NEIRE NIARA FERREIRA DE ARAUJO

Influência de fatores epigenéticos no aneurisma aterosclerótico da aorta abdominal de idosos

Tese apresentada ao Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia – Entidade Associada da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Medicina, Tecnologia e Intervenção em Cardiologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Chiara Bertolami

Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 01 novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca do IDPC.

São Paulo
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Preparada pela Biblioteca do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
©reprodução autorizada pelo autor

©reprodução autorizada pelo autor

Araujo, Neire Niara Ferreira de

Influência de fatores epigenéticos no aneurisma aterosclerótico da aorta abdominal de idosos / Neire Niara Ferreira de Araujo -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
Universidade de São Paulo
Área de Concentração: Medicina, Tecnologia e Intervenção em Cardiologia
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Chiara Bertolami

Descritores: 1. Aneurisma da aorta abdominal 2. Idoso 3. Repressão epigenética 4. Expressão gênica 5. MicroRNAs 6. Metilação de DNA 7. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real.

USP/IDPC/Biblioteca/065/16

Dedico esta tese ao meu Deus, que nos permite vislumbrar uma pequena parte da riqueza de sua criação máxima, o ser humano.

"SENHOR, tu me sondas
e me conheces.
Pois tu formaste o meu interior, tu me teceste no
seio de minha mãe.
Graças te dou, visto que por modo
assombrosamente maravilhoso me formaste; as tuas
obras são admiráveis, e a minha alma o sabe muito
bem; os meus ossos não te foram encobertos,
quando no oculto fui formado e entretecido como
nas profundezas da terra.
Os teus olhos me viram a substância ainda informe,
e no teu livro foram escritos todos os meus dias,
cada um deles escrito e determinado, quando
nenhum deles havia ainda.
Tal conhecimento é maravilhoso demais para mim: é
sobremodo elevado, não o posso atingir".

Salmo de Davi, 139: 1, 13-17,6
(Bíblia Sagrada, versão anotada expandida)

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes, razão maior da minha profissão, os quais não mediram esforços para colaborar com esta pesquisa.

Expresso aqui a minha eterna gratidão à minha mãe, que, aos 87 anos, continua sendo a minha inspiração para continuar estudando, pelo seu amor compreensivo e incondicional.

Ao meu pai, em memória, o meu maior respeito.

Aos demais familiares, com quem compartilho os bons e os difíceis momentos da minha vida.

Seria uma tarefa impossível descrever o nome de cada um dos meus amigos neste simplificado tópico de agradecimentos, como a Esmeralda, amiga de infância e que continua uma grande amiga, até aqueles que foram sendo acrescentados por Deus ao longo dessa escalada e que estiveram, de perto ou de longe, me fortalecendo com palavras de incentivo, especialmente, durante as trajetórias mais desafiadoras da minha vida, como a Dra. Noemi Suzuki Esmerio, Clarice Robles Egea, Elza Brooks, Dr.Jairo Lins Borges e tantos outros. Certifico-lhes, meus amados, que o nome de cada um de vocês, inclusive os que não constam nesta humilde lista, estará sempre gravado no meu coração, em que guardo a mais sincera gratidão por tudo.

Agradeço ao Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC), representado pela Dra. Amanda Guerra de Souza, pelas oportunidades oferecidas, pelo grande incentivo à pesquisa e ao ensino, e por priorizar o respeito e a prática dos direitos humanos em todos os recantos desta respeitosa Instituição.

Minha gratidão sincera ao meu orientador, Dr. Marcelo Chiara Bertolami, pelos ensinamentos e pela assistência durante os anos de realização deste trabalho. Meus agradecimentos à Dora, secretária, sempre pronta a nos atender com eficiência.

Meus agradecimentos aos médicos da seção de Cardiogeriatria, representada pelo chefe, Dr. Felicio Savioli Neto, à Dra. Claudia Gravina, pelo apoio e incentivo, ao Dr. Newton, Dra. Carolina e à Dra. Roseli. Agradeço a colaboração das médicas (R3) Larissa e Danilla, bem como, da secretária, Luciana.

À seção de Cirurgia Vascular, representada pelo Dr. Nilo Mitsuru Izukawa, chefe da seção, e demais cirurgiões da equipe, especialmente ao Dr. Fabio Rossi, meus sinceros agradecimentos pela disponibilidade dos serviços profissionais.

Agradeço à equipe do Laboratório de Biologia Molecular, representada pelo Prof. Mario Hirata e, especialmente, à Dra. Hui-Tzu Lin Wang, a quem admiro, pela dedicação ao trabalho e por ter abraçado essa causa junto comigo. Agradeço à Jéssica Cassilla, Dra. Gisele Medeiros, Dra. Helena S. Thurow, às secretárias Ana Cristina e Denise, e aos demais colegas pela colaboração. Agradeço, com destaque especial, ao Dr. André Feldman, Dr. Pedro Silvio Farsky e à Dra. Juliana Freitas Germano, pela pronta disposição em colaborar nessa pesquisa.

Meus agradecimentos à Dra. Maria de Lourdes Higuchi, pela honrosa participação nesta pesquisa, e à Dra. Paula Helena Lima.

Minha gratidão pelo apoio e pela gentileza dos membros da Comissão de Pós-Graduação (CPG), de maneira especial, à Sra. Mabília e Janeide. Agradeço, especialmente, à Valquíria Dias, pelo acolhimento e apoio, desde o meu primeiro contato com a CPG.

Meus agradecimentos aos médicos e funcionários da Comissão de Ética e Pesquisa (CEP) do IDPC, pela relevante participação.

Agradeço à equipe do Laboratório de Análises desta Instituição, representado pelas Dra. Aline e Dra. Fernanda, e às funcionárias, Edneia e Sara, que, gentilmente, receberam os nossos pacientes para coleta de material.

À equipe da biblioteca, Anna, Claudiana e Dulce, pelo apoio recebido durante a pesquisa, meus agradecimentos.

Ao João Ítalo e à equipe de Estatística, agradeço pelas informações. Agradeço aos funcionários do Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) por colaborarem durante a coleta de dados dos participantes.

Meus sinceros agradecimentos ao Igor Gomes, da equipe de informática, pelo apoio no momento certo.

Minha gratidão aos professores da Pós-Graduação que, por meio de aulas majestosas, acrescentaram mais do que conhecimento científico às nossas vidas; eles nos ensinaram muito mais com seus bons exemplos de dedicação, ética e respeito.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus.*

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS
LISTA DE FIGURAS
LISTA DE TABELAS
LISTA DE QUADROS
RESUMO
ABSTRACT
1 INTRODUÇÃO.....2
1.1 Envelhecimento da população: novos desafios 2
1.2 Aneurisma da aorta abdominal.....2
1.3 Quadro clínico e diagnóstico do aneurisma da aorta abdominal.....4
1.4 Etiopatogenia do aneurisma da aorta abdominal 5
1.5 Histopatogênese do aneurisma da aorta abdominal 9
1.6 Epigenética no desenvolvimento do AAA 12
1.6.1 Metilação de DNA 12
1.6.2 microRNAs: biogênese e regulação no AAA.....14
1.7 Tratamento do aneurisma da aorta abdominal 20
1.8 Contribuições para inovação científica 22
2 OBJETIVOS 24
2.1 Objetivo geral 24
2.2 Objetivo específico 24
3 MÉTODOS.....26
3.1 População e tipo de estudo 26
3.2 Aspectos éticos 26
3.3 Critérios de inclusão 27
3.4 Critérios de exclusão.....27
3.5 Anamnese e coleta dos dados clínicos 28
3.6 Exames bioquímicos 29
3.7 Experimentos de biologia molecular e análise histológica.....29
3.7.1 Análise da expressão gênica do tecido da aorta pela qPCR *array* 31

3.7.2 Análise de miRNAs no tecido e no plasma pela qPCR *array*.....33
3.7.3 Análise de metilação do DNA no tecido da aorta abdominal 35
3.8 Análise histológica 37
3.9 Análise estatística.....38
4 RESULTADOS 41
4.1 Dados biodemográficos e clínicos da população de estudo 41
4.2 Perfil de expressão gênica em TECIDOS: AAA vs controle.....42
4.3 Perfil de expressão de miRNAs em TECIDOS: AAA vs controle 44
4.4 Perfil de expressão de miRNAs em PLASMA: AAA vs controle.....46
4.5 Perfil de metilação em TECIDO: AAA vs controle.....47
4.6 Análise histopatológica.....48
4.6.1 Coloração pelo método de Verhoeff para fibras elásticas.....48
4.6.2 Coloração pelo método Tricrômico de Masson para fibras colágenas 48
4.7 Análise funcional utilizando o program IPA *Ingenuity*® 50
5 DISCUSSÃO.....53
6 CONCLUSÕES.....71
7 ANEXOS.....73
7.1 ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) 73
7.2 ANEXO B - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa. 76
7.3 ANEXO C - Questionário de Anamnese 77
8 REFERÊNCIAS 85
9 APÊNDICES
9.1 APÊNDICE A - Dados demográficos e exames laboratoriais dos doadores de tecido da aorta abdominal
9.2 APÊNDICE B - Resultados do controle de qualidade das 12 amostras de RNA extraídos do tecido da aorta (6 AAA e 6 controles). As amostras foram testadas quanto à expressão de 2 genes endógenos (ACTB e HPRT1), eficiência da transcrição reversa (RTC), controle positivo da PCR (PPC), controle negativo da transcrição reversa (NRT), contaminação de DNA genômico (GDC) e controle branco (NTC). Este teste de controle de qualidade se fez necessário devido à exigência do fabricante para garantir resultados fidedignos na análise de expressão gênica por PCR array

9.3 APÊNDICE C - Resultados do controle de qualidade das amostras de miRNA extraídos do plasma (PLA n=12) e do tecido (TE n=12). As amostras foram testadas contra *spiking control* (cel-miR-39-3p) e mais 6 miRNAs endógenos, além de controle positivo da reação (PPC) e controle da transcrição reversa (miRTC). Este teste de controle de qualidade se fez necessário para garantir resultados fidedignos na análise de perfil de miRNA por PCR array

9.4 APÊNDICE D - Resultados da análise de metilação do DNA de 22 genes relacionados à estresse e toxicidade utilizando EpiTect Methyl II (EAHS-581Z, QIAGEN, GmbH, Hiden, Alemanha). Os dados mostram percentagem de não metilados (UN) e metilados (M) de cada amostra de DNA do tecido de AAA e controles provenientes de doadores. As duas últimas linhas contêm os controles do sistema de restrição enzimática

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAA	Aneurisma da Aorta Abdominal
AAT	Aneurismas de Aorta Torácica
ADAM	*Aneurysm Detection and Management*
AGTR1	Receptor tipo 1 da angiotensina II
ALOX5	Aracdonato-5 lipoxigenase
AntagomiRNA	Antagonista de microRNA
AVE	Acidente Vascular Encefálico
BRA	Bloqueador do Receptor AT1 da Angiotensina
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
CH^3	Radical Metila
cm	Centímetro
cm^2	Centímetro quadrado
CML	Células musculares lisas
CPG	Comissão de Pós-Graduação
CpGs	Dinucleotídeos Citosina-Guanina
Ct	Ciclo de *threshold*
CX3CL1	*C-X3-C motif chemokine ligand 1*
DAC	Doença Arterial Coronária
DCV	Doença Cardiovascular
DLP	Dislipidemia
DM2	Diabete Melito Tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT	DNA-Metiltransferase
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FIH	Fator de crescimento induzido por hipóxia

FN1	Fibronectina 1
GDC	Contaminação de DNA Genômico
GDF-15	Fator 15 de crescimento e diferenciação
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HC/FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HO	Heme oxigenase
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular-1
IDPC	Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
IECA	Inibidor da Enzima Conversora da Angiotensina
IMC	Índice de Massa Corporal
ITGB1	Integrina subunidade beta 1
Kg	Quilogramas
Kg/cm²	Quilograma por centrímetro quadrado
LDL	Lipoproteínas de Baixa Densidade
MASS	*Multicentre Aneurysm Screening Study*
MBD	Proteínas metal-CpG associadas
MEC	Matriz Extracelular
miRNA	MicroRNAs
MMP	Metaloproteinase
mRNA	RNA mensageiro
m²	Metro quadrado
mg/dl	Miligramas por decilitro
mmHg	Milímetro de mercúrio
NR	Norma Regulamentadora
NRT	Controle negativo da transcrição reversa
NTC	Controle branco
OMS	Organização Mundial de Saúde

PA	Pressão Arterial
PAI	Inibidor da Ativação do Plasminogênio
PCR-US	Proteína C Reativa Ultrassensível
PPC	Controle positivo da PCR
PTGIS	Prostaglandina I2 sintetase (prostaciclina)
qPCR	Reação em cadeia pela polimerase quantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Transcriptase Reversa – Reação em Cadeia pela polimerase
SAME	Serviço de Arquivo Médico e Estatística
SIP	Esfingosina-1 fosfatase
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
SPHK1	Esfingosina cinase 1 (*sphingosine kinase 1)*
TIMP	Inibidor tecidual das metaloproteases da matriz
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TP	Timidina fosforilase
t-PA	Ativador do Plasminogênio Tipo-Tecidual
UKSAT	*United Kingdom Small Aneurysm Trial*
u-PA	Ativador do Plasminogênio Tipo-Uroquinase
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
WHO	*World Health Organization*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Genes relacionados com AAA 6

Figura 2 Mapa do desenvolvimento fetal da musculatura lisa da aorta.....8

Figura 3 Histopatogênese do AAA.....10

Figura 4 Mecanismos epigenéticos de regulação gênica. 13

Figura 5 Biogênese dos miRNAs. 15

Figura 6 Exposição ambiental e alterações nos microRNAs. 19

Figura 7 Fluxograma do estudo. 30

Figura 8 Fluxograma da análise de expressão gênica pela qPCR array.....32

Figura 9 Fluxograma da análise de expressão de miRNA pela qPCR *array*. 35

Figura 10 Fluxograma da análise de metilação do DNA.....37

Figura 11 Comparação do grau de metilação de DNA entre os tecidos com AAA e os controles. 47

Figura 12 Imagens histológicas de tecido-controle e tecido com AAA.....49

Figura 13 A interação entre os genes e miRNAs diferentemente expressos no tecido de pacientes com AAA.....51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Os miRNAs envolvidos no remodelamento vascular e aneurisma aórtico..... 18

Tabela 2 Estimativa do grau de risco de ruptura baseado no diâmetro do aneurisma da aorta abdominal (AAA). 21

Tabela 3 Dados biodemográficos e clínicos da população de estudo..... 42

Tabela 4 Resultados da coloração pelo método de Verhoeff para detectar fibras elásticas..... 48

Tabela 5 Resultados da coloração pelo método Tricrômico de Masson para detectar as fibras colágenas. 49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Lista dos genes relacionados à função do endotélio vascular humano, classificados segundo as vias funcionais que foram analisadas no presente estudo*. 32

Quadro 2 As vias de estresse e toxicidade e os respectivos genes que foram analisados no estudo de metilação.....36

Quadro 3 Comparação da expressão gênica dos tecidos da aorta de indivíduos com AAA em relação ao grupo-controle. 44

Quadro 4 MiRNAs diferentemente expressos no tecido de indivíduos com AAA em relação ao grupo-controle 45

Quadro 5 MiRNAs diferentemente expressos no plasma de indivíduos com AAA em relação ao grupo-controle 46

RESUMO

Araujo NNF. *Influência de fatores epigenéticos no aneurisma aterosclerótico da aorta abdominal de idosos* [Tese]. São Paulo: Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia; 2016.

O aneurisma de aorta abdominal (AAA) é uma doença assintomática na maioria dos casos, podendo acometer 5% das pessoas do gênero masculino com idade superior a 65 anos, predispondo ao risco de ruptura com mortalidade em torno de 80%. O presente estudo teve como objetivo avaliar os perfis de expressão gênica e de metilação do DNA no tecido, como também os microRNAs no plasma e no tecido de indivíduos com e sem AAA na tentativa de identificar marcadores biológicos e alvos terapêuticos para o diagnóstico, monitoramento e tratamento precoce do AAA. Os perfis de expressão gênica, miRNA e metilação de DNA dos tecidos da aorta abdominal (n=6) obtidos durante a cirurgia aberta para correção de AAA foram comparados com tecidos da aorta abdominal de doadores de órgãos sem AAA (n=6). Também foram comparados os perfis de miRNAs circulantes no plasma do grupo AAA (n=6) com o grupo-controle de voluntários com as características semelhantes, porém sem AAA (n=6). Para a análise da expressão gênica, utilizou-se a qPCR *Array*, analisando-se genes relacionados ao endotélio vascular humano (PAHS-015Z, QIAGEN®). A análise do perfil de miRNA foi realizada utilizando-se *Human miFinder 384HC miScript miRNA PCR Array* (MIHS-3001Z, QIAGEN®) e, para análise de metilação do DNA, utilizou-se a qPCR *array* com 22 genes das vias de estresse e toxicidade EpiTect Methyl II (EAHS-581Z, QIAGEN®). O *software* Ingenuity Pathway analysis (IPA®) foi utilizado para identificação das prováveis relações entre os microRNAs e a expressão gênica realizada nesta pesquisa. No estudo da expressão gênica, quatro genes (*SPHK-1, TYMP, ALOX5 e HIF1A)* foram identificados como mais expressos e outros 6 genes (*PTGIS, CX3CL1, ITGB1, COL18A-1, FN1 e AGTR1*) apresentaram expressão reduzida nos tecidos de AAA. Na análise do perfil de miRNAs, 24 miRNAs foram significantemente mais expressos e 35 miRNAs menos expressos no tecido. No plasma de indivíduos com AAA, 8 miRNAs apresentaram-se mais expressos e 9 miRNAs menos expressos. Dois miRNAs, miR-328-3p e let-7c-5p demonstraram expressões comuns entre tecido e plasma. Quanto ao padrão de metilação de DNA, somente o gene *GDF15* teve grau de metilação maior nos tecidos de AAA quando

comparado ao grupo-controle. A análise funcional revelou que o gene *PTGIS* (prostaciclina sintetase), um potente vasodilatador e inibidor da atividade plaquetária, foi reprimido pelo miR-150-5p, que se mostrou 7,5 vezes mais expresso no tecido de AAA, e teve uma possível interação com o miR-328-3p, cuja expressão foi 3,7 vezes mais baixa no tecido. Os genes com expressão reduzida nos tecidos do AAA foram alvos de miRNAs com expressão aumentada, evidenciando a importância e influência dos fatores epigenéticos tanto para o desenvolvimento quanto para a gravidade do AAA.

Descritores: Aneurisma da aorta abdominal, Idoso, Repressão epigenética, Expressão gênica, MicroRNAs, Metilação de DNA, Reação em cadeia da polimerase em tempo real.

ABSTRACT

Araujo NNF. *Influence of genetic factors over atherosclerotic abdominal aortic aneurism in the elderly* [Thesis]. São Paulo: Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia; 2016.

Abdominal aortic aneurism (AAA) is an asymptomatic disease in the majority of cases that may occur in 5% of males over age 65, predisposing to the risk of rupture leading to a mortality rate of 80%. The aim of this study was to evaluate the DNA metilation and gene expression profile in tissue, and microRNA expression pattern in both plasma and tissue samples from individuals with and without AAA to identify biological markers and therapeutic targets for an early diagnosis and treatment of AAA, respectively. Genes and miRNA expression and DNA metilation profiles in AAA tissues (n= 6) were compared to abdominal aortic tissues obtained from organ donators without AAA (n = 6). We also compared circulating miRNAs profiles in plasma samples, between AAA (n = 6) and the control group without AAA (n = 6). For the gene expression analysis we used a qPCR Array (PAHS-015Z, QIAGEN®) to analyze genes related to human vascular endothelium. For the miRNA expression pattern and for DNA methylation analysis we used the *Human miFinder 384HC miScript miRNA PCR Array* (MIHS-3001Z, QIAGEN®) and EpiTect Methyl II (EAHS-581Z, QIAGEN®), respectively. The Ingenuity software was used to identify the interactions between the miRNAs and genes evaluated in this study. Four genes (*SPHK-1, TYMP, ALOX5 and HIF1A)* were upregulated and six other genes (*PTGIS, CX3CL1, ITGB1, COL18A-1, FN1 e AGTR1*) were downregulated in AAA tissues. In addition, the miRNAs analysis showed 24 miRNAs more expressed and 35 miRNAs less expressed in AAA tissue than controls. Although in plasma samples, AAA group presented 8 miRNAs more expressed and 9 miRNAs less expressed than controls. Only, miR-328-3p and let-7c-5p were differently expressed between AAA and controls in both tissue and plasma samples. DNA methylation analysis showed that the gene *GDF15* was hypermethylated in AAA tissues when compared to the control group. Functional analysis revealed that *PTGIS*, a potent vasodilator and platelet activity inhibitor was supressed by miR-150-5p, which had a seven-fold increase in AAA tissues. Moreover, a possible interaction between *PTGIS* and miR-328-3p, about 4-fold decreased in AAA tissues, was showed. Thus, the downregulated genes in AAA tissues are targets of miRNAs with

increased expression in the same biological sample. These results highlight the importance and influence of epigenetic factors for both development and severity of AAA.

Descriptors: abdominal aorta aneurysm, elderly, epigenetic repression, gene expression, microRNAs, DNA methylation, real-time polymerase chain reaction.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Envelhecimento da população: novos desafios

A população de idosos está aumentando numa velocidade sem precedentes. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu a idade de 65 anos para idosos nos países desenvolvidos e de 60 anos para idosos nos países em desenvolvimento, categoria na qual se encontra o Brasil[1].

O Censo Demográfico de 2010, realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), constatou o rápido aumento da população com idade a partir de 65 anos, que passou de 4,8% em 1991 para 5,9% em 2000, chegando a 7,4% em 2010, refletindo seus efeitos em todas as áreas da sociedade[2].

A taxa de crescimento da população de idosos deve-se, possivelmente, à redução da mortalidade nas faixas etárias mais jovens, à redução na taxa de natalidade, ao aumento da expectativa de vida dos octogenários, com uma população cada vez maior chegando aos 90 anos, e ao aumento dos centenários[3].

1.2 Aneurisma da aorta abdominal

A palavra “aneurisma” é de origem Grega e significa dilatação. O aneurisma da aorta abdominal (AAA) é definido como a permanente dilatação da aorta abdominal, quando o diâmetro transverso excede 1,0 a 1,5 vezes o considerado normal (2,0 cm) para o segmento entre as artérias renais e ilíacas, que seria de 2,0 cm, ou seja, maior ou igual a 3,0 cm, predispondo ao risco de ruptura aórtica[4,5].

O envelhecimento é um dos principais fatores de risco para doenças crônicas, especialmente as doenças cardiovasculares. Dentre elas, destaca-

se o AAA, que predomina nos homens com idades acima dos 60 anos, podendo passar despercebido por muitos anos e surpreender os pacientes com o mais temível dos eventos, a ruptura, levando à morte em 80% dos casos[4]. A ruptura do aneurisma é uma das emergências médicas mais dramáticas registradas nos hospitais. Calcula-se que menos de 50% dos pacientes conseguem chegar vivos ao hospital e que apenas metade destes sobrevive ao tratamento cirúrgico. O AAA é considerado a décima causa de morte nos países ocidentais[6]. Nos Estados Unidos, cerca de 4 a 5% das mortes súbitas são atribuídas à ruptura de AAA[7,8]. Muitas dessas mortes inesperadas podem ser evitadas mediante o diagnóstico precoce e indicação do tratamento em tempo hábil.

A prevalência do AAA é de 5% nos homens e de 1% nas mulheres, ambos a partir dos 60 anos de idade[9,10]; aumenta com a idade, de forma que, entre os homens na faixa etária dos 45 a 55 anos, é de 1,3% e passa para 12,5% nos mais idosos (75 a 84 anos), razão pela qual a população-alvo dos programas de rastreamento de AAA é composta de homens a partir de 65 anos. Nas mulheres mais jovens, a prevalência é próxima de zero, mas, com o aumento da idade, entre 75 e 84 anos, chega a 5,2 %[11,12].

O AAA é considerado doença multifatorial, envolvendo fatores de risco genéticos e ambientais e, geralmente, está associado a outras doenças, tais como hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia e, principalmente, o tabagismo[13,14].

Os estudos epidemiológicos têm mostrado que diabete melito tipo 2 (DM2) é um fator preditivo negativo para o risco de desenvolver AAA[15,16]. O mecanismo pelo qual isso acontece permanece desconhecido. Entretanto, tal como idade, gênero, história familiar de aneurismas e perda da integridade da parede aórtica, a presença de diabete está relacionada com maior risco de ruptura[17].

A dislipidemia, especialmente baixa concentração plasmatica de lipoproteína de alta densidade (HDL-colesterol), tem sido associada ao desenvolvimento do AAA. Acredita-se que a HDL-colesterol possa regular os

genes envolvidos no remodelamento da matriz, na migração e proliferação celular, inibindo o desenvolvimento do AAA[14,18].

Estudos confirmam a associação positiva de doença arterial coronária (DAC) e AAA, com prevalência de 5,0 a 8,4%[19,20]. Análise multivariada de estudo recente revelou que idade ≥ 65 anos, história familiar de AAA, tabagismo ativo e doença comprometendo três artérias coronárias foram associados com prevalência mais elevada de AAA[21]. A associação dos fatores de risco, como tabagismo, HAS e doença carotídea em pacientes com DAC, aumenta a chance de desenvolver AAA[20].

1.3 Quadro clínico e diagnóstico do aneurisma da aorta abdominal

O AAA é uma doença silenciosa que evolui de forma assintomática. Na maioria dos casos, o AAA é detectado casualmente durante a realização de ultrassonografia de abdome para investigação de outras doenças[22-24]. Raramente, pode apresentar dores abdominais em caso de crescimento acelerado do AAA por pressão sobre os órgãos adjacentes, por embolização de trombos nas artérias sistêmicas distais ou por ruptura. Em 30% dos casos, o paciente portador de AAA pode referir sensação de massa pulsátil na região abdominal[25;26].

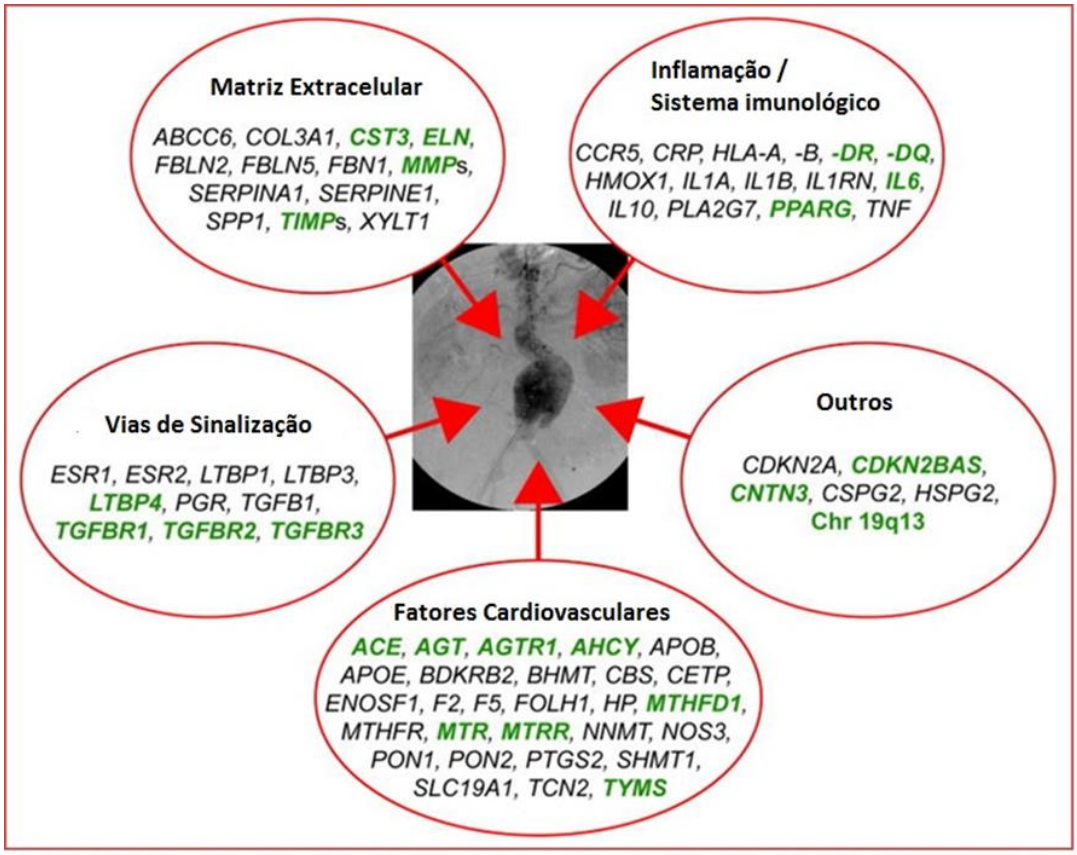
Atualmente, o método de escolha para rastreamento do AAA na população é a ultrassonografia de abdome, com sensibilidade e especificidade próximas de 100%[24,27]. Metanálise de programa de rastreamento de AAA[28] concluiu que homens com idade entre 65 e 70 anos devem ser rastreados e que, nesse grupo, a mortalidade poderia ser reduzida em 43%[29].

1.4 Etiopatogenia do aneurisma da aorta abdominal

Os mecanismos envolvidos no AAA não estão completamente compreendidos, mas os conhecimentos até o presente sugerem o envolvimento de vários fatores e processos degenerativos resultantes de interações biológicas e estímulos hemodinâmicos na parede da aorta abdominal[6].

Nos estudos de associação do genoma total, apenas 10% dos casos de doenças cardiovasculares apresentam componente hereditário[30,31]. Há evidências de que, aproximadamente, 15% dos pacientes portadores de AAA possuem relato de casos da mesma doença entre parentes de primeiro grau[32,33], sendo considerada uma doença autossômica dominante com penetrância gênica incompleta[34,35]. Clifton e colaboradores foram pioneiros ao descrever o caso de 3 irmãos de mesmos progenitores, previamente assintomáticos, que foram submetidos à cirurgia de reparação da ruptura de AAA, sugerindo forte correlação entre carga genética e a doença[36].

Hinterseher e colegas catalogaram os genes relacionados, direta ou indiretamente, com o desenvolvimento do AAA[37] (Figura 1):



Fonte: Adaptada de Hinterseher e colaboradores, 2011.

Figura 1 - Genes relacionados com AAA. Em conjunto, os genes relacionados com a matriz extracelular (MEC), inflamação ou sistema imunológico, as vias de sinalização e fatores cardiovasculares contribuem para a patogênese do AAA. Os genes destacados em cor verde são os mais fortemente associados.

A influência dos fatores ambientais é tão importante na etiologia das doenças quanto a presença de mutações genéticas, polimorfismos e anormalidades cromossômicas[38].

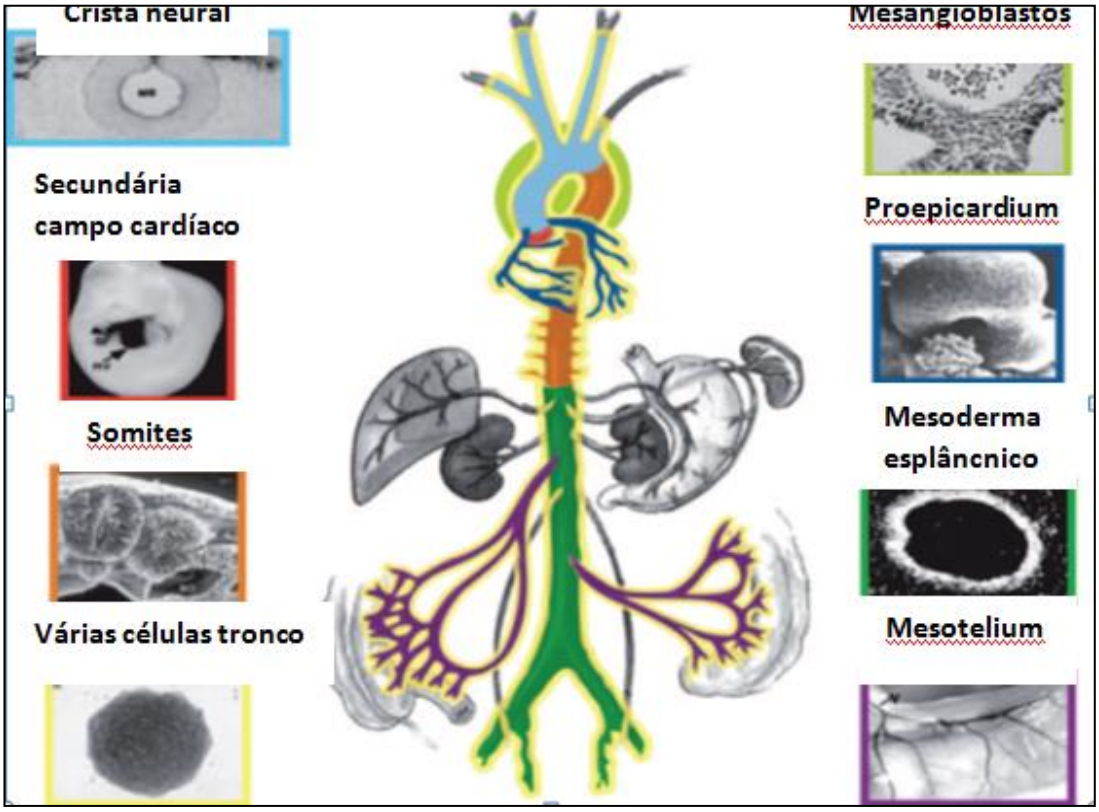
O AAA é uma das doenças mais influenciadas pelo estilo de vida, tanto no seu desenvolvimento como também no prognóstico, cujo principal fator de risco é o tabagismo, sendo cinco vezes mais frequente entre os fumantes do que em não fumantes[39]. Segundo a literatura, o tabagismo está presente em, aproximadamente, 70% dos homens com AAA[6,40]. Grande estudo sueco rastreou 22.187 homens com idade média de 65 anos e detectou história de tabagismo ativo ou pregresso em 87% dos indivíduos com AAA[40].

O estudo ADAM (*Aneurysm Detection and Management*), que incluiu 114.567 indivíduos, também observou a associação do tabagismo ativo ou pregresso com o diâmetro do AAA. Nos indivíduos com AAA entre 3,0 a 3,9 cm, havia 2,97 vezes a chance de associação com tabagismo; enquanto os AAA, a partir de 4,0 cm, a chance foi de 5,07 vezes[41].

Nas mulheres, o tabagismo é considerado fator de risco muito maior para AAA do que para os homens. Apesar da prevalência menor da doença nas mulheres, o AAA costuma ser mais grave nesse grupo[42]. Em metanálise recente, as mulheres apresentaram risco de ruptura quatro vezes maior, mais cedo e com aneurismas de diâmetros menores do que os homens[43,44].

Alguns estudos sugerem a participação de micro-organismos na patogênese do AAA, mas os resultados têm sido inconclusivos[45]. Em estudo recente, os pesquisadores observaram a presença de *Mycoplasma pneumoniae* e *Clamydophila pneumoniae* no AAA, sugerindo haver simbiose local desses microrganismos, podendo resultar em reação inflamatória exacerbada na camada adventícia da aorta, com diminuição da atividade do TIMP-1 levando à maior degradação de colágeno pela MMP-9 e dilatação do vaso[46].

A teoria do efeito hemodinâmico do fluxo turbulento na região das emergências das artérias renais poderia explicar a origem dos AAAs; entretanto, a origem embrionária das células musculares lisas nos diferentes segmentos da aorta parece esclarecer melhor as diferentes doenças no mesmo vaso (Figura 2). O segmento da aorta ascendente é formado de células musculares lisas que se originam da crista neural, enquanto o segmento abdominal da aorta é constituído de células musculares lisas originadas a partir do mesoderma, podendo explicar diferentes respostas aos mesmos estímulos na mesma artéria[47] quando testados sob condições idênticas *in vivo*[48] ou *in vitro*[49].



Fonte: Adaptada de Majesky, 2007

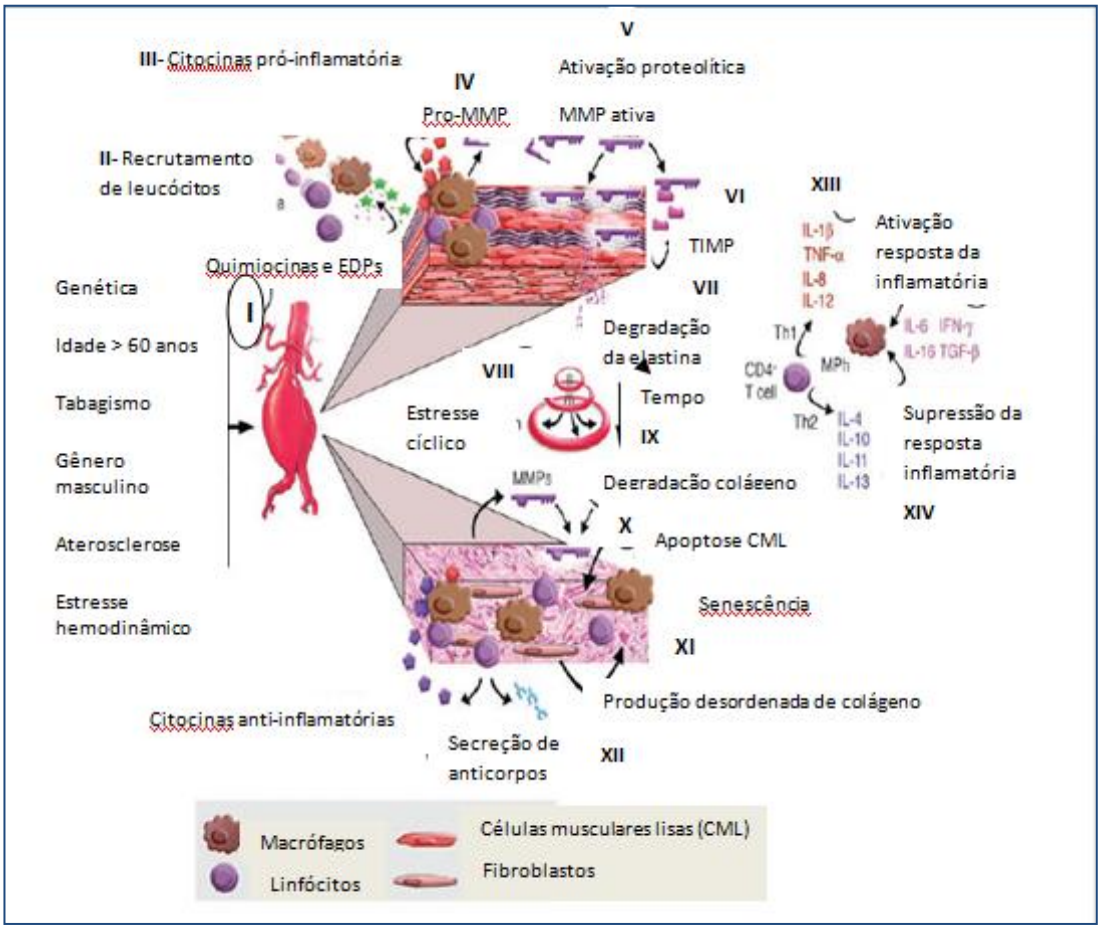
Figura 2 - Mapa do desenvolvimento fetal da musculatura lisa da aorta. As cores representam as diferentes origens embrionárias das células musculares lisas conforme indicadas nas imagens à direita e à esquerda da figura.

Embora os aneurismas maiores sejam mais sujeitos à ruptura, nem sempre apresentam paredes mais frágeis, quando comparados com aneurismas menores. Estudo analisou fragmentos da parede anterior de grandes aneurismas comparados com AAA menores e observou que aqueles foram mais resistentes à ruptura do que estes, sem qualquer propriedade histológica ou histoquímica que pudesse explicar o fenômeno. As limitações dos testes realizados na pesquisa ainda não trazem informações que permitam calcular com maior precisão o risco de ruptura[50].

1.5 Histopatogênese do aneurisma da aorta abdominal

Com o envelhecimento, surgem alterações histológicas típicas que acometem, principalmente, a camada média da aorta, tais como necrose cística por depósito de material mucoide, fragmentação e ruptura da camada elastina, fibrose com o aumento do colágeno e das células musculares lisas, além de medionecrose, em que se observam áreas com aparente perda de núcleos[51].

Na patogênese do AAA, observa-se infiltração crônica de células inflamatórias nas camadas média e adventícia da aorta, fragmentação e degeneração da elastina[52], e atenuação da camada média, constituída por processo inflamatório vascular transmural, degradação da MEC, desequilíbrio na homeostase das células musculares lisas[25] e estresse oxidativo[53]. A Figura 3 apresenta, esquematicamente, todo o processo envolvendo a patogênese do AAA[54].



Fonte: Adaptada de Curci e colaboradores, 2004.

Figura 3 - Histopatogênese do AAA.

Iniciando pela injúria da parede aórtica relacionada com os fatores de risco (I), levando ao recrutamento de leucócitos dentro da camada média aórtica (II), ativação dos macrófagos (III), que produzem pró-enzimas das metaloproteases (pro-MMP) (IV), que são ativadas no espaço extracelular. (V). TIMPs podem neutralizar a atividade das MMPs (VI), mas parece insuficiente para prevenir a degradação das proteínas da matriz estrutural (elastina e colágeno intersticial) (VII). A degradação da elastina, o estresse cíclico e a tensão sobre a parede da aorta levam à progressiva dilatação e formação do aneurisma (VIII). A degradação do colágeno enfraquece a parede (IX); embora as células musculares lisas (CML) e os fibroblastos possam promover o reparo estrutural, a apoptose e senescência celular causam depleção das CMLs (X), e ocorre a desorganização do colágeno intersticial (XI). O tecido do aneurisma é infiltrado por células T, linfócitos B, plasmócitos, células CD4 e deposição de imunoglobulinas, refletindo a resposta imune celular e humoral (XII). O conhecimento da resposta imune adaptativa celular no AAA pode revelar como diferentes subtipos de células T (Th1 *vesus* Th2) interagem com macrófagos para promover ou suprimir a degeneração aneurismal, baseado no equilíbrio local de moléculas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (XIII). Algumas citocinas produzidas dentro do tecido do aneurisma, tais como as interleucinas - 6 (IL-6) e IFN-γ, podem apresentar duplas e opostas funções dependendo do contexto específico (XV). EPDs, degradação de peptídeos elastina; MPh, macrófagos; PGs, prostaglandinas; ROS, espécies reativas de oxigênio[54].

Durante o desenvolvimento do AAA, ocorre intensa atividade das proteases cisteínas, serinas e, principalmente, das metaloproteases (MMPs), que são uma família de proteínas responsáveis pela manutenção da integridade da MEC da parede dos vasos, que são produzidas tanto pelas células do tecido conjuntivo que forma a MEC, os fibroblastos e células musculares lisas, como, também, pelas células inflamatórias que participam do processo de degradação da MEC, como as enzimas metaloproteinases, (MMP-1, 2, 3, 9, 12 e 13), principalmente a MMP-2 e a MMP-9, as serinoproteases, ativador do plasminogênio tipo-tecidual (t-PA), o ativador do plasminogênio tipo-uroquinase (u-PA), a plasmina, a elastase leucocitária e as cisteinas (catepsina D, K, L e S)[52,55]. A ação dessas enzimas depende da interação entre seus inibidores e ativadores: a) Inibidores: os TIMPs (*tissue inihibitors of matrix metaloproteinases*), protease-nexina, elafina (que inibe a elastase), a-2 macroglobulina, PAI (inibidor da ativação do plasminogênio); b) Ativadores: a uroquinase, t-PA e a plasmina[56].

Os TIMPs exercem papel importante no desenvolvimento dos aneurismas aórticos. O TIMP1 liga-se à pro-MMP-9 formando um complexo, enquanto o TIMP2 liga-se à pro-MMP-2[57].

As MMP-9 (92-kD; gelatinase B) e MMP -2 (72-kD; gelatinase A) são as enzimas mais proeminentes secretadas pelo tecido do AAA em órgãos de cultura *in vivo*; elas são expressas pelas células musculares lisas, pelos macrófagos, pelos fibroblastos e pelo infiltrado inflamatório[58].

Embora a aterosclerose seja responsável, em grande parte, pelo desenvolvimento dos AAA, no entanto, os genes que predispõem à aterosclerose e AAA são diferentes[59], sugerindo que outros fatores não genéticos, os epigenéticos, podem estar envolvidos na patogênese da AAA. Os mecanismos epigenéticos ambientais e comportamentais podem contribuir para o surgimento de doenças, dentre elas, o AAA[60]. Com isso, acredita-se que a avaliação de fatores epigenéticos, especialmente de microRNAs (miRNAs), possa contribuir para a melhor compreensão da patogênese do AAA e identificar possíveis alvos terapêuticos.

1.6 Epigenética no desenvolvimento do AAA

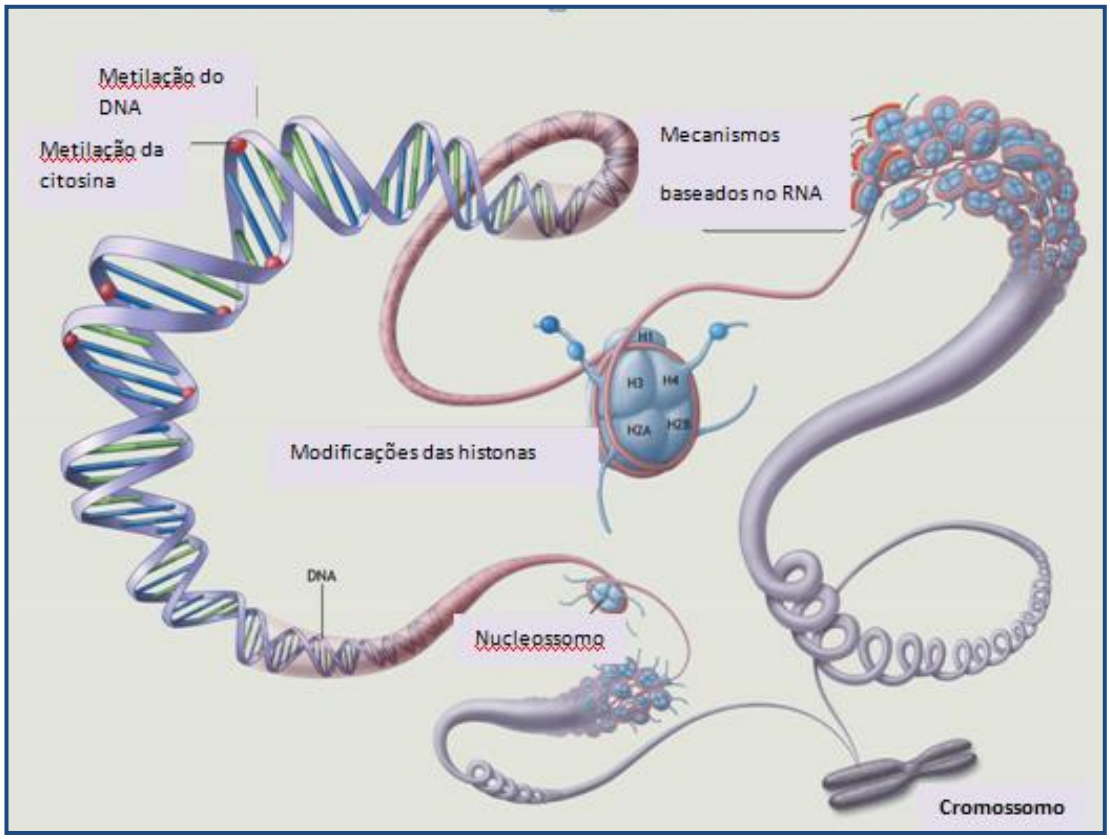
Epigenética é o ramo da Biologia que estuda as mudanças hereditárias na função de um gene que ocorrem sem alteração na sequência de nucleotídeos[61]. Estas alterações epigenéticas são potencialmente reversíveis e moduladas pelo ambiente, dieta ou intervenção farmacológica. Deste modo, podem mediar mudanças na estabilidade genômica e expressão gênica[62,63], tornando-os mecanismos patogênicos potencialmente importantes em doenças multifatoriais complexas como AAA. Os fatores epigenéticos como metilação no DNA (Ácido desoxirribonucleico), modificações das histonas e microRNAs podem ajudar a explicar como as células com sequência de DNA idênticas podem apresentar fenótipos diferentes[64,65].

1.6.1 Metilação de DNA

Os mecanismos epigenéticos incluem todas as informações herdadas que não vêm da sequência do DNA em si. A regulação epigenética da expressão dos genes envolve modificações químicas do DNA e das proteínas associadas, contribuindo para o desenvolvimento e as condições tanto fisiológicas como patológicas[66] (Figura 4).

O principal papel da metilação do DNA é o silenciamento da transcrição e a formação da heterocromatina, modificações estas que podem ser herdadas por meio das divisões celulares. Por essa razão, a metilação do DNA é considerada uma das modificações epigenéticas mais estáveis[67]. Aproximadamente 70 a 90% dos dinucleotídeos citosina – guaninas (CpGs) são metilados nas células somáticas saudáveis, representando 3% a 6% de todas as citosinas. As regiões ricas em CpGs, chamadas “ilhas CpGs”, constituem, aproximadamente, 7% destes dinucleotídeos do genoma total e são associadas com as regiões 5´regulatórias de 40% a 60% dos genes humanos[67,68].

A maquinaria da metilação do DNA compreende: as enzimas DNA - metil tranferases (DNMT-1, DNMT-2, DNMT-3a e DNMT-3b), as proteínas metil-CpGs associadas (*Methyl-CpG Binding Proteins*, MBD 1, MBD2, MBD3, MBD4, MeCP2 ou Kaiso) e as DNA-demetilases[69].



Fonte: Adaptada de Matouk e colaboradores, 2008.

Figura 4 - Mecanismos epigenéticos de regulação gênica.
1) Metilação do DNA, marcada pelos pontos de cor vermelha; 2) modificações das histonas, marcadas pelas circunferências azuis ; 3) mecanismos baseados no RNA (Ácido ribonucleico), marcados por cobertura vermelha sobre a cromatina.

Em pesquisa recente, foi realizado o mapeamento do padrão de metilação do DNA na aterosclerose humana. Os autores concluíram que a aterosclerose é caracterizada por hipermetilação do DNA total[70], diferindo de outras doenças humanas, como, por exemplo, o câncer, em que ocorre hipometilação do genoma total e hipermetilação das ilhas CpGs associadas com genes supressores tumorais[67].

Outras descobertas importantes surgiram nos anos 90, quando o DNA passou a ser identificado na sua forma tridimensional e a modificação das histonas foi relacionada com a regulação do estado da cromatina e do genoma[71].

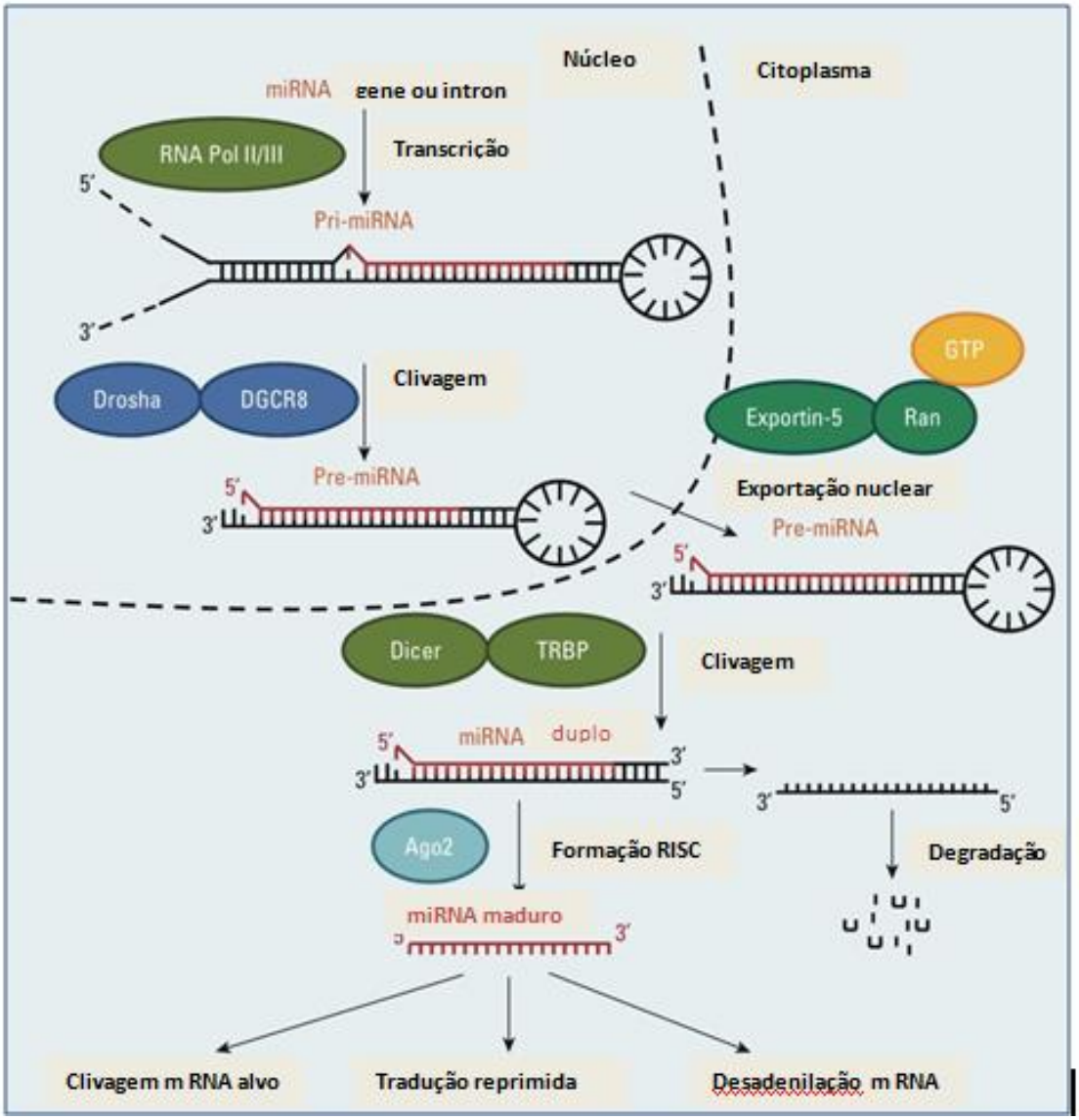
1.6.2 microRNAs: biogênese e regulação no AAA

Os miRNAs são pequenos ácidos ribonucleicos não codificantes, com, aproximadamente, 22 nucleotídeos, considerados marcadores epigenéticos pós-transcricionais capazes de reprimir a expressão do RNA mensageiro (mRNA) e impedir a tradução da proteína[72]. O silenciamento do gene mediado pelos miRNAs ocorre pelo pareamento de bases da região 5' do miRNA com a sequência de bases do mRNA-alvo, reprimindo a tradução e/ou levando à degradação do mRNA[73].

Os miRNAs tanto podem ser encontrados no núcleo, citoplasma e mitocôndrias das células como também em outros compartimentos extracelulares, tais como no soro sanguíneo[74], exossomos[75] e microvesículas[76].

O ciclo de uma molécula de miRNA começa no núcleo da célula, em que é transcrito, o miRNA primário e sua dupla fita é clivada pela enzima Drosha, formando o miRNA precursor, o qual é transportado para o citoplasma pela enzima Exportina 5, sendo, novamente, clivado pela enzima Dicer antes de tornar-se fita simples, miRNA maduro, e ligar-se ao complexo RISC cujo alvo será o mRNA para inibir a tradução e, consequentemente, a formação da proteína[77].

Diversos miRNAs podem ter como alvo o mesmo mRNA, bem como, o mesmo mRNA pode ter múltiplos sítios de ligação para diversos miRNAs, criando-se um sistema regulatório altamente complexo[78]. A Figura 5 ilustra a biogênese dos miRNAs[79].



Fonte: Adaptada de Virjens e colaboradores, 2015.

Figura 5 - Biogênese dos miRNAs.

Os miRNAs podem ser considerados biomarcadores com boa sensibilidade e especificidade por serem estáveis no sangue, facilmente detectáveis, tanto por meio de microarranjos de miRNAs como por meio de qPCR (Reação em cadeia pela polimerase quantitativa)[80,81]. Atualmente, estão sendo alvos de pesquisa no campo do AAA, uma vez que podem ser empregados como biomarcadores específicos tanto no diagnóstico como na evolução da doença.

Alguns miRNAs têm as suas funções estabelecidas no AAA, por exemplo, o miR-24 que pertence ao mesmo grupamento de miR-23b, 24 e 27b, cuja expressão diminuída favorece a transcrição do gene *CHI31* que controla síntese de citocinas pelos macrófagos, bem como, a sobrevida dessas células. Promove, também, a migração das células musculares lisas e produção de citocinas, além de estimular a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais. Dessa forma, níveis de miR-24 reduzidos, tanto no plasma como no tecido, foram detectados em indivíduos com AAA[82].

A família miR-29 regula, pelo menos, 16 genes-alvo da MEC, dentre eles, encontram-se isoformas de colágeno (*COL1A1,COL1A2 e COL3A1)*, fibrilina-1 (*FBN1*) e elastina (*ELN*)[83]. Os estudos revelaram que a baixa expressão do miR-29 resulta em maior fibrose na área do infarto agudo do miocárdio[84] e tem papel importante na formação do aneurisma[85]. Experimentalmente, a inibição do miR-29b aumentou a expressão dos genes que codificam colágeno (tipo I, III e V) e a elastina, e, além disso, reduziu a expressão das MMP-9 e MMP-2, e, consequentemente, reduziu a formação de aneurismas aórticos em modelos animais. Por outro lado, a superexpressão do miR-29 levou à rápida expansão do AAA e aumentou o risco de ruptura[86].

O miR-21 tem sua expressão aumentada em muitos tumores e processos envolvendo a sobrevida, proliferação e migração celular[87]. Ele tem sido indicado como regulador da função contrátil[88] e da proliferação das células musculares lisas[89]. Estudos realizados em animais por Maegdefessel e colaboradores revelaram que a nicotina acelerou o crescimento dos AAA e, mais adiante, aumentou a quantidade de mir-21, como atividade protetora na tentativa de limitar a expansão do aneurisma e sua evolução para ruptura[25]. O aumento da expressão do miR-21 foi acompanhado de baixa expressão do *PTEN,* um gene supressor tumoral, em fumantes com AAA quando comparados com os não fumantes[90].

A família do miR-15 (miR- 15 a, miR15 b, miR- 16- 1, miR-16-2, miR 195 e miR-497) consiste em miRNAs altamente conservados e agrupados em 3 cromossomos[91]. Essa família de miRNAs tem sido associada com o remodelamento do colágeno e silenciamento da síntese de elastina, alterações básicas para a formação dos aneurismas, em que ocorre perda da elastina e aumento na produção do colágeno[83]. A elastina tem sido o alvo direto desses dois miRNAs, miR-29b[85,86,92] e miR-195, razão porque ambos estão envolvidos na formação do AAA[93].

O miR-126 regula o processo de inflamação vascular e está envolvido no remodelamento das doenças aórticas[94]. Estudos revelam seu potencial papel na formação do AAA, sendo encontrado em baixa expressão no plasma e alta expressão nos tecidos de AAA[95].

O miR-155 está envolvido em processos patológicos de diversos tecidos, mas alguns estudos[96,97] enfatizam o seu papel preponderante como modulador da inflamação vascular, podendo estar envolvido tanto na aterosclerose como na doença aneurismática da aorta.

Estudo de revisão recente catalogou os 12 microRNAs envolvidos no remodelamento vascular e no aneurisma aórtico. Os autores discutiram o potencial uso dos miRNAs como biomarcadores no diagnóstico, prognóstico, bem como, a perspectiva de novos alvos terapêuticos em aneurisma aórtico[94] (Tabela 1).

Tabela 1 – Os miRNAs envolvidos no remodelamento vascular e aneurisma aórtico.

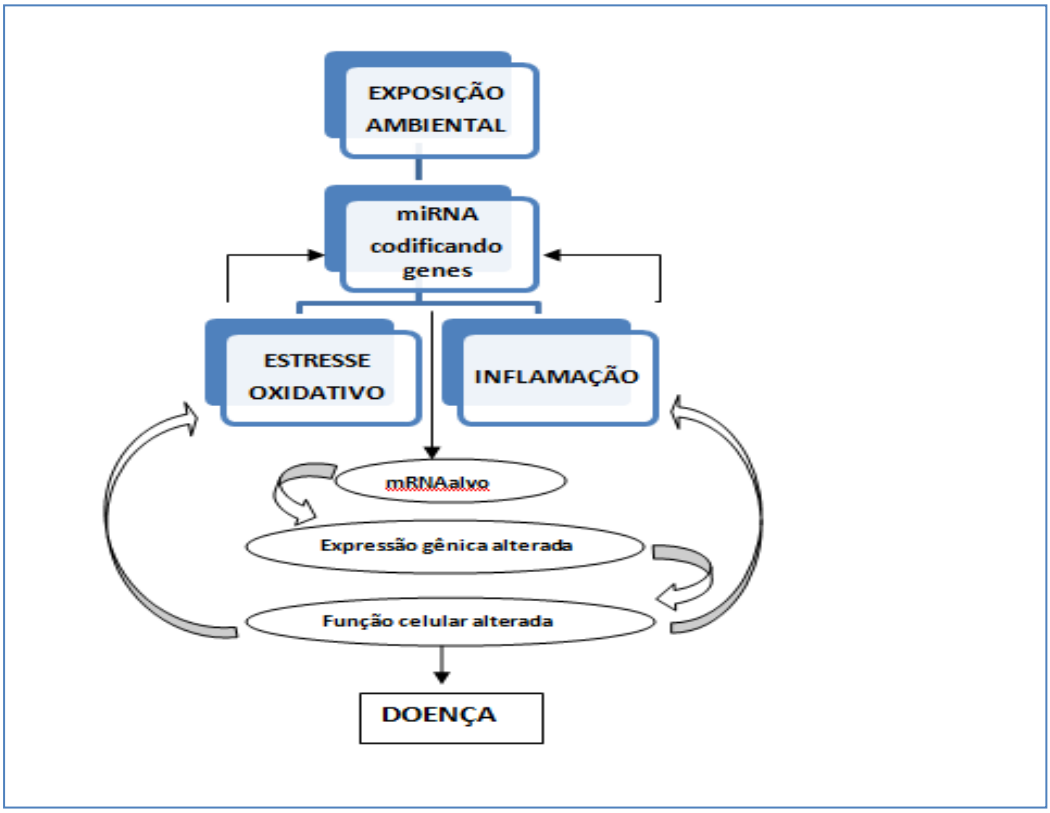
miRNA(s)	Genes- alvos	Efeitos	Referências
miR- 21	*PTEN,SPRY,PDCD4, BCL2*	Induzir proliferação Reduzir apoptose em CML no AAA	Maegdefessel e cols.; Merk e cols, 2012[90,98]
miR-24	*ChI3L1*	Inibir inflamação	Maegdefessel e cols., 2014[82]
miR-26a	*SMAD-1,SMAD-4*	Induzir proliferação Inibir diferenciação Apoptose de CML no AAA	Leeper e cols., 2011[99]
miR-29	*COL1A1,COL3A2,COL3 A1, FBN1, ELN*	Promover baixa expressão na MEC no AAA	Boon e cols., 2011; Maegdefessel e cols.; Merk e cols., 2012[85,86,92]
miR-126	*EGFL7*	Inibir a inflamação vascular	Harris e cols.; Fish e cols.; Wang e cols., 2008[100-102]
miR-143/ miR145	*Klf4,miocardina, Elk-1, SRF*	Promover diferenciação e reprimir proliferação das CML na aterosclerose E AAT	Cordes e cols., Elia e cols., 2009[103,104]
miR-155	*MAP3K10, CTLA4, SMAD2*	Inibir inflamação vascular na aterosclerose	Biros e cols., 2014[105]
miR-181b	*IPOA3*	Inibir inflamação vascular na aterosclerose	Sun e cols., 2014[106,107]
miR-195	*COL1A1, COL1A2, COL1A3, FBN1, ELN*	Regular MMPs no AAA	Zampetaki e cols., 2014[93]
miR-223	*CXCL2,CCL3,IL-6*	Inibir inflamação vascular no AAA	Johnnidis e cols., 2008; Kin e cols., 2012; Lee e cols.; 2013[95,108,109]
miR-663	*JunB, MLC9*	Promover diferenciação e inibir proliferação e migração de CML	Ni e cols., 2011; Li e cols., 2013[110,111]
miR-712/ miR 205	*TIMP3, RECK*	Induzir inflamação na aterosclerose e AAA	Son e cols., 2012; Kim e cols., 2014[112,113]

(Adaptada de Fu e colaboradores, 2015).

O cigarro, principal fator de risco para AAA, foi um dos primeiros e mais estudados fatores ambientais, bem como, o seu efeito sobre a maquinaria dos miRNAs em humanos[114].

Hou e colaboradores revisaram estudos mais recentes que ligam os fatores ambientais com determinadas doenças, enfatizando o papel do cigarro[115,116]. Os autores propuseram modelo conceitual para explicar os

principais possíveis mecanismos que podem levar a alterações na expressão dos miRNAs, a inflamação, ao estresse oxidativo e à doença[115] (Figura 6).



Fonte: Adaptada de Hou e colaboradores, 2011

Figura 6 - Exposição ambiental e alterações nos microRNAs.

Vrijens e colegas catalogaram 18 miRNAs relacionados com exposição ao cigarro em humanos, destacando os miRNAs- 21, 29b e 223. Esses miRNAs foram incluídos entre aqueles miRNAs envolvidos no remodelamento vascular e no aneurisma aórtico apresentados na Tabela 3.

Em recente avaliação crítica de 104 publicações envolvendo miRNAs como biomarcadores no plasma, soro e sangue periférico, cobrindo 57 doenças não neoplásicas; 29 citações indicaram 87 microRNAs relacionados com algumas doenças cardiovasculares. No entanto, apenas, 31 eram miRNAs únicos. Alguns dos miRNAs encontrados nas pesquisas, ou estavam presentes em diversos tipos celulares, como o miR-21, ou falharam durante tentativas de replicação, como ocorreu com os miRNA-107, 125 b-5p, 142-3p, 142-5p e 146 a- 5p[117].

Os conhecimentos da fisiopatologia molecular do aneurisma estão avançando com os diversos estudos, tanto em modelos animais como em humanos, porém ainda são limitados e necessitam de mais pesquisas para decifrar o verdadeiro papel dos miRNAs no AAA, que podem ser excelentes biomarcadores e novos alvos terapêuticos na doença aneurismática da aorta.

1.7 Tratamento do aneurisma da aorta abdominal

Até o presente, o tratamento cirúrgico é a primeira escolha para a correção dos aneurismas com diâmetro maior do que 5,0 a 5,5 cm, dependendo do risco perioperatório. Os aneurismas com diâmetro menor do que 5,0 cm, dependendo do centro, devem ser monitorados por meio de ultrassonografia[59]. Os estudos ADAM (*Aneurym Detection and Management*) e o UKSAT (*United Kingdom Small Aneurysm Trial*) revelaram que a cirurgia eletiva dos aneurismas menores (5,0 – 5,5 cm) não aumentou a sobrevida dos pacientes, sendo recomendada a conduta de “observar e esperar”, nesses casos[27,118].

O diagnóstico precoce e o seguimento do AAA visam evitar a apresentação dramática de sua forma aguda, quando ocorre a ruptura, resultando na morte de 80 – 90% dos pacientes[119].

O diâmetro transverso do AAA é o mais forte preditor de ruptura, que aumenta consideravelmente a partir de 5,5 cm. Com base no diâmetro do AAA observado, Conway e colegas puderam prever o risco de ruptura do AAA em 12 meses[120] (Tabela 2).

Tabela 2 – Estimativa do grau de risco de ruptura baseado no diâmetro do aneurisma da aorta abdominal (AAA).

Diâmetro do AAA (mm)	Risco de Ruptura em 12 meses (%)
30 – 39	0
40 – 49	1.0
50 – 59	1.0 – 11
60 – 69	10 – 22
>70	30 – 33

(Adaptada de Conwey e colaboradores, 2001)

O tratamento com cirurgia aberta ou a correção endovascular está indicado, apenas, para prevenir o risco de ruptura. Todos os esforços estão voltados para que mortes sejam evitadas por causa de uma doença com indicação para tratamento cirúrgico eletivo, no qual a mortalidade é drasticamente mais baixa, do que quando associada à ruptura[121].

As duas opções de tratamento cursam com riscos, entretanto, na Europa e nos Estados Unidos, o tratamento endovascular para implante de stent tem sido realizado em, aproximadamente, 70% dos casos, devido à maior morbidade e mortalidade da cirurgia convencional[6].

A mortalidade dos pacientes submetidos tanto à cirurgia aberta como à correção endovascular vai depender mais das comorbidades associadas (idade superior a 80 anos, doença renal dialítica ou não dialítica, insuficiência cardíaca, doença vascular e gênero feminino) do que pelos procedimentos em si[122].

Quanto ao tratamento clínico do AAA, não existem opções farmacológicas com eficácia e segurança comprovadas. A cessação do tabagismo parece ser a única estratégia válida para reduzir o risco de expansão e de ruptura do AAA[123].

As diretrizes americanas recomendam o controle de todos os fatores de risco envolvidos na aterosclerose para os pacientes portadores de AAA. Os pacientes hipertensos e os portadores de DAC são, particularmente, beneficiados com os betabloqueadores[124].

1.8 Contribuições para inovação científica

Para melhor assistir a população idosa em crescimento acelerado, a comunidade científica tem tentado encontrar biomarcadores capazes de auxiliar na identificação precoce das doenças crônicas degenerativas inerentes ao envelhecimento, a fim de aprimorar medidas preventivas e terapêuticas, que, certamente, garantirão a longevidade com melhor qualidade de vida para essa população. Porém, até o momento, poucos estudos foram realizados nesse campo de conhecimento. Este trabalho vem contribuir para melhor entendimento da influência dos fatores epigenéticos no desenvolvimento do AAA aterosclerótico, visando estabelecer novas estratégias de rastreamento que permitirão detectar precocemente, acompanhar a evolução dessa doença e identificar prováveis alvos terapêuticos.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência dos fatores epigenéticos na fisiopatologia do AAA aterosclerótico de idosos.

2.2 Objetivo específico

- Analisar e comparar a expressão de genes envolvidos com a angiogênese, constrição e vasodilatação, inflamação, apoptose, molécula de adesão, coagulação e ativação plaquetária entre amostras de tecidos de indivíduos com AAA e indivíduos controle.
- Avaliar o perfil de metilação do DNA da região promotora de genes relacionados com estresse e toxicidade, em amostras de tecidos com AAA e amostras de tecido-controle.
- Analisar e comparar o perfil de expressão de miRNA entre amostras de tecidos e plasma de indivíduos com AAA e indivíduos-controle.
- Verificar a interação entre os miRNAs e o mRNA dos genes analisados no contexto do AAA.

3 MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 População e tipo de estudo

Este estudo observacional analítico foi realizado em indivíduos matriculados no ambulatório da Seção Médica de Cardiogeriatria e/ou da Seção de Cirurgia Vascular do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia do Estado de São Paulo (IDPC/SP), no período de 27/04/2012 a 23/06/2015, com idades maior ou igual a 60 anos, de ambos os gêneros.

A população do estudo incluiu 57 participantes divididos em dois grupos:

a) **CASO** - 14 indivíduos com AAA submetidos à correção cirúrgica para implante de prótese tubular de DACROM (amostras de tecido e plasma).
b) **CONTROLE** – 43 indivíduos sem AAA (**7** amostras de tecido proveniente de doadores de órgãos obtidos pelo serviço de captação de órgãos do IDPC; e **36** amostras de plasma proveniente de pacientes com características clínicas semelhantes ao do grupo caso, mas sem AAA).

3.2 Aspectos éticos

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do IDPC/SP, constando do Termo de Livre Consentimento e Esclarecido (TCLE) (Anexo A), requerido pelas resoluções CNS 196/96, 251/97 e 292/99, sobre diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos, do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa/Agência de Vigilância Sanitária, e as Boas Práticas de Pesquisa

Clínica do ICH-GCP, o qual foi protocolado em 15 de abril de 2014, cujo número é 1470 (Anexo B).

Foi aplicado questionário durante a anamnese (Anexo C) e os dados obtidos foram devidamente registrados em fichas elaboradas para essa finalidade pela investigadora, em seguida, foram armazenadas em banco de dados computadorizados, sendo as identidades dos pacientes preservadas, e enviados ao Laboratório de Epidemiologia e Estatística do IDPC. Todo o material biológico coletado (sangue e tecido da aorta) será armazenado por cinco anos, e, depois desse prazo, será descartado, segundo as normas da Agência de Vigilância Sanitária.

3.3 Critérios de inclusão

- Os indivíduos a partir de 60 anos, de ambos os gêneros, que foram submetidos à cirurgia aberta para correção do AAA e concordaram em ter o espécime removido, submeteram-se à coleta de sangue e assinaram o TCLE.
- Indivíduos com características semelhantes, sem evidência clínica de AAA, em condições físicas e mentais para responderem as questões do protocolo do estudo, que concordaram em assinar o TCLE e submeteram-se à coleta de sangue.
- Indivíduos doadores de órgãos e tecidos, sem distinção de idade ou gênero, sem evidência de aneurisma na região entre as emergências das artérias renais e a bifurcação das artérias ilíacas.

3.4 Critérios de exclusão

- Indivíduos com AAA de outra etiologia, senão degenerativa.
- Indivíduos portadores de aneurismas tóraco-abdominais (AATA).

- Indivíduos portadores de neoplasias conhecidas em atividade ou outras doenças graves incapacitantes.
- Déficit cognitivo impossibilitando a participação do indivíduo no protocolo.

3.5 Anamnese e coleta dos dados clínicos

A avaliação clínica dos pacientes foi realizada pela única investigadora e os seguintes dados foram coletados:

- Estilo de vida: sedentarismo ou prática de atividade física regular.
- Tabagismo: a) fumante ativo; b) ex-fumante e c) nunca fumou.
- Quanto ao tempo e à quantidade de cigarros consumidos, foram agrupados em: a) tempo em que fumou (início ao término) e b) quantos cigarros/dia (média).
- História de doenças prévias e fatores de risco para doenças cardiovasculares: hipertensão arterial, dislipidemia, diabetes, doença renal crônica, doença arterial periférica e outras comorbidades. Quanto ao diagnóstico das doenças e fatores de risco para doenças cardiovasculares (DCV), foram considerados os dados obtidos por meio da história pregressa e/ou atual, como também as informações que constavam no prontuário do paciente que poderiam comprovar a sua existência.
- Medicamentos – anti-hipertensivos (inibidor da enzima conversora da angiotensina (IECA), bloqueador do receptor AT1 da angiotensina (BRA), diuréticos, betabloqueadores, bloqueadores dos canais de cálcio), anticoagulantes (inibidores da vitamina K), antiaterogênicos (estatinas, fibratos), bisfosfonatos, cálcio, vitamina D, hormônios (levotiroxina, estrógenos, testosterona) e antiagregantes plaquetários (ácido acetil salicílico, ticlopidina, clopidogrel).

- As medidas de pressão arterial seguiram as recomendações da VI Diretriz Brasileira de Hipertensão (Sociedade Brasileira de Cardiologia, Sociedade Brasileira de Hipertensão e Sociedade Brasileira de Nefrologia, 2010)[125].

3.6 Exames bioquímicos

As coletas das amostras de sangue periférico seguiram as recomendações da IV Diretriz Brasileira de Dislipidemia[126], que orienta observar o período de jejum de 12 horas. Os exames laboratoriais foram realizados por técnicos devidamente treinados do Laboratório do IDPC e os resultados seguiram os padrões vigentes na atualidade.

Foi realizada determinação sérica de glicemia, ureia, creatinina, ácido úrico, colesterol total, HDL-colesterol e LDL-colesterol, triglicérides, fósforo, magnésio, cálcio total por método colorimétrico enzimático. A determinação sérica de sódio e de potássio foi realizada por potenciometria. Os valores de referência foram baseados nos critérios da II Diretriz Brasileira de Cardiogeriatria[127] e a IV Diretriz Brasileira de Dislipidemia[126]

3.7 Experimentos de biologia molecular e análise histológica

O fluxograma apresentado na Figura 7 ilustra as etapas experimentais do presente trabalho que consiste na análise comparativa de metilação do DNA, expressão gênica e de miRNA, e dos dados histológicos entre os grupos avaliados.

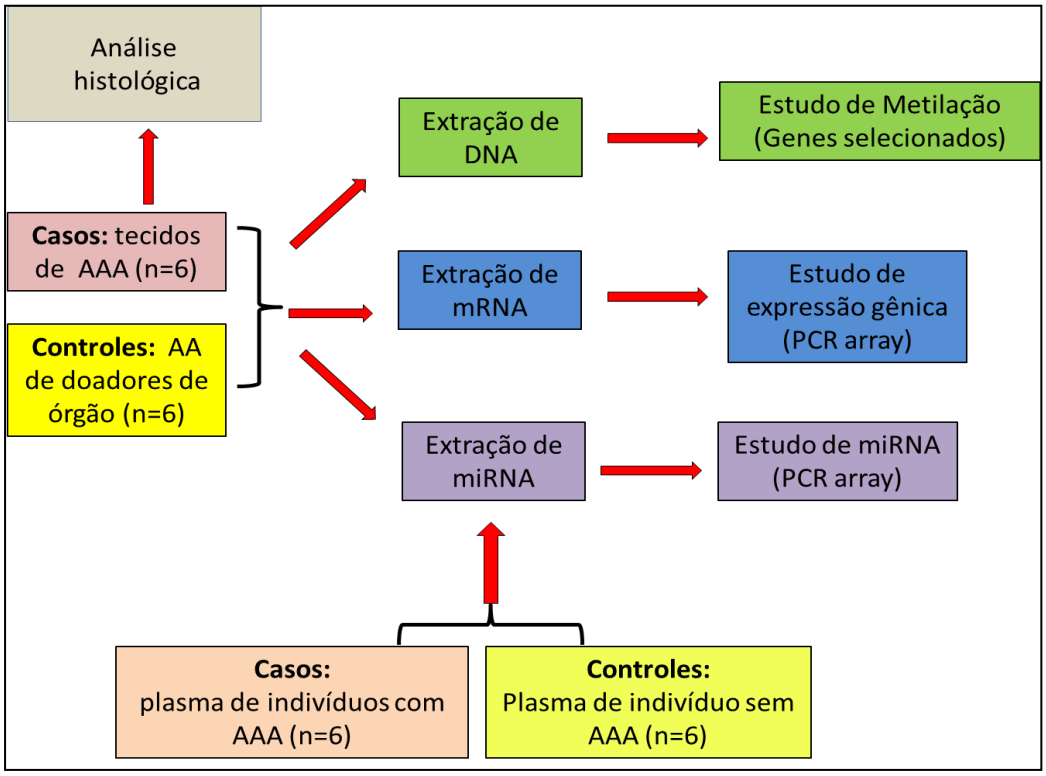


Figura 7 - Fluxograma do estudo. AA, Aorta abdominal; AAA, Aneurisma da aorta abdominal.

Para obtenção de plasma para análise do perfil de miRNAs circulantes, foram coletadas amostras de sangue periférico dos indivíduos de ambos os grupos, caso e controle. Para a obtenção das amostras de tecido, no grupo CASO, durante a cirurgia de correção, foi retirado um fragmento de 2,0 cm^2 da capa do aneurisma para análise histológica e molecular. Enquanto, no grupo-controle, as amostras de tecido da aorta abdominal sem aneurisma foram obtidas de doadores de órgãos. As amostras de tecido proveniente de ambos os grupos foram conservadas em solução de *RNAlater*® (QIAGEN, GmbH, Hiden, Alemanha), com a finalidade de estabilizar as moléculas de RNA, antes do processamento. Essas amostras foram estocadas a -20°C até o momento do experimento.

3.7.1 Análise da expressão gênica do tecido da aorta pela qPCR *array*

O fluxograma da análise de expressão gênica encontra-se na Figura 8. Para a extração do RNA do tecido da aorta, utilizaram-se os reagentes da *RNeasy Microarray Tissue Mini Kit* (QIAGEN, GmbH, Hiden, Alemanha), seguindo-se as instruções do fabricante. A quantificação das amostras de RNA foi determinada utilizando-se o espectrofotômetro *Qubit (LifeTechnologies,* Forest City, EUA). A integridade das amostras de RNA foi avaliada por eletroforese capilar empregando-se o sistema *Agilent Technologies 2200 TapeStation (Agilent Technologies* Inc., Santa Clara, EUA). Foram selecionadas para análise pela qPCR *array* somente as amostras com valor de integridade de RNA (RIN) superior a 7.

Para a reação de transcrição reversa, usou-se 800 ng de RNA total de cada amostra para sintetizar o DNA complementar (cDNA) e o kit RT² First Strand (QIAGEN, GmbH, Hiden, Alemanha). O cDNA obtido foi armazenado a –20ºC até a realização da qPCR. As expressões gênicas dos tecidos da aorta abdominal (6 casos e 6 controles) foram analisadas pela qPCR *Array* contendo 84 genes relacionados ao endotélio vascular humano (código PAHS-015Z, QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha).

As vias de angiogênese, constrição e vasodilatação, inflamação, apoptose, molécula de adesão, coagulação e ativação plaquetária, e os respectivos genes envolvidos que foram analisados no presente projeto de pesquisa encontram-se no Quadro 1 ou no seguinte site do fabricante Qiagen (GmbH, Hilden, Alemanha): https://www.qiagen.com/br/shop/pcr/primer-sets/rt2-profiler-pcrarrays?catno=PAHS-015Z#geneglobe.

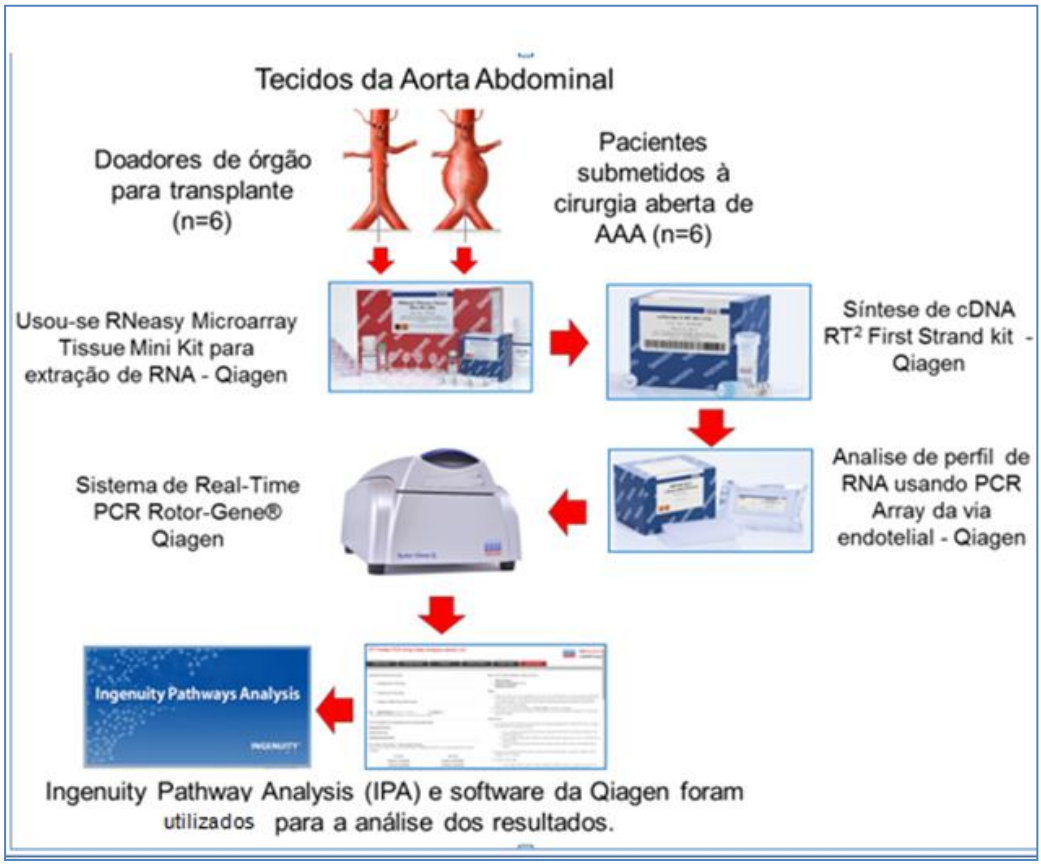


Figura 8 - Fluxograma da análise de expressão gênica pela qPCR array.

Quadro 1 – Lista dos genes relacionados à função do endotélio vascular humano, classificados segundo as vias funcionais que foram analisadas no presente estudo*.

Vias Funcionais	Genes Relacionados
Angiogênese	*ANGPT1, CCL2 (MCP-), CCL5 (RANTES), CX3CL1, EDN1, EDNRA, ENG (EVI-1), F3, FASLG (TNFSF6), FGF1, FGF2(BFGF), FLT1 (VEGFR1), FN1, HIF1A, HMOX1, IL1B, IL6, ITGA5, ITGAV, ITGB1, ITGB3, KDR (VEGFR3), KIT (CD117), KLK3, MMP2, MMP9, NOS3 (eNOS), NPPB, NPR1, PF4, PGF, PLAU (UPA), PTGS2 (COX2), SERPINE1 (PAI), SPHK1, TEK, THBS1 (TSP1), TYMP, VEGF*
Constrição e vasodilatação	*ACE, AGT, AGTR1, ALOX5, APOE, CALCA, CAV1, CX3CL1, EDN1, EDN2, EDNRA, F2R (PAR1), HMOX1, ICAM1, NOS3 (eNOS), NPPB, NPR1, PTGIS, PTGS2 (COX2), SOD1*
Inflamação	*ACE, AGT, AGTR1, ALOX5, APOE, CALCA, CCL2 (MCP1), CCL5 (RANTES), CX3CL1, EDNRA, F2R (PAR1), F3, FN1, HIF1A, HMOX1, IL1B, IL6, NPPB, PTGS2 (COX2), SELE, SPHK1, TGFB1, THBS1 (TSP-1), TNF, VCAM1.*
Apoptose	*ANXA5, BAX, BCL2, BCL2L1 (BCLXL), CASP1 (ICE), CASP3, CAV1, CCL2 (MCP1), CCL5 (RANTES), CFLAR (Casper), CX3CL1, EDN1, EDNRA, FAS (TNFRSF6), FASLG (TNFSF6), FGF2 (BFGF), HIF1A, HMOX1, IL1B, IL3, IL6, IL7, OCLN, PF4, PTK2 (FAK), SPHK1, TEK (TIE2,TIE2), THBS1 (TSP1), TNF, TNFSF10 (TRAIL).*

continua

conclusão

Vias Funcionais	Genes Relacionados
Moléculas de adesão	*ADAM17 (CD156b), AGT, BCL2, CALCA, CDH5, COL18A1, CX3CL1, ENG (EVI1), FGF1, FN1, ICAM1, IL1B, ITGA5, ITGAV, ITGB1, ITGB3, KDR (VEGFR3), PDGFRA, PECAM1, PLAU (UPA), PLG, PTK2 (FAK), SELE, SELL (LECAM1), SELPLG (PSelectin), SERPINE1 (PAI1), TGFB1, THBS1 (TSP1), TNF, VCAM1, VEGFA, VWF*
Coagulação	*ANXA5, CAV1, EDN1, F2R (PAR1), F3, FN1, MMP1, PECAM1, PF4, PLAT (TPA), PLAU (UPA), PLG, PROCR (EPCR), PTK2 (FAK), SELL (LECAM1), SELPLG (P-Selectin), SERPINE1 (PAI-1), TEK (TIE-TIE2), TFPI, THBD, THBS1 (TSP-1), TIMP1, VWF*
Ativação plaquetária	*APOE, CX3CL1, F2R (PAR1), FN1, IL11, IL6, ITGB3, NOS3 (eNOS), PDGFRA, PECAM1, PF4, PLG, SERPINE1 (PAI-1), SOD1, TGFB1, THBD, THBS1 (TSP-1), TIMP1, VEGFA, VWF.*

*por método de qPCR Array (código PAHS-015Z, QIAGEN)

3.7.2 Análise de miRNAs no tecido e no plasma pela qPCR *array*

O fluxograma contendo as etapas do experimento está apresentado na Figura 9. A primeira etapa do experimento foi a extração de miRNA do tecido da aorta abdominal e do plasma. No caso de utilizar o tecido para a análise, um fragmento de ± 20 mg de tecido da aorta abdominal foi homogeneizado utilizando-se o equipamento *Tissue Rupter*® com probes descartáveis (QIAGEN, GmbH, Hiden, Alemanha). Em seguida, foi feita a extração de RNA total, que também inclui os miRNAs, com o produto comercial *RNeasy Fibrous Tissue Mini* (QIAGEN, GmbH, Hiden, Alemanha). A extração de miRNA do plasma foi realizada utilizando-se o kit miRNeasy Serum/Plasma (QIAGEN, GmbH, Hiden, Alemanha) de acordo com o protocolo do fabricante.

As amostras de miRNA obtidas foram quantificadas no aparelho Qubit® 2.0 de quantificação fluorométrica (*Thermo Fisher Scientific*, *Waltham*, MA, EUA) utilizando-se o kit Qubit® microRNA assay *(LifeTechnologies,* Forest City, EUA). Essas amostras de miRNA foram guardadas no congelador a -80°C até a próxima etapa do experimento. Após essa primeira etapa de extração de miRNA, todos os procedimentos seguintes seguiram de modo igual para tecido e plasma.

Para a análise pela qPCR *array*, os miRNAs foram transcritos, primeiramente, para cDNA, utilizando-se o kit RT² First Strand (QIAGEN, GmbH, Hiden, Alemanha). O cDNA obtido foi armazenado a -20ºC até a realização da qPCR *array*.

Realizou-se o controle de qualidade das amostras de cDNA utilizando-se placa de miScript miRNA QC PCR *array* (código MIHS-989ZE-1, QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha) que contém controle de 4 miRNAs (cel-miR-39-3p, cel-miR-16-5p, cel-miR-21-5p, cel-miR-191-5p), 3 non-coding RNA (SNORD 61, SNORD 95, SNORD 96A), miRTC (controle da transcrição reversa) e PPC (controle positivo da PCR) para cada amostra. Somente as amostras com pureza e qualidade satisfatórias foram utilizadas para o experimento da qPCR *array*.

As expressões de miRNA do tecido da aorta abdominal e do plasma (6 casos e 6 controles) foram analisadas utilizando-se placa comercial denominada *Human miFinder 384HC miScript miRNA PCR Array* (código MIHS-3001Z, QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha) que detecta o perfil de 372 miRNAs cuja expressão é abundante na maioria dos tecidos e fluidos, e também são mais bem caracterizados no registro do banco da miRBase (www.miRNase.org). A relação dos 372 miRNAs analisados encontra-se no site da Qiagen (https://www.qiagen.com/br/shop/pcr/primer-sets/miscript-mirna-pcr-arrays?catno=MIHS-3001Z#geneglobe). A qPCR foi realizada no equipamento QuantiStudio® (*Thermo Fisher Scientific*, *Waltham*, MA, EUA), e a análise dos resultados foi feita pelo *software* de análises da Qiagen pelo método de quantificação relativa ($2^{-\Delta\Delta CT}$), o qual informa o número de vezes que um determinado miRNA foi mais/menos expresso (*fold change*) no grupo caso em relação ao grupo-controle.

Por fim, a análise funcional e a avaliação da interação da expressão gênica e do perfil de miRNAs com AAA foram realizadas pelo programa *Ingenuity Pathways Analysis–IPA* (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha).

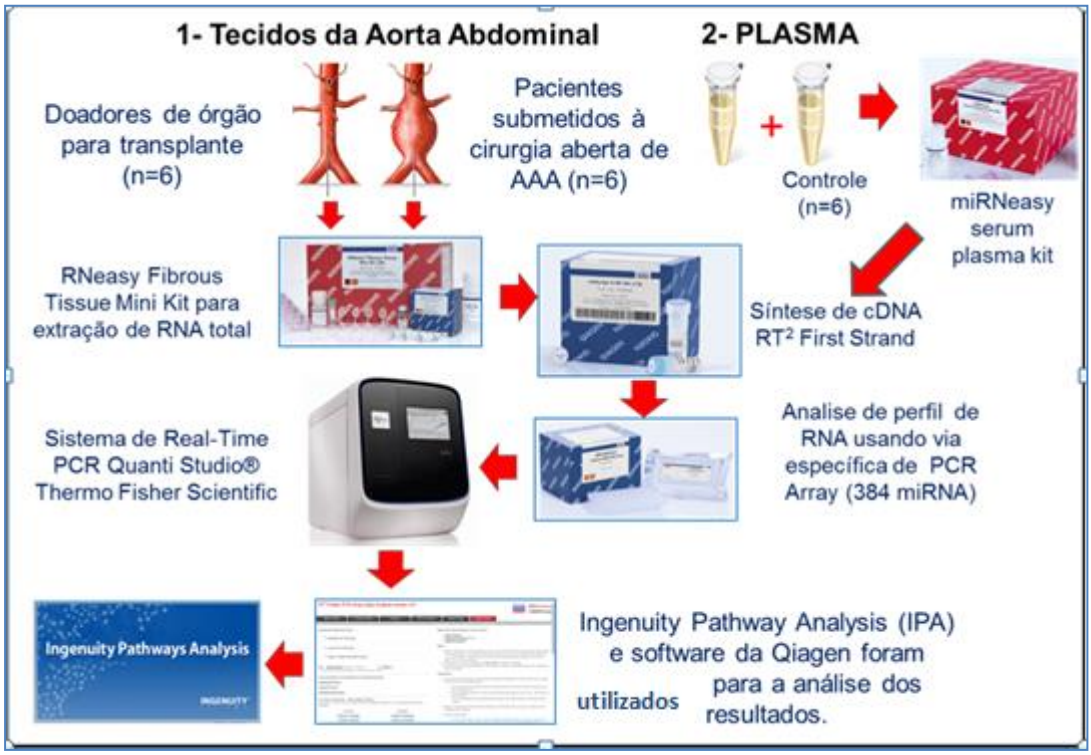


Figura 9 - Fluxograma da análise de expressão de miRNA pela qPCR *array*.

3.7.3 Análise de metilação do DNA no tecido da aorta abdominal

Para a extração de DNA genômico do tecido da aorta abdominal, os tecidos obtidos durante a cirurgia de reparação do aneurisma (n=6) e de doadores de órgãos para transplante (n=6) foram, primeiramente, homogeneizados com *Tissue Rupter*® utilizando-se probes descartáveis (QIAGEN, GmbH, Hiden, Alemanha) e, em seguida, os reagentes do *kit DNeasy blood and tissue* (QIAGEN, GmbH, Hiden, Alemanha) foram empregados para a extração.

A quantificação foi determinada pelo espectrofotômetro *Qubit*® *(LifeTechnologies, Forest City*, EUA) e a verificação da pureza foi feita pelo sistema *Agilent Technologies 2200 TapeStation (Agilent Technologies* Inc., Santa Clara, EUA). Somente as amostras de DNA com pureza satisfatória (A206/A280 por volta de 2,0) foram aproveitadas para a análise de metilação. Essas amostras foram estocadas a -20°C até o momento da análise. Utilizou-se a qPCR *array* para a análise de 22 genes (Quadro 2) da

via de estresse e toxicidade (EpiTect Methyl II para a análise de metilação - código: EAHS-581Z, QIAGEN, GmbH, Hiden, Alemanha). O fluxograma da análise de metilação contendo os resultados em percentagem de metilação estão ilustrados na Figura 10.

Quadro 2 – As vias de estresse e toxicidade e os respectivos genes que foram analisados no estudo de metilação.

Vias funcionais	**Genes**
Stress oxidativo	*BNIP3, CYP1A1, GPX3, PRDX2, PTGS2 (COX2), SCARA3*
Danos ao DNA	*ATM, BRCA1, CCND1, GADD45A, GADD45G, MLH1, MSH2, TP53, XPC*
Resposta à falha na estruturação proteica	*INSIG1, UBE2G2*
Sinalização da hipóxia	*CSTB, RARA*
Proteína de *Heat Schock*	*DNAJC15*
Crescimento e senescência	*ATM, CDKN1A (p21CIP1/WAF1), GADD45A, GDF15 (PLAB), MSH2, TP53.*
Inflamação	*PRDX2, PTGS2 (COX2).*
Antiapoptótica	*BNIP3, CDKN1A (p21CIP1/WAF1), PRDX2.*
Proliferação e carcinogênica	*BRCA1, CCND1, CDKN1A (p21CIP1/WAF1), CYP1A1, PRDX2, PTGS2 (COX2), TP53.*

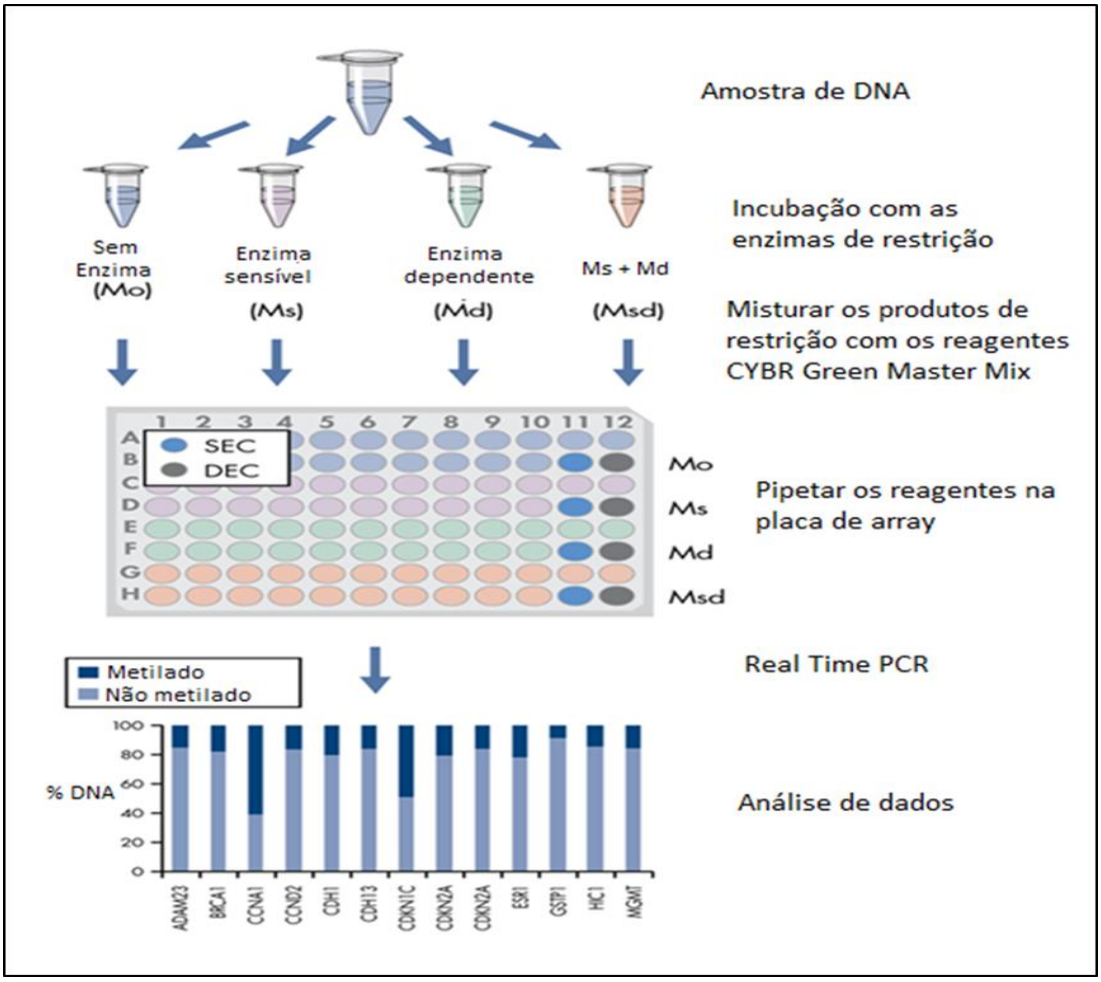


Figura 10 - Fluxograma da análise de metilação do DNA.
Os DNAs foram extraídos a partir dos tecidos de AAA de indivíduos submetidos à cirurgia de correção (n=6) e de doadores de órgãos (n=6). As amostras de DNA obtidas foram tratadas com enzimas de restrição em 4 condições distintas; seguiu-se da adição dos reagentes CYBR® green, amplificação no aparelho de Real Time PCR e análise dos dados no programa estatístico da Qiagen (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha).

3.8 Análise histológica

As amostras da aorta abdominal foram fixadas em solução de formol a 10% tamponado por 24 a 48 horas e, depois, incluídas em blocos de parafina. Os blocos foram seccionados no sentido longitudinal em cortes de 5,0 µm de espessura utilizando-se o micrótomo (*American Optical y Reichert,* New York, EUA). Em seguida, os cortes foram fixados em lâminas e submetidos às seguintes colorações: hematoxilina-eosina, tricrômico de Masson e Verhoef.

Após a coloração, as lâminas foram escaneadas no aparelho *Scanscope CS System (Aperio Tecnologies*, Inc., CA, USA), com objetiva *Olympus UPlanSApo* 20x com especificações 20x/0,75 acoplada ao escâner, gerando arquivos de imagem no formato svs. As imagens digitalizadas foram analisadas por meio do programa *Aperio ImageScope View Software (Aperio Tecnologies*, Inc., CA, USA), uma nova tecnologia que dispensa o uso do microscópio óptico. Esta análise foi feita em colaboração com o Laboratório de Patologia Cardíaca do Instituto do Coração – HC FMUSP. As amostras foram analisadas selecionando-se o algoritmo de macro para marcação nuclear e de membrana documentado pelo *Software Image Scope*. O programa fornece como resultado o percentual da área tecidual total sobre a intensidade de marcação. Nesta pesquisa, foram realizadas as análises histológicas dos tecidos pelo método de Verhoef para marcação das fibras elásticas e pelo método tricrômico de Masson para coloração de fibras colágenas.

3.9 Análise estatística

Para gerenciamento do banco de dados, foi utilizado o programa Excel da *Microsoft Office*, e para execução dos cálculos estatísticos e a elaboração dos gráficos, foram utilizados os programas *Graph Pad Prism* (*California Corporation, CA, EUA*) e IBM SPSS *Statistics for Windows*, versão 20 (IBM *Corporation*, Armonk, NY, EUA). As variáveis categóricas foram apresentadas como números absolutos e relativos, e as variáveis contínuas, apresentadas como média ou mediana, conforme a normalidade da distribuição da amostra avaliada pelo teste *Kolmogorov-Smirnov*. As variáveis contínuas dependentes com distribuição normal foram analisadas pelo teste T pareado, e as amostras que não tinham distribuição normal foram analisadas pelo teste não paramétrico de Friedman.

Para as variáveis contínuas independentes com distribuição normal, a análise foi feita por teste *t de Student*, e as variáveis sem distribuição normal foram analisadas por método não paramétrico de *Mann Whitney* ou *Kruskal Wallis* dependendo do número de grupos a ser analisado. Em todas as análises, o nível de significância considerado foi de 5%.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Dados biodemográficos e clínicos da população de estudo

As características demográficas, clínicas e laboratoriais dos participantes dos grupos CASO (n=14) e CONTROLE (n=36) estão resumidas na Tabela 3. Os dados clínicos e laboratorias dos indivíduos doadores de órgãos sem aneurisma (controle de tecido n=7) foram coletados dos prontuários no setor de captação de órgãos do IDPC e encontram-se registrados no Apêndice A.

Os grupos CASO e CONTROLE revelaram características homogêneas na maioria das variáveis consideradas. No entanto, houve diferença significativa entre os dois grupos em relação ao gênero (p=0,0314), com predomínio dos homens (71,4% para 13%) no grupo CASO, como também em relação à presença de DAC (35,7% para 8,3%; p=0,0304) e à concentração de creatinina sérica (1,3 mg/dl para 0,9 mg/dl; p=0,001). As concentrações de colesterol total e LDL-colesterol séricas foram significantemente mais elevadas no grupo de controle, com p= 0,0191 e p=0,0268, respectivamente.

No grupo CASO, o diâmetro transverso médio dos AAA foi de 5,9 cm, com variação entre 4,8 a 8,0 cm. Apenas três dos 14 participantes apresentaram sintoma de dor abdominal, tendo um deles (diâmetro= 6,0 cm) idade de 85 anos e dois eram do gênero feminino, com idades de 75 e 77 anos, com diâmetros de AAA = 6,4 e 4,8 cm, os quais foram submetidos à cirurgia de emergência. Um indivíduo apresentou quadro de isquemia crítica de membro inferior e AAA com diâmetro = 4,8 cm.

Tabela 3 - Dados biodemográficos e clínicos da população de estudo.

	Grupos de Tratamento		
Variáveis	Cirúrgico (n=14)	Clínico (n=36)	* p < 0,05
Idade (média)	72,6	75,4	0,1557
Gênero (homens)	10 (71,4%)	13 (36,1%)	**0,0314** *
HAS	12 (85,7%)	28 (77,8%)	0,5287
Diabetes	3 (21,4%)	10 (27,7%)	0,6458
Dislipidemias	8 (57,1%)	28 (77,7%)	0,1445
Tabagismo	11 (78,6%)	18 (50%)	0,1099
DAC	5 (35,7%)	3 (8,3%)	**0,0304** *
História familiar de aneurisma	3 (21,4%)	1 (2,8%)	0,0612
IMC (Kg/cm$^{2)}$	26,89	27	0,7134
Medicamentos			
Estatinas	12 (85,7%)	24 (66,6%)	0,2945
IECA	6 (42,8%)	10 (27,7%)	0,3304
BRA	3 (21,4%)	12 (33,3%)	0,5067
β Bloqueador	8 (57,1%)	11 (30,5%)	0,1098
Dados laboratoriais			
Glicemia (mg/dl)	95,2	100,1	0,347
Colesterol total (mg/dl)	155,3	181,2	**0,0191** *
HDL (mg/dl)	48,4	51,8	0,5889
LDL (mg/dl)	79,6	103,9	**0,0268** *
Triglicerides (mg/dl)	138,7	127,1	0,6753
ácido úrico (mg/dl)	5,8	5,4	0,4558
PCR (mg/dl)	0,56	0,66	0,4364
Creatinina (mg/dl)	1,308	0,94	**0,001** *

HAS- hipertensão arterial sistêmica; DAC- doença arterial coronária; IMC- índice de massa corporal; IECA- inibidor da enzima conversora da angiotensina; BRA- bloqueador dos receptores da angiotensina; PCR- proteína C reativa (ultra sensível).

4.2 Perfil de expressão gênica em TECIDOS: AAA vs controle

Para a análise de expressão gênica e de miRNA, foi utilizado o método de arranjos conhecido como qPCR *array*. Esse método consegue discriminar com acurácia diferentes perfis de expressão gênica e miRNA, mesmo em amostras com poucos individuos[128]. Por essa razão, optou-se por estudar um número maior de genes e miRNAs em uma amostra menor (6 indivíduos em cada grupo), porém representativa e bem caracterizada, e, após uma análise e seleção criteriosa de potenciais biomarcadores de AAA, poder realizar, futuramente, a validação desse marcadores numa amostra maior.

Analisou-se, comparativamente, o perfil de expressão gênica em amostras tecidos com (n=6) e sem AAA (n=6), utilizando a qPCR *array* que avalia 84 genes relacionados ao endotélio vascular humano simultaneamente.

Inicialmente, as amostras de RNA extraídos do tecido da aorta foram testadas quanto à expressão de 2 genes endógenos (*ACTB e HPRT1*), eficiência da transcrição reversa (RTC), controle positivo da PCR (PPC), controle negativo da transcrição reversa (NRT), contaminação de DNA genômico (GDC) e controle branco (NTC). Este teste de controle de qualidade se fez necessário devido à exigência do fabricante para garantir resultados fidedignos na análise de expressão gênica pela qPCR *array*. É importante ressaltar que todas as amostras analisadas foram aprovadas no controle de qualidade. Os resultados estão apresentados no Apêndice B.

Os resultados indicaram 4 genes *(SPHK1, TYMP, ALOX5 e HIF1A)* com a expressão significantemente maior nos tecidos com AAA, e outros 6 genes (*PTGIS, CX3CL1, ITGB1, COL18A1, FN1 e AGTR1*) com expressão significantemente menor nos tecidos com AAA, quando comparados com o grupo-controle (Quadro 3). Observamos que o gene *SPHK1* foi quase 6 vezes mais expresso no grupo AAA do que no grupo-controle. Por outro lado, o gene *PTGIS* foi quase 9 vezes menos expresso no AAA do que nos controles.

Quadro 3 – Comparação da expressão gênica dos tecidos da aorta de indivíduos com AAA em relação ao grupo-controle.

Símbolo do gene	Nome do gene	Regulação Positiva (*Folde Change*)	Valor do p <0,05
SPHK1	Sphingosine kinase 1	5,8665	0,008782
TYMP	Thymidine phosphorylase	3,3792	0,011833
ALOX5	Arachidonate 5-lipoxygenase	2,8547	0,011344
HIF1A	Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit	2,3201	0,044185
Símbolo do gene	**Nome do gene**	**Regulação Negativa (*Folde Change*)**	**Valor do p <0,05**
PTGIS	Prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase	-8,7594	0,031336
CX3CL1	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1	-5,0835	0,017486
ITGB1	Integrin, beta 1 (fibronectin receptor)	-4,1626	0,038294
COL18A1	Collagen, type XVIII, alpha 1	-3,1693	0,013109
FN1	Fibronectin 1	-2,9468	0,040659
AGTR1	Angiotensin II receptor, type 1	-2,6193	0,021593

Estão listados os genes regulados positivamente e os genes regulados negativamente, ambos com mudança de regulação (*fold change*) de, pelo menos, 2 vezes. Somente foram listados os genes que tiveram diferença estatisticamente significante (p<0,05).

4.3 Perfil de expressão de miRNAs em TECIDOS: AAA vs controle

Analisou-se, comparativamente, a expressão de 372 miRNAs nos tecidos de AAA com o grupo-controle e todas as amostras testadas tiveram qualidade satisfatória (Apêndice C).

Entre os miRNAs analisados, identificaram-se 59 miRNAs com diferença de expressão no tecido de pacientes com AAA quando comparados ao grupo-controle. Vinte e quatro deles apresentaram expressão aumentada de, pelo menos, 2 vezes (Quadro 4). Os miRNAs hsa-let-7g-3p e hsa-mir-1207-5p apresentaram expressão quase 10 vezes maior no tecido de AAA. Também foram identificados outros 35 miRNAs com a expressão significantemente menor no AAA de, pelo menos, 2 vezes em relação ao CONTROLE. É interessante observar que a expressão de hsa-mir-23b-3p foi 20 vezes menor nos tecidos de indivíduos com AAA. A comparação das mudanças de regulação (*fold change*) entre os grupos foi realizada por teste t não pareado, e somente os miRNAs que tiveram diferenças estatisticamente significantes (p<0,05) com mudanças de regulação ≥ 2 foram apresentados no Quadro 4.

Quadro 4 – MiRNAs diferentemente expressos no tecido de indivíduos com AAA em relação ao grupo-controle

miRNAs	regulação positiva (*fold change*)	miRNAs	regulação negativa (fold change)
hsa-let-7g-3p	9,85	hsa-let-7a-5p	-2,02
hsa-miR-1207-5p	9,27	hsa-let-7c-5p	-2,14
hsa-miR-142-3p	7,2	hsa-miR-100-5p	-2,75
hsa-miR-144-5p	5,54	hsa-miR-125a-5p	-2,7
hsa-miR-150-5p	7,5	hsa-miR-125b-5p	-3,52
hsa-miR-155-3p	3,54	hsa-miR-133a-3p	-9,33
hsa-miR-15b-3p	4,58	hsa-miR-133b	-7,95
hsa-miR-16-5p	2,16	hsa-miR-140-3p	-4,55
hsa-miR-181a-3p	4,58	hsa-miR-140-5p	-2,96
hsa-miR-182-5p	3,34	hsa-miR-143-3p	-7,31
hsa-miR-200c-3p	2,08	hsa-miR-143-5p	-9,2
hsa-miR-212-3p	2,09	hsa-miR-145-5p	-7,15
hsa-miR-29a-5p	2,98	hsa-miR-145-3p	-5,42
hsa-miR-31-5p	6,08	hsa-miR-193a-3p	-2,58
hsa-miR-338-3p	4,87	hsa-miR-193a-5p	-3,12
hsa-miR-34b-3p	2,05	hsa-miR-193b-3p	-3,11
hsa-miR-34c-5p	2,53	hsa-miR-193b-5p	-2,51
hsa-miR-363-3p	3,28	hsa-miR-196b-5p	-4,73
hsa-miR-378a-3p	2,05	hsa-miR-23a-3p	-2,07
hsa-miR-378a-5p	2,19	hsa-miR-23b-3p	-20,83
hsa-miR-425-5p	2,32	hsa-miR-23b-5p	-2,67
hsa-miR-451a	5,61	hsa-miR-24-3p	-2,31
hsa-miR-454-3p	3,09	hsa-miR-27b-3p	-3,67
hsa-miR-542-5p	2,62	hsa-miR-27b-5p	-5,24
		hsa-miR-28-3p	-2,32
		hsa-miR-28-5p	-2,15
		hsa-miR-29b-2-5p	-2,69
		hsa-miR-328-3p	-3,78
		hsa-miR-331-5p	-4,52
		hsa-miR-365b-3p	-3,11
		hsa-miR-504-5p	-5,96
		hsa-miR-574-3p	-2,16
		hsa-miR-744-5p	-2,62
		hsa-miR-99a-3p	-2,8
		hsa-miR-99b-5p	-3,22

Estão listados os miRNAs com expressão regulada positivamente e os regulados negativamente. A expressão de miRNAs foi analisada por *Human miFinder 384HC miScript miRNA PCR Array* (MIHS-3001Z, QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha) e calculou-se o número de vezes de mudança de regulação *(fold change)* por método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, utilizando-se a plataforma estatística da Qiagen®.

4.4 Perfil de expressão de miRNAs em PLASMA: AAA vs controle

Analisou-se, comparativamente, o perfil de expressão de miRNAs circulantes entre amostras de plasma de indivíduos do grupo CASO e do grupo-controle. Das 6 amostras de plasma obtidas do grupo CASO, apenas 3 foram aprovadas no teste de controle de qualidade, com PPC-miRTC ≥ 7,0, mas foram suficientes para dar prosseguimento à análise (Apêndice C). O número de miRNAs diferentemente expressos entre os dois grupos foi muito menor no plasma do que no tecido da aorta.

Foram identificados oito miRNAs significantemente mais expressos ($p<0,05$) no plasma do grupo de indivíduos com AAA, entre eles, destaca-se o miR-328-3p, cuja expressão foi quase 24 vezes mais elevada (Quadro 5). Os resultados também apontaram 9 miRNAs com expressão significantemente menor, entre eles, let-7c-5p, let7d-5p e miR-139-5p, os quais apresentaram expressões entre 10 e 15 vezes menores no plasma dos indivíduos com AAA.

Quadro 5 - MiRNAs diferentemente expressos no plasma de indivíduos com AAA em relação ao grupo-controle

miRNAs	regulação positiva (*fold change*)	miRNAs	regulação negativa (fold change)
hsa-miR-127-3p	3,62	hsa-let-7c-5p	-15,99
hsa-miR-184	5,11	hsa-let-7d-5p	-11,55
hsa-miR-328-3p	23,96	hsa-miR-10a-5p	-4,98
hsa-miR-370-3p	5,52	hsa-miR-139-5p	-14,45
hsa-miR-421	4,81	hsa-miR-192-5p	-5,48
hsa-miR-489-3p	3,47	hsa-miR-29b-3p	-8,45
hsa-miR-490-3p	6,19	hsa-miR-361-5p	-5,57
hsa-miR-661	5,21	hsa-miR-486-3p	-3,19
		hsa-miR-491-5p	-2,74

Estão listados os miRNAs com a expressão regulada positivamente e os regulados negativamente. A expressão de miRNAs foi analisada por *Human miFinder 384HC miScript miRNA PCR Array* (MIHS-3001Z, QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha) e calculou-se o número de vezes de mudança de regulação *(fold change)* por método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando a plataforma estatística da Qiagen®.

4.5 Perfil de metilação em TECIDO: AAA vs controle

Analisou-se o grau de metilação de DNA da região promotora de 22 genes relacionados a estresse oxidativo e toxicidade nos tecidos de AAA comparados com o grupo-controle de tecido. Os resultados detalhados contendo percentagem de DNA metilado e não metilado de cada gene em cada indivíduo estão apresentados no Apêndice D.

Os nossos dados indicaram que a maioria dos genes analisados (21/22 ou 95,5%) se encontra no estado não metilado, tanto nos tecidos com AAA quanto no controle. A Figura 11 mostra que somente o gene *GDF15* (*Growth differentiation factor 15*), o fator 15 de crescimento e diferenciação, está significantemente mais metilado no grupo AAA (p=0,0006).

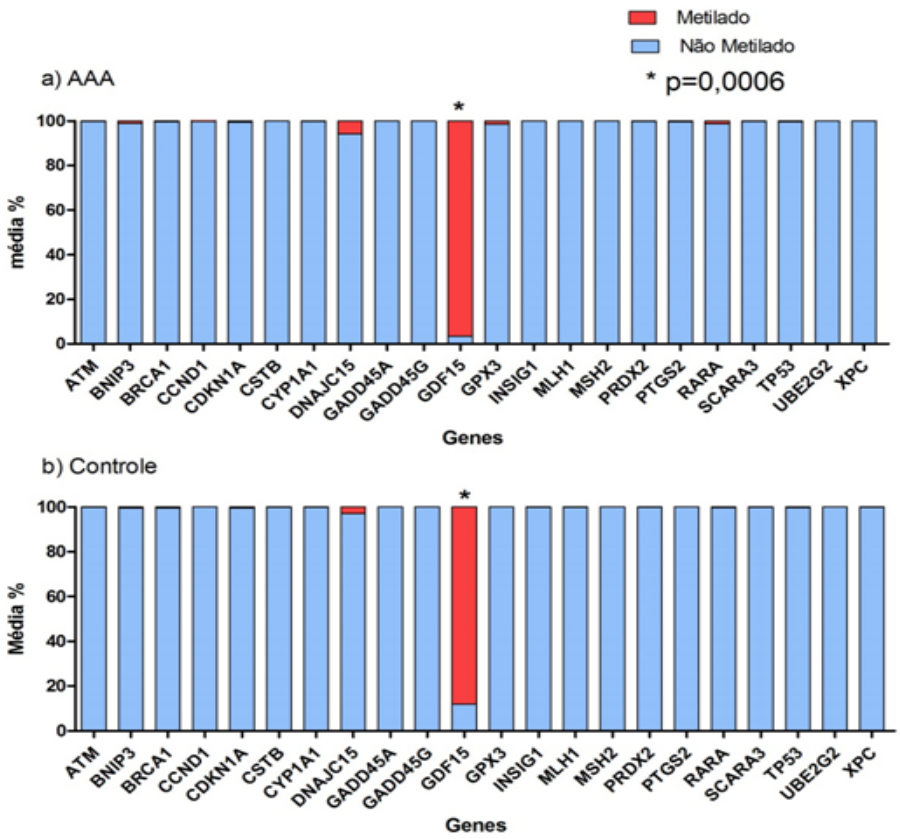


Figura 11 - Comparação do grau de metilação de DNA entre os tecidos com AAA e os controles.

Grau de metilação de DNA em 22 genes relacionados com estresse e toxicidade do EpiTect Methyl II, EAHS-581Z (QIAGEN, GmbH, Hiden, Alemanha), no grupo de aneurisma da aorta abdominal (AAA) e controle. A análise comparativa do grau de metilação foi feita por teste não paramétrico de Mann-Whitney (α=0,05). * indica o gene com grau de metilação significantemente diferente entre os grupos (p=0,0006).

4.6 Análise histopatológica

4.6.1 Coloração pelo método de Verhoeff para fibras elásticas

Realizou-se a coloração de Verhoeff para avaliar as fibras elásticas nos tecidos com AAA (casos) e aorta sem aneurisma (controles).

A Tabela 4 apresenta a percentagem individual e média de marcação em área total, e em 1mm da camada média-íntima e adventícia da aorta. Os resultados indicaram presença significantemente menor de fibras elásticas nos tecidos com AAA, tanto na camada média-íntima (44,6% vs 17,5%, p=0,0022) quanto na adventícia (46,4% vs 9,7%, p=0.0003).

Tabela 6 - Resultados da coloração pelo método de Verhoeff para detectar fibras elásticas.

Número da amostra	Média-íntima total (%)		1mm Média-intima (%)	
	Casos	Controles	Casos	Controles
1	3,70	13,79	1,40	15,65
2	1,70	10,75	1,60	9,98
3	3,30	6,80	1,20	2,49
4	1,40	9,31	0,70	13,20
5	2,50	24,59	0,33	25,80
6	0,40	34,69	0,40	34,85
7	1,20	22,77	0,83	18,02
8	0,90	–	0,85	–
Média (%)	1,89	17,53	0,91	17,14
α = 0.05	p = 0.0003		p = 0.0003	

As imagens digitalizadas foram analisadas no programa *Aperio ImageScope View Software (Aperio Tecnologies*, Inc., CA, USA).
Os resultados estão apresentados em percentagem, individualmente e em média do grupo, referente à área total e 1mm do tecido.

4.6.2 Coloração pelo método Tricrômico de Masson para fibras colágenas

O método Tricrômico de Masson foi utilizado para identificação de fibras colágenas. Na comparação dos resultados de marcação entre os tecidos com AAA (casos) e sem AAA (controles), não foi observada diferença significante na quantidade de fibras colágenas, tanto na camada

média-íntima (35,6% vs 34,3%, p=1,00) quanto na camada adventícia da aorta (19,3% vs 26,7%, p=0,2810).

Tabela 7 - Resultados da coloração pelo método Tricrômico de Masson para detectar as fibras colágenas.

Número da amostra	Média-íntima total (%)		1mm Média-intima (%)		Adventícia total (%)		1mm de Adventícia (%)	
	Casos	Controles	Casos	Controles	Casos	Controles	Casos	Controles
1	31,32	34,08	32,55	27,10	12,32	17,07	13,66	14,93
2	17,88	51,64	14,71	47,58	5,77	32,81	2,85	40,92
3	55,32	39,93	56,62	61,70	26,83	34,82	35,00	41,12
4	50,23	22,87	46,57	26,31	38,54	23,28	46,51	24,90
5	59,92	19,76	64,07	19,84	17,32	13,50	15,64	6,73
6	9,13	23,70	8,01	27,53	24,53	20,88	22,98	17,67
7	19,38	48,19	12,05	54,70	11,15	44,86	12,42	50,78
8	41,60		41,94		18,30		14,32	
Média (%)	35,60	34,31	34,57	37,82	19,35	26,75	20,42	28,15
α = 0.05	p = 1.00		p = 0.7789		p = 0.2810		p = 0.2810	

As imagens digitalizadas foram analisadas no programa *Aperio ImageScope View Software (Aperio Tecnologies*, Inc., CA, USA).
Os resultados estão apresentados em percentagem, individualmente e em média do grupo, referente à área total e 1mm do tecido.

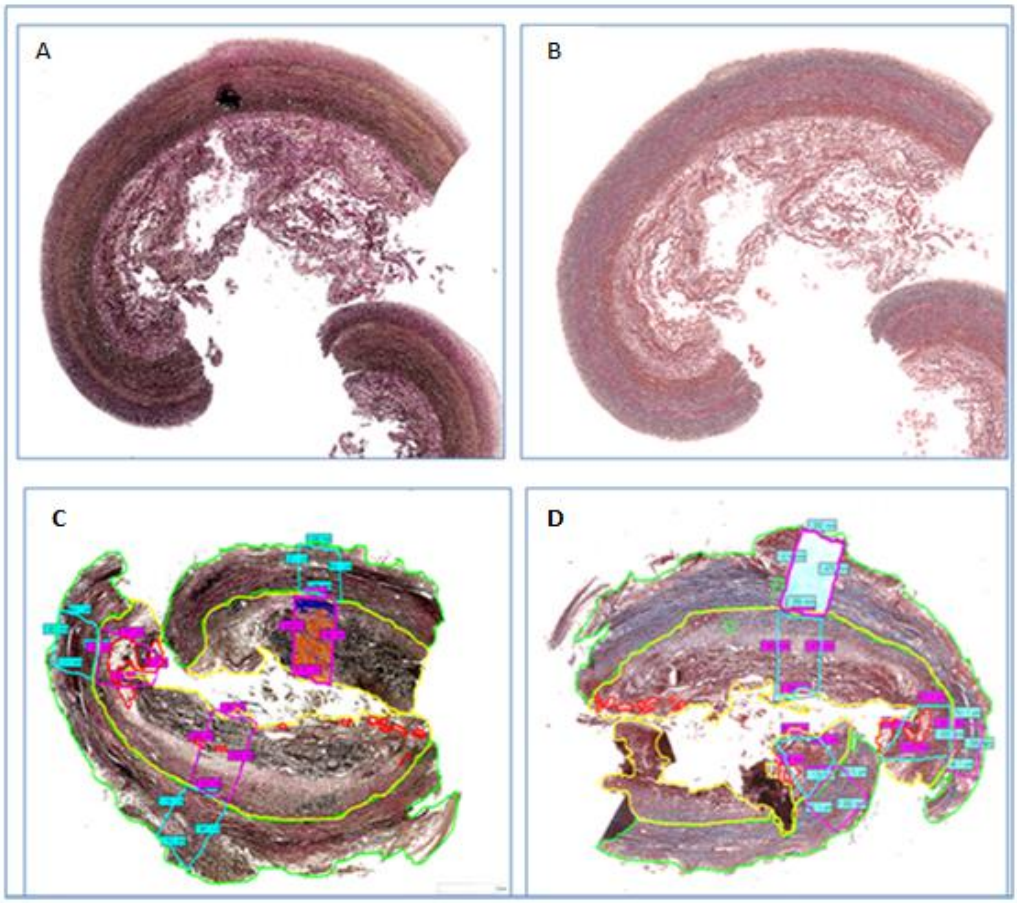


Figura 12 - Imagens histológicas de tecido-controle e tecido com AAA.
A e B- Tecido-controle - notam-se as camadas da parede arterial bem definidas: A) marcação de fibras elásticas (cor preta) e B) marcação de fibras colágenas (cor azul). C e D

Tecido com AAA - nota-se desorganização das camadas da parede arterial: C) marcação de fibras elásticas e D) marcação de fibras colágenas. As imagens digitalizadas foram analisadas no programa *Aperio Image Scope View Software* (*Aperio Tecnologies*, Inc., CA, USA).

4.7 Análise funcional utilizando o program IPA *Ingenuity®*

Foi utilizado o *software Ingenuity Pathway Analysis®* (IPA) (http://www.ingenuity.com/) para predição da relação entre os genes, e os miRNAs identificados nos tecidos de AAA e controles, cujas expressões foram significantemente maiores ou menores de, pelo menos, 2 vezes. Esse programa utiliza algoritmos com base nas literaturas publicadas e indexadas em principais bancos de referências, ou seja, os genes ou miRNAs e as relações ainda não descritas não aparecerão na análise.

Na análise, foram incluídos 10 genes (Quadro 3) e 59 miRNAs (Quadro 4) diferentemente expressos no TECIDO do nosso estudo. Além disso, foram adicionados à figura os genes *LTB4R e APOE*, os quais conhecidamente foram associados com AAA[129,130]. As interações diretas (linhas completas) e indiretas (linhas pontilhadas) entre os genes e os miRNAs são apresentados na Figura 13.

Por meio dessa figura, pode-se observar que a análise de predição esteve compatível com a grande maioria dos achados diferenciais de expressão gênica encontrados no presente estudo. Houve concordância de ativação com a expressão dos genes *ALOX5 e SPHK1,* enquanto houve concordância de inibição com os genes *AGTR1, FN1, ITGB1, PTGIS e CX3CL1.* A expressão gênica de *COL18A1 e HIF1A* não foi concordante com a análise de predição realizada, ao mesmo tempo em que o gene *TYMP* não apresentou relações com as moléculas adicionadas na figura e não foi demonstrado.

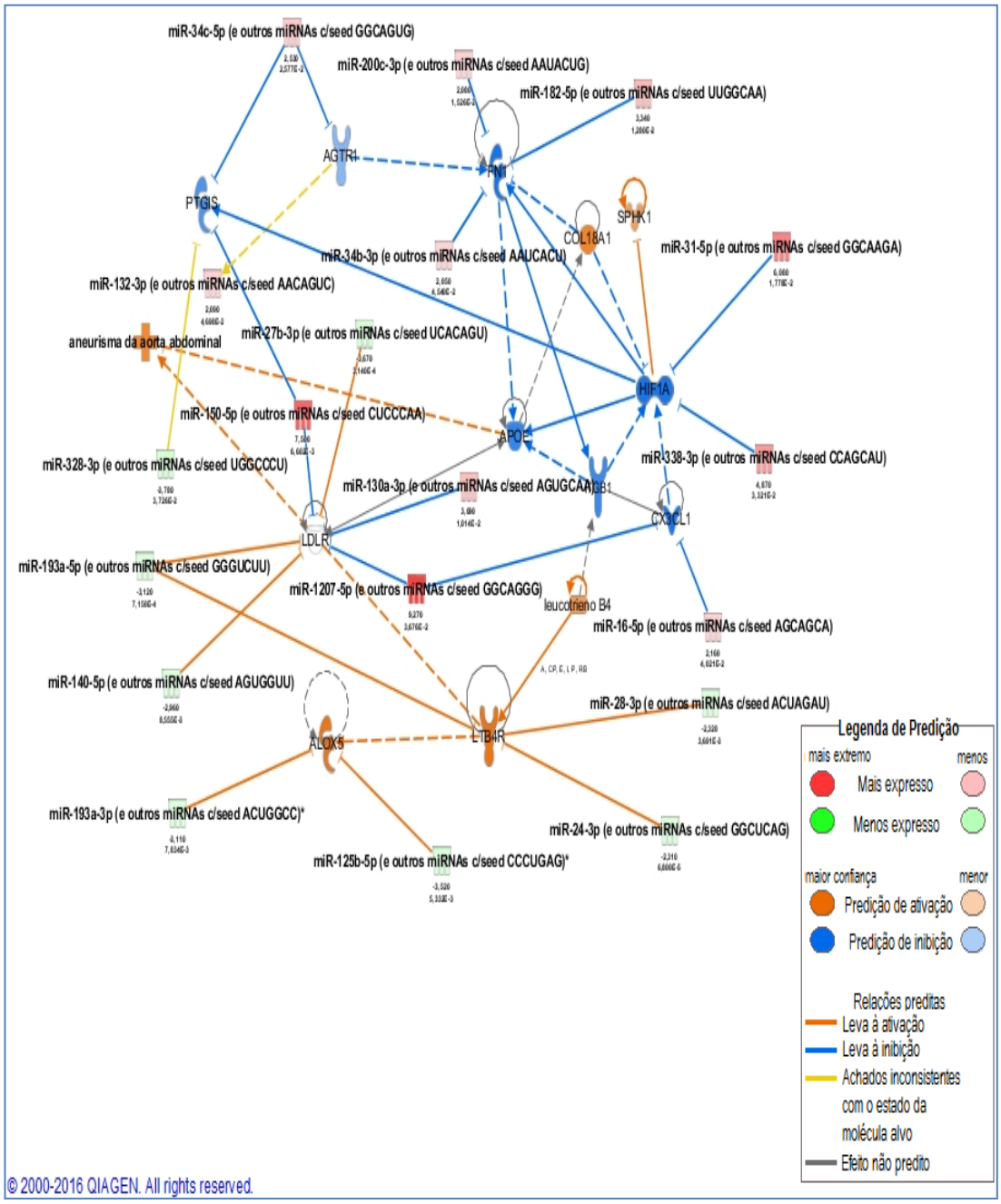


Figura 13 - A interação entre os genes e miRNAs diferentemente expressos no tecido de pacientes com AAA.

Foi realizada predição por meio do *software Ingenuity Pathway analysis®* (IPA) (http://www.ingenuity.com/). Os genes marcados em cor azul (*PTGIS, AGTR1, FN1, ITGB1, HIF1A, CX3CL1 e APOE*) indicam inibição e os genes marcados em cor laranja (*COL18A1, ALOX5, SPHK1 e LTB4R*) indicam ativação. Os miRNAs marcados em cor verde são os menos expressos e os miRNAs marcados em tons diferentes de vermelho são os mais expressos.

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

O tratamento convencional do AAA em risco de ruptura é a cirurgia reparadora, que consiste em inserção de um enxerto intraluminal via acesso aberto até a aorta aneurismática. Recentemente, a cirurgia convencional tem sido substituída por procedimentos endovasculares, mas ambos os métodos apresentam riscos operatórios e parecem ser eficazes apenas na prevenção de ruptura aórtica[4]. Até o momento, nenhuma abordagem alternativa foi identificada como eficaz na limitação da progressão do AAA em seres humanos. O que falta, atualmente, é uma compreensão detalhada dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desencadeamento e na evolução de AAA. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo identificar genes e os mecanismos epigenéticos envolvidos na regulação da patogênese do AAA, na busca de alvos moleculares para a prevenção, o monitoramento e o tratamento da doença.

A caracterização da população de estudo é primordial para qualquer pesquisa. No presente estudo, a população avaliada é bastante homogênea em vários aspectos, exceto em algumas variáveis, tais como predomínio de gênero masculino no grupo CASO. Esse dado está de acordo com a literatura, que também aponta o predomínio do gênero masculino e de DAC em indivíduos com AAA[19].

Quanto à prevalência de dislipidemias, o grupo-controle foi maior (77,7%) em comparação ao grupo CASO (57%), provavelmente atribuído ao maior uso de estatina por este grupo (85,7% versus 66,6%), medida recomendada pelas diretrizes no controle dos fatores de risco para doenças cardiovasculares, dentre elas, o AAA[126].

A creatinina sérica mostrou diferença significativa (p=0,001) entre os dois grupos, cujos níveis mais elevados foram registrados no grupo CASO, possivelmente, refletindo maior carga de doença sistêmica aterosclerótica nesse grupo.

O tabagismo, principal fator de risco para AAA, foi mais prevalente no grupo CASO (78,6% para 50%), concordando com a maioria dos estudos, apesar de não apresentar significância estatística (p=0,1099), o que pode ser em razão do tamanho pequeno da amostra[41].

No presente trabalho, utilizou-se o sistema de arranjos (*array*) para a análise de metilação de DNA, de expressão gênica e de miRNAs, com o propósito de analisar, simultaneamente, o maior número possível de genes e miRNA.

Nos experimentos de expressão gênica, foram analisados 84 genes relacionados à função do endotélio vascular humano, dos quais quatro foram significantemente mais expressos no tecido com AAA quando comparado ao tecido sem AAA (*SPHK-1, TYMP, ALOX5 e HIF1A*). Esses genes estão relacionados com os processos de angiogênese, inflamação, apoptose e remodelamento vascular.

- O gene ***SPHK-1*** codifica para a esfingosina cinase-1, cuja função é fosforilar a esfingosina para formar o fosfato de esfingosina-1, um potente lipídio que atua na sinalização intra e extracelular via TNFα e NFkB, modulando a resposta inflamatória, apoptose e angiogênese. Além disso, Munzer e colegas mostraram em modelos de *knockout* que a esfingosina cinase-1 regula negativamente a ativação plaquetária e a formação de trombos[131].
- O gene ***TYMP*** codifica para uma enzima chamada timidina fosforilase (TP) que tem função importante no metabolismo de nucleotídeos. Essa enzima é um alvo molecular para o desenho de inibidores enzimáticos com possível uso na terapia do câncer, visto que essa enzima se encontra superexpressa em alguns tipos de tumores sólidos e sua atividade catalítica é essencial para promoção da angiogênse[132,133]. Haraguchi e colaboradores[134] mostraram que a TP é essencial no processo de angiogênese e a sua ação é inibina na presença de 6-amino-5-clorouracil, um

inibidor de TP, sugerindo que é necessária a atividade enzimática de TP na angiogênese.

Tem sido descrito também que a TP tem um efeito semelhante ao fator de crescimento de células endoteliais derivado de plaquetas (PD-ECGF). Embora o mecanismo de ação da TP na angiogênese ainda não seja conhecido, os dados da literatura mostram que a TP não é um fator de crescimento, mas, indiretamente, participa da angiogênese por meio da quimiotaxia de células endoteliais e outras células[135]. Por outro lado, Li e colaboradores[136] mostraram que a expressão aumentada de TP regula positivamente *heme oxygenase* (HO)-1 e, consequentemente, o aumento de p27(KIP1) em cultura de células musculares lisas do vaso inibindo, assim, a migração e proliferação dessas células *in vitro* e *in vivo*. Os mesmos autores afirmam que a TP representa um alvo promissor para tratamento de doenças obstrutivas do vaso.

- O gene ***HIF1A*** codifica para um fator de crescimento induzido pela hipóxia (FIH-1α). O aumento da transcrição desse fator pelas células endoteliais em resposta à isquemia aumenta a produção de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e o seu receptor (VEGF-R) e, por consequência, a ativação do endotélio vascular[137]. Em placa de aterosclerose, a transcrição do fator FIH-1α foi associada ao fenótipo inflamatório da placa e com alta expressão do VEGF. FIH-1α também está mais expresso em macrófagos ativados[138], podendo contribuir para angiogênese, inflamação e apoptose.
- O gene ***ALOX5*** codifica a 5-lipoxigenase que tem papel importante na síntese de leucotrienos a partir do ácido araquidônico, e sabe-se que os leucotrienos são mediadores inflamatórios potentes. Bhamidipati e colegas[130], por meio dos resultados observados em modelos de knockout, concluíram que a inibição de 5-lipoxigenase por agentes farmacológicos ou abordagens genéticas atenua a

progressão do aneurisma e previne a fragmentação da camada média da aorta. Alvos terapêuticos focando na via da 5-lipoxigenase podem ter potencial no tratamento de AAA.

Dos genes que tiveram a expressão significantemente menor nos tecidos com AAA, destacam-se o *PTGIS, CX3CL1, ITGB1, COL18A-1, FN1 e AGTR1,* cujas funções são descritas a seguir resumidamente.

- O gene ***PTGIS*** codifica para a enzima que participa da via do citocromo P450 envolvido em síntese de colesterol, esteroides e outros lípides. Esse gene também cataliza a conversão de prostaglandina H2 para prostaciclina (prostaglandina I2), um potente vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária.
- Gene ***CX3CL1****,* codifica para uma proteína quimiotática para células T e monócitos, regula adesão e migração dessas células.
- Gene ***ITGB1****,* codifica para uma integrina de adesão celular, regula a hemostasia e reparo tecidual.
- Gene ***COL18A1***, codifica para uma proteína constitutiva da matriz extracelular.
- *Gene* ***FN1****,* codifica para a fibronectina, presente na superfície celular e matriz extracelular que está envolvida na adesão celular, migração, cicatrização e coagulação.
- *Gene* ***AGTR1****,* diminui receptor para angiotensina, consequentemente, pode afetar pressão e volume sanguíneos.

Vale ressaltar que existem poucos trabalhos nos quais esses genes foram descritos no contexto do AAA, porém, os resultados do presente trabalho sugerem que uma deficiência das moléculas codificadas por esses genes pode contribuir para um pior prognóstico do AAA.

Para a análise de expressão de miRNA no tecido e no plasma, foi utilizada uma placa comercial que permitiu avaliar a expressão simultânea

de 372 miRNAs abundantemente expressos na maioria dos tecidos e fluidos, e bem caracterizados no banco de dados miRBase (www. miRNase.org).

Na análise de expressão em amostra de tecido, 24 miRNAs foram significantemente mais expressos e 35 miRNAs menos expressos no grupo com AAA, dos quais se destaca o miR-23b, que foi quase 21 vezes menos expresso nos tecidos com AAA (Quadro 3). Nas amostras de plasma, 8 miRNAs foram mais expressos e outros 9 miRNAs menos expressos no grupo CASO, sendo o miR-328-3p o que apresentou a expressão mais significativa, com um aumento de quase 24 vezes em indivíduos com AAA (Quadro 4).

Quando se comparou o perfil de expressão dos miRNAs em amostras de tecido e plasma, somente os miRNAs miR-328-3p e let-7c-5p foram diferentemente expressos entre os grupos de estudo em ambas as amostras.

O miR-328-3p, cuja expressão estava 24 vezes mais elevada no grupo CASO em amostra de plasma, em amostra de tecido com AAA, teve a expressão consideravelmente reduzida (-3,78 vezes) quando comparada ao grupo-controle. Essa relação entre os níveis de expressão de miRNA no tecido e no plasma tem sido bastante polêmica. Kin e colaboradores observaram que os miRNAs com superexpressão no tecido de AAA apresentaram baixa expressão no plasma, por exemplo, miR-15a, 15 b, 124a, 223, 21, 29b, 155 e 146a[95]. Isso pode refletir que a expressão desses determinados miRNAs é importante para a regulação de mecanismos inerentes à(ao) própria(o) célula/tecido alvo do estudo, ou seja, que esses miRNAs são tecido-específicos.

O miR-328-3p é um dos microRNAs circulantes derivado das plaquetas que, até o presente, não foi correlacionado com AAA. Estudos revelam a associação do miR-328 com diagnóstico precoce de IAM, mortalidade em 6 meses ou desenvolvimento de insuficiência cardíaca pós-IAM, e é considerado biomarcador dessas condições clínicas[139]. Também há registro de associação do miR-328 com remodelamento dos átrios e vulnerabilidade para fibrilação atrial[140]. O miR-328 tem como alvo centenas de genes[141] que

atuam no processo inflamatório e sinalização celular (*CD44*), despolarização dos miócitos (*CACNA1C e CACNB1*), função vascular (*ABCG2*) e envelhecimento celular (H2AFX)[142].

Por outro lado, o miR-let-7c-5p, pertencente à família miR-let-7, apresentou o mesmo padrão de expressão em amostra de tecido e plasma do grupo AAA, com uma redução de 2,14 e 16 vezes, respectivamente.

Kin e colaboradores[95] realizaram trabalho semelhante ao nosso, comparando a expressão de miRNAs no tecido de AAA aterosclerótico e no plasma. Além da diferença metodológica, eles usaram o tecido da aorta torácica como controle, enquanto nós usamos aorta abdominal de doadores. Por isso, acredita-se que esse pode ser um viés importante a ser considerado.

Quanto ao perfil de miRNAs no plasma, Kin e colaboradores analisaram 23 indivíduos com AAA, 17 com DAC e 12 voluntários saudáveis. Alguns dos resultados encontrados por eles estão em concordância com os nossos resultados, enquanto outros são divergentes. Um dos resultados concordantes foi em relação aos membros da família do miR-let-7, relacionados com a função endotelial, os quais apresentaram expressão aumentada no tecido de AAA. Em nossos resultados, o miR-let-7g-3p expressou quase 10 vezes mais no tecido com AAA. Entretanto, outros membros da mesma família, o miR-let-7a-5p e miR-let-7c-5p, foram, no mínimo, duas vezes menos expressos no tecido com AAA. Provavelmente, as subfamílias de miR-let-7 têm alvos diferentes de regulação, consequentemente, participam em vias diferentes de remodelamento do AAA.

Quando se analisou a expressão de miRNA em amostras de tecido separadamente, o miRNA com destaque nos nossos resultados foi o miR-23b-3p que faz parte de uma famíla composta pelos miRNAs miR-23b, miR-24-a e miR-27b, os quais têm as funções descritas na angiogênese cardíaca pós-infarto, na sobrevida dos cardiomiócitos e no câncer. Tanto em modelos animais de AAA como em humanos, essa família de miRNAs apresentou baixa regulação e foi relacionada com progressão do aneurisma,

principalmente o miR-24[82]. Nossos resultados mostraram que a expressão de miR-23b-3p foi vinte vezes menor no tecido de AAA, assim como todos os membros da família, miR-23, 24 e 27, que também apresentaram baixa expressão significante no tecido aneurismático.

Pesquisa recente também mostrou que, logo após a lesão do vaso, há regulação negativa da expressão do miR-23b, resultado concordante com o observado em nosso estudo. O aumento da expressão do miR-23b inibe a proliferação das células musculares lisas do vaso e a formação neointimal após injúria vascular *in vivo*[143].

Além do miR-23b, os nossos resultados revelaram outros miRNAs com baixa expressão significativa nos tecidos de AAA: o miR-143-3p (-7,31 vezes), miR-143-5p (-9,2 vezes), miR-145-5p (-7,15 vezes) e miR-145-3p (-5,42 vezes). A literatura mostrou que a expressão aumentada dos miR-143/145 nas células endoteliais exerce papel ateroprotetor[144]. Em nossos amostras, houve baixa expressão dos miRNAs -143/145, o que parece favorecer o desenvolvimento da aterosclerose. Esses miRNAs são citados na literatura entre os envolvidos no remodelamento vascular e no aneurisma de aorta[110,111].

Em nossa pesquisa, os miRNAs miR-125a-5p, miR-125b-5p e o miR-365 apresentaram baixa expressão significativa nos tecidos de AAA, refletindo o envolvimento desses miRNAs no processo aterosclerótico do AAA. No cenário da aterosclerose, os miR-125a-5p, miR-125b-5p e o miR-365 foram identificados com baixa expressão em modelos de formação neointimal, em resposta à injúria vascular[89]. Entre esses miRNAs, o miR-125a-5p é reconhecido por seu papel antiaterogênico no macrófago e aumenta a sua expressão em resposta à LDL oxidada[96].

O miR-155-3p, relacionado com inflamação, apresentou-se 3,5 vezes mais expresso no tecido de AAA em nosso trabalho, concordando com os dados da literatura[95].

O miR-29b, relacionado com fibrose, foi observado por Kin e colaboradores no tecido de AAA com expressão aumentada(95), o que divergiu de outros autores[94], inclusive do nosso estudo, em que observamos

diminuição de 2,7 vezes na expressão de miR-29b-2-5p no tecido de AAA. Esse resultado divergente pode ser explicado pelo emprego de aorta torácica para controle de tecido, enquanto nós empregamos tecido de aorta abdominal sem AAA de doadores de órgãos. Sabe-se que as células musculares lisas são de origem embrionária diferente ao longo do trajeto da aorta, o que pode explicar a diferença encontrada em nossos resultados.

Nossos resultados revelaram outro membro da família, o miR-29a-5p, que foi quase 3 vezes mais expresso no tecido com AAA, quando comparado ao grupo-controle. Portanto, observamos os membros da mesma família miR-29 com diferentes comportamentos de expressão no mesmo tecido examinado. Os resultados observados com a família do miR-29 seriam a evidência de que ela tem como alvo, pelo menos, 16 genes da MEC, tais como o *COL1A1, COL1A2, COL3A1, FBN1* e *ELN*, que estão envolvidos no remodelamento da MEC de diversos órgãos[84,111].

No trabalho de Keiwa e colegas, o miR-15b e o miR-15a estavam superexpressos no tecido de aorta com AAA e com baixa expressão no plasma. Nossos resultados revelaram que o miR-15b-3p estava 4,58 vezes mais expresso no tecido com AAA, quando comparado ao grupo-controle, e não foi expresso no plasma do mesmo grupo. O miR-15 está relacionado com apoptose e o miR-195, envolvido no remodelamento vascular e aneurisma aórtico[93], fazem parte da mesma família.

Outro trabalho semelhante ao nosso realizado por Pahl e colaboradores[128] comparou tecido de aorta abdominal com aneurisma (n=5) e tecido de aorta abdominal sem aneurisma captado de doadores de órgãos (n=5) utilizando *microarray* contendo 847 miRNAs. Foram selecionados oito miRNAs que mostraram diferenças significativas para validação por qRT-PCR. Os autores identificaram quatro de cinco miRNAs validados relacionados com apoptose, os quais podem estar envolvidos na perda de células musculares lisas de AAA: o miR-133a, 133b, 331-3p e 204, todos apresentando baixa expressão no tecido aneurismático. Nós observamos que o miR-133a-3p e o miR-133b apresentaram-se, respectivamente, 9,33 vezes e 7,95 vezes menos expressos no tecido aneurismático, com alta

significância estatística. Nossos resultados estão de acordo com os dados obtidos por Pahl e colegas, que utilizaram os tecidos de aorta da mesma origem embrionária, tal como aplicamos em nossa pesquisa.

Em recente revisão sobre o papel dos miRNAs no AAA, o miR-181b foi citado, não por evidências de sua participação direta na patogênese dos aneurismas, mas pelo seu papel na inibição do processo inflamatório vascular, na aterosclerose, e, possivelmente, no desenvolvimento do AAA[94]. Em nossos resultados, outro membro da família do miR-181, o miR-181a-3p, apresentou–se 4,58 vezes mais expresso no tecido com AAA, quando comparado ao tecido de aorta sem aneurisma, de acordo com o estudo de Pahl e colegas, que também constataram alta expressão do miR-181a no tecido de AAA[128].

O *software Ingenuity* foi utilizado para a predição da relação entre os genes e os miRNAs diferentemente expressos entre os grupos CASO e CONTROLE nas amostras de tecidos de aorta. Na análise, foram incluídos os 10 genes (Quadro 3) e 59 miRNAs (Quadro 4) diferentemente expressos nas amostras de TECIDO, e cujas expressões foram significantemente maiores ou menores, pelo menos, 2 vezes em relação ao controle. Além disso, foram adicionados à figura os genes *LTB4R e APOE*, os quais, conhecidamente, foram associados com AAA[129,130].

Houve concordância de ativação com a expressão dos genes *ALOX5 e SPHK1,* enquanto houve concordância de inibição com os genes *AGTR1, FN1, ITGB1, PTGIS e CX3CL1.* A expressão gênica de *COL18A1 e HIF1A* não foi concordante com a análise de predição realizada, ao mesmo tempo em que o gene *TYMP* não apresentou relações com as moléculas adicionadas na figura e não foi demonstrado.

O gene *SPHK1* (*sphingosine kinase 1)* destacou-se entre os 10 genes por apresentar-se quase 6 vezes mais expresso no tecido de AAA do que nos controles. Na análise pelo sistema Ingenuity, o gene *SPHK1* não foi alvo de nenhum dos 59 miRNAs diferentemente expressos em nossa pesquisa, porém, mostrou-se como alvo de *HIF1A,* que pode estar sendo regulado e, consequentemente, alterar a expressão de *SPHK1* (Figura 13).

Quanto ao gene *ALOX5* (*arachidonate 5-lipoxygenase*), que apresentou expressão aumentada em 2,85 vezes no nosso resultado, observamos interação direta e negativa dos miR-193a-3p (2,58 vezes), e miR-125b-5p (3,52 vezes) sobre esse gene, ou seja, baixa expressão desses miRNAs favorece a transcrição do gene *ALOX5* (Figura 13).

O gene *ALOX5* é um membro da família das lipoxigenases e está envolvido na síntese de leucotrienos do ácido araquidônico. Os leucotrienos são mediadores de diversos processos inflamatórios e alérgicos, estando associados a algumas condições clínicas como asma, aterosclerose e diversos tipos de câncer[145], e existem algumas publicações na área do AAA[146-148]. A expressão bastante aumentada do miR-125a-5p foi observada em cultura de células mononucleares tratadas com LDL oxidada, e a função desse miRNA foi mediar aporte de lípides e modular a secreção de citocinas inflamatórias[96]. A alta expressão do miR-193 circulante contribui para maior grau de fibrose do miocárdio em pacientes com cardiomiopatia hipertrófica[149]. Os nossos resultados revelaram baixa expressão desses dois miRNAs nos tecidos do AAA, o que parece favorecer a atividade inflamatória e aterosclerótica do gene *ALOX5 c*ontribuindo para a patogênese do AAA.

No nosso resultado, o gene *PTGIS* apresentou expressão quase nove vezes mais baixa nos tecidos de AAA do que nos controles. Este gene codifica um membro da família de enzimas do citocromo P450, que é uma proteína da membrana do retículo endoplasmático que cataliza a conversão da prostaglandina H2 para prostaciclina (prostaglandina I2), reconhecidamente um dos mais potentes vasodilatadores e inibidores da atividade plaquetária. O desequilíbrio entre a prostaciclina e o tromboxane A2 pode levar ao aparecimento de aterosclerose e doenças cardíacas isquêmicas.

Acreditamos que a tão baixa expressão do gene *PTGIS* encontrada nos nossos resultados, refletindo a inibição de suas atividades vasodilatadora e antiagregante plaquetária, parece estar relacionada com o contexto clínico da nossa população em que, das 6 amostras de tecido com AAA, quatro pertenciam a indivíduos sintomáticos, submetidos à cirurgia em

caráter emergencial, e um desses indivíduos apresentou isquemia crítica do membro inferior esquerdo, sendo submetido à tomboembolectomia. Dessas 4 amostras, duas pertenciam a pacientes do gênero feminino, em que a manifestação e evolução do AAA costumam ser mais graves, conforme comentamos na introdução. Com esses resultados, podemos supor que a inibição do gene *PTGIS* pode estar relacionada a quadros agudos e mais graves de AAA, entretanto, esse resultado deverá ser validado em amostra maior.

Observamos, ainda, que o miR-150-5p foi 7,5 vezes mais expresso no tecido com AAA e interagiu com o gene *PTGIS* inibindo a sua expressão, consequentemente, gerando o desequilíbrio entre a síntese de prostaciclina e a do seu antagonista, o tromboxano A2, o que pode ter contribuído para o desenvolvimento da doença aneurismática. Goren e colaboradores observaram que a expressão do miR-150 nas plaquetas de portadores de insuficiência cardíaca com fibrilação atrial era 3,2 vezes reduzida em relação aos pacientes sem fibrilação atrial e que foi correlacionada com os níveis de miRNA circulante. Nós não detectamos miR-150-5p circulante, mas sabe-se que, na patogênese do AAA, há envolvimento desse miRNA tanto no processo trombogênico como na aterosclerose, e pode ser que, devido à maior solicitação desse miRNA no tecido, esse não foi detectável na circulação.

Outra observação interessante do nosso trabalho envolvendo o gene *PTGIS* foi a sua interação direta com o mir-328-3p, com a expressão reduzida 3,78 vezes no tecido de AAA e a expressão aumentada de quase 24 vezes no plasma de indivíduos com AAA. O miR-328, conhecido por estar presente nas plaquetas, foi descrito no plasma de pacientes com IAM, associado com maior risco de mortalidade e insuficiência cardíaca[139], bem como, de pacientes com vulnerabilidade para fibrilação atrial[140], situações semelhantes em gravidade ao AAA. Acreditamos que a expressão 24 vezes aumentada do miR-328-3p no plasma dos indivíduos com AAA sugere a sua participação em quadros de maior complexidade, como os da nossa amostra, em que 4 eram sintomáticos, envolvendo intensa atividade

inflamatória e de agregação plaquetária. Não foi encontrada na literatura a associação do mir-328-3p nem do gene *PTGIS* no contexto do AAA.

Conforme a Figura 13, observamos a expressão aumentada dos miRNAs miR-182-5p, miR-34b-3p emir-200-3p nos tecidos de AAA. Esses miRNAs juntos inibem a expressão do gene *FN1* (fibronectina 1). A fibronectina está envolvida nos processos de adesão e migração celular, incluindo embriogênese, cicatrização, coagulação sanguínea, imunidade e metástases. As publicações existentes sobre o miR-182-5p e o miR-34b-3p estão relacionadas com vários tipos de câncer[150,151]. Quanto ao gene *FN1*, há referências sobre o seu papel no câncer[152], glomerulopatia[153] e, mais recentemente, foi publicado estudo associando esse gene à cardiomiopatia dilatada idiopática e isquêmica[154]; nenhuma citação do gene *FN1* relacionado com os miR-182-5p e o miR-34b-3p no contexto do AAA foi encontrada até o presente. Porém, pode-se observar que, com a diminuição de *FN1,* pode estar havendo inibição da *APOE*, sendo que essa inibição poderia estar levando ao desenvolvimento do aneurisma (Figura 13).

Nossos resultados também mostraram redução de 5 vezes na expressão do gene *CX3CL1*(*C-X3-C motif chemokine ligand 1*) no tecido do AAA, em que o programa IPA de predição indicou os miRNAs com expressão aumentada miR-16-5p (2,2 vezes) e miR-1207-5p (9,2 vezes) como reguladores deste gene. Estudos recentes associam o gene *CX3CL1* com aterosclerose e susceptibilidade à DAC[155,156]. Há um estudo citando a importância da quimiocina fractalcina (*CX3CL1*) no recrutamento de monócitos e plaquetas para o local da lesão aterosclerótica[157], e outro estudo citando a expressão elevada desse gene e seu papel no AAA[158]. O miR-1207 foi citado, entre outros miRNAs relacionados, com a fase final da síntese de colesterol e aterogênese[159], o que poderia explicar a superexpressão desse miRNA nas amostras com AAA aterosclerótico e sua interação com a fractalcina. Quanto ao miR-16-5p, não encontramos na literatura sua associação com aterosclerose ou AAA, embora tenha sido expresso em nossas amostras e interagiu com o gene *CX3CL1* na análise realizada pelo *software* Ingenuity.

Outro gene com expressão reduzida foi o *AGTR1* (*angiotensin II receptor, type 1*), já identificado com forte associação ao AAA[160]. Esse gene apresentou-se como alvo direto do miR-34c-5p e indireto do miR-132-3p. Pela análise de predição, pode-se observar que esse gene, estando inibido (azul), estaria levando à inibição de *FN1*, o qual inibiria *APOE* e, com isso, estaria levando ao processo de aneurisma (Figura 13). O gene *ITGB1* (*integrin subunit beta1)* também mostrou estar inibindo *APOE,* e, também, pode estar envolvido com o AAA por essa via.

Por serem célula e tecido-específicos, os miRNAs podem apresentar diferentes padrões de expressão conforme demonstramos. Mesmo assim, os miRNAs circulantes podem ser bons biomarcadores com alta sensibilidade e especificidade para detectar doenças em diferentes estágios de evolução, inclusive podendo fazer o diagnóstico precoce a partir de uma amostra de sangue periférico, o que seria ainda custo-efetivo[161]. Três miRNAs já se revelaram aplicáveis na clínica do infarto agudo do miocárdio (IAM), o miR-133, miR-499, miR-208, que estão altamente expressos no plasma e são detectáveis nas primeiras 4 horas, antes mesmo dos marcadores isquêmicos convencionais[162].

Assim como foi demonstrada a aplicação prática dos miRNAs no IAM, acreditamos que os conhecimentos adquiridos até o presente na patogênese do AAA constituem um grande avanço rumo à descoberta de biomarcadores que possam detectar a doença em sua fase inicial, como também poderão ser aplicados no controle evolutivo, visando prevenir o risco de ruptura.

Um dos miRNAs mais estudados e apontados ultimamente como promissor alvo terapêutico é o miR-29b, em especial, por favorecer a apoptose das células musculares lisas, promovendo a desestabilização da parede vascular e formação do aneurisma. A inibição do miR-29b pelo antagonista de miRNA aumenta a síntese de colágeno, levando à rápida resposta fibrótica na parede da aorta, resultando em significante redução do AAA[86,163,164].

Alguns estudos, incluindo o nosso, já identificaram diversos miRNAs envolvidos no AAA, tanto no tecido como no plasma dos portadores da doença, entretanto, mais estudos serão necessários para esclarecer o verdadeiro papel dos miRNAs como biomarcador diagnóstico e prognóstico[95,105,128]. Uma das limitações desses estudos, incluindo esta pesquisa, foram as amostras de tecido de aneurisma em estágios avançados da doença e pela maioria dos estudos desenvolvidos serem em modelos animais, devido à dificuldade em se adquirir amostras de tecido de aorta abdominal humana e pela maior preferência na indicação de cirurgia endovascular nos últimos anos.

A nossa pesquisa tanto confirmou resultados encontrados na literatura como revelou novos miRNAs diferentemente expressos, tanto em tecido como no plasma de indivíduos com AAA. Acreditamos, com isso, poder contribuir para a desafiadora tarefa de encontrar uma opção de tratamento clínico por meio de antagonistas de miRNA capazes de inibir miRNAs envolvidos no desenvolvimento do AAA, ou na utilização de miRNAs produzidos laboratorialmente que tenham relação com melhora do AAA, uma doença, até agora, considerada essencialmente cirúrgica.

O AAA envolve apoptose das células musculares lisas, inflamação, autoimunidade, degradação da matriz extracelular e estresse oxidativo, mas a patobiologia ainda permanece desconhecida[53]. Há evidências de que o nível das enzimas responsáveis pela eliminação das espécies reativas de oxigênio (EROs) encontra-se reduzido no tecido com AAA[165] e que as EROs podem ter efeito sobre a MEC por meio da ativação da MMP-9 e MMP-2[165]. Partindo dessas informações, escolhemos as vias de estresse oxidativo e toxicidade para analisar a metilação dos genes que pudessem estar associados ao desenvolvimento e/ou gravidade do AAA.

O resultado da análise do padrão de metilação de DNA de 22 genes relacionados com estresse oxidativo e toxicidade revelaram, apenas, que o gene *GDF-15* está significantemente mais metilado (p=0,0006) nos tecidos de AAA. Os demais genes analisados não estavam metilados ou não apresentaram padrão de metilação significativo.

O gene *GDF-15* é membro da grande família do fator transformador de crescimento-β (TGF-β), um dos responsáveis pelo desenvolvimento da inflamação vascular[166,167]. Estudos revelaram que o *GDF-15* pode ser induzido por força mecânica de estiramento das fibras musculares, e está envolvido tanto na apoptose como na hipertrofia cardíaca[168,169]. Segundo informações do Pubmed/Gene, a proteína codificada pelo gene *GDF-15* pertence à família do TGF-β, que é expressa em diversos tipos de células, agindo como uma citoquina pleiotrópica e está envolvida na resposta celular ao estresse após injúria. Níveis aumentados dessa proteína estão associados a tecido sob condições de hipóxia, inflamação, injúria aguda e estresse oxidativo.

Existe apenas um estudo publicado em modelo animal revelando o papel protetor do gene *GDF-15* (*growth differentiation fator-15*) na aterosclerose avançada (170). Preusch e colegas estudaram ratos sem receptor de LDL, LDL-*receptor knockout*, transplantados com medula de doadores *GDF-15* -/-, deficientes de *GDF-15*, submetidos à dieta aterogênica durante 24 semanas, e observaram que havia grande acúmulo de macrófagos dentro das lesões ateroscleróticas na raiz da aorta, acompanhado de aumento na expressão de ICAM-1 (molécula de adesão intracelular *-1*). O ICAM-1 é uma molécula de adesão expressa nos monócitos que facilita a passagem dessas células pela barreira endotelial e sua transformação em células espumosas e, consequentemente, contribui para a formação da placa aterosclerótica e vulnerabilidade da lesão[171,172]. Esse trabalho mostrou que, na ausência do gene *GDF-15*, a lesão aterosclerótica é mais grave, provavelmente por maior recrutamento de macrófagos para região do endotélio vascular. Em nosso trabalho, o gene *GDF-15* está mais metilado nos tecidos de AAA, indicando menor transcrição desse gene, com isso, maior gravidade do AAA.

O *GDF-15* já foi descrito como biomarcador relevante no prognóstico e estratificação de risco do infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca e embolia pulmonar[173,174], embora o seu mecanismo de ação ainda não esteja bem elucidado. Até o momento, não foi descrita a relação entre a atividade

do gene *GDF-15* e a patogênese do AAA, provavelmente o presente estudo foi o primeiro a identificar aumento de metilação do gene *GDF-15* no tecido de aorta abdominal aneurismática em humanos. Mais estudos, em população maior, serão necessários para entender melhor o efeito da metilação do gene *GDF-15* na transcrição desse gene e a influência na alteração da produção de fator de diferenciação do crescimento sobre o desenvolvimento do AAA.

Na análise histológica, por meio das técnicas específicas de coloração, avaliaram-se as fibras elásticas e fibras colágenas da aorta de AAA e das amostras-controle sem AAA.

A técnica de Verhoeff é um dos métodos de coloração mais utilizados para demonstrar a presença de fibras elásticas no tecido. As fibras elásticas representam cerca de 5% do tecido conjuntivo, sendo constituídas, essencialmente, por elastina e por microfibrilhas[175]. São responsáveis pela flexibilidade e retração elástica, conferindo, assim, aos tecidos a capacidade de se distenderem facilmente e de voltarem ao seu comprimento normal após abolição da tensão e, consequentemente, relaxamento[176,177].

Nossos resultados indicaram menor presença de fibras eláticas nos tecidos de AAA, tanto na camada média-íntima quanto na adventícia. Esses resultados estão concordantes com os dados da literatura. Segundo Monteiro e colaboradores[50], há redução significativa de fibras elásticas e células musculares lisas nos tecidos de AAA com diâmetros maiores do que 55 mm.

O colágeno é o principal componente do tecido conjuntivo e desempenha papel-chave na arquitetura e integridade da matriz extracelular. No presente trabalho, usou-se a coloração de tricrômico de Masson para identificação e quantificação de fibras colágenas. Não encontramos diferenças significativas entre os tecidos de AAA e dos controles quanto à percentagem de fibras colágenas. Nossos resultados foram semelhantes aos observados por Monteiro e colaboradores[50], em que os autores também não observaram diferenças na percentagem de colágeno entre os tecidos de AAA e de doadores, assim como também entre os

diferentes diâmetros de AAA. Nas imagens apresentadas na Figura 12, observamos a diferença entre o tecido com AAA e o controle, quanto à disposição das lâminas na parede arterial. No tecido-controle, observa-se a definição das camadas da parede arterial, enquanto, nos tecidos com AAA, observa-se desorganização, perda da definição dessas camadas.

Em razão da complexa patogênese do AAA, continua sendo um grande desafio encontrar biomarcadores com sensibilidade e especificidade aceitáveis. Mais estudos estão sendo aguardados para esclarecer essa interação entre genes e miRNAs na doença aneurismática, entretanto, os resultados da nossa pesquisa e os achados da literatura, até o presente, parecem nos aproximar, cada vez mais, desse objetivo.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Nossos resultados permitem concluir que:

- O tecido da parede da aorta com AAA apresenta um perfil de expressão gênica diferente do tecido-controle sem AAA, caracterizada pelo aumento das expressões dos genes *SPHK1, TYMP, ALOX5 e HIF1A, e expressão reduzida dos genes PTGIS, CX3CL1, ITGB1, COL18A1, FN1 e AGTR1.*
- O gene *GDF15* que codifica para o fator 15 de crescimento está hipermetilado nos tecidos com AAA. A inibição da transcrição desse fator contribui para a vulnerabilidade da lesão aterosclerótica e aumento da gravidade do AAA.
- O número de miRNAs, diferentemente expressos e que já foram descritos na literatura como diretamente envolvidos na patogênese do AAA, encontrado no tecido é significativamente superior ao número de miRNA circulantes.
- Cinco genes encontrados no tecido de aorta com aneurisma, sendo quatro com expressão negativa, *CX3CL1, PTGIS, FN1, AGTR1* e um com expressão positiva, *ALOX5*, foram alvos de nove miRNAs, dos quais sete apresentaram expressão aumentada, miR-1207-5p, miR-16-5p, miR-150-5p, miR-34c-5p, miR-182-5p, miR-34b-3p, miR-200c-3p e dois, miR-125b-5p e 193b-3p, expressão reduzida, quando comparados com tecido de aorta sem aneurisma, evidenciando a importância e influência dos fatores epigenéticos, tanto para o desenvolvimento quanto para a gravidade do AAA.

7 ANEXOS

7 ANEXOS

7.1 ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

Coordenadoria de Serviços de Saúde

INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIMENTO

TÍTULO DO ESTUDO: "INFLUÊNCIA DE FATORES EPIGENÉTICOS NO ANEURISMA ATEROSCLERÓTICO DA AORTA ABDOMINAL DE IDOSOS"
CENTRO: INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
INVESTIGADORA: DRA. NEIRE NIARA FERREIRA DE ARAUJO
NÚMERO DO PACIENTE: _____
INICIAIS DO PACIENTE: _____

OBJETIVO DESTE ESTUDO

Você está sendo convidado para participar deste estudo durante o qual será submetido a uma consulta onde serão realizadas algumas perguntas sobre o seu estilo de vida, história familiar, além de um exame físico e exames de laboratório (exame de sangue e urina). Através desses exames, pretendemos encontrar as possíveis causas genéticas e a influência do seu estilo de vida para o aparecimento do aneurisma em sua aorta abdominal. Um pequeno fragmento será retirado da região do aneurisma durante a cirurgia, a fim de avaliar se as alterações encontradas no exame de sangue, também estarão presentes na parede da sua aorta abdominal. As pessoas que apresentam aneurisma na aorta abdominal correm um risco maior do que aquelas que não têm, de serem acometidos por doença no coração, no cérebro, nos rins ou em outros órgãos. Conhecendo essas possíveis causas do aneurisma, você poderá receber orientações, junto ao seu médico, para evitar ou tratar algumas doenças que costumam aparecer nas pessoas que apresentam aneurisma na aorta, como infarto agudo do miocárdio, "derrame cerebral", e até a morte.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO
Caso queira participar deste estudo, você será chamado para a realização de consultas periódicas, de acordo com a necessidade das investigações, como também para submeter-se a exames laboratoriais (sangue e urina), SEM CUSTO ADICIONAL PARA VOCÊ.

RISCOS E DESCONFORTOS

Os riscos ou desconfortos são de possíveis acidentes leves durante as punções venosas, que serão realizadas por pessoas tecnicamente capacitadas, no Laboratório Central do IDPC.

BENEFÍCIOS POTENCIAIS

O benefício maior é poder identificar algumas das possíveis causas do aneurisma em sua aorta abdominal. Com isso, poderemos fornecer informações importantes ao seu médico sobre a sua doença e você possa receber medidas mais adequadas para prevenir e/ ou tratar doenças igualmente sérias, como o infarto do coração e o derrame cerebral, que podem surgir em algumas pessoas que têm aneurisma.

28 19

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

Coordenadoria de Serviços de Saúde

INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA

CONFIDENCIALIDADE

Se você aceitar participar deste estudo, todos os seus registros médicos serão verificados pela equipe de pesquisa em busca de dados para o estudo.
Assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido você está dando permissão para que isso seja feito.
Sua identidade será mantida em segredo quando os resultados do estudo forem publicados, pois, você está autorizando os seus dados a serem publicados em revistas, artigos e serem tema de debates e aulas.
As informações coletadas durante o estudo serão armazenadas em um computador, mas seu nome não. Seu médico será informado de sua participação nesse estudo

"INFLUÊNCIA DE FATORES EPIGENÉTICOS NO ANEURISMA ATEROSCLERÓTICO DA AORTA ABDOMINAL DE IDOSOS".

NOVOS ACHADOS

Você será informado sobre quaisquer novos achados importantes que se tornarem disponíveis durante o estudo que possam influenciar seu desejo de continuar ou não a participar do estudo:

"INFLUÊNCIA DE FATORES EPIGENÉTICOS NO ANEURISMA ATEROSCLERÓTICO DA AORTA ABDOMINAL DE IDOSOS"

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA E CONSENTIMENTO

Sua participação neste estudo é voluntária. Você pode se recusar a participar ou pode Desistir, a qualquer momento durante o estudo, sem ter que dar explicações. Isso não mudará a qualidade de atendimento que você estará recebendo nem implicará em qualquer tipo de penalidade.
Os membros da equipe de pesquisa podem encerrar sua participação no programa de pesquisa após análise das razões pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição. O motivo será explicado a você e pode ser devido ao cancelamento do estudo pela coordenação ou por você não cumprir as orientações dadas pela equipe de pesquisa, ou outras questões administrativas. Caso isso venha a acontecer, você continuará o seu tratamento através do setor onde você costuma ser acompanhado no ambulatório do IDPC.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

Coordenadoria de Serviços de Saúde

INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA

SOLICITAÇÃO DE INFORMAÇÕES ADICIONAIS

A investigadora clínica, Dra. _Neire Niara Ferreira de Araujo_, tel. 98116 2880, irá responder todas as dúvidas que você possa ter sobre sua participação neste estudo.
Em caso de dúvidas ou preocupações quanto aos seus direitos como participante deste estudo, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia no tel: 5085-6040.
Uma cópia deste termo será entregue para você.

Li e compreendi este termo de consentimento e todas as minhas dúvidas foram resolvidas. Recebi explicações sobre o objetivo da pesquisa, os procedimentos de estudo a que serei submetido, os possíveis riscos e desconfortos e os benefícios que posso apresentar. As alternativas à minha participação neste estudo também foram discutidas. Portanto, concordo voluntariamente em fornecer meu consentimento para participar deste estudo clínico.

Assinatura do paciente	Data	Hora
Assinatura da testemunha	Data	Hora
Assinatura da Investigadora	Data	Hora

20 19

7.2 ANEXO B - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Coordenadoria de Serviços de Saúde
INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA
Comitê de Ética em Pesquisa

À
Neire Niara Ferreira de Araujo
Investigadora Principal
Dr. Marcelo Bertolami
Orientador
Nº DO PROTOCOLO NO CEP: 4174
(este nº deverá citar nas correspondências referentes a este projeto)

Título Atual_ Projeto de Pesquisa Clínica/ Tese doutorado: "Influência de fatores epigenéticos no aneurisma aterosclerótico da aorta abdominal de idosos".

Título Anterior_ Projeto de Pesquisa Clínica/ Tese doutorado: "Influência de Fatores Epinegéticos na Calcificação de Aorta Abdominal de Idosos".

Referente: Emenda

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia diante de suas atribuições analisou e aprovou em reunião ordinária a emenda ao projeto supracitado, onde foi apresentado:

- ✓ Alteração do Título da Pesquisa;
- ✓ Inclusão como Co-orientador o Dr. Fábio Rossi;
- ✓ Redução no tamanho da amostra e do número de genes a serem estudos; e
- ✓ Redução de três grupos para apenas um grupo a ser pesquisado, por não dispor das tomografias, pois o aparelho de tomógrafo está em processo de instalação.

NÃO SERÃO INCLUÍDOS NOVOS PACIENTES

Pedro Silvio Farsky
Coordenador CEP
CRM 55073

São Paulo, 15 de abril de 2014.

Dr. Pedro Silvio Farsky
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia

Av. Dr. Dante Pazzanese, 500 • Ibirapuera • São Paulo – SP • CEP: 04012-909 • Fone: (11) 5085 6040 • E-mail: cep@dantepazzanese.org.br

FORM 001IDPC Mar/09 rev.1

Secretaria de Pós Graduação
Recebido em: 15 / 04 / 2014
Visto:

7.3 ANEXO C - Questionário de Anamnese

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

QUESTONÁRIO AVALIAÇÃO CLÍNICA E EXAMES COMPLEMENTARES
PROJETO : FATORES EPIGENÉTICOS NA CALCIFICAÇÃO DA AORTA ABDOMINAL DE IDOSOS
DRA. NEIRE NIARA F. DE ARAUJO – CRM 50493 / CARDIOGERIATRIA / IDPC (2013-2015)

IDENTIFICAÇÃO: .....
DATA/ATENDIMENTO:.....
NOME:.....REGISTRO:.....
NATURALIDADE:.....NACIONALIDADE:..... ETNIA: .....DATA/NASC.....
ESTADO CIVIL: .....
ENDEREÇO:.....
CEP:.....TEL. FIXO: ( ).....TEL. CELULAR: ( ).....

EMAIL:.....
PROFISSÃO:.....,.....
.....

I- ANTECEDENTES PATOLÓGICOS:

DOENÇA	TIPO	TEMPO	TRATAMENTO **SIM**	TRATAMENTO **NÃO**
HAS				
DM				
DLP				
OBESIDADE				
HIPO / HIPERTIREOIDISMO				
DOENÇA CAROTÍDEA				
AVC				
DPOC/ ASMA				

ARRITMIA	TIPO	TEMPO	TRATAMENTO: SIM / NÃO	OBS
FIBRILAÇÃO FLUTTER				
EXTRASSISTOLIA				

Av. Dr. Dante Pazzanese, 500 • Ibirapuera • São Paulo – SP • CEP: 04012-909 • Fone: (11) 5085 6000
FORM 002IDPC Mai/09 rev. 1

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

TAQUIARRITMIA				
BLOQUEIOS				
MARCAPASSO/CDI/ RESSINCR.				

DAC	TIPO	TEMPO	TRATAMENTO: SIM/ NÃO
ANGINA			
IAM			
ANGIOPLASTIA/ STENT			

OUTRAS DOENÇAS	TIPO	TEMPO	TRATAMENTO: SIM/ NÃO
OSTEOPOROSE			
OSTEOARTROSE			
DOENÇA NEUROLÓGICA			
DAOP			

.....
.....
.....

CIRURGIAS	**TIPO**	**DATA**	**EVOLUÇÃO**	**OUTRAS INFORMAÇOES**

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

.....

II- HISTÓRIA SOCIAL / HÁBITOS:

HÁBITO	ATUAL	PREGRESSO	TIPO	TEMPO DE INÍCIO/TÉRMINO (MESES/ ANOS)	QUANTIDADE/ DIA
TABAGISMO					
ETILISMO					

ATIVIDADE FÍSICA	ATUAL	PREGRESSO	TIPO	TEMPO	QUANTIDADE/ DIA
SEDENTARISMO					
EXERCÍCIOS					

ATIVIDADES DE LASER	ATUAL	PREGRESSO	TIPO	TEMPO / FREQ.

AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE ESTRESSE:

1) ALGUM FATO EM SUA VIDA LHE CAUSOU UM ESTRESSE MUITO GRANDE? (LUTOS, SEPARAÇÃO, FALÊNCIA, ETC)
.....
...

2) TEM ALGUMA COISA QUE DEIXA VOCÊ ESTRESSADO?
.....
...

ESTRESSE	LEVE	MODERADO	INTENSO

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

PESSOAL			
FAMILIAR			
TRABALHO			
OUTROS TIPOS			

MAIS DETALHES:
.....
.....
.....

III- HISTÓRIA FAMILIAR:

HAS		OSTEOPOROSE		
DM 2		CÂNCER		
DLP		ARRITMIA		
ANEURISMA		MCP (ICC)		
AVC		MCP (HIPERT)		
HIPOTIREOIDISMO		OBESIDADE		

OBS:

IV- HISTÓRIA CLÍNICA ATUAL:

ASSINTOMÁTICO ( ) SINTOMÁTICO ( )
.....
.....
.....
.....

V- EXAME FÍSICO

DADOS ANTROPOMÉTRICOS:
PESO(KG):..... ESTATURA(CM):.....IMC (KG/CM²).....
CINTURA(CM):.....QUADRIL(CM):.....

PA (mmHg)	SENTADO	DEITADO	DE PÉ
BRAÇO DIREITO			
BRAÇO ESQUERDO			

PULSOS	NORMAIS	ALTERADOS

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

PERNA DIREITA		
PERNA ESQUERDA		

OBS:.....
.....
.....

A) CABEÇA/ PESCOÇO: SOPROS : NÃO ( ) SIM ( )
.....

BÓCIO/NÓDULOS : NÃO ( ) SIM ( ).....

B) APARELHO CARDIOVASCULAR: AUSCULTA CARDÍACA NORMAL ( ) ALTERADA ( )
.....
.....
.....

C) APARELHO RESPIRATÓRIO: AUSCULTA PULMONAR NORMAL ( ) ALTERADA ( )
.....
.....
.....

D) APARELHO DIGESTIVO: ABDOME NORMAL ( ) ALTERADO ( )

OBS:.....
.....
.....
.....

E) APARELHO LOCOMOTOR:

MARCHA NORMAL ( ) ALTERADA ( )
OBS:
.....
.....
.....
.....

F) AVALIAÇÃO DO SONO:

DORME BEM : SIM ( ) NÃO ( ) RONCOS: SIM ( ) NÃO ( )

OBS:
.....
.....
.....

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

G) OUTRAS INFORMAÇÕES IMPORTANTES:

VI- RELAÇÃO DE MEDICAMENTOS

MEDICAMENTO	SIM	NÃO	TEMPO	DOSE DIÁRIA	TIPO/NOME	REAÇÕES ADVERSAS
IECA						
BRA						
ESTATINA						
ANTIAGREGANTE PLAQUETÁRIO						
DIURÉTICO						
BLOQ. CANAIS CÁLCIO						
BETABLOQUEADOR						
HORMÔNIO TIREOIDEANO						
BISFOSFONATOS						
REPOSIÇÃO DE CÁLCIO						
REPOSIÇÃO DE VIT. D3						

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

ANTIDEPRESSIVOS						
ANTICOAGULANTE						
NITRATOS						
ANALGÉSICOS						
AINH/CORTICOIDES						
CILOSTAZOL/ OUTROS VASOD. PERIFÉRICOS						
OUTROS MEDICAMENTOS						

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1 World Health Organization. Definition or an order elderly person. World Health Organization 2013 May 4 [cited 2013 May 4];Available from: URL: http://www.who.int/healthinfo/survey/ageingdefnolder/en/.

2 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [acesso em 2014 Apr 10]. Disponível em: http:www.ibge.gov.br.

3 Lima e Costa MF, Guerra HL, Barreto SM, Guimarães RM. Diagnóstico da situação de saúde da população idosa brasileira: um estudo de mortalidade e das internações hospitalares. Inf Epidemiol SUS 2000;99(1):23-41.

4 Golledge J, Norman PE. Current status of medical management for abdominal aortic aneurysm. Atherosclerosis 2011 Jul;217(1):57-63.

5 Moll FL, Powell JT, Fraedrich G, Verzini F, Haulon S, Waltham M, et al. Management of abdominal aortic aneurysms clinical practice guidelines of the European society for vascular surgery. Eur J Vasc Endovasc Surg 2011 Jan;41(Suppl 1):S1-S58.

6 Golledge J, Muller J, Daugherty A, Norman P. Abdominal aortic aneurysm: pathogenesis and implications for management. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006 Dec;26(12):2605-13.

7 Schermerhorn M. A 66-year-old man with an abdominal aortic aneurysm: review of screening and treatment. JAMA 2009 Nov 11;302(18):2015-22.

8 Harris LM, Faggioli GL, Fiedler R, Curl GR, Ricotta JJ. Ruptured abdominal aortic aneurysms: factors affecting mortality rates. J Vasc Surg 1991 Dec;14(6):812-8.

9 Pande RL, Beckman JA. Abdominal aortic aneurysm: populations at risk and how to screen. J Vasc Interv Radiol 2008 Jun;19(6 Suppl):S2-8.

10 Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE. Abdominal aortic aneurysm in women. J Vasc Surg 2001 Jul;34(1):122-6.

11 Cao H, Hu X, Zhang Q, Li J, Wang J, Shao Y, et al. Homocysteine level and risk of abdominal aortic aneurysm: a meta-analysis. PLoS One 2014;9(1):e85831.

12 Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, et al. Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. Circulation 2013 Jan 1;127(1):e6-e245.

13 Scott RA, Bridgewater SG, Ashton HA. Randomized clinical trial of screening for abdominal aortic aneurysm in women. Br J Surg 2002 Mar;89(3):283-5.

14 Nordon IM, Hinchliffe RJ, Loftus IM, Thompson MM. Pathophysiology and epidemiology of abdominal aortic aneurysms. Nat Rev Cardiol 2011 Feb;8(2):92-102.

15 Shah AD, Langenberg C, Rapsomaniki E, Denaxas S, Pujades-Rodriguez M, Gale CP, et al. Type 2 diabetes and incidence of cardiovascular diseases: a cohort study in 1.9 million people. Lancet Diabetes Endocrinol 2015 Feb;3(2):105-13.

16 De RP, Farchioni L, Fiorucci B, Lenti M. Diabetes and abdominal aortic aneurysms. Eur J Vasc Endovasc Surg 2014 Mar;47(3):243-61.

17 Ferruzzi J, Vorp DA, Humphrey JD. On constitutive descriptors of the biaxial mechanical behaviour of human abdominal aorta and aneurysms. J R Soc Interface 2011 Mar 6;8(56):435-50.

18 Torsney E, Pirianov G, Charolidi N, Shoreim A, Gaze D, Petrova S, et al. Elevation of plasma high-density lipoproteins inhibits development of experimental abdominal aortic aneurysms. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2012 Nov;32(11):2678-86.

19 Kent KC, Zwolak RM, Egorova NN, Riles TS, Manganaro A, Moskowitz AJ, et al. Analysis of risk factors for abdominal aortic aneurysm in a cohort of more than 3 million individuals. J Vasc Surg 2010 Sep;52(3):539-48.

20 Elkalioubie A, Haulon S, Duhamel A, Rosa M, Rauch A, Staels B, et al. Meta-Analysis of Abdominal Aortic Aneurysm in Patients With Coronary Artery Disease. Am J Cardiol 2015 Nov 1;116(9):1451-6.

21 Durieux R, Van DH, Labropoulos N, Yazici A, Legrand V, Albert A, et al. High prevalence of abdominal aortic aneurysm in patients with three-vessel coronary artery disease. Eur J Vasc Endovasc Surg 2014 Mar;47(3):273-8.

22 Lederle FA, Walker JM, Reinke DB. Selective screening for abdominal aortic aneurysms with physical examination and ultrasound. Arch Intern Med 1988 Aug;148(8):1753-6.

23 Maegdefessel L, Spin JM, Adam M, Raaz U, Toh R, Nakagami F, et al. Micromanaging abdominal aortic aneurysms. Int J Mol Sci 2013;14(7):14374-94.

24 Lindholt JS, Vammen S, Juul S, Henneberg EW, Fasting H. The validity of ultrasonographic scanning as screening method for abdominal aortic aneurysm. Eur J Vasc Endovasc Surg 1999 Jun;17(6):472-5.

25 Maegdefessel L, Dalman RL, Tsao PS. Pathogenesis of abdominal aortic aneurysms: microRNAs, proteases, genetic associations. Annu Rev Med 2014;65:49-62.

26 Aggarwal S, Qamar A, Sharma V, Sharma A. Abdominal aortic aneurysm: A comprehensive review. Exp Clin Cardiol 2011;16(1):11-5.

27 Lederle FA, Wilson SE, Johnson GR, Reinke DB, Littooy FN, Acher CW, et al. Immediate repair compared with surveillance of small abdominal aortic aneurysms. N Engl J Med 2002 May 9;346(19):1437-44.

28 Fleming C, Whitlock EP, Beil TL, Lederle FA. Screening for abdominal aortic aneurysm: a best-evidence systematic review for the U.S. Preventive Services Task Force. Ann Intern Med 2005 Feb 1;142(3):203-11.

29 Kuivaniemi H, Elmore JR. Opportunities in abdominal aortic aneurysm research: epidemiology, genetics, and pathophysiology. Ann Vasc Surg 2012 Aug;26(6):862-70.

30 Marian AJ, Belmont J. Strategic approaches to unraveling genetic causes of cardiovascular diseases. Circ Res 2011 May 13;108(10):1252-69.

31 Dube JB, Hegele RA. Genetics 100 for cardiologists: basics of genome-wide association studies. Can J Cardiol 2013 Jan;29(1):10-7.

32 Bown MJ, Braund PS, Thompson J, London NJ, Samani NJ, Sayers RD. Association between the coronary artery disease risk locus on chromosome 9p21.3 and abdominal aortic aneurysm. Circ Cardiovasc Genet 2008 Oct;1(1):39-42.

33 Thompson AR, Drenos F, Hafez H, Humphries SE. Candidate gene association studies in abdominal aortic aneurysm disease: a review and meta-analysis. Eur J Vasc Endovasc Surg 2008 Jan;35(1):19-30.

34 Tilson MD, Seashore MR. Fifty families with abdominal aortic aneurysms in two or more first-order relatives. Am J Surg 1984 Apr;147(4):551-3.

35 Tilson MD, Seashore MR. Human genetics of the abdominal aortic aneurysm. Surg Gynecol Obstet 1984 Feb;158(2):129-32.

36 Clifton MA. Familial abdominal aortic aneurysms. Br J Surg 1977 Nov;64(11):765-6.

37 Hinterseher I, Tromp G, Kuivaniemi H. Genes and abdominal aortic aneurysm. Ann Vasc Surg 2011 Apr;25(3):388-412.

38 Skinner MK, Manikkam M, Guerrero-Bosagna C. Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. Trends Endocrinol Metab 2010 Apr;21(4):214-22.

39 Powell JT, Greenhalgh RM. Clinical practice. Small abdominal aortic aneurysms. N Engl J Med 2003 May 8;348(19):1895-901.

40 Svensjo S, Bjorck M, Gurtelschmid M, Djavani GK, Hellberg A, Wanhainen A. Low prevalence of abdominal aortic aneurysm among 65-year-old Swedish men indicates a change in the epidemiology of the disease. Circulation 2011 Sep 6;124(10):1118-23.

41 Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE, Chute EP, Hye RJ, Makaroun MS, et al. The aneurysm detection and management study screening program: validation cohort and final results. Aneurysm Detection and Management Veterans Affairs Cooperative Study Investigators. Arch Intern Med 2000 May 22;160(10):1425-30.

42 Norman PE, Powell JT. Abdominal aortic aneurysm: the prognosis in women is worse than in men. Circulation 2007 Jun 5;115(22):2865-9.

43 Sweeting MJ, Thompson SG, Brown LC, Powell JT. Meta-analysis of individual patient data to examine factors affecting growth and rupture of small abdominal aortic aneurysms. Br J Surg 2012 May;99(5):655-65.

44 Wilson KA, Lee AJ, Lee AJ, Hoskins PR, Fowkes FG, Ruckley CV, et al. The relationship between aortic wall distensibility and rupture of infrarenal abdominal aortic aneurysm. J Vasc Surg 2003 Jan;37(1):112-7.

45 Hinterseher I, Gabel G, Corvinus F, Luck C, Saeger HD, Bergert H, et al. Presence of Borrelia burgdorferi sensu lato antibodies in the serum of patients with abdominal aortic aneurysms. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012 May;31(5):781-9.

46 Roggerio A, Sambiase NV, Palomino SA, de Castro MA, da Silva ES, Stolf NG, et al. Correlation of bacterial coinfection versus matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 expression in aortic aneurysm and atherosclerosis. Ann Vasc Surg 2013 Oct;27(7):964-71.

47 Majesky MW. Developmental basis of vascular smooth muscle diversity. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2007 Jun;27(6):1248-58.

48 Rosenquist TH, Kirby ML, van Mierop LH. Solitary aortic arch artery. A result of surgical ablation of cardiac neural crest and nodose placode in the avian embryo. Circulation 1989 Nov;80(5):1469-75.

49 Topouzis S, Majesky MW. Smooth Muscle Lineage Diversity in the Chick Embryo. Dev Biol 1996 Sep 15;178(2):430-45.

50 Tavares Monteiro JA, da Silva ES, Raghavan ML, Puech-Leao P, de Lourdes HM, Otoch JP. Histologic, histochemical, and biomechanical properties of fragments isolated from the anterior wall of abdominal aortic aneurysms. J Vasc Surg 2014 May;59(5):1393-401.

51 Schlatmann TJ, Becker AE. Histologic changes in the normal aging aorta: implications for dissecting aortic aneurysm. Am J Cardiol 1977 Jan;39(1):13-20.

52 Shimizu K, Mitchell RN, Libby P. Inflammation and cellular immune responses in abdominal aortic aneurysms. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006 May;26(5):987-94.

53 Boddy AM, Lenk GM, Lillvis JH, Nischan J, Kyo Y, Kuivaniemi H. Basic research studies to understand aneurysm disease. Drug News Perspect 2008 Apr;21(3):142-8.

54 Curci JA, Thompson RW. Adaptive cellular immunity in aortic aneurysms: cause, consequence, or context? J Clin Invest 2004 Jul;114(2):168-71.

55 Gutierrez PS. Doenças da aorta torácica: alterações morfológicas e o papel das metaloproteinases na gênese dos aneurismas e das dissecções. Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo 2011;21(1):46-53.

56 Pires L JT GP. Quantificação morfológica de Chlamydia pneumoniae e Mycoplasma pneumoniae em aneurismas de aorta abdominal humana. Revista Brasileira de cirurgia vascular 2007;22:322-331.

57 Norman PE, Davis TM, Le MT, Golledge J. Matrix biology of abdominal aortic aneurysms in diabetes: mechanisms underlying the negative association. Connect Tissue Res 2007;48(3):125-31.

58 Newman KM, Ogata Y, Malon AM, Irizarry E, Gandhi RH, Nagase H, et al. Identification of matrix metalloproteinases 3 (stromelysin-1) and 9 (gelatinase B) in abdominal aortic aneurysm. Arterioscler Thromb 1994 Aug;14(8):1315-20.

59 Annambhotla S, Bourgeois S, Wang X, Lin PH, Yao Q, Chen C. Recent advances in molecular mechanisms of abdominal aortic aneurysm formation. World J Surg 2008 Jun;32(6):976-86.

60 Maccani MA, Marsit CJ. Epigenetics in the placenta. Am J Reprod Immunol 2009 Aug;62(2):78-89.

61 Bird A. Perceptions of epigenetics. Nature 2007 May 24;447(7143):396-8.

62 Talbert PB, Henikoff S. Spreading of silent chromatin: inaction at a distance. Nat Rev Genet 2006 Oct;7(10):793-803.

63 Ozanne SE, Constancia M. Mechanisms of disease: the developmental origins of disease and the role of the epigenotype. Nat Clin Pract Endocrinol Metab 2007 Jul;3(7):539-46.

64 Ling C, Groop L. Epigenetics: a molecular link between environmental factors and type 2 diabetes. Diabetes 2009 Dec;58(12):2718-25.

65 Tost J. DNA methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker. Mol Biotechnol 2010 Jan;44(1):71-81.

66 Turunen MP, Aavik E, Yla-Herttuala S. Epigenetic regulation in vascular cells. Curr Opin Lipidol 2013 Oct;24(5):438-43.

67 Miranda TB, Jones PA. DNA methylation: the nuts and bolts of repression. J Cell Physiol 2007 Nov;213(2):384-90.

68 Matouk CC, Marsden PA. Epigenetic regulation of vascular endothelial gene expression. Circ Res 2008 Apr 25;102(8):873-87.

69 Ikegami K, Ohgane J, Tanaka S, Yagi S, Shiota K. Interplay between DNA methylation, histone modification and chromatin remodeling in stem cells and during development. Int J Dev Biol 2009;53(2-3):203-14.

70 Zaina S, Heyn H, Carmona FJ, Varol N, Sayols S, Condom E, et al. DNA methylation map of human atherosclerosis. Circ Cardiovasc Genet 2014 Oct;7(5):692-700.

71 Ordovas JM, Smith CE. Epigenetics and cardiovascular disease. Nat Rev Cardiol 2010 Sep;7(9):510-9.

72 Ghildiyal M, Zamore PD. Small silencing RNAs: an expanding universe. Nat Rev Genet 2009 Feb;10(2):94-108.

73 Ambros V. The functions of animal microRNAs. Nature 2004 Sep 16;431(7006):350-5.

74 Das S, Ferlito M, Kent OA, Fox-Talbot K, Wang R, Liu D, et al. Nuclear miRNA regulates the mitochondrial genome in the heart. Circ Res 2012 Jun 8;110(12):1596-603.

75 Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nat Cell Biol 2007 Jun;9(6):654-9.

76 Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, et al. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. PLoS One 2008;3(11):e3694.

77 Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 2004 Jan 23;116(2):281-97.

78 Saetrom P, Heale BS, Snove O, Jr., Aagaard L, Alluin J, Rossi JJ. Distance constraints between microRNA target sites dictate efficacy and cooperativity. Nucleic Acids Res 2007;35(7):2333-42.

79 Vrijens K, Bollati V, Nawrot TS. MicroRNAs as potential signatures of environmental exposure or effect: a systematic review. Environ Health Perspect 2015 May;123(5):399-411.

80 Engelhardt S. Small RNA biomarkers come of age. J Am Coll Cardiol 2012 Jul 24;60(4):300-3.

81 Zampetaki A, Mayr M. Analytical challenges and technical limitations in assessing circulating miRNAs. Thromb Haemost 2012 Oct;108(4):592-8.

82 Maegdefessel L, Spin JM, Raaz U, Eken SM, Toh R, Azuma J, et al. miR-24 limits aortic vascular inflammation and murine abdominal aneurysm development. Nat Commun 2014;5:5214.

83 Ott CE, Grunhagen J, Jager M, Horbelt D, Schwill S, Kallenbach K, et al. MicroRNAs differentially expressed in postnatal aortic development downregulate elastin via 3' UTR and coding-sequence binding sites. PLoS One 2011;6(1):e16250.

84 van RE, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, et al. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. Proc Natl Acad Sci U S A 2008 Sep 2;105(35):13027-32.

85 Boon RA, Seeger T, Heydt S, Fischer A, Hergenreider E, Horrevoets AJ, et al. MicroRNA-29 in aortic dilation: implications for aneurysm formation. Circ Res 2011 Oct 28;109(10):1115-9.

86 Maegdefessel L, Azuma J, Toh R, Merk DR, Deng A, Chin JT, et al. Inhibition of microRNA-29b reduces murine abdominal aortic aneurysm development. J Clin Invest 2012 Feb 1;122(2):497-506.

87 Thom T, Haase N, Rosamond W, Howard VJ, Rumsfeld J, Manolio T, et al. Heart disease and stroke statistics--2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Circulation 2006 Feb 14;113(6):e85-151.

88 Davis BN, Hilyard AC, Lagna G, Hata A. SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. Nature 2008 Jul 3;454(7200):56-61.

89 Ji R, Cheng Y, Yue J, Yang J, Liu X, Chen H, et al. MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation. Circ Res 2007 Jun 8;100(11):1579-88.

90 Maegdefessel L, Azuma J, Toh R, Deng A, Merk DR, Raiesdana A, et al. MicroRNA-21 blocks abdominal aortic aneurysm development and nicotine-augmented expansion. Sci Transl Med 2012 Feb 22;4(122):122ra22.

91 Porrello ER, Johnson BA, Aurora AB, Simpson E, Nam YJ, Matkovich SJ, et al. MiR-15 family regulates postnatal mitotic arrest of cardiomyocytes. Circ Res 2011 Sep 2;109(6):670-9.

92 Merk DR, Chin JT, Dake BA, Maegdefessel L, Miller MO, Kimura N, et al. miR-29b participates in early aneurysm development in Marfan syndrome. Circ Res 2012 Jan 20;110(2):312-24.

93 Zampetaki A, Attia R, Mayr U, Gomes RS, Phinikaridou A, Yin X, et al. Role of miR-195 in aortic aneurysmal disease. Circ Res 2014 Oct 24;115(10):857-66.

94 Fu XM, Zhou YZ, Cheng Z, Liao XB, Zhou XM. MicroRNAs: Novel Players in Aortic Aneurysm. Biomed Res Int 2015;2015:831641.

95 Kin K, Miyagawa S, Fukushima S, Shirakawa Y, Torikai K, Shimamura K, et al. Tissue- and plasma-specific MicroRNA signatures for atherosclerotic abdominal aortic aneurysm. J Am Heart Assoc 2012 Oct;1(5):e000745.

96 Chen T, Huang Z, Wang L, Wang Y, Wu F, Meng S, et al. MicroRNA-125a-5p partly regulates the inflammatory response, lipid uptake, and ORP9 expression in oxLDL-stimulated monocyte/macrophages. Cardiovasc Res 2009 Jul 1;83(1):131-9.

97 Zhu J, Chen T, Yang L, Li Z, Wong MM, Zheng X, et al. Regulation of microRNA-155 in atherosclerotic inflammatory responses by targeting MAP3K10. PLoS One 2012;7(11):e46551.

98 Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. Nature 2008 Dec 18;456(7224):980-4.

99 Leeper NJ, Raiesdana A, Kojima Y, Chun HJ, Azuma J, Maegdefessel L, et al. MicroRNA-26a is a novel regulator of vascular smooth muscle cell function. J Cell Physiol 2011 Apr;226(4):1035-43.

100 Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, Mendell JT, Lowenstein CJ. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. Proc Natl Acad Sci U S A 2008 Feb 5;105(5):1516-21.

101 Fish JE, Santoro MM, Morton SU, Yu S, Yeh RF, Wythe JD, et al. miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. Dev Cell 2008 Aug;15(2):272-84.

102 Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, McAnally J, Hill JA, et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. Dev Cell 2008 Aug;15(2):261-71.

103 Cordes KR, Sheehy NT, White MP, Berry EC, Morton SU, Muth AN, et al. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. Nature 2009 Aug 6;460(7256):705-10.

104 Elia L, Quintavalle M, Zhang J, Contu R, Cossu L, Latronico MV, et al. The knockout of miR-143 and -145 alters smooth muscle cell maintenance and vascular homeostasis in mice: correlates with human disease. Cell Death Differ 2009 Dec;16(12):1590-8.

105 Biros E, Moran CS, Wang Y, Walker PJ, Cardinal J, Golledge J. microRNA profiling in patients with abdominal aortic aneurysms: the significance of miR-155. Clin Sci (Lond) 2014 Jun;126(11):795-803.

106 Sun X, Sit A, Feinberg MW. Role of miR-181 family in regulating vascular inflammation and immunity. Trends Cardiovasc Med 2014 Apr;24(3):105-12.

107 Sun X, He S, Wara AK, Icli B, Shvartz E, Tesmenitsky Y, et al. Systemic delivery of microRNA-181b inhibits nuclear factor-kappaB activation, vascular inflammation, and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. Circ Res 2014 Jan 3;114(1):32-40.

108 Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT, Stehling-Sun S, Lam MH, Kirak O, et al. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. Nature 2008 Feb 28;451(7182):1125-9.

109 Lee HJ, Yi JS, Lee HJ, Lee IW, Park KC, Yang JH. Dysregulated Expression Profiles of MicroRNAs of Experimentally Induced Cerebral Aneurysms in Rats. J Korean Neurosurg Soc 2013 Feb;53(2):72-6.

110 Ni CW, Qiu H, Jo H. MicroRNA-663 upregulated by oscillatory shear stress plays a role in inflammatory response of endothelial cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2011 May;300(5):H1762-H1769.

111 Li P, Zhu N, Yi B, Wang N, Chen M, You X, et al. MicroRNA-663 regulates human vascular smooth muscle cell phenotypic switch and vascular neointimal formation. Circ Res 2013 Oct 25;113(10):1117-27.

112 Son DJ, Kumar S, Takabe W, Kim CW, Ni CW, Alberts-Grill N, et al. The atypical mechanosensitive microRNA-712 derived from pre-ribosomal RNA induces endothelial inflammation and atherosclerosis. Nat Commun 2013;4:3000.

113 Kim CW, Kumar S, Son DJ, Jang IH, Griendling KK, Jo H. Prevention of abdominal aortic aneurysm by anti-microRNA-712 or anti-microRNA-205 in angiotensin II-infused mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2014 Jul;34(7):1412-21.

114 Foley DL, Craig JM, Morley R, Olsson CA, Dwyer T, Smith K, et al. Prospects for epigenetic epidemiology. Am J Epidemiol 2009 Feb 15;169(4):389-400.

115 Hou L, Wang D, Baccarelli A. Environmental chemicals and microRNAs. Mutat Res 2011 Sep 1;714(1-2):105-12.

116 Hou L, Zhang X, Wang D, Baccarelli A. Environmental chemical exposures and human epigenetics. Int J Epidemiol 2012 Feb;41(1):79-105.

117 Haider BA, Baras AS, McCall MN, Hertel JA, Cornish TC, Halushka MK. A critical evaluation of microRNA biomarkers in non-neoplastic disease. PLoS One 2014;9(2):e89565.

118 The UK Small Aneurysm Trial Participants. Mortality results for randomised controlled trial of early elective surgery or ultrasonographic surveillance for small abdominal aortic aneurysms. Lancet 1988;21(352(9141)):1649-55.

119 Takayama T, Yamanouchi D. Aneurysmal disease: the abdominal aorta. Surg Clin North Am 2013 Aug;93(4):877-91.

120 Conway KP, Byrne J, Townsend M, Lane IF. Prognosis of patients turned down for conventional abdominal aortic aneurysm repair in the endovascular and sonographic era: Szilagyi revisited? J Vasc Surg 2001 Apr;33(4):752-7.

121 Daly KJ, Torella F, Ashleigh R, McCollum CN. Screening, diagnosis and advances in aortic aneurysm surgery. Gerontology 2004 Nov;50(6):349-59.

122 Giles KA, Schermerhorn ML, O'Malley AJ, Cotterill P, Jhaveri A, Pomposelli FB, et al. Risk prediction for perioperative mortality of endovascular vs open repair of abdominal aortic aneurysms using the Medicare population. J Vasc Surg 2009 Aug;50(2):256-62.

123 Mani K, Wanhainen A, Lundkvist J, Lindstrom D. Cost-effectiveness of intensive smoking cessation therapy among patients with small abdominal aortic aneurysms. J Vasc Surg 2011 Sep;54(3):628-36.

124 Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzer NR, Bakal CW, Creager MA, Halperin JL, et al. ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease): endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation. Circulation 2006 Mar 21;113(11):e463-e654.

125 Nobre F. [Introduction: Brazilian guidelines on hypertension VI. Brazilian Society of Cardiology, Brazilian Society of Hypertension, Brazilian Society of Nephrology]. J Bras Nefrol 2010 Sep;32 Suppl 1:III.

126 Sposito AC, Caramelli B, Fonseca FA, Bertolami MC, Afiune NA, Souza AD, et al. [IV Brazilian Guideline for Dyslipidemia and Atherosclerosis prevention: Department of Atherosclerosis of Brazilian Society of Cardiology]. Arq Bras Cardiol 2007 Apr;88 Suppl 1:2-19.

127 Gravina CF, Franken R, Wenger N, Freitas EV, Batlouni M, Rich M, et al. [II Guidelines of Brazilian Society of Cardiology in geriatric cardiology]. Arq Bras Cardiol 2010;95(3 Suppl 2):e16-e76.

128 Pahl MC, Derr K, Gabel G, Hinterseher I, Elmore JR, Schworer CM, et al. MicroRNA expression signature in human abdominal aortic aneurysms. BMC Med Genomics 2012;5:25.

129 Ahluwalia N, Lin AY, Tager AM, Pruitt IE, Anderson TJ, Kristo F, et al. Inhibited aortic aneurysm formation in BLT1-deficient mice. J Immunol 2007 Jul 1;179(1):691-7.

130 Bhamidipati CM, Whatling CA, Mehta GS, Meher AK, Hajzus VA, Su G, et al. 5-Lipoxygenase pathway in experimental abdominal aortic aneurysms. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2014 Dec;34(12):2669-78.

131 Munzer P, Schmid E, Walker B, Fotinos A, Chatterjee M, Rath D, et al. Sphingosine kinase 1 (Sphk1) negatively regulates platelet activation and thrombus formation. Am J Physiol Cell Physiol 2014 Nov 15;307(10):C920-C927.

132 Elamin YY, Rafee S, Osman N, KJ OB, Gately K. Thymidine Phosphorylase in Cancer; Enemy or Friend? Cancer Microenviron 2016 Apr;9(1):33-43.

133 Tabata S, Ikeda R, Yamamoto M, Shimaoka S, Mukaida N, Takeda Y, et al. Thymidine phosphorylase activates NFkappaB and stimulates the expression of angiogenic and metastatic factors in human cancer cells. Oncotarget 2014 Nov 15;5(21):10473-85.

134 Haraguchi M, Miyadera K, Uemura K, Sumizawa T, Furukawa T, Yamada K, et al. Angiogenic activity of enzymes. Nature 1994 Mar 17;368(6468):198.

135 Miyadera K, Sumizawa T, Haraguchi M, Yoshida H, Konstanty W, Yamada Y, et al. Role of thymidine phosphorylase activity in the angiogenic effect of platelet derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase. Cancer Res 1995 Apr 15;55(8):1687-90.

136 Li W, Tanaka K, Morioka K, Uesaka T, Yamada N, Takamori A, et al. Thymidine phosphorylase gene transfer inhibits vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating heme oxygenase-1 and p27KIP1. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005 Jul;25(7):1370-5.

137 Schaper W, Buschmann I. Arteriogenesis, the good and bad of it. Cardiovasc Res 1999 Sep;43(4):835-7.

138 Vink A, Schoneveld AH, Lamers D, Houben AJ, van der Groep P, van Diest PJ, et al. HIF-1 alpha expression is associated with an atheromatous inflammatory plaque phenotype and upregulated in activated macrophages. Atherosclerosis 2007 Dec;195(2):e69-e75.

139 He F, Lv P, Zhao X, Wang X, Ma X, Meng W, et al. Predictive value of circulating miR-328 and miR-134 for acute myocardial infarction. Mol Cell Biochem 2014 Sep;394(1-2):137-44.

140 McManus DD, Lin H, Tanriverdi K, Quercio M, Yin X, Larson MG, et al. Relations between circulating microRNAs and atrial fibrillation: data from the Framingham Offspring Study. Heart Rhythm 2014 Apr;11(4):663-9.

141 Target Scan Human. Predicted microRNA targets in mammals [**accessed** jan 2016]. Available from: http://www.Targetscan.org. 2016.

142 Zhang Q, Kandic I, Kutryk MJ. Dysregulation of angiogenesis-related microRNAs in endothelial progenitor cells from patients with coronary artery disease. Biochem Biophys Res Commun 2011 Feb 4;405(1):42-6.

143 Iaconetti C, De RS, Polimeni A, Sorrentino S, Gareri C, Carino A, et al. Down-regulation of miR-23b induces phenotypic switching of vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. Cardiovasc Res 2015 Sep 1;107(4):522-33.

144 Hergenreider E, Heydt S, Treguer K, Boettger T, Horrevoets AJ, Zeiher AM, et al. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. Nat Cell Biol 2012 Mar;14(3):249-56.

145 National Center for Biotechnology Information NCBI PubMed [accessed Mar 2016]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed.

146 Zhao L, Moos MP, Grabner R, Pedrono F, Fan J, Kaiser B, et al. The 5-lipoxygenase pathway promotes pathogenesis of hyperlipidemia-dependent aortic aneurysm. Nat Med 2004 Sep;10(9):966-73.

147 Palinski W. Aneurysms: leukotrienes weaken aorta from the outside. Nat Med 2004 Sep;10(9):896-8.

148 Bisoendial RJ, Tanck MW, Golledge J, Broekhuizen LN, Legemate DA, Stroes ES, et al. The association between the gene encoding 5-lipoxygenase activating protein and abdominal aortic aneurysms. Atherosclerosis 2012 Feb;220(2):425-8.

149 Fang L, Ellims AH, Moore XL, White DA, Taylor AJ, Chin-Dusting J, et al. Circulating microRNAs as biomarkers for diffuse myocardial fibrosis in patients with hypertrophic cardiomyopathy. J Transl Med 2015;13:314.

150 Wang F, Zhong S, Zhang H, Zhang W, Zhang H, Wu X, et al. Prognostic Value of MicroRNA-182 in Cancers: A Meta-Analysis. Dis Markers 2015;2015:482146.

151 Xiao J, Li Y, Zhang W, Jiang Y, Du B, Tan Y. miR-34b inhibits nasopharyngeal carcinoma cell proliferation by targeting ubiquitin-specific peptidase 22. Onco Targets Ther 2016;9:1525-34.

152 Kuang J, Zhao M, Li H, Dang W, Li W. Identification of potential therapeutic target genes and mechanisms in head and neck squamous cell carcinoma by bioinformatics analysis. Oncol Lett 2016 May;11(5):3009-14.

153 Ohtsubo H, Okada T, Nozu K, Takaoka Y, Shono A, Asanuma K, et al. Identification of mutations in FN1 leading to glomerulopathy with fibronectin deposits. Pediatr Nephrol 2016 Apr 7:1-9.

154 Qiu LL, Ding XJ, Zhu HT, Gao LW, Tang JF, Liu XQ. Comparative RNA profile analysis of idiopathic dilated cardiomyopathy and ischemic cardiomyopathy. Genet Mol Res 2016;15(1)):gmr.15016910.

155 Zhang X, Feng X, Cai W, Liu T, Liang Z, Sun Y, et al. Chemokine CX3CL1 and its receptor CX3CR1 are associated with human atherosclerotic lesion volnerability. Thromb Res 2015 Jun;135(6):1147-53.

156 Yao K, Zhang S, Lu H, Hong X, Qian J, Sun A, et al. Changes in fractalkine in patients with ST-elevation myocardial infarction. Coron Artery Dis 2015 Sep;26(6):516-20.

157 Flierl U, Bauersachs J, Schafer A. Modulation of platelet and monocyte function by the chemokine fractalkine (CX3 CL1) in cardiovascular disease. Eur J Clin Invest 2015 Jun;45(6):624-33.

158 Patel A, Jagadesham VP, Porter KE, Scott DJ, Carding SR. Characterisation of fractalkine/CX3CL1 and fractalkine receptor (CX3CR1) expression in abdominal aortic aneurysm disease. Eur J Vasc Endovasc Surg 2008 Jul;36(1):20-7.

159 Karagiannis GS, Weile J, Bader GD, Minta J. Integrative pathway dissection of molecular mechanisms of moxLDL-induced vascular smooth muscle phenotype transformation. BMC Cardiovasc Disord 2013;13:4.

160 Jones GT, Thompson AR, van Bockxmeer FM, Hafez H, Cooper JA, Golledge J, et al. Angiotensin II type 1 receptor 1166C polymorphism is associated with abdominal aortic aneurysm in three independent cohorts. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008 Apr;28(4):764-70.

161 Condorelli G, Latronico MV, Cavarretta E. microRNAs in cardiovascular diseases: current knowledge and the road ahead. J Am Coll Cardiol 2014 Jun 3;63(21):2177-87.

162 Liebetrau C, Gaede L, Dorr O, Troidl C, Voss S, Hoffmann J, et al. Release kinetics of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide in a clinical model of acute myocardial infarction. Clin Chim Acta 2014 Feb 15;429:34-7.

163 Maegdefessel L, Azuma J, Tsao PS. MicroRNA-29b regulation of abdominal aortic aneurysm development. Trends Cardiovasc Med 2014 Jan;24(1):1-6.

164 Maegdefessel L, Azuma J, Toh R, Merk DR, Deng A, Chin JT, et al. Inhibition of microRNA-29b reduces murine abdominal aortic aneurysm development. J Clin Invest 2012 Feb;122(2):497-506.

165 Weintraub NL. Understanding abdominal aortic aneurysm. N Engl J Med 2009 Sep 10;361(11):1114-6.

166 Robertson AK, Rudling M, Zhou X, Gorelik L, Flavell RA, Hansson GK. Disruption of TGF-beta signaling in T cells accelerates atherosclerosis. J Clin Invest 2003 Nov;112(9):1342-50.

167 Topper JN. TGF-beta in the cardiovascular system: molecular mechanisms of a context-specific growth factor. Trends Cardiovasc Med 2000 Apr;10(3):132-7.

168 Schlittenhardt D, Schober A, Strelau J, Bonaterra GA, Schmiedt W, Unsicker K, et al. Involvement of growth differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1 (GDF-15/MIC-1) in oxLDL-induced apoptosis of human macrophages in vitro and in arteriosclerotic lesions. Cell Tissue Res 2004 Nov;318(2):325-33.

169 Frank D, Kuhn C, Brors B, Hanselmann C, Ludde M, Katus HA, et al. Gene expression pattern in biomechanically stretched cardiomyocytes: evidence for a stretch-specific gene program. Hypertension 2008 Feb;51(2):309-18.

170 Preusch MR, Baeuerle M, Albrecht C, Blessing E, Bischof M, Katus HA, et al. GDF-15 protects from macrophage accumulation in a mousemodel of advanced atherosclerosis. Eur J Med Res 2013;18:19.

171 Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, Pigott R, Woolf N, Katz D, et al. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. J Pathol 1993 Nov;171(3):223-9.

172 Yang PY, Rui YC. Intercellular adhesion molecule-1 and vascular endothelial growth factor expression kinetics in macrophage-derived foam cells. Life Sci 2003 Dec 12;74(4):471-80.

173 Wollert KC, Kempf T, Peter T, Olofsson S, James S, Johnston N, et al. Prognostic value of growth-differentiation factor-15 in patients with non-ST-elevation acute coronary syndrome. Circulation 2007 Feb 27;115(8):962-71.

174 Kempf T, von HS, Peter T, Allhoff T, Cicoira M, Doehner W, et al. Prognostic utility of growth differentiation factor-15 in patients with chronic heart failure. J Am Coll Cardiol 2007 Sep 11;50(11):1054-60.

175 Stevens A, Lowe J. Epithelial Cells. Human Histology. 2 ed. London: Elsevier Mosby; 1997.

176 Young B, Weather J. Connective Support Tissue. Weather Functiona Histolog. 4 ed. New York: Churchill Livingstone; 2000.

177 Seeley T, Stephens T, Tate P. Histologia: O Estudo dos Tecidos. 6 ed. Loures Lusociência; 2003.

9 Apêndices

9 APÊNDICES

9.1 APÊNDICE A - Dados demográficos e exames laboratoriais dos doadores de tecido da aorta abdominal

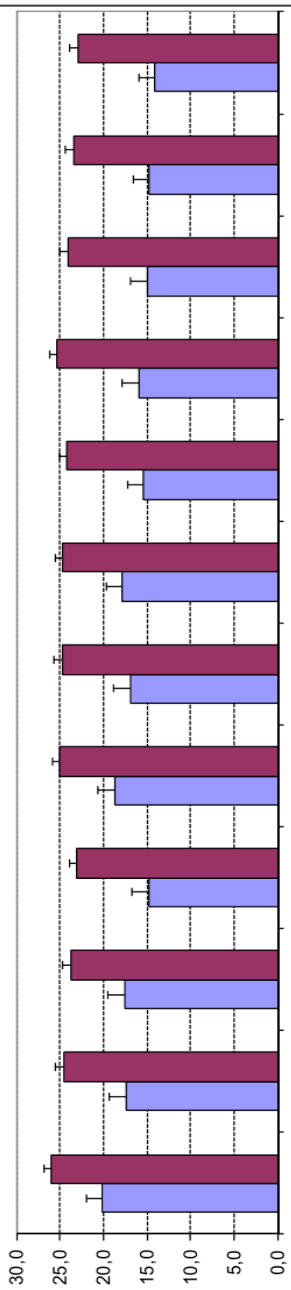
	Dados demográficos										
	Iniciais do nome	Sexo	idade	Causa de morte	Tabagismo	Raça	HAS	Diabete	dislipidemia	peso	altura
Doador 1	SS	feminino	61	AVCI	sim	Branca	sim	não	não	80	168
Doador 2	JSD	feminino	37	HSA	não	Branca	não	não	não	56	165
Doador 3	MOSA	feminino	49	HSA	sim	Branca	NI	não	não	75	160
Doador 4	FZ	masculino	51	AVCH	sim	Branca	sim	não	não	98	186
Doador 5	TLB	feminino	16	AVCH	não	Branca	não	não	não	80	172
Doador 6	MDPA	feminino	59	AVCH	sim	Negra	sim	não	não	55	160
Doador 7	DCS	masculino	54	HSA	sim	Parda	sim	não	não	61	163

	Exames Bioquímicos									
	Glicose	uréia	creatinina	Sódio	Potássio	TGO	TGP	GGT	CPK	FA
Doador 1	160	55	1,5	155	4,2	54	50	187	680	86
Doador 2	117	19	0,5	134	3,2	26	52	22	56	49
Doador 3	221	49	0,6	157	4,8	45	41	160	101	109
Doador 4	134	86	4,4	NI	3	131	76	68	3754	52
Doador 5	135	NI	0,5	135	3,1	23	23	19	69	61
Doador 6	177	32	0,7	150	4,1	106	79	83	367	83
Doador 7	175	42	0,9	153	3,7	103	77	75	566	124

NI - não informado, HAS - hipertenão arterial sistêmica, TGO - transaminase glutâmica oxalacética, TGP- transaminase glutâmica pirúvica
GGT- gnaglutamiltransferase, CPK- Creatina fosfoquinase, FA- fostatase alcalina

9.2 APÊNDICE B - Resultados do controle de qualidade das 12 amostras de RNA extraídos do tecido da aorta (6 AAA e 6 controles). As amostras foram testadas quanto à expressão de 2 genes endógenos (ACTB e HPRT1), eficiência da transcrição reversa (RTC), controle positivo da PCR (PPC), controle negativo da transcrição reversa (NRT), contaminação de DNA genômico (GDC) e controle branco (NTC). Este teste de controle de qualidade se fez necessário devido à exigência do fabricante para garantir resultados fidedignos na análise de expressão gênica por PCR array

Row	Sample Name	S1	S2	S3	S4	S5	S6	Ctrl 1	Ctrl 2	Ctrl 3	Ctrl 4	Ctrl 5	Ctrl 6
	Control Name	Ave Ct											
A	ACTB	20,11	17,40	17,60	14,80	18,70	16,91	17,83	15,36	15,95	14,97	14,70	14,04
B	HPRT1	25,98	24,54	23,75	23,04	24,97	24,70	24,66	24,15	25,29	24,04	23,44	22,98
C	RTC	20,79	20,72	20,48	20,55	20,73	20,84	20,72	20,61	21,24	20,72	20,66	20,61
D	PPC	17,93	17,80	17,82	17,82	17,81	17,75	17,96	17,82	18,23	17,99	18,69	17,89
E	GDC	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	33,52	35,00	35,00	35,00
F	NRT	31,81	34,05	33,52	30,76	29,90	27,34	27,46	26,04	27,45	26,46	27,99	28,66
G	PPC - H_2O	18,09	17,94	18,07	18,13	18,27	18,31	18,29	18,13	18,10	18,05	18,36	18,47
H	NTC	35,00	35,00	34,70	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	34,01	35,00
		Housekeeping Genes Expression Levels											
		Reverse Trascription Control (RTC): Are RNA sample impurities affecting reverse transcription?											
	$C_t^C - C_t^G$	2,70	2,78	2,41	2,42	2,46	2,53	2,43	2,48	3,14	2,67	2,30	2,14
Cut-off	5	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
		Positive PCR Control (PPC): Are RNA sample impurities affecting PCR?											
	$C_t^D - C_t^G$	-0,16	-0,14	-0,25	-0,31	-0,46	-0,56	-0,33	-0,31	0,13	-0,06	0,33	-0,58
Cut-off	3	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
		No Reverse Transcription (NRT) control: Is genomic DNA contamination detectable?											
	C_t^F	31,81	34,05	33,52	30,76	29,90	27,34	27,46	26,04	27,45	26,46	27,99	28,66
Cut-off	35	YES	YES	YES	YES	YES	YES	YES	YES	YES	YES	YES	YES
		Genomic DNA Contamination (GDC) control: Will it affect the results?											
	C_t^E	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	33,52	35,00	35,00	35,00
Cut-off	35	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	YES	NO	NO	NO
		No Template Control (NTC): Is the PCR system clean?											
	C_t^H	35	35	34,7	35	35	35	35	35	35	35	34,01	35
Cut-off	34	YES	YES	YES	YES	YES	YES	YES	YES	YES	YES	YES	YES



9.3 APÊNDICE C - Resultados do controle de qualidade das amostras de miRNA extraídos do plasma (PLA n=12) e do tecido (TE n=12). As amostras foram testadas contra *spiking control* (cel-miR-39-3p) e mais 6 miRNAs endógenos, além de controle positivo da reação (PPC) e controle da transcrição reversa (miRTC). Este teste de controle de qualidade se fez necessário para garantir resultados fidedignos na análise de perfil de miRNA por PCR array

Assay	Sample Name	CAI-9 PLA	CAI-11 PLA	CAI_13 PLA	CAI-16 PLA	CAI-20 PLA	CAI-23 PLA	CAI-33 PLA	CAI-34 PLA	CAI-35 PLA	CAI-37 PLA	CAI-46 PLA	CAI-49 PLA	CAI-9 TE	CAI-11 TE	CAI-13 TE	CAI- 14 TE	CAI-20 TE	CAI-23 TE	C1 - TE	C2 - TE	C3 - TE	C4 - TE	C6 - TE	C7 - TE
	Control Name	Average C_T												Average C_T											
1	cel-miR-39-3p	24,98	23,79	26,02	28,35	24,74	25,24	22,20	22,27	26,83	20,66	22,04	22,08	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00
2	cel-miR-39-3p	24,97	23,79	25,93	28,04	24,50	25,13	22,19	22,20	26,71	20,61	21,99	21,96	34,60	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00
3	hsa-miR-16-5p	32,21	32,75	32,36	33,46	31,34	35,00	22,69	26,24	32,37	21,51	23,30	25,12	19,30	22,99	23,57	25,87	21,60	23,96	24,89	24,16	22,80	23,13	23,34	25,35
4	hsa-miR-21-5p	28,95	30,34	32,89	35,00	27,35	30,01	21,34	23,67	28,59	20,34	23,13	23,56	16,40	23,31	22,03	25,31	21,46	22,24	22,44	24,01	22,98	23,02	23,96	22,97
5	hsa-miR-191-5p	33,61	35,00	35,00	35,00	33,45	35,00	24,24	27,57	32,31	22,91	26,09	27,26	20,08	21,64	21,96	23,60	20,92	22,08	21,89	22,07	21,62	22,28	21,56	23,41
6	SNORD61	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	32,96	33,45	35,00	18,97	21,46	20,81	23,69	20,98	21,45	22,63	21,78	21,22	21,26	21,65	25,15
7	SNORD95	35,00	35,00	32,89	35,00	35,00	35,00	32,26	33,28	35,00	30,97	30,93	32,67	18,87	21,00	19,68	23,37	19,90	21,05	21,34	21,32	20,35	20,66	21,23	23,08
8	SNORD96A	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	35,00	32,99	33,02	35,00	19,98	22,57	21,39	24,85	21,35	22,43	23,03	23,20	21,73	22,49	23,12	24,83
9	miRTC	26,21	31,12	35,00	35,00	26,19	26,24	22,89	24,76	30,40	23,10	23,15	23,00	23,47	22,86	23,17	25,02	23,08	23,55	24,45	23,31	22,72	23,48	23,38	26,22
10	miRTC	26,36	30,52	35,00	35,00	26,32	26,24	22,99	24,84	30,61	23,16	23,12	23,02	23,43	22,85	23,12	25,15	23,01	23,52	24,36	23,28	22,70	23,52	23,47	26,19
11	PPC	20,05	20,61	20,20	20,22	19,94	20,10	20,42	20,33	19,98	20,53	20,37	20,25	20,12	20,29	20,41	20,30	20,09	20,33	20,41	20,36	20,19	20,11	20,49	20,42
12	PPC	19,96	20,50	20,28	20,37	19,97	20,37	20,32	20,57	20,08	20,38	20,27	20,29	20,10	20,47	20,36	20,32	20,16	20,44	20,75	20,82	20,21	20,37	20,49	20,57

		Reverse Trascription Control (miRTC): Are RNA sample impurities affecting reverse transcription?																							
Pathway-Focused $C_T^{miRTC} - C_T^{PPC}$		4,78	8,77	13,26	13,21	4,80	4,50	1,07	2,85	8,97	1,17	1,31	1,24	1,84	0,97	1,26	3,27	1,41	1,65	2,33	1,21	1,01	1,76	1,44	4,20
Cut-Off	7	NO	Perhaps	Perhaps	Perhaps	NO	NO	NO	NO	Perhaps	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
HC Array QB1 Plate miRNome $C_T^{miRTC} - C_T^{PPC}$		5,78	9,77	14,26	14,21	5,80	5,50	2,07	3,85	9,97	2,17	2,31	2,24	2,84	1,97	2,28	4,27	2,41	2,65	3,33	2,21	2,01	2,76	2,44	5,20
Cut-Off	7	NO	Perhaps	Perhaps	Perhaps	NO	NO	NO	NO	Perhaps	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
2 Plate miRNome $C_T^{miRTC} - C_T^{PPC}$		4,78	8,77	13,26	13,21	4,80	4,50	1,07	2,85	8,97	1,17	1,31	1,24	1,84	0,97	1,26	3,27	1,41	1,65	2,33	1,21	1,01	1,76	1,44	4,20
Cut-Off	7	NO	Perhaps	Perhaps	Perhaps	NO	NO	NO	NO	Perhaps	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
3 Plate miRNome $C_T^{miRTC} - C_T^{PPC}$		4,28	8,27	12,76	12,71	4,30	4,00	0,57	2,35	8,47	0,67	0,81	0,74	1,34	0,47	0,76	2,77	0,91	1,15	1,83	0,71	0,51	1,26	0,94	3,70
Cut-Off	7	NO	Perhaps	Perhaps	Perhaps	NO	NO	NO	NO	Perhaps	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
4 Plate miRNome $C_T^{miRTC} - C_T^{PPC}$		3,78	7,77	12,26	12,21	3,80	3,50	0,07	1,85	7,97	0,17	0,31	0,24	0,84	-0,03	0,26	2,27	0,41	0,65	1,33	0,21	0,01	0,76	0,44	3,20
Cut-Off	7	NO	Perhaps	Perhaps	Perhaps	NO	NO	NO	NO	Perhaps	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO

		Positive PCR Control (PPC): Are RNA sample impurities affecting PCR?																							
C_T^{PPC}		20,00	20,56	20,24	20,29	19,96	20,24	20,37	20,45	20,03	20,46	20,32	20,27	20,11	20,38	20,38	20,31	20,14	20,39	20,58	20,59	20,20	20,24	20,49	20,50
Cut-Off	21	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO

9.4 APÊNDICE D - Resultados da análise de metilação do DNA de 22 genes relacionados à estresse e toxicidade utilizando EpiTect Methyl II (EAHS-581Z, QIAGEN, GmbH, Hiden, Alemanha). Os dados mostram percentagem de não metilados (UN) e metilados (M) de cada amostra de DNA do tecido de AAA e controles provenientes de doadores. As duas últimas linhas contêm os controles do sistema de restrição enzimática.

Genes	Well	Amostras																							
		CAI-9		CAI-11		CAI-13		CAI-14		CAI-20		CAI-23		Controle 1		Controle 2		Controle 3		Controle 4		Controle 5		Controle 6	
		UM	M	UM	M	UM	M	UM	M	UM	M	UM	M	UM	M	UM	M	UM	M	UM	M	UM	M	UM	M
ATM	A01	99,94%	0,06%	99,93%	0,07%	99,86%	0,14%	99,97%	0,03%	100,00%	0,00%	99,80%	0,20%	99,95%	0,05%	99,92%	0,08%	99,82%	0,18%	99,98%	0,02%	99,47%	0,53%	99,96%	0,04%
BNIP3	A02	98,79%	1,21%	98,68%	1,32%	99,07%	0,93%	99,29%	0,71%	44,37%	55,63%	98,92%	1,08%	100,00%	0,00%	99,41%	0,59%	99,31%	0,69%	99,36%	0,64%	99,08%	0,92%	99,53%	0,47%
BRCA1	A03	99,70%	0,30%	99,68%	0,32%	99,62%	0,38%	99,68%	0,32%	99,73%	0,27%	99,51%	0,49%	99,78%	0,22%	99,68%	0,32%	99,09%	0,91%	99,88%	0,12%	99,22%	0,78%	99,74%	0,26%
CCND1	A04	99,89%	0,11%	99,86%	0,14%	99,98%	0,02%	99,84%	0,16%	99,96%		99,91%	0,09%	99,98%	0,02%	99,98%	0,02%	99,95%	0,05%	100,00%	0,00%	99,88%	0,12%	99,91%	0,09%
CDKN1A	A05	100,00%	0,00%	99,99%	0,01%	99,98%	0,02%	99,38%	0,62%	99,52%	0,48%	97,49%	2,51%	99,59%	0,41%	99,63%	0,37%	99,81%	0,19%	99,55%	0,45%	99,26%	0,74%	99,28%	0,72%
CSTB	A06	99,90%	0,10%	99,94%	0,06%	99,90%	0,10%	99,91%	0,09%	100,00%	0,00%	99,89%	0,11%	99,91%	0,09%	99,92%	0,08%	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%	99,68%	0,32%	99,79%	0,21%
CYP1A1	A07	99,92%	0,08%	99,96%	0,04%	99,88%	0,12%	99,86%	0,14%	99,97%	0,03%	99,80%	0,20%	99,96%	0,04%	99,90%	0,10%	99,69%	0,31%	100,00%	0,00%	99,68%	0,32%	100,00%	0,00%
DNAJC15	A08	99,82%	0,18%	97,75%	2,25%	85,00%	15,00%	96,89%	3,11%	90,26%	9,74%	96,07%	3,93%	99,48%	0,52%	98,97%	1,03%	89,44%	10,56%	98,80%	1,20%	96,61%	3,39%	99,37%	0,63%
GADD45A	A09	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%
GADD45G	A10	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%	99,99%	0,01%	100,00%	0,00%	99,98%	0,02%	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%
GDF15	A11	2,70%	97,30%	4,32%	95,68%	3,30%	96,70%	3,20%	96,80%	2,90%	97,10%	4,08%	95,92%	8,41%	91,59%	13,08%	86,92%	17,68%	82,32%	10,40%	89,60%	14,80%	85,20%	6,78%	93,22%
GPX3	A12	98,63%	1,37%	98,95%	1,05%	96,82%	3,18%	99,28%	0,72%	100,00%	0,00%	98,22%	1,78%	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%
INSIG1	B01	99,99%	0,01%	99,96%	0,04%	99,98%	0,02%	99,92%	0,08%	99,78%	0,22%	100,00%	0,00%	99,89%	0,11%	99,91%	0,09%	99,94%	0,06%	100,00%	0,00%	99,36%	0,64%	100,00%	0,00%
MLH1	B02	100,00%	0,00%	99,92%	0,08%	99,97%	0,03%	100,00%	0,00%	99,98%	0,02%	99,98%	0,02%	100,00%	0,00%	99,98%	0,02%	99,99%	0,01%	100,00%	0,00%	99,50%	0,50%	99,99%	0,01%
MSH2	B03	99,98%	0,02%	99,98%	0,02%	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%	99,94%	0,06%	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%	99,94%	0,06%	99,91%	0,09%
PRDX2	B04	99,69%	0,31%	99,69%	0,31%	99,60%	0,40%	99,88%	0,12%	100,00%	0,00%	99,76%	0,24%	99,96%	0,04%	99,96%	0,04%	99,79%	0,21%	99,97%	0,03%	99,53%	0,47%	99,87%	0,13%
PTGS2	B05	99,64%	0,36%	99,94%	0,06%	99,24%	0,76%	99,90%	0,10%	100,00%	0,00%	99,79%	0,21%	99,97%	0,03%	99,98%	0,02%	99,97%	0,03%	100,00%	0,00%	99,98%	0,02%	99,96%	0,04%
RARA	B06	99,11%	0,89%	99,22%	0,78%	98,56%	1,44%	97,37%	2,63%	99,50%	0,50%	98,70%	1,30%	99,87%	0,13%	99,72%	0,28%	99,55%	0,45%	99,88%	0,12%	99,45%	0,55%	99,77%	0,23%
SCARA3	B07	99,84%	0,16%	99,84%	0,16%	99,25%	0,75%	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%	99,95%	0,05%	100,00%	0,00%	99,32%	0,68%	100,00%	0,00%
TP53	B08	99,76%	0,24%	99,84%	0,16%	99,64%	0,36%	99,62%	0,38%	99,64%	0,36%	99,55%	0,45%	99,84%	0,16%	99,77%	0,23%	99,17%	0,83%	99,90%	0,10%	99,37%	0,63%	99,72%	0,28%
UBE2G2	B09	99,93%	0,07%	99,97%	0,03%	99,96%	0,04%	100,00%	0,00%	99,94%	0,06%	99,96%	0,04%	100,00%	0,00%	99,99%	0,01%	100,00%	0,00%	100,00%	0,00%	99,93%	0,07%	99,99%	0,01%
XPC	B10	99,98%	0,02%	99,94%	0,06%	99,98%	0,02%	99,99%	0,01%	100,00%	0,00%	99,97%	0,03%	100,00%	0,00%	99,98%	0,02%	99,95%	0,05%	100,00%	0,00%	99,52%	0,48%	99,88%	0,12%
SEC Ctrl	B11	Pass		Pass		Pass		Pass		Pass		Pass		Pass		Pass		Pass		Pass		Pass		Pass	
DEC Ctrl	B12	Pass		Pass		Pass		Pass		Pass		Pass		Pass		Pass		Pass		Pass		Pass		Pass	