

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

TÚLIO FABIANO DE OLIVEIRA LEITE

**Expressão dos níveis plasmáticos dos miRNA-181b,
miRNA-21, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 em
pacientes com aneurisma de aorta abdominal e suas
relações com a evolução clínica após tratamento
endovascular**

RIBEIRÃO PRETO

2023

TÚLIO FABIANO DE OLIVEIRA LEITE

**Expressão dos níveis plasmáticos dos miRNA-181b,
miRNA-21, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 em
pacientes com aneurisma de aorta abdominal e suas
relações com a evolução clínica após tratamento
endovascular**

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

Área de Concentração: Clínica Cirúrgica.

**Orientador: Prof. Dr. Edwaldo Edner
Joviliano**

RIBEIRÃO PRETO

2023

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Leite, Túlio Fabiano de Oliveira

Expressão dos níveis plasmáticos dos miRNA-181b, miRNA-21, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 em pacientes com aneurisma de aorta abdominal e suas relações com a evolução clínica após tratamento endovascular. / Túlio Fabiano de Oliveira Leite; Orientador, Edwaldo Edner Joviliano. Ribeirão Preto. - 2023.

128p.: 6il.; 30 cm

Tese (Doutorado) - Programa de Clínica Cirúrgica. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

1. Aneurisma de aorta abdominal. 2. Correção endovascular de aneurisma de aorta abdominal. 3. microRNAs. 4. MMP. 5. TIMP. 6. Biomarcadores. 7. Vazamentos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluno: Túlio Fabiano de Oliveira Leite

Título: Expressão dos níveis plasmáticos dos miRNA-181b, miRNA-21, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 em pacientes com aneurisma de aorta abdominal e suas relações com a evolução clínica após tratamento endovascular.

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

Área de Concentração: Clínica Cirúrgica.

Aprovado em: ____/____/____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedicatória

Ao **Grande Arquiteto do Universo**, por existir, escolher e guiar-me sempre pelos melhores caminhos, iluminando-os nos momentos de angústia e incerteza, fortalecendo-me.

Ao meu amado filho, **Felipe**, que sempre foi fonte de inspiração e perseverança para seguir desbravando a vida.

Aos meus pais, **Geraldo e Nilda**, pelo amor, carinho, incentivo, pela dedicação, criação, pelos sentimentos e princípios que formaram meu caráter e que hoje norteiam minha vida. Meu reconhecimento e gratidão eterna.

À minha irmã, **Talita**, pela confiança na minha caminhada, pelo carinho, pela cumplicidade e amizade.

Aos meus avós, **Antônio Leite Machado** (*in memoriam*) e **Maria Leopoldina** (*in memoriam*), e **João Mendes** (*in memoriam*) e **Etelvina Lucinda** (*in memoriam*), que me fazem lembrar minhas origens. Pois, um homem sem memória é um homem sem história e um homem sem história está fadado a cometer, no presente e no futuro, os mesmos erros do passado.

Agradecimentos

Ao ***Prof. Dr. Edvaldo Edner Joviliano***, amigo, orientador, por ter dado a oportunidade de ser um incentivador na vida acadêmica e na área de pesquisa. Agradeço pela confiança, perseverança e entusiasmo.

Ao ***Prof. Dr. Joaquim Maurício da Motta Leal Filho***, agradeço também pela tutoria na minha formação de Radiologista Intervencionista e Cirurgião Endovascular, inspirando-me na busca incessante do conhecimento. Meu reconhecimento e eterna gratidão.

Ao ***Prof. Dr. Carlos Alberto Araújo Chagas***, angiologista e cirurgião vascular, eterno irmão, pioneiro a me incentivar na vida acadêmica e como pesquisador desde os primórdios da graduação e que segue ao longo da data presente. Agradeço a confiança, o carinho, a perseverança, companheirismo e o entusiasmo. Agradeço também pela tutoria na minha formação médica e de cirurgião vascular, inspirando-me na busca incessante do conhecimento. Meu reconhecimento e eterna gratidão.

Aos amigos residentes da especialidade que contribuíram de certa forma para o projeto, em especial ao Dr. Elpidio que me auxiliou na coleta de dados e amostras. Obrigado pelo companheirismo, ensinamento, apoio e incentivo.

Às equipes de enfermagem e técnicos de laboratórios da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela ajuda ao longo do projeto.

Ao Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, à Comissão de Pós-Graduação e às suas secretárias, em especial à Juliana.

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia da FMRP-USP: Fermino Sanches, pela ajuda no armazenamento das amostras e realização dos experimentos.

Aos demais Mestres, amigos e colegas de jornada das instituições e hospitais pelos quais passei: Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, Hospital Santa Casa de Misericórdia de Ribeirão Preto e Hospital das Clínicas da FMUSP. Agradeço pelos ensinamentos apreendidos.

Aos pacientes e seus familiares, todos envolvidos neste estudo, sem os quais esta tese não poderia ser realizada. Meu respeito e gratidão eterna!

Apoio Financeiro

Agradeço à **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), cujo apoio financeiro foi imprescindível para a realização deste estudo.

Agradeço à **FAEPA** (Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do HCFMRP-USP), pelo apoio para a realização deste estudo.

Resumo

Leite TFO. **Expressão dos níveis plasmáticos dos miRNA-181b, miRNA-21, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 em pacientes com aneurisma de aorta abdominal e suas relações com a evolução clínica após tratamento endovascular.** Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2023.

Introdução: O aneurisma de aorta abdominal (AAA) é uma importante causa de morbimortalidade na população idosa. O tratamento endovascular está associado à menor morbimortalidade que o tratamento convencional, no entanto necessita de seguimento rigoroso com exames de imagem contrastados para confirmação da exclusão do saco aneurismático. Considerando que a formação de um aneurisma é um processo multifatorial e complexo, envolvendo a remodelação destrutiva do tecido conjuntivo em todo o segmento afetado da parede da aorta e que este processo envolve inflamação crônica local, diminuição no número de células do músculo liso da túnica média, fragmentação da matriz extracelular da aorta e, ainda, que um perfil de expressão aberrante de miRNAs tem sido associado a doenças humanas, incluindo disfunção cardiovascular, propôs-se então a realização deste estudo. **Objetivos:** Quantificar e avaliar a resposta da expressão dos miRNAs, MMPs e TIMPs à correção endovascular de AAA com base em dosagens séricas no seguimento de seis meses pós-operatório. **Casística e Métodos:** Foram recrutados 47 pacientes com AAA, sem outras doenças inflamatórias associadas, atendidos no Ambulatório de Cirurgia Vascular e Endovascular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRPUSP), com indicação de tratamento endovascular, e 10 pacientes sem comorbidades. Foram selecionados para estudo e dosagens séricas os miRNA-181b, miRNA-21, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2. As expressões dos miRNAs, das MMPs e dos TIMPs foram realizadas pelos métodos de PCR em tempo real e ELISA, respectivamente, após extração do RNA das amostras de sangue total em dois momentos, pré-operatório e após seis meses de pós-operatório, e apenas uma vez no grupo controle. Foram coletados dados de perfil demográfico, seguimento clínico e exames de imagem com angiotomografia no pré-operatórios e após seis meses. **Resultados:** Foi observada hiperexpressão dos miRNA-181b, miRNA-21, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 no sangue total dos pacientes com AAA. O tratamento endovascular desses pacientes resultou em diminuição das expressões dos miRNAs analisados, indicando que a exclusão do saco aneurismático altera as expressões desses marcadores. As MMPs e os TIMPs apresentaram aumento de sua expressão após seis meses de pós-operatório em ambos os grupos, com e sem vazamento. Adicionalmente, as expressões dos miRNAs, MMPs e TIMPs não demonstraram correlação com o diâmetro do aneurisma, bem como com os diversos tipos de dispositivos utilizados para o tratamento endovascular dos AAA. **Conclusões:** A hiperexpressão dos miRNA-181b, miRNA-21, com sua redução após o tratamento endovascular, pode sugerir a utilização dessas moléculas como potenciais biomarcadores no seguimento desses pacientes. Porém, os miRNAs, MMPs e TIMPs não foram capazes de identificar possíveis vazamentos e nem discriminá-los em subtipos. Novos estudos com maior número de casos devem ser realizados para validar os dados obtidos no presente estudo.

Palavras-chave: Aneurisma de aorta abdominal. Correção endovascular de aneurisma de aorta abdominal. microRNAs. Biomarcadores. Vazamentos.

Abstract

Leite TFO. **Expression of plasma levels of miRNA-181b, miRNA-21, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 in patients with abdominal aortic aneurysm and their relationship with a clinical outcome after endovascular treatment.** Thesis (Doctorate) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2023.

Introduction: Abdominal aortic aneurysm (AAA) is an important cause of morbidity and mortality in the elderly population. Endovascular treatment is associated with lower morbidity and mortality than conventional treatment, however, it requires a rigorous follow-up with contrast imaging tests to confirm the aneurysmal sac exclusion. Considering that the formation of an aneurysm is a complex multifactorial process, involving the destructive remodeling of the connective tissue throughout the affected segment of the aortic wall and that this process involves a chronic local inflammation, a decrease in the number of smooth muscle cells of the media tunic, and fragmentation of the extracellular matrix of the aorta and although an aberrant expression profile of miRNAs has been associated with human diseases, including cardiovascular dysfunction, it was proposed to carry out this study involving this whole process. The main objective was to quantify and evaluate miRNA expression response to endovascular correction of abdominal aortic aneurysm based on serum dosages at the six-month follow-up. **Casuistic and Methods:** We recruited 47 consecutive patients with AAA without other associated inflammatory diseases from the Ambulatory of Vascular and Endovascular Surgery of the HCFMRPUSP with indication of endovascular treatment and 10 patients without comorbidities. The miRNA-181b, miRNA-21, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 were selected for study and serum dosages. The differential expression of the miRNAs was performed by the real-time PCR method and ELISA, after extraction of RNA from the whole blood samples at two moments, preoperatively and after 6 months of follow-up and only once in the control group. Demographic profile, clinical follow-up and imaging examinations with angiotomography performed in the preoperative period and after 6 months were collected. **Results:** Overexpression of miRNA-181b, miRNA-21, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 was observed in the whole blood of patients with AAA. Endovascular treatment of patients with AAA resulted in decreased expression of the studied miRNAs, indicating that exclusion of the aneurysmal sac alters the expression of these markers. MMPs and TIMPs showed an increase in their expression after six months postoperatively in both groups, with and without leakage. Additionally, the expressions of miRNAs, MMPs and TIMPs did not correlate with the diameter of the aneurysm or with the different types of devices used for the endovascular treatment of AAA. **Conclusions:** The overexpression of miRNA-181b, miRNA-21 with its reduction after endovascular treatment, may suggest the use of these molecules as potential biomarkers in the follow-up of these patients. However, miRNAs, MMPs and TIMPs were not able to identify possible leaks or discriminate them into subtypes. New studies with a larger number of cases should be carried out with the aim of validating the data obtained.

Keywords: Abdominal aortic aneurysm. Endovascular correction of abdominal aortic aneurysm. microRNAs. Biomarkers. Endoleaks.

Lista de Figuras

Figura 1 - Histopatogênese do AAA	40
Figura 2 - Mecanismo hipotético subjacentes à influência das MMPs nas patologias vasculares.....	42
Figura 3 - Modelo geral da biogênese do miRNA. mRNA, ácido ribonucleico mensageiro; miRNA, microRNA.....	49
Figura 4 - Esquema dos tipos de <i>endoleak</i>	56
Figura 5 - Expressão miR-21 e progressão do aneurisma da aorta	92
Figura 6 - Expressão miR-181b e progressão do aneurisma da aorta	95

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Desenho esquemático (<i>boxplot</i>) de Micro RNA 21, segundo os grupos controle e estudo (momentos pré e seis meses).....	81
Gráfico 2 - Desenho esquemático (<i>boxplot</i>) de Micro RNA 181-b, segundo os grupos controle e estudo (momentos pré e seis meses).....	82
Gráfico 3 - Desenho esquemático (<i>boxplot</i>) de MMP-2, segundo os grupos controle e estudo (momentos pré e seis meses).....	83
Gráfico 4 - Desenho esquemático (<i>boxplot</i>) de MMP-9, segundo os grupos controle e estudo (momentos pré e seis meses).....	84
Gráfico 5 - Desenho esquemático (<i>boxplot</i>) de TIMP-1, segundo os grupos controle e estudo (momentos pré e seis meses).....	85
Gráfico 6 - Desenho esquemático (<i>boxplot</i>) de TIMP-2, segundo os grupos controle e estudo (momentos pré e seis meses).....	86

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Dados relacionados à demografia e ao aspecto clínico dos pacientes	79
Tabela 2 -	PCR qualitativo plasmático miRNA grupo controle, pré-operatório e após seis meses de pós-operatório	81
Tabela 3 -	Nível plasmático MMPs grupo controle, pré-operatório e após seis meses de pós-operatório	82
Tabela 4 -	Nível plasmático TIMPs grupo controle, pré-operatório e após seis meses de pós-operatório	84
Tabela 5 -	Análise microRNAs, MMPs e TIMPs nos grupos com e sem <i>endoleak</i> pré-operatório e após seis meses de pós-operatório	87

Lista de Símbolos e Abreviaturas

AAA-	Aneurisma de aorta abdominal
AKT-	Proteína quinase (do inglês <i>Protein kinase</i>)
AMPK-	Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (do inglês <i>AMP-activated protein Kinase</i>)
AP-2α-	Proteína ativadora 2 α (do inglês <i>Activator Protein 2</i>)
ApoE -	Apolipoproteína E (do inglês <i>apolipoprotein E</i>)
APOA-1-	Apolipoproteína A-I (do inglês <i>apolipoprotein-A 1</i>)
apoA-1 D4F-	Apolipoproteína A-I D4F (do inglês <i>apolipoprotein-A 1</i>)
BCL 2-	<i>Linfoma de células B 2</i> (do inglês <i>B-cell lymphoma 2</i>)
CD-	Grupamento de diferenciação (do inglês <i>cluster of differentiation</i>)
<i>C. elegans-</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CTLA4-	Proteína 4 citotóxica associada a linfócitos T (do inglês <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>)
DKO-	<i>Double knockout</i>
e-PTFE-	Politetrafluoretileno (do inglês <i>polytetrafluoroethylene</i>)
EDTA-	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EVAR-	<i>Endovascular Aneurysm Repair</i>
FMRP-USP-	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
GTP-	Trifosfato de guanosina (do inglês <i>Guanosine Triphosphate</i>)
HCFMRP-USP-	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HDL-	Lipoproteína de alta densidade (<i>high density lipoprotein</i>)
HO-1-	<i>Heme oxygenase</i>
H₂O₂-	Peróxido de hidrogênio
IL-	Interleucina

IPOA3-	Importina-3
KDA-	Kilodalton
LDL-	Lipoproteína de baixa densidade (do inglês <i>low density lipoprotein</i>)
Ldlr-	Receptor de lipoproteína de baixa densidade (do inglês <i>low density lipoprotein receptor</i>)
miRNA-	microRNA
MMP-	Metaloproteinase da matriz extracelular
NF-KB-	Fator nuclear de transcrição (do inglês <i>factor nuclear kappa B</i>)
PAI-1-	Inibidor-1 do ativador do plasminogênio (do inglês <i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>)
PCR:	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês <i>polymerase chain reaction</i>)
PDCD4-	Morte celular programada 4 (do inglês <i>programmed cell death 4</i>)
PI3K-	Fosfatidilinositol 3-quinases (do inglês <i>phosphatidylinositol 3-kinases</i>)
PTEN:	Fosfatase homóloga tensina (do inglês <i>phosphatase and tensin homologue</i>)
RISC-	Complexo silenciador induzido pelo RNA (do inglês <i>RNA-induced silencing complex</i>)
RNA-	Ácido ribonucleico (do inglês <i>ribonucleic acid</i>)
RNase-	<i>Ribonuclease</i>
RISC-	Complexo silenciador induzido por RNA (do inglês, <i>RNA Interference Specificity Complex</i>)
ROC-	Curva característica de operação do receptor (do inglês <i>Receiver Operating Characteristic Curve</i>)
RPM-	<i>Rotação por minuto</i>
RQ-PCR-	Reação em cadeia de polimerase quantitativo em tempo real

SMAD2-	Síntese de proteínas do homólogo decapentaplégico 2 (<i>Mothers against decapentaplegic homolog 2</i>)
STAT-	Transcrição ativada por transdução de sinal (do inglês <i>Signal Transduction-activated Transcription</i>):
TCLE-	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF-β-	Fator de transformação do crescimento beta (do inglês <i>Transforming Growth Factor beta</i>)
TNFα-	Fator de necrose tumoral alfa (do inglês <i>Alpha Tumor Necrosis Factor</i>)
TIMP-	Inibidor tissular da metaloproteinase (do inglês <i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>)
VCAM-	Molécula de adesão celular vascular (do inglês <i>vascular cell adhesion molecule</i>)
VSMC-	Célula muscular lisa vascular (do inglês <i>Vascular smooth muscle cell</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
2. REVISÃO DA LITERATURA	27
2.1. Aneurisma de aorta abdominal.....	28
2.1.1. Prevalência	28
2.1.2. Incidência.....	29
2.1.3. Fatores de risco para aneurisma de aorta abdominal.....	29
2.1.3.1. Sexo.....	29
2.1.3.2. História familiar	30
2.1.3.3. Tabagismo	31
2.1.3.4. Doença pulmonar obstrutiva crônica	32
2.1.3.5. Níveis lipídicos elevados	33
2.1.3.6. Obesidade.....	33
2.1.3.7. Diabetes.....	34
2.1.3.8. Hipertensão.....	35
2.1.3.9. Aterosclerose	36
2.1.3.10. Defeitos genéticos.....	37
2.2. Mecanismos celulares e moleculares na formação dos AAAs	28
2.2.1. Células inflamatórias.....	28
2.2.2. Metaloproteinases.....	40
2.2.2.1. Metaloproteinase-2	42
2.2.2.2. Metaloproteinase-9	46
2.2.3. Inibidor tecidual de metaloproteinase.....	46
2.2.3.1. Inibidor tecidual de metaloproteinase-1	47
2.2.3.2. Inibidor tecidual de metaloproteinase-2.....	48
2.3. microRNAs	48
2.3.1. Biogênese dos microRNAs.....	50
2.3.2. Mecanismo de ação dos miRNAs.....	50
2.3.3. Os microRNAs na fisiopatologia dos aneurismas	54
2.4. O Tratamento endovascular e os mecanismos de <i>endoleak</i>	56
2.4.1. Fatores de risco para <i>endoleak</i>	56
2.4.1.1. Anatomia das artérias mesentérica inferior e lombares.....	57
2.4.1.2. Anatomia do colo	57
2.4.1.3. Diâmetro do aneurisma.....	57
2.4.1.4. Anticoagulação e antiagregante plaquetário.....	58
2.4.1.5. Cirurgia de emergência	58
2.4.1.6. Geração das endopróteses	59
2.4.1.7. Tabagismo	59
2.4.1.8. Idade e gênero.....	59
2.5. Patogenia do <i>endoleak</i>	60
2.6. Tratamento dos <i>endoleaks</i>	62
2.7. Seguimento.....	62
2.7.1. Metaloproteinases no seguimento endovascular	63
2.7.2. microRNAs no seguimento endovascular	65
2.8. Hipótese.....	66
3. OBJETIVOS	67
3.1. Objetivo geral	68
3.2. Objetivos específicos.....	68

4. CASUÍSTICA E MÉTODO	69
4.1. Considerações éticas	70
4.2. População do estudo	70
4.2.1. Critério de inclusão	70
4.2.2. Critérios de exclusão	71
4.3. Local do estudo	71
4.4. Método	71
4.4.1. Descrição dos dispositivos	71
4.4.2. Realização do procedimento e liberação do dispositivo	72
4.4.3. Acompanhamento pós-operatório	72
4.4.4. Colheita do Material	73
4.4.4.1. microRNAs	73
4.4.4.1.1. Extração de RNA	73
4.4.4.1.2. Síntese de DNA complementar (cDNA) para miRNA	74
4.4.4.1.3. RQ-PCR dos microRNAs	75
4.4.4.1.4. Metaloproteinases e inibidores das metaloproteinases	76
4.4.4.1.5. Determinação de MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2	76
4.4.5. Morfometria do aneurisma	76
4.5. Análise estatística.....	77
5. RESULTADOS.....	78
5.1. Casuística	79
5.2. PCR qualitativo de miRNA plasmático no pré-operatório e após seis meses de pós-operatório.....	80
5.3. Análise do MMP plasmático no pré-operatório e após seis meses de pós-operatório	82
5.4. Análise do TIMP plasmático no pré-operatório e após seis meses de pós-operatório	84
5.5. Análise microRNA, MMP e TIMP plasmático nos grupos com e sem <i>endoleak</i> pré-operatório e após seis meses de pós-operatório	86
6. DISCUSSÃO	88
7. CONCLUSÕES.....	99
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
9. ANEXO.....	115
10. APÊNDICES	120

1- Introdução

A formação dos aneurismas inclui processos degenerativos como a regulação positiva das vias proteolíticas, inflamação e perda da matriz da parede arterial.¹ É mais comum em homens do que em mulheres, com taxas de prevalência estimadas entre 1,3% e 8,9% em homens e entre 1% e 2% em mulheres.² A maioria dos diagnósticos é acidental e tem se observado aumento em função do incentivo ao *screening* na população de risco. Como a maioria dos aneurismas é assintomática, a complicação mais temida é a ruptura com taxa de mortalidade de 80%.³

O único tratamento definitivo do aneurisma é a cirurgia, sendo o reparo cirúrgico tradicional, a substituição do segmento aneurismático por um enxerto tubular através da abertura da cavidade abdominal. Como opção menos invasiva, a técnica endovascular, tem ganhado espaço no tratamento definitivo do aneurisma, porém ainda existem restrições consideráveis, sobretudo para casos complexos.⁴

A correção endovascular dos AAA modificou radicalmente o tratamento dessa doença. Por outro lado, os benefícios dessa técnica a longo prazo, particularmente em relação à sua durabilidade e ao tempo livre de reintervenção, continuam uma constante discussão.⁵ A mais temida complicação pós-reparo endovascular (EVAR) é a rotura do aneurisma, podendo ocorrer como consequência de vazamentos (*endoleaks*).⁶

Diante da obrigação de vigilância dos pacientes submetidos ao tratamento endovascular, há necessidade de se desenvolverem métodos não invasivos, a fim de identificar os *endoleaks* e indicar intervenção precoce. Atualmente, os exames de vigilância ainda são dependentes do diagnóstico imagiológico do médico observador, bem como da plataforma de análise e mensuração do exame. Marcadores biológicos parecem ser promissores e capazes de evitar esse viés, com a enorme vantagem de serem uma opção minimamente invasiva e com possíveis resultados satisfatórios. Dessa forma, o cerne seria identificar marcadores biológicos capazes de rastrear *endoleaks*.⁷⁻⁹

Existe interesse crescente na identificação de fatores genéticos e epigenéticos que contribuem para a patogênese do aneurisma e do *endoleak*, pois isso pode permitir triagem mais direcionada e facilitar o desenvolvimento de tratamentos para limitar o crescimento dos aneurismas e dos *endoleaks*.¹⁰

MicroRNAs (miRNA) são pequenos RNAs (Ácido ribonucleico) (20-23 nucleotídeos), que não são traduzidos em proteínas, mas influenciam na estabilidade e tradução de RNAs mensageiros (mRNAs) e regulam a expressão de seus genes-alvo em nível pós-transcricional.¹¹ Os microRNAs podem ser detectados no tecido ou no sangue circulante e são notavelmente estáveis durante o armazenamento, tornando-os potencialmente marcadores ideais de diagnóstico ou prognóstico.¹² Estima-se que os miRNAs regulam a expressão de aproximadamente 60% de todos os genes codificadores de proteínas. Milhares de sequências de miRNAs humanos foram catalogadas e demonstrado que sua expressão tinha exclusividade em certos tecidos em estágios particulares de desenvolvimento e, portanto, é promissora como alvos potenciais para novos diagnósticos e terapias medicamentosas.^{13,14}

As metaloproteinases de matriz (MMP) constituem uma família de enzimas com atividade proteolítica relacionada geneticamente e cuja atividade é dependente de zinco. Diferem entre si, estruturalmente, e em sua habilidade em degradar um grupo particular de proteínas da matriz extracelular, sendo que, juntas, podem degradar todos os seus componentes protéicos.¹⁵ O tecido aneurismático é caracterizado pela elevação da atividade elastolítica e colagenolítica causada pelo aumento da produção de enzimas proteolíticas quando comparado ao tecido aórtico normal.

A expressão e atividade das MMPs são controladas pelos inibidores de tecido fisiológico endógeno dessas MMPs, contribuindo para a manutenção do equilíbrio metabólico e estrutural da matriz extracelular. Acredita-se que a alteração da homeostasia entre MMPs e seus inibidores seja responsável pela degradação elástica excessiva observada em AAA.¹⁶

Dessa forma, o presente estudo foi motivado pela necessidade de rastrear marcadores plasmáticos, mediante pesquisa com miRNA, MMPs e seus inibidores, bem como avaliar o comportamento desses marcadores inflamatórios após o tratamento endovascular.

2. Revisão de Literatura

2.1 Aneurisma de aorta abdominal

O AAA é uma dilatação permanente com diâmetro transversal maior que 3 cm ou com dilatação de 1,5 a 2,0 vezes o tamanho normal para o diâmetro aórtico adjacente. A aorta abdominal infrarrenal é a localização mais frequente de dilatação aneurismática.¹⁷ Embora o risco de ruptura do AAA seja significativo em grandes diâmetros, estima-se que a taxa de ruptura é de aproximadamente 10 e 30%/ano, 55-69 mm e 70 mm, respectivamente.¹⁰

A fisiopatologia dos AAAs é complexa e multifatorial, incluindo genética, fatores ambientais, hemodinâmicos e imunológicos.¹⁸ Em nível histológico, inflamação, apoptose das células do músculo liso vascular, degradação da matriz extracelular e estresse oxidativo estão relacionados ao seu desenvolvimento e sua progressão. Além disso, a autoimunidade também pode desempenhar importante papel nesse processo.¹⁷

O AAA é uma doença degenerativa das camadas arteriais com história natural de dilatação progressiva e ruptura com mortalidade de 70% antes de chegarem ao hospital e, entre aqueles que chegam ao hospital 50% vão a óbito. A taxa de mortalidade total é 80%.¹⁹ Das dimensões do aneurisma que podem ser analisadas, o diâmetro é o principal aspecto anatômico para previsão clínica de risco de ruptura.¹⁵

Os dados citados acima mostram quão importante é a detecção precoce de AAA. Programas de *screening* com ultrassonografia com Doppler mostraram que essa triagem realizada em homens entre 65 e 74 anos de idade permite intervenção precoce, reduzindo a mortalidade por ruptura.^{19,20}

2.1.1 Prevalência

A prevalência de AAA depende da idade da população estudada, que varia entre 1,4 e 12,4%.²³ Para aqueles com mais de 65 anos de idade, a prevalência de aneurismas é de aproximadamente 5% a 6% nos homens e 1% a 2% nas mulheres.^{1,21,22} Existem indicações para o declínio na incidência da doença em idosos do sexo masculino, fenômeno que, presumivelmente, reflete mudanças no

comportamento de fumar das décadas passadas.²² No entanto, embora essa noção possa ser verdade para os homens, o aumento na prevalência de aneurismas foi relatado em mulheres²³. Além disso, esse aparente declínio não é universal, as mudanças no comportamento do tabagismo não são uniformemente distribuídas geograficamente e a prevalência do tabagismo está realmente aumentando nas sociedades não-ocidentais. Finalmente, não se pode excluir, que o declínio na prevalência de AAA reflete o nadir temporal relacionado com aumento em anos de vida saudável e longevidade. Diante desse cenário, o pico de incidência de AAA poderia mudar para uma idade mais avançada.¹⁸

2.1.2 Incidência

Enquanto em 2005 cerca de 134000 pessoas morreram em todo o mundo devido ao AAA, este número aumentou para 168000 em 2015. Assim, em apenas 10 anos, o número de pessoas que morreram por essa doença aumentou em quase 25%.^{19,24,25} Dentre os fatores que aumentam o risco de doença destacam-se idade avançada, sexo masculino, tabagismo, hipertensão, aterosclerose e defeitos genéticos.^{19,26,27}

2.1.3 Fatores de risco para AAA

2.1.3.1 Sexo

Doenças cardiovasculares são mais comuns em homens do que mulheres, embora seja a principal causa de morte no gênero feminino. A prevalência de AAA é seis vezes maior em homens do que em mulheres, ou seja, 1,3% em mulheres e 7,6% em homens. Essa prevalência se torna elevada, 8,3%, quando há história familiar, o que torna vantajoso o *screening* adequado em mulheres para evitar rupturas. Não há evidências fortes para sugerir que a taxa de crescimento do aneurisma seja diferente em homens e mulheres. Embora um único pequeno estudo tenha sugerido que o sexo feminino era um preditor independente da taxa de crescimento, a magnitude da diferença foi de apenas 0,7 mm por ano.^{28,29} Para

determinado diâmetro, o risco de ruptura nas mulheres é quatro vezes maior do que nos homens (taxa de risco de 4,0; IC95%, 2,0 a 7,9) com risco anual de ruptura de 3,9% em mulheres com aneurismas de 5,0 a 5,9 cm enquanto no homem é de 1%, e o tempo de ruptura é menor nas mulheres do que nos homens.²⁸⁻³¹

O estrogênio endógeno parece conferir proteção contra doenças cardiovasculares em mulheres na pré-menopausa. Infelizmente, adiar a menopausa com o tratamento hormonal não reduz o risco de doença cardíaca coronária. O início tardio de AAA em mulheres sugere que os estrógenos também podem desempenhar importante papel na redução da prevalência da doença. Em ratos, demonstrou-se que os estrogênios diminuem a proporção de colágeno/elastina, enquanto a testosterona aumenta a proporção de colágeno. Isso, provavelmente, contribui para a menor rigidez aórtica observada em mulheres. Vários modelos animais apoiam um possível papel do estrogênio na proteção contra AAA.^{28,29} Nas aortas femininas, houve menor destruição da camada média da aorta, menor número de infiltração de macrófagos e níveis mais baixos de MMP-9, a protease essencial no AAA.^{32,33}

Além disso, um estudo de base populacional destacou a possibilidade de que, nos Estados Unidos, o tabagismo seja um fator de risco mais potente para AAA em mulheres do que em homens, enquanto a hipertensão é um fator de risco apenas em homens.³⁴

As mulheres submetidas à cirurgia aberta eletiva para AAA são, em média, dois anos mais velhas que os homens. Alguns estudos de base populacional descobriram que a fatalidade dos casos após a cirurgia eletiva é 35% a 50% maior nas mulheres do que nos homens, embora outros estudos não tenham encontrado a diferença. No entanto, as taxas de fatalidade, *endoleak* interno e reintervenção tardia são semelhantes para homens e mulheres.³⁵

2.1.3.2 História familiar

Clifton, em 1977, relatou pela primeira vez um possível componente genético da doença do aneurisma quando descreveu uma família em que três irmãos foram todos afetados pelo AAA.³⁶ Há descrição na literatura de que, história familiar positiva de AAA em parente de primeiro grau aumenta o risco em até um fator de

dez.³⁷ Desde então, muitos estudos familiares foram realizados na tentativa de estabelecer um vínculo genético.

Como o processo inflamatório tem sido cada vez mais implicado no desenvolvimento de AAA, vários autores começaram a investigar genes inflamatórios específicos, geralmente aqueles que codificam proteínas-chave na cascata de citocinas. Essa abordagem de gene candidato pode fornecer informações sobre a suscetibilidade individual e também aprimorar a compreensão dos processos envolvidos na formação de aneurismas de aorta.³⁷

Existem diferentes teorias que podem explicar isso. Em primeiro lugar, é provável que as famílias são expostas a fatores ambientais e socioeconômicos semelhantes, como hábitos de fumar, regimes alimentares e de exercício, que podem aumentar o risco de AAA por desenvolvimento de doenças ateroscleróticas.³⁷

As vias citocinas são extremamente complexas e a regulação dessa cascata inflamatória pode estar subjacente ao desenvolvimento de AAA. Muitos dos genes de citocinas contêm proteínas polimórficas *loci* e, embora associações significativas tenham sido encontradas entre certos polimorfismos genéticos e AAA, é improvável que um único gene emergja como fator crítico. É provável que o verdadeiro mecanismo subjacente à formação do aneurisma envolva a interação entre predisposição genética e fenótipo.³⁷

O entendimento do mecanismo genético do AAA proporcionará maior compreensão da fisiopatologia e potencial meta de intervenção terapêutica para modular a resposta inflamatória.

2.1.3.3 Tabagismo

O tabagismo é um forte fator de risco modificável mais importante para AAA. A duração do tabagismo e o número diário de cigarros estão também associados a maior risco, com associação dose-dependente.²⁴ A relação dose-dependente é clara, com riscos relativos de três, cinco e sete para fumantes atuais com menos de um maço/dia, entre um e dois maços/dia e três ou mais maços/dia, respectivamente. O tabagismo de três ou mais maços/dia foi o fator de risco mais forte para AAA (risco relativo = 6,6), seguido pela idade de 65 anos, ou mais (risco relativo = 6).³⁸

Apesar da prevalência decrescente de fumantes, ao longo do tempo, as mulheres estão começando a fumar em idade mais jovem e por mais tempo. Além disso, o número de ex-fumantes aumentou significativamente nos últimos 50 anos. Todos esses atributos podem levar ao aumento das taxas de AAA.²⁴

A nicotina, um dos principais componentes da fumaça do cigarro, ativa a AMPK em célula muscular lisa vascular (VSMC) e a AMPK α 2 fosforila AP-2 α na serina, resultando em expressão aberrante de MMP-2 e consequente formação de AAA. Em estudos experimentais com camundongos com infusão de nicotina houve aumento das concentrações de MMP-2 e MMP-9 na formação de AAA. A expressão de MMP-2 aumentou significativamente em camundongos ApoE - / - e ApoE - / - / AMPK α 1 - / - infundidos com nicotina. A expressão da proteína MMP-9 também aumentou após infusão de nicotina, mas em menor grau do que o de MMP-2. Em contraste, os camundongos ApoE - / - / AMPK α 2 - / - exibiram MMP-2 em menor concentração após infusão de nicotina.³⁹⁻⁴²

O tabagismo leva ao aumento da expressão genética da 5-lipoxigenase no tecido aórtico, e esta desempenha papel de destaque na ativação da MMP-2 e consequente formação de aneurismas. A hiperatividade localizada da MMP pode levar ao enfraquecimento focal da parede do aneurisma e à ruptura em níveis relativamente baixos de pressão intraluminal.⁴³

2.1.3.4 Doença pulmonar obstrutiva crônica

Em 1985, identificou-se, pela primeira vez, o grau de doença pulmonar obstrutiva crônica como um dos fatores de risco associados à ruptura de AAA em pacientes inicialmente selecionados para tratamento não cirúrgico.⁴⁴ O AAA está associado à doença pulmonar obstrutiva crônica com taxa de prevalência de 6,1%.⁴⁵ Essas duas entidades patológicas são, provavelmente, multifatoriais; e as alterações genóticas podem ter expressão de fenótipo diferente devido a vários fatores ambientais e demográficos, como idade, profissão, hipertensão, tabagismo e muitos outros.^{46,47}

Uma resposta pró-inflamatória persistente associada à proteólise e ao excesso de remodelamento da matriz é uma das bases fisiopatológicas do AAA e

doença pulmonar obstrutiva crônica. Associado a isso, inflamação crônica das vias aéreas e destruição da parede alveolar, caracterizada pelo aumento do número de macrófagos alveolares, neutrófilos e linfócitos T citotóxicos, interleucina (IL)-6, IL-8, e a liberação de múltiplos mediadores inflamatórios aproximam essas duas entidades patológicas. O alto nível de estresse oxidativo pode amplificar essa inflamação, bem como a elastólise e enzimas elastolíticas, incluindo proteases, catepsinas e MMPs.⁴⁵⁻

48

2.1.3.5 Níveis lipídicos elevados

A hiperlipidemia plasmática é reconhecida como um dos fatores de risco para o aparecimento de AAA. Análise molecular lipídica por espectrometria de massa de imagem tem revelado o envolvimento do metabolismo lipídico e acúmulo lipídico anormal na *vasa vasorum* da camada adventícia na patogênese da doença.⁴⁹

A presença de cristais de colesterol na parede da aorta abdominal promove a dilatação e o crescimento do AAA, induzindo a morte das células musculares lisas e resposta inflamatória imune. Estudos experimentais levantaram a hipótese de que a injeção de HDL (Lipoproteína de alta densidade) reconstituída, consistindo em apoA-I nativa e fosfolípidios, ou o peptídeo mimético apoA-I D4F tem potencial para reduzir o AAA a partir do efluxo de colesterol de macrófagos.^{50,51} As funções protetoras cardiovasculares do HDL incluem o transporte reverso de colesterol, bem como antioxidantes, anti-inflamatórios e antiapoptóticos e efeitos antitrombóticos.⁵²

Estudos *in vitro* relataram uma inversa associação entre o uso de estatinas e a atividade da MMP-9. Além disso, os ensaios clínicos mostraram que o uso de estatina retarda o crescimento aneurismático. Esses achados podem potencialmente apoiar o caminho entre os níveis lipídicos e o risco de AAA, além das estatinas promoverem a redução inflamatória da parede da aorta.⁵³

2.1.3.6 Obesidade

A obesidade, especialmente a deposição adiposa abdominal, é um fator de risco para mortalidade cardiovascular. Virtualmente, todas as artérias são

circundadas por tecido adiposo. Esse tecido perivascular pode ser fonte de citocinas inflamatórias contribuindo para uma forte associação entre doença vascular e obesidade.^{54,55} É uma das variáveis da síndrome metabólica, incluindo resistência à insulina, hipertensão e dislipidemia, ou seja, fatores de risco para a formação de AAA.^{54,55}; aumenta a infiltração de macrófagos e a expressão de citocinas no tecido adiposo periaórtico. Não está claro se as células inflamatórias entram na parede vascular pela camada íntima ou pelos espaços periadventíciais. Interessante que o aumento da concentração de angiotensina II potencializa a infiltração de macrófagos e células inflamatórias para a parede vascular. Conseqüentemente, como uma das bases da fisiopatologia do AAA é a inflamação crônica, a obesidade, que é um desarranjo inflamatório crônico, pode contribuir para o desenvolvimento de AAA.^{54,55}

2.1.3.7 Diabetes

Diabetes mellitus é um forte fator de risco cardiovascular; entretanto, vários estudos epidemiológicos confirmaram a existência de relação negativa entre diabetes e presença de AAA, crescimento e ruptura. As artérias de pacientes diabéticos geralmente são mais rígidas e calcificadas. No entanto, o aumento da calcificação da parede do vaso, isoladamente, não parece explicar a taxa reduzida de expansão aórtica observada em pacientes diabéticos.

A hiperglicemia crônica está associada ao enrijecimento da parede dos vasos, ao progressivo aumento da matriz extracelular devido a redução da degradação e aumento da síntese de colágeno e elastina da matriz extracelular, bem como redução da expressão de MMPs. Além disso, a hiperglicemia pode aumentar os níveis de inibidor-1 do ativador do plasminogênio (PAI-1), que diminui a expressão da plasmina e, conseqüentemente, de MMPs. E finalmente, a hiperglicemia atua no eixo inflamatório, reduzindo a ativação monócito-macrófago e peptídeo C mediado. Dessa forma, essa complexidade de cadeias reacionais da hiperglicemia crônica pode exercer papel negativo no desenvolvimento de AAA.⁵⁶

Explicações plausíveis para a associação negativa entre diabetes e AAA podem ser encontradas ao se analisar a matriz extracelular. O excesso de matriz nos vasos é uma característica de diabetes, enquanto a perda de matriz é

observada nas paredes de aortas aneurismáticas. Estudos com ratos diabéticos demonstraram tendência de aumento de colágeno e elastina, dois dos principais elementos da matriz extracelular nas paredes da aorta. Além disso, estudos *in vitro* mostraram que altas concentrações de glicose resultam em aumento da síntese de colágeno.⁵⁷ Seria de se esperar que a inflamação aórtica induzida por diabetes levaria à formação de aneurisma nesses pacientes. Isso pode explicar o achado oposto, que é relacionado à diferença na resposta inflamatória de patogênese do AAA em comparação com a aterosclerose oclusiva. Pode haver alterações na interação entre a matriz extracelular e as células inflamatórias no diabetes. Mudanças conformacionais da matriz induzidas pela glicação podem suprimir quaisquer sinais pró-inflamatórios que resultariam da estimulação de células inflamatórias. Isto pode limitar a inflamação do ateroma intimal, promovendo complicações oclusivas do ateroma, mas protegendo a camada média de degradação e consequente dilatação vascular.⁵⁷

2.1.3.8 Hipertensão

A hipertensão está associada positivamente à presença de AAA. A angiotensina II causa disfunção vascular, proliferação, hipertrofia celular do músculo liso e degradação da matriz extracelular devido ao aumento do estresse oxidativo, provoca também aumento da produção de superóxido e H₂O₂, que promovem aumento da expressão de MMPs implicados na degradação da matriz extracelular, que é importante na patogênese do AAA.⁵⁸

Os principais determinantes fisiológicos da rigidez das grandes artérias são os elementos estruturais da parede arterial, tônus do músculo liso e a pressão arterial média. Entre as várias proteínas estruturais, a elastina fornece o principal elemento elástico das artérias. Embora a elastina já tenha sido considerada inerte, várias células da parede arterial são conhecidas por restaurar a elastina, mesmo em adultos. A elastina também é suscetível à degradação e a composição de aminoácidos da elastina arterial muda com a idade. Juntos, sugerem que a elastina arterial é realmente transformada, embora com meia-vida longa. Curiosamente, uma

série de enzimas, como serina proteases e vários membros da MMP, incluindo MMP-9 e MMP-2, são capazes de quebrar a elastina.⁵⁹

O aumento da atividade da elastase sérica está associado à aterosclerose e ao aumento do risco de doença cardiovascular. Mais especificamente, a MMP-9 e MMP-2 desempenham importante papel na remodelação vascular. O aumento da atividade de MMP-9 e MMP-2 está associado à destruição das lâminas elásticas das artérias e à formação de aneurismas em animais e humanos.⁵⁹ Dessa forma, o estresse hemodinâmico e oxidativo estimulam a produção de enzimas que danificam a matriz extracelular e apoptose das células musculares lisas, contribuindo para a formação de AAA.⁶⁰

2.1.3.9 Aterosclerose

Existem evidências de que doença arterial periférica e AAA afetam camadas distintas da parede arterial: a aterosclerose afeta, principalmente, a íntima e média, enquanto o AAA normalmente afeta, a média e a adventícia. Além disso, ainda não está claro por que algumas pessoas desenvolvem AAA, enquanto outros desenvolvem doença arterial periférica, apesar das semelhanças em seus perfis de risco cardiovascular.⁶¹

A aterosclerose e a disfunção vascular aumentam com a idade devido à diminuição da complacência vascular, angiogênese e propriedades antitrombóticas endoteliais e aumento da inflamação devido à senescência do endotélio vascular. A hipercolesterolemia facilita a infiltração inflamatória de células e aumenta a expressão e secreção de enzimas proteolíticas, como MMPs e elastina, que quebram o colágeno, facilitando a progressão do aneurisma e enfraquecendo a matriz extracelular da aorta.^{61,62}

Estudos experimentais com animais mostraram que os AAA se formam a partir da exposição prolongada a condições aterogênicas refletidas pela placa aterosclerótica aórtica. As placas ateroscleróticas na parede aórtica promovem expansão das placas, dilatação e enfraquecimento simultâneo das paredes da aorta que suportam a tensão mural. Autores relataram que a aterosclerose, embora ocorra inicialmente na íntima, promove a dilatação da túnica média e adventícia que, por

sua vez, agrava a obstrução luminal e promove a vascularização e remodelação por meio de distúrbio na síntese e degradação das proteínas da matriz.⁶²⁻⁶⁴

Há várias citocinas pró-inflamatórias importantes que explicam o papel da aterosclerose na formação do AAA, estimulando a expressão de moléculas de adesão e MMPs. Uma dessas citocinas, o TNF- α (fator de necrose tumoral alfa), está envolvido na ativação da proteína mitogênica da cascata Kinase, levando à migração e proliferação vascular da célula muscular lisa, estimulando o processo inflamatório com liberação de TNF- α , IL-6, IL-1 β e MMPs.⁶⁵

2.1.3.10 Defeitos genéticos

Influência genética tem sido demonstrada para AAA, com hereditariedade de até 77%. Foram identificados genes/*loci*, como por exemplo: SMYD2 (polimorfismo de nucleotídeo único superior [SNP] rs1795061), LINC00540 (rs9316871), PCIF1 / MMP9 / ZNF335 (rs3827066) e ERG (rs2836411). Embora essa pesquisa tenha apresentado resultado com valor-*p* significativo, é importante replicar essas novas descobertas em populações independentes e em dados prospectivos.^{66,67}

Além dos defeitos genéticos, há condições sindrômicas que causam risco aumentado de AAA, algumas já bem descritas há décadas. Normalmente, os aneurismas sindrômicos estão ligados à disfunção da matriz extracelular, células do músculo liso ou sinalização de TGF- β . Embora várias outras patologias estejam frequentemente presentes, simultaneamente, nesses casos sindrômicos, a mais grave é tipicamente vascular, pois o enfraquecimento da parede da aorta pode causar dilatação, dissecação e possível ruptura da mesma. As principais síndromes que apresentam relação com alteração estrutural da parede da aorta são: Síndrome de Marfan, Síndrome de Loeys-Dietz e Síndrome de Ehlers-Danlos, com mutações dos genes da fibrilina-1, fator de crescimento transformador β receptor I e II e colágeno tipo 3, respectivamente.^{67,68}

A elucidação genética pode oferecer melhores perspectivas para a identificação de terapias eficazes e com base biológica, ou seja, vinculando mutações específicas do paciente a fenótipos bem definidos.

2.2 Mecanismos celulares e moleculares na formação dos AAAs

2.2.1 Células inflamatórias

A parede aórtica é composta de três camadas: a íntima, média e adventícia. As células musculares lisas da camada média com proteínas estruturais da matriz extracelular, principalmente colágeno e elastina, são responsáveis pela manutenção da estrutura e função da aorta. Durante o desenvolvimento do aneurisma, a integridade dessas camadas e componentes da proteína é interrompida. A degradação da matriz extracelular é uma das características dos AAA, mas os mecanismos subjacentes a esse processo são incompletos.⁶⁹

A célula do músculo liso vascular é a principal célula intrínseca da parede aórtica e é capaz de síntese de matriz, produção de protease ou produção do inibidor de protease e recrutamento de células inflamatórias. Como tal, é capaz de exercer influência fundamental na homeostase da matriz aórtica. O efeito dessas células no desenvolvimento e crescimento dos AAAs pode estar relacionado à perda da capacidade sintética devido à apoptose.⁷⁰

Nos estágios iniciais dos AAAs, o aumento do conteúdo de colágeno é desproporcionalmente maior que o de elastina. Este fenômeno reflete o aumento da ruptura da elastina por elastases, a produção insuficiente de elastina por esgotamento de células musculares lisas, tensão de cisalhamento acelerada da parede e o acúmulo compensatório de colágeno. À medida que a massa de colágeno e a circunferência aórtica aumentam, as fibras elásticas se dispersam para uma área maior e a elastina não consegue compensar a carga hemodinâmica elevada. Todas essas mudanças resultam no aumento lento do diâmetro aórtico.⁷¹

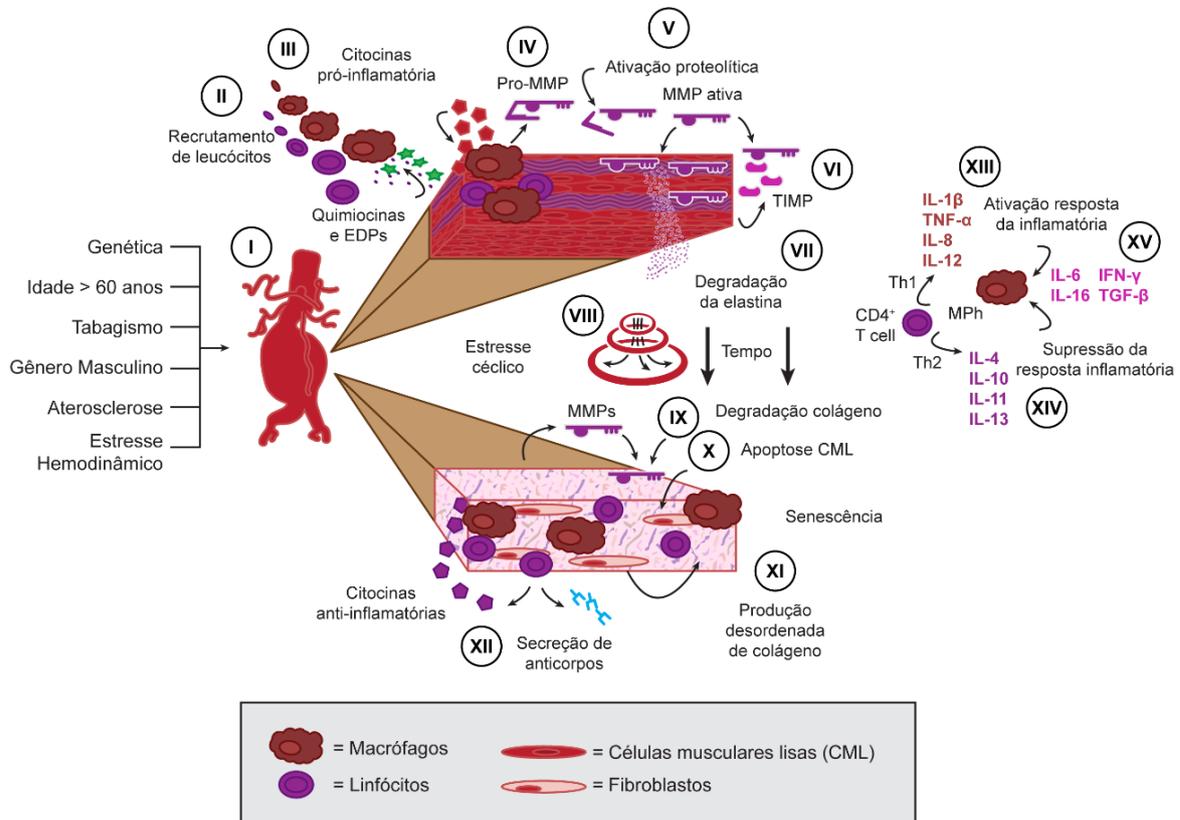
Há contribuições de diferentes tipos de células inflamatórias na fisiopatologia do AAA. A apoptose de células musculares lisas e degeneração da camada média da aorta têm sido registradas como marcas desta patologia. Inflamação, produção de espécies reativas de oxigênio e estresse da parede aórtica foram associados à apoptose de células musculares lisas em AAA. Essa perda de integridade estrutural é fundamental para a dilatação e ruptura da aorta. É interessante que a maioria dos AAA ocorrem abaixo do nível das artérias renais, o que pode refletir as diferentes

origens embriológicas das células do músculo liso vascular na aorta abdominal distal, onde o mesoderma dá origem às células do músculo liso vascular da aorta, enquanto que na aorta torácica as células musculares lisas surgem da crista neural.⁴⁰

Além das células do músculo liso vascular da média, outros tipos de células estão envolvidos na formação dos AAA, incluindo células endoteliais, neutrófilos, monócitos, macrófagos, linfócitos, adipócitos, mastócitos e plaquetas.⁴⁰

O tipo celular mais comum na biologia molecular dos aneurismas são os macrófagos. A infiltração de macrófagos do AAA é um dos achados patológicos mais consistentes devido à produção de MMPs, citocinas e quimiocinas, bem como sua capacidade de remover resíduos celulares. Curiosamente, devido à sua capacidade de expressar diferentes fenótipos abrangendo funções inflamatórias e reparativas, os macrófagos participam tanto da patogênese quanto da resposta de reparo do AAA. Isso pode ocorrer por meio da via clássica das citocinas ou por mecanismos mais novos. Os macrófagos podem influenciar diretamente a função das células musculares lisas por meio de netrina-1 derivada de macrófagos (conhecida por promover a retenção de macrófagos nos tecidos), conforme evidenciado pela descoberta de que a deleção de netrina-1 resulta em redução da formação de AAA por meio de um mecanismo dependente de MMP-3.⁴⁰

Em um modelo animal com AAA induzido pela aplicação periaórtica de cloreto cálcio observou-se acúmulo de macrófagos na adventícia. Esse recurso também foi significativo em AAA de ratos induzidos por elastase. Em ratos infundidos com Angiotensina II, a infiltração de macrófagos na camada média da aorta foi uma das características iniciais do desenvolvimento dos AAA, e o acúmulo de macrófagos na adventícia foi identificado em estágios mais avançados de AAA.⁷² (Figura 1)

Figura 1- Histopatogênese AAA

2.2.2 Metaloproteinases

As MMPs são uma família de endopeptidases em constante expansão (25 identificadas até o momento em vertebrados, 23 das quais encontradas em humanos), com atividade proteolítica em relação a um ou mais componentes da matriz extracelular.⁷³ Cada membro da família MMP possui estrutura de cinco domínios que consistem em: o domínio de sinal, o prodomínio, o sítio catalítico, a região de dobradiça e o domínio semelhante à hemopexina. Com base na especificidade do substrato, as MMPs são categorizadas em seis grupos:

1. Colagenases (MMP-1,8,13,18)
2. Gelatinases (MMP-2,9)
3. Estromelinas (MMP-3,10,11)
4. Matilinas (MMP-7,26)

5. MMPs do tipo membrana (MT-MMPs)

6. Outras MMPs (MMP-12,19,20)

Quase todos os tipos de células vasculares, como as endoteliais e musculares lisas e os fibroblastos adventícios secretam MMPs em condições normais. Macrófagos e linfócitos constituem fontes adicionais no estado patológico.^{71,73}

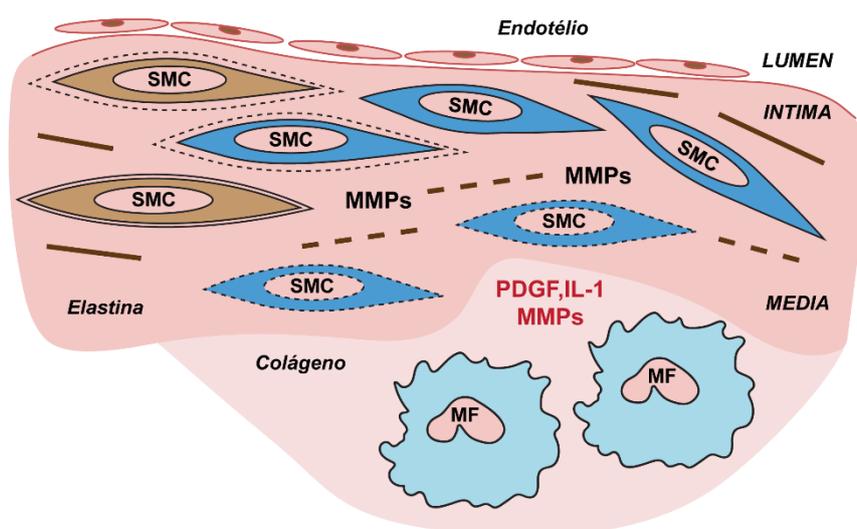
As MMPs são, também, uma família de metaloendopeptidases dependentes de zinco que funcionam na renovação de componentes da matriz extracelular. As MMPs elastolíticas implicadas em AAA são: MMP-2 (gelatinase A, de 72 kDa) e MMP-9 (gelatinase B, 92-kDa), produtos das células mesenquimais e macrófagos, respectivamente. *In vivo*, as MMPs podem se ligar à matriz extracelular, e ambas MMP-2 e MMP-9 contêm domínio semelhante à fibronectina que medeia sua ligação ao substrato.⁷⁴

O infiltrado inflamatório no AAA é composto de linfócitos e macrófagos. Acredita-se que essas células imunes desempenhem papel etiológico por meio de sua capacidade de produzir citocinas que induzem células mesenquimais residentes a produzir MMPs. As citocinas pró-inflamatórias secretadas pelos macrófagos aumentam a produção de MMP liberadas pelas células do músculo liso vascular.⁷⁴

O equilíbrio entre síntese e degradação das proteínas da matriz extracelular está alterado no AAA. Além disso, a importância da perda da matriz extracelular na patogênese da dilatação e ruptura arterial foi sugerida por estudos *in vitro* e *in vivo*. Busutil *et al.*⁷⁵ estiveram entre os primeiros a observar aumento na atividade de proteases que degradam o colágeno e a elastina na parede dos AAA. O aumento da atividade proteolítica pode ser devido à superexpressão das enzimas ou regulação negativa de seus inibidores, particularmente dos tecidos inibidores de MMPs.⁷⁶ Em síntese, a formação do AAA é uma superprodução de MMPs de VSMCs na camada média causando perda de elastina. A fibrose compensatória aumenta o conteúdo de colágeno gerando uma parede arterial menos complacente e rígida. Mais tarde, isso desencadeia a inflamação, causando a entrada de macrófagos que podem produzir quantidades maiores e um espectro mais amplo de MMPs. O resultado final é a

extensa degradação da matriz extracelular, levando à rápida distensão e, eventualmente, à ruptura da artéria (Figura 2).

Figura 2 - Mecanismo hipotético subjacente à influência das MMPs nas patologias vasculares



2.2.2.1 Metaloproteinase-2

A MMP-2 é única em sua capacidade de degradar a elastina e o colágeno fibrilar. É encontrada, principalmente, em associação com as células mesenquimais da camada média e da adventícia, embora pequenas quantidades possam ser produzidas por macrófagos.^{71,77}; e possui especificidade de substrato para elastina e colágeno fibrilar, sendo encontrada na aorta normal e aneurismática.⁷⁸

O gene da MMP-2 está localizado no cromossomo 16 (16q13) e contém 13 exons.⁷⁶ A MMP-2 é expressa, constitutivamente, por muitos tipos de células em cultura. Ao contrário de outras MMPs, sua síntese não é regulada por citocinas inflamatórias, como a IL-1 e o TNF- α , embora o fator de crescimento transformador-beta (TGF- β) aumente a produção de MMP-2 em fibroblastos e queratinócitos. Estudos indicam que as células mesenquimais dos AAA (célula muscular lisa e fibroblastos) produzem níveis elevados de MMP-2 *in vivo*. Freestone et al.⁷⁹ encontraram tendências de aumento dos níveis de MMP-2 em AAAs por zimografia

e imuno-histoquímica. Embora esses autores tenham relatado altos níveis de MMP-2 em aneurismas pequenos, outros não encontraram nenhuma correlação entre o nível de MMP-2 e o tamanho do aneurisma; como Davis et al.⁷⁴, que enfatizaram ainda que a expressão de MMP-2 é particularmente regulada positivamente em células mesenquimais nas proximidades de infiltrados inflamatórios, indicando que as células inflamatórias podem produzir fatores estimuladores. Estudos clínicos ressaltam que a MMP-2 promove a expansão de AAAs menores ou em estágios iniciais, mas a ruptura é o eventual resultado do aumento da atividade da MMP-9.⁷¹

Freestone et al.⁷⁹ demonstraram que a principal MMP em aneurismas pequenos foi a MMP-2 e sugeriu que a MMP-9 estava envolvida na expansão do aneurisma em um estágio posterior, um achado confirmado por outros investigadores. McMillan et al.⁸⁰ relataram níveis aumentados de mRNA de MMP-9 sintetizados por células mesenquimais no tecido de aneurismas. Goodall et al.⁷⁸ observaram que as células de músculo liso derivadas de aorta aneurismática apresentaram níveis três vezes maiores de MMP-2 do que células de tecido aterosclerótico.

Fumantes apresentam alta atividade da MMP-2 na parede aórtica, o que pode ser a causa da degradação acentuada das fibras elásticas e conseqüente enfraquecimento da parede arterial. Portanto, o tabagismo está associado a alterações na composição estrutural da proteína da matriz arterial que leva a alterações em suas propriedades mecânicas com conseqüente formação de AAA. Já o diabetes é caracterizado pelo acúmulo de colágeno com conseqüente aumento do volume da matriz, resultando em alterações, como espessamento da membrana basal e expansão mesenquimal. Essas alterações são responsáveis por muitas das complicações do diabetes, mas podem aumentar a rigidez dos vasos, reduzindo o risco de AAA.⁵⁷

2.2.2.2 Metaloproteinase-9

As elastases de serina e a MMP-9 compreendem as elastases predominantes presentes em AAAs humanos, enquanto que a MMP-9 também apresenta atividade colagenolítica e gelatinolítica. A concentração de MMP-9 é quase insignificante em

culturas de células de tecidos aórticos normais. Vários pesquisadores, aplicando técnicas imuno-histoquímicas e zimografia em tecidos aneurismáticos, documentaram que a expressão, quantidade de proteína e atividade proteolítica da MMP-9 são, notavelmente, maiores do que em pacientes com doença arterial obstrutiva periférica, a aterosclerótica, ou em indivíduos controle.⁷¹ Desfavoravelmente, apenas Davis et al.⁷⁴ detectaram atividade gelatinolítica semelhante entre AAA e doença arterial obstrutiva periférica, o que foi atribuído por alguns pesquisadores ao fato de que as técnicas de extração de proteínas eram de baixa sensibilidade.⁷¹

A MMP-9 se localiza, preferencialmente, em macrófagos na camada adventícia infiltrante em AAAs e, especificamente, em áreas adjacentes aos *vasa vasorum* adventícios. Além disso, fatores regionais desencadeiam na aorta infrarrenal a produção de MMP-9 e podem contribuir para a predileção pelo desenvolvimento de aneurisma nessa área. Levando em consideração os achados acima, é possível que a inflamação crônica e a produção de MMP-9 estão fortemente correlacionadas e trabalham em conjunto para promover a degeneração da elastina e do colágeno nas camadas externas da aorta dos AAA.⁷¹

A MMP-9 é encontrada em neutrófilos, macrófagos e carcinomas malignos. Algumas células mesenquimais também produzem esta enzima em resposta a certos estímulos. A produção de MMP-9 em cultura de células musculares lisas aórticos pode ser mediada por citocinas pró-inflamatórias. Embora células musculares lisas tenham potencial para produzir MMP-9 *in vitro*, a análise imuno-histoquímica tecidual indica que as células musculares lisas não são a fonte primária de MMP-9 em tecido aórtico doente. Dessa forma, o aumento da concentração de MMP-9 no tecido aórtico é resultado da infiltração de macrófagos que acompanha aterosclerose grave, ao invés de ser o fenômeno único associado à formação de aneurisma.⁷⁴

Pyo et al.³² utilizaram camundongos sem o gene MMP-9 para investigar a participação da mesma no processo proteolítico. Os autores observaram que a ausência do gene direcionado dessa MMP em camundongos suprime a dilatação da aorta e contribui para a preservação da elastina medial, apesar da presença de células inflamatórias infiltrantes na parede da aorta. Pode-se inferir, por esse estudo,

que a MMP-9 medeia diretamente a proteólise em AAA e assim um único gene MMP-9 é suficiente para o desenvolvimento da doença, induzidos por elastase.

É importante considerar a atividade da MMP-9 em relação ao seu inibidor (TIMP-1) durante a progressão do aneurisma. Embora quantidades significativas de TIMP-1 tenham sido detectadas em aneurismas, a razão MMP-9/TIMP-1 é elevada e a atividade proteolítica líquida de MMP-9 é aumentada em AAAs. Talvez a expressão aumentada de TIMP-1 não exceda o aumento da atividade de MMP-9. Os fatores que controlam a produção de TIMP-1 e o desequilíbrio entre MMP-9 e TIMP-1 ainda permanecem desconhecidos. Levando em conta que os macrófagos são responsáveis pela produção de MMP-9 e o fato de TIMP-1 estar localizado em células musculares lisas, é questionável como TIMP-1 inibe MMP-9 em AAAs estabelecidos. Uma explicação plausível é que as origens diferentes impedem interações intensivas entre eles (por exemplo, formação de complexos), favorecendo a atividade de MMP-9. É provável que o TIMP-1 neutralize o excesso de enzima ativada que circula no fluido tecidual após a degradação.⁷¹

Considerando que tanto a MMP-9 quanto a MMP-2 possuem potente capacidade elastolítica, ambas poderiam desempenhar papel importante na remodelação dos AAAs. Os níveis aumentados de MMP-2 e seu aumento de ligação e ativação sugerem papel importante na progressão da patogênese do AAA. Futuros estudos deverão ser direcionados para a compreensão da regulação, ativação e do papel dos inibidores de MMP. A identificação de tais inibidores dentro da parede do aneurisma ou o desenvolvimento de abordagens que bloqueie essas enzimas proteolíticas pode prevenir a formação de aneurisma ou inibir seu crescimento.⁷⁴

Vários autores sugerem que a proteólise na parede do AAA está associada ao tamanho e à frequência de ruptura. Freestone et al.⁷⁹ documentaram, pela primeira vez, concentrações aumentadas de MMP-2 em aneurismas pequenos (4-5,5 cm de diâmetro), enquanto que em aneurismas maiores (> 5,5 cm de diâmetro) a MMP-9 estava substancialmente elevada. Alguns anos depois, McMillan et al.⁸¹, usando o método competitivo de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), argumentaram que os AAAs de diâmetro moderado (5-7 cm) expressam concentrações significativamente mais altas de mRNA de MMP-9 do que pequenas (< 5 cm) ou grandes (> 7 cm) AAA. Estudos recentes ressaltam que em AAAs assintomáticos, a

atividade de MMP-9 correlaciona-se negativamente com seu diâmetro, destacando que o baixo nível de MMP-9 influencia levemente a expansão aórtica. Altos níveis de proteína MMP-9 foram detectados em amostras de AAAs rotos, independentemente do diâmetro do aneurisma.⁸² É provável que o aumento da MMP-9 iniba o remodelamento aórtico, opondo o metabolismo do colágeno e predispondo à ruptura da aorta. Em conclusão, a MMP-9 mantém seu papel fundamental na degradação da matriz, degeneração da parede aórtica e patogênese do AAA.⁷¹

2.2.3 Inibidores teciduais de metaloproteinases

Os TIMPs são inibidores dominantes das MMPs, enquanto a α 2-macroglobulina e o inibidor-2 da via do fator tecidual inibem as MMPs em menor grau. Os TIMPs se ligam a formas ativas ou latentes de MMPs em proporção molecular de 1:1. O equilíbrio das concentrações relativas de MMPs ativas e de seus inibidores determina a atividade proteolítica líquida.⁷¹ Há quatro inibidores endógenos das MMPs conhecidos: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4.

2.2.3.1 Inibidor tecidual de metaloproteinase-1

O TIMP-1 inibe, especificamente, a MMP-1 e MMP-9; e sua expressão está localizada nas células do músculo liso vascular, mas pode ser induzida *in vitro* por vários outros tipos celulares como células endoteliais e fibroblastos em resposta a estímulos externos, bem como pode estar espalhado em áreas adjacentes aos macrófagos. A concentração plasmática de TIMP-1 demonstrou ser notavelmente elevada em pacientes com AAAs em comparação àqueles com aterosclerose ou saudáveis.^{16,71,83}

Os TIMPs bloqueiam a destruição da parede aórtica e previnem o desenvolvimento do aneurisma por inibição de MMPs. Alguns dos dados experimentais mais fortes que apoiam o papel protetor do TIMP-1 no desenvolvimento de aneurismas resultam de estudos em camundongos nos quais o efeito da deficiência e superexpressão de TIMP-1 foi avaliado. Camundongos TIMP-1 / apoE-double KO (DKO) em dietas ricas em colesterol apresentaram incidência

aumentada de aneurisma em comparação com camundongos TIMP-1 + / +.⁸⁴ A deficiência de TIMP-1 resultou em atividade aumentada de MMP e infiltração de macrófagos.⁸⁵ Esses autores relataram aumento da degradação da camada média e incidência de pseudoaneurisma em TIMP-1 / apoE-DKO em camundongos.⁸⁶ Camundongos deficientes em TIMP-1 também apresentam maior suscetibilidade à indução de aneurisma por infusão de elastase, com maior incidência e maior gravidade.⁸⁷ Finalmente, a superexpressão de TIMP-1 foi capaz de prevenir a degeneração, dilatação e ruptura da aorta em um modelo de xenoenxerto de AAA em rato.⁸⁸ O TIMP-1 foi hipotetizado para prejudicar a migração de VSMCs e macrófagos. Estas últimas séries celulares, nas lesões ateroscleróticas, induzem ativação e secreção de várias MMPs. Portanto, TIMP-1 previne indiretamente a destruição da camada média em parede do AAA, reduzindo o número de células invasoras, que produzem MMPs.⁷¹

2.2.3.2 Inibidor tecidual de metaloproteinase-2

A expressão dos TIMPs é observada durante a remodelação tecidual fisiológica, contribuindo para a manutenção do equilíbrio metabólico e estrutural da matriz extracelular. Alterações na homeostasia entre as MMPs e os TIMPs têm sido identificadas em doenças associadas à renovação não-controlada da matriz extracelular, como artrite, câncer, doenças cardiovasculares, nefrites, desordens neurológicas e fibroses.⁸⁹

As células musculares lisas cultivadas de pacientes AAA expressam constitutivamente MMP-2 e TIMP-2, seu inibidor endógeno⁹⁰, mas aumentam a expressão de TIMP-2 e MMP-2 em AAA localizadas em células musculares lisas e macrófagos.^{71,91} Como a ativação da MMP-2 requer a formação do complexo trimolecular da MT1-MMP, do TIMP-2 e da pro-MMP-2, os TIMP-2 podem, teoricamente, promover e inibir a degradação da matriz em AAA.⁷¹

A produção elevada de MMP-2 pelas células musculares lisas de aorta aneurismática combinada com a produção inalterada de TIMP-2 pode modular um ambiente de maior elastólise em aortas propensas à formação de aneurismas. A

razão MMP-2–TIMP-2 foi superior a 2,5 vezes elevada nas células derivadas do aneurisma.⁹¹

Os TIMP-1 e TIMP-2 representam membros bem caracterizados dessa família de inibidores e apresentam atividade inibitória contra as formas ativas de toda a família de MMPs, embora a TIMP-1 forme, preferencialmente, complexo com a MMP-9, enquanto o TIMP-2 atua sobre a MMP-2. Finalmente, o TIMP-2 é considerado inibidor de invasão e metástase de células tumorais *in vitro* e *in vivo*, e também da angiogênese associada a tumores.⁸³ Portanto, há interesse mundial no uso de TIMPs e outros inibidores sintéticos como terapia promissora contra o aumento de aneurismas com risco de vida.

2.3 MicroRNAs

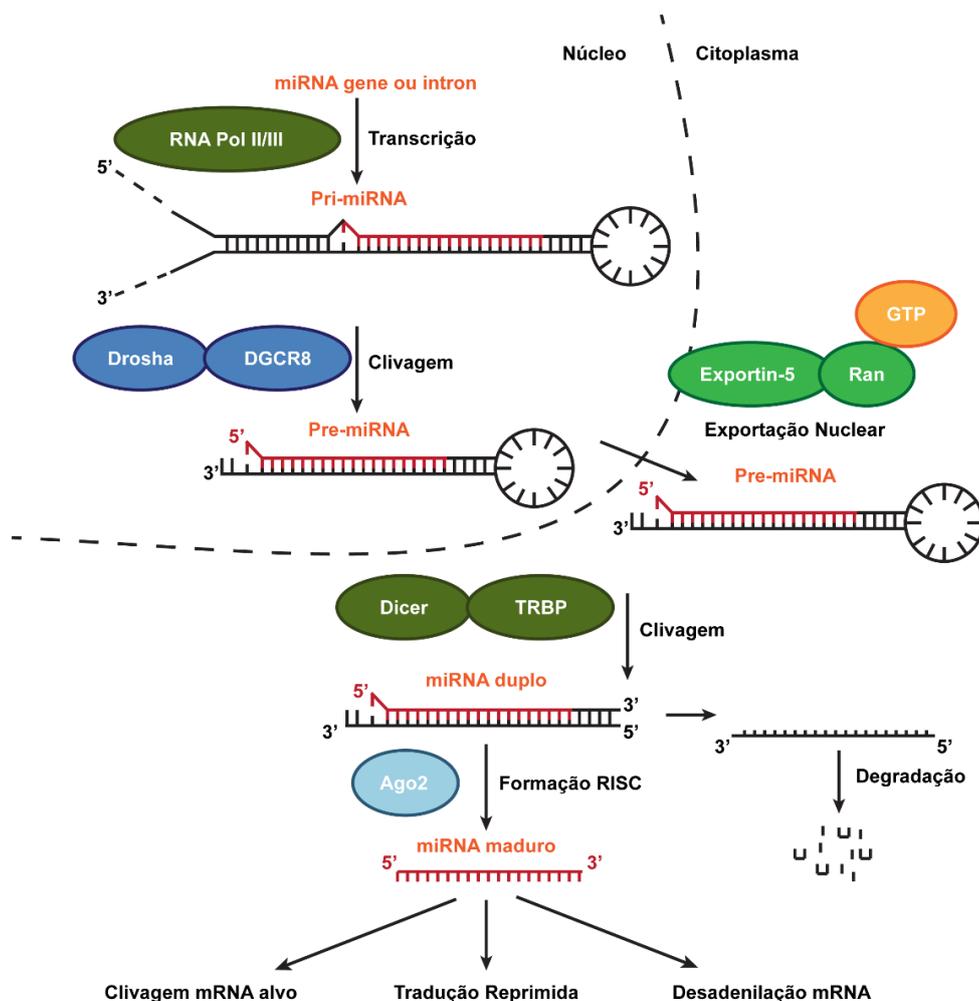
O microRNA é um grupo de RNA de cadeia simples, não codificante de proteínas, de cerca de 22 nucleotídeos de comprimento. Podem ser encontradas nas células, plantas e em animais.¹⁹ A função miRNA é de regulação pós-transcricional da expressão gênica e estão envolvidas em diversos processos celulares, incluindo diferenciação, proliferação e apoptose.⁹² Até a presente data, mais de 1900 tipos diferentes de miRNAs foram encontrados em humanos.¹⁹ O Lin-4 foi o primeiro miRNA a ser identificado em *C. elegans* (*Caenorhabditis elegans*), em 1993, quando se começou a revelar a importância dos miRNAs.⁹³

2.3.1 Biogênese dos microRNAs

O processo de biogênese dos miRNAs é complexo e envolve componentes nucleares e citoplasmáticos. Inicialmente, são produzidos na forma de um transcrito primário longo (pri-miRNA), de várias quilobases de extensão pela RNA polimerase II. O pri-miRNA é processado, ainda no núcleo, por uma endonuclease RNase III, conhecida como Drosha, juntamente com seu cofator Pasha, gerando uma molécula precursora do miRNA maduro denominada pré-miRNA, com cerca de 70 nucleotídeos. Em seguida, o pré-miRNA é transportado ao citoplasma pela exportina-5, que utiliza GTP como cofator.⁹⁴ No citoplasma, o pré-miRNA é

processado por outra RNase III, Dicer, gerando um miRNA fita dupla de aproximadamente 22 nucleotídeos. Este produto é incorporado ao complexo multimérico RISC (complexo silenciador induzido por RNA, do inglês, *RNA Interference Specificity Complex*), que inclui as proteínas argonautas como principais componentes. A atividade da helicase faz com que apenas uma das fitas do duplex de miRNA permaneça no complexo RISC para controlar a expressão pós-transcricional de genes-alvo⁹⁴ (Figura 3).

Figura 3 - Modelo geral da biogênese do miRNA. mRNA, ácido ribonucleico mensageiro; miRNA, microRNA



2.3.2 Mecanismo de ação dos miRNAs

Os miRNAs constituem, tradicionalmente, uma classe de reguladores negativos da transcrição gênica. Cada miRNA pode, por predições de bioinformática, regular até 300 genes diferentes, de acordo com a sua complementaridade e sequência no gene. Para os miRNAs são conhecidos dois mecanismos de ação: degradação e inibição de sua tradução. O primeiro mecanismo ocorre quando há pareamento perfeito entre o miRNA e o gene-alvo, ou quando o pareamento imperfeito resulta em deadenilação do mRNA.⁹⁵ O pareamento imperfeito pode interferir na inibição da tradução, por meio de bloqueio da inicialização, retirada de ribossomos e inibição de alongamento.⁹⁶ O possível papel do miRNA como regulador positivo da transcrição gênica também já foi descrito.

2.3.3 Os microRNAs na fisiopatologia dos aneurismas

A disfunção das células endoteliais, infiltração de leucócitos, degradação da matriz extracelular e depleção de célula muscular lisa são consideradas três características patológicas dos AAA. Vários miRNAs foram identificados como reguladores cruciais, orquestrando as funções de todos os subtipos de células vasculares. A assinatura do miRNA do aneurisma pode variar dependendo da localização e morfologia da doença.^{69,97}

As células endoteliais são os primeiros sensores celulares expostos a fatores patológicos, como hiperlipidemia e estresse turbulento de cisalhamento, no lúmen da aorta. Além disso, a manipulação de angiotensina II e miR-712/205 afetaram a adesão de leucócitos circulantes, destacando ainda mais o potencial terapêutico de direcionar essa via, ao mesmo tempo em que implica que outros mecanismos estão envolvidos.⁶⁹

A infiltração celular inflamatória subsequente pode ser facilitada pelo miR-155, cujos níveis foram altamente elevados em biópsias de AAA e soros circulantes em pacientes com a doença. Acredita-se que o miR-155 não apenas promova a inflamação crônica, melhorando o desenvolvimento das células T por meio da regulação negativa da proteína 4 citotóxica associada a linfócitos T (CTLA4), mas

também bloqueie a tradução e síntese de proteínas do homólogo decapentaplégico (SMAD2) durante a regulação da sinalização de TGF- β , levando ao desenvolvimento de AAA.⁶⁹

Da mesma forma, o miR-181b promove os macrófagos de capacidades mais invasivas e proliferativas para controlar a progressão do aneurisma por meio da regulação negativa do inibidor de tecido da expressão da MMP-3, controlando o crescimento do aneurisma e da aterosclerose.⁹⁸ O miR-181b está envolvido na diferenciação de VSMC, aumentando genes marcadores sintéticos e diminuindo genes relacionados à contratilidade. A perda do fenótipo contrátil dos VSMCs é um evento precoce na patologia do AAA. O miR-181b é superexpresso em tecidos de AAA humanos. A regulação negativa da expressão de miR-181b pela entrega sistêmica de antimir-181b em camundongos ApoE^{-/-} e Ldlr^{-/-} infundidos com Angio-II revelou que o anti-miR-181b suprime significativamente a formação de AAA, aumenta a expressão de elastina e colágeno, facilita respostas fibróticas e mantém a estabilidade do aneurisma.⁹⁹

No contexto dos AAA, as interações com miR-24-Chi3l1 parecem favorecer amplos efeitos em todas as células presentes na parede aórtica, como a regulação da sobrevivência de macrófagos, síntese de citocinas, migração de células do músculo liso da parede aórtica e estimulação de moléculas de adesão molecular nas células endoteliais. Além disso, a superexpressão do miR-24 em modelos murinos foi capaz de diminuir significativamente os níveis de Chi3l1, interrompendo a evolução do AAA, respostas imunes reduzidas e atividades de citocinas, sugerindo que a regulação negativa do miR-24 contribui para o crescimento do aneurisma. Em contraste, a inibição do miR-24 demonstrou acelerar a progressão do AAA pelo aumento do grau de respostas inflamatórias relacionadas à apoptose.⁶⁹

O miR-21 regula a função contrátil, a proliferação e a apoptose das células musculares lisas. Diante disso, a expressão do miR-21 aumenta substancialmente à medida que os AAA se desenvolvem nos modelos de perfusão de elastase pancreática porcina e de infusão de angiotensina II em AAA.⁶⁹ O desenvolvimento de AAA leva ao aumento da expressão de miR-21 e diminuição da expressão de PTEN, resultando em resposta pró-proliferativa e antiapoptótica de células

musculares lisas dentro da parede do vaso, provavelmente na tentativa de proteger a aorta de expansão adicional e ruptura final.¹⁰⁰

Os níveis de miR-195 mostraram aumento significativo nas aortas de camundongos Apo E *deficient* após a infusão de Angiotensina II. Consistente com os níveis aumentados de miR-195 em aortas humanas dissecadas, foi detectada a ligação direta de miR-195 a vários transcritos de matriz extracelular. Com base nesses achados, foi realizada análise proteômica do secretoma de células musculares lisas da aorta murina após a manipulação do miR-195, revelando que o miR-195 tem como alvo um grupo de proteínas da matriz extracelular, incluindo colágenos, proteoglicanos, elastina e proteínas associadas às microfibrilas elásticas. A inibição do miR-195 *in vivo* levou a níveis mais elevados de expressão de elastina aórtica, relacionada a aumentos nos níveis de MMP-2 e MMP-9. No plasma humano, a expressão do miR-195 demonstrou levar à correlação inversa entre a presença de AAA e o diâmetro aórtico. Esses dados indicam que o miR-195 pode contribuir para a patogênese dos AAA via desregulação da matriz extracelular.⁶⁹

Em estudo de perfil inicial, foram identificados 151 miRNAs que mostraram mais de duas vezes o aumento da concentração de microRNAs em pacientes com aneurisma comparados ao grupo controle. Entre eles, três miRNAs, miR-191-3p, miR-455-3p e miR-1281 exibiram maior aumento no grupo de pacientes (acima de cinco vezes). O estudo de validação subsequente confirmou a elevação desses três miRNAs. As curvas ROC para cada um dos três miRNAs analisados foram construídas para discriminação entre AAA e controles. A área sobre a curva do miR-191-3p foi de 0,9700 com sensibilidade de 93,3% e especificidade de 96,7% (intervalo de confiança = 0,9352–1,0048). A área sobre a curva de miR-455-3p foi de 0,9825 com sensibilidade de 95,0% e especificidade de 100,0% (intervalo de confiança = 0,9613-1,0037). A área sobre a curva do miR-1281 foi de 0,9206 com sensibilidade de 76,7% e especificidade de 98,3% (intervalo de confiança = 0,9613-1,0037). Dessa forma, esses microRNAs podem atuar como biomarcadores promissores para o diagnóstico precoce do AAA.¹⁰¹

Os miRNA-191 e 455-3p foram identificados no plasma de pacientes com AAA, apresentando alto poder discriminatório para o diagnóstico e apresentaram redução significativa de sua expressão após seis meses de tratamento

endovascular, o que sugere fortemente a exclusão completa do aneurisma. Além disso, a expressão de miR-191 e miR-455-3p não se correlacionou com os diâmetros dos aneurismas. A análise da influência dos diversos tipos de dispositivos de endoprotéses utilizados para o tratamento endovascular do AAA não mostrou diferenças significativas nas expressões de miR-191 e miR-455-3p.¹⁰²

O miR-191 é um regulador chave da homeostase de células T. A regulação negativa de miR-191 resultou em perda preferencial de células T CD4+ e CD8+ de memória. Essas perdas foram devidas à redução da sobrevivência após a sinalização atenuada de citocinas e ativação de STAT5. Além disso, a super-representação de moléculas de adesão pode causar aderência, resultando em infiltração de células do sistema imunológico. Eventualmente, vias de sinalização específicas mediadas por IL-35, IL-27, IL-18 e IL-33 foram identificadas como interrompidas. Entre outros, a IL-35 induz IL-32 nas células musculares lisas da parede do vaso. Seus níveis se mostraram elevados em amostras de AAA, com ênfase particular nas células endoteliais, musculares lisas e imunes. Por sua vez, a IL-27 por meio de seu receptor IL-27R acelerou significativamente a formação de aneurisma em um modelo de camundongo. A IL-18, por outro lado, tem sido associada à formação de AAA por meio da ativação de MMP ou pelo recrutamento de macrófagos.¹⁰³

O miRNA-1281 foi identificado no sangue total de pacientes com AAA e apresentou redução significativa na expressão após o tratamento endovascular, e diminuição significativa (> 5 vezes) após seis meses de cirurgia ($p < 0,0001$). Isso mostra uma correlação positiva e significativa, tanto na presença do aneurisma quanto na evolução clínica e anatômica favorável, sugerindo que a exclusão do saco aneurismático altera as vias dos miRNAs. Além disso, não houve associação da expressão de miRNA com o diâmetro do aneurisma ($p = 0,7058$). A razão pela qual o miRNA-1281 reduz após o tratamento do aneurisma ainda não é compreendido. Uma vez que a doença da parede aórtica não foi removida no EVAR, especula-se que a expressão do miRNA-1281 pode estar relacionada ao estresse da parede aórtica ou alterações de fluxo.¹⁰⁴

2.4 O Tratamento endovascular e os mecanismos de *endoleak*

Uma alternativa menos invasiva ao reparo cirúrgico aberto é o EVAR, por meio de um dispositivo chamado endoprótese, que é inserido na área dilatada da aorta para separar o fluxo sanguíneo normal do aneurisma, sendo que as extremidades da endoprótese devem ser ancoradas em áreas saudáveis, a fim de evitar *endoleak*. Essa técnica foi projetada para ser aplicada direto na aorta sem necessidade do acesso cirúrgico. Como o EVAR é um procedimento menos invasivo do que a cirurgia aberta, a internação hospitalar é mais curta, em média quatro a cinco dias.

O *endoleak* é definido como fluxo sanguíneo persistente no saco aneurismático após EVAR, que pode estar presente no momento do reparo em até 25% dos casos. Embora um *endoleak* possa, frequentemente, se resolver sem intervenções, alguns requerem tratamento imediato ou tardio para evitar ruptura do aneurisma. Além disso, alguns *endoleaks* desenvolvem-se meses ou anos após a cirurgia, sendo obrigatória a vigilância ao longo da vida, podendo ser identificados por angiotomografia computadorizada, angiorressonância ou ultrassom com Doppler. Existem cinco principais tipos de *endoleaks*, e o gerenciamento e risco de ruptura dependem de cada tipo.²⁶

A incidência de *endoleaks* está entre 4-12% para tipo I; 8-12% tipo II; 8-12% tipo III e 5,4% para o tipo V.⁵ A reintervenção para o tipo I é de 54-66% e 22% para tipo II, comparada a 6% sem *endoleak*. A chance de ruptura secundária do saco aneurismático é de 0,6 a 4,2%, com 2/3 das rupturas decorrentes de *endoleak*.^{28,30}

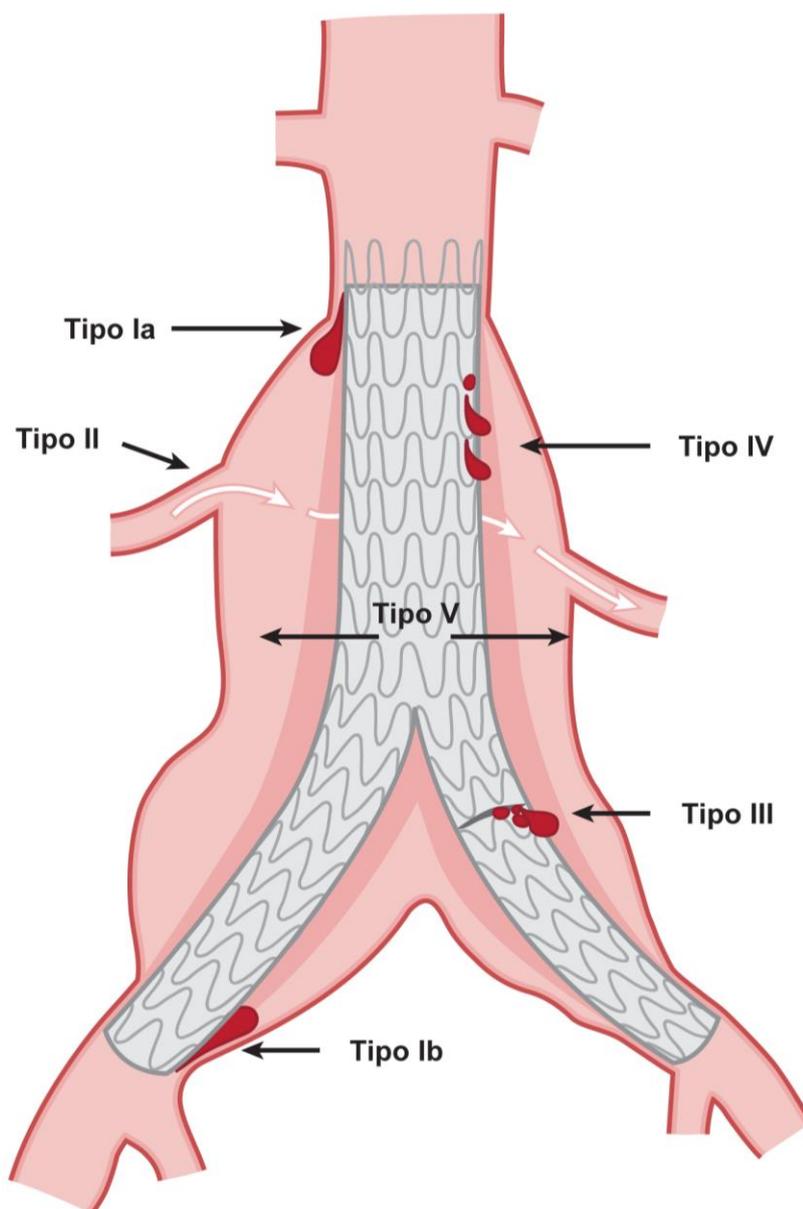
O *endoleak* Tipo I pode ser definido como selamento circunferencial inadequado nas áreas de fixação da prótese na parede aórtica, sendo subdividido em tipo Ia, quando há *endoleak* oriundo da fixação proximal (colo proximal), Ib quando presente na região de fixação distal (eixo ilíaco), ou ainda Ic quando ocorre por comunicação direta entre a aorta e a íliaca após implante de um *plug* oclisor na íliaca durante o uso de endoprótese monoilíaca.⁵

O *endoleak* tipo II trata-se de uma das mais frequentes complicações pós EVAR, chegando a taxas de 44% de todos os *endoleaks*.¹⁰⁵ As artérias frequentemente envolvidas nesse tipo de *endoleaks* são as artérias mesentérica

inferior e as lombares. Os *endoleaks* tipo II são subdivididos em tipo IIa quando apenas um ramo colateral está envolvido e em tipo IIb quando dois ou mais ramos fornecem fluxo para o saco aneurismático.^{106,107}

O *endoleak* tipo III pode ser definido como secundário à falha estrutural da endoprótese e ocorre em 4%. Esse tipo pode ser subdividido em IIIa, quando decorrente de desconexão entre os módulos da endoprótese, e em IIIb quando há fratura ou defeito de fabricação do material. Já o tipo IV está relacionado com a porosidade do tecido de revestimento da endoprótese, e ocorre através do tecido intacto, e na maioria dos casos se resolve nos primeiros 30 dias após o EVAR, sendo considerado de natureza benigna. Não se relaciona aumento do risco de rotura do aneurisma e não há indicação de intervenção, desde que excluídas outras causas antes de se estabelecer o diagnóstico definitivo.¹⁰⁷ O tipo V, ou endotensão, pode ser definido como elevação da pressão intrassaco aneurismático pós EVAR, sem evidências de perfusão do saco aneurismático, com prevalência de aproximadamente 4,5%^{92,108,109} (Figura 4).

Figura 4 - Esquema dos tipos de *endoleak*



2.4.1 Fatores de risco para *endoleak*

2.4.1.1 Anatomia das artérias mesentérica inferior e lombares

A perviedade das artérias mesentérica inferior e lombar, apesar de ser fator de risco independente para *endoleak* tipo II, está correlacionada com risco

aumentado de eventos adversos como crescimento e ruptura do aneurisma, chegando a 24-52% e 1-9%, respectivamente, nos pacientes com *endoleak* persistente. Além disso, o número de artérias lombares é um fator de risco independente para *endoleak*. Portanto, o diâmetro da artéria mesentérica inferior ($\geq 2,6$ mm), das artérias lombares ($\geq 1,9$ mm) associado à ausência de trombos é fator de risco importante para o *endoleak*.¹¹⁰⁻¹¹³

2.4.1.2 Anatomia do colo

Devido ao desenvolvimento e à evolução das endopróteses, os conceitos e fatores de risco decorrentes da anatomia hostil do aneurisma têm sido revisados recentemente, e fatores de risco adicionais foram acrescentados. Dentre as características de colo hostil, destacam-se diâmetro do colo proximal (>30 mm), comprimento do colo (<15 mm), colo cônico, presença de trombo mural ($>50\%$ da circunferência), calcificação, angulação acentuada do colo ($>60^\circ$) e tortuosidade aórtica acentuada, que podem aumentar o risco de *endoleak*.¹¹⁴⁻¹¹⁶ Além disso, a dilatação do colo aórtico devido à remodelação após implantação da endoprótese, representa fator de risco importante para *endoleak*. A remodelação aórtica e dilatação do colo após EVAR representam uma realidade desafiadora relacionada a eventos adversos tardios. A dilatação do colo é definida como o aumento do diâmetro do colo proximal >2 mm ou $>15\%$. Acredita-se que o mecanismo fisiopatológico da dilatação do colo pode estar relacionado à força radial da própria endoprótese, embora haja evidências ainda inconclusivas.

2.4.1.3 Diâmetro do aneurisma

Apesar de os diâmetros dos aneurismas geralmente diminuïrem com o tempo, a presença de *endoleak* atenua significativamente esta reduçãõ. É descrito na literatura que *endoleaks* isolados tipo II, identificados após um ano do procedimento, estiveram associados a aumento significativo do diâmetro do aneurisma em comparação com os que foram detectados logo após o procedimento.¹¹⁷

2.4.1.4 Anticoagulação e antiagregante plaquetário

É fato que o aumento no diâmetro do saco aneurismático pode levar à ruptura. A formação de trombo pode levar à cessação do fluxo sanguíneo no saco aneurismático, embora a formação e aderência desses trombos seja dependente de uma infinidade de fatores. Os pacientes submetidos à anticoagulação e antiagregação plaquetária representam um grupo com risco aumentado de formação de *endoleak* devido à sua incapacidade de formar trombos estáveis. O uso dessas medicações é comum em pacientes com doença cardiovascular, já que modificam positivamente o risco de eventos indesejáveis. Conseqüentemente, a investigação adicional de taxas de *endoleak* e morbidade em pacientes anticoagulados e antiagregados submetidos ao EVAR é importante. O efeito da anticoagulação e terapia antiplaquetária na incidência de *endoleaks* e expansões de saco após tratamento endovascular é limitado pelo seu pequeno tamanho de amostra e, conseqüentemente, produz resultados conflitantes.^{118,119}

2.4.1.5 Cirurgia de emergência

A incidência de complicações nos pacientes com aneurisma roto é significativamente maior do que em casos eletivos. A presença de *endoleak* em correção eletiva de aneurismas é bem descrita, porém pouco se conhece dos *endoleaks* em cirurgias de emergência. Em circunstâncias de rotina, os pacientes geralmente recebem anticoagulação plena durante o procedimento, enquanto que aqueles com aneurisma roto raramente são anticoagulados durante o procedimento. Isso pode ter impacto na taxa de *endoleak*, ou seja, muitas artérias lombares podem estar propensas à trombose em pacientes não anticoagulados após o implante da endoprótese e exclusão de aneurisma. Além disso, o colapso hemodinâmico secundário à ruptura do aneurisma e perda de sangue promove impacto negativo nos resultados.

A menor incidência de *endoleaks* do tipo II, observada em pacientes com aneurisma roto, deve-se ao trauma vascular maciço no local da ruptura, o que permitiria liberar fatores de coagulação local, bem como taxa de mortalidade

significativamente maior nesses pacientes do que nos casos eletivos (23,49% vs 1,38%; $p < 0,01$). Portanto, mais pesquisas devem ser realizadas para se entender completamente o comportamento do EVAR de aneurisma roto.⁸⁵

2.4.1.6 Geração das endopróteses

A incidência de *endoleaks* tem sido descrita, sendo maior na primeira e segunda gerações de endopróteses (dispositivos de junho de 1994 a junho de 2003, respectivamente), do que nas da terceira geração (2010), sendo 12,7% e 1,2% ($p < 0,001$), respectivamente.¹²⁰⁻¹²²

2.4.1.7 Tabagismo

O *status* de não fumante como fator de risco independente para *endoleak* tipo II parece contraditório, dada a relação entre tabagismo e aneurismas. Mas o estado pró-trombótico e a evolução aterosclerótica das artérias lombar e mesentérica inferior causado pelo tabagismo diminui a incidência desse tipo de *endoleak*, embora a evolução aneurismática continua com possíveis degenerações dos colos proximal e distal, levando a *endoleak* tipo I.⁹⁰

2.4.1.8 Idade e gênero

A prevalência de AAA é muito menor em mulheres do que em homens. Porém, a taxa de ruptura do aneurisma é três vezes maior em mulheres do que em homens. O diâmetro médio do aneurisma quando há ruptura é de 5 cm nas mulheres e 6 cm nos homens. Isso parece evidente, pois em mulheres a aorta apresenta diâmetro menor comparado ao dos homens.¹²³ Além disso, pacientes idosos com aneurisma apresentam redução de miócitos no músculo liso da camada média. A presença do *endoleak* aumentaria a pressão no saco aneurismático, que já possui característica enfraquecida, levando à dilatação contínua do aneurisma.^{124,125} Assim, idade e gênero são fatores de risco para maiores complicações em aneurismas de aorta. Diante disso, a presença de *endoleak* persistente associado às características

anatômicas e histológicas inerentes à idade e ao gênero podem potencializar uma ruptura.

2.5 Patogenia do *endoleak*

Como citado acima, o EVAR dos AAA modificou radicalmente o tratamento dessa doença. Por outro lado, os benefícios, em longo prazo, particularmente em relação à sua durabilidade e ao tempo livre de reintervenção, continuam em constante discussão. A mais temida complicação pós-EVAR é a ruptura do aneurisma, podendo ocorrer como consequência de *endoleaks*, pressurização do saco aneurismático (endotensão), migração ou degeneração das endopróteses e degeneração do colo proximal e distal por progressão da doença aneurismática.⁶ Dentre essas complicações, os *endoleaks* podem atingir taxa de até 50% dependendo do tipo de endoprótese, da seleção dos pacientes, técnica de implante e morfologia da aorta.^{5,110} O *endoleak* pode ocorrer a qualquer momento e tem sido demonstrada correlação com a expansão do aneurisma, bem como com o risco de ruptura.⁵

O *endoleak* Tipo I ocorre a partir de programação pré-operatória inadequada com subdimensionamento do diâmetro da endoprótese, ou ainda medida inadequada da extensão do colo proximal, ocasionando a manutenção de fluxo para o saco aneurismático, que precocemente acarreta risco de aumento do diâmetro do colo proximal, migração distal da endoprótese ou mesmo ruptura do saco aneurismático.¹²⁶

Os principais fatores anatômicos mais comuns encontrados em *endoleak* tipo I são: colo proximal curto (<15 mm de extensão), colo proximal largo (>30 mm de diâmetro), colo proximal angulado (>60°) e presença de calcificação e trombos nas regiões de ancoragem.¹²⁷⁻¹²⁹

Os fatores de risco para desenvolvimento de *endoleak* tipo II incluem os ramos colaterais da aorta pérvios e idade avançada; enquanto que tabagismo e índice tornozelo-braço reduzido estão associados a baixo risco desse tipo.⁵

Os fatores de risco para ocorrência de *endoleak* tipo III são angulações excessivas do colo proximal ou do eixo ilíaco, remodelação do saco aneurismático e

erro técnico intraoperatório devido a pequena sobreposição entre as conexões (*overlap*). Essa complicação promove pressurização direta do saco aneurismático, o que eleva o risco de rotura e, conseqüentemente, quando identificado, a reintervenção precoce é necessária. Já, o *endoleak* tipo IV ocorre em pacientes que fazem uso de anticoagulantes por alterações cardíacas como arritmias, próteses metálicas cardíacas e trombose venosa profunda, com indicação de anticoagulação perene.⁶²

O *endoleak* tipo V, ou endotensão, apresenta patogênese incerta, mas há uma tendência na literatura de considerá-la como secundário a um *endoleak* subdiagnosticado. Mesmo assim, descreve-se que a transferência de pressão para o saco aneurismático possa decorrer da porosidade do tecido da endoprótese e transmissão dessa pressão pelo trombo para a parede aneurismática.¹⁰⁹ Pacientes com *endoleak* apresentam risco potencial de ruptura em média global de 2%.¹²⁴

2.6 Tratamento dos *endoleaks*

O *endoleak* tipo I é considerado uma falha no tratamento. Diversas técnicas endovasculares podem ser empregadas para correção como a angioplastia com balão para promover o *oversize* entre a endoprótese e a parede aórtica; uso de extensões proximais ou *cuffs*, quando há colo proximal disponível, visto que sua fixação depende de uma área infrarrenal adequada; uso de *stents* expansíveis por balão cobrindo o colo com o objetivo de aumentar a força radial; *stents* aórticos autoexpansíveis em posição transrenal¹³⁰, embolização do saco aneurismático¹³¹, técnicas de *stents* paralelos e até customização de endopróteses fenestradas. Quando as opções endovasculares falharem há a possibilidade de cerclagem do colo proximal por cirurgia aberta, porém com morbimortalidade significativa pouco maior.⁵

Os *endoleaks* tipo II indicam intervenção quando há aumento do saco aneurismático maior que 10 mm em um ano. Há diversas formas de abordar essa complicação, como embolização transarterial do vaso responsável pelo *endoleak*, punção do saco aneurismático guiado por fluoroscopia ou por tomografia computadorizada e ligadura cirúrgica aberta ou videolaparoscópica.^{106,107}

O *endoleak* tipo III promove pressurização direta do saco aneurismático, o que eleva o risco de rotura e, conseqüentemente, quando identificada, a reintervenção precoce é necessária. Pode ser corrigido por técnica endovascular com implante de extensão ou *cuff* coaxial à endoprótese prévia ou conversão para endoprótese monoilíaca com enxerto femoro-femoral cruzado.

O *endoleak* tipo IV não se relaciona a aumento do risco de rotura do aneurisma e não há indicação de intervenção, desde que excluídas outras causas, antes de se estabelecer o diagnóstico definitivo.¹⁰⁷

O *endoleak* tipo V, em curto prazo, não parece estar associado com ruptura, porém em longo prazo pode cursar com aumento desse risco. A pressurização do saco aneurismático poderia levar à degeneração das áreas de fixação da prótese, precipitando degenerações precoces dos colos e *endoleaks*.¹³² A intervenção está indicada quando há expansão do saco aneurismático maior que 10 mm em um ano com o uso de *cuffs* ou extensão coaxial à endoprótese prévia ou conversão para cirurgia aberta.^{107,133}

2.7 Seguimento

A recomendação para os pacientes submetidos a EVAR é angiotomografia com um mês, três, seis e doze meses durante o primeiro ano de pós-operatório. Após o primeiro ano, a tomografia computadorizada é recomendada anualmente e como alternativa, a ultrassonografia com Doppler se nenhuma anormalidade for detectada nesse período.¹⁰⁰

O risco de ruptura de aneurisma é de 0,7% de um a 24 meses após o EVAR bem-sucedido. Além disso, após a exclusão endovascular, ainda há 30% a 40% dos casos em que *endoleak* persistente, associado à pressurização contínua do saco, crescimento do aneurisma e risco aumentado de ruptura está presente no seguimento de um ano.

A vigilância ao longo da vida é obrigatória após EVAR, com ultrassonografia ou angiotomografia. Há estudos comparando esses dois procedimentos sugerindo que a sensibilidade e a especificidade são equivalentes.¹³⁴ Por outro lado, estudos mais recentes sugerem que a ultrassonografia sozinha tem baixa precisão

diagnóstica em relação a tipos específicos de *endoleaks*¹³⁵, e torna, em alguns centros, a tomografia com contraste iodado o método de escolha devido ao seu rápido tempo de aquisição e alto valor diagnóstico.¹³⁶

A vigilância por toda a vida com angiotomografia aumenta o risco acumulativo de exposição à radiação e nefropatia induzida por contraste.^{137,138} Uma abordagem para melhorar a precisão diagnóstica do ultrassom é a realização de ultrassom com contraste com microbolhas, que tem demonstrado ser equivalente à angiotomografia na identificação do *endoleak*, embora possa não ser tão sensível na detecção de migração de endoprótese.¹³⁹

Outra opção inclui angiorressonância nuclear magnética, com excelente contrastação de tecidos moles e ausência de radiação ionizante que, de acordo com alguns autores, demonstrou ser mais sensível que a angiotomografia. No entanto, técnicas de angiorressonância são consideradas demoradas e caras.¹⁴⁰ Uma revisão recente das três modalidades concluiu que o ultrassom com microbolhas era significativamente mais sensível e específico do que o ultrassom com Doppler na identificação de *endoleak*, mais preciso que angiotomografia e com precisão semelhante à angiorressonância.^{5,7,108}

2.7.1 Metaloproteinases no seguimento endovascular

A disseminação do tratamento endovascular de AAA trouxe preocupação e a necessidade de *screening* para a identificação de *endoleaks* decorrentes de exclusão incompleta do aneurisma, uma causa potencial de ruptura tardia. Isso exige a utilização de imagens de tomografia computadorizada em série durante período de tempo indeterminado após reparação.⁸ A angiotomografia necessita de administração de contraste e exposição à radiação, um problema frente a pacientes que apresentam função renal deteriorada, bem como pequeno aumento do risco de malignidade em função dos efeitos estocásticos.^{7,9} Além disso, a importância biológica de muitos *endoleaks* ainda não é conhecida, e a tomografia computadorizada não elimina a dificuldade em determinar quais *endoleaks* requerem intervenção adicional. Estas questões suscitam a preocupação de que o custo em longo prazo da vigilância dos *endoleaks* poderia, potencialmente, superar os

benefícios do EVAR. Embora uma abordagem alternativa seja útil para orientar o curso do seguimento clínico, um marcador sorológico confiável da doença de aneurisma persistente pode ajudar a preencher essa necessidade.⁸

É descrito na literatura que vários biomarcadores circulantes estão associados à presença de AAA, como marcadores de trombose, inflamação e degradação da matriz.⁷ O reaparecimento dessas enzimas na circulação periférica pode sinalizar o desenvolvimento de pressurização contínua do saco e a recorrência do aneurisma.

Teoricamente, o aumento da produção de MMPs dentro da parede do aneurisma pode transbordar para a circulação sistêmica. Essas proteases podem desempenhar papel crítico na evolução do AAA em direção ao alargamento e à ruptura. As MMPs plasmáticas também podem ser marcadores bioquímicos úteis para avaliar a eficácia do tratamento cirúrgico ou intervencionista.⁷¹

Durante o EVAR, o saco aneurismático é mantido com progressiva regressão. Apesar de sua baixa mortalidade e morbidade, é caracterizado por alta frequência (17-26%) de *endoleak*. A manutenção do saco residual é exposta ao fluxo sanguíneo e predispõe à recorrência e ruptura do aneurisma em casos de *endoleak*. Tomografia computadorizada seriada constitui a base de diagnóstico e vigilância de *endoleak*. Essa tática aumenta muito o custo de tratamento endovascular.⁷¹

Postula-se que a perfusão contínua do saco aneurismático em pacientes com *endoleak* perpetua a remodelação da parede aórtica, resultando em liberação de MMPs na circulação, e é premissa para promover a liberação de MMPs na circulação, assim como preâmbulo para especulações para terapia farmacológica nos pacientes assintomáticos com pequenos aneurismas.⁸¹

A literatura confirma que os níveis plasmáticos de MMP-9 após EVAR bem-sucedido diminuiu dos valores basais em um mês, três ou seis meses de seguimento, mas em pacientes com *endoleak*, esses níveis aumentaram significativamente em um mês, três e seis meses de seguimento ou reduziram em um mês e três meses, comparado com a linha de base ou com os controles.^{7,141,142}

As MMPs podem ser utilizadas como marcadores plasmáticos em pacientes com AAA; pois, primeiro, estão significativamente elevadas nesses pacientes em comparação com controles saudáveis. Segundo, em pacientes tratados com

sucesso por EVAR, os níveis plasmáticos de MMPs, durante o acompanhamento, diminuiu para nível semelhante ao de pós-tratamento cirúrgico convencional. Terceiro, o aumento dos níveis de MMP após a exclusão por EVAR pode auxiliar na identificação de pacientes que apresentem *endoleak* perienxerto durante o seguimento com consequente pressurização contínua do saco e possível expansão do aneurisma. Quarto, a diminuição dos níveis de MMPs durante o seguimento indica exclusão efetiva do aneurisma por EVAR.¹⁴³

Hellenthal et. Al.⁹, Sangiorgi et al.¹⁴³ e Lorelli et al.¹⁴⁴ sugeriram que os níveis plasmáticos de MMP-9 podem ser utilizados para monitorar o sucesso dos procedimentos de EVAR.

Um biomarcador ideal para detecção de *endoleaks* deverá ter alta sensibilidade, bem como alta especificidade para excluir indivíduos sem *endoleak* e também ser capaz de discriminar os tipos de *endoleak*.⁷

Os procedimentos, convencional ou endovascular, permanecerão como padrão ouro para o tratamento de aneurismas. Com o aprimoramento tecnológico das endopróteses e o arrojo de se tentar tratar aneurismas cada vez mais complexos, novas complicações surgirão. Para mitigar ou antecipar essas complicações faz-se necessário compreender a fisiopatologia do aneurisma em nível molecular por meio de biomarcadores. O reaparecimento dessas enzimas na circulação periférica pode sinalizar o desenvolvimento de pressurização contínua do saco e recorrência do aneurisma. Por fim, o estudo de microRNAs e marcadores inflamatórios será importante para, além de se compreender o papel de remodelação do saco aneurismático, avaliar a fisiopatologia dos *endoleaks* e, conseqüentemente, propor tratamento intervencionista precoce.

2.7.2 MicroRNAs no seguimento endovascular

Devido à sua função reguladora genética e sua alta estabilidade em fluidos biológicos, os miRNAs têm sido destacados como candidatos ideais para biomarcadores não invasivos. Embora alguns miRNAs tenham sido descritos como regulatórios em modelos ou tecidos humanos de AAA, comparativamente, poucos estudos existem até o momento estabelecendo seus papéis funcionais na doença.

O microRNA circulante pode afetar as células endoteliais vasculares, que amortecem todo o sistema circulatório e desempenham papel fundamental na manutenção da homeostase. Por exemplo, o endotélio regula o tônus vascular, a atividade plaquetária, adesão leucocitária e angiogênese. O papel do endotélio é exercido por meio da produção de óxido nítrico e outros fatores reguladores, bem como pela presença de receptores ligados à membrana para numerosas moléculas.¹⁰³

2.8 Hipótese

Apesar do grande interesse e da literatura florescente nos últimos anos, o uso de biomarcadores circulantes para detectar complicações do EVAR ainda é limitado na prática clínica devido à disponibilidade restrita do método, falta de recomendações em diretrizes secundárias e de estudos de correlação mais aprofundados. Para superar essas limitações, a metodologia utilizada para estudar o desenvolvimento e progressão do AAA deve ser traduzida também para o cenário endovascular para apoiar o uso de biomarcadores no diagnóstico precoce de complicações, como por exemplo, os *endoleaks*. Um potencial biomarcador inédito na clínica para o seguimento de pacientes submetidos à técnica endovascular melhoraria os programas de vigilância após a alta hospitalar, com eventual uso personalizado de tomografia computadorizada.¹⁴⁵

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão dos níveis plasmáticos dos miR-181b, miR-21, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 em pacientes com AAA antes e após o EVAR.

3.2 Objetivos específicos

1. Quantificação sérica da expressão dos miR-181b, miR-21, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2;
2. Avaliar a resposta da concentração sérica dos miR-181b, miR-21, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 após EVAR de AAA;
3. Correlacionar a expressão sérica dos miR-181b, miR-21, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 com os diversos materiais de endoproteses existentes;
4. Correlacionar o diâmetro do AAA com a expressão dos miR-181b, miR-21, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2;
5. Correlacionar *endoleaks* com a expressão dos miR-181b, miR-21, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2.

4. Casuística e Métodos

4.1 Considerações éticas

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), Processo nº 82522018.0.0000.5440 (Anexo).

Todos os participantes receberam orientações sobre a natureza do estudo, seus objetivos e benefícios. Foram ainda informados que a pesquisa não lhes acarretaria riscos, ou despesas adicionais, e que a não aceitação não implicaria em qualquer prejuízo do tratamento. Foram incluídos aqueles que concordaram em participar do estudo e espontaneamente assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndices A e B).

4.2 População do estudo

Para o grupo de estudo foram incluídos 47 pacientes (independente de grupo étnico, idade e sexo), submetidos a EVAR de AAA no período de maio de 2018 a fevereiro de 2020, selecionados a partir de casos atendidos no Ambulatório de Cirurgia Vascular e Endovascular do HCFMRP-USP. As dosagens dos miRNAs avaliados foram realizadas da seguinte forma: A) dosagem sérica pré-operatória (24 horas antes do procedimento cirúrgico), através de veia periférica e B) dosagem sérica através de veia periférica com seis meses de pós-operatório. Esses pacientes realizaram exames de vigilância (angiografia da aorta total por tomografia computadorizada ou por ressonância nuclear magnética) em três momentos: um mês, seis e doze meses após o procedimento cirúrgico, objetivando a investigação de *endoleaks* e/ou alterações na morfometria do saco aneurismático. Para o grupo controle, foram selecionados 10 pacientes (independente de grupo étnico, idade e sexo), não portadores de AAA, pareados por idade e sexo com o grupo estudo.

4.2.1 Critério de inclusão

Foram incluídos no presente estudo pacientes com diagnóstico de AAA infrarenal/ilíacas elegíveis para correção endovascular padrão, respeitando as

indicações de tratamento vigentes na atualidade - em homens diâmetro $\geq 5,5$ cm; em mulheres diâmetro $\geq 5,0$ cm; crescimento ≥ 1 cm em um ano ou $\geq 0,5$ cm em seis meses, independente do sexo; e aneurismas de íliaca comum com diâmetro ≥ 3 cm, independente do sexo.

4.2.2 Critérios de exclusão

Pacientes com doenças subjacentes (psicose medicamentosa, meningites, acidente vascular encefálico, esclerose múltipla, neoplasias e doenças autoimunes), ou que utilizam medicamentos com possibilidade de interferir na análise dos marcadores em estudo, ou que não concordaram em assinar o TCLE.

4.3 Local do estudo

As dosagens dos MicroRNAs foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP). As coletas de sangue foram realizadas na Unidade de Pesquisa Clínica do HCFMRP-USP.

4.4 Método

4.4.1 Descrição dos dispositivos

Foram utilizadas nove marcas de endopróteses diferentes: AFX™ (n=4), endoprótese que apresenta esqueleto metálico de cromo-cobalto revestido com e-PTFE, fixação anatômica (fixação da bifurcação da endoprótese na bifurcação da aorta); GORE® EXCLUDER® (n=2), endoprótese que apresenta esqueleto metálico de nitinol revestido com e-PTFE, bimodular com fixação proximal passiva (sem farpas ou ganchos de fixação direta à parede da aorta); MEDTRONIC® ENDURANT® (n=18), endoprótese com esqueleto metálico de nitinol revestido com poliéster, bimodular com fixação proximal ativa (com farpas de fixação direta à parede da aorta); APOLLO (n=2), endoprótese que apresenta esqueleto metálico Níquel-Titânio

revestido com E-PTFE, bimodular com fixação proximal ativa; COOK® ZENITH® (n=5) endoprótese com esqueleto de aço inoxidável revestido com poliéster, trimodular com fixação proximal ativa; ANACONDA™ (n=8), endoprótese que apresenta esqueleto de nitinol revestida com poliéster, reposicionável, trimodular com fixação proximal ativa; BRAILE (n=2), endoprótese com esqueleto metálico de nitinol revestido com poliéster, bimodular com fixação proximal ativa (sem farpas de fixação direta à parede da aorta); INCRAFT (n=5), endoprótese com esqueleto metálico de nitinol revestido com poliéster, bimodular com fixação proximal ativa (com farpas de fixação direta à parede da aorta) e Aortic (Inside) (n=1), endoprótese que apresenta esqueleto metálico Níquel-Titanio revestido com E-PTFE, bimodular com fixação proximal ativa.

A variedade de endopróteses utilizadas se justifica pela variabilidade da anatomia de cada aneurisma, sendo selecionada a endoprótese mais adequada para cada caso.

4.4.2 Realização do procedimento e liberação do dispositivo

Os procedimentos foram realizados por equipe treinada em cirurgia endovascular, da Divisão de Cirurgia Vascular e Endovascular do HCFMRP-USP. Os procedimentos foram realizados em centro cirúrgico, utilizando-se arco cirúrgico GE/OEC 9900 ELITE, sob anestesia geral, utilizando-se a via de acesso femoral bilateral para entrega e liberação dos dispositivos. Administrou-se heparina não fracionada (5.000 unidades) no intraoperatório, logo após a colocação do introdutor.

4.4.3 Acompanhamento pós-operatório

Todos os pacientes foram acompanhados no mesmo ambulatório, com retornos agendados para um mês, seis e doze meses (sendo que o paciente teve livre acesso ao ambulatório, se necessário). Nas consultas de retorno, foram submetidos a exame clínico realizado por um dos integrantes da equipe, cirurgião vascular capacitado. Esses pacientes realizaram exames de vigilância (angiografia da aorta total por tomografia computadorizada ou por ressonância nuclear

magnética) em três momentos: um mês, seis e doze meses após o procedimento cirúrgico, objetivando a investigação de *endoleaks* e/ou alterações na morfometria do saco aneurismático.

4.4.4 Colheita do material

Os voluntários da pesquisa preencheram uma ficha de entrevista clínica e assinaram o TCLE, previamente à coleta da amostra de sangue. Após o preenchimento dos critérios de inclusão e exclusão, foram submetidos à coleta de sangue através de veia periférica (30 mL), distribuídos em alíquotas: 1) MMP (Plasma), em tubo com tampa verde, contendo EDTA, o sangue foi centrifugado a 5200 rpm por 10 minutos a 4°C, e separado em tubo *ependorf* (uma alíquota de mais ou menos 1 mL) e congelado a -70°C; e 2) MicroRNAs, em tubo com tampa verde, contendo EDTA, sangue total congelado a -80°C. As amostras ficaram armazenadas até o momento das análises.

4.4.4.1 microRNAs

4.4.4.1.1 Extração de RNA

Para a extração do RNA, as amostras de sangue foram coletadas em tubos BD Vacutainer® com EDTA e centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm, sendo o plasma transferido para um tubo *Eppendorf*® de 2,0 ml. A extração do RNA total das amostras de plasma foi realizada utilizando-se o *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN®), com protocolo adaptado a partir das orientações do fabricante. Em um tubo falcon estéril e livre de RNase de 15 mL, foram adicionados 4 mL de Trizol® LS Reagent® (Invitrogen®, EUA) a 400 µL de plasma. Em seguida, o material foi deixado em repouso por cinco minutos em temperatura ambiente, sendo adicionados 800 µl de clorofórmio (proporção 1:5 da quantidade inicial de Trizol®), agitando-se vigorosamente por 30 segundos. Após deixar o material em repouso por três minutos em temperatura ambiente, centrifugou-se a 4°C por 15 minutos a 12.000 g. Ao final da centrifugação havia um sistema de três fases: incolor=RNA, branco=DNA,

vermelho=proteína. A fase incolor foi transferida para outro tubo falcon de 15 ml, adicionando-se 1,5 vezes o volume obtido da fase incolor de etanol 100%, agitando-se vigorosamente a amostra. Em seguida, foram adicionados 700 µl dessa solução na coluna *RNeasy MinElute Spin*®, centrifugando as amostras por 15 segundos a 8000 g. O líquido resultante foi descartado, sendo repetido o passo anterior com o resto da solução até o final da mesma, sempre descartando o líquido resultante. Posteriormente, foram adicionados 700 µl de *Buffer RWT* do *Kit* em cada coluna, centrifugando novamente a amostra por 15 segundos a 8000 g, sempre descartando o líquido resultante. Na sequência, foram adicionados 500 µl de Tampão RPE (Buffer RPE do Kit) em cada coluna, centrifugando também em rotação >8000 g por 15 segundos, descartando o líquido resultante. Adicionaram-se 500 µl de Tampão RPE (Buffer RPE do Kit) em cada coluna, centrifugando também em rotação >8000 g, desta vez por dois minutos, descartando o líquido resultante. Centrifugou-se com o máximo da centrífuga por um minuto, descartando o líquido resultante. Após a troca do tubo coletor da coluna por um tubo *Eppendorf*® de 1,5 mL, foram adicionados 30 µl de água RNA-free. Centrifugou-se em rotação >8000 g por um minuto. Esse material foi, em seguida, aliquotado, identificado e armazenado a -80°C.

Para a verificação da integridade do RNA obtido das amostras (tecido de corpo cavernoso e plasma dos animais dos grupos experimentais) foi utilizado o equipamento Thermo Scientific NanoDrop® 2000, um espectrofotômetro que fornece a concentração de RNA em uma amostra de 1 a 2 µl. Além da concentração, este aparelho fornece valores de razão referentes à pureza das amostras (razão 260/280).

4.4.4.1.2 Síntese de DNA complementar (cDNA) para miRNA

Foi realizada transcrição reversa utilizando o *kit* comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems). Para a síntese do cDNA do miRNA para cada 5 ng de RNA, foram adicionados 0,75 µl de *RT Buffer*, 0,075 µl de dNTP's, 1,5 µl de *primers* específicos (miRNAs ou controle endógeno) e 0,5 µl da enzima MultiScribe™, 0,094µl de RNase out (1.9U), completando com água DEPC

para um volume final de 7,5 µl. As amostras foram levadas para um termociclador por 30 min a 16°C, 30 min a 42°C, 5 min a 85°C e resfriadas a 4°C, posteriormente foram armazenadas em freezer a -20°C. Antes de utilizar o cDNA sintetizado na reação de PCR em tempo real, o mesmo foi diluído 1:4 em água DEPC.

4.4.4.1.3 RQ-PCR dos microRNAs

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

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

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

As condições padrão de amplificação foram 95°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto (anelamento e extensão simultânea). Os dados foram então exportados para planilhas do *software Excel* para cálculo dos valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Foi estabelecido *threshold* de 0,1 para o

endógeno e também para os miRNAs avaliados e o desvio entre as amostras considerado foi de até 0,5.

4.4.4.1.4 Metaloproteinases e inibidores das metaloproteinases

As amostras de sangue foram colhidas em tubos contendo EDTA como anticoagulante, centrifugadas a 10000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante obtido foi coletado e armazenado a -80°C para a realização dos ensaios. No ensaio, as amostras de plasma foram diluídas 50 vezes para a determinação da MMP-2, 1000 a 2000 vezes para a MMP-9 e 200 vezes para a TIMP-1 e TIMP-2.

4.4.4.1.5 Determinação de MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2

A determinação plasmática de MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 foi realizada por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), conforme instruções dos *kits* de quantificação (DuoSet ELISA - R&D Systems). A etapa final do ensaio foi realizada em um leitor de microplacas VERSAmax (Molecular Devices), os valores de densidade óptica foram lidos a 450 nm e calculados a partir de uma curva padrão de quatro parâmetros (4-PL) com o auxílio do *software* SoftMax Pro v5. Os resultados obtidos foram expressos em ng/mL para a MMP-2 e em pg/mL para MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2.

4.4.5 Morfometria do aneurisma

Foi utilizado o programa Osirix 32-bit para obtenção das medidas do aneurisma, que foram plotadas em diagrama confeccionado previamente. As aferições foram realizadas em quatro momentos (pré-operatório, e um mês, seis e doze meses após o procedimento cirúrgico).

4.5 Análise estatística

As variáveis categóricas foram apresentadas com frequências absolutas e relativas. A associação entre variáveis categóricas foi avaliada com o teste exato de Fisher ou teste da razão de verossimilhança.

O teste de Kolmogorov-Smiornov foi utilizado para avaliar se a distribuição das variáveis quantitativas seguia a distribuição normal. As variáveis foram apresentadas com medianas (percentil 50%) e intervalo interquartilico (percentil 25 e 75%). As variáveis foram comparadas entre grupos com o teste de Mann-Whitney e entre momentos (pré x um mês, pré x seis meses, ou um mês x seis meses) com o teste dos sinais de Wilcoxon. Foram apresentados em gráficos de desenho esquemático (*Boxplot*).

Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Para os cálculos e gráficos foi utilizado o sistema IBM SPSS Statistics for Windows, V. 18.0 (Armonk, NY).

5. Resultados

5.1 Casuística

Foram tratados 47 pacientes com AAA por técnica endovascular. A maioria dos pacientes era do sexo masculino e tabagista. Desses, 10 (21,27%) apresentaram *endoleak* no pós-operatório de seis meses. Todos os procedimentos foram realizados sob anestesia geral, não sendo necessária a exclusão de nenhum desses pacientes. As variáveis relacionadas aos dados demográficos dos pacientes não mostraram significância estatística (Tabela 1).

Tabela 1 - Dados relacionados à demografia e ao aspecto clínico dos pacientes

Variável	Estudo com <i>endoleak</i>	Estudo sem <i>endoleak</i>	P
	n=10	n=37	
Idade (anos), mediana (IIQ)	72 (67 - 79)	70 (66 - 78)	0,754 ^c
Peso(kg), mediana (IIQ)	76 (65 - 92)	75 (67 - 88)	0,677 ^c
Altura(m), mediana (IIQ)	1,72 (1,69 - 1,76)	1,67 (1,64 - 1,73)	0,118 ^c
IMC (kg/m ²), mediana (IIQ)	26 (23 - 30)	27 (24 - 30)	0,856 ^c
Sexo (masculino)	9 (90%)	32 (86,5%)	1,000 ^a
Etnia			0,280 ^b
Branca	10 (100%)	32 (86,5%)	
Parda	0 (0%)	2 (5,4%)	
Negra	0 (0%)	3 (8,1%)	
Tabagismo (cigarros/dia), mediana (IIQ)	20 (5 - 40)	20 (10 - 20)	0,663 ^c
Angulação do Colo			0,630 ^a
<60°	8 (80%)	32 (86,5%)	
>60°	2 (20%)	5 (13,5%)	
Marcas Endoprotese			0,262 ^b
AFX	0 (0%)	4 (10,8%)	
Anaconda	2 (20%)	6 (16,2%)	
Aortic	1(10%)	0	
Apollo	1(10%)	1 (2,7%)	
Braile	1 (10%)	1 (2,7%)	
Cook	0 (0%)	5 (13,5%)	
Gore	0 (0%)	2 (5,4%)	
Incraft	1 (10%)	4 (10,8%)	
Medtronic	4 (40%)	14 (37,8%)	
Tipo revestimento			0,664 ^a
e-PTFE	2 (20,0%)	8 (21,6%)	
Poliéster	8 (80,0%)	29 (78,4%)	

continua

conclusão

Variável	Estudo com <i>endoleak</i>	Estudo sem <i>endoleak</i>	P
	n=10	n=37	
Volume de contraste(mL)*	145 (115 - 200)	120 (100 - 150)	0,233 ^c
Radiação (tempo escopia/seg)*	1702 (1409 - 2030)	1569 (1261 - 2194)	0,649 ^c
Radiação (dose acumulada/mgy)*	368 (244 - 445)	337 (232 - 429)	0,687 ^c
Tempo Cirurgia(min)*	120 (110 - 148)	123 (106 - 173)	0,696 ^c
Diâmetro colo Proximal(cm)*	2,55 (2,33 - 2,73)	2,30 (2,10 - 2,50)	0,047 ^c
Diâmetro maximo colo distal direita (cm)*	1,45 (1,15 - 1,53)	1,30 (1,13 - 1,50)	0,462 ^c
Diametro maximo colo distal esquerda (cm)*	1,20 (1,20 - 1,43)	1,30 (1,00 - 1,50)	0,844 ^c
Comp colo proximal (cm)*	2,65 (2,08 - 3)	2,90 (2,03 - 3,90)	0,593 ^c
diametro do trombo no AAA*	0 (0 - 22)	0 (0 - 30)	0,298 ^c
Oversize colo proximal (%)*	20 (14 - 20)	20 (15 - 20)	0,829 ^c
Oversize colo distal Direito (%)*	18 (10 - 20)	20 (20 - 20)	0,044 ^c
Oversize colo distal esquerdo (%)*	18 (10 - 20)	20 (20 - 20)	0,044 ^c
Número Artérias Lombares*	4 (3 - 5)	4 (2 - 5)	0,635 ^c
Diâmetro A, Lombar(cm)*	0,25 (0,20 - 0,30)	0,20 (0,20 - 0,30)	0,853 ^c
Diametro AML (cm)*	0,3 (0 - 0,3)	0,2 (0 - 0,3)	0,540 ^c
Trombose (%)			0,875 ^b
0	7 (70%)	28 (77,8%)	
25-50	2 (20%)	5 (13,9%)	
>50	1 (10%)	3 (8,3%)	
Perda de Sangue(mL)*	270 (190 - 313)	290 (200 - 358)	0,686 ^c
Endoleak (6 meses)	9 (90%)	0 (0%)	<0,001 ^a
tipo			
IA	1 (10,0%)	0 (0%)	
IB	1 (10,0%)	0 (0%)	
IIA	5 (50,0%)	0 (0%)	
IIB	3 (30,0%)	0 (0%)	

*Mediana (intervalo interquartilico) **a**: teste exato de Fisher; **b**: teste da razão de verossimilhança, **c**: teste de Mann-Whitney. **IIQ**: intervalo interquartilico.

5.2 PCR qualitativo de miRNA plasmático no pré-operatório e após seis meses de pós-operatório

Os miR-21 e miR-181-b em pacientes com AAA, antes do tratamento endovascular, se mostraram elevados comparados ao grupo controle, respectivamente, 2,76x e 3,86x ($p < 0,05$). Além disso, apresentaram redução de sua expressão após seis meses de pós-operatório (Tabela 2; Gráficos 1 e 2).

Tabela 2 - PCR qualitativo plasmático miRNA do grupo controle, pré-operatório e após seis meses de pós operatório

Variável	Controle (n=10)	Estudo (pré) (n=47)	Estudo (seis meses) (n=47)	P ₁	P ₂	P ₃
Micro RNA 21	1,50 (0,29 - 3,62)	4,15 (1,36 - 13,66)	3,80 (1,23 - 16,21)	0,034	0,049	0,049
Micro RNA 181	1,45 (0,96 - 2,77)	5,60 (1,20 - 20,09)	3,83 (1,95 - 6,15)	0,025	0,010	0,010

P₁ [comparação Controle x Estudo (pré)]: teste de Mann-Whitney; P₂ [comparação Controle x Estudo (seis meses)]: teste de Mann-Whitney; P₃ [comparação Estudo (pré) x Estudo (seis meses)]: teste dos sinais de Wilcoxon. IIQ: intervalo interquartílico.

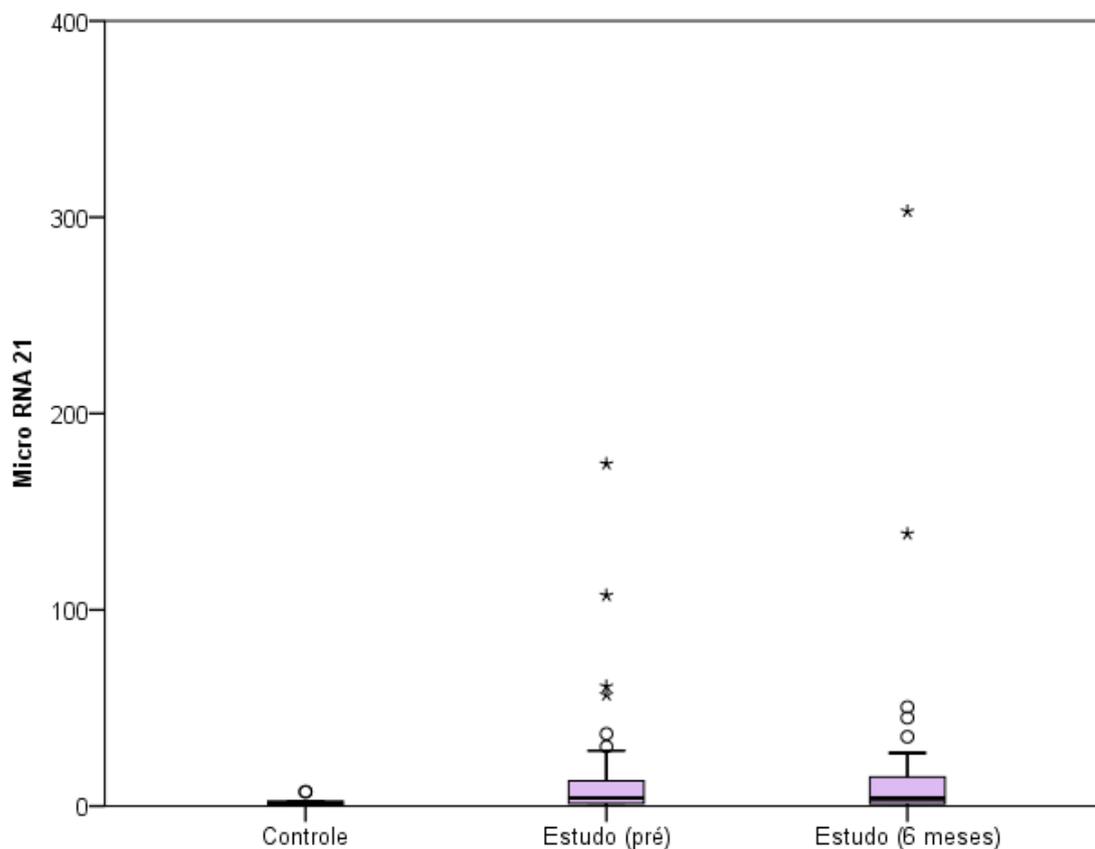
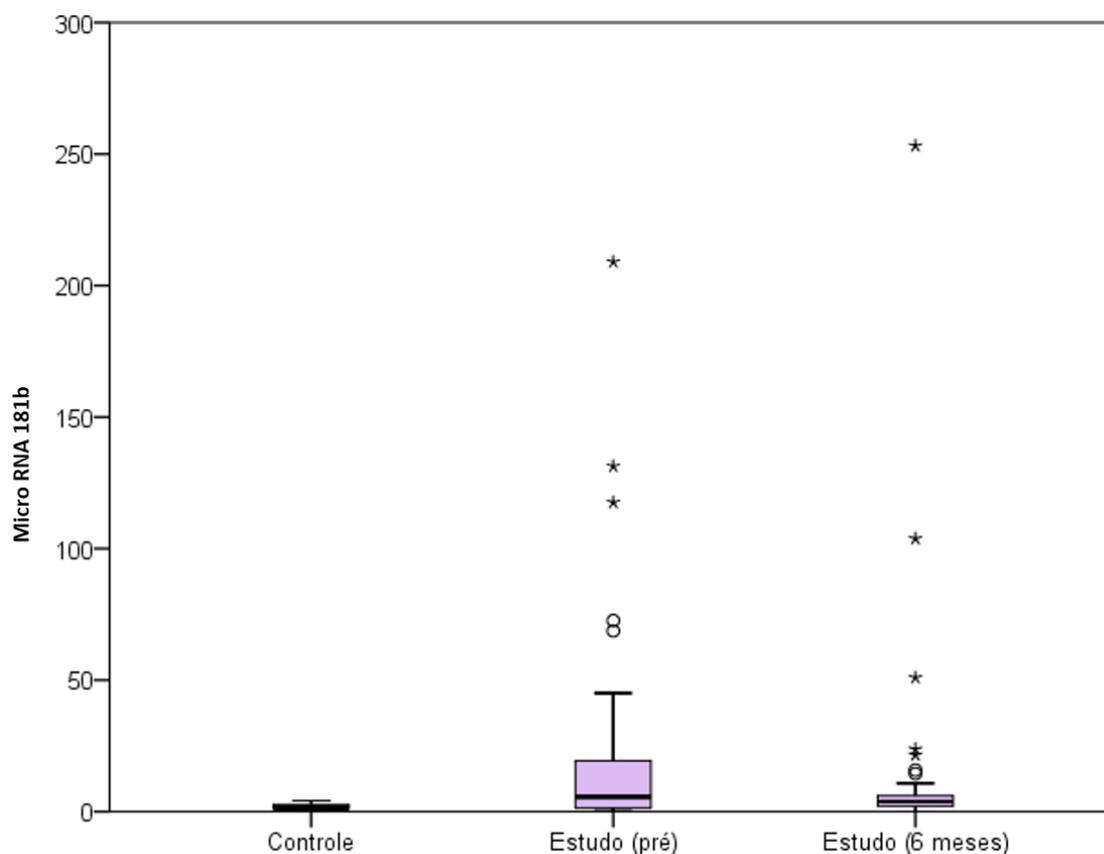
Gráfico 1 - Desenho esquemático (*boxplot*) de micro RNA 21, segundo os grupos controle e estudo (momentos pré e seis meses).

Gráfico 2 - Desenho esquemático (*boxplot*) de micro RNA 181-b, segundo os grupos controle e estudo (momentos pré e seis meses).



5.3 Análise de MMP plasmático no pré-operatório e após seis meses de pós-operatório

As MMP-2 e MMP-9 apresentaram elevação de sua expressão após seis meses de pós-operatório (Tabela 3; Gráficos 3 e 4).

Tabela 3 - Nível plasmático MMPs grupo controle, pré-operatório e após seis meses de pós-operatório

Variável	Controle (n=10)	Estudo (pré) (n=47)	Estudo (seis meses) (n=47)	P ₁	P ₂	P ₃
Mediana (IIQ)						
MMP-2(ng/ml)	374 (331 - 411)	366 (323 - 433)	436 (393 - 504)	0,867	0,003	0,003
MMP-9(pg/ml)	1806842 (1519842 - 2576244)	2764326 (1650344 - 4306912)	3320696 (1493512 - 5098956)	0,102	0,126	0,126

P₁ [comparação Controle x Estudo (pré)]: teste de Mann-Whitney; P₂ [comparação Controle x Estudo (seis meses)]: teste de Mann-Whitney; P₃ [comparação Estudo (pré) x Estudo (seis meses)]: teste dos sinais de Wilcoxon. IIQ: intervalo interquartilico; ng/ml: nanograma por ml; pg: picograma por ml

Gráfico 3 - Desenho esquemático (*boxplot*) de MMP-2, segundo os grupos controle e estudo (momentos pré e seis meses)

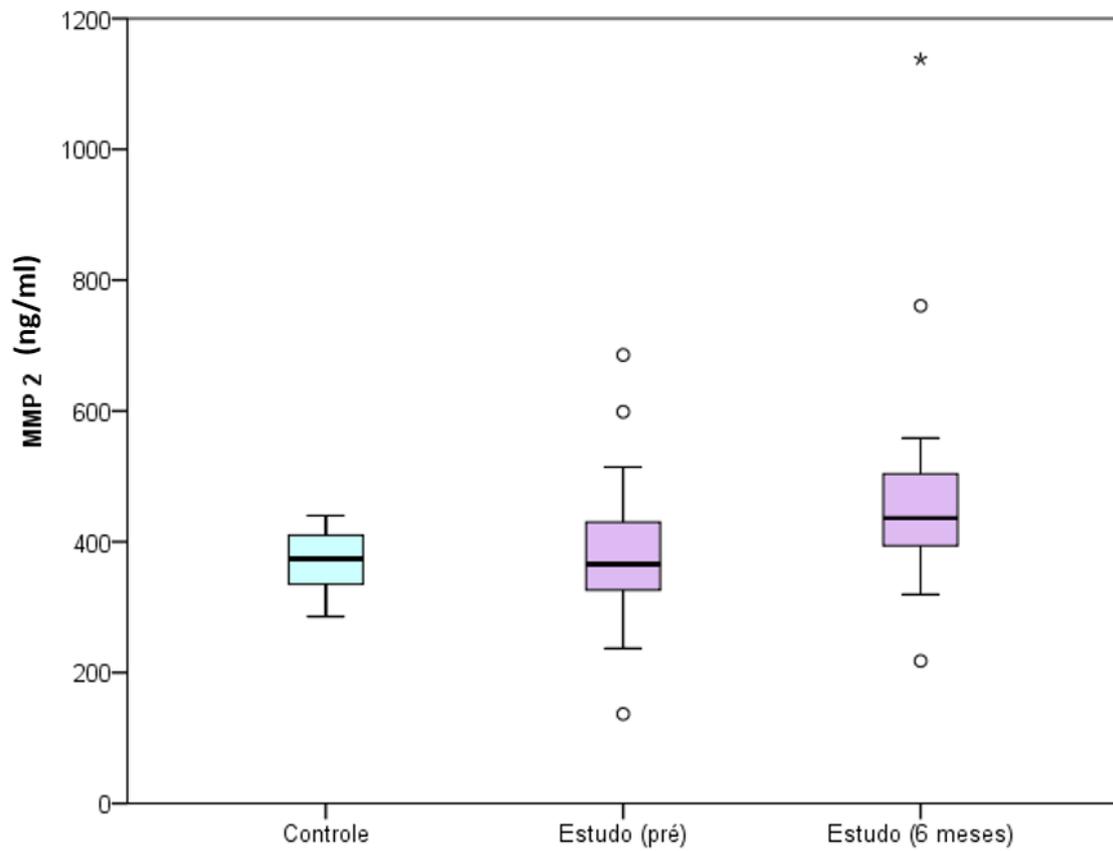
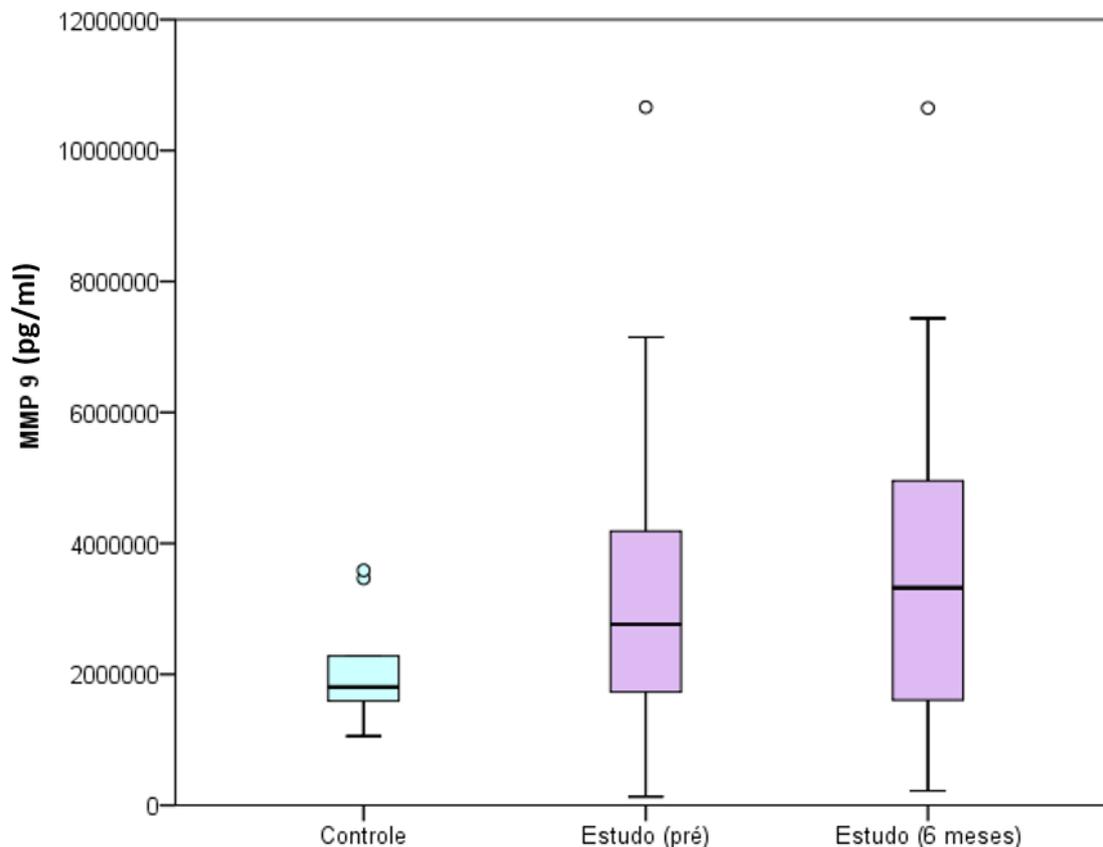


Gráfico 4 - Desenho esquemático (*boxplot*) de MMP-9, segundo os grupos controle e estudo (momentos pré e seis meses)



5.4 Análise de TIMP's plasmático no pré-operatório e após 6 meses de pós-operatório

Os TIMPS-1 e TIMPS-2 apresentaram elevação de sua expressão após seis meses de pós-operatório (Tabela 4; Gráficos 4 e 5).

Tabela 4 - Nível plasmático TIMPs grupo controle, pré-operatório e após seis meses de pós-operatório

Variável	Controle (n=10)	Estudo (pré) (n=47)	Estudo (seis meses) (n=47)	P ₁	P ₂	P ₃
Mediana (IIQ)						
TIMP-1 (pg/ml)	132357 (99515 - 152834)	150318 (134823 - 197189)	189566 (139233 - 233892)	0,054	0,014	0,014
TIMP-2 (pg/ml)	92693 (83047 - 107185)	102676 (89406 - 117338)	117375 (102095 - 133995)	0,224	0,002	0,002

P₁ [comparação Controle x Estudo (pré)]: teste de Mann-Whitney; P₂ [comparação Controle x Estudo (seis meses)]: teste de Mann-Whitney; P₃ [comparação Estudo (pré) x Estudo (seis meses)]: teste dos sinais de Wilcoxon. IIQ: intervalo interquartilico; pg:picograma por ml.

Gráfico 5 - Desenho esquemático (*boxplot*) de TIMP-1, segundo os grupos controle e estudo (momentos pré e seis meses).

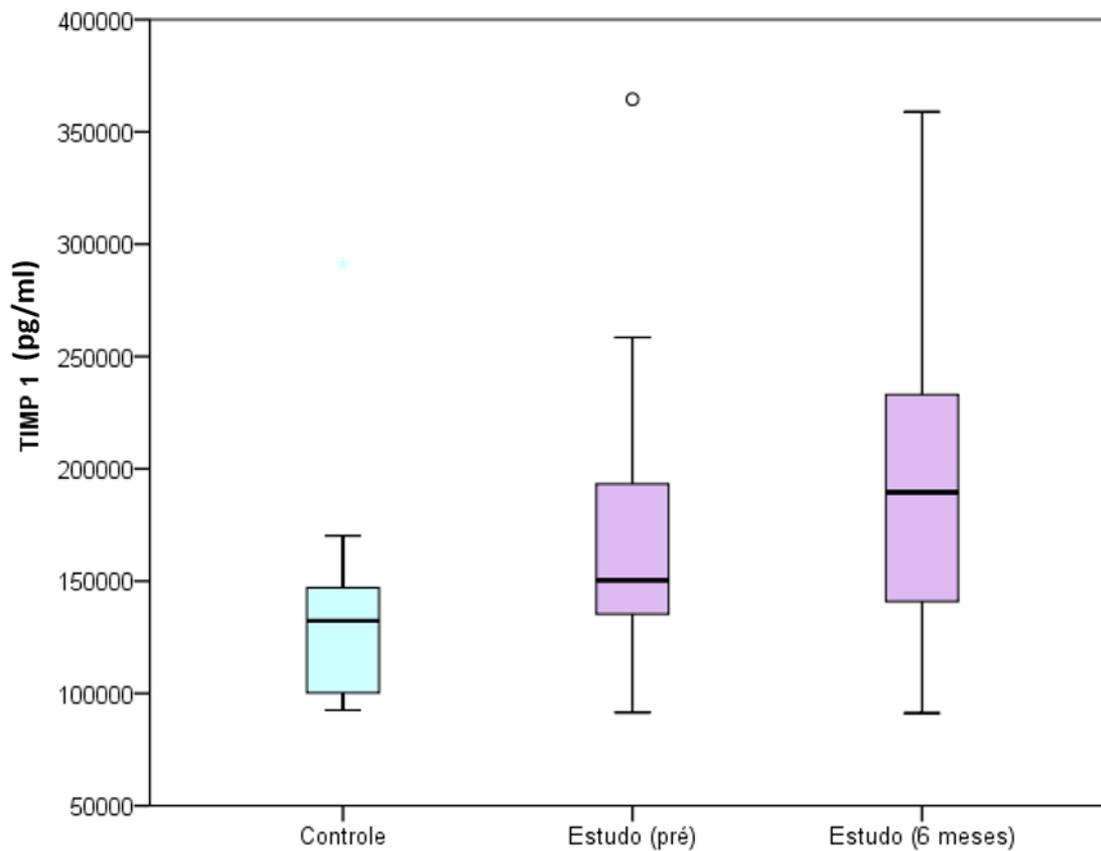
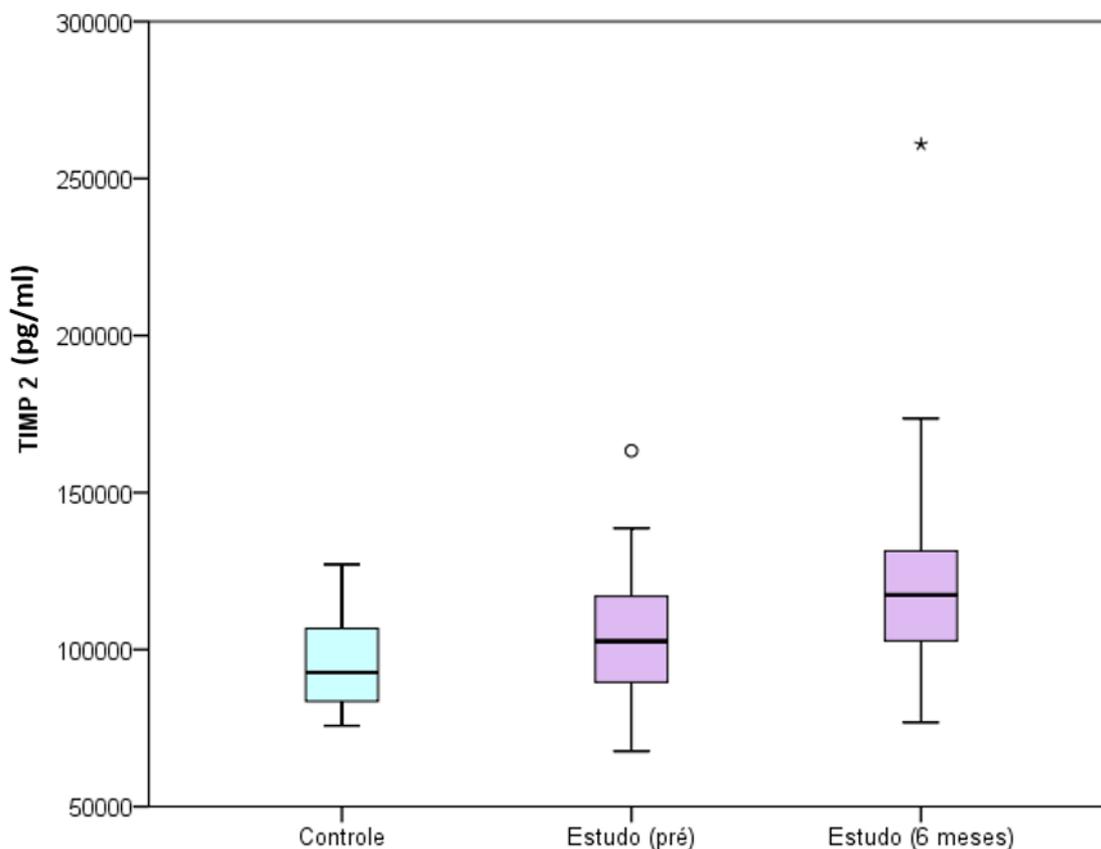


Gráfico 6 - Desenho esquemático (*boxplot*) de TIMP-2, segundo os grupos controle e estudo (momentos pré e seis meses)



5.5 Análise de microRNA, MMP e TIMP plasmático nos grupos com e sem *endoleak* pré-operatório e seis meses de pós-operatório

Os microRNA-21, microRNA-181-b, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 não apresentaram alteração significativa das suas expressões após seis meses de pós-operatório (Tabela 5).

Tabela 5 - Análise de microRNAs, MMPs e TIMPs nos grupos com e sem *endoleak* pré-operatório e após seis meses de pós-operatório

Variável Mediana (IIQ)	Estudo com <i>endoleak</i>	Estudo sem <i>endoleak</i>	P ^c
	n=10	n=37	
Micro RNA 21			
Pré	8,29 (1,12 - 19,88)	4,12 (1,05 - 12,73)	0,621
6 meses	4,88 (0,53 - 18,7)	3,59 (1,30 - 12,68)	0,835
p (pré x seis meses)***	0,799	0,792	
Micro RNA 181b			
Pré	3,06 (0,81 - 29,99)	6,76 (1,27 - 19,71)	0,697
6 meses	4,40 (1,31 - 9,19)	3,67 (1,96 - 5,77)	0,917
p (pré x 6 meses)***	0,445	0,294	
MMP-2 (ng/ml)			
Pré	341 (286 - 411)	366 (340 - 433)	0,132
seis meses	438 (347 - 505)	434 (396 - 505)	0,435
p (pré x seis meses)***	0,022	<0,001	
MMP-9 (pg/ml)			
Pré	3284647 (1108374 - 4818180)	2749133 (1969572 - 4247284)	0,938
seis meses	2826677 (1659062 - 3378612)	3336122 (1474335 - 5276627)	0,483
p (pré x seis meses) ***	0,386	0,464	
TIMP-1 (pg/ml)			
Pré	134315 (127503 - 148103)	165198 (139697 - 207404)	0,024
seis meses	174615 (123545 - 216289)	191211 (145643 - 236588)	0,323
p (pré x seis meses) ***	0,028	0,017	
TIMP-2 (pg/ml)			
Pré	95518 (81942 - 113607)	103098 (90468 - 118358)	0,232
seis meses	115890 (89781 - 129095)	118564 (102457 - 134638)	0,377
p (pré x seis meses) ***	0,017	<0,001	
Diâmetro (cm)			
Pré	6,2 (5,7 - 7,0)	5,8 (5,5 - 6,6)	0,297
um mês	5,9 (5,4 - 7,1)	5,6 (5,2 - 6,4)	0,226
seis meses	5,9 (5,4 - 6,8)	5,3 (4,9 - 6,1)	0,048
p (pré x 1 mês) ***	0,127	0,091	
p (pré x seis meses) ***	0,001	<0,001	
p (um mês x seis meses) ***	1,000	0,001	

***Testes dos sinais de Wilcoxon. IIQ: intervalo interquartilico.

6. *Discussão*

A literatura existente sobre miRNAs e AAA ainda é muito escassa, e a importância biológica não é clara. Os miRNAs podem mediar a repressão translacional e degradação, bem como estimular a expressão do gene por ligação ao RNAm alvo, e cada miRNA pode regular centenas de alvos, sugerindo que eles podem desempenhar papel importante na maioria das vias de sinalização biológicas.¹⁴⁶ Os miRNAs representam uma nova camada de regulação precisa para a expressão de sequências específicas de genes. A importância das vias reguladoras miRNAs também é reforçada por uma impressionante lista de doenças que se verificou estar associada à expressão miRNA anormal. Há evidências que muitas doenças relacionadas com a idade, inclusive AAA, estão associadas ao controle diminuído da sinalização celular, reparação do DNA, respostas ao estresse oxidativo e apoptose.¹⁴⁷ Assim, o conhecimento de que miRNAs estão envolvidos em doenças poderia oferecer *insights* detalhados sobre os mecanismos e, por sua vez, ser utilizado como biomarcadores ou alvos terapêuticos.

Em relação aos pacientes portadores de AAA, duas questões de importância clínica se impõem: o seguimento de pacientes submetidos a EVAR para o diagnóstico de *endoleaks* e qual seria a melhor propedêutica para os pequenos aneurismas de aorta. Até o momento, o diagnóstico dos *endoleaks* após EVAR depende, quase que exclusivamente, de exames de tomografia computadorizada durante o acompanhamento; e de avaliação angiográfica adicional para *endoleaks* considerados relevantes, com custos de gestão clínica adicionais e potencial risco de lesão renal contraste-induzida.^{148,149}

A taxa de *endoleak* varia de 0% a 47%, dependendo do tipo de enxerto de *stent*, seleção do paciente, técnica de implantação e morfologia aórtica.¹⁴⁹⁻¹⁵² No presente estudo, a taxa de *endoleak* foi de 21,27% em seis meses (um paciente com *endoleak* IA, cinco pacientes com *endoleak* IIA, três com *endoleak* IIB e um paciente com *endoleak* IB). A presença de *endoleak* pode estar associada com expansão adicional do aneurisma, que, por sua vez, pode resultar em ruptura.¹⁵³ Por isso, é necessário o seguimento dos pacientes submetidos a EVAR para o diagnóstico de *endoleaks* por exames tomográficos seriados, com aumento significativo dos custos do processo total. Além disso, a importância biológica dos *endoleaks* ainda não é

conhecida; e a tomografia computadorizada, em algumas situações, não auxilia na tomada de decisão clínica, o que exige tratamento adicional.¹⁵²

Por outro lado, esforços para limitar a taxa de mortalidade por ruptura de AAA dependem da detecção precoce e reparação eletiva. A indicação para o reparo eletivo é baseada principalmente no diâmetro máximo do AAA acima de 5,5 cm.^{154,155} Por conseguinte, o benefício do diagnóstico precoce por rastreamento de ultrassonografias abdominais é limitado porque a maioria dos AAA é demasiadamente pequena para intervenção no momento do diagnóstico. Atualmente, não há nenhum tratamento médico estabelecido para os pequenos AAA, no entanto, eles podem romper ocasionalmente. Se fosse possível prever quais AAA pequenos terão maior probabilidade de exigir intervenção posterior, talvez essa intervenção pudesse ser oferecida mais precocemente, com menos morbidade e mortalidade, pois a idade é um dos principais fatores de risco e as rupturas fatais durante a vigilância poderiam ser limitadas.¹⁵⁶ No entanto, dois grandes ensaios randomizados mostraram uma estratégia de reparação precoce AAA ser ineficiente.^{118,120} Consequentemente, é desejável um modelo de risco mais apurado, a fim de se determinarem quais biomarcadores circulantes podem contribuir com informações.

No presente estudo, os miR-21 e miR-181-b foram identificados no sangue total de pacientes sem aneurismas, com AAA e com *endoleak*. Houve aumento significativo de suas expressões antes do tratamento endovascular quando comparadas ao grupo controle. Quando comparadas ao grupo estudo e após seis meses de tratamento endovascular apresentaram redução de suas expressões com resultado estatisticamente significativo. Adicionalmente, as expressões dos miR-21 e miR-181-b não demonstraram correlação com anatomia, diâmetro do aneurisma ou com os diversos tipos de dispositivos utilizados para o tratamento endovascular dos AAA. Em relação às demais características clínicas e demográficas, não foram observadas diferenças entre os diversos fatores de risco cardiovascular.

Maegdefessel et al.¹³ analisaram amostras aórticas humanas de pacientes com AAA submetidos a reparo cirúrgico de uma aorta abdominal aumentada e identificaram expressão aumentada de miR-21 e diminuição da expressão de PTEN no aneurisma, o que corrobora o achado do presente estudo. O miR-21 é um dos

miRNAs mais comumente e acentuadamente regulados em várias doenças cardiovasculares, bem como em muitos cânceres e possui vários alvos validados, incluindo fosfatase e homólogo de tensina (PTEN), Sprouty-1 (SPRY1), morte celular programada 4 (PDCD4), linfoma de células B 2 (BCL2) e inibição dos macrófagos, o que poderia, potencialmente, vinculá-lo à patologia do aneurisma.^{157,158,159}

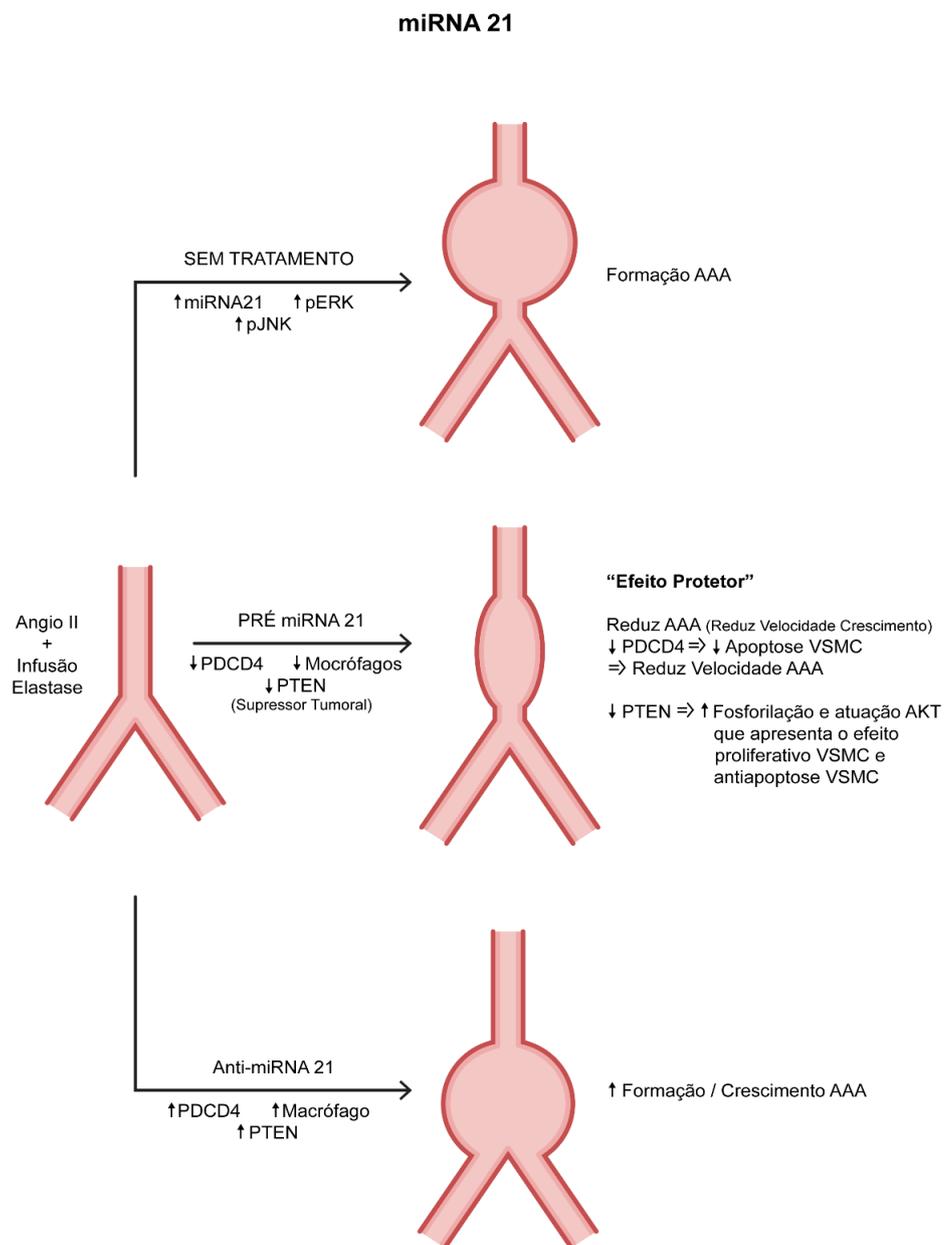
Estudo realizado em murinos por Maegdefessel et al.¹³ sugere que a regulação positiva do miR-21 é uma resposta fisiológica à expansão aórtica. Essa resposta protetora pode ser aumentada quando estímulos deletérios como a nicotina estão presentes. Embora essa via endógena possa ser insuficiente para anular a expansão aórtica, porém pode ser potencial alvo terapêutico.¹⁵⁷

A modulação do miR-21 na doença de AAA, segue um padrão comum em doenças cardiovasculares, como resposta fisiológica protetora.¹⁵⁹ Por exemplo, os peptídeos natriuréticos (como o peptídeo natriurético cerebral) são liberados do ventrículo esquerdo do coração quando ocorrem altas pressões de enchimento. Seu principal objetivo é inibir a sobrecarga de volume e preservar a função cardíaca. O desenvolvimento de AAA leva ao aumento da expressão de miR-21 e diminuição da expressão de PTEN, resultando em resposta pró-proliferativa e antiapoptótica de células musculares lisas dentro da parede do vaso, provavelmente na tentativa de proteger a aorta de expansão adicional e ruptura final.^{13,157,160}

A inibição da via de sinalização PTEN/PI3K/AKT pelo miR-21 para limitar a expansão do AAA, um mecanismo que ficou, particularmente, evidente quando o miR-21 foi superexpresso por meio do tratamento com pré-miR21. Além disso, os efeitos pró-proliferativos do PTEN regulado negativamente foram diminuídos pelo tratamento com anti-21, bloqueando a regulação positiva do miR-21 e levando à aceleração acentuada do desenvolvimento de AAA e até mesmo ruptura em animais suplementados com nicotina. Estudos anteriores indicaram que após a fase inicial de recrutamento e ativação de células inflamatórias no modelo de AAA infundido com elastase (até sete dias após a infusão), a estabilização da integridade vascular tornou-se o fator mais importante na limitação da expansão do aneurisma (entre os dias 7 e 14). O papel crítico da apoptose e depleção de células musculares lisas em tecidos aneurismáticos humanos compromete a estrutura da parede vascular, reduzindo a população de células capazes de reparar o tecido conjuntivo e a

estabilização da parede o vaso. Portanto, a proliferação de células musculares lisas e a apoptose são altamente afetadas pela expressão alterada de miR-21^{13,157} (Figura 5).

Figura 5 - Expressão miRNA-21 e progressão do aneurisma da aorta



Estudos *in vitro* também identificaram o fator de transcrição NF-κB como um regulador positivo crucial da expressão de miR-21 em células vasculares. Nicotina, IL-6 e angiotensina II foram capazes de induzir miR-21 por meio da regulação positiva de NF-κB. Embora a inibição de NF-κB utilizando siRNAs contra suas subunidades ou direcionamento direto de drogas esteja bem estabelecida *in vitro*, esta permanece impraticável para abordagens tradicionais em humanos devido à grande variedade de funções de NF-κB e aos muitos processos celulares nos quais essa transcrição está envolvida. Embora isso também seja um problema com os miRNAs, a modulação do miR-21 parece ser uma abordagem mais viável para equilibrar os mecanismos determinantes da doença, como proliferação e apoptose na parede da aorta.^{13,157}

Na presente casuística, a intervenção resultou em diminuição da expressão do miR-21 estudado após seis meses de pós-operatório, sugerindo que a exclusão do saco aneurismático altera a expressão do miRNA, embora quando comparado entre os pacientes que apresentaram *endoleak* não houve diferença estatística. Diante da cascata de reações referente ao miR-21, balões expansíveis ou endopróteses com eluição de drogas contendo pré-21 miRNAs poderiam surgir como ferramenta promissora para desencadear a proliferação na parede da aorta em pacientes humanos com doença de AAA.

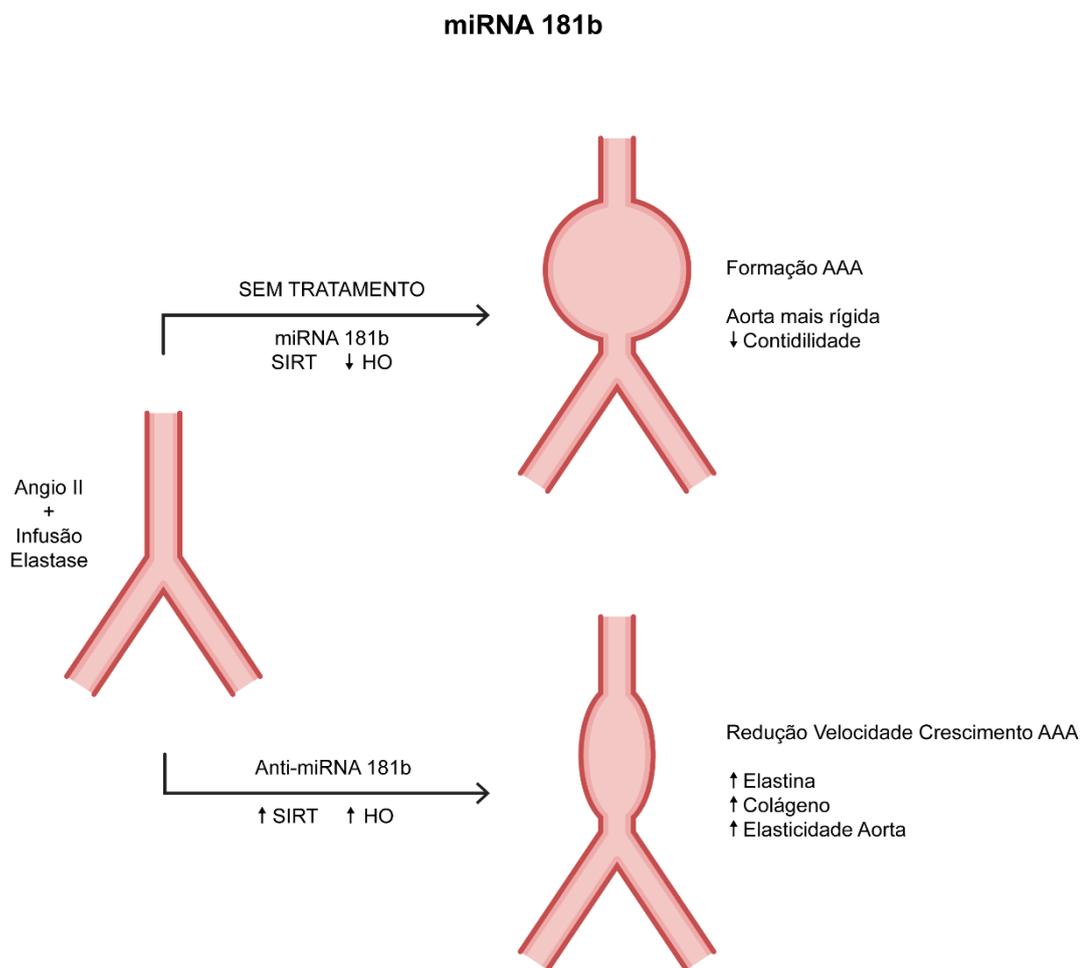
O MiR-181b é um membro da família miR-181. Está envolvido na diferenciação de células musculares lisas aumentando genes marcadores sintéticos e diminuindo genes relacionados à contratilidade. A perda do fenótipo contrátil dos VSMCs é um evento precoce na patologia do AAA.⁹⁹ O acúmulo de macrófagos, o aumento da atividade proteolítica e a perda de proteínas da matriz são considerados eventos cruciais durante a progressão e ruptura de placas ateroscleróticas e aneurismas.⁹⁸

Di Gregoli et al.⁹⁸ demonstraram, pela primeira vez, que o miR-181b exacerba esses processos e, conseqüentemente, promove doenças cardiovasculares inflamatórias. Os autores revelaram também que o miR-181b é superexpresso em tecidos de AAA em humanos, corroborando os dados encontrados no presente estudo em pacientes aneurismáticos. A regulação negativa da expressão de miR-181b pela entrega sistêmica de antimiR-181b em camundongos ApoE^{-/-} e Ldlr^{-/-},

infundidos com AngII, revelou que o anti-miR-181b suprime significativamente a formação de AAA, aumenta a expressão de elastina e colágeno, facilita respostas fibróticas e mantém a estabilidade do aneurisma.

O miR-181-b tem como principais alvos a Sirtuína 1 (SIRT1), heme oxigenase-1 (HO-1), importina- α 3 (IPOA3). A SIRT1 é uma histona desacetilase de classe III, altamente expressa na célula muscular lisa, e desempenha importante papel em muitas doenças vasculares. A heme oxigenase-1 (HO-1) é uma enzima isoforma altamente induzível que catalisa a degradação do heme em monóxido de carbono, biliverdina e ferro.⁹⁹

A angiotensina II eleva acentuadamente a expressão de miR-181b, mas reduz a expressão de SIRT1 e HO-1 em pesquisas com murinos. A expressão e atividade de SIRT1 são notavelmente reduzidas em tecidos humanos aneurismáticos comparados a segmentos saudáveis. A ablação de SIRT1 agrava a formação de AAA estimulada por AngII e alterações patológicas relacionadas, mas a superexpressão específica de SIRT1 na camada células musculares lisas inibe essas alterações.⁹⁹ A SIRT1 protege contra a remodelação vascular induzida por AngII, rigidez aórtica induzida por dieta e aterosclerose.¹⁶¹ Esses resultados sugerem que SIRT1 em VSMCs atua como alvo terapêutico para prevenir a formação de AAA⁹⁹ (Figura 6).

Figura 6 - Expressão miRNA-181b e progressão do aneurisma da aorta

Di Gregoli et al.⁹⁸ demonstraram que a inibição do miR-181b promove um fenótipo de placa estável ao restaurar a expressão de TIMP-3 em macrófagos, que estabiliza o AAA proporcionando o acúmulo de colágeno. A inibição do miR-181b também aumenta diretamente a deposição de elastina. Este duplo papel benéfico da inibição do miR-181b fornece evidências substanciais para esta abordagem como terapêutica para doenças cardiovasculares relacionadas à aterosclerose, incluindo aneurismas.

O miR-181-b modula a inflamação vascular visando a IPOA3, uma proteína necessária para a translocação nuclear do NF- κ B. A superexpressão de miR-181b inibiu a expressão de IPOA3 e baixou a expressão do gene responsivo a NF- κ B (VCAM-1 e E-selectina) no endotélio celular. Essas descobertas indicaram que o

miR-181b inibe a inflamação mediada por NF- κ B por meio da redução da expressão de IPOA3.¹⁶²

Neste estudo, a intervenção resultou em diminuição estatisticamente significativa da expressão do miR-181-b avaliado após seis meses de pós-operatório, sugerindo que a exclusão do saco aneurismático altera a expressão do miRNA, embora quando comparado entre os pacientes que apresentaram *endoleak* não se observou diferença estatística. Diante da cascata de reações, o efeito de uma droga anti-miR-181 reduz as expressões SIRT1 e HO-1, promovendo maior elasticidade e menor rigidez à parede celular, o que poderia surgir como ferramenta promissora para pacientes com fatores de risco para aterosclerose e aneurismas.

A MMP-2 degrada a elastina e é expressa, constitutivamente, em células musculares lisas, fibroblastos e macrófagos na camada média e adventícia e a Angiotensina II e CaCl₂ aumentam a atividade de MMP-2 na aorta abdominal e torácica promovendo apoptose, inflamação e aumento da rigidez da parede aórtica.^{40,71} A MMP-9 é produzida constitutivamente por fibroblastos e células musculares lisas e pela infiltração de macrófagos adventícios durante a formação de AAA. O mRNA de MMP-9 e a expressão da proteína na parede aórtica e os níveis plasmáticos de MMP-9 são significativamente maiores em pacientes com AAA.⁴⁰

Dilmé et al.¹⁶³ relataram que quando os pacientes foram estratificados de acordo com o diâmetro máximo do AAA, os níveis dos dois transcritos de MMPs apresentaram padrões diferentes. Enquanto os níveis de MMP-2 foram semelhantes em todos os grupos estratificados por diâmetro, o MMP-9 apresentou expressão máxima no grupo de moderado diâmetro (55 e 69.9 mm). Semelhantemente, Freestone et al.⁷⁹, em uma combinação de zimografia e imunotransferência identificaram a MMP-2 como a principal em pequenos aneurismas, enquanto a zimografia indicou aumento da atividade da MMP-9 em grandes aneurismas. Por outro lado, Lorelli et al.¹⁴⁴ ratificaram que a MMP-9 estavam elevados no tecido aneurismático da aorta e no plasma e levantaram a hipótese de que os níveis plasmáticos de MMP-9 poderiam diminuir significativamente após EVAR em até três meses, mas que permaneceriam elevados em pacientes com *endoleaks*.¹⁴⁴ Sangiorgi et al.¹⁴³ encontraram diminuição contínua, tanto da MMP-9 quanto da MMP-3, após a exclusão bem-sucedida do AAA em até seis meses de

acompanhamento. Além disso, o aumento nos níveis de MMP após EVAR representa marcador confiável de exclusão ineficaz de aneurisma.¹⁴³

Em uma meta-análise, os autores identificaram associação positiva significativa na concentração plasmática de MMP-9 com *endoleak*.⁷ Esses achados são contraditórios, de acordo com Moxon et al.¹⁶⁴, que não observaram nenhuma relação entre o diagnóstico ou tipo de *endoleak* e a concentração circulante de MMP-9. Na presente casuística, não houve diferença entre as atividades de MMP-2 e MMP-9 após seis meses de pós-operatório entre pacientes com e sem *endoleak* nesse período; mas houve aumento das MMP-2 e MMP-9 antes e após o tratamento endovascular. As razões para esta discrepância podem, em parte, estar relacionadas a diferenças nas populações estudadas ou manuseio diferente de amostras de sangue, avaliação dos métodos e permanência do tecido aneurismático.

In vivo, as MMPs são inibidas por TIMPs, dos quais quatro tipos diferentes foram identificados: TIMP-1, sintetizado pela maioria dos tipos de células do tecido conjuntivo, bem como macrófagos, que atuam contra a maioria dos membros da colagenase, estromelisina e gelatinase classes de MMPs. A superexpressão de TIMP-1 reduziu lesões ateroscleróticas em ApoE/camundongos e preveniram degeneração e ruptura da lâmina elástica em rato modelo, substanciando, ainda mais, o papel funcional das MMPs. Além disso, em modelos animais, a superexpressão de TIMP-1 impediu a formação e ruptura de aneurismas aórticos e a interrupção do gene direcionado de MMP-9 e suprimiu o desenvolvimento de AAA experimentais.^{84,87} No presente estudo não se observou diferença entre as atividades de TIMP-1 após seis meses de pós-operatório entre pacientes com e sem *endoleak* nesse período. Mas no grupo com e sem *endoleak* houve aumento de TIMP's estatisticamente significativo. As razões para esta discrepância podem, em parte, estar relacionadas a diferenças nas populações estudadas, permanência da parede aórtica na técnica endovascular ou manuseio diferente de amostras de sangue, avaliação dos métodos e permanência do tecido aneurismático.

A remodelação da parede aórtica em AAA envolve ativação gênica de amplo espectro de enzimas proteolíticas, enquanto que a expressão de inibidor fisiológico, TIMP-2, é significativamente menor em AAA. Os TIMP-2 são diminuídos em AAA em

comparação à doença aterosclerótica e pode-se suspeitar que o equilíbrio funcional de proteólise/antiproteólise esteja alterado em AAA. Ainda mais, TIMP-2 em baixa concentração participa em associação com MMP-14 para a ativação de MMP-2, promovendo ação proteolítica e, conseqüentemente, desenvolvimento de AAA.¹⁶⁵ Neste estudo não houve diferença entre as atividades de TIMP-2 após seis meses de pós-operatório entre pacientes com e sem *endoleak* nesse período. Mas no grupo com e sem *endoleak* houve aumento de TIMP's estatisticamente significativo. As razões para esta discrepância podem, em parte, estar relacionadas a diferenças nas populações estudadas, permanência da parede aórtica na técnica endovascular ou manuseio diferente de amostras de sangue, avaliação dos métodos e permanência do tecido aneurismático.

7. Conclusões

A avaliação da expressão dos níveis plasmáticos de miR-21, miR-181-b, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 em pacientes com AAA antes e após o tratamento endovascular demonstrou que:

- Houve hiperexpressão dos miR-21, miR-181-b, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 no sangue total de pacientes com AAA.
- Houve diminuição das expressões dos miR-21 e miR-181-b após tratamento endovascular dos AAA.
- Houve aumento das expressões dos MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 após tratamento endovascular dos AAA.
- Os Diferentes tipos de materiais de endoprótese não influenciaram na expressão dos miR-21, miR-181-b, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2.
- Os níveis plasmáticos dos miR-21, miR-181-b, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 não apresentaram correlação com a variação dos diâmetros dos aneurismas.
- Os níveis plasmáticos dos miR-21, miR-181-b, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 não apresentaram correlação com *endoleaks*.

8. Referências Bibliográficas¹

¹Elaboradas de acordo com as Diretrizes para Apresentação de Dissertações e Teses da USP: Documento Eletrônico e Impresso - Parte IV (Vancouver) 3ª ed. São Paulo: SIBi/USP, 2016.

1. Norman PE, Powell JT. Site specificity of aneurysmal disease. *Circulation*. 2010;121(4):560-8.
2. Sakalihasan N, Limet R, Defawe OD. Abdominal aortic aneurysm. *Lancet*. 2005;365(9470):1577-89.
3. Ali MU et al. Screening for abdominal aortic aneurysm in asymptomatic adults. *J Vasc Surg*. 2016;64(6):1855-68.
4. Blanchard JF. Epidemiology of abdominal aortic aneurysms. *Epidemiol Rev*. 1999;21(2):207-21.
5. Green N et al. Endoleak after endovascular aneurysm repair: Current status. *Rev Vasc Med*. 2014;2(2):43-7.
6. Jaldin RG et al. Complicações do tratamento endovascular do aneurisma de aorta abdominal. In: Maffei FHA (Aut.). *Doenças vasculares periféricas*. 5ª Ed. V. 2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. cap.115, p. 1493-1509.
7. Ng E, Morris DR, Golledge J. The association between plasma matrix metalloproteinase-9 concentration and endoleak after endovascular aortic aneurysm repair: a meta-analysis. *Atherosclerosis*. 2015;242(2):535-42.
8. Hovsepian DM et al. Elevated plasma levels of matrix metalloproteinase-9 in patients with abdominal aortic aneurysms: a circulating marker of degenerative aneurysm disease. *J Vasc Interv Radiol*. 2000;11(10):1345-52.
9. Hellenthal FA et al. Plasma levels of matrix metalloproteinase-9: a possible diagnostic marker of successful endovascular aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2012;43(2):171-2.
10. Golledge J, Kuivaniemi H. Genetics of abdominal aortic aneurysm. *Curr Opin Cardiol*. 2013;28(3):290-6.
11. Maegdefessel L. The emerging role of microRNAs in cardiovascular disease. *J Intern Med*. 2014;276(6):633-44.
12. Mitchell PS et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(30):10513-8.
13. Maegdefessel L, Dalman RL, Tsao PS. Pathogenesis of abdominal aortic aneurysms: microRNAs, proteases, genetic associations. *Annu Rev Med*. 2014;65:49-62.
14. Iyer V et al. A systematic review investigating the association of microRNAs with human abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis*. 2017;261:78-89.

15. Hellenthal FA et al. Biomarkers of AAA progression. Part 1: extracellular matrix degeneration. *Nat Rev Cardiol*. 2009;6(7):464.
16. Xiong W et al. Effects of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 deficiency on aneurysm formation. *J Vasc Surg*. 2006;44(5):1061-6.
17. Kim HO et al. Endovascular aneurysm repair for abdominal aortic aneurysm: a comprehensive review. *Korean J Radiol*. 2019;20(8):1247-65.
18. Lindeman JH. The pathophysiologic basis of abdominal aortic aneurysm progression: a critical appraisal. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2015;13(7):839-51.
19. Borek A et al. Roles of microRNAs in abdominal aortic aneurysm pathogenesis and the possibility of their use as biomarkers. *Kardiochir Torakochirurgia Pol*. 2019;16(3):124-7.
20. Scott RA, Multicentre Aneurysm Screening Study Group. The Multicentre Aneurysm Screening Study (MASS) into the effect of abdominal aortic aneurysm screening on mortality in men: a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002;360(9345):1531-9.
21. de Araujo NN et al. Dysregulation of microRNAs and target genes networks in human abdominal aortic aneurysm tissues. *PloS One*. 2019;14(9): e0222782.
22. Stather PW et al. A review of current reporting of abdominal aortic aneurysm mortality and prevalence in the literature. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2014;47(3):240-2.
23. Lederle, FA. The rise and fall of abdominal aortic aneurysm. *Circulation*. 2011;124(10):1097-9.
24. Jahangir E et al. Smoking, sex, risk factors and abdominal aortic aneurysms: a prospective study of 18 782 persons aged above 65 years in the Southern Community Cohort Study. *J Epidemiol Community Health*. 2015;69(5):481-8.
25. Wang H et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016;388(10053):1459-544.
26. Chaikof EL et al. The Society for Vascular Surgery practice guidelines on the care of patients with an abdominal aortic aneurysm. *J Vac Surg*. 2018;67(1):2-77.e2.
27. Fattahi N et al. Risk factors in 50-year-old men predicting development of abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg*. 2020;72(4):1337-1346.e1.

28. van Marrewijk C et al. Significance of endoleaks after endovascular repair of abdominal aortic aneurysms: the EUROSTAR experience. *J Vasc Surg.* 2002;35(3):461-73.
29. Solberg S et al. Increased growth rate of abdominal aortic aneurysms in women. The Tromsø study. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2005;29(2):145-9.
30. Madigan MC et al. Occult type I or III endoleaks are a common cause of failure of type II endoleak treatment after endovascular aortic repair. *J Vasc Surg.* 2019;69(2):432-9.
31. Brown PM, Zelt DT, Sobolev B. The risk of rupture in untreated aneurysms: the impact of size, gender, and expansion rate. *J Vasc Surg.* 2003;37(2):280-4.
32. Pyo R et al. Targeted gene disruption of matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) suppresses development of experimental abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest.* 2000;105(11):1641-9.
33. Ailawadi G et al. Gender differences in experimental aortic aneurysm formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:2116-22.
34. Rodin MB et al. Middle age cardiovascular risk factors and abdominal aortic aneurysm in older age. *Hypertension.* 2003;42(1):61-8.
35. Norman PE, Powell JT. Abdominal aortic aneurysm: the prognosis in women is worse than in men. *Circulation.* 2007;115(22):2865-9.
36. Clifton MA. Familial abdominal aortic aneurysms. *Br J Surg.* 1977;64(11):765-6.
37. Sandford RM et al. The genetic basis of abdominal aortic aneurysms: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2007;33(4):381-90.
38. Iribarren C et al. Traditional and novel risk factors for clinically diagnosed abdominal aortic aneurysm: the Kaiser multiphasic health checkup cohort study. *Ann Epidemiol.* 2007;17(9):669-78.
39. Wang S et al. Activation of AMP-activated protein kinase $\alpha 2$ by nicotine instigates formation of abdominal aortic aneurysms in mice in vivo. *Nat Med.* 2012;18(6), 902-910.
40. Quintana RA, Taylor WR. Cellular mechanisms of aortic aneurysm formation. *Circ Res.* 2019;124(4), 607-18.
41. Ghosh et al. Cigarette smoke-induced MMP2 and MMP9 secretion from aortic vascular smooth cells is mediated via the Jak/Stat pathway. *Hum Pathol.* 2015;46(2), 284-94.

42. Agraval H, Yadav UC. MMP-2 and MMP-9 mediate cigarette smoke extract-induced epithelial-mesenchymal transition in airway epithelial cells via EGFR/Akt/GSK3 β / β -catenin pathway: Amelioration by fisetin. *Chem Biol Interact.* 2019;314:108846.
43. Jaldin RG et al. Morphologic and biomechanical changes of thoracic and abdominal aorta in a rat model of cigarette smoke exposure. *Ann Vasc Surg.* 2013;27(6):791-800.
44. Cronenwett JL et al. Actuarial analysis of variables associated with rupture of small abdominal aortic aneurysms. *Surgery.* 1985;98:472-83.
45. Akturk UA et al. What are the prevalence of abdominal aortic aneurysm in patients with chronic obstructive pulmonary diseases and the characteristics of these patients? *Eurasian J Med.* 2017;49(1):36.
46. Takagi H, Umemoto T, ALICE (All-Literature Investigation of Cardiovascular Evidence) Group. A meta-analysis of the association of chronic obstructive pulmonary disease with abdominal aortic aneurysm presence. *Ann Vasc Surg.* 2016;34:84-94.
47. Takagi H, Umemoto T. No association of chronic obstructive pulmonary disease with abdominal aortic aneurysm growth. *Heart Vessels.* 2016;31(11):1806-16.
48. Takagi H, Umemoto T. Association of chronic obstructive pulmonary, coronary artery, or peripheral artery disease with abdominal aortic aneurysm rupture *Int Angiol.* 2017;36(4):322-31.
49. Tanaka H et al. Elevated plasma levels of LDL cholesterol promote dissecting thoracic aortic aneurysms in angiotensin II-induced mice. *Ann Vasc Surg.* 2018;48:204-13.
50. Martínez-López D et al. Impaired HDL (High-Density Lipoprotein)-mediated macrophage cholesterol efflux in patients with abdominal aortic aneurysm-Brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38(11):2750-4.
51. Allara E et al. Genetic determinants of lipids and cardiovascular disease outcomes: a wide-angled Mendelian randomization investigation. *Circ Genom Precis Med.* 2019;12(12):e002711.
52. Martínez-López D et al. APOA1 oxidation is associated to dysfunctional high-density lipoproteins in human abdominal aortic aneurysm. *EBioMedicine.* 2019 May 1;43:43-53.
53. Weng LC et al. Evaluation of the relationship between plasma lipids and abdominal aortic aneurysm: A Mendelian randomization study. *PloS One.* 2018;13(4):e0195719.

54. Police SB et al. Obesity promotes inflammation in periaortic adipose tissue and angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(10):1458-64.)
55. Golledge J et al. Obesity, adipokines, and abdominal aortic aneurysm. Health in men study. *Circulation.* 2007;116:2275-79.
56. Dattani N, Sayers RD, Bown MJ. Diabetes mellitus and abdominal aortic aneurysms: a review of the mechanisms underlying the negative relationship. *Diab Vasc Dis Res.* 2018;15(5):367-74.
57. Barão FTF et al. Study of the biomechanical and histological properties of the abdominal aorta of diabetic rats exposed to cigarette smoke. *J Vasc Res.* 2019;56(5), 255-66.
58. Chuaiphichai S et al. Endothelial cell tetrahydrobiopterin modulates sensitivity to ang (angiotensin) II-induced vascular remodeling, blood pressure, and abdominal aortic aneurysm. *Hypertension.* 2018;72(1):128-38.
59. Yasmin et al. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(2):372.
60. Chai H et al. IKK Epsilon Deficiency Attenuates Angiotensin II-Induced Abdominal Aortic Aneurysm Formation in Mice by Inhibiting Inflammation, Oxidative Stress, and Apoptosis. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020:3602824. eCollection 2020.
61. Tsialtas D et al. Atherosclerotic vascular diseases have really the same risk factors? Comparison between large abdominal aortic aneurysm and obstructive non-coronary arterial disease. *Vascular.* 2017;25(6):629-34.
62. Leone O et al. The complex interplay among atherosclerosis, inflammation, and degeneration in ascending thoracic aortic aneurysms. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2020;160(6):1434-1443.e6.
63. Yao L et al. Association of carotid atherosclerosis and stiffness with abdominal aortic aneurysm: The atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Atherosclerosis.* 2018;270:110-6.
64. Li W et al. Predictors associated with increased prevalence of abdominal aortic aneurysm in Chinese patients with atherosclerotic risk factors. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2017;54(1):43-9.
65. Zhai H et al. TIMP-3 suppresses the proliferation and migration of SMCs from the aortic neck of atherosclerotic AAA in rabbits, via decreased MMP-2 and MMP-9 activity, and reduced TNF- α expression. *Mol Med Rep.* 2018;18(2):2061-7.

66. Tang W et al. Replication of newly identified genetic associations between abdominal aortic aneurysm and SMYD2, LINC00540, PCIF1/MMP9/ZNF335, and ERG. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2020;59(1):92-7.
67. Pinard A, Jones GT, Milewicz DM. Genetics of Thoracic and Abdominal Aortic Diseases: Aneurysms, Dissections, and Ruptures. *Circ Res.* 2019;124(4):588-606.
68. Ostberg NP et al. The Genetics of thoracic aortic aneurysms and dissection: A clinical perspective. *Biomolecules.* 2020;10(2):182.
69. Li Y, Maegdefessel L. Non-coding RNA contribution to thoracic and abdominal aortic aneurysm disease development and progression. *Front Physiol.* 2017;8:429.
70. Airhart N et al. Smooth muscle cells from abdominal aortic aneurysms are unique and can independently and synergistically degrade insoluble elastin. *J Vasc Surg.* 2014;60(4):1033-42.
71. Kadoglou NP, Liapis CD. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis, surveillance and treatment of abdominal aortic aneurysms. *Curr Med Res Opin.* 2004;20(4):419-32.
72. Lu H et al. Novel mechanisms of abdominal aortic aneurysms. *Curr Atheroscler Rep.* 2012;14(5):402-12.
73. Fanjul-Fernández, M et al. Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1803(1):3-19.
74. Davis V et al. Matrix metalloproteinase-2 production and its binding to the matrix are increased in abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18(10):1625-33.
75. Busutti RW, Abou-Zamzam AM, Machleder HI. Collagenase activity of the human aorta: a comparison of patients with and without abdominal aortic aneurysms. *Arch Surg.* 1980;115(11):1373-8.
76. Hinterseher I et al. (). Matrix metalloproteinase 2 polymorphisms in a caucasian population with abdominal aortic aneurysm. *J Surg Res.* 2006;133(2):121-8.
77. Longo GM et al. Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. *J Clin Invest.* 2002;110(5):625-32.
78. Goodall S et al. Ubiquitous elevation of matrix metalloproteinase-2 expression in the vasculature of patients with abdominal aneurysms. *Circulation.* 2001;104(3), 304-9.

79. Freestone T et al. Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15(8):1145-51.
80. McMillan WD, Pearce WH. Increased plasma levels of metalloproteinase-9 are associated with abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 1999;29(1):122-9.
81. McMillan WD et al. Size matters: the relationship between MMP-9 expression and aortic diameter. *Circulation.* 1997;96(7), 2228-32.
82. Petersen E et al. Activity of matrix metalloproteinase-2 and-9 in abdominal aortic aneurysms. Relation to size and rupture. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2000;20(5), 457-461.
83. Hendel AS, Ang LJ, Granville D. Inflammaging and proteases in abdominal aortic aneurysm. *Curr Vasc Pharmacol.* 2015;13(1):95-110.
84. Silence J, Collen D, Lijnen HR. Reduced atherosclerotic plaque but enhanced aneurysm formation in mice with inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) gene. *Circ Res.* 2002;90(8):897-903.
85. Quinn AA et al. The incidence and fate of endoleaks vary between ruptured and elective endovascular abdominal aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg.* 2017;65(6):1617-24.
86. Lemaître V, Soloway PD, D'Armiento J. Increased medial degradation with pseudo-aneurysm formation in apolipoprotein E-knockout mice deficient in tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *Circulation.* 2003;107(2):333-8.
87. Eskandari MK et al. Enhanced abdominal aortic aneurysm in TIMP-1-deficient mice¹. *J Surg Res.* 2005;123(2):289-93.
88. Allaire E et al. Local overexpression of TIMP-1 prevents aortic aneurysm degeneration and rupture in a rat model. *J Clin Invest.* 1998;102(7):1413-20.
89. Brew K, Dinakarbandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1477(1-2):267-83.
90. Fujimura N et al. Characteristics and risk factors for type 2 endoleak in an East Asian population from a Japanese multicenter database. *Circ J.* 2016;80(1):118-23.
91. Crowther M et al. Increased matrix metalloproteinase 2 expression in vascular smooth muscle cells cultured from abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 2000;32(3):575-83.
92. White GH, May J. How should endotension be defined? History of a concept and evolution of a new term. *J Endovasc Ther.* 2000;7(6):435-8.

93. Sun LL et al. The regulatory role of microRNAs in angiogenesis-related diseases. *J Cell Mol Med*. 2018;22(10):4568-87.
94. Zhang W, Dahlberg JE, Tam W. MicroRNAs in tumorigenesis: a primer. *Am J Pathol*. 2007;171(3):728-38.
95. Joviliano EE, Ribeiro MS, Tenorio EJR. MicroRNAs and current concepts on the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm. *Braz J Cardiovasc Surg*. 2017;32(3):215-24.
96. Petersen CP et al. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell*. 2006;21(4):533-42.
97. Biros E et al. microRNA profiling in patients with abdominal aortic aneurysms: the significance of miR-155. *Clin Sci (Lond)*. 2014;126(11):795-803.
98. Di Gregoli K et al. MicroRNA-181b controls atherosclerosis and aneurysms through regulation of TIMP-3 and elastin. *Circ Res*. 2017;120(1), 49-65.
99. Hou X, Yang S, Zheng Y. Licochalcone A attenuates abdominal aortic aneurysm induced by angiotensin II via regulating the miR-181b/SIRT1/HO-1 signaling. *J Cell Physiol*. 2019;234(5), 7560-8.
100. Yu Q et al. Dexmedetomidine suppresses the development of abdominal aortic aneurysm by downregulating the microRNA-21/PDCD 4 axis. *Int J Mol Med*. 2021;47(5):90.
101. Zhang W et al. Plasma microRNAs serve as potential biomarkers for abdominal aortic aneurysm. *Clin Biochem*. 2015;48(15):988-92.
102. Tenorio EJR et al. Expression in whole blood samples of miRNA-191 and miRNA-455-3p in patients with AAA and their relationship to clinical outcomes after endovascular repair. *Ann Vasc Surg*. 2018;50:209-17.
103. Licholai S et al. MiR-191 as a key molecule in aneurysmal aortic remodeling. *Biomolecules*. 2021;11(11):1611.
104. Missae L et al. Expression of MicroRNA-1281, C-reactive protein, and renal function in individuals with abdominal aortic aneurysm and their clinical correlation after endovascular repair. *Braz J Cardiovasc Surg*. 2021;36(3):301-7.
105. Parent FN et al. The incidence and natural history of type I and II endoleak: a 5-year follow-up assessment with color duplex ultrasound scan. *J Vasc Surg*. 2002;35(3):474-81.
106. Sidloff DA et al. Type II endoleak after endovascular aneurysm repair. *Br J Surg*. 2013;100(10):1262-70.

107. Moll FL et al. Management of abdominal aortic aneurysms clinical practice guidelines of the European society for vascular surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2011 Jan;41(Suppl 1):S1-S58.
108. Ferrari M et al. Surgical treatment of persistent type 2 endoleaks, with increase of the aneurysm sac: indications and technical notes. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2005;29(1):43-6.
109. Dubenec SR et al. Endotension: a review of current views on pathophysiology and treatment. *J Cardiovasc Surg.* 2003;44(4):553-7.
110. White GH et al. Endoleak as a complication of endoluminal grafting of abdominal aortic aneurysms: classification, incidence, diagnosis, and management. *J Endovasc Ther.* 1997;4(2):152-68.
111. Makaroun M et al. Fate of endoleaks after endoluminal repair of abdominal aortic aneurysms with the EVT device. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1999;18(3):185-90.
112. Otsu M et al. Analysis of anatomical risk factors for persistent type II endoleaks following endovascular abdominal aortic aneurysm repair using CT angiography. *Surg today.* 2016;46(1):48-55.
113. Samura M et al. Identification of anatomical risk factors for type II endoleak to guide selective inferior mesenteric artery embolization. *Ann Vasc Surg.* 2018;48:166-73.
114. Pitoulis GA et al. Conical neck is strongly associated with proximal failure in standard endovascular aneurysm repair. *J Vasc Surg.* 2017;66(6):1686-95.
115. Schuurmann RC et al. Aortic curvature is a predictor of late type Ia endoleak and migration after endovascular aneurysm repair. *J Endovasc Ther.* 2017;24(3):411-7.
116. Zacharias N et al. Anatomic characteristics of abdominal aortic aneurysms presenting with delayed rupture after endovascular aneurysm repair. *J Vasc Surg.* 2016;64(6):1629-32.
117. Lal BK et al. Predictors and outcomes of endoleaks in the Veterans Affairs Open Versus Endovascular Repair (OVER) trial of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 2015;62(6):1394-404.
118. Wild JB et al. Effect of anticoagulation and antiplatelet therapy on incidence of endoleaks and sac size expansions after endovascular aneurysm repair. *Ann Vasc Surg.* 2014;28(3):554-9.

119. Ueshima H. Explanation for the Japanese paradox: prevention of increase in coronary heart disease and reduction in stroke. *J Atheroscler Thromb.* 2007;14(6):278-86.
120. Cannavale A et al. Evolving concepts and management of endoleaks after endovascular aneurysm repair: where do we stand in 2019? *Clin Radiol.* 2020;75(3):169-78.
121. Bergonti M et al. Third-versus second-generation stent graft for endovascular aneurysm repair: a device-specific analysis. *Ann Vasc Surg.* 2017;44:67-76.
122. Maudet A et al. Endovascular treatment of infrarenal aneurysms: comparison of the results of second-and third-generation stent grafts. *Ann Vasc Surg.* 2016;34:95-105.
123. Brown LC, Powell JT. Risk factors for aneurysm rupture in patients kept under ultrasound surveillance. *Ann Surg.* 1999;230(3):289 -96; discussion 296-7.
124. Van Marrewijk CJ et al. Is a type II endoleak after EVAR a harbinger of risk? Causes and outcome of open conversion and aneurysm rupture during follow-up. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2004;27(2):128-37.
125. Nakao T et al. Genetic ablation of microRNA-33 attenuates inflammation and abdominal aortic aneurysm formation via several anti-inflammatory pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017;37(11):2161-2170.
126. Sobocinski J et al. The benefits of EVAR planning using a 3D workstation. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2013;46(4):418-23.
127. Sternbergh III WC et al. Aortic neck angulation predicts adverse outcome with endovascular abdominal aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg.* 2002;35(3):482-6.
128. Stather P et al. Outcomes of endovascular aneurysm repair in patients with hostile neck anatomy. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2012;44(6):556-61.
129. Zarins CK et al. Stent graft migration after endovascular aneurysm repair: importance of proximal fixation. *J Vasc Surg.* 2003;38(6):1264-72.
130. Chisci E et al. Transrenal E-XL stenting to resolve or prevent type Ia endoleak in the case of severe neck angulation during endovascular abdominal aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg.* 2013;57(5):1383-6.
131. Marcelin C et al. Embolization for persistent type IA endoleaks after chimney endovascular aneurysm repair with Onyx®. *Diagn Interv Imaging.* 2017;98(12):849-855.

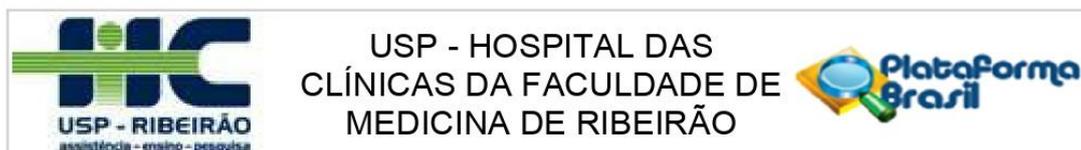
132. Gilling-Smith G et al. Endotension after endovascular aneurysm repair: definition, classification, and strategies for surveillance and intervention. *J Endovas Ther.* 1999;6(4):305-7.
133. Kougiyas P et al. Successful treatment of endotension and aneurysm sac enlargement with endovascular stent graft reinforcement. *J Vasc Surg.* 2007;46(1):124-7.
134. Wolf YG et al. Duplex ultrasound scanning versus computed tomographic angiography for postoperative evaluation of endovascular abdominal aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg.* 2000;32(6):1142-8.
135. Ashoke R et al. Color duplex ultrasonography is insensitive for the detection of endoleak after aortic endografting: a systematic review. *J Endovas Ther.* 2005;12(3):297-305.
136. Rozenblit A et al. Endovascular repair of abdominal aortic aneurysm: value of postoperative follow-up with helical CT. *AJR. Am J Roentgenol.* 1995;165(6):1473-9.
137. Mirza TA et al. Duplex ultrasound and contrast-enhanced ultrasound versus computed tomography for the detection of endoleak after EVAR: systematic review and bivariate meta-analysis. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2010;39(4):418-28.
138. Henao EA et al. Contrast-enhanced duplex surveillance after endovascular abdominal aortic aneurysm repair: improved efficacy using a continuous infusion technique. *J Vasc Surg.* 2006;43(2):259-64.
139. Gürtler VM et al. A comparison between contrast-enhanced ultrasound imaging and multislice computed tomography in detecting and classifying endoleaks in the follow-up after endovascular aneurysm repair. *J Vasc Surg.* 2013;58(2):340-5.
140. van der Laan MJ et al. Dynamic CE-MRA for endoleak classification after endovascular aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2006;31(2):130-5.
141. Georgiadis GS et al. Correlation of baseline plasma and inguinal connective tissue metalloproteinases and their inhibitors with late high-pressure endoleak after endovascular aneurysm repair: long-term results. *J Endovasc Ther.* 2019; 26(6):826-35.
142. Antoniou GA et al. Plasma matrix metalloproteinase 9 levels may predict endoleaks after endovascular aortic aneurysm repair. *Angiology.* 2013;64(1):49-56.

143. Sangiorgi G et al. Plasma levels of metalloproteinases-3 and-9 as markers of successful abdominal aortic aneurysm exclusion after endovascular graft treatment. *Circulation*. 2001;104(12 Suppl 1):I288-95.
144. Lorelli DR et al. Response of plasma matrix metalloproteinase-9 to conventional abdominal aortic aneurysm repair or endovascular exclusion: implications for endoleak. *J Vasc Surg*. 2002;35(5):916-22.
145. Stilo F et al. Biomarkers in EndoVascular Aneurysm Repair (EVAR) and abdominal aortic aneurysm: pathophysiology and clinical implications. *Diagnostics (Basel)*. 2022;12(1):183.
146. Small EM, Frost RJ, Olson EN. MicroRNAs add a new dimension to cardiovascular disease. *Circulation*. 2010;121(8):1022-32.
147. Krek A et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet*. 2005;37(5):495-500.
148. Schurink GW et al. Endoleakage after stent-graft treatment of abdominal aneurysm: implications on pressure and imaging--an in vitro study. *J Vasc Surg*. 1998;28(2):234-41.
149. Karch LA et al. Algorithm for the diagnosis and treatment of endoleaks. *Am J Surg*. 1999;178(3):225-31.
150. Balm R, Jacobs MJ. Use of spiral computed tomographic angiography in monitoring abdominal aortic aneurysms after transfemoral endovascular repair. *Tex Heart Inst J*. 1997;24(3):200-3.
151. Schurink GW, Aarts NJ, van Bockel JH. Endoleak after stent-graft treatment of abdominal aortic aneurysm: a meta-analysis of clinical studies. *Br J Surg*. 1999;86(5):581-7.
152. Zarins CK et al. Endoleak as a predictor of outcome after endovascular aneurysm repair: AneuRx multicenter clinical trial. *J Vasc Surg*. 2000;32(1):90-107.
153. Cuypers P et al. Realistic expectations for patients with stent-graft treatment of abdominal aortic aneurysms. Results of a European multicentre registry. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1999;17(6):507-16.
154. Schermerhorn ML, Cronenwett JL. The UK small aneurysm trial. *J Vasc Surg*. 2001;33(2):443.
155. Lederle FA et al. Rupture rate of large abdominal aortic aneurysms in patients refusing or unfit for elective repair. *JAMA*. 2002;287(22):2968-72.

156. Cornuz J et al. Risk factors for asymptomatic abdominal aortic aneurysm: systematic review and meta-analysis of population based screening studies. *Eur J Public Health*. 2004;14(4):343-9.
157. Maegdefessel L et al. MicroRNA-21 blocks abdominal aortic aneurysm development and nicotine-augmented expansion. *Sci Transl Med*. 2012;4(122):122ra22.
158. Li K et al. Effect of miR-21 on rat thoracic aortic aneurysm model by regulating the expressions of MMP-2 and MMP-9. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020;24(2):878-84.
159. Huang X et al. MicroRNA-21 knockout exacerbates angiotensin ii-induced thoracic aortic aneurysm and dissection in mice with abnormal transforming growth factor- β -SMAD3 signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018;38(5):1086-101.
160. Kumar S et al. Role of noncoding RNAs in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm: Possible therapeutic targets? *Circ Res*. 2019;124(4):619-30.
161. Fry JL et al. Vascular smooth muscle sirtuin-1 protects against diet-induced aortic stiffness. *Hypertension*. 2016;68(3), 775-84.
162. Fu X-M et al. MicroRNAs: novel players in aortic aneurysm. *Biomed Res Int*. 2015;2015:831641.
163. Dilmé JF et al. Influence of cardiovascular risk factors on levels of matrix metalloproteinases 2 and 9 in human abdominal aortic aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2014;48(4), 374-81.
164. Moxon JV et al. Circulating biomarkers are not associated with endoleaks after endovascular repair of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 2018;67(3), 770-7.
165. Defawe OD et al. TIMP-2 and PAI-1 mRNA levels are lower in aneurysmal as compared to athero-occlusive abdominal aortas. *Cardiovasc Res*. 2003;60(1), 205-13.

9. Anexo

COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do perfil inflamatório e de MicroRNAs como marcadores de endoleak pós correção endovascular de Aneurisma de Aorta Abdominal

Pesquisador: TULIO FABIANO DE OLIVEIRA LEITE

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 82522018.0.0000.5440

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.574.900

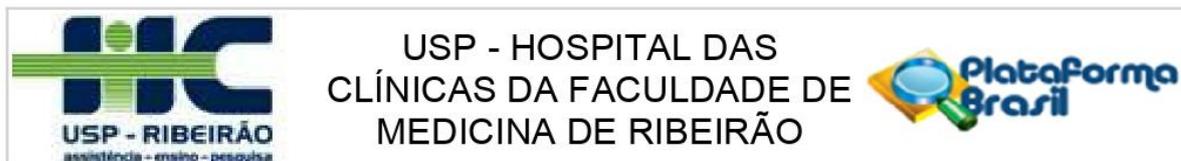
Apresentação do Projeto:

"O aneurisma de aorta abdominal (AAA) é uma importante causa de morbimortalidade na população idosa. Atualmente a única forma de prevenir a rotura e o óbito relacionado ao AAA é a intervenção cirúrgica. O tratamento endovascular está associado a menor morbimortalidade que o tratamento convencional, no entanto, necessita de um seguimento com exames de imagem para confirmação da exclusão do saco aneurismático ao longo do tempo. A formação de um aneurisma é um processo multifatorial complexo, envolvendo a remodelação destrutiva do tecido conjuntivo em todo o segmento afetado da parede da aorta. Este processo envolve uma inflamação crônica local, uma diminuição no número de células do músculo liso da túnica média e fragmentação da matriz extracelular da aorta."

Objetivo da Pesquisa:

- Avaliar as concentrações plasmáticas de marcadores da degradação da matriz extracelular em pacientes submetidos à correção endovascular de AAA (EVAR) correlacionando dados do pré-operatório, evolução clínica e angiotomografia com o surgimento de vazamentos e/ou alterações na morfometria do saco aneurismático no seguimento de 6 meses.
- Caracterizar os MicroRNAs envolvidos na fisiopatologia do AAA e dos vazamentos ao tratamento endovascular.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 2.574.900

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os benefícios parecem superar os riscos uma vez que os exames que realizados são exames de rotina neste tipo de cirurgia. Além do risco de quebra de sigilo quanto aos dados dos participantes, também existe o risco de desconforto e hematoma oriundos da punção venosa. Os pesquisadores precisam incluir um item de avaliação dos riscos e benefícios no projeto de pesquisa para melhor avaliação deste aspecto.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Metodologia Proposta:

Paciente e controle: Neste estudo, selecionaremos 50 pacientes (independente do grupo étnico, idade e sexo) que serão submetidos à correção endovascular de AAA. Estes pacientes realizarão exames de vigilância (angiografia de aorta total por tomografia computadorizada ou por ressonância nuclear magnética) em dois momentos: 1 e 6 meses após o procedimento cirúrgico, objetivando a investigação de vazamentos e/ou alterações na morfometria do saco aneurismático, além de dosagens de marcadores inflamatórios e de MicroRNAs no pré e pós operatórios (6meses). Todos os incluídos no estudo serão selecionados a partir de casos atendidos no Ambulatório de Cirurgia Vascular e Endovascular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP). Cabe ressaltar, que tais exames são realizados de rotina no controle pós-operatório

de todos os pacientes submetidos à correção endovascular de AAA. Como grupo controle serão selecionados 30 pacientes (independente do grupo étnico, idade e sexo) não portadores de AAA, pareados por idade e sexo com o grupo estudo. No grupo controle, a ausência de aneurisma será documentada através da realização de ultrassonografia abdominal com Doppler arterial em pacientes submetidos a screening para AAA (idade avançada, história de tabagismo, sexo masculino e história familiar positiva).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos foram corrigidos de acordo com o parecer anterior emitido pelo CEP.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa Versão 2 – data: 06/03/2018 e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido- Versão 2 – data: 08/03/2018 - grupo estudo e grupo controle, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO



Continuação do Parecer: 2.574.900

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1017091.pdf	08/03/2018 12:57:12		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_termo_de_consetimento_versao_2.pdf	08/03/2018 12:56:49	TULIO FABIANO DE OLIVEIRA LEITE	Aceito
Outros	Respostas_do_parecer.pdf	07/03/2018 20:53:32	TULIO FABIANO DE OLIVEIRA LEITE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_versao_2.pdf	07/03/2018 20:51:59	TULIO FABIANO DE OLIVEIRA LEITE	Aceito
Cronograma	Cronograma_Projeto.pdf	05/03/2018 22:00:52	TULIO FABIANO DE OLIVEIRA LEITE	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_consentimento.pdf	26/01/2018 14:52:43	TULIO FABIANO DE OLIVEIRA LEITE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	24/01/2018 19:42:57	TULIO FABIANO DE OLIVEIRA LEITE	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_de_acordo_assinado.pdf	24/01/2018 19:39:05	TULIO FABIANO DE OLIVEIRA LEITE	Aceito
Orçamento	Orcamento_tulio_clinica_cirurgica.pdf	24/01/2018 19:38:45	TULIO FABIANO DE OLIVEIRA LEITE	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto_instituicao.pdf	24/01/2018 19:37:08	TULIO FABIANO DE OLIVEIRA LEITE	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

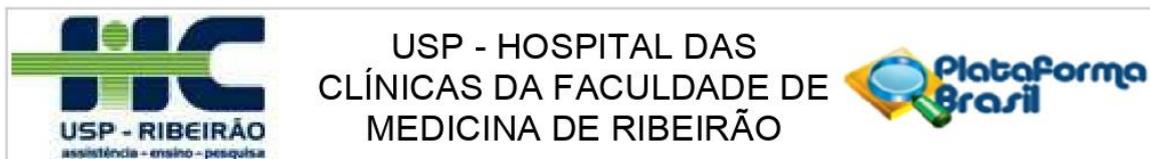
UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 2.574.900

RIBEIRAO PRETO, 02 de Abril de 2018

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

10. Apêndices

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (GRUPO ESTUDO)

Título do estudo: Avaliação do perfil inflamatório e de MicroRNAs como marcadores de endoleak pós correção endovascular de Aneurisma de Aorta Abdominal.

Marcadores em investigação: Quantificações plasmáticas MMP-9, MMP-2 e MicroRNAs.

Nome do investigador principal: Túlio Fabiano de Oliveira Leite

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

Introdução:

Você está sendo convidado para participar de um estudo de pesquisa clínica em que você cederá uma pequena amostra de sangue, cerca de três colheres de sopa (30ml), que serão coletadas antes da cirurgia de correção do aneurisma de aorta abdominal e nas consultas de seguimento após o tratamento do aneurisma.

Leia este documento com cuidado e não hesite em fazer qualquer pergunta a qualquer momento. Sua participação neste estudo é totalmente voluntária. Cabe a você decidir se quer participar ou não. Se decidir participar, você receberá uma via assinada e rubricada em todas as páginas por você e pelo pesquisador. Caso desista de participar, você pode se retirar do estudo sem dar explicações, que não afetará o padrão de assistência médica recebida.

Natureza e objetivo do estudo:

Este estudo de pesquisa clínica está sendo conduzido por seu médico para avaliar algumas substâncias presentes no seu sangue que são liberadas pelo aneurisma de aorta abdominal.

Você está sendo convidado a participar deste estudo de pesquisa clínica porque é portador de aneurisma de aorta abdominal que corresponde ao enfraquecimento da parede da artéria aorta o que resulta na dilatação do vaso com riscos de rotura e de entupimento das artérias dos membros inferiores devido à saída de coágulos que estão dentro no aneurisma.

A correção por dentro do vaso (endovascular) é uma cirurgia em que é feita um corte em cada virilha e colocam-se por dentro dos vasos tubos de tecido sintético (enxerto) suportado por um esqueleto metálico (*stent*) denominado endoprótese. Essa endoprótese desvia o sangue da região enfraquecida do aneurisma para evitar que ele rompa.

Esta pesquisa contribuirá para entender melhor os possíveis tratamentos ou adequações do tratamento do aneurisma de aorta abdominal.

Duração do estudo:

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

Procedimentos do estudo:

Marco 0: Você deverá comparecer para internação 1 dia antes da cirurgia, sendo aproveitada a oportunidade para coleta de sangue.

Marco 1 mês: Você comparecerá novamente após um mês do procedimento para ser submetido ao exame de imagem (tomografia ou ressonância).

Marco 6 meses: Novo retorno será solicitado para coleta de sangue e novo exame de imagem (tomografia ou ressonância).

Riscos e benefícios:

A coleta de sangue trará dor leve e pode deixar um hematoma (marca roxa) no local da punção venosa. O estudo não trará benefício direto para você. É possível que esta pesquisa possa contribuir para melhorar o tratamento endovascular do aneurisma de aorta abdominal.

Existe uma possibilidade de que as informações obtidas neste estudo possam ajudar no desenvolvimento futuro de um novo tratamento para pacientes que sofrem da mesma condição que você.

Custos, não remuneração e compensação:

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

Confidencialidade:

A garantia de sigilo dos seus dados, de acordo com as normas brasileiras será assegurada, podendo haver indenização conforme as leis vigentes no país, caso ocorra

dano decorrente de participação na pesquisa. Os tubos coletados serão numerados, sendo de conhecimento exclusivo do pesquisador principal.

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

Participação voluntária:

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

Outras informações importantes:

O investigador principal deste estudo médico é o Dr. Túlio Fabiano de Oliveira Leite, que pode ser encontrado no seguinte endereço: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – HCFMRP-USP – Av. Bandeirantes, 3900 – 9º andar – Departamento de Cirurgia e Anatomia – Campus Universitário – Monte Alegre – CEP: 14049-900 – Ribeirão Preto/SP e telefone (horário comercial) 16 3602 2593 e celular 11- 98131-4050. Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP no seguinte telefone (horário comercial) (016) 3602-2228 pode responder dúvidas referente a pesquisa caso haja algum questionamento.

1. Você leu ou leram para você o termo de consentimento livre e esclarecido para esse estudo. Recebi todas as explicações sobre a natureza, objetivo, duração, efeitos e riscos previsíveis do estudo, assim como sobre as minhas responsabilidades. As minhas perguntas foram respondidas satisfatoriamente.
2. Você concordou em participar do estudo e em cooperar totalmente com o médico e entrar em contato com ele/ela quando necessário para esclarecimento de dúvidas ou dos próximos passos do estudo.
3. Você informou ao médico do estudo sobre todas suas doenças e medicações que está usando, além de informar sobre todas as suas consultas médicas recentes.
4. Você informou também ao médico do estudo sobre qualquer participação sua em outros estudos clínicos no último ano.

5. Você entendeu que a participação no estudo é voluntária e que pode se recusar a participar ou posso sair do estudo a qualquer momento. Caso você se recuse a participar deste estudo, não será penalizado de nenhuma forma e sua decisão não prejudicará qualquer cuidado médico ao qual tenha direito.
6. Seu prontuário médico será utilizado para buscar dados quanto ao procedimento cirúrgico realizado e resultado de exames de seguimento após o tratamento.
7. Você receberá uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assinado e rubricado em todas as páginas por você e pelo pesquisador.
8. Você terá livre acesso aos resultados da pesquisa.

Nome do paciente: _____

(a ser preenchido pelo paciente)

Assinatura do paciente: _____

(ou nome e assinatura do representante legal, se aplicável)

Data: _____

Nome da testemunha: _____

Assinatura da testemunha: _____

(se aplicável)

Data: _____

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

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

Nome: _____

Assinatura: _____

Data: _____

APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE e ESCLARECIDO (GRUPO CONTROLE)

Título do estudo: Avaliação do perfil inflamatório e de MicroRNAs como marcadores de endoleak pós correção endovascular de Aneurisma de Aorta Abdominal.

Marcadores em investigação: Quantificações plasmáticas de MMP-9, MMP-2 e MicroRNAs.

Nome do investigador principal: Túlio Fabiano de Oliveira Leite

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

Introdução:

Você está sendo convidado para participar de um estudo de pesquisa clínica em que você cederá uma pequena amostra de sangue, cerca de três colheres de sopa (30ml).

Leia este documento com cuidado e não hesite em fazer qualquer pergunta a qualquer momento. Sua participação neste estudo é totalmente voluntária. Cabe a você decidir se quer participar ou não. Se decidir participar, você receberá uma via assinada e rubricada em todas as páginas por você e pelo pesquisador. Caso desista de participar, você pode se retirar do estudo sem dar explicações, que não afetará o padrão de assistência médica recebida.

Natureza e objetivo do estudo:

Este estudo de pesquisa clínica está sendo conduzido por seu médico para avaliar algumas substâncias presentes no seu sangue que são liberadas pelo aneurisma de aorta abdominal.

Você está sendo convidado a participar desta pesquisa clínica porque não possui aneurisma de aorta abdominal. As dosagens realizadas serão comparadas com as dosagens dos pacientes portadores de aneurisma de aorta abdominal submetidos a correção endovascular do aneurisma de aorta abdominal.

Esta pesquisa contribuirá para entender melhor os possíveis tratamentos ou adequações do tratamento do aneurisma de aorta abdominal.

Duração do estudo:

A sua participação como voluntário terá a duração de 1 dia.

Procedimentos do estudo:

Marco 0: Você deverá comparecer em consulta ambulatorial, quando será colhida amostra de sangue após realização de ultrassonografia com Doppler arterial de aorta abdominal mostrando ausência de aneurisma de aorta abdominal.

Riscos e benefícios:

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

O estudo não trará benefício direto para você. É possível que esta pesquisa possa contribuir para melhorar o tratamento endovascular do aneurisma de aorta abdominal.

Existe uma possibilidade de que as informações obtidas neste estudo possam ajudar no desenvolvimento futuro de um novo tratamento para pacientes portadores de aneurisma de aorta abdominal.

Participação voluntária:

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária. Você poderá decidir não participar ou interromper sua participação no estudo em qualquer momento, sem dar razão. Você não será penalizado e não perderá benefícios aos quais tem direito. Seu médico irá informá-lo sobre quaisquer informações importantes que se tornem disponíveis durante o estudo e que possam afetar sua vontade em continuar participando neste estudo.

Custos, não remuneração e compensação:

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

Confidencialidade:

A garantia de sigilo dos seus dados, de acordo com as normas brasileiras será assegurada, podendo haver indenização conforme as leis vigentes no país, caso ocorra dano decorrente de participação na pesquisa. Os tubos coletados serão numerados, sendo de conhecimento exclusivo do pesquisador principal.

Outras informações importantes:

O investigador principal deste estudo médico é a Dr. Túlio Fabiano de Oliveira Leite, que pode ser encontrada no seguinte endereço: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – HCFMRP-USP – Av. Bandeirantes, 3900 – 9º andar – Departamento de Cirurgia e Anatomia – Campus Universitário – Monte Alegre – CEP: 14049-900 – Ribeirão Preto/SP e telefone (horário comercial) 16 3602 2593 e celular: 11- 98131-4050.

Preto/SP e telefone (horário comercial) 16 3602 2593 e celular 11- 98131-4050. Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP no seguinte telefone (horário comercial) (016) 3602-2228 pode responder dúvidas referente a pesquisa caso haja algum questionamento.

1. Você leu ou leram para você o termo de consentimento livre e esclarecido para esse estudo. Recebi todas as explicações sobre a natureza, objetivo, duração, efeitos e riscos previsíveis do estudo, assim como sobre as minhas responsabilidades. As minhas perguntas foram respondidas satisfatoriamente.
2. Você concordou em participar do estudo e em cooperar totalmente com o médico e entrar em contato com ele/ela quando necessário para esclarecimento de dúvidas ou dos próximos passos do estudo.
3. Você informou ao médico do estudo sobre todas suas doenças e medicações que está usando, além de informar sobre todas as suas consultas médicas recentes.
4. Você informou também ao médico do estudo sobre qualquer participação sua em outros estudos clínicos no último ano.
5. Você entendeu que a participação no estudo é voluntária e que pode se recusar a participar ou posso sair do estudo a qualquer momento. Caso você se recuse a participar deste estudo, não será penalizado de nenhuma forma e sua decisão não prejudicará qualquer cuidado médico ao qual tenha direito.
6. Seu prontuário médico será utilizado para buscar dados quanto ao procedimento cirúrgico realizado e resultado de exames de seguimento após o tratamento.

7. Você receberá uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assinado e rubricado em todas as páginas por você e pelo pesquisador.
8. Você terá livre acesso aos resultados da pesquisa.

Nome do paciente: _____

(a ser preenchido pelo paciente)

Assinatura do paciente: _____

(ou nome e assinatura do representante legal, se aplicável)

Data: _____

Nome da testemunha: _____

Assinatura da testemunha: _____

(se aplicável)

Data: _____

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

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

Nome: _____

Assinatura: _____

Data: _____