0.61	0.68	0.72	0.51	0.58	0.62	0.68
50th	0.63	0.70	0.72	0.84	0.58	0.63	0.71	0.76	0.64	0.72	0.80	0.86	0.58	0.68	0.72	0.77
75th	0.73	0.84	0.86	0.97	0.67	0.72	0.87	0.94	0.75	0.85	0.98	0.97	0.68	0.79	0.86	0.91

Age, y/percentile	White male				White female				Black male				Black female			
	45-54	55-64	65-74	75-84	45-54	55-64	65-74	75-84	45-54	55-64	65-74	75-84	45-54	55-64	65-74	75-84
25th	0.54	0.57	0.67	0.71	0.50	0.55	0.63	0.70	0.56	0.63	0.69	0.72	0.54	0.59	0.63	0.68
50th	0.63	0.69	0.81	0.85	0.58	0.64	0.73	0.80	0.69	0.75	0.82	0.85	0.63	0.67	0.76	0.78
75th	0.78	0.82	0.95	1.00	0.67	0.75	0.85	0.94	0.81	0.92	0.99	1.02	0.73	0.80	0.90	0.91

ANEXO B: Normograma do estudo Bogalusa para avaliação de espessura médio-intimal carotídea.

Right																
Age, y/percentile	White male				White female				Black male				Black female			
	25	30	35	40	25	30	35	40	25	30	35	40	25	30	35	40
25th	0.611	0.636	0.662	0.687	0.562	0.586	0.611	0.635	0.637	0.675	0.712	0.750	0.616	0.650	0.685	0.719
50th	0.663	0.702	0.740	0.779	0.633	0.654	0.676	0.697	0.719	0.756	0.793	0.830	0.682	0.718	0.754	0.790
75th	0.768	0.807	0.845	0.884	0.717	0.735	0.754	0.772	0.839	0.884	0.929	0.974	0.750	0.793	0.837	0.880

Left																
Age, y/percentile	White male				White female				Black male				Black female			
	25	30	35	40	25	30	35	40	25	30	35	40	25	30	35	40
25th	0.577	0.617	0.658	0.698	0.554	0.586	0.618	0.650	0.640	0.676	0.713	0.749	0.587	0.629	0.670	0.712
50th	0.655	0.707	0.760	0.812	0.621	0.657	0.693	0.729	0.736	0.774	0.812	0.850	0.646	0.691	0.736	0.781
75th	0.763	0.814	0.864	0.915	0.660	0.713	0.766	0.819	0.794	0.844	0.894	0.944	0.714	0.768	0.822	0.876

ANEXO C: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE SERVIÇOS DA SAÚDE
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
LABORATÓRIO DE INVESTIGAÇÃO MOLECULAR EM CARDIOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: "Pesquisa de microRNAs circulantes biomarcadores de aterosclerose subclínica em pacientes pré-diabéticos"

Dados de identificação do voluntário da pesquisa

Nome do voluntário: _____

Documento de identidade Nº: _____ Sexo: M ☐ F ☐

Data de nascimento: ____/____/____

Endereço: _____ No. ____ apto: _____

Bairro: _____ Cidade: _____

CEP: _____ Telefone: _____

Prezado(a) Voluntário(a),

Meu nome é Mario Hiroyuki Hirata, sou professor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP) e estou convidando você para participar do projeto de pesquisa que estou desenvolvendo com Magda Elizabeth Graciano Saldarriaga, aluna de pós-graduação da FCF/USP e com colaboração de outros pesquisadores do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC) e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Para participar desta pesquisa precisarei do seu consentimento para realizar vários exames. Um teste de bioimpedância que avalia a sua composição corporal de gordura, massa magra e água, exames de imagem angiotomografia de coronárias e ultrassonografia de artérias carótidas, os quais permitirão estabelecer se há presença de placas ateroscleróticas. Será realizado um Teste de tolerância à glicose (curva de glicemia) que permitirá identificar se existem alterações no metabolismo da glicose com uma alta sensibilidade, durante a qual você deverá ingerir um líquido com alto conteúdo de glicose (75g dextrose). Finalmente, serão coletadas amostras de sangue e urina no Setor de Coleta do Laboratório Clínico ou no Setor de Dislipidemias e Coronariopatias.

Comitê de Ética do IDPC
Av. Dr. Dante Pazzanese 500, Ibirapuera,
CEP: 04012-180, São Paulo, SP
Telefones: 5085-4000

Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Cidade Universitária
CEP: 05508-900, São Paulo, SP
Telefone: 3091-3677

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE SERVIÇOS DA SAÚDE
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
LABORATÓRIO DE INVESTIGAÇÃO MOLECULAR EM CARDIOLOGIA

O risco à saúde será mínimo. A coleta de sangue pode formar uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha e a dextrose ingerida poderá causar enjoo ou sensação de desmaio. O risco associado à angiogramografia deve-se à administração de meio de contraste iodado endovenoso e à radiação, não entanto, a radiação é pequena encontrando-se dentro dos limites aceitos pelos órgãos internacionais e a administração do meio de contraste estará sujeita à função renal adequada, avaliada pelos níveis séricos de ureia e creatinina.

Nesta pesquisa, além dos testes bioquímicos (glicemia de jejum e 2 horas pós-carga, hemoglobina glicada, insulina, colesterol total e frações, triglicérides, ApoB, ApoA, hemograma completo, fibrinogênio, TAP, TTPA, T₃ total, T₄, T₄ livre, TSH, uréia, creatinina, ácido úrico, proteínas totais, AST, ALT, GGT, proteína C reativa ultrasensível e urina (citoquímico)), vamos fazer testes moleculares de RNA para associar a expressão gênica de RNAs no sangue com algumas alterações que podem estar relacionadas com o a fisiopatologia da aterosclerose subclínica. Para este procedimento, serão coletados aproximadamente 45 mL de sangue aproximadamente 50 ml de urina.

A sua amostra será armazenada no Laboratório de Biologia Molecular aplicada ao Diagnóstico (LBMAD) da FCF/USP, sob minha responsabilidade, e será mantido em banco de materiais biológicos sem a sua identificação, caso foram necessárias para análises posteriores.

Os resultados obtidos durante a pesquisa serão **confidenciais** e somente serão revelados a terceiros com sua autorização. Sua identidade será mantida em segredo, quando os resultados desta pesquisa forem publicados em artigos de revistas científicas ou forem apresentados em temas de aulas e debates. Você receberá todos os resultados dos exames laboratoriais necessários sem qualquer custo e, caso se interesse, você terá acesso aos resultados dos testes genéticos no final da pesquisa.

Sua participação neste estudo é voluntária, portanto, não receberá qualquer pagamento por sua participação. Por quaisquer motivos, independentemente de seu consentimento, os membros da equipe podem encerrar sua participação no estudo devido a alguma alteração médica que pode colocá-lo em risco de outra complicação, devido ao cancelamento do estudo pela coordenação do mesmo, caso o sujeito não cumpra as orientações ou por outras questões administrativas. Caso isso ocorra um dos pesquisadores entrará em contato e lhe explicará o motivo da exclusão.

Você pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem penalidade ou perda dos benefícios a que você tem direito e seu tratamento médico no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC)

Comitê de Ética do IDPC
Av. Dr. Dante Pazzanese 500, Ibirapuera,
CEP: 04012-180, São Paulo, SP
Telefones: 5085-4000

Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Cidade Universitária
CEP: 05508-900, São Paulo, SP
Telefone: 3091-3677

ANEXO D: Parecer CEP Faculdade de Ciências Farmacêuticas

FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Pesquisa de microRNAs circulantes biomarcadores de aterosclerose subclínica em pacientes pré-diabéticos

Pesquisador: Mario Hiroyuki Hirata

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 36625714.9.0000.0067

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.181.992

Data da Relatoria: 29/06/2015

Apresentação do Projeto:

As doenças cardiovasculares e a diabetes melito fazem parte das NCD prioritárias da WHO devido as altas taxas de morbi-mortalidade e incapacidade de geram cada ano. Estima-se que no mundo existem 382 milhões de diabéticos e outros 316 milhões de pessoas com características de risco como prediabetes. A T2DM corresponde a 95% dos casos e está fortemente associada ao estilo de vida, a idade e a obesidade; cerca do 60% desenvolvem

doença cardiovascular onde a metade dos eventos coronarianos incluídos a morte súbita ocorrem em indivíduos assintomáticos. Isto evidencia a necessidade de novos marcadores precoces dessa doença, principalmente em assintomáticos já que em muitos deles a morte é a primeira manifestação. Recentemente tem sido sugerido que os miRNAs envolvidos na regulação epigenética da expressão gênica, poderiam ser caracterizados como biomarcadores em diversas doenças. Nosso objetivo é identificar alterações no perfil de miRNAs circulantes em pacientes pré-diabéticos, com ou sem placa de ateroma, com a finalidade de encontrar biomarcadores moleculares de aterosclerose subclínica. Estes resultados contribuiriam ao conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos da aterosclerose subclínica, na prevenção primaria e posterior impacto do seu alto custo socioeconômico.

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112

Bairro: Butantã

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-3622

Fax: (11)3031-8986

E-mail: cepfcf@usp.br

Continuação do Parecer: 1.181.992

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL Identificar miRNAs circulantes biomarcadores de aterosclerose subclínica em pacientes pré-diabéticos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Relacionar os miRNAs circulantes com genes envolvidos no processo fisiopatológico da aterosclerose subclínica.
- Identificar alterações nas vias metabólicas dos genes identificados na aterosclerose subclínica, utilizando ferramentas bioinformáticas como Ingenuity™.
- Elaborar uma proposta de miRNAs biomarcadores da aterosclerose subclínica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O risco da pesquisa é mínimo. O risco associado à angiotomografia deve-se à administração de meio de contraste iodado endovenoso e à radiação, não entanto, a radiação é pequena encontrando-se dentro dos limites aceitos pelos órgãos internacionais e a administração do meio de contraste estará sujeita à função renal adequada, avaliada pelos níveis séricos de ureia e creatinina.

Não há benefício direto aos participantes da pesquisa, porém os resultados deste estudo vão ajudar para uma melhor conduta terapêutica no caso dos pacientes com alteração do metabolismo da glicose e a aterosclerose subclínica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

CASUÍSTICA

Serão incluídos no estudo 150 indivíduos entre 30 e 70 anos com indicação de TTOG e sem diagnóstico estabelecido de doença aterosclerótica em qualquer território arterial. A classificação do estado glicêmico dentro dos 3 grupos será realizada baseada nos valores de glicemia de jejum, 2 horas pós-carga e pela HbA1c, segundo os critérios da ADA 2014. Todas as pessoas que voluntariamente aceitaram participar do estudo como consta no termo de consentimento e que reuniram os critérios de inclusão tiveram consulta médica e entrevista geral para identificar variáveis sócio demográficas (sexo, idade, endereço, ocupação), do estilo de vida (exercício físico, dieta, tabagismo), clínicas (consumo de medicamentos, doenças atuais, antecedentes de doenças pessoais e familiares e tensão arterial) e antropométricas (peso, estatura, perímetro da cintura, perímetro da cadeira). Será feito também um teste de bioimpedância para avaliar a composição corporal de água, gordura e massa magra, como parte das medidas antropométricas. A avaliação da aterosclerose subclínica é realizada mediante aferição do Score de cálcio coronariano pela angiotomografia de coronárias de acordo com o protocolo estabelecido pelo setor de imagens do

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã CEP: 05.508-000
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 Fax: (11)3031-8986 E-mail: cepf@usp.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.181.992

IDPC, coordenado pelo Pesquisador Ibraim Masciarelli Francisco Pinto. Será feito também ultrassonografia vascular para medir espessura médio-intimal e detectar a presença de placas nas artérias carótidas sob coordenação do Dr. Rodrigo Bellio de Mattos Barretto com colaboração do Dr Mohamed Hassan Saleh e a Dra Ana Cláudia Gomes Pereira Petisco. Será realizado um estudo piloto de perfil de miRNAs em soro de 20 pacientes bem caracterizados dos três grupos e os miRNAs identificados com expressão diferencial como possíveis biomarcadores serão validados na população total do estudo.

Critérios de exclusão:

Indivíduos com desordens endócrinos relacionados com alteração da homeostase da glicose; portadores de doença hepática, renal, hemorrágica ou gastrointestinal grave; neoplasias, outros tipos de doença cardiovascular, mulheres grávidas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE está adequado.

Recomendações:

Trata-se de uma emenda que propõe algumas alterações nos objetivos e testes laboratoriais a serem aplicados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Este projeto já havia sido aprovado anteriormente.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Este CEP entende que o adendo ao projeto de pesquisa pode ser aprovado.

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã CEP: 05.508-000
UF: SP Município: SÃO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 Fax: (11)3031-8986 E-mail: cepfcf@usp.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.181.992

SAO PAULO, 12 de Agosto de 2015

Assinado por:
Mauricio Yonamine
(Coordenador)

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã CEP: 05.508-000
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 Fax: (11)3031-8988 E-mail: cepf@usp.br

ANEXO E: Parecer CEP Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia

INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Pesquisa de microRNAs circulantes biomarcadores de aterosclerose subclínica em pacientes pré-diabéticos

Pesquisador: Mario Hiroyuki Hirata

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 36625714.9.3001.5462

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.217.636

Apresentação do Projeto:

As doenças cardiovasculares e a diabetes melito fazem parte das NCD prioritárias da WHO devido as altas taxas de morbi-mortalidade e incapacidade de geram cada ano. Estima-se que no mundo existem 382 milhões de diabéticos e outros 316 milhões de pessoas com características de risco como prediabetes. A T2DM corresponde a 95% dos casos e está fortemente associada ao estilo de vida, a idade e a obesidade; cerca do 60% desenvolvem doença cardiovascular onde a metade dos eventos coronarianos incluídos a morte súbita ocorrem em indivíduos assintomáticos. Isto evidencia a necessidade de novos marcadores precoces desta doença, principalmente em assintomáticos já que em muitos deles a morte é a primeira manifestação. Recentemente tem sido sugerido que os miRNAs envolvidos na regulação epigenética da expressão gênica, poderiam ser caracterizados como biomarcadores em diversas doenças. Nosso objetivo é identificar alterações no perfil de miRNAs circulantes em pacientes pré-diabéticos, com ou sem placa de ateroma, com a finalidade de encontrar biomarcadores moleculares de aterosclerose subclínica. Estes resultados

Endereço: Av. Dr. Dante Pazzanese N.º 500, Torre 6º andar

Bairro: Ibirapuera

CEP: 04.012-909

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)5085-6040

Fax: (11)5085-6040

E-mail: cep@dantepazzanese.org.br

Continuação do Parecer: 1.217.636

contribuiriam ao conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos da aterosclerose subclínica, sua prevenção primária e posterior impacto do alto custo socioeconômico.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Identificar miRNAs circulantes biomarcadores de aterosclerose subclínica em pacientes prediabéticos.

Objetivo Secundário:

Relacionar miRNAs circulantes com genes envolvidos na fisiopatologia da aterosclerose subclínica.

Identificar alterações nas vias metabólicas dos

genes identificados na aterosclerose subclínica utilizando ferramentas bioinformáticas como Ingenuity™.

Elaborar uma proposta de miRNAs

biomarcadores da aterosclerose subclínica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A coleta de sangue pode formar uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha e a dextrose ingerida poderá causar enjoo ou sensação

de desmaio. O risco associado à angiotomografia deve-se à administração de meio de contraste iodado endovenoso e à radiação, não entanto, a

radiação é pequena encontrando-se dentro dos limites aceitos pelos órgãos internacionais e a administração do meio de contraste estará sujeita à

função renal adequada, avaliada pelos níveis séricos de ureia e creatinina.

Benefícios:

Identificação de biomarcadores para a detecção precoce de DVC, assim como contribuição ao conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos que

levam ao desenvolvimento da aterosclerose subclínica. Este conhecimento pode servir como base da

prevenção primária da DCV com o fim de

impactar o alto custo econômico e social desta condição, assim como na identificação de brancos terapêuticos dirigidos à disfunção molecular

subjacente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia vem através deste

Endereço: Av. Dr. Dante Pazzanese N.º 500, Torre 6º andar

Bairro: Ibirapuera

CEP: 04.012-909

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)5085-6040

Fax: (11)5085-6040

E-mail: cep@dantepazzanese.org.br

Continuação do Parecer: 1.217.636

documento, notificar a aprovação em reunião ordinária da emenda ao projeto supracitado, onde foram apresentados os seguintes documentos:

Projeto de Pesquisa – Versão final;
Resumo da Emenda e Justificativa;
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, Versão final;
Declaração de Participação/ Laureane Nunes Masi; e
Currículo Lattes/ Laureane Nunes Masi.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentados todos os termos e declarações.

Projeto de Pesquisa – Versão final;
Resumo da Emenda e Justificativa;
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, Versão final;
Declaração de Participação/ Laureane Nunes Masi; e
Currículo Lattes/ Laureane Nunes Masi.

Recomendações:

- a) Informar imediatamente relatório sobre qualquer evento adverso ocorrido.
- b) Comunicar qualquer alteração no projeto/TCLE.
- c) Elaborar e apresentar ao CEP relatório final sobre o andamento da pesquisa

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia vem através deste documento, notificar a aprovação em reunião ordinária da emenda ao projeto supracitado.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia vem através deste documento, notificar a aprovação em reunião ordinária da emenda ao projeto supracitado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	Colaboradores.pdf	22/09/2014 23:56:41		Aceito

Endereço: Av. Dr. Dante Pazzanese N.º 500, Torre 6º andar
Bairro: Ibirapuera CEP: 04.012-909
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)5085-6040 Fax: (11)5085-6040 E-mail: cep@dantepazzanese.org.br

**INSTITUTO DANTE
PAZZANESE DE CARDIOLOGIA**

Continuação do Parecer: 1.217.636

Outros	Declaração participação.pdf	22/09/2014 23:56:58		Aceito
Outros	Declaração anuência instituição participante.pdf	23/09/2014 00:00:00		Aceito
Outros	Declaração Anuência Departamento.pdf	23/09/2014 00:00:14		Aceito
Outros	Descrição equipe trabalho.pdf	23/09/2014 00:00:54		Aceito
Outros	Ficha coleta dados.pdf	23/09/2014 00:14:08		Aceito
Folha de Rosto	Folha de Rosto.pdf	25/09/2014 10:39:52		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_401239.pdf	25/09/2014 10:42:13		Aceito
Outros	Resposta Pendências CEP.pdf	13/10/2014 10:48:20		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE v2.pdf	13/10/2014 11:03:03		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Pesquisa de microRNAs circulantes como biomarcadores de cardiopatia coronariana subclínica em pacientes prediabéticos utilizando Sequenciamento de Última Geração v2.pdf	13/10/2014 11:03:35		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_401239.pdf	13/10/2014 11:05:42		Aceito
Outros	Emenda.pdf	12/06/2015 17:48:15		Aceito
Outros	Pesquisa de miRNAs circulantes biomarcadores de aterosclerose subclínica em pacientes pré-diabéticos.pdf	12/06/2015 18:07:00		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE .pdf	12/06/2015 18:09:37		Aceito
Outros	Laureane Nunes.pdf	12/06/2015 18:14:18		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_521140 E1.pdf	12/06/2015 18:14:43		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Dr. Dante Pazzanese N.º 500, Torre 6º andar
 Bairro: Ibirapuera CEP: 04.012-909
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)5085-6040 Fax: (11)5085-6040 E-mail: cep@dantepazzanese.org.br

INSTITUTO DANTE
PAZZANESE DE CARDIOLOGIA

Continuação do Parecer: 1.217.636

SAO PAULO, 08 de Setembro de 2015

Assinado por:
Pedro Silvio Farsky
(Coordenador)

Endereço: Av. Dr. Dante Pazzanese N.º 500, Torre 6º andar
Bairro: Ibirapuera **CEP:** 04.012-909
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5085-6040 **Fax:** (11)5085-6040 **E-mail:** cep@dantepazzanese.org.br

ANEXO F: TCLE Seção de Tomografia

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA

**Termo de Esclarecimento,
Ciência e Consentimento para
Utilização do Meio de
Contraste Iodado**

Preencher quando não houver etiqueta

Paciente: _____

Prontuário: _____

Eu _____
declaro que estou ciente da necessidade de utilização do meio de contraste iodado endovenoso
e/ou oral para a realização do exame de tomografia computadorizada.

Autorizo a utilização do meio de contraste iodado, ciente de que irá contribuir no
esclarecimento do diagnóstico.

A proposta do procedimento a que serei submetido (a), seus benefícios, riscos,
complicações potenciais e alternativas me foram explicadas claramente. Tive a oportunidade de
fazer perguntas, que foram respondidas satisfatoriamente. Entendo que não exista garantia
absoluta sobre os resultados a serem obtidos.

Confirmando que li as informações acima, compreendi, esclareci minhas dúvidas e concordo com
a realização da cirurgia/procedimento.

☐ Paciente ☐ Responsável

Nome Legível: _____ Assinatura: _____

Grau de parentesco: _____ Identidade nº _____

Data: ____/____/____ Hora: ____:____

Deve ser preenchido pelo médico

Expliquei todo o procedimento, cirurgia e/ou tratamento a que o paciente acima referido está
sujeito, ao próprio paciente e/ou seu responsável, sobre os benefícios, riscos e alternativas,
tendo respondido às perguntas formuladas pelos mesmos. De acordo com o meu atendimento,
o paciente e/ou seu responsável, está em condições de compreender o que lhes foi informado.

Nome do médico: _____ Assinatura: _____ CRM: _____

ANEXO G: Ficha Clínica

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
Laboratório de Biologia Molecular – Ambulatório de Farmacogenômica

Projeto: “Pesquisa de miRNAs Circulantes, Potenciais Biomarcadores de Aterosclerose Subclínica em Indivíduos Euglicêmicos e Pré-Diabéticos”

Questionário Clínico

Nome:		Núm. no projeto:			
Data da Entrevista: / /	RG doc. :	Registro no IDPC:			
Data de Nascimento: / /	Idade:	Naturalidade:			
Gênero: Masculino () Feminino ()		Menopausa: Pré() Pós()			
Endereço Residencial:					
Telefone Residencial:		E-mail:			
Comercial:		Celular: ()			
Dados Biodemográficos					
Etnia: Branca () Parda () Negra () Asiática () Outro () _____					
Peso do (a) paciente:	kg	Comorbidades	Desde quando?	Sim	Não
Altura do (a) paciente	m	HAS			
IMC	Kg/cm ²	DM			
Medida da Circunferência Abdominal	cm	IAM			
Medida do Quadril	cm	AVC			
PA em posição supina	mmHg	DAC			
Bioimpedância (Composição corporal)		RM			

Hábitos	Sim	Não
1. O (a) paciente fuma? Quantos cigarros ao dia? _____ Há quanto tempo? _____	()	()
Ex-tabagista? Há quanto tempo? _____	()	()
2. Consome Bebida Alcoolica? Destilado () Cerveja () Vinho ()	()	()
Até 7 doses/semana() Mais de 7 doses/semana() Dose por semana: _____		
Ex-etilista? Quando parou? _____	()	()
3. Pratica atividade física?	()	()
Qual a frequência? _____ Qual atividade? _____		
4. Profissão:		

Ficha Clínica: “Pesquisa de miRNAs Circulantes, Potenciais Biomarcadores de Aterosclerose Subclínica em Indivíduos Euglicêmicos e Pré-Diabéticos”

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
Laboratório de Biologia Molecular – Ambulatório de Farmacogenômica

Histórico Familiar (Pai, Mãe ou Irmão)	Parentesco (Quem?)	Sim	Não	NA
1. Diabetes Mellitus		()	()	()
2. Obesidade		()	()	()
3. Hipertensão		()	()	()
4. Hipercolesterolemia		()	()	()
5. Doença cardiovascular		()	()	()
6. História familiar de DAC prematura (parente de primeiro grau masculino < 55 anos ou feminino < 65 anos)		()	()	()
7. Não tem () Não Sabe ()		()	()	()
8. Morte Súbita		()	()	()

Medicamentos utilizados

Paciente utiliza medicamentos? () Sim () Não

1. _____ Dose _____ () mg () mcg / Horário
2. _____ Dose _____ () mg () mcg / Horário
3. _____ Dose _____ () mg () mcg / Horário
4. _____ Dose _____ () mg () mcg / Horário
5. _____ Dose _____ () mg () mcg / Horário
6. _____ Dose _____ () mg () mcg / Horário
7. _____ Dose _____ () mg () mcg / Horário
8. _____ Dose _____ () mg () mcg / Horário
9. _____ Dose _____ () mg () mcg / Horário
10. _____ Dose _____ () mg () mcg / Horário

Ficha Clínica: "Pesquisa de miRNAs Circulantes, Potenciais Biomarcadores de Aterosclerose Subclínica em Indivíduos Euglicêmicos e Pré-Diabéticos"

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
Laboratório de Biologia Molecular – Ambulatório de Farmacogenômica

Outras observações Clínicas Relevantes:

Exames Laboratoriais e de Imagem

Data:	ApoA1	AST
GLI (Jejum)	ApoB	ALT
GLI 2H	WBC	CREATININA
Hba1c	RBC	ACIDO URICO
INSULINA	HB	UREIA
CT	HT	TSH
TG	PLT	T4 Total
HDL-C	TAP	T4L
LDL-C	TTPA	T3
VLDL-C	FIBRINOGENIO	PCRus

Ficha Clínica: "Pesquisa de miRNAs Circulantes, Potenciais Biomarcadores de Aterosclerose Subclínica em Indivíduos Euglicêmicos e Pré-Diabéticos"

Página 4 de 4
Versão 1.0/Outubro de 2014

ANEXO H: Ficha do aluno Sistema Janus-USP

5/3/2017

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 8442262/1 - Magda Elizabeth Graciano Saldarriaga

Email: melizabeth@usp.br
Data de Nascimento: 04/06/1988
Cédula de Identidade: RNE - V883761-T - DF
Local de Nascimento: Colômbia
Nacionalidade: Colombiana
Graduação: Microbiologia y Bioanalista - Universidad de Antioquia - Colômbia - 2011

Curso: Mestrado
Programa: Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área: Análises Clínicas
Data de Matrícula: 03/07/2014
Início da Contagem de Prazo: 03/07/2014
Data Limite para o Depósito: 06/03/2017
Orientador: Prof(a). Dr(a). Mario Hiroyuki Hirata - 03/07/2014 até o presente. Email: mhhirata@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 03/07/2014
Português, Aprovado em 19/08/2015
Trancamento(s): 60 dias
Período de 27/01/2017 até 15/02/2017
Período de 09/12/2016 até 17/01/2017
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 19/08/2015
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 03/07/2014
Trancado em 09/12/2016
Trancado em 27/01/2017

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).

Última ocorrência: Trancado em 16/02/2017

Impresso em: 05/03/2017 15:15:05

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

1/3

9136 - 8442262/1 - Magda Elizabeth Graciano Saldarriaga

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5757-6/1	Tópicos em Análises Clínicas II	05/08/2014	17/11/2014	15	1	100	A	N	Concluída
FBC5709-5/2	Biologia Molecular em Análises Clínicas	22/09/2014	27/10/2014	75	5	100	A	N	Concluída
MCM5725-6/1	Aspectos Atuais do Metabolismo de Lipídeos (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	03/11/2014	07/12/2014	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5761-6/2	Tópicos Avançados em Bioquímica Clínica	02/02/2015	04/03/2015	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5793-12/2	Tópicos em Análises Clínicas I	03/03/2015	16/06/2015	15	1	100	A	N	Concluída
FBC5708-5/3	Farmacogenômica Cardiovascular	06/03/2015	17/04/2015	90	0	-	-	N	Turma cancelada
FBC5780-2/3	Análise de Dados Aplicados às Pesquisas Biológicas	10/08/2015	21/09/2015	90	6	100	A	N	Concluída
FBC5708-5/4	Farmacogenômica Cardiovascular	19/10/2015	02/12/2015	90	6	100	A	N	Concluída
FBC5700-6/2	Aterosclerose: Fisiopatologia, Diagnóstico e Terapêutica	03/11/2015	30/11/2015	60	4	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	31
Estágios:			
Total:	0	25	31

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Trancado em 16/02/2017

Impresso em: 05/03/2017 15:15:05

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 8442262/1 - Magda Elizabeth Graciano Saldarriaga

Comissão julgadora da dissertação de mestrado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
72297	Mario Hiroyuki Hirata	FCF - USP	Presidente

5/3/2017

Última ocorrência: Trancado em 16/02/2017

Impresso em: 05/03/2017 15:15:05

ANEXO I: Informações para os Membros da Banca Julgadora

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP