ANDRE FELDMAN

**Análise da expressão de miRNAs em pacientes com
fibrilação atrial aguda no pós-operatório de cirurgia de
revascularização miocárdica**

Tese apresentada ao Instituto Dante
Pazzanese de Cardiologia, entidade
associada à Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de Medicina, Tecnologia e
Intervenção em Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Dalmo Antonio Ribeiro
Moreira

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Gun

**São Paulo
2015**

ANDRE FELDMAN

**Análise da expressão de miRNAs em pacientes com
fibrilação atrial aguda no pós-operatório de cirurgia de
revascularização miocárdica**

Tese apresentada ao Instituto Dante
Pazzanese de Cardiologia, entidade
associada à Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de Medicina, Tecnologia e
Intervenção em Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Dalmo Antonio Ribeiro
Moreira

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Gun

**São Paulo
2015**

Ficha catalográfica

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia

©reprodução autorizada pelo autor

Feldman, Andre

Análise da expressão de miRNAs em pacientes com fibrilação atrial aguda no pós-operatório de cirurgia de revascularização miocárdica / Andre Feldman.-- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
Universidade de São Paulo

Área de Concentração: Medicina, Tecnologia e Intervenção
em Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Dalmo Antônio Ribeiro Moreira

Descritores: 1. Revascularização Miocárdica. 2. Fibrilação
Atrial. 3. Cuidados Pós-Operatórios. 4. miRNAs

USP/IDPC/Biblioteca/046/15

Dedico este trabalho:

À minha esposa, Cibele, pelo amor, carinho e compreensão. Agradeço por estar ao meu lado em todos os momentos como uma fiel companheira e agora dedicada mãe de nosso filho, e por ceder parte de nosso tempo juntos para a elaboração desta tese. Sou muito grato por me ensinar o primeiro significado da palavra amor.

Aos meus pais, Efraim e Kely, pela construção de um lar que me ensinou os princípios morais e de justiça que norteiam as nossas vidas. Tenho muito orgulho por ter aprendido com vocês os valores da responsabilidade, prudência e simplicidade. Sou grato pelo amor incondicional e pela dedicação que sempre tiveram para proporcionar tudo que fosse necessário.

Ao meu tio, Carlos, que é coorientador nesta tese mas principalmente orientador na vida pessoal e profissional. Uma pessoa ímpar em minha formação desde o seu primórdio. Um exemplo de humildade e respeito pelas pessoas, lutador pela vida e vencedor dos obstáculos que ela já lhe trouxe.

Aos meus avós (“in memoriam”) que me proporcionaram muita alegria durante a minha infância e memórias inesquecíveis desta época.

À minha irmã, Francine, com quem dividi muitos bons momentos desde pequeno e que, hoje, ensina que por trás de sua aparente fragilidade física encontra-se uma grande e valorosa mulher.

Ao meu filhinho Danilo que tem a sabedoria de, sem ainda ter pronunciado a sua primeira palavra, me ensinar o segundo sentido que existe na palavra “amor”. Ensinar, através do sorriso, que o sentido da vida vem das pessoas e não dos bens materiais. Por proporcionar tanta alegria em tão pouco espaço de tempo.

Aos meus sogros, Sérgio e Maria Cecília, exemplos de humildade e ternura. Dotados da capacidade de inundar as nossas vidas de bondade e paz. Agradeço pela imensa dedicação ao genros, filhos e netos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, antes de tudo, à Deus, em primeiro lugar, pela luz, proteção e por tudo que dele recebi até hoje.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Dalmo Antonio Ribeiro Moreira, pelo seu incentivo e dedicação cuidadosa em cada detalhe desta obra. Uma pessoa de impressionante conhecimento dentro da área de arritmia.

Ao Dr. Pedro Silvio Farsky, que teve papel fundamental na aprovação do projeto junto à FAPESP e pela confiança na minha pessoa junto a este processo burocrático.

À Hui-Tzu Lin Wang, minha mais recente amiga, que foi imprescindível durante vários momentos na realização desta tese e que, trabalhando de forma incansável, é certamente uma das responsáveis diretas pela concretização desta obra.

Aos colaboradores do setor de biologia molecular, principalmente Jessica Cassilla e Gabriela Leite que participaram ativamente durante as fases iniciais e finais deste trabalho junto à análise genética deste material.

Ao Prof. Dr. Mario Hirata, fonte de inspiração para este material. Dotado de enorme conhecimento na área de biologia molecular foi responsável por direcionar o foco de estudo desta obra.

Ao Dr. Antonio Carlos Mugayar Bianco, grande mestre na vida profissional e pessoal, pela amizade durante o convívio diário que me proporcionaram e proporcionam enorme aprendizado na área médica. Uma pessoa pela qual tenho grande admiração principalmente pelo caráter e humildade.

À todos os médicos da Seção de Unidade de Terapia Intensiva, principalmente aos amigos e colegas diaristas, Flávia Cunácia, Guilherme Arruda, Robert Tanaka e Ronaldo Della Monica por transformar um ambiente insalubre num lugar de convívio muito confortável.

Aos colaboradores e cirurgiões do centro cirúrgico que foram essenciais na obtenção e preservação de parte do material deste trabalho

À todos os colaboradores da UTI que sempre estão empenhados por fazer o melhor aos pacientes que contribuíram para este trabalho

Um especial agradecimento aos pacientes que consentiram em fazer parte desta tese, pela confiança e boa vontade.

*“Os homens perdem a saúde para juntar dinheiro,
depois perdem o dinheiro para recuperar a saúde.
E por pensarem ansiosamente no futuro esquecem do presente de forma
que acabam por não viver nem no presente nem no futuro. E vivem como se
nunca fossem morrer... e morrem como se nunca tivessem vivido.”*
Dalai Lama

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. Serviço 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: Serviços de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

RESUMO

SUMMARY

1 INTRODUÇÃO:	2
1.1 Prevalência:	2
1.2 A fibrilação atrial no pós-operatório de cirurgia cardíaca	3
1.2.1 Implicações clínicas da FAPO:	4
1.2.2 Fatores desencadeantes associados à FAPO:	5
1.2.2.1 Ativação do Sistema Nervoso Autônomo:	5
1.2.2.2 Inflamação:	5
1.2.2.3 Estresse oxidativo	6
1.2.2.4 Volemia:	7
1.2.2.5 Hipóxia:	7
1.2.2.6 Anemia:	8
1.2.2.7 Alterações metabólicas:	8
1.3 A relação entre FA, canais iônicos transmembrana e alterações genéticas	10
1.4 A biologia molecular envolvida na FA	15
1.4.1 Bases de biologia molecular	15
1.4.2 Epigenética relacionada a arritmogênese	16
1.4.3 O papel dos microRNAs no surgimento de doenças	17
1.4.3.1 Os principais miRNAs relacionados à FA	19
1.5 Racionalidade	19
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivos primários:	22
2.2 Objetivos secundários:	22

3 MATERIAIS E MÉTODOS:	24
3.1 Tipo de estudo	24
3.2 Local da pesquisa	24
3.3 Elegibilidade:	24
3.4 Amostragem	24
3.5 Critérios de exclusão:	24
3.6 Desenho da pesquisa	25
3.6.1 Inclusão dos pacientes	27
3.6.2 Dados estudados	27
3.7 Definição de FAPO	29
3.8 Manejo cirúrgico e cuidados pós-operatórios:	29
3.9 Coleta e confidencialidade dos dados	30
3.10 Método utilizado para a análise da expressão gênica	31
3.10.1 Obtenção de mRNA do sangue total e no tecido atrial	32
3.10.2 Análise da integridade de mRNA	32
3.10.3 Síntese de DNA complementar a partir de mRNA	33
3.10.4 Determinação do volume ideal de cDNA para a reação de qPCR	33
3.10.5 Escolha do gene de referência para reação de qPCR	34
3.10.6 Análise da expressão gênica por qPCR	35
3.10.7 Extração de miRNA do plasma e síntese do cDNA	35
3.10.8 Análise da expressão de miRNA por qPCR	36
3.11 Análise estatística	36
3.12 Ética e Boas práticas clínicas	37
3.13 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	37
4 RESULTADOS	39
4.1 Resultados das características clínicas dos pacientes:	40
4.1.1 Perfil da doença arterial coronária entre os grupos:	40
4.1.2 Características clínicas e ecocardiográficas entre os grupos:	40
4.1.3 Características perioperatórias dos grupos:	41
4.1.4 Evolução pós-operatória:	43
4.2 Resultado da análise de miRNA	44
4.2.1 Comparação entre miRNAs em amostra coletada no período pós-operatório	44

4.2.2 Comparação entre miRNAs em amostras coletadas nos períodos pré e pós-operatório.....	46
4.3 Análise da expressão dos genes relacionados à síntese de proteínas relacionadas aos canais transmembrana.....	47
4.3.1 Comparação entre os genes relacionados às canalopatias entre os grupos no pré-operatório:.....	47
4.3.2 Comparação dos genes relacionados às canalopatias no grupo FAPO entre os tempos pré e pós-operatório:	48
4.3.3 Comparação dos genes relacionados às canalopatias no tecido atrial	49
4.4 Comparação dos genes relacionados à produção de IL-1, IL-6 e TNFα	51
5 DISCUSSÃO.....	54
5.1 Dados clínicos da população.....	54
5.1.1 Características perioperatórias	55
5.1.2 Evolução pós-operatória:	57
5.1.3 A Fibrilação atrial no pós-operatório	57
5.2 Análise de miRNA	58
5.2.1 O miRNA no pós-cirúrgico	58
5.2.2 Comparação dos miRNAs entre os períodos pré e pós- operatório.....	60
5.3 Análise da expressão dos genes relacionados à síntese de proteínas dos canais transmembrana	60
5.3.1 Comparação dos genes relacionados às proteínas de canais iônicos no pré-operatório:	60
5.3.2 Comparação dos genes relacionados às proteínas de canais iônicos no grupo FAPO entre os tempos pré e pós-operatório:	61
5.3.3 Comparação dos genes relacionados às proteínas de canais iônicos no tecido atrial dos grupos FAPO e controle genético	63
5.4 Comparação dos genes relacionados à produção de IL-1, IL-6 e TNFα.....	64
6 LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	66
7 CONCLUSÕES.....	69
8 APLICABILIDADE CLÍNICA	71
9 ANEXOS.....	73
9.1 Anexo A – Formulário de coleta de dados.....	73
9.2 Anexo B – Registro de aprovação do Comitê de ética em pesquisa	74

9.3 Anexo C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	77
10 REFERÊNCIAS	83
11 APÊNDICES	
11.1 Apêndice A - Protocolo de extração de mRNA do tubo PAXgene	
11.2 Apêndice B - Protocolo de extração de mRNA do tecido atrial	
11.3 Apêndice C - Análise de expressão de mRNA por qPCR	
11.4 Apêndice D - Escolha do gene de referência para reação de qPCR	
11.5 Apêndice E - Protocolo para extração de miRNA do plasma	
11.6 Apêndice F - Análise de expressão de miRNA por qPCR	

LISTA DE ABREVIATURAS

AE	Átrio esquerdo
AVE	Acidente vascular encefálico
BB	Betabloqueador
BH	Balanço hídrico
BS	Balanço sanguíneo
CA	Califórnia
CACNA1C	Canal de cálcio voltagem dependente subunidade 1C alfa
CACNB1	Canal de cálcio voltagem dependente subunidade beta-1
cDNA	DNA complementar
CEC	Circulação extracorpórea
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CRM	Cirurgia de revascularização miocárdica
CVE	Cardioversão elétrica
CX	Artéria circunflexa
DA	Artéria descendente anterior
DAC	Doença arterial coronária
DD	Diâmetro diastólico
DLP	Dislipidemia
DM	Diabetes mellitus
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	desvio-padrão
e col	e colaboradores
ECG	Eletrocardiograma
EUA	Estados Unidos da América
FA	Fibrilação atrial
FAPO	Fibrilação atrial pós-operatória
FE	Fração de ejeção

GAPDH	glyceraldehydo-3-fosfato desidrogenase
GJA1	“ <i>gap junction</i> alfa 1” ou conexina-40
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HCO ₃	Bicarbonato
IAMCST	Infarto agudo do miocárdico com supradesnivelamento do segmento ST
IAMSST	Infarto agudo do miocárdio sem supradesnivelamento do segmento ST
IDPC	Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
IL	Interleucina
IMC	Índice de massa corporal
IOT	Intubação orotraqueal
KCNJ2	Canal 2 de influxo de potássio da subfamília J
KCNN3	Canal de potássio de pequena voltagem cálcio-dependente
KCNQ1	Canal de potássio voltagem dependente
miRNA	microRNA
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NCBI	National Centre for Biotechnology Information
POI	Pós-operatório imediato
qPCR	Reação em cadeia de polimerase quantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
TCE	Tronco de coronária esquerda
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
UK	Reino Unido
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

LISTA DE SÍMBOLOS

>	maior
<	menor
±	mais ou menos
mm	milímetros
kg	kilograma
p	valor descritivo de probabilidade do teste
%	porcento
cm	centímetro
J	Joule
°C	graus <i>Celsius</i>
mg	miligrama
ng	nanograma
µl	microlitro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Correlação entre gene e seus efeitos fisiológicos.....	14
Tabela 2	Resumo das análises realizadas	29
Tabela 3	Relação dos genes em que foram estudados a expressão gênica por qPCR e as respectivas identificações dos genes no NCBI*	35
Tabela 4	Características clínicas e ecocardiográficas dos pacientes em cada grupo.....	41
Tabela 5	Variáveis perioperatórias entre os grupos	42
Tabela 6	Comparação dos desfechos evolutivos entre os grupos.....	44
Tabela 7	Comparação da expressão de miRNAs entre os grupos no período pós-cirúrgico	45
Tabela 8	Expressão miRNAs entre períodos pré e pós-cirúrgico	46
Tabela 9	Expressão dos miRNAs do grupo controle genético entre os períodos pré e pós-cirúrgico.	47
Tabela 10	Expressão dos genes das canalopatias no grupo FAPO entre os períodos pré e pós-cirúrgico	49
Tabela 11	Comparação da expressão dos genes das canalopatias entre os grupos no tecido atrial.....	50
Tabela 12	Comparação da expressão dos genes inflamatórios entre os grupos e entre os tempos de coleta	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Traçado eletrocardiográfico evidenciando ritmo de FA.....	2
Figura 2	Prevalência global de FA	3
Figura 3	Fisiopatologia da FAPO.	10
Figura 4	Esquema representativo de canais iônicos atriais com algumas subunidades como KCNJ2, KCNA5, entre outras.	11
Figura 5	Potencial de ação evidenciando cada fase e sua respectiva troca de íons.....	12
Figura 6	Relação entre correntes iônicas e duração do potencial de ação.....	14
Figura 7	Produção de proteínas a partir do código genético..	15
Figura 8	Bloqueio da tradução de proteína por microRNAs.....	18
Figura 9	Exemplo da análise da integridade de RNA de sangue periférico e tecido atrial	33
Figura 10	Determinação do volume ideal de cDNA para RT-PCR.....	34

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Tempo de anóxia entre os grupos FAPO e controle genético	42
Gráfico 2	Comparação da expressão do mi-RNA no período pós-cirúrgico	45
Gráfico 3	Expressão dos genes miRNA-26(A), miRNA-1(B) e miRNA-23(C) no grupo FAPO entre os períodos pré e pós-cirúrgico.	46
Gráfico 4	Expressão relativa dos genes relacionados às proteínas de canal entre ambos os grupos na amostra colhida no tempo pré-cirúrgico	48
Gráfico 5	Comparação entre genes relacionados a proteínas transmembranas no grupo FAPO entre os tempos pré e pós-cirúrgico	49
Gráfico 6	Expressão relativa dos genes nos tecidos.....	50
Gráfico 7	Expressão relativa dos genes IL-1(A), IL-6(B) e TNF α (C) entre os grupos nos períodos pré e pós operatórios	52

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1	Esquema de obtenção de dados e materiais27
Fluxograma 2	Fluxograma da análise de expressão de mRNA e miRNA pela reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR).31
Fluxograma 3	Formação dos grupos estudados.39

RESUMO

Feldman A. *Análise da expressão de miRNAs em pacientes com fibrilação atrial aguda no pós-operatório de cirurgia de revascularização miocárdica* [Tese]. São Paulo: Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, Entidade associada à Universidade de São Paulo; 2015.

A fibrilação atrial (FA) é a arritmia mais comum no pós-operatório de cirurgia cardíaca. Apesar de estar relacionada a alterações estruturais, alguns pacientes, mesmo que sem tais condições, ainda assim, cursam com fibrilação atrial no pós-operatório (FAPO) causando aumento no tempo de internação e custos. Estudos recentes vem ampliando o conhecimento sobre pequenos fragmentos de RNA, chamados de microRNAs (miRNAs) que podem interferir diretamente no aparecimento de algumas doenças na área cardiovascular. O objetivo do presente estudo é: 1) comparar a expressão dos miRNAs 1, 23 e 26 entre pacientes com e sem FAPO; 2) comparar nos grupos a expressão destes miRNAs entre os período pré e pós-cirúrgico; 3) comparar a expressão dos genes GJA1, KCNJ2, CACNB1, CACNA1C e KCNN3 entre os tempos pré e pós-cirúrgico no grupo FAPO; 4) comparar estes últimos genes no tecido atrial; 5) comparar os genes relacionados à produção de interleucinas (IL)-1, 6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF α) entre os grupos e entre os tempos pré e pós-cirúrgico; 6) avaliar as características clínicas e evolutivas da população estudada. Pacientes submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica foram submetidos à coleta de 20ml de sangue pré e pós-cirurgia bem como fragmento de tecido atrial. Um total de 143 pacientes compuseram os grupos: FAPO (24 pacientes), controle genético (24 pacientes) e controle total (97 pacientes + 24 grupo controle genético). Do ponto de vista clínico observou-se maior idade, tempo de anóxia, tempo de internação em terapia intensiva e hospitalar no grupo FAPO. A análise genética revelou menor expressão do miRNA-23 no grupo FAPO ($p=0,02$). A comparação entre os períodos pré e pós-cirúrgico revelou redução dos três miRNAs no tempo pós-cirúrgico ($p<0,05$) e dos genes relacionados às proteínas de canal ($p<0,05$). A comparação no tecido não evidenciou alterações entre os grupos. Os genes relacionados às citocinas revelaram redução no período pós-cirúrgico ($p<0,05$) em ambos os grupos. Concluiu-se que o miRNA-23 pode ter implicação no surgimento da FAPO e outros miRNAs não estudados devem estar envolvidos neste processo uma vez que houve redução de outros genes de canais relacionados ao aparecimento de FAPO.

Descritores: Revascularização Miocárdica; Fibrilação Atrial; Cuidados Pós-Operatórios; miRNAs.

SUMMARY

Feldman A. *Expression analysis of miRNA in patients with acute atrial fibrillation in the post-operative period of coronary artery bypass graft surgery* [Thesis]. "São Paulo: Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, Entidade Associada à Universidade de São Paulo", 2015.

Atrial fibrillation (AF) is the most common arrhythmia after cardiac surgery. AF is related to cardiac structural changes although a group of patients still remains developing post-operative atrial fibrillation (FAPO) even without those changes, leading to more days in the hospital and costs. Recent studies showed that short fragments of RNA, called microRNA (miRNA) can contribute to the development of several diseases in the cardiovascular area. The aim of this study is to 1) compare the expression of miRNA-1, 23 and 26 between the group with and without FAPO; 2) compare, in the FAPO group, the expression of these miRNAs in the pre and post-surgery periods; 3) compare the expression of GJA1, KCNJ2, CACNB1, CACNA1C e KCNN3 genes between the pre and post-surgery periods; 4) compare this genes in atrial tissue; 5) compare the genes related to inflammation cytokines as interleukin(IL)-1, 6 and alpha tumoral necrosis factor between the groups in the pre and post-surgery periods; 6) evaluate clinical and evaluative patterns of the study population. Twenty milliliters of blood samples in the pre and post-operative periods and an atrial fragment were extracted from patients submitted to coronary artery bypass graft surgery. A total of 143 patients were divided in the FAPO group (24 patients), genetic control group (24 patients) and a total control (97 + 24 genetic control patients). The clinical analysis showed bigger age and clamp-time, more days in the intensive care unit and hospital in the FAPO group. The genetic analysis revealed less expression of miRNA-23 in the FAPO group ($p=0.02$). The comparison between the pre and post-surgery periods showed reduction in the three studied miRNAs ($p<0.05$) and reduction in the genes related to the production of the membrane protein channel sites. The comparisons in the atrial tissue didn't show any difference in the study groups. The cytokines showed post-surgery reduction ($p<0.05$) in both groups. The conclusion is that miRNA-23 can be implicated in FAPO as others miRNAs not studied can also be, once there was a significative reduction in the genes related to FAPO development.

Descriptors: Coronary artery bypass graft surgery; atrial fibrillation; post-operative care; microRNA.

1 INTRODUÇÃO:

A fibrilação atrial (FA) é a arritmia supraventricular na qual ocorre uma completa desorganização da atividade elétrica dos átrios fazendo com que estes percam sua capacidade de contração. Ao eletrocardiograma (ECG), a ausência de despolarização atrial organizada reflete-se com a substituição das ondas P, características do ritmo sinusal, por ondulações de alta frequência na linha de base que variam em sua forma e amplitude acompanhada por intervalos RR irregulares.¹ (figura 1) A fibrilação atrial foi demonstrada ao eletrocardiograma, pela primeira vez, há mais de cem anos² e, atualmente, é reconhecida como um grave problema de saúde pública.

Figura 1 - Traçado eletrocardiográfico evidenciando ritmo de FA.

1.1 Prevalência:

A prevalência da FA foi estimada em 596 casos para cada 100.000 homens e 373 casos para cada 100.000 mulheres, totalizando cerca de 33 milhões de indivíduos no mundo. Dados remetem a uma prevalência de 1 a 4% em adultos, podendo chegar a 13% em indivíduos com mais de 80 anos.³

Atualmente, a FA é a taquiarritmia cardíaca sustentada mais comum e a que mais deve aumentar na população mundial nos próximos anos.⁴ Acredita-se que, nos Estados Unidos, dos atuais três milhões de indivíduos com FA teremos, em 2050, aproximadamente 8 milhões. (figura 2) A idade é

o fator que mais impacta em seu surgimento sendo que países com maior número de idosos apresentam maior prevalência de FA.⁵

Figura 2 - Prevalência global de FA. Adaptado e traduzido com autorização de: Rahman F, et al. Nat. Ver. Cardiol. 11, 639-654 (2014)⁵

As principais complicações relacionadas com a FA são o tromboembolismo sistêmico e a insuficiência cardíaca, causadas pela ausência de contração atrial, frequência cardíaca elevada e irregularidade dos ciclos cardíacos. O tromboembolismo sistêmico está relacionado com a tríade de Virchow que inclui: estase sanguínea (favorecida pela ausência de contração atrial); anormalidades do endocárdio atrial e, estado de hipercoagulação, condição própria desencadeada por esta arritmia.

1.2 A fibrilação atrial no pós-operatório de cirurgia cardíaca

A incidência de arritmias atriais (incluindo a FA) após cirurgia cardíaca aberta situa-se entre 20 a 50% dependendo das definições e dos métodos de detecção.⁶ Dados de literatura estimam uma incidência entre 11 e 20% para pacientes submetidos à revascularização miocárdica, 30 a 40% para

correções valvares e em até 50% para procedimentos cirúrgicos associados.^{6,7} Nos últimos anos, a incidência de FA pós-operatória (FAPO) tem aumentado de forma significativa. Tal fato pode ser atribuído, muito provavelmente, pela maior incidência de idosos sendo submetidos a tratamento cirúrgico.⁷ A idade é, provavelmente, o principal fator de risco para o surgimento da FA. Na população geral, a frequência de FAPO aumenta 24% para cada 5 anos a partir dos 80 anos de idade.⁸ Em uma revisão com 915 pacientes em ritmo sinusal submetidos à cirurgia cardíaca, a razão de chances para desenvolvimento de FAPO foi de 1.51 por década.⁹ As causas desta relação se devem a alterações estruturais degenerativas que ocorrem no músculo cardíaco com o passar dos anos, a crescente perda de miócitos atriais e aumento de infiltrados fibróticos que podem criar múltiplas vias de reentrada induzindo ao aparecimento de arritmias supraventriculares.⁸

Dados de um estudo multicêntrico¹⁰ com 4.657 pacientes submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica (CRM) mostrou que a maior parte dos episódios de FA ocorre no segundo dia de pós-operatório com uma janela de surgimento principalmente entre o segundo e o quinto dias. A FAPO apresenta curso autolimitado com restabelecimento espontâneo do ritmo sinusal em mais de 90% dos pacientes em até seis a oito semanas após a cirurgia.¹⁰

1.2.1 Implicações clínicas da FAPO:

Os pacientes com FAPO têm maior mortalidade hospitalar do que os que não apresentam esta arritmia (4,7% vs 2,1%), além de maior tempo de internação e mortalidade em longo prazo.⁶ Destaca-se, ainda, maior risco de fenômenos tromboembólicos, principalmente para o sistema nervoso central que podem ocasionar acidente vascular encefálico (AVE).¹¹ Em uma série de casos com 4.000 pacientes, observou-se uma incidência de AVE mais elevada (3,3% vs 1,4%) em pacientes que desenvolveram FAPO.⁷

Adicionalmente, o desenvolvimento de FAPO pode levar a descompensação do quadro cardiovascular acarretando em maior tempo para a estabilização clínica e incremento do tempo de internação com elevação dos custos.⁸ De acordo com alguns autores, o tempo de internação pode aumentar em cerca de 2 a 4 dias em pacientes que desenvolvem FAPO.¹²

1.2.2 Fatores desencadeantes associados à FAPO:

1.2.2.1 Ativação do Sistema Nervoso Autônomo:

Após alguns anos de estudo, observou-se que o sistema nervoso autônomo desempenha um importante papel tanto no desencadeamento quanto na manutenção da FA em humanos.¹³ A manipulação cardíaca pode ser responsável por um desequilíbrio entre os sistemas simpático e parassimpático. Lesões locais e diretas das fibras simpáticas podem alterar a modulação autonômica das células atriais aumentando sua sensibilidade às catecolaminas e favorecendo o surgimento de FAPO. Adicionalmente, o tônus simpático pode também ser aumentado pela dor e pela resposta inflamatória induzida pelo procedimento cirúrgico, ocasionando maior liberação de catecolaminas que encurtam o período refratário atrial e propiciam o surgimento de ectopias atriais.¹³ No cenário de pós-operatório de revascularização miocárdica, a suspensão de betabloqueadores no período perioperatório pode desencadear um efeito rebote com efeitos pró-arritmogênicos.

1.2.2.2 Inflamação:

Marcadores inflamatórios como interleucinas (IL)-2, IL-6, IL-8, proteína C-reativa, fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e neutrófilos estão significativamente elevados na corrente sanguínea de pacientes submetidos à cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea (CEC). Acredita-se que a inflamação com neutrofilia esteja associada a alterações na condução do impulso elétrico tecidual e no período refratário atrial.¹³ Gaudino e cols¹⁴ mostraram a correlação entre o polimorfismo da IL-6 associado a seus níveis elevados e aumento da incidência de FAPO. Tais achados sugerem que um componente inflamatório da FAPO possa estar ligado à predisposição genética desta complicação.

O conceito de inflamação na FAPO é embasado por vários estudos clínicos desenhados com a intenção de suprimir a resposta inflamatória através de intervenções como, por exemplo, a cirurgia sem CEC. Uma meta-análise de estudos randomizados e controlados que avaliaram a incidência de FA após cirurgia de revascularização miocárdica com e sem CEC mostrou uma significativa vantagem da segunda abordagem na redução da FAPO (razão de chances de 0.427 com 841 pacientes estudados)¹⁵

1.2.2.3 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é uma condição na qual ocorre aumento da produção, além de acúmulo de radicais livres e radicais peróxidos celulares, que se associam à agressão a diversos componentes celulares (moléculas de ácido desoxirribonucleico, proteínas, carboidratos e lipídios celulares), e que podem culminar em apoptose celular e necrose tecidual. Um estudo caso-controle de Ramlawi e cols¹⁶ mostrou que pacientes que desenvolvem FAPO apresentam aumento de estresse oxidativo agudo, indicado pela presença de proteínas oxidadas no miocárdio após cirurgia cardíaca. Além disso, o estudo mostrou um aumento da expressão de alguns genes no

grupo com FAPO que estariam implicados no processo oxidativo contribuindo para sua perpetuação. Este foi o primeiro estudo a documentar uma evidência direta que correlaciona o estresse oxidativo à FA no pós-operatório de cirurgia cardíaca. Alguns estudos testaram a utilização de substâncias com propriedades antioxidantes como vitamina C, N-acetilcisteína e estatinas com resultados favoráveis, mas tratam-se de resultados preliminares que necessitam ser mais profundamente estudados.¹⁷⁻¹⁹

1.2.2.4 Volemia:

O desenvolvimento da FAPO pode estar relacionado com hipovolemia ou hipotensão. A perda de sangue ou a diminuição do retorno venoso causa diminuição do débito cardíaco e, conseqüentemente, redução da oferta de oxigênio. Tal condição contribui para a liberação de catecolaminas pela glândula suprarrenal, o que tem efeito pró-arrítmico.²⁰

Adicionalmente, a hipervolemia pode também ser um fator que contribui para o surgimento da FAPO, pois aumenta a estimulação mecânica do átrio causada pela sua distensão. Este efeito associa-se ao aumento da frequência de ectopias atriais além de levar à redução na duração do potencial de ação atrial. Essas duas condições aumentam o risco de desencadeamento de FA, particularmente em pacientes predispostos, como acontece no pós-operatório de cirurgia cardíaca.¹³

O estudo *Atrial Fibrillation Supression Trial II* mostrou que pacientes que desenvolvem FA após cirurgia cardiotorácica receberam, nos primeiros cinco dias, cerca de 1000ml de solução cristalóide a mais em relação aos que não desenvolveram a arritmia.²¹ Notou-se também que o balanço hídrico no segundo dia de pós-operatório é um forte preditor para o aparecimento de arritmias.²¹

1.2.2.5 Hipóxia:

A hipóxia é um dos fatores desencadeantes de arritmias supraventriculares mais comumente observados na prática clínica.¹³ Tal condição leva à redução no conteúdo arterial de oxigênio culminando com elevação da atividade simpática, taquicardia e vasoconstricção, acarretando incrementos na pós-carga ventricular e no consumo de oxigênio miocárdico.¹³ Além disso, a hipóxia causa vasoconstricção pulmonar com aumento da sobrecarga ventricular direita e distensão atrial. Por fim, ressalta-se que a hipóxia aguda pode causar injúria isquêmica às células atriais alterando, assim, as propriedades de suas membranas celulares. Como consequência, observa-se uma desorganização da atividade elétrica miocárdica que deflagra arritmias atriais.¹³

A relação entre FAPO e hipóxia torna-se evidente pela sua elevada incidência em pacientes com apnéia obstrutiva do sono e doença pulmonar obstrutiva crônica.¹³

1.2.2.6 Anemia:

A anemia no período perioperatório é um conhecido fator de risco para FAPO. Esta condição produz intensa ativação da atividade adrenérgica para tentar elevar o débito cardíaco e melhorar a oferta de sangue tecidual. Apesar da transfusão de hemácias ser uma prática clínica muito comum, não há evidência científica que esta conduta diminua a incidência de FAPO. Existe, pelo contrário, alguns dados que correlacionam a transfusão de sangue a uma maior incidência de FAPO.²²

1.2.2.7 Alterações metabólicas:

Distúrbios metabólicos atuam como gatilhos para FAPO em pacientes com predisposição para esta condição. A tríade obtida por acidose metabólica, uso de catecolaminas e predisposição miocárdica consiste numa importante associação que leva ao surgimento de arritmias ventriculares e supraventriculares.²³

Hipotireoidismo e hipoglicemia são outras condições clínicas que predisõem ao aparecimento de FAPO além de serem fatores de pior evolução clínica no pós-operatório.¹³

Os distúrbios hidroeletrólíticos são fatores de grande importância na gênese da FAPO. Alterações dos níveis séricos de potássio e magnésio já estão bem documentadas como fatores diretamente relacionados às arritmias supraventriculares no pós-operatório de cirurgia cardíaca. Em um estudo prospectivo, Walsh e cols²⁴ demonstraram a correlação entre baixos níveis séricos de potássio em pacientes com arritmias no período pós-operatório. Adicionalmente, mostraram que a deficiência de magnésio contribui de forma direta na instabilização da membrana celular aumentando a incidência de arritmias. A utilização de magnésio no período perioperatório reduz a incidência de FAPO de forma significativa.²⁵ A figura 3 abaixo esquematiza os principais fatores desencadeantes da FAPO.

Figura 3 - Fisiopatologia da FAPO.

1.3 A relação entre FA, canais iônicos transmembrana e alterações genéticas

A associação entre componentes estruturais e componentes iônicos é essencial para a propagação do impulso elétrico pelas células miocárdicas. Quando alterações estruturais cardíacas, fatores genéticos ou fatores iatrogênicos modificam esta harmonia, podem ocorrer alterações na atividade elétrica cardíaca, acarretando em efeitos nos átrios ou ventrículos.²⁶

A fisiopatologia da FAPO parece estar relacionada a disfunções dos canais iônicos, denominadas canalopatias, que promovem a condução de íons por gradiente eletroquímico.²⁷ Estes canais iônicos (figura 4) são formados por proteínas que são codificadas por uma grande família de genes. Há estudos que relatam que tais genes codificam mais de 400 proteínas que fazem parte da estrutura destes canais.²⁸ Dentre tais canais podem-se destacar os de sódio presentes nos neurônios, miócitos e musculatura esquelética; canais de cálcio, com pelo menos cinco tipos diferentes de proteínas na membrana plasmática e, os canais de potássio que promovem correntes de hiperpolarização nas células.

O canal de potássio voltagem-dependente consiste em um agregado de quatro domínios proteicos semelhantes aos que existem como subunidades independentes.²⁹ Este canal apresenta pelo menos três fases: fase de fechamento, quando o canal não conduz íons; fase de abertura, quando o canal conduz aproximadamente 10^7 íons por segundo; e fase inativa, quando o canal não pode ser aberto ou fechado.²⁹ O fechamento e a abertura dos canais dependem das mudanças no potencial elétrico transmembrana. Durante a fase de potenciais negativos eles estão abertos, favorecendo a repolarização celular e, em potenciais positivos encontram-se fechados. Os mecanismos moleculares pelos quais ocorrem abertura e fechamento dos canais e a seleção do íon específico ainda necessitam ser elucidados. Contudo, há evidências de que a análise de fatores genéticos poderia auxiliar na identificação das bases moleculares que implicam em alterações das funções dos canais.²⁹

Figura 4 - Esquema representativo de canais iônicos atriais com algumas subunidades. Os genes SCN5A, SCN1B, SCN2B codificam proteínas responsáveis pela estrutura dos canais de sódio e estão relacionados com a despolarização celular. Os genes KCNJ2, KCNA5 e KCNQ1 estão relacionados aos canais de potássio importantes no processo de repolarização celular. O gene GJA5 está associado à síntese de conexina 40, proteína estrutural das junções comunicantes, importante para condução do impulso elétrico entre as células.

Um dos modelos que são propostos para a patogênese da FA decorre da diminuição do período refratário atrial como substrato para o mecanismo de reentrada e seu desenvolvimento. Tal redução está relacionada com a aceleração da fase de repolarização mediada pelos canais de potássio.

A curva do potencial de ação normal mostra o que ocorre na célula atrial durante sua ativação. A fase 0 compreende à entrada de sódio na célula, tornando seu interior eletricamente positivo o que leva ao processo que é conhecido como despolarização. As fases 1, 2 e 3 compreendem o processo de repolarização. Na fase 1 ocorre, predominantemente, a entrada de íons cloreto. Na fase 2, dá-se a troca de íons cálcio e potássio responsáveis pela fase de platô do potencial de ação. Nas fases 1, 2 e 3 o miócito encontra-se irresponsivo a qualquer estímulo elétrico externo, o que caracteriza o período refratário absoluto celular (Figura 5).

Figura 5 - Potencial de ação evidenciando cada fase e sua respectiva troca de íons. PRA: período refratário atrial. Adaptado do original em: http://www.uff.br/fisio6/aulas/aula_07/topico_01.htm (acesso em 21/12/2014)

A existência do período refratário evita com que o coração possa evoluir com tetania quando submetido à estimulações rápidas e minimiza a

possibilidade de despolarizações em repetição, o que levaria à taquicardia intensa. Deste modo, o prolongamento do período refratário atrial teria efeito antiarrítmico enquanto o seu encurtamento, efeito oposto, ou seja, efeito pró-arritmogênico. Na prática clínica, por exemplo, fármacos que prolongam a repolarização atrial e, conseqüentemente, o período refratário atrial (por exemplo a amiodarona), reduzem o risco de taquicardias atriais, como a fibrilação atrial.

Atualmente, sabe-se que alterações no influxo celular de potássio e cálcio leva ao encurtamento das fases 1,2 e 3 do potencial de ação com conseqüente diminuição do período refratário atrial. Tal condição expõe o miócito a estímulos sequenciais fazendo com que os mesmos respondam, desencadeando uma arritmia. Em outras palavras, o encurtamento da refratariedade atrial permite que a célula seja ativada a frequências progressivamente crescentes.

Como já mencionado acima, os canais iônicos de membrana são determinantes para que a atividade elétrica atrial ocorra de forma adequada. Alterações na estrutura ou função destes canais podem ser decorrentes de uma falha em sua síntese a partir de mutações no DNA (herança genética) que implicariam no surgimento de arritmias desde a idade mais jovem ou por falha na síntese de canais ou suas subunidades a partir do bloqueio dos genes (através da ligação com microRNAs) responsáveis pela sua produção (arritmia de surgimento mais tardio).

Desta forma, a alteração da expressão de alguns genes leva a modificações em determinadas subunidades de canais de membrana com conseqüente prejuízo na troca iônica e diminuição na duração do potencial de ação e da refratariedade atrial, o que propicia o surgimento de arritmias. (tabela 1) Este modelo está embasado em estudos que mostraram que a mutação de alguns genes, responsáveis pela síntese de canais iônicos cardíacos, alteravam a refratariedade atrial ou amplificavam o mecanismo de reentrada.³⁰⁻³³

Tabela 1 – A relação entre gene e seus efeitos fisiológicos³⁴⁻³⁶

Genes	Efeito na função	Efeito fisiológico
CACNA1C	Perda de função do gene	Aumenta a atividade de reentrada e aumenta a refratariedade atrial
KCNJ2	Aumento de função do gene	Diminui a DPA
CACNB1	Perda de função do gene	Aumenta a atividade de reentrada e aumenta a refratariedade atrial
KCNN3	Aumento da função do gene	Diminui a DPA
GJA1	Diminuição da transmissão célula-célula	Alteração das regiões de condução

Legenda: DPA: duração do potencial de ação.

A figura 6 abaixo ilustra a curva de potencial de ação atrial relacionando cada fase com a corrente iônica envolvida e a respectiva subunidade genética responsável pela alteração da corrente em questão.³⁷

Figura 6 - Relação entre correntes iônicas e duração do potencial de ação. O potencial de ação é iniciado pelo influxo rápido de íons Na⁺ (fase 0), seguido pelas fases 1,2 e 3 (repolarização) na qual a cor vermelha representa o influxo e a cor azul o efluxo de correntes. Os principais genes que codificam a síntese dos canais seguem ao lado direito da figura. Legenda: Na⁺ corrente: corrente de influxo de sódio; L-type Ca²⁺ corrente: corrente de influxo de cálcio de longa duração; T-type Ca²⁺ corrente: corrente de influxo de cálcio transitória; I_{Ks}: corrente de efluxo muito lenta de potássio; I_{K1}: corrente de efluxo de potássio não dependente de voltagem.

1.4 A biologia molecular envolvida na FA

1.4.1 Bases de biologia molecular

As bases da transmissão de caracteres hereditários estão contidas dentro da molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA). A importância do DNA consiste justamente na forma com que a sequência de bases nitrogenadas encontra-se disposta (código genético), pois a partir da leitura deste código produzir-se-ão proteínas específicas que determinarão as características e o funcionamento do organismo. Para tal, o código do DNA é transcrito em RNA mensageiro (mRNA). Este último sai do núcleo celular em direção ao citoplasma onde se encontra com ribossomos que são estruturas que farão a leitura da sequência de bases do RNA (processo chamado de tradução) e formarão uma determinada proteína (figura 7).

Figura 7 - Produção de proteínas a partir do código genético. Adaptado de: <http://discovermagazine.com/2009/oct/03-sea-change-challenging-biologys-central-dogma> (acesso em 25/10/2014).

Em um estudo de associação realizado na China,³⁰ a FA isolada foi herdada em quatro gerações como um padrão autossômico dominante. A mutação S140G do gene do canal de potássio KCNQ1 permitiu a

associação entre as canalopatias e FA. Estudos eletrofisiológicos revelaram o ganho de função na corrente elétrica do canal de potássio voltagem-dependente quando o gene mutado é expresso. Este ganho de função acelera a fase 3 do potencial de ação por facilitação da saída dos íons potássio, o que explicaria a diminuição da duração do potencial de ação e do período refratário, favorecendo o desenvolvimento da FA.³⁰

Até há algum tempo atrás, as alterações genéticas eram atribuídas somente a alterações primárias na cadeia de DNA (mutações) que consequentemente levavam a produção de proteínas estruturalmente diferentes daquelas inicialmente designadas para um adequado funcionamento do organismo. Tal fisiopatologia explica os casos de FA de origem familiar ou FA em jovens sem doença estrutural. Porém, mais recentemente, descobriu-se que o processo de produção de proteínas pode ser afetado mesmo sem que a sequência de bases nitrogenadas seja alterada: surgiu a epigenética.

Epigenética é a ocorrência de alterações que ocorrem no funcionamento de um gene sem que haja alteração no DNA primário.³⁸ As alterações epigenéticas são potencialmente reversíveis e podem ser desencadeadas pelo ambiente, dieta, infecções, intervenção medicamentosa ou cirúrgica. Desta forma, apesar do DNA primário estar íntegro, existe um bloqueio ou uma interferência no processo de tradução proteica que leva a não produção ou a produção modificada de uma proteína.

1.4.2 Epigenética relacionada a arritmogênese

Há menos de duas décadas, as alterações genotípicas primárias (mutação) da sequência do DNA eram consideradas como o evento que causaria o aparecimento das mais diversas doenças monogênicas. Tais alterações modificam a expressão do transcrito (mRNA) e, por conseguinte, a síntese proteica ocasionando a manifestação fenotípica (doença e sintomas).

Porém, mais recentemente, descobriu-se que o processo de produção de proteínas pode ser afetado mesmo sem que a sequência genética esteja alterada caracterizando, assim, os fenômenos epigenéticos. Portanto, como já descrito previamente, a epigenética tem sido descrita como mudanças na função de um gene alterando a produção de proteínas.³⁸

Recentemente, os mecanismos associados à regulação da expressão gênica para arritmogênese tem atraído enorme atenção entre os pesquisadores, principalmente as mudanças na expressão dos genes mesmo na presença da estabilidade genômica,^{39,40} tornando-os mecanismos patogênicos potencialmente importantes em doenças multifatoriais complexas como FA. Os fatores epigenéticos como metilação do DNA nas regiões que controlam a expressão gênica, modificações das histonas, e os microRNAs (miRNA) podem estar envolvidos nas alterações fenotípicas mesmo na presença de sequência de DNA idênticos.^{41,42}

1.4.3 O papel dos microRNAs no surgimento de doenças

Os miRNAs, recém descoberta classe de reguladores da expressão gênica, estão sendo relacionados a inúmeros processos biológicos e o estudo de seu papel na biologia cardiovascular está em seus primórdios. Nos últimos anos, estudos experimentais em animais começaram a revelar o importante papel dos miRNAs na fisiopatologia cardiovascular.⁴³

MicroRNAs são pequenos fragmentos não codificadores de RNA compostos por 17-25 nucleotídeos que regulam a expressão de genes alvo bloqueando, assim, a tradução do mesmo. Apesar de conhecidos há vários anos, não se sabia o real papel dos miRNAs no código genético. Mais recentemente, descobriu-se que os miRNAs apresentam importante função na regulação de diversos genes levando a grandes implicações clínicas em várias doenças. Tal descoberta abriu um enorme campo de pesquisa que promete a intervenção em algumas doenças através de um mecanismo alternativo ao atualmente empregado.

Diferentemente dos fatores de transcrição que regulam a expressão de genes em nível transcricional, os miRNAs primariamente silenciam o mRNA em nível pós-transcricional interferindo na síntese proteica das células. Resumidamente, o processo de transcrição ocorre normalmente porém existe uma interferência por parte do miRNA no processo de tradução. Desta forma, a produção de proteínas (como por exemplo: receptores transmembrana de cálcio, potássio ou mesmo receptores para fármacos como betabloqueadores) poderiam ter sua produção prejudicada interferindo, desta maneira, em determinada função orgânica (figura 8).

Figura 8 - Bloqueio da tradução de proteína por microRNAs. Adaptado de: <http://discovermagazine.com/2009/oct/03-sea-change-challenging-biologys-central-dogma> (acesso em 25/10/2014).

Recentemente, um crescente número de estudos tem investigado a presença de miRNAs no sangue. Estes trabalhos reportaram alterações na expressão dos miRNAs e introduziram o conceito de que os miRNAs circulantes podem ser considerados marcadores fidedignos de várias doenças,⁴⁴⁻⁴⁷ incluindo a FA.⁴⁸ Laterza e cols.⁴⁹ estabeleceram o princípio geral de que os biomarcadores das doenças são secretados para a circulação sistêmica após a lesão tecidual. Além disso, os autores também

demonstraram que a circulação de miRNAs pode servir como indicadores do que está acontecendo nos tecidos. De forma semelhante, outro estudo realizado por Kosaka⁵⁰ relatou como estes miRNAs circulantes são liberados e, em seguida, transferidos para compartimentos onde podem retomar suas funções. Dados recentes sugerem que os miRNAs estejam envolvidos no controle da excitabilidade cardíaca e na arritmogênese em condições patológicas.⁵¹⁻⁵⁵

1.4.3.1 Os principais miRNAs relacionados à FA

Até o presente momento são iniciais as pesquisas que relacionam os miRNAs à FA em pacientes ambulatoriais, também conhecida como FA clínica. No cenário de pós operatório de cirurgia cardíaca, até o presente momento, não há estudos que avaliaram a relação entre miRNA e FA.

Na FA clínica, Luo e cols.⁵⁶ encontraram elevação do miRNA-26 em pacientes com FA bem como sua correlação com o gene KCNJ2 documentando a disfunção deste último na amostra de seus pacientes. Wang e cols.⁴⁸, em revisão sobre o tema, mostraram que, em modelos com animais e com humanos ,existe correlação entre miRNA-1 e os genes GJA1 e KCNJ2 responsáveis pela adequada condução do estímulo cardíaco entre as células. Ainda nesta revisão, o miRNA-328 esteve relacionado aos genes CACN1C e CACNB1 mostrando-se como preditores independentes para o surgimento de FA.

1.5 Racionalidade

Tendo em vista um novo horizonte complementando a fisiopatologia de diversas doenças cardiovasculares através da ação dos miRNAs aliado à ausência de estudos, até o presente momento, para explicar o envolvimento destes no surgimento da FA no cenário pós operatório, o

presente estudo tem por razão estudar a relação entre miRNAs e FAPO tendo em vista que atualmente estão em desenvolvimento novas moléculas que visam neutralizar (antisense) ou antagonizar (AntagomiRNA – pesquisas “*first in man*” na área cardiovascular previstas para iniciar no ano de 2017⁵⁷) tais fragmentos genéticos potencializando a prevenção e o tratamento destes eventos na prática clínica futura.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos primários:

1. Comparar a expressão dos miRNA1, miRNA-23a e miRNA-26a, na amostra de plasma pós-cirúrgica, entre os grupos FAPO e controle genético.
2. No grupos FAPO e controle genético, comparar a expressão destes miRNAs entre os tempos pré e pós-cirúrgico.
3. No grupo FAPO, comparar a expressão dos genes GJA1, KCNJ2, CACNB1, CACNA1C e KCNN3 entre os tempos pré e pós-cirúrgico.

2.2 Objetivos secundários:

1. Comparar a expressão dos genes GJA1, KCNJ2, CACNB1, CACNA1C e KCNN3 na amostra de tecido atrial entre os grupos FAPO e controle genético.
2. Comparar a expressão dos genes relacionados à produção de IL-1, IL-6 e TNF α entre os grupos FAPO e controle genético nos tempos pré e pós-cirúrgico.
3. Descrever as características basais e a evolução clínica da população.

3 MATERIAIS E MÉTODOS:

3.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo observacional prospectivo.

3.2 Local da pesquisa

Centro cirúrgico, Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e Enfermaria do setor de Coronária do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC).

3.3 Elegibilidade:

Pacientes que foram submetidos à CRM isolada e em ritmo sinusal previamente ao procedimento comprovado por eletrocardiograma pré-operatório.

3.4 Amostragem

A amostra foi constituída pelos pacientes que foram submetidos à CRM de forma consecutiva no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, desde Janeiro de 2012 a Janeiro de 2014.

3.5 Critérios de exclusão:

Foram excluídos os pacientes que apresentavam as seguintes características clínicas, eletrocardiográficas ou ecocardiográficas:

- Ritmo não sinusal ou uso de marca-passo;
- Doença estrutural cardíaca prévia (como valvopatia ou miocardiopatia) moderada ou grave (exceto doença arterial coronária);
- Aumento de câmara atrial esquerda (diâmetro > 40mm) ou ventricular esquerda (diâmetro > 56mm) ao ecocardiograma pré-operatório;
- Uso de drogas ilícitas;
- Hipertireoidismo;
- Hipotireoidismo clínico tratado com levotiroxina
- Evidência clínica ou através de exame de imagem de disfunção ventricular. (fração ejeção < 55% ao ecocardiograma)
- Uso de antiarrítmicos

3.6 Desenho da pesquisa

Amostras de sangue periférico em volume de 20ml foram obtidas imediatamente antes do início da cirurgia (tempo zero) através de acesso venoso profundo por via subclávia que é inserido como parte da rotina, imediatamente antes do início do procedimento cirúrgico. Os pacientes foram submetidos à CRM conforme previamente programada pela equipe clínica e cirúrgica.

Durante a colocação do paciente em circulação extracorpórea foi obtida pequena amostra de tecido atrial do paciente (1cm x 1cm). Tal material é ressecado a partir do local onde habitualmente é realizada a canulação para colocação do tubo de circulação extracorpórea. O tamanho diminuto da amostra não deve causar qualquer prejuízo à função cardíaca do paciente.

Na unidade de terapia intensiva (UTI), nova coleta de 20 ml de sangue foi realizada após 48 horas do término da cirurgia através da mesma via de acesso central. A escolha de 48 horas para coleta da segunda amostra de sangue se deve a este ser o tempo que, em média, observa-se uma maior incidência no surgimento de FAPO.^{6,10}

Os pacientes foram acompanhados com coleta de dados de forma observacional no período pós-operatório até a alta hospitalar. Foram coletados dados clínicos referentes à amostra populacional como idade, peso, altura, sexo, fatores de risco para doença arterial coronária (DAC), uso de medicações no período pré-operatório e eventual suspensão das mesmas, magnitude das lesões ao cateterismo, função ventricular, presença e quantificação de hipertensão pulmonar e doença pulmonar crônica.

Durante o período de internação foram obtidos dados como: tempos cirúrgicos de perfusão e anóxia, balanços sanguíneo e hídrico intraoperatório, balanço hídrico na unidade de terapia intensiva, tempo de intubação (IOT), uso de medicação com ação vasoconstrictora, taxa de transfusão de hemoderivados, valores séricos de bicarbonato, potássio e lactato à admissão e no primeiro dia de pós-operatório.

Os pacientes foram avaliados quanto ao surgimento de FAPO, presença de instabilidade hemodinâmica durante este episódio, utilização e dose de fármaco para reversão, tempo até reversão e necessidade de cardioversão elétrica (CVE). Outros desfechos como tempo de internação em UTI e hospitalar e aparecimento de complicações como AVE e infarto perioperatório foram avaliados para comparação entre os grupos.

O fluxograma 1 abaixo esquematiza as etapas às quais os pacientes estudados foram submetidos:

Fluxograma 1 - Esquema de obtenção de dados e materiais

3.6.1 Inclusão dos pacientes

A inclusão dos pacientes foi feita de forma consecutiva durante o período de recrutamento. Este período foi interrompido ao se atingir 24 pacientes no grupo FAPO. Neste momento, o grupo controle apresentava um número maior de pacientes (n=143). Desta forma realizou-se um sorteio, através do uso de envelopes, de 24 pacientes que constituíram o grupo controle genético que foi submetido, conjuntamente ao grupo FAPO, às análises de expressão gênica. Os 119 pacientes restantes formaram o grupo controle total.

Para a análise dos parâmetros clínicos e evolutivos foram comparados os três grupos: grupo FAPO (n=24), grupo controle genético (n=24) e grupo controle total (n=119).

3.6.2 Dados estudados

Os três grupos foram comparados, através de análise estatística, quanto aos dados clínicos pré-cirúrgicos, perioperatórios e evolutivos (tabela 2).

Entre os grupos FAPO e controle genético, comparou-se a expressão dos miRNA-1, miRNA-23 e miRNA-26 em amostra de sangue coletado no

pós-operatório. Em outra análise, comparou-se a expressão entre os miRNAs acima citados nas amostras pré e pós-cirurgia dos pacientes do grupo FAPO e controle. Conforme descrito anteriormente, a escolha destes tipos de miRNAs foi feita baseada em estudos em FA clínica que mostraram que alterações nestas estruturas estavam relacionadas ao desenvolvimento de FA.^{48,56} Não há estudos com miRNAs no cenário de pós-operatório de cirurgia cardíaca o que confere a originalidade deste estudo.

Entre os grupos FAPO e controle genético, comparou-se a expressão dos genes GJA1, KCNJ2, CACNB1, CACNA1C e KCNN3 em amostra de sangue coletado no pós-operatório. Adicionalmente, estes mesmos genes foram comparados entre as amostras pré e pós-cirúrgica no grupo FAPO. A escolha destes genes baseia-se na observação de que, em alguns estudos, alterações na função e estrutura destes canais iônicos levam ao desenvolvimento de FA em pacientes ambulatoriais.^{31,58-61} Além disso, outros estudos correlacionam a interferência dos miRNAs acima citados na expressão destes genes em particular.^{48,53,56}

Comparou-se, entre os grupos FAPO e controle genético, os genes GJA1, KCNJ2, CACNB1, CACNA1C e KCNN3 na amostra de tecido atrial direito. Sabe-se que, na maioria dos pacientes que desenvolve FA, a origem desta arritmia está no átrio esquerdo. Porém, Gaborit e cols.⁶² reportaram a ausência de diferença, entre tecido atrial direito e esquerdo de pacientes com coração estruturalmente normal, com relação à expressão dos principais genes avaliados neste estudo.

A resposta inflamatória pós operatória foi comparada através da expressão dos genes responsáveis pela produção de interleucina (IL)-1, IL-6, e TNF α em amostra de sangue pós-cirúrgico dos pacientes FAPO e controle genético. A escolha destes marcadores advém de sua elevação em diversas doenças na área cardiovascular.^{63,64}

Tabela 2 - Resumo das análises realizadas

Material analisado	Grupo analisado	Material estudado
miRNAs	FAPO vs Controle genético	Pós-cirúrgico ^δ
miRNAs	Grupo FAPO	Pré vs Pós ^δ
miRNAs	Grupo Controle	Pré vs Pós ^δ
Genes canais iônicos	Grupo FAPO	Pré vs Pós ^δ
Genes canais iônicos	FAPO vs Controle genético	Tecido atrial
Citocinas	FAPO vs Controle genético	Pré e Pós-cirúrgico ^δ

^δem amostra de sangue

3.7 Definição de FAPO

Fibrilação atrial foi definida como ritmo irregular na ausência de ondas P ao eletrocardiograma acompanhado de intervalos RR irregulares. Foi considerado FAPO o surgimento deste padrão eletrocardiográfico no pós-operatório de cirurgia cardíaca, mantido por pelo ao menos 30 minutos e com necessidade de reversão química através de antiarrítmicos ou reversão elétrica através de cardioversão sincronizada.

3.8 Manejo cirúrgico e cuidados pós-operatórios:

Os pacientes foram submetidos a anestesia geral e esternotomia mediana. Todos os procedimentos foram realizados com a utilização de circulação extracorpórea (fluxo não pulsátil) e canulação da aorta ascendente e átrio direito. A anticoagulação com heparina não fracionada foi realizada com vistas a se atingir um tempo de coagulação ativado ao redor de 450 segundos. Antes da anticoagulação as amostras de sangue eram coletadas para posterior análise no setor de biologia molecular. O paciente

foi mantido em hipotermia com temperatura próxima a 33°C e clampeamento intermitente para possibilitar a realização das anastomoses coronárias.

O manejo pós-operatório foi realizado em ambiente de UTI por pelo menos 48 horas estando sua alta para enfermaria condicionada à estabilização clínica. Pacientes que não apresentam contraindicação ao uso de betabloqueadores receberam a medicação (propranolol na dose de 20mg a cada 8 horas) a partir do primeiro dia de pós-operatório. Outras medicações utilizadas de rotina incluem: ácido acetilsalicílico, estatina e heparina. Todos os pacientes estiveram monitorizados ininterruptamente quando do período em que permanecerem internados em UTI.

Após estabilização clínica os pacientes foram transferidos à enfermaria onde permaneceram em acompanhamento pelo médico assistente.

Cabe ressaltar que o manejo cirúrgico e clínico, quer seja na UTI ou enfermaria, foi conduzido pelo médico assistente de cada paciente qualquer sem interferência por parte dos colaboradores deste estudo.

Os pacientes que evoluíram com FAPO foram conduzidos conforme o protocolo do serviço que utiliza a amiodarona (dose de ataque de 300mg e manutenção de 600-900mg a cada 24 horas em bomba de infusão contínua) para reversão de ritmo em pacientes estáveis. Em pacientes com instabilidade clínica, a cardioversão elétrica é o procedimento de escolha com choques bifásicos com carga de 120J.

3.9 Coleta e confidencialidade dos dados

O formulário de coleta de dados (Anexo A) identifica o paciente pelo número correspondente e pelo nome para inclusão no banco de dados. Somente foi permitido o acesso ao banco de dados àqueles que participam da pesquisa. Os dados clínicos obtidos foram e serão mantidos em caráter confidencial. Após a coleta, os dados foram inseridos em banco eletrônico de dados no programa Microsoft Excel versão 2010.

3.10 Método utilizado para a análise da expressão gênica

No presente estudo, avaliou-se a expressão dos genes KCNJ2, GJA1, CACNB1, CACNA1C, KCNN3, IL-1, IL-6 e TNF α no sangue total conservado nos tubos PAXgene (Becton, Dickinson and Company, EUA) e tecidos de átrio obtidos no momento da cirurgia de revascularização. Além disso, também avaliou-se a expressão dos miRNA relacionados. Os reagentes específicos (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha) foram utilizados para a extração de RNA mensageiro (mRNA) e miRNAs. O controle de qualidade das amostras de mRNA e miRNA foi realizado utilizando-se reagentes específicos para cada tipo de amostra biológica.

A reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) para a análise da expressão de mRNA e miRNA utilizou-se de reagentes comerciais específicos e pré-determinados (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha). (Fluxograma 2)

Fluxograma 2 - Fluxograma da análise de expressão de mRNA e miRNA pela qPCR.

3.10.1 Obtenção de mRNA do sangue total e no tecido atrial

Para a avaliação da expressão gênica utilizando o método de qPCR é necessário obter amostras de mRNA de qualidade. Para isso, os tubos PAXgene (QIAGEN® GmbH, Hilden, Alemanha) contendo aditivos de estabilização foram utilizados na coleta para garantir uma melhor conservação de RNA das amostras de sangue total. Esses tubos foram armazenados no congelador a -30°C até o momento de seu processamento. Na extração de mRNA, utilizou-se o *kit PAXgene blood RNA*, número do catálogo 762174 (QIAGEN® GmbH, Hilden, Alemanha). Os procedimentos para obtenção de RNA seguiram o protocolo do fabricante (Apêndice 1).

O fragmento de tecido do átrio direito obtido antes da canulação da cava superior foi conservado em solução estabilizante de RNAlater® (Life Technologies, CA, EUA) e congelado a -30°C até o momento do processamento. Para a obtenção de RNA do tecido atrial utilizou-se o kit RNeasy Fibrous Tissue, número do catálogo 74704 (QIAGEN® GmbH, Hilden, Alemanha). Os procedimentos seguiram o protocolo do fabricante (Apêndice 2).

3.10.2 Análise da integridade de mRNA

Após a obtenção das amostras de RNA, analisou-se sua integridade no sistema de eletroforese capilar utilizando o equipamento *Tape Station 2200* (Agilent Technologies, Inc. UK) e reagente *R6K Screen Tape* (Agilent Technologies, Inc. UK). Todas as amostras de mRNAs analisados neste estudo tiveram o índice de integridade equivalente RINe (RNA *integrity number equivalent*) acima de 7,0 (Figura 9). Vale ressaltar que este procedimento é essencial para verificar se houve degradação ou contaminação da amostra por solventes orgânicos que possam tornar imprecisos os resultados.

Figura 9 - Exemplo da análise da integridade de RNA de sangue periférico e tecido atrial. A primeira coluna (A0) corresponde ao padrão de massa molecular. As colunas (B1, C1 e D1) representam a corrida eletroforética de 3 amostras de RNA com os respectivos números de integridade (RNA integrity number -RIN). O gráfico mostra os picos 18s e 28s indicando uma integridade satisfatória.

3.10.3 Síntese de DNA complementar a partir de mRNA

A molécula de mRNA é bastante instável e, com o objetivo de facilitar a manipulação em laboratório sem prejuízo da qualidade dos resultados, as amostras de mRNA foram transcritas em DNA complementar (cDNA) por meio de reação catalisada por enzimas. O cDNA é uma amostra de material genético que é obtida por apresentar maior estabilidade e, assim, garantir melhor preservação do material para posterior análise por qPCR.

Após a quantificação e verificação da integridade das amostras de RNA, realizou-se a transcrição reversa utilizando 400ng de RNA de cada amostra. O reagente empregado foi *QuantiTect Reverse Transcription* (QIAGEN® GmbH, Hilden, Alemanha) e a reação foi realizada em termociclador *Mastercycler Personal* (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha).

3.10.4 Determinação do volume ideal de cDNA para a reação de qPCR

Com o objetivo de determinar o volume ideal de cDNA para ser utilizado na reação de qPCR, foi preparado inicialmente um “pool” com 10

amostras de cDNA escolhidas aleatoriamente na população. Depois, realizou-se a análise de qPCR utilizando os volumes crescentes do “pool” de cDNA (0,5; 1, 2, 4 µl) conforme a figura 10. Para a escolha do volume ideal de cDNA, considerou-se o número de Ct (ciclo de *threshold*) ideal e disponibilidade de volume suficiente para a análise de todos os genes escolhidos para este estudo. Assim sendo, optou-se pelo volume de 1 µl de cDNA para a análise de expressão de mRNA por qPCR.

Figura 10 - Determinação do volume ideal de cDNA para RT-PCR. Análise de expressão dos genes utilizando volumes crescentes de cDNA. O eixo Y representa os ciclos de *threshold* (CT) e no eixo X estão as diluições de cDNA testadas na reação de qPCR em tempo real.

3.10.5 Escolha do gene de referência para reação de qPCR

O gene de referência, também denominado de gene endógeno ou gene “*house keeping*”, é usado como controle interno da reação de qPCR para minimizar as variações causadas por degradação de RNA, presença de inibidores na amostra de RNA, deficiências na transcrição reversa ou na recuperação de ácido nucléico, além de possíveis erros de manipulação do ensaio.

Escolheu-se o gene *GAPDH* como gene de referência deste trabalho, porque é comumente usado para estudos de expressão gênica em sangue periférico.

3.10.6 Análise da expressão gênica por qPCR

A lista dos genes avaliados neste estudo está na Tabela 3. A reação de qPCR foi realizada no equipamento RotorGene® (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha), utilizando os reagentes *Quantifast Multiplex PCR*, sistema TaqMan® (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha) cujo protocolo encontra-se no Apêndice 3. A escolha do gene de referência para a reação de qPCR está contida no Apêndice 4.

Tabela 3 - Relação dos genes em que foram estudados a expressão gênica por qPCR e as respectivas identificações dos genes no NCBI*

Genes	Identificação do gene	Referência do Transcrito	Catálogo Qiagen®
KCNJ2	3759	NM_000891 (5397pb)	QF00265223
GJA1	2697	NM_000165 (3130 pb)	QF00005404
TNF	7124	NM_000594 (1686 pb)	QF00062811
CACNB1	782	NM_000723 (3742 pb)	QF00238070
CACNA1C	775	NM_000719 (13480 pb)	QF00050351
KCNN3	3782	NM_002249 (13035 pb)	QF00393449
IL1A	3552	NM_000575 (2943 pb)	QF00021469
IL6	3569	NM_000600 (1201 pb)	QF00097405

Legenda: NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*). Retirado a partir do catálogo do fabricante: <http://www.qiagen.com/br/products/catalog/assay-technologies/real-time-pcr-and-rt-pcr-reagents/quantifast-probe-assays> (acesso em 12/04/2011)

3.10.7 Extração de miRNA do plasma e síntese do cDNA

Para a extração de miRNA do plasma foi utilizado o *kit* miRNeasy Serum/Plasma, número do catálogo 217184 (QIAGEN® GmbH, Hilden, Alemanha). Durante o processo de extração foi adicionado às amostras um controle interno denominado *Spike-In* para avaliar a qualidade da extração, bem como normalizar as expressões dos miRNA (Apêndice 5).

Após a extração dos miRNAs contidos no plasma dos pacientes analisados, foi realizada uma transcrição reversa para a síntese do DNA complementar (cDNA), seguida de análise da expressão por qPCR em tempo real. A síntese do cDNA foi realizada com o kit *miScript PCR System* (QIAGEN® GmbH, Hilden, Alemanha).

3.10.8 Análise da expressão de miRNA por qPCR

As expressões dos miR-1, miR-23, miR-26, Ce-miR-39_1 (*Spike-In*) e dos miRNA *housekeeping* miR-16 e miR-423 foram realizadas em duplicata, de acordo com especificações do fabricante do kit *miScript PCR System* (QIAGEN® GmbH, Hilden, Alemanha). A descrição completa deste processo encontra-se no Apêndice 6.

3.11 Análise estatística

A análise estatística estimou a necessidade de 24 pacientes em cada grupo para se conseguir detectar, com poder de 80%, uma diferença de 20% na expressão dos genes estudados com nível de significância de 5% (α).

As variáveis quantitativas foram expressas em termos de média, desvio-padrão (DP), ou mediana, valores mínimo e máximo. A suposição de que as variáveis tenham distribuição normal foi testada pelo teste de *Shapiro-Wilk*. Para a comparação dos grupos foi utilizado o teste de *Mann-Whitney*. Foi realizado um ajuste para fatores de risco conhecidos como a idade e os que eventualmente aparecessem a partir dos dados clínicos obtidos na população estudada.

As variáveis qualitativas foram expressas em termos de frequências absolutas e relativas (porcentagens). Para verificar a associação foi aplicado o teste exato de Fisher ou o teste de qui-quadrado.

Em todos os testes aplicados, os resultados foram considerados significativos quando o nível descritivo (p-valor) foi menor que 0,05. Todos os testes foram realizados com o auxílio do programa SAS for Windows, versão 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.).

3.12 Ética e Boas práticas clínicas

O estudo foi conduzido em conformidade com as resoluções nacionais e internacionais como descritas nos seguintes documentos:

- ICH Harmonized Tripartite Guidelines for Good Clinical Practice – 1996;
- Resolução CNS196/96;
- Declaração de Helsinque.

Este estudo tem aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da instituição proponente (Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, número de registro 4005). A carta com a aprovação do CEP encontra-se no Anexo B.

3.13 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Foi solicitado consentimento para participação do estudo sendo necessária a compreensão e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo C) para que o paciente pudesse fazer parte deste estudo.

Em nenhum momento houve protocolo terapêutico na condução dos casos, sendo que o tratamento foi realizado de acordo com as diretrizes e por decisão do médico assistente de cada paciente.

4 RESULTADOS

No período de janeiro de 2012 a janeiro de 2014 foram recrutados 143 pacientes de acordo com os critérios de inclusão e exclusão. Destes, 24 (16,7%) pacientes evoluíram com FAPO. Os demais 119 pacientes formaram o grupo controle total. Neste grupo foi realizado sorteio, através da utilização de envelope, de 24 pacientes que compuseram o grupo controle genético. As amostras de sangue e tecido dos grupos FAPO e controle genético foram submetidos análise genética. (Fluxograma 3)

Fluxograma 3 - Formação dos grupos estudados.

4.1 Resultados das características clínicas dos pacientes:

4.1.1 Perfil da doença arterial coronária entre os grupos:

Dos pacientes submetidos à CRM observou-se que a indicação do procedimento foi, respectivamente entre os grupos FAPO e controle genético, por angina estável de 58,4% vs. 66,7% ($p=0,47$); infarto sem supradesnivelamento do segmento ST (IAMSST) 29,1% vs 20,8% ($p=0,35$); infarto com supradesnivelamento do segmento ST (IAMCST) 8,3% vs. 8,3% ($p=1,00$) e isquemia silenciosa 4,2% vs. 4,2% ($p=1,00$).

Quanto aos locais das lesões coronárias (considerando-se maior que 50% para lesões de tronco de coronária esquerda e 70% para as demais artérias) observou-se uma incidência de lesão em tronco de coronária esquerda (TCE), respectivamente entre os grupos FAPO e controle genético, de 75,0% vs. 66,6% ($p=0,51$); descendente anterior (DA) em 91,6% vs. 95,8% ($p=0,82$); circunflexa (CX) 54,2% vs. 45,8% ($p=0,58$) e coronária direita (CD) 66,7% vs. 70,8% ($p=0,68$). O número de pacientes com três ou mais artérias acometidas foi igual em ambos os grupos com uma incidência de 91,7%.

4.1.2 Características clínicas e ecocardiográficas entre os grupos:

Os pacientes foram alocados em três grupos para a análise clínica: pacientes com FAPO (24 pacientes), grupo controle genético (24 pacientes) e grupo controle total (119 pacientes).

O conjunto de informações a respeito das características clínicas dos pacientes em cada grupo está demonstrado na tabela 4.

Tabela 4 - Características clínicas e ecocardiográficas dos pacientes em cada grupo.

Variáveis	Grupo FAPO (24p)	Grupo controle genético (24p)	Grupo controle total (119p)	p1	p2
Idade (anos)	64,7 ($\pm 7,5$)	56,3 ($\pm 9,2$)	56,2 ($\pm 9,1$)	0,001	0,92
Sexo masculino	63%	66%	64%	0,96	0,92
HAS	95,8%	95,8%	94,7%	1,00	1,00
DM	41,6%	45,8%	43,6%	0,23	0,20
DLP	54,1%	50,0%	52,8%	0,46	0,54
Tabagismo	33,3%	37,5%	36,9%	0,86	0,79
IMC	26,9 ($\pm 3,3$)	28,6 ($\pm 3,5$)	28,8 ($\pm 3,3$)	0,10	0,16
FE (%)	56,8	57,9	57,8	0,68	0,97
AE (mm)	30,8	31,4	31,7	0,79	0,89
DD (mm)	50,9	50,2	50,2	0,81	1,00

Legenda - p1: valor de p entre os grupos FAPO e controle genético; p2: valor de p entre os grupos controle genético e controle total; HAS: hipertensão arterial sistêmica; DM: diabetes mellitus; DLP: dislipidemia; IMC: índice de massa corpórea; FE: fração de ejeção ao ecocardiograma pré-operatório; AE: tamanho do átrio esquerdo ao ecocardiograma; DD: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo ao ecocardiograma.

Os grupos diferem apenas quanto a idade (FAPO com 64,7 vs. 56,3 anos, $p=0,001$), estando as demais características sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

4.1.3 Características perioperatórias dos grupos:

As principais características do intra e pós-operatório podem ser observadas na tabela 5 a seguir. Pode-se observar que a única variável com diferença estatisticamente significativa entre os grupos é o tempo de anóxia que foi maior no grupo FAPO comparativamente ao grupo controle genético ($p=0,04$).

Tabela 5 - Variáveis perioperatórias entre os grupos

Variáveis	Grupo FAPO (24p)	Grupo controle genético (24p)	Grupo controle total (119p)	p1	p2
Número de enxertos	3,2	3,4	3,4	0,88	1,00
RM completa	87%	89%	88%	0,79	0,92
Uso droga vasoativa	12,5%	16,6%	13,7%	0,65	0,89
Tempo anóxia (minutos)	65,4(±17,4)	49,7 (±14,3)	50,3(±13,2)	0,04	0,89
BS (mL)	- 659,0(±252)	- 608,8(±349,3)	- 624,4(±378,3)	0,76	0,87
K ⁺ admissão (mEq/L)	4,00(±0,5)	4,04(±0,7)	4,01(±0,6)	0,93	0,99
HCO ₃ (mEq/L)	22,7(±3,0)	22,4(±2,2)	22,5(±4,1)	0,87	0,90
Sangramento POI (ml/kg)	0,29(±0,13)	0,25(±0,15)	0,28(±0,21)	0,83	0,90
BH PO1 (mL)	1203(±1510)	1032(±1732)	1134(±2134)	0,49	0,67
Lactato admissão (mEq/L)	1,91(±1,14)	2,66(±1,45)	2,01(±2,32)	0,37	0,61
Uso de BB pós operatório	91,6%	91,6%	92,4%	1,00	0,89

Legenda – p1: valor de p entre os grupos FAPO e controle genético; p2: valor de p entre os grupos controle genético e controle total; RM: revascularização miocárdica; BS: balanço sanguíneo; K⁺: potássio; HCO₃: bicarbonato; POI: pós-operatório imediato; BH: balanço hídrico; PO1: primeiro pós-operatório; BB: betabloqueador.

Observou-se que o valor de corte de 78 minutos no tempo de anóxia pode contribuir para o risco de desenvolvimento de FAPO. No grupo controle genético, todos os pacientes tiveram tempo de anóxia inferior a 78 minutos. No grupo FAPO, sete pacientes (29%) tiveram tempo de anóxia superior a 78 minutos. (Gráfico 1)

Gráfico 1 - Tempo de anóxia entre os grupos FAPO e controle genético

Outras variáveis estudadas que não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos respectivamente, FAPO e controle genético, foram: volemia (em ml) ao final da cirurgia (105,3 [$\pm$ 532,2] vs. 190,3[$\pm$ 434,9], $p=0,69$); tempo de perfusão (em minutos) (91,9[$\pm$ 32,2] vs. 78,43[$\pm$ 25,3], $p=0,18$); balanço hídrico no pós-operatório imediato (em ml/kg) (1906[$\pm$ 924,5] vs. 1758[$\pm$ 1122,9], $p=0,096$), uso de betabloqueador no pós-operatório (91,6% vs 91,6%, $p=1,00$) e diurese no pós-operatório imediato (em ml/kg) (1,50[$\pm$ 0,68] vs. 1,56 [$\pm$ 0,78], $p=0,81$).

4.1.4 Evolução pós-operatória:

Quanto aos desfechos evolutivos dos pacientes, observaram-se taxas de complicações reduzidas como um episódio de AVE no grupo FAPO e dois infartos perioperatórios (ambos no grupo FAPO).

Dentre os pacientes do grupo FAPO não se observou nenhuma realização de cardioversão elétrica de emergência, pois não houve instabilidade hemodinâmica em nenhum paciente. Dos 24 pacientes do grupo FAPO, 22 pacientes apresentaram reversão com amiodarona (91,6%) sendo a dose média utilizada de 1.545 mg e o tempo médio para reversão de 36,8 horas. Dois pacientes foram submetidos a cardioversão elétrica eletiva com vistas a interromper o período de FAPO antes de completar 48 horas sob o risco de formação de trombo atrial após este período. Dos 24 pacientes com FAPO, quatro pacientes apresentaram FAPO na enfermaria e 20 destes durante a internação na UTI. O tempo médio de aparecimento da FAPO foi de 54 horas. Na tabela 6 observam-se os demais desfechos evolutivos nos grupos estudados:

Tabela 6 - Comparação dos desfechos evolutivos entre os grupos

Variáveis	Grupo FAPO (24p)	Grupo controle genético (24p)	Grupo controle total (119p)	p1	p2
Tempo de IOT (horas)	11,71	10,46	10,87	0,68	0,79
Tempo UTI (dias)	4,40	2,13	3,60	0,028	0,100
Internação (dias)	11,91	7,29	8,40	0,039	0,210

Legenda – IOT: intubação orotraqueal; UTI: unidade de terapia intensiva; p1: valor de p entre os grupos FAPO e controle genético; p2: valor de p entre os grupos controle genético e controle total.

Conforme pode ser visibilizado na tabela 6 acima, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos FAPO e controle genético com relação ao tempo de internação em UTI e no tempo de internação total. Quando a comparação foi realizada entre o grupo FAPO e grupo controle total não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Quanto à mortalidade, observaram-se dois óbitos de pacientes que não desenvolveram FAPO e pertenciam ao grupo controle total. A causa da morte dos pacientes foi choque séptico.

4.2 Resultado da análise de miRNA

4.2.1 Comparação entre miRNAs em amostra coletada no período pós-cirúrgico

Os miRNAs foram comparados entre os grupos FAPO e controle genético na amostra de sangue pós-cirúrgica. A tabela 7 abaixo mostra os resultados destas comparações. Apenas o miRNA-23 obteve diferença estatisticamente significativa entre os grupos FAPO e controle genético. Os miRNAs 1 e 26 não diferiram entre os pacientes com e sem FAPO.

Tabela 7 - Comparação da expressão de miRNAs entre os grupos no período pós-cirúrgico

miRNA	Momento da coleta	Expressão - Grupo FAPO (±DP)	Expressão - Grupo controle genético (±DP)	valor p
miRNA1	Pós	0,19 (±0,16)	0,18 (±0,13)	0,53
miRNA-23	Pós	29,54 (±22,71)	44,38(±39,79)	0,02
miRNA-26	Pós	0,04 (±0,03)	0,11(±0,28)	0,12

Legenda: DP: desvio-padrão

O gráfico 2 abaixo ilustra o comportamento do miRNA-23 nos grupos FAPO e controle genético.

Gráfico 2 - Comparação da expressão do miRNA-23 no período pós-cirúrgico

4.2.2 Comparação entre miRNAs em amostras coletadas nos períodos pré e pós-operatório

O presente estudo comparou, em ambos os grupos, a expressão dos miRNAs entre os períodos pré e pós-cirúrgico. Na tabela 8 abaixo encontram-se os resultados do grupo FAPO:

Tabela 8 - Expressão miRNAs entre períodos pré e pós-cirúrgico

miRNA	Grupo	Pré-cirúrgico (±DP)	Pós-cirúrgico (±DP)	valor p
miRNA-1	FAPO	0,29(±0,17)	0,19(±0,16)	0,0010
miRNA-23	FAPO	63,14(±34,8)	29,54(±22,45)	0,0001
miRNA-26	FAPO	0,06(±0,04)	0,04(±0,03)%	0,0420

Legenda: FAPO: fibrilação atrial pós operatória.

Pode-se observar redução da expressão, no período pós-cirúrgico, de todos os miRNAs estudados. (gráfico 3)

Gráfico 3 - Expressão dos miRNA-26(A), miRNA-1(B) e miRNA-23(C) no grupo FAPO entre os períodos pré e pós-cirúrgico.

A mesma análise comparativa foi realizada no grupo controle genético. Assim como observado no grupo FAPO, a análise da expressão dos miRNAs em plasma do grupo controle genético revelou redução significativa da expressão dos miRNAs 23 e 26 no período pós-cirúrgico. Apesar da redução numérica, o miRNA-1 não atingiu significância estatística entre os períodos estudados. Segue abaixo a tabela 9 com a análise do grupo controle genético quanto à expressão dos miRNAs entre os períodos pré e pós-cirúrgico.

Tabela 9 - Expressão dos miRNAs do grupo controle genético entre os períodos pré e pós-cirúrgico.

miRNA	Grupo	Pré-cirúrgico	Pós-cirúrgico	valor p
miRNA-1	Controle genético	0,27(±0,25)	0,18(±0,12)	0,07
miRNA-23	Controle genético	66,48(±42,65)	44,38(±39,37)	0,0007
miRNA-26	Controle genético	0,10(±0,09)	0,05(±0,03)	0,01

Legenda: DP: desvio-padrão

4.3 Análise da expressão dos genes relacionados à síntese de proteínas relacionadas aos canais transmembrana

4.3.1 Comparação entre os genes relacionados às canalopatias entre os grupos no pré-operatório:

Os genes relacionados à síntese de canais transmembrana foram comparados através do sangue colhido no momento pré-cirúrgico. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos FAPO e controle genético com relação à expressão relativa de qualquer um dos genes estudados. O gráfico 4 abaixo mostra a comparação entre os grupos na amostra coletada no momento imediatamente antes ao início da cirurgia.

Gráfico 4 - Expressão relativa dos genes relacionados às proteínas de canal entre ambos os grupos na amostra colhida no tempo pré-cirúrgico

4.3.2 Comparação dos genes relacionados às canalopatias no grupo FAPO entre os tempos pré e pós-operatório:

Amostras de sangue do grupo FAPO nos períodos pré e pós-cirúrgicos foram comparadas quanto à expressão relativa dos genes relacionados à síntese de canais transmembrana. Observa-se redução estatisticamente significativa ($p < 0,001$ para todos) nos genes GJA1, CACNB1, CACNA1C e KCNN3. Somente o gene KCNJ2 não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os momentos pré e pós-cirúrgico no grupo FAPO (tabela 10 e gráfico 5).

Tabela 10 - Expressão dos genes das canalopatias no grupo FAPO entre os períodos pré e pós-cirúrgico

miRNA	Pré-cirúrgico ($\pm$ DP)	Pós-cirúrgico ($\pm$ DP)	valor p
GJA1	0,91 ($\pm$ 0,14)	0,31 ($\pm$ 0,19)	p<0,01
KCNJ2	1,04 ($\pm$ 0,48)	1,04 ($\pm$ 0,48)	ns
CACNB1	0,98 ($\pm$ 0,10)	0,22 ($\pm$ 0,10)	p<0,01
CACNA1C	1,04 ($\pm$ 0,11)	0,15 ($\pm$ 0,16)	p<0,01
KCNN3	0,97 ($\pm$ 0,40)	0,47 ($\pm$ 0,17)	p<0,01

Legenda: DP:desvio-padrão; ns: não significativo

Gráfico 5 - Comparação entre genes relacionados a proteínas transmembranas no grupo FAPO entre os tempos pré e pós-cirúrgico.

Legenda: Pré-ST: amostra pré-cirúrgica; Pós-ST: amostra pós-cirúrgica

4.3.3 Comparação dos genes relacionados às canalopatias no tecido atrial

A expressão relativa dos genes relacionados às canalopatias, a partir de amostra do tecido atrial, foram comparados entre os grupos. A tabela 11 mostra os resultados desta análise:

Tabela 11 - Comparação da expressão dos genes das canalopatias entre os grupos no tecido atrial

Proteína	Grupo	Mediana	Mínimo	Máximo	valor p
GJA1	FAPO	59,71	32,67	81,57	0,12
	Controle genético	67,18	37,01	121,10	
KCNJ2	FAPO	0,10	0,06	0,18	0,95
	Controle genético	0,11	0,04	0,21	
CACNB1	FAPO	0,48	0,30	0,61	0,27
	Controle genético	0,42	0,24	0,84	
CACNA1C	FAPO	4,79	2,19	8,06	0,01
	Controle genético	5,94	3,56	11,39	
KCNN3	FAPO	7,31	4,66	17,75	0,39
	Controle genético	7,36	3,01	18,90	

Legenda: DP: desvio-padrão

Observa-se que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos FAPO e controle genético quanto à expressão do gene CACNA1C. Os demais genes não apresentaram diferença estatisticamente significativa. O gráfico 6 traz a representação esquemática dos dados colocados.

Gráfico 6 - Expressão relativa dos genes nos tecidos.

4.4 Comparação dos genes relacionados à produção de IL-1, IL-6 e TNF α

Para avaliar a magnitude da inflamação entre os grupos foram dosados os genes relacionados a esta condição. Na tabela 12 pode-se observar que, em ambos os grupos, houve redução na expressão dos genes relacionados à inflamação indicando aumento da mesma no pós-operatório.

Tabela 12 - Comparação da expressão dos genes inflamatórios entre os grupos e entre os tempos de coleta

Proteína	Grupo	Pré ($\pm$ DP)	Pós ($\pm$ DP)	valor p1
IL-1	FAPO	0,95 ($\pm$ 0,53)	0,62($\pm$ 0,47)	p<0,001
	Controle genético	0,89($\pm$ 0,43)	0,45($\pm$ 0,27)	p<0,001
	valor p2	ns	ns	
IL-6	FAPO	1,52($\pm$ 0,80)	0,21($\pm$ 0,15)	p<0,001
	Controle genético	0,75($\pm$ 0,57)	0,20($\pm$ 0,12)	p<0,001
	valor p2	ns	ns	
TNF α	FAPO	1,21($\pm$ 0,41)	0,38($\pm$ 0,14)	p<0,001
	Controle genético	1,14($\pm$ 0,43)	0,41($\pm$ 0,14)	p<0,001
	valor p2	ns	ns	

Legenda: DP: desvio-padrão, ns: não significativo;p1: valor de p entre os períodos de coleta pré e pós-cirúrgico; p2: valor de p entre os grupos FAPO e controle genético;ns: não significativo.

Pode-se notar que todos os genes relacionados às citocinas inflamatórias apresentam diferença estatisticamente significativa quando comparados entre os períodos pré e pós-operatório em ambos os grupos. Quando a comparação é feita entre os grupos nota-se que não há diferença entre os mesmos independentemente do período de coleta da amostra (gráfico 7).

Gráfico 7 - Expressão relativa dos genes IL-6(A), IL-1(B) e TNF α (C) em sangue total entre os grupos nos períodos pré e pós-cirúrgico

5 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo que avaliou as alterações de miRNAs no cenário de pós-operatório de cirurgia de revascularização miocárdica relacionando-as à ocorrência de fibrilação atrial neste período. Existem alguns estudos nesta área de miRNAs e fibrilação atrial somente em pacientes clínicos e fora do contexto de cirurgia cardíaca.^{34,49,53-56,65,66}

A FAPO acarreta aumento nos dias de internação em UTI e hospitalar o que eleva os custos e a incidência de complicações. Considera-se FAPO o surgimento de FA identificada por parâmetros clínicos e eletrocardiográficos com duração superior a 30 minutos e necessidade de intervenção farmacológica ou elétrica (cardioversão), ou seja, de forma idêntica a que é realizada na prática diária. A não utilização do Holter, durante o período em que o paciente permaneceu na enfermaria, reside no fato de que esta prática não faz parte da rotina atualmente vigente. Desta forma, objetivou-se reproduzir o estudo na situação mais próxima possível da prática clínica sendo a amostra composta somente por pacientes com FA identificada na rotina e que é realmente responsável pelo aumento de custos e complicações.

5.1 Dados clínicos da população

A população estudada foi composta por pacientes estáveis no pré-operatório uma vez que em sua totalidade os procedimentos foram realizados em caráter eletivo.

A incidência de FAPO de 16,7% foi semelhante à descrita na literatura que varia entre 12 a 40% nos diversos estudos.^{7,12,13} Se for considerado que, no presente estudo, foram excluídos pacientes com doença cardíaca estrutural a incidência que se aproxima do limite inferior da literatura é

coerente uma vez que pacientes com doença cardíaca estrutural apresentam maior probabilidade de FAPO.

A média de idade dos pacientes do grupo controle total foi de 56 anos e, do grupo FAPO, de 64 anos, valor semelhante ao encontrado em estudo realizado por Bianco e cols. em 2004, nesta mesma unidade de terapia intensiva, cuja média de pacientes submetidos à CRM foi de 61 anos.⁶⁷

A média de idade dos pacientes com FAPO foi superior à encontrada nos grupos controle genético e total (64,7 vs 56,2 anos, $p=0,001$). Este dado reforça a idade como importante fator de risco para FA como já está bem estabelecido através de diversos estudos na literatura.^{4,5,8,12,13} Estudo realizado por Erdil e cols.⁸ encontraram idade média de 64,1 anos no grupo FAPO.

Bianco e cols.⁶⁷ observaram que 68% das cirurgias foram realizadas em pacientes do sexo masculino. Estes dados assemelham-se ao presente estudo que encontrou 63% de pacientes do sexo masculino no grupo FAPO e 64% no grupo controle total.

A elevada prevalência de hipertensão, diabetes, dislipidemia e tabagismo em nosso estudo reforça o elevado risco aterosclerótico e de complicações desta população. Apesar disso, as taxas de complicações pós-operatórias não foram elevadas.

No presente estudo optou-se por excluir pacientes com disfunção ventricular ou aumento de câmaras cardíacas para evitar que estas alterações pudessem ser gatilhos de FAPO. Assim sendo, os parâmetros ecocardiográficos de fração de ejeção e diâmetros cavitários eram normais e semelhantes em ambos os grupos.

5.1.1 Características perioperatórias

No presente estudo, o número de enxertos, taxa de revascularização completa, uso de fármaco vasoativo, volemia, balanços hídrico e sanguíneo intraoperatórios, volemia ao final da cirurgia, valores séricos de potássio

plasmático à admissão e durante a evolução, bicarbonato sérico à admissão, diurese nas primeiras 24 horas, tempo de perfusão, taxa de sangramento e balanço hídrico no pós-operatório das primeiras 24 horas bem como lactato à admissão, não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Chelazzi e col¹³, através de ampla revisão em literatura, mostraram que a grande maioria dos fatores acima descritos atua como gatilho para o desenvolvimento de FAPO. A ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos para estes fatores minimiza a chance de que eles sejam os responsáveis pelo desenvolvimento de FAPO no presente estudo, abrindo espaço para que outras causas possam estar implicadas na gênese da FAPO da população estudada.

O único fator a apresentar diferença significativa entre os grupos foi o tempo de anóxia (65,4 minutos vs 49,7 minutos, $p=0,04$). No presente estudo observou-se que o valor de corte de 78 minutos eleva muito o risco de desenvolvimento de FAPO. No grupo controle genético nenhum paciente apresentou tempo de anóxia superior a 78 minutos. É importante destacar que o presente estudo não foi desenhado para este objetivo, limitando este dado à condição descritiva sem poder analítico. Topal e cols⁶⁸, avaliando os fatores preditores para FAPO, também identificaram o tempo de anóxia como fator preditor para esta condição, assim como Erdil e cols⁸ que identificaram o tempo de anóxia superior a 73 minutos como fator de risco para o desenvolvimento de FAPO.

Já está bem estabelecido na literatura que o miRNA é influenciado por fatores como infecção, isquemia, inflamação, entre outros.^{48,55,65-67,69} Esta diferença encontrada nos tempos de anóxia entre os grupos levanta a hipótese de que este fator possa desencadear uma alteração na expressão de um miRNA que poderia levar ao desenvolvimento de FAPO. A resposta para esta hipótese só pode ser obtida com a realização de um novo estudo desenhado especificamente para avaliar esta questão.

5.1.2 Evolução pós-operatória:

Apesar de ser uma população de elevado risco de eventos ateroscleróticos, a exclusão de pacientes com alteração cardíaca estrutural (principalmente disfunção ventricular) diminuiu o risco de complicações pós-operatórias. As taxas de complicações deste estudo foram menores das encontradas na literatura na qual a taxa de mortalidade de cirurgia de revascularização é de 3-6%, infarto perioperatório de cerca de 5-7% e AVE de aproximadamente 4-7%.^{13,67} No presente estudo houve duas mortes (no grupo controle total), dois infartos perioperatórios (grupo FAPO) e um episódio de acidente vascular encefálico (grupo FAPO).

5.1.3 A Fibrilação atrial no pós-operatório

Os pacientes do presente estudo que desenvolveram FAPO apresentaram uma evolução típica desta arritmia. A totalidade dos pacientes apresentou-se estável hemodinamicamente e em nenhum paciente foi necessária a cardioversão elétrica de emergência. A taxa de reversão com amiodarona foi elevada (91,6%) com necessidade de reversão através de cardioversão elétrica eletiva em apenas dois pacientes. Vários estudos^{11-13,70,71} mostram dados semelhantes aos encontrados evidenciando que a FAPO está mais relacionada ao aumento dos tempos de permanência em UTI e hospitalar e, conseqüentemente, dos custos relacionados à internação do que propriamente à instabilização clínica e hemodinâmica do paciente.

Os tempos de internação em UTI (4,40 vs 2,13; $p=0,03$) e internação hospitalar (11,91 vs 7,29; $p=0,04$) apresentaram-se estatisticamente maiores no grupo FAPO em comparação ao grupo controle reforçando a importância de se prevenir tal condição garantindo-se, assim, o benefício clínico da alta precoce e minimizando o custo da internação. Aranki e cols.¹² encontraram média de internação de 15,3 dias sendo a FAPO responsável por um incremento de 4,9 dias no tempo médio de internação. No presente estudo,

similarmente a Aranki e cols., a FAPO foi responsável por um incremento médio de 4,62 dias no período total de internação. Neste mesmo estudo de Aranki e cols.¹² foi encontrado uma elevação de \$11.500 por paciente devido ao desenvolvimento de FAPO e consequente aumento da internação hospitalar.

A diferença observada entre os grupos FAPO e controle genético não foi observada entre FAPO e controle total. Tal fato se deve à presença de cinco pacientes que evoluíram com outras complicações clínicas (principalmente infecção) levando a uma internação em UTI e hospitalar prolongadas (superior a 25 dias). Tal fator elevou a média dos tempos de internação de UTI e hospitalar no grupo controle total o que minimizou a diferença entre este grupo e o grupo FAPO.

5.2 Análise de miRNA

5.2.1 O miRNA no pós-cirúrgico

A comparação dos miRNAs entre os grupos FAPO e controle genético no período pós-cirúrgico objetivou identificar uma alteração que pudesse estar influenciando o surgimento de FAPO nos pacientes avaliados. Detectou-se diferença estatisticamente significativa na expressão do miRNA-23 que encontra-se diminuído no grupo FAPO em comparação ao grupo controle genético (29,54 vs 44,38, $p=0,02$).

Apenas um estudo avaliou o papel do miRNA-23 na área cardiovascular, porém, fora da área da eletrofisiologia. Este estudo mostrou atuação deste miRNA-23 na angiogênese e na hipertrofia muscular cardíaca.⁷²

O presente estudo foi o primeiro a avaliar o papel do miRNA-23 na área da eletrofisiologia e mostrou importante redução da expressão do mesmo em pacientes com FAPO. É possível que este miRNA esteja influenciando a redução de um ou mais genes relacionados à produção de canais iônicos ou

mesmo outros mecanismos relacionados à FAPO. A identificação desta correlação, entretanto, não pode ser feita a partir da análise dos dados deste estudo, porém abre o campo para investigação desta hipótese em outra oportunidade.

Assim como encontrado na presente análise, dentro da área de FA em pacientes ambulatoriais, os poucos estudos em humanos que avaliaram a expressão de miRNAs em plasma de sangue periférico identificaram um padrão de redução da sua expressão no plasma. Em estudo recente⁷³ publicado por McManus e cols., em pacientes com FA crônica, submetidos à ablação por cateter, em comparação a pacientes sem FA avaliou alguns miRNAs no plasma e identificou redução na expressão dos miRNAs 21 e 150 no grupo com FA crônica. Outro estudo⁷⁴ publicado por este mesmo grupo identificou redução do miRNA-328 em plasma de pacientes com FA crônica e fatores de risco para doença arterial coronária. Liu e cols.⁷⁵ identificaram redução dos miRNA-146, miRNA-150, miRNA-19 e miRNA-375 em pacientes com FA clínica comparativamente à pacientes em ritmo sinusal.

Este comportamento de diminuição da expressão de miRNAs, em amostra de plasma, observado na literatura em pacientes com FA crônica e no presente estudo na FAPO ainda não está totalmente elucidado. Uma das hipóteses sugeridas é que o miRNA estaria ligado ao RNA mensageiro para efetuar a sua ação e, desta forma, sua fração livre plasmática estaria diminuída no plasma. Outra teoria é que o miRNA pode estar sendo deslocado do plasma sanguíneo para outro tecido (no caso da FAPO provavelmente o tecido atrial) onde ele terá maior efeito no bloqueio do RNA mensageiro. Tal condição é suportada por evidências que demonstraram redução da expressão de miRNAs em plasma concomitantemente a aumento dos mesmos em tecido miocárdico.⁴⁸

5.2.2 Comparação dos miRNAs entre os períodos pré e pós-operatório

A comparação dos miRNAs revelou redução estatisticamente significativa na expressão dos miRNA-1 ($p=0,001$), miRNA-23 ($p=0,0001$) e miRNA-26 ($p=0,04$) em amostra de sangue pós-cirúrgico do grupo FAPO comparativamente à amostra pré-cirúrgica. O grupo controle apresentou o mesmo comportamento com redução significativa na amostra pós-cirúrgica, excetuando-se ao miRNA-1.

Este comportamento sugere a interferência direta da cirurgia na função destes miRNAs. Na área da FA crônica, estudos com miRNA-1 mostraram que este gene atua no controle da excitabilidade cardíaca principalmente através da modulação dos genes GJA1 e KCNJ2.^{48,53} Foi demonstrado que o miRNA-26 também atua sobre o gene KCNJ2 diminuindo sua expressão.^{48,53}

O presente estudo não foi desenhado para identificar a consequência desta redução no pós-cirúrgico em outras áreas. Porém, devido ao elevado nível de significância estatística encontrado é interessante, principalmente do ponto de vista clínico, a realização de novos estudos para avaliar a consequência da redução destes miRNAs em áreas aparte à eletrofisiologia neste grupo de pacientes submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica.

5.3 Análise da expressão dos genes relacionados à síntese de proteínas dos canais transmembrana

5.3.1 Comparação dos genes relacionados às proteínas de canais iônicos no pré-operatório:

A comparação da expressão relativa dos genes responsáveis pela síntese das proteínas de canal não mostrou diferença entre os grupos quanto ao sangue coletado no período pré-operatório. Tal condição revela a uniformidade entre os grupos antes da intervenção cirúrgica, ou seja, antes dos grupos serem submetidos a um fator de gatilho para a FAPO. Esta

comparação é essencial para que se possa analisar o que acontece com estes genes no grupo FAPO após o procedimento, a fim de avaliar o comportamento destas variáveis após um fator modificador (procedimento cirúrgico).

5.3.2 Comparação dos genes relacionados às proteínas de canais iônicos no grupo FAPO entre os tempos pré e pós-operatório:

Verificou-se que, no grupo FAPO, houve significativa redução na expressão dos genes GJA1, CACNB1, CACNA1C e KCNN3 na amostra de sangue coletada no período pós-cirúrgico em comparação ao pré-cirúrgico. A diminuição do miRNA no plasma pode estar contribuindo para a redução ou alteração da síntese das respectivas proteínas de canal sendo esta a condição que pode justificar o desenvolvimento de FAPO neste grupo. A estrutura alterada associada à disfunção do canal iônico prejudicam o transporte de íons à passagem de corrente transmembrana e, deste modo, aumenta o risco de alterações na condutibilidade do impulso elétrico atrial, favorecendo a FAPO. O gene KCNJ2 foi o único que não apresentou diferença entre as amostras de sangue comparadas.

Gollob e cols.³⁶ sequenciaram o gene GJA5 a partir de tecido cardíaco e linfócitos periféricos de 15 pacientes com FA idiopática e identificaram mutações neste gene que estavam associadas ao prejuízo do transporte intracelular e à redução do transporte intercelular de íons, responsáveis pela condução do impulso elétrico celular. O gene GJA5 é responsável pela síntese da proteína conexina-40. Esta proteína faz a ligação intercelular (junções gap) e permite a transmissão de íons célula a célula (condução elétrica intercelular). Em estudos realizados em ratos, a destruição da proteína conexina-40 aumentou a vulnerabilidade a arritmias reentrantes atriais.^{76,77} No presente estudo, o gene GJA1, responsável pela produção da proteína conexina-43, encontrou-se reduzido no pós operatório e pode estar relacionado ao aparecimento de FAPO nestes pacientes.

Lu e cols.³⁴ realizaram um interessante estudo com cães. Os autores induziram um aumento na expressão do miRNA-328 através da inoculação

de adenovírus por um vetor modificado e observaram uma redução no mRNA dos genes CACNA1C (gene codificador da subunidade α_1c do canal de cálcio tipo L, em inglês *L-type Ca^{+2}*) e CACNB1 (gene codificador da subunidade β_1 do canal de cálcio tipo-L, em inglês *L-type Ca^{+2}*) observando redução do potencial de ação atrial e encurtamento do período refratário. Num segundo momento, os autores reverteram a ação do miRNA-328 com a inoculação de antagomiR (antagonista de miRNA) e observaram aumento na expressão de mRNA dos genes CACNA1C e CACNB1 com consequente aumento do potencial de ação e da refratariedade atrial. O papel do canal de cálcio voltagem dependente (sintetizado pelos genes CACNA1C, CACNB1, entre outros genes) reside na regulação da entrada de cálcio para o interior da célula mantendo a fase de platô do potencial de ação, ou seja, garantindo a integralidade do período refratário. Uma disfunção nestes canais leva ao encurtamento do período refratário e aumenta a predisposição à arritmias. No presente estudo, a redução da expressão dos genes CACNA1C e CACNB1 pode ter levado a uma redução no período refratário atrial do grupo FAPO, fator este que pode ter contribuído para o desenvolvimento da arritmia neste grupo.

O gene KCNN3 é responsável pela codificação e síntese do canal de potássio de baixa condutância cálcio-ativado, também chamado de SK3. Estes canais são responsáveis pela hiperpolarização da membrana celular. A diminuição do gene KCNN3 encontrada no presente estudo pode contribuir para uma redução na hiperpolarização, o que facilita a diminuição do limiar de despolarização da membrana atrial aumentando a chance de novas despolarizações (ou despolarizações precoces), o que aumenta a chance de arritmia. Estudos recentes já demonstraram modificações estruturais no receptor SK3 e sua relação com fibrilação atrial. Chang e cols.⁷⁸ encontraram associação entre polimorfismo do gene KCNN3 e o surgimento de FA. Ling e cols.³⁵ mostraram a diminuição da expressão do gene KCNN3 a partir do aumento da expressão do miRNA-499 em pacientes com FA crônica.

O único gene que não mostrou diferença entre as amostras pré e pós cirúrgica no presente estudo foi o gene KCNJ2. Este gene faz a síntese da subunidade Kir2.1, parte do canal de potássio (I_{K1}), que é responsável pela manutenção do potencial de repouso da membrana celular, pelo controle da excitabilidade cardíaca, modulação da fase tardia da repolarização e da duração do potencial de ação nas células cardíacas. O aumento da corrente de potássio leva a encurtamento da duração do potencial de ação e favorece o aparecimento de FA.⁷⁹ Luo e cols.⁵⁶ encontraram relação entre a diminuição da expressão do miRNA-26 levando a aumento da expressão do gene KCNJ2 em pacientes com FA comparativamente a pacientes sem FA.

A redução destes genes pode estar contribuindo para o surgimento de arritmia no grupo FAPO. É possível que outros miRNAs não estudados possam estar atuando nestes genes e promovendo esta redução no grupo FAPO após a cirurgia.

5.3.3 Comparação dos genes relacionados às proteínas de canais iônicos no tecido atrial dos grupos FAPO e controle genético

A comparação da expressão dos genes relacionados às proteínas de canais iônicos GJA1, KCNJ2, CACNB1, CACNA1C e KCNN3 no tecido atrial revelou uniformidade entre os grupos FAPO e controle genético. Apenas o gene CACNB1 apresentou diferença estatisticamente significativa entre o grupo FAPO (0,80) e controle genético (1,05) com significância estatística ($p=0,01$).

A coleta deste fragmento foi realizada quando da instalação da circulação extracorpórea, ou seja, no período pré-cirúrgico. Portanto, a comparação da expressão gênica em tecido atrial revelou uniformidade entre os grupos sugerindo que os grupos FAPO e controle genético eram semelhantes, no pré-operatório, quanto à expressão dos genes relacionados à síntese das proteínas dos principais canais iônicos relacionados à FA.

5.4 Comparação dos genes relacionados à produção de IL-1, IL-6 e TNF α

A magnitude da inflamação entre os grupos foi avaliada a partir da comparação dos genes relacionados à produção das principais citocinas relacionadas a esta condição. A comparação entre grupos FAPO e controle genético no pré-operatório não revelou diferenças quanto aos genes responsáveis pela produção de IL-1, IL-6 e TNF α entre os grupos mostrando um equilíbrio do status inflamatório entre os grupos no momento pré-cirúrgico.

Após a cirurgia observa-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) na redução dos três genes relacionados à produção de IL-1, IL-6 e TNF α tanto no grupo FAPO quanto no grupo controle. A diminuição dos genes em dosagem de plasma pode refletir o aumento de sua utilização para a produção das citocinas, condição esta induzida pela inflamação desencadeada pelo procedimento cirúrgico.

A comparação entre os grupos FAPO e controle genético entre si no período pós-cirúrgico não revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos revelando que a magnitude da ativação inflamatória foi semelhante em ambos os grupos. Estas observações permitem concluir que as diferenças observadas nas expressões de miRNA e das proteínas de canal entre os grupos FAPO e controle genético parecem não estar relacionadas diretamente ao processo inflamatório da cirurgia.

Alguns estudos⁸⁰⁻⁸³ que avaliaram a concentração de IL-1, IL-6 e TNF α encontraram aumento destas citocinas em tecido atrial e sangue periférico de pacientes com FA crônica submetidos a procedimento cirúrgico cardíaco.

6 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

A não utilização do Holter para detecção de arritmias no período de não monitorização contínua do paciente (internação em enfermaria) poderia ser considerada uma limitação relativa do estudo. Isto porque poder-se-ia diminuir a capacidade de identificar um episódio de FAPO fora da UTI. Conforme dito anteriormente, seu emprego não faz parte da rotina e, como o objetivo do estudo consiste em identificar os pacientes com FAPO que realmente sofrem intervenção (cardioversão química ou elétrica), a não utilização do Holter não interfere neste processo que é essencialmente clínico e/ou eletrocardiográfico. Uma implicação da não utilização do Holter poderia ser a “contaminação” do grupo controle genético com pacientes com FA paroxística. Tal condição minimizaria o gradiente entre os grupos diminuindo a capacidade de se detectar uma diferença entre os mesmos. Assim sendo, não impacta nos resultados em que foram encontradas diferenças estatisticamente significativas.

A detecção de um ponto de corte de 78 minutos para o tempo de anóxia deve ser encarada como uma referência para a influência deste parâmetro como fator de risco para desenvolver FAPO, pois se trata de um dado encontrado em um estudo com desenho não projetado para tal. A amostra de pacientes foi calculada para a análise genética e os dados clínicos tem apenas caráter descritivo.

A interpretação da análise genética está baseada em resultados dos genes dosados no sangue e tecido atrial comparativamente a dados descritos na literatura em pacientes ambulatoriais com FA. A ausência de maiores informações na área de pós-operatório de cirurgia cardíaca não permite estabelecer uma relação mais direta entre a alteração do miRNA-23 com os genes das proteínas de canal iônico.

O estudo detectou redução de todos os miRNAs investigados no período pós-cirúrgico do grupo FAPO e controle mostrando esse ser um efeito relacionado à cirurgia. Porém, o desenho do estudo não permite saber qual e onde é a influência desta diminuição fora da área da FAPO.

7 CONCLUSÕES

- 1) O miRNA-23 encontra-se diminuído na população de pacientes com FAPO e pode estar envolvido no desenvolvimento desta complicação no pós-operatório de cirurgia de revascularização miocárdica.
- 2) Nos grupos FAPO e controle genético houve redução na expressão dos miRNAs-1, 23 e 26 no período pós-cirúrgico estando este comportamento relacionado à cirurgia.
- 3) Os genes GJA1, CACNB1, CACNA1C e KCNN3 estão diminuídos no grupo FAPO após a intervenção cirúrgica e podem estar envolvidos no surgimento desta arritmia neste grupo.
- 4) A amostra de tecido atrial revelou igualdade entre os grupos caracterizando que estruturalmente os grupos FAPO e controle são semelhantes quanto aos genes relacionados às proteínas de canal.
- 5) A análise dos genes relacionados à produção de IL-1, IL-6 e TNF α apresentou igual comportamento de ambos os grupos revelando redução na expressão dos genes no período pós-cirúrgico comparativamente ao tempo pré-cirúrgico estando esta alteração relacionada ao aumento da produção de citocinas no pós-operatório de cirurgia cardíaca.
- 6) A descrição dos parâmetros clínicos revelou maior idade e maior tempo de anóxia no grupo FAPO. O grupo FAPO evoluiu com maior tempo de internação em UTI e enfermaria.

8 APLICABILIDADE CLÍNICA

O estudo e identificação dos miRNAs nas diversas doenças vem abrindo uma nova janela de oportunidade de tratamento adicionalmente à fisiopatologia atualmente já conhecida. Algumas pesquisas, em animais de laboratório, para o desenvolvimento de antagonistas de miRNAs (antagomiRNA) já foram realizadas com sucesso e estão previstos os primeiros estudos em humanos para o desenvolvimento de antagomiRNA para 2017. Estudos como este, que visam identificar a relação de miRNAs específicos com as respectivas doenças possibilitará o conhecimento desta nova fisiopatologia e permitirão uma futura intervenção com fins preventivos ou mesmo terapêuticos nas mais diversas doenças, principalmente em caso de sucesso destes antagonistas de miRNAs atualmente em fase de desenvolvimento.

9 ANEXOS

9.1 Anexo A – Formulário de coleta de dados

FORMULÁRIO COLETA

Data: ____/____/20____

Número..... RG:..... NOME:.....

Termo de consentimento ☐ Sangue pré ☐ Átrio ☐ Sangue pós ☐

Antecedentes: ☐ HAS ☐ Diabetes ☐ DLP ☐ Tabagismo ☐ Obesidade

Peso:..... kg Alt:.....cm

☐ Angina pré ☐ IAM SSST pré ☐ IAM CSST pré ☐ Isquemia silenciosa

☐ Dispneia aos esforços

FE:.....%, AE:....., DD:....., DS:....., S:, PP:..... BBloq.pré:.....

Cate pré: ☐ TCE ☐ DA ☐ Dg ☐ Mg ☐ CX ☐ CD

Intra-operatório: TP:..... min TA:..... min BH:..... BS:..... Vol K⁺.....

Transfusão: ... U CH; ...U PFC; ...U Plaquetas - Droga Vasoativa:.....

RM: ☐ MIE- ☐ MID-..... ☐ Sf-Ao-..... ☐ Sf-Ao-..... ☐ Sf-Ao-..... ☐ Sf-
☐ Ao-..... ☐ Radial -

☐ RM Completa ☐ RM Incompleta Intercorrências:

Pós-operatório (UTI): Δt IOT:.....hs HCO₃⁻ admissão:..... lactato adm.:..... K⁺ adm:.....

Sangramento POI:..... mL/kg/h Diurese POI:..... mL/kg/h

BH POI: Acumulado 1º PO Acumulado 2º PO: ☐ Propranolol

Droga Vasoativa: Noradrenalina Pico mck/kg/min por horas

Dobutamina Pico mck/kg/min por horas

Dopamina Pico mck/kg/min por horas

Outra: Pico mck/kg/min por horas

Uso de: ☐ NO ☐ BIA ☐ Cateter AE ☐ Swan Ganz ☐ Vigileo ☐ Hipertermia

Complicações: ☐ IAM pós-op ☐ AVE ☐ Arritmia não FA

Pós-operatório (Enf):

Complicações: ☐ AVE ☐ Arritmia não FA ☐ Arritmia FA ☐ Infecção

sítio:.....

Dias de internação UTI:..... Enf:..... Data de alta: ____/____/20____

☐ Óbito

☐ FA pós operatória

9.2 Anexo B – Registro de 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

DATA DA ENTRADA: 04 de novembro de 2010.

DATA DA 1ª AVALIAÇÃO: 16 de novembro de 2010.

DATA DA AVALIAÇÃO FINAL: 23 de novembro de 2010.

CAAE: 0091.0.131.000-10

Nº DO PROTOCOLO NO CEP: 4005

(este nº. deverá citar nas correspondências referentes a este projeto)

Investigador Principal: Andre Feldman

Orientador: Dr. Dalmo Antonio Ribeiro Moreira

Nº de Sujeitos no Centro: 200

Nº de Sujeitos no Brasil: 200

Nº de Sujeitos Total: 200

Área de Conhecimento: Ciências da Saúde – Medicina

Área Temática Especial: Genética Humana

Unitermos: polimorfismo, genético, fibrilação, atrial

Fase: Não se aplica

Nível: Diagnóstico

Duração do Estudo: 04 anos

Patrocinador: Não se aplica

Grupo: III

Considerações/Comentários: O estudo tem como objetivo realizar uma análise comparativa entre pacientes com FAPO e pacientes sem FAPO identificando a associação de polimorfismos genéticos e o surgimento de fibrilação atrial pós cirurgia de RM, a presença de polimorfismos que promovam maior expressão de

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

RNA_m levando a maior ativação de receptores beta-adrenérgicos em tecido de sangue periférico em pacientes com FAPO, identificação de polimorfismos genéticos que promovam maior expressão de RNA_m levando a maior ativação de receptores beta-adrenérgicos em tecidos atrial de pacientes com FAPO e características e perfil da população estudada obtendo dados que possam atuar como fatores de risco para o surgimento de FAPO.

Ao se proceder à análise ao projeto em questão, considera-se que:

- a) O projeto preenche os requisitos fundamentais das resoluções CNS 196/96, 251/97 e 292/99, sobre as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Conselho Nacional de Saúde / Conselho Nacional de Ética em Pesquisa / Agência Nacional de Vigilância Sanitária e as Boas Práticas de Pesquisa Clínica do ICH-GCP.
- b) O Comitê de Ética em Pesquisa avaliou o Protocolo de Estudo e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
- c) O Comitê de Ética em Pesquisa segue os preceitos das resoluções CNS 196/96, 251/97 e 292/99, sobre as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Conselho Nacional de Saúde / Conselho Nacional de Ética em Pesquisa / Agência Nacional de Vigilância Sanitária e as Boas Práticas de Pesquisa Clínica do ICH-GCP.

Diante do exposto, O Comitê de Ética em Pesquisa, manifesta-se pela:

- Protocolo de Pesquisa Clínica/ Tese de Doutorado 2010 – Aprovado
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Aprovado
- Declaração de Realização do Estudo – Prof. Dr. Carlos Gun – Entregue
- Declaração de Propriedade das Informações – Entregue
- Declaração de Manuseio de Material Biológico – Entregue

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

- Publicação dos Resultados da Pesquisa – Entregue
- Declaração de Responsabilidade, Direitos e Obrigações – Entregue
- Declaração de Recrutamento – Entregue
- Orçamento Financeiro Detalhado – Entregue
- Termo de Compromisso do Investigador – Entregue
- Lista de Centros Participantes – Entregue
- Declaração de Riscos e Benefícios – Entregue
- Declaração sobre currículo na Plataforma Lattes –
<http://lattes.cnpq.br/2936049810707235> - Entregue
- Folha de Rosto – Entregue

O Comitê de Ética em Pesquisa, solicita que:

- a. Informar imediatamente relatório sobre qualquer evento adverso ocorrido
- b. Comunicar qualquer alteração no projeto e no TCLE.
- c. Elaborar e apresentar ao CEP os relatórios parcial e final sobre a pesquisa.

Situação: Protocolo Avaliado e Aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa em Reunião Extraordinária Realizada no Dia 23 de Novembro de 2010.

São Paulo, 23 de novembro de 2010.

Pedro L. P. P.

9.3 Anexo C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma.

TÍTULO DO ESTUDO: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE miRNAs EM PACIENTES COM FIBRILAÇÃO ATRIAL AGUDA NO PÓS OPERATÓRIO DE CIRURGIA DE REVASCULARIZAÇÃO MIOCÁRDICA

CENTRO: INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA

INVESTIGADOR: ANDRE FELDMAN

NÚMERO DO PACIENTE: _____

INICIAIS DO PACIENTE: _____

O OBJETIVO DO ESTUDO CONSISTE EM ANALISAR A PRESENÇA DE miRNA QUE DETERMINEM O APARECIMENTO DE FIBRILAÇÃO ATRIAL NO PERÍODO PÓS OPERATÓRIO DE CIRURGIA CARDÍACA

Você está sendo convidado para participar deste estudo porque será submetido à cirurgia cardíaca conforme indicação de seu médico cardiologista. Os autores deste projeto desejam pesquisar e descobrir quais os pacientes que apresentam alterações genéticas que fazem com que apareça uma arritmia após o procedimento cirúrgico e, a partir desta descoberta, propiciar uma prevenção ao surgimento da arritmia aos pacientes identificados com tal alteração genética. Ao aceitar esta pesquisa você estará ajudando no desenvolvimento e na melhora do atendimento de pacientes que, como você, serão submetidos à cirurgia cardíaca.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Caso você queira participar deste estudo você será submetido à coleta de 20ml de sangue no dia que precede a cirurgia e outros 20ml de sangue no segundo dia de pós operatório. Durante a cirurgia será coletado um pequeno fragmento (um centímetro) de seu coração sem qualquer prejuízo futuro a sua saúde. Tal fragmento é descartado durante o procedimento habitual, sendo que, desta vez, o fragmento será armazenado para estudo ao invés de ser descartado. O material coletado será armazenado no laboratório de biologia molecular para posterior análise. Os materiais obtidos (sangue e tecido atrial) serão submetidos à análise para estudo de alterações genéticas que estejam relacionados a arritmia que está sendo pesquisada. Este material poderá permanecer estocado por tempo indeterminado para que possam ser feitas outras dosagens de outras substâncias para fins de estudo quer seja neste projeto ou em outros projetos.

RISCOS E DESCONFORTOS

Felizmente o número de efeitos colaterais são poucos, dentre eles pode ocorrer tontura e mal estar relacionados a punção de sangue e realização de mais de uma punção caso haja dificuldade técnica na obtenção de sangue venoso. A retirada de um pequeno fragmento de 1 cm do tecido atrial não está relacionada a risco à sua saúde uma vez que tal procedimento já faz parte do processo que é, habitualmente, realizado durante o ato cirúrgico

BENEFÍCIOS POTENCIAIS

Declaro ainda que os participantes deste estudo poderão ou não receber um benefício direto com a sua participação no estudo uma vez que

serão acompanhados de forma mais próxima podendo obter acesso ao médico de forma mais facilitada.

ALTERNATIVAS À PARTICIPAÇÃO

Caso você não queira participar deste estudo, você receberá o tratamento de forma habitual sem qualquer prejuízo a seu tratamento. Caso deseje, você pode desistir em qualquer momento ao longo do estudo sem qualquer prejuízo em seu tratamento e em seu seguimento.

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 neste estudo.

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.

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 muito menos 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 a alguma alteração médica que pode colocá-lo em risco de outras complicações se continuar a participar, cancelamento do estudo pela coordenação do estudo, por você não cumprir as orientações dadas pela equipe de pesquisa ou outras questões administrativas. Caso isso venha a acontecer seu tratamento continuará sendo feito pelo seu médico. Caso você apresente uma reação adversa (efeito colateral) durante o estudo, você deve entrar em contato imediatamente com o Dr. Andre Feldman no telefone 5085-6007.

SOLICITAÇÃO DE INFORMAÇÕES ADICIONAIS

O investigador clínico, Dr. Andre Feldman, tel 5085-6007, irá responder todas as dúvidas que você possa ter sobre sua participação neste estudo. Em caso de dúvidas ou preocupações quanto ao 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 e 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.

_____	_____	____:____ h
Assinatura do Paciente	Data	Hora

_____	_____	____:____ h
Testemunha (se necessário)	Data	Hora

_____	_____	____:____ h
Assinatura do Investigador	Data	Hora

10 REFERÊNCIAS

1. Bellet S. Clinical disorders of the heart beat. *Lea & Febinger*, 1971.
2. Einthoven W. Le telecardiogramme. *Arch Int Physiol* 1906;4:132-164.
3. Chugh SS, Havmoeller R, Narayanan K et al. Worldwide epidemiology of atrial fibrillation: a Global Burden of Disease 2010 Study. *Circulation* 2014;129(8):837-847.
4. Friberg L, Bergfeldt L. Atrial fibrillation prevalence revisited. *J Intern Med* 2013;274(5):461-468.
5. Rahman F, Kwan GF, Benjamin EJ. Global epidemiology of atrial fibrillation. *Nat Rev Cardiol* 2014;11(11):639-654.
6. Mitchell LB. CCS atrial fibrillation guidelines committee. Canadian Cardiovascular Society atrial fibrillation guidelines 2010: prevention and treatment of atrial fibrillation following cardiac surgery. *Can J cardiol* 2011;27:91-7.
7. Creswell LL, Schuessler RB, Rosenbloom M, Cox JL. Hazards of postoperative atrial arrhythmias. *Ann Thorac Surg* 1993;56(3):539-549.
8. Erdil N, Gedik E, Donmez K et al. Predictors of postoperative atrial fibrillation after on-pump coronary artery bypass grafting: is duration of mechanical ventilation time a risk factor? *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2014;20(2):135-142.
9. Peretto G, Durante A, Limite LR, Cianflone D. Postoperative arrhythmias after cardiac surgery: incidence, risk factors, and therapeutic management. *Cardiol Res Pract* 2014;2014:615987.
10. Mathew JP, Fontes ML, Tudor IC et al. A multicenter risk index for atrial fibrillation after cardiac surgery. *JAMA* 2004;291(14):1720-1729.
11. Silva RG, Lima GG, Laranjeira A, Costa AR, Pereira E, Rodrigues R. Fatores de risco e morbimortalidade associados à fibrilação atrial no pós-operatório de cirurgia cardíaca. *Arq Bras Cardiol* 2004;83(2):105-110.
12. Aranki SF, Shaw DP, Adams DH et al. Predictors of atrial fibrillation after coronary artery surgery. Current trends and impact on hospital resources. *Circulation* 1996;94(3):390-397.

13. Chelazzi C, Villa G, De Gaudio AR. Postoperative atrial fibrillation. *ISRN Cardiol* 2011;2011:203179.
14. Gaudino M. The -174G/C interleukin-6 polymorphism influences postoperative interleukin-6 levels and postoperative atrial fibrillation. Is atrial fibrillation an inflammatory complication? 2003.
15. Anselmi A, Possati G, Gaudino M. Postoperative inflammatory reaction and atrial fibrillation: simple correlation or causation? *Ann Thorac Surg* 2009;88(1):326-333.
16. Ramlawi B, Otu H, Mieno S et al. Oxidative stress and atrial fibrillation after cardiac surgery: a case-control study. *Ann Thorac Surg* 2007;84(4):1166-1172.
17. Baker WL, Anglade MW, Baker EL, White CM, Kluger J, Coleman CI. Use of N-acetylcysteine to reduce post-cardiothoracic surgery complications: a meta-analysis. *Eur J Cardiothorac Surg* 2009;35(3):521-527.
18. Chen WT, Krishnan GM, Sood N, Kluger J, Coleman CI. Effect of statins on atrial fibrillation after cardiac surgery: a duration- and dose-response meta-analysis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2010;140(2):364-372.
19. Eslami M, Badkoubbeh RS, Mousavi M et al. Oral ascorbic acid in combination with beta-blockers is more effective than beta-blockers alone in the prevention of atrial fibrillation after coronary artery bypass grafting. *Tex Heart Inst J* 2007;34(3):268-274.
20. Edwards JD, Wilkins RG. Atrial fibrillation precipitated by acute hypovolaemia. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1987;294(6567):283-284.
21. Kalus JS, Caron MF, White CM et al. Impact of fluid balance on incidence of atrial fibrillation after cardiothoracic surgery. *Am J Cardiol* 2004;94(11):1423-1425.
22. Sood N, Coleman CI, Kluger J, White CM, Padala A, Baker WL. The association among blood transfusions, white blood cell count, and the frequency of post-cardiothoracic surgery atrial fibrillation: a nested cohort study from the Atrial Fibrillation Suppression Trials I, II, and III. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2009;23(1):22-27.
23. Goldman L. Supraventricular tachyarrhythmias in hospitalized adults after surgery. Clinical correlates in patients over 40 years of age after major noncardiac surgery. *Chest* 1978;73(4):450-454.
24. Walsh SR, Tang T, Wijewardena C, Yarham SI, Boyle JR, Gaunt ME. Postoperative arrhythmias in general surgical patients. *Ann R Coll Surg Engl* 2007;89(2):91-95.

25. Toraman F, Karabulut EH, Alhan HC, Dagdelen S, Tarcan S. Magnesium infusion dramatically decreases the incidence of atrial fibrillation after coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg* 2001;72(4):1256-1261.
26. Brugada R. Is atrial fibrillation a genetic disease? *J Cardiovasc Electrophysiol* 2005;16(5):553-556.
27. Catterall WA. Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science* 1988;242(4875):50-61.
28. Venter JC, Adams MD, Myers EW et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001;291(5507):1304-1351.
29. Roberts R. Mechanisms of disease: Genetic mechanisms of atrial fibrillation. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006;3(5):276-282.
30. Chen YH, Xu SJ, Bendahhou S et al. KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation. *Science* 2003;299(5604):251-254.
31. Shi HF, Yang JF, Wang Q et al. Prevalence and spectrum of GJA5 mutations associated with lone atrial fibrillation. *Mol Med Rep* 2013;7(3):767-774.
32. Yang Y, Xia M, Jin Q et al. Identification of a KCNE2 gain-of-function mutation in patients with familial atrial fibrillation. *Am J Hum Genet* 2004;75(5):899-905.
33. Xia M, Jin Q, Bendahhou S et al. A Kir2.1 gain-of-function mutation underlies familial atrial fibrillation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;332(4):1012-1019.
34. Lu Y, Zhang Y, Wang N et al. MicroRNA-328 contributes to adverse electrical remodeling in atrial fibrillation. *Circulation* 2010;122(23):2378-2387.
35. Ling TY, Wang XL, Chai Q et al. Regulation of the SK3 channel by microRNA-499--potential role in atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 2013;10(7):1001-1009.
36. Gollob MH, Jones DL, Krahm AD et al. Somatic mutations in the connexin 40 gene (GJA5) in atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2006;354(25):2677-2688.
37. Darbar D, Roden DM. Genetic mechanisms of atrial fibrillation: impact on response to treatment. *Nat Rev Cardiol* 2013;10(6):317-329.
38. Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature* 2007;447(7143):396-398.

39. Talbert PB, Henikoff S. Spreading of silent chromatin: inaction at a distance. *Nat Rev Genet* 2006;7(10):793-803.
40. Ozanne SE, Constancia M. Mechanisms of disease: the developmental origins of disease and the role of the epigenotype. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2007;3(7):539-546.
41. Tost J. DNA methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker. *Mol Biotechnol* 2010;44(1):71-81.
42. Ling C, Groop L. Epigenetics: a molecular link between environmental factors and type 2 diabetes. *Diabetes* 2009;58(12):2718-2725.
43. Xu C, Lu Y, Pan Z et al. The muscle-specific microRNAs miR-1 and miR-133 produce opposing effects on apoptosis by targeting HSP60, HSP70 and caspase-9 in cardiomyocytes. *J Cell Sci* 2007;120(Pt 17):3045-3052.
44. Cortez MA, Calin GA. MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases. *Expert Opin Biol Ther* 2009;9(6):703-711.
45. Hoekstra M, van der Lans CA, Halvorsen B et al. The peripheral blood mononuclear cell microRNA signature of coronary artery disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;394(3):792-797.
46. Tijssen AJ, Creemers EE, Moerland PD et al. MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure. *Circ Res* 2010;106(6):1035-1039.
47. Vlassov VV, Laktionov PP, Rykova EY. Circulating nucleic acids as a potential source for cancer biomarkers. *Curr Mol Med* 2010;10(2):142-165.
48. Wang Z, Lu Y, Yang B. MicroRNAs and atrial fibrillation: new fundamentals. *Cardiovasc Res* 2011;89(4):710-721.
49. Laterza OF, Lim L, Garrett-Engele PW et al. Plasma MicroRNAs as sensitive and specific biomarkers of tissue injury. *Clin Chem* 2009;55(11):1977-1983.
50. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem* 2010;285(23):17442-17452.
51. Yang B, Lu Y, Wang Z. Control of cardiac excitability by microRNAs. *Cardiovasc Res* 2008;79(4):571-580.
52. Wang Z, Luo X, Lu Y, Yang B. miRNAs at the heart of the matter. *J Mol Med (Berl)* 2008;86(7):771-783.

53. Wang Z. The role of microRNA in cardiac excitability. *J Cardiovasc Pharmacol* 2010;56(5):460-470.
54. Latronico MV, Catalucci D, Condorelli G. Emerging role of microRNAs in cardiovascular biology. *Circ Res* 2007;101(12):1225-1236.
55. Latronico MV, Condorelli G. MicroRNAs and cardiac conduction. *Curr Drug Targets* 2010;11(8):907-912.
56. Luo X, Pan Z, Shan H et al. MicroRNA-26 governs profibrillatory inward-rectifier potassium current changes in atrial fibrillation. *J Clin Invest* 2013;123(5):1939-1951.
57. Thum T. Voyaging into the parallel universe of micro RNAs. 18-5-2014. 20-11-2014. Ref Type: Online Source
58. Biel M, Schneider A, Wahl C. Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation. *Trends Cardiovasc Med* 2002;12(5):206-212.
59. Voigt N, Trausch A, Knaut M et al. Left-to-right atrial inward rectifier potassium current gradients in patients with paroxysmal versus chronic atrial fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2010;3(5):472-480.
60. El-Armouche A, Boknik P, Eschenhagen T et al. Molecular determinants of altered Ca²⁺ handling in human chronic atrial fibrillation. *Circulation* 2006;114(7):670-680.
61. Bartos DC, Anderson JB, Bastiaenen R et al. A KCNQ1 mutation causes a high penetrance for familial atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2013;24(5):562-569.
62. Gaborit N, Le BS, Szuts V et al. Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *J Physiol* 2007;582(Pt 2):675-693.
63. Gungor B, Ekmekci A, Arman A et al. Assessment of interleukin-1 gene cluster polymorphisms in lone atrial fibrillation: new insight into the role of inflammation in atrial fibrillation. *Pacing Clin Electrophysiol* 2013;36(10):1220-1227.
64. Deng H, Xue YM, Zhan XZ, Liao HT, Guo HM, Wu SL. Role of tumor necrosis factor-alpha in the pathogenesis of atrial fibrillation. *Chin Med J (Engl)* 2011;124(13):1976-1982.
65. Condorelli G, Latronico MV, Dorn GW. microRNAs in heart disease: putative novel therapeutic targets? *Eur Heart J* 2010;31(6):649-658.
66. Latronico MV, Catalucci D, Condorelli G. MicroRNA and cardiac pathologies. *Physiol Genomics* 2008;34(3):239-242.

67. Bianco ACM, Timerman A, Paes AT et al. Análise prospectiva de risco em pacientes submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 2005;85(4):254-261.
68. Topal AE, Eren MN. Predictors of atrial fibrillation occurrence after coronary artery bypass graft surgery. *Gen Thorac Cardiovasc Surg* 2011;59(4):254-260.
69. van RE, Olson EN. MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *J Clin Invest* 2007;117(9):2369-2376.
70. Shrivastava R, Smith B, Caskey D, Reddy P. Atrial fibrillation after cardiac surgery: does prophylactic therapy decrease adverse outcomes associated with atrial fibrillation. *J Intensive Care Med* 2009;24(1):18-25.
71. Villareal RP, Hariharan R, Liu BC et al. Postoperative atrial fibrillation and mortality after coronary artery bypass surgery. *J Am Coll Cardiol* 2004;43(5):742-748.
72. Bang C, Fiedler J, Thum T. Cardiovascular importance of the microRNA-23/27/24 family. *Microcirculation* 2012;19(3):208-214.
73. McManus DD, Tanriverdi K, Lin H et al. Plasma microRNAs are associated with atrial fibrillation and change after catheter ablation (the miRhythm study). *Heart Rhythm* 2015;12(1):3-10.
74. McManus DD, Lin H, Tanriverdi K et al. Relations between circulating microRNAs and atrial fibrillation: data from the Framingham Offspring Study. *Heart Rhythm* 2014;11(4):663-669.
75. Liu Z, Zhou C, Liu Y et al. The expression levels of plasma microRNAs in atrial fibrillation patients. *PLoS One* 2012;7(9):e44906.
76. Kanno S, Saffitz JE. The role of myocardial gap junctions in electrical conduction and arrhythmogenesis. *Cardiovasc Pathol* 2001;10(4):169-177.
77. Hagendorff A, Schumacher B, Kirchhoff S, Luderitz B, Willecke K. Conduction disturbances and increased atrial vulnerability in Connexin40-deficient mice analyzed by transesophageal stimulation. *Circulation* 1999;99(11):1508-1515.
78. Chang SH, Chang SN, Hwang JJ et al. Significant association of rs13376333 in KCNN3 on chromosome 1q21 with atrial fibrillation in a Taiwanese population. *Circ J* 2012;76(1):184-188.

79. Pandit SV, Berenfeld O, Anumonwo JM et al. Ionic determinants of functional reentry in a 2-D model of human atrial cells during simulated chronic atrial fibrillation. *Biophys J* 2005;88(6):3806-3821.
80. Ziabakhsh-Tabari S. Can perioperative C-reactive protein and interleukin-6 levels predict atrial fibrillation after coronary artery bypass surgery? *Saudi Med J* 2008;29(10):1429-1431.
81. Ucar HI, Tok M, Atalar E et al. Predictive significance of plasma levels of interleukin-6 and high-sensitivity C-reactive protein in atrial fibrillation after coronary artery bypass surgery. *Heart Surg Forum* 2007;10(2):E131-E135.
82. Guliemos V, Menschikowski M, Dill H et al. Interleukin-1, interleukin-6 and myocardial enzyme response after coronary artery bypass grafting - a prospective randomized comparison of the conventional and three minimally invasive surgical techniques. *Eur J Cardiothorac Surg* 2000;18(5):594-601.
83. Zhong F, Li XY, Yang SL, Stefano GB, Fimiani C, Bilfinger TV. Methionine-enkephalin stimulates interleukin-6 mRNA expression: human plasma levels in coronary artery bypass grafting. *Int J Cardiol* 1998;64 Suppl 1:S53-S59.

11 APÊNDICES

11.1 Apêndice A - Protocolo de extração de mRNA do tubo PAXgene

1. Utilizando a centrífuga com o rotor inclinável, centrifugam-se os tubos PAXgene a 5000 RPM (Rotações Por Minuto) por 10 minutos na temperatura ambiente (15 a 25°C).
2. Remove-se o sobrenadante por inversão, tomando o cuidado de não desfazer o botão de células no fundo do tubo. Em seguida, adiciona-se 4 ml de *RNase-free water* (RNFW) aos tubos fechando-os com uma nova tampa.
3. Agitam-se os tubos no Vórtex® até dissolver completamente o botão de células, e centrifugam-se por 10 minutos a 5000 RPM. Em seguida, descarta-se todo o sobrenadante por inversão.
4. Adiciona-se 350 µl de solução tampão (BR1), e agitam-se os tubos no Vórtex® para dissolver o botão de células. Passa-se todo o volume da suspensão para um microtubo de 1,5 ml.
5. Adiciona-se 300 µl de *Binding Buffer* (BR2) e 40 µl de proteinase K (PK). Mistura-se no agitador Vórtex® por 5 segundos, e incuba-se por 10 minutos a 55°C em termo bloco com a agitação a 1000 RPM.
6. Pipeta-se a solução do item anterior na coluna de cor lilás (*Shredder spin column - PSC*) acoplada ao tubo de 2 ml (PT). Centrifuga-se o conjunto por 3 minutos a 8000 RPM.
7. Descarta-se a coluna lilás e cuidadosamente transfere todo o filtrado para um novo tubo de 1,5 ml, tomando o cuidado de não transferir o resto celular no fundo do tubo.
8. Adiciona-se 350 µl de etanol 96-100%. Mistura-se no Vórtex® e pipeta-se 700 µl dessa solução para a coluna vermelha (*PAXgene*

- RNA spin column*) e centrifuga-se por 1 minuto a 14000 RPM. Repetir o procedimento até terminar todo o volume o item anterior.
9. Adiciona-se à coluna 350µl de solução tampão de lavagem (BR3) e centrifuga-se o conjunto por 1 minuto a 14000 RPM. Transferir a coluna para um novo tubo de 2ml e descarta-se os tubos contendo o filtrado.
 10. Prepara-se a seguinte mistura para cada coluna: 10µl de solução *DNase I* (RNFD) adicionada a 70µl de *DNA digestion buffer* (RDD).
 11. Pipeta-se 80 µl (RNFD+RDD) do item anterior diretamente na membrana da coluna. Incuba-se à temperatura ambiente por 15 minutos. Após o período de incubação, iniciam-se as seguintes etapas de lavagem da coluna: uma vez com 350 µl de solução tampão BR3 e duas vezes com 500 µl de solução tampão BR4. Em todas as etapas de lavagem, centrifuga-se a coluna por 1 minuto a 14000 RPM.
 12. Por fim, descartam-se os tubos contendo o filtrado. Transfere-se a coluna em um novo tubo de 1,5 ml e pipeta-se 80 µl de tampão de eluição (BR5) diretamente na membrana da coluna, e centrifuga-se por 1 minuto a 14000 RPM. Em seguida, incuba-se o eluato por 5 minutos a 65°C sem agitação. Após a incubação, colocam-se os tubos no gelo imediatamente por 3 minutos.
 13. As amostras de RNA são quantificadas por espectrometria de fluorescência no aparelho Qubit (Life Applied, CA, EUA) e guardadas rapidamente no freezer a -80 °C até o momento do experimento.

11.2 Apêndice B - Protocolo de extração de mRNA do tecido atrial

1. O fragmento do átrio de mais ou menos 20 mg é picotado com bisturi e colocado no microtubo de 1,5 ml contendo 300 µl de solução tampão RLT (contendo tiocianato de guanidina). Em seguida, utilizando o aparelho dispersador de tecido (IKA Works INC. Wilmington, NC, EUA) o material é lisado até ficar homogêneo.
2. Adiciona-se 590 µl de água livre de RNase e 10 µl de proteinase K ao tubo contendo o lisado e incuba-se a solução por 10 minutos a 55°C. Em seguida, centrifuga-se o tubo por 3 minutos a 10.000 RPM.
3. Transfere-se o sobrenadante para um tubo novo de 1,5 ml e adiciona-se 1/2 volume de etanol 96-100% e mistura-se no agitador.
4. Transfere-se 700 µl da solução do item anterior para a coluna (*RNeasy Mini column*) acoplada ao tubo coletor de 2 ml. Centrifuga-se o conjunto por 15 segundos a 8.000 RPM e descarta-se o filtrado. Repetir o procedimento até filtrar toda a solução do item 3.
5. Pipeta-se 350 µl da solução tampão RW1 na coluna e centrifuga-se o conjunto da coluna e tubo por 15 segundos a 8.000 RPM, descartando o filtrado.
6. Prepara-se a seguinte mistura para cada coluna: 10 µl de solução *DNase I* adicionada a 70 µl de *DNA digestion buffer* (RDD). Por exemplo; para 12 colunas, colocou-se 120 µl de RNFD e 840 µl de RDD.
7. Pipeta-se 80 µl do item anterior na coluna. Incuba-se à temperatura ambiente por 15 minutos. Após o período de incubação, iniciam-se as seguintes etapas de lavagem: uma vez com 350 µl de solução tampão BR3 e duas vezes com 500 µl de

solução tampão BR4. Em todas as etapas de lavagem, centrifugam-se as colunas por 1 minuto a 14000 RPM.

8. Secam-se as colunas centrifugando por 1 minuto a 14000 RPM.
9. Transfere-se a coluna em um novo tubo de 1,5 ml e pipeta-se 50 µl de tampão de eluição (BR5) diretamente na membrana da coluna, e centrifuga-se por 1 minuto a 14000 RPM.
10. As amostras de RNA obtidas são quantificadas por espectrometria de fluorescência no aparelho Qubit (Life Applied, CA, EUA) e guardadas imediatamente no freezer a -80°C até o momento do experimento.

11.3 Apêndice C - Análise de expressão de mRNA por qPCR

A reação de qPCR para estudo de expressão gênica foi realizada em duplicata, e cada reação foi composta de 12,5 µl de QuantiFast Multiplex PCR Master Mix, 1,25 µl de 20x QuantiFast Probe Assay (FAM – gene alvo), 1,25 µl de 20x QuantiFast Probe Assay (MAX – gene referência), 5 µl água livre de RNase e 5 µl de amostra de cDNA pré diluída.

A reação foi realizada em 40 ciclos de seguintes condições:

- 1- Incubação inicial de 5 minutos a 95°C para ativação da enzima *Hot Star Taq* e também para outros reagentes atingirem a temperatura ideal da reação.
- 2- 45 ciclos de 30 segundos a 95°C que corresponde à fase de desnaturação, seguido de 30 segundos a 60°C que corresponde à fase de hibridização e extensão.
- 3- Os sinais de fluorescência foram detectados nos filtros verde (FAM) e amarelo (MAX) no equipamento Rotor-Gene (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha).
- 4- Na análise do resultado foi determinada uma linha de corte na região logarítmica da curva, e o número de ciclos onde essa linha se cruza corresponde ao CT (*cycle threshold*). O valor de CT é preditivo da quantidade de mRNA alvo presente na amostra.

Os critérios de validação interna das RT-PCR foram: **(i)** controles NTC (*No Template Control*) adequados, ou seja, sem amplificação, **(ii)** curva de amplificação com padrão exponencial e com platô, com o seu início de aumento antes do CT de 30, **(iii)** ocorrência de amplificação do gene de interesse com CT até 40, **(iv)** desvio padrão dos CT das duplicatas menor que 0,30. **(iv)** As eficiências das reações do gene de referência e do gene alvo semelhantes. Caso não atendessem a qualquer dos itens dos critérios de validação, os ensaios eram repetidos.

A quantificação relativa (QR) de cada amostra de RNA foi calculada pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Segundo: “Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method” Linvak KJ and Schmittgen TD 2001). Para isso, usou-se o gene de referência GAPDH para a normalização do cálculo de ΔCT ($CT_{\text{gene alvo}} - CT_{\text{GAPDH}}$), e a média de CT do grupo sem fibrilação atrial como calibrador. A fórmula aplicada foi a seguinte:

$$\text{QR de cada amostra} = 2^{[-(CT_{\text{gene alvo}} - CT_{\text{GAPDH}}) - (\text{média do calibrador})]}$$

Considerou-se maior ou menor expressão todo o valor de QR >2 ou QR <0,5, respectivamente.

11.4 Apêndice D - Escolha do gene de referência para reação de qPCR

O gene de referência, também denominado de gene endógeno ou gene “*house keeping*” é usado como controle interno da reação de qPCR. A normalização da expressão de um gene alvo por meio de um gene de referência permite minimizar as variações causadas por degradação de RNA, presença de inibidores na amostra de RNA, deficiências na transcrição reversa ou na recuperação de ácido nucléico, além de possíveis erros de manipulação do ensaio.

Para a escolha do gene endógeno utilizou-se uma placa comercial contendo 32 genes endógenos mais utilizados em amostras biológicas humanas (TaqMan array 96 well fast plate – Applied Biosystems, Foster, EUA). Entre os genes avaliados, selecionaram-se 6 genes (*GAPDH*, *ACTB*, *B₂M*, *UBC*, *MT-ATP6* e *PPIA*) com base no menor número de ciclos que cruzam um limiar de detecção da fluorescência (CT - *threshold cycle*) e a importância funcional desses genes no tecido cardíaco. Após a seleção, avaliou-se a expressão destes seis genes em 10 amostras distintas de cDNA da população de estudo. Os resultados da expressão foram analisados no programa geNorm (Primer Design, CO, UK), e foram identificados os genes como genes mais estáveis, ou seja, com menor variação entre as amostras testadas. Escolheu-se o gene *GAPDH* como gene de referência deste trabalho, porque é um gene comumente usado para estudos de expressão gênica em células leucocitárias do sangue periférico.

11.5 Apêndice E - Protocolo para extração de miRNA do plasma

1. Em um tubo com capacidade para 3 ml, pipeta-se 1000 µl de reagente *QIAzol Lysis* seguida de adição de 200 µl de plasma. Mistura-se esta solução utilizando agitador. Deixa-se o tubo em repouso à temperatura ambiente (15-25 °C) por 5 minutos.
2. Adiciona-se 3,5 µl de controle *miRNeasy Serum/Plasma Spike-In* ($1,6 \times 10^8$ cópias/ µl de miR-39 do *Caenorhabditis elegans*) e mistura-se vigorosamente no agitador.
3. Adiciona-se 1.200 µl de clorofórmio, tampar os tubos e agitar vigorosamente por 15 segundos. Deixar os tubos em repouso à temperatura ambiente (15-25°C) por 3 minutos.
4. Centrifuga-se os tubos a 14.000 rpm a 4°C durante 15 minutos.
5. Transfere-se a fase aquosa que fica na parte superior da solução para um novo tubo coletor de 3 ml, evitando pipetar o material da interface.
6. Adiciona-se 1,5 volumes de etanol 100% e mistura-se a solução por repetições de pipetagem e dispensação.
7. Pipeta-se 600 µl da solução do item anterior para o conjunto de coluna (*RNeasy MinElute spin*) e tubo coletor, fecha-se a tampa. Nas etapas seguintes, as centrifugações foram realizadas à temperatura ambiente (15-25°C). Centrifuga-se a coluna a 14.000 rpm por 15 segundos descartando o filtrado.
8. Repete o procedimento do item 7 até terminar todo o volume da amostra do item 6.
9. Adiciona-se 700 µl de solução tamponado RWT à coluna, centrifuga-se à 14.000 rpm por 15 segundos descartando o filtrado.
10. Pipeta-se 500 µl de solução tamponado RPE na coluna, centrifuga-se a 14.000 rpm por 15 segundos descartando o filtrado.

11. Pipeta-se 500 µl de etanol 80% diluído em água livre de RNase na coluna. Em seguida, centrifuga-se a 14.000 rpm por 2 minutos para lavar a membrana da coluna e descarta-se o tubo contendo o filtrado.
12. Transfere-se a coluna para um novo tubo coletor de 2,0 ml, deixando a tampa aberta e centrifuga-se a 14.000 rpm por 5 minutos para secar a membrana da coluna.
13. Transfere-se a coluna para um novo tubo de 1,5 ml, adiciona-se 14 µl de água livre de RNase no centro da membrana da coluna e centrifuga-se a 14.000 rpm por 1 minuto.
14. As amostras de miRNA obtidas no processo de extração foram quantificadas e armazenadas rapidamente no freezer a -80 °C até o momento do experimento.

11.6 Apêndice F - Análise de expressão de miRNA por qPCR

Em cada poço da placa foram adicionados cinco μ l do master mix *QuantiTect Sybr Green 2x*, 1 μ l de iniciador universal 10x, 1 μ l de H₂O livre de RNase, 2 μ l da amostra de cDNA dos pacientes pré diluído (1/5) e 1 μ l de iniciadores específicos para cada miRNA avaliado. A reação foi realizada nas seguintes condições: 15 minutos a 95°C para a ativação da DNA polimerase *HotStar* (contida no master mix), seguida de 40 ciclos de 94°C por 15 segundos, 55°C por 30 segundos e 70°C por 30 segundos, para a detecção da fluorescência. Foram determinadas as curvas de *melting* de cada miRNA por se tratar de um sistema de detecção por *Sybr Green*.

Após a determinação das expressões de todos os miRNA, inclusive dos controles, foi realizado um estudo em conjunto de todas as amostras em um único projeto, para que o valor de *cycle threshold* (Ct) dos miRNA fossem padronizados entre as amostras. Para isto foi utilizado o *ExpressionSuite Software v1.0.3* (Applied Biosystems®, CA, EUA).

Foram realizadas duas etapas consecutivas de normalização das expressões dos miR-1, miR-23a, miR-46a em todas as amostras analisadas, inclusive no grupo controle. Para isto os valores de Ct de cada miRNA foram corrigidos de acordo com o valor de Ct do controle *Spike-In* de cada amostra separadamente ($Ct \text{ das amostras} - Ct \text{ do Spike-In} = 1^\circ \text{ delta Ct}$).

O valor resultante (1° delta Ct) foi então normalizado novamente de acordo com a média dos valores de Ct dos dois miRNA endógenos miR-16 e miR-423, ($1^\circ \text{ delta Ct} - \text{MEDIA Ct miR-16 e miR-423} = 2^\circ \text{ delta Ct}$).

Os 2° valores de delta Ct das amostras teste foram utilizados para a análise das expressões diferenciais, comparando-os aos 2° valores de delta Ct das amostras controles.