

Renato Cesar de Souza

**Análise da expressão de miRNAs em pacientes
que desenvolveram síndrome vasoplégica após
cirurgia de revascularização miocárdica com
circulação extracorpórea**

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

Programa de pós-graduação em Cirurgia
Torácica e Cardiovascular
Orientador: Prof. Dr. Omar Asdrúbal Vilca
Mejía

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A
versão original está disponível na biblioteca da FMUSP)

**São Paulo
2023**

Renato Cesar de Souza

**Análise da expressão de miRNAs em pacientes
que evoluíram para síndrome vasoplégica após
cirurgia de revascularização miocárdica com
circulação extracorpórea**

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

Programa de pós-graduação em Cirurgia
Torácica e Cardiovascular
Orientador: Prof. Dr. Omar Asdrúbal Vilca
Mejía

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011. A
versão original está disponível na biblioteca da FMUSP)

**São Paulo
2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Souza, Renato Cesar de

Análise da expressão de miRNAs em pacientes que evoluíram para síndrome vasoplégica após cirurgia de revascularização miocárdica com circulação extracorpórea / Renato Cesar de Souza. -- São Paulo, 2023.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular.
Orientador: Omar Asdrúbal Vilca Mejía.

Descritores: 1.Vasoplegia 2.Choque
3.Revascularização miocárdica 4.MicroRNAs 5.MicroRNA circulante 6.Biomarcadores

USP/FM/DBD-212/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Dedico esta tese à minha família. Aos meus pais, Cezar e Silva, por sempre terem dedicado todo o seu tempo e suas decisões para que eu e meus irmãos tivéssemos a oportunidade de crescer por meio do estudo, princípio que eles fielmente seguem desde sempre. Vocês são o maior exemplo do real sentido da maternidade e paternidade e, principalmente, graças a vocês eu pude chegar aqui. Aos meus irmãos Leonardo, Pedro e Matheus, por sermos sempre uma família do nosso jeito e que ajudaram a construir quem sou hoje.

Aos meus amigos de sempre Rafael, Gabriel e João que, com meus irmãos, são a memória mais antiga de amizade que tenho.

A todos os pesquisadores brasileiros, nobres trabalhadores que lutam diariamente para que a produção científica brasileira esteja nas fronteiras do conhecimento e não desistem, apesar das adversidades que a educação do nosso país enfrenta.

Agradecimientos

A Deus, pela oportunidade de viver uma experiência tão nobre quanto esta, de poder participar de um projeto de pesquisa tão importante, por me cercar de pessoas incríveis e, ao mesmo tempo, permitir que eu contribua na construção do conhecimento científico.

Ao Prof. Fabio Jatene, pelo exemplo de liderança, dedicação ao trabalho e por perseguir incansavelmente o melhor para a instituição que me formou como cirurgião cardiovascular, da qual sinto imenso orgulho por ter feito parte.

Agradecimento especial ao Prof. Omar Mejía, meu querido orientador, pela oportunidade que me concedeu com este projeto, por ser um exemplo de dedicação e persistência dentro dos nossos propósitos, por estar sempre apontando o “norte” e agindo para que tudo aconteça da melhor forma. Sou-lhe grato pela dedicação comigo e residentes, desde a residência de cirurgia cardiovascular, pelo tempo que nos dedica nas discussões de caso matinais e pelo conhecimento compartilhado. “Collaboration is the new competition”.

À Dra. Ludmila Ferreira, grande pesquisadora, exemplo de integridade ética e moral em pesquisa, dedicada, generosa e de enorme conhecimento científico. Obrigado pela dedicação ao projeto, por estar sempre disposta a ajudar e pelos conselhos ao longo desta etapa.

Ao Dr. Lucas Lacerda, amigo e companheiro de residência, cirurgião de grande coração que, além de ser um “R-mais” exemplar, teve a generosidade de me indicar ao meu orientador para fazer parte da linha de pesquisa.

Ao Dr. Ricardo Dias, grande mestre, amigo e cirurgião, a quem devo boa parte do meu aprendizado em cirurgia cardiovascular. O senhor é um exemplo de liderança, coragem e determinação.

Ao Dr. Duncan, também grande mestre, amigo e cirurgião, pessoa de enorme coração com quem tive a honra de aprender muito durante o início da caminhada na cirurgia cardíaca.

Aos amigos do grupo da coronária do InCor Prof. Luis Alberto Dallan, Prof. Luiz Augusto Lisboa, Dr. Alexandre Hueb e Dr. Luis Roberto Dallan, pela grande paciência, por incentivarem e apoiarem a formação e os projetos de pesquisa de seus residentes.

Aos demais assistentes e professores do InCor-HCFMUSP: Dr. Fabio Gaiotto, Dr. Samuel Steffen, Dr. Domingos Lourenço e Dr. Ronaldo Honorato, do Núcleo de Transplante; Prof. Pablo Pomerantzeff, Dr. Carlos Manuel, Dr. Elinthon Veronese, Dr. Fabricio Dinato, do grupo da valva; Prof. Marcelo Jatene, Profa. Carla Tanamati, Dr. Luiz Fernando Caneo, Dr. Leonardo Augusto Miana e Dr. Juliano Penha, do grupo das cardiopatias congênitas; Prof. Roberto Costa, Dra. Elizabeth Crevelari e Dr. Wagner Tadeu, do grupo da estimulação cardíaca artificial. Pessoas que dedicam suas vidas a aliviar a dor do próximo, à construção do conhecimento científico e à formação dos

melhores cirurgiões cardiovasculares do país, nesta instituição única no Brasil que é a USP.

Aos amigos residentes, “fellows” e companheiros de batalhas: Guilherme Viotto, Mónica Gonzalez, Gustavo Orellana, Joaquim Aprigio, Jose Ivo Figueiredo, Victor Clementoni, Marcelo Werneck, Hernan Gabriel, Valdano Manuel, Aldo Martinez, Gustavo Guerreiro, Andressa Elicker, Lucas Cardoso, Lucas Bonamigo, Guilherme Brasil, Romullo Medeiros, Polyanna Nascimento, Davi Tenorio, Marcos Zapata, Renan Rodrigues. Sem vocês, esses anos teriam sido infinitamente mais difíceis. Vocês foram minha família em São Paulo.

Ao Prof. Luiz Felipe Pinho Moreira, coordenador do programa, por todo o apoio, incentivo e opiniões sinceras desde o início deste projeto de pesquisa.

Agradecimento especial à FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio à realização desta pesquisa.

“O homem que considera sua razão infalível está bem próximo do erro.”

Allan Kardec

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

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

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

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

SUMÁRIO:

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO / *ABSTRACT*

1 – INTRODUÇÃO	1
2 – OBJETIVOS	6
3 – REVISÃO DA LITERATURA	8
3.1 – Definição de Síndrome Vasoplégica pós cirurgia cardíaca	9
3.2 – Incidência, fatores de risco e mortalidade.....	11
3.3 – Fisiopatologia	16
3.4 – Tratamento.....	17
3.5 – MicroRNAs e suas aplicações como biomarcadores	22
4 – MÉTODOS	30
4.1 - Ética na pesquisa	31
4.2 – Desenho do estudo, critérios de inclusão e exclusão e grupos	31
4.3-Monitorização do paciente, técnica cirúrgica, material biológico e acompanhamento do paciente	34
4.4 - Perfil de miRNA de sangue total	40
4.5 - Análise da expressão e análise estatística do miRNA	41
4.6 - Análises de previsão de alvo e de enriquecimento de vias	42
5 – RESULTADOS	44
5.1 Comparação entre os grupos VASO e NONVASO	45
5.2 -MiRNAs circulantes desregulados em amostras de sangue durante o período pré-operatório de pacientes que se submeteram à cirurgia de revascularização miocárdica com CEC e desenvolveram e não desenvolveram VS	45
5.3 - Combinação do hsa-miR-30d-5p e hsa-miR-770-5p no sangue total como potencial preditor de VS	48
5.4 - A previsão de alvos de miRNA e a análise de enriquecimento do conjunto de genes	50
5.5 – Apelina e miRNA.....	54
6 – DISCUSSÃO	61
7 – CONCLUSÃO	68
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

LISTAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Monitor Vigileo® com sensor FloTrac® da *Edwards Lifescience*™ utilizado na monitorização do índice cardíaco para diagnóstico de SV. Dentre os parâmetros que o monitor fornece, utilizamos o índice cardíaco acima de 2,2 L/min/m².....36

Figura 2 - Ficha de controle dos parâmetros hemodinâmicos do pós-operatório anotado pela equipe de enfermagem do setor de pós-operatório. T – temperatura axilar, R – frequência respiratória, FC – frequência cardíaca, PA – pressão arterial média, PVC – pressão venosa central, S – pressão sistólica, D – pressão diastólica, M - pressão média, DC – débito cardíaco, IC – índice cardíaco.....37

Figura 3 - Fluxograma do paciente incluído no estudo. O paciente tem suas amostras de material biológico coletadas ao longo da cirurgia; posteriormente o tórax é fechado, o paciente é encaminhado para a unidade pós-operatória onde os dados são coletados e o membro pesquisado acompanha o diagnóstico de vasoplegia. As amostras de material biológico são encaminhadas para armazenamento a -81oC para posterior descongelamento, processamento e análise do perfil de miRNA.....38

Figura 4 - *Tempus*™ *Blood RNA Tube*. Tubo utilizado na armazenagem a -81°C das amostras de sangue para preservação do material genético.....39

Figura 5 - Exemplo de diagrama gerado pelo IPA em que cada linha representa uma relação biológica existente entre os miRNAs e outras moléculas sustentadas por uma referência da literatura, de um livro didático ou de informações canônicas armazenadas no IKB. A partir disso, é possível prever um efeito final.....43

Figura 6A - Gráfico volcano em que o eixo y representa o valor p da expressão de miRNA enquanto o eixo x representa a quantidade de vezes em que a expressão está alterada. A linha pontilhada que cruza perpendicularmente o eixo y representa o valor acima do qual a expressão do miRNA é significativa com $p < 0.05$. Há duas linhas pontilhadas cruzando perpendicularmente o eixo x que marcam aqueles miRNAs que têm sua expressão aumentada (à direita) e diminuída (à esquerda). Os pontos coloridos, portanto, representam aqueles miRNAs com sua expressão alterada de forma significativa.....47

Figura 6B - O teste não paramétrico de Mann-Whitney e, para a detecção de *outliers*, o método ROUT (baseado na taxa de descoberta falsa - FDR) foram usados para comparar os dois grupos, usando os valores de ΔCt após a normalização da média global e o cálculo da expressão relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$

(alteração de dobra) para cada miRNA. Considerando o valor de $P \leq 0,05$ como estatisticamente significativo.47

Figura 7 - (A) A curva ROC para cada miRNA individual produziu os dois maiores valores de AUC de 0,8333 [intervalo de confiança (IC) de 95%, 0,6622-1,000; valor de $P = 0,0047$] e 0,8178 (IC de 95%, 0,6640-0,9715; valor de $P = 0,0030$) para hsa-miR-770-5p e hsa-miR-30d-5p, respectivamente. (B) Comparação das curvas ROC isoladas dos miR30d e 770-5p com as três maiores AUC de microRNAs combinados.50

Figura 8 - (A) As 15 principais vias canônicas mais significativamente enriquecidas, representadas como gráficos de barras empilhadas. O número total de moléculas em cada via está na parte superior de cada barra representada. A principal via enriquecida foi a "Via de sinalização hepática da apelina", com 14 das 26 moléculas da via (53,8%), contendo o maior número de alvos dos miRNAs desregulados. (B) Diagrama de cordas que representa a quantidade de conexão entre as cinco vias canônicas relacionadas à via de sinalização da apelina: no fígado, endotelial, músculo/cardiomiócito, fibroblastos cardíacos e pâncreas, com várias entidades ou nós (gene/proteína/miRNAs) dentro dessas vias ou indiretamente conectados aos nós das vias. Quanto mais inter-relacionamento e conexões o nó tiver, mais relevante será, além de representado por cores diferentes. O tamanho era proporcional ao número de conexões. Nesse diagrama específico, as cores dos acordes foram parcialmente misturadas com as cores de suas entidades conectadas.53

Figura 9 - Via canônica de sinalização da apelina em diferentes tecidos: A) hepatócito; B) cardiomiócito; C) fibroblasto cardíaco; D) célula pancreática; E) endotélio e célula muscular lisa vascular. Os miRNAs estão indicados em verde e vermelho, representando sua expressão aumentada e diminuída, respectivamente. As moléculas e efeitos estão em laranja e azul, representando seus efeitos aumentados e diminuídos, respectivamente.....60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre os grupos vasoplegia e não vasoplegia quanto às variáveis pré, intra e pós-operatórias. Os dados são apresentados como número de pacientes e porcentagem entre parênteses para variáveis dicotômicas ou mediana e intervalo interquartil (IQR) ou desvio-padrão (S.D). Os símbolos *** representam $p < 0.0001$33

Tabela 2 - Lista dos microRNAs com expressão alterada, seu símbolo, miRbaseID, valor da alteração e valor p.....46

Tabela 3 - Tabela mostrando valores de AUC de cada miRNA isoladamente. Maior AUC obtida ocorreu com o hsa-miR-30d e com o hsa-miR-770-5p.....49

Tabela 4 - Tabela mostrando valores de AUC da combinação de todos os pares de miRNAs possíveis. Maior AUC obtida ocorreu com a combinação do hsa-miR-30d com o hsa-miR-770-5p. A combinação desses dois miRNAs produziu um valor de AUC de 0,9615 (IC95%, 0,973-0,999; $P < 0,0001$) com sensibilidade de 84,6% e especificidade de 91,67% na distinção entre pacientes dos grupos VASO e NONVASO.49

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AUC - Área sob a curva
APLN - Apelina
APLNR - Receptor de apelina
ATII - Angiotensina II
BAVT - Bloqueio atrioventricular total
BMPRII - Receptor de proteína morfogênica óssea tipo II
CABG - *Coronary artery by-pass grafting*
CAT - Catalase
CEC - Circulação extracorpórea
COL5a3 - Colágeno tipo 1
DAC - Doença arterial coronariana
DC - Débito cardíaco
Dyn/cm⁵/m² - *Dyne* por centímetro à quinta, por metro quadrado
Dyn/s/cm - *Dyne* por segundo, por centímetro
EDN1 - Endotelina 1
EDN3 - Endotelina 3
eNOS - NO sintase endotelial
GSK3b - Glicogênio sintase quinase beta
HIF1 - Fator de transcrição induzível por hipóxia 1
HP - Hipertensão arterial pulmonar
IQR - Intervalo interquartil
IC - Índice cardíaco
IECA - Inibidor da enzima conversora de angiotensina
IL1 - Interleucina 1
IL6 - Interleucina 6
InCor – Instituto do Coração
HCFMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IPA - *Ingenuity Pathways Analysis*
IRVS - Índice de resistência vascular sistêmica
IRS1 - Receptor da insulina 1
L/min/m² - Litro por minuto por metro quadrado
MB - Azul de metileno
miRNA - microRNA
NE - Noradrenalina
NONVASO - Grupo não vasoplégico
NO - Óxido nítrico
OR - *Odds ratio*

PAM - Pressão arterial média
PA - Pressão arterial
REDCAP - *Research Electronic Data Capture*
RVM – Revascularização miocárdica
RVS - Resistência vascular sistêmica
SARA - Síndrome da angústia respiratória aguda
SCA - Síndrome coronariana aguda
SD – Desvio-padrão
SIRS - Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SV - Síndrome vasoplégica
TM - Marca não registrada
TNFA - Fator de necrose tumoral alfa
VCAM - Molécula de adesão celular vascular 1
VASO - Grupo vasoplégico
® - Marca registrada
% - Porcentagem
> - Maior que
< - Menor que
= - igual a

Resumo

Souza RC. Análise da expressão de miRNAs em pacientes que evoluíram para síndrome vasoplégica após cirurgia de revascularização miocárdica com circulação extracorpórea [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Introdução: A Síndrome Vasoplégica (SV) é uma complicação frequente e letal no pós-operatório de cirurgias cardíacas com circulação extracorpórea (CEC), de difícil previsão e manejo. Caracteriza-se por um estado de baixa resistência vascular sistêmica (RVS) e elevado índice cardíaco (IC). Sua incidência na literatura varia de 9% a 44% dos pacientes operados, enquanto sua mortalidade pode chegar a 25% dos casos. MicroRNAs (miRNAs), uma classe de pequenas moléculas não codificantes de RNA responsáveis pela regulação pós-transcrição da expressão gênica. **Objetivos:** Identificar miRNAs capazes de prever quais pacientes evoluem para SV após RVM com CEC e avaliar as potenciais consequências orgânicas da exposição à CEC, por meio do perfil de miRNAs e dos seus alvos celulares por bioinformática. **Métodos:** Estudo de caráter exploratório, caso-controle aninhado a uma coorte de 87 pacientes de baixo risco cirúrgico, submetidos à revascularização do miocárdio (RVM) com CEC entre janeiro de 2018 e dezembro de 2019. Quinze pacientes que evoluíram com SV (Grupo VASO) foram comparados com 15 que não evoluíram (NONVASO) quanto ao perfil de miRNA em amostras de sangue periférico coletado antes do procedimento cirúrgico. Durante o acompanhamento, os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes incluídos foram coletados para o banco de dados do *Research Electronic Data Capture* (REDCAP). Baseados nas alterações encontradas nos miRNAs, realizamos análise computacional para previsão dos potenciais alvos moleculares deste perfil de miRNAs e as consequências orgânicas, por meio do *software Ingenuity Pathways Analysis* (IPA). **Resultados:** Encontramos que 7 miRNAs encontravam-se com sua expressão significativamente alterada no grupo VASO em comparação com o grupo NONVASO. A combinação do miR-30d com o miR-770-5p apresentou AUC de 0,9615 (IC95%, 0,973-0,999; $P < 0,0001$) com sensibilidade de 84,6% e especificidade de 91,67% na distinção entre pacientes dos grupos VASO e NONVASO. A previsão de alvos por bioinformática aponta que este perfil de miRNA no grupo VASO enriquece e altera a via da molécula apelina (APLN) e seu receptor (APLNR), moléculas responsáveis pela regulação do tônus vascular. **Conclusão:** A associação dos microRNAs miR-30d e miR-770-5p representa um potencial biomarcador capaz de distinguir aqueles pacientes que irão desenvolver SV após RVM com CEC. A molécula APLN pode ter importante participação na SV pós CEC.

Palavras-chave: Vasoplegia. Choque. Revascularização miocárdica.
MicroRNAs. MicroRNA circulante. Biomarcadores.

Abstract

Souza RC. Analysis of miRNA expression in patients who developed vasoplegic syndrome after on-pump coronary artery bypass grafting [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

Introduction: Vasoplegic syndrome (VS) is a frequent and lethal complication in the postoperative period of cardiac surgeries with cardiopulmonary bypass (CPB), difficult to predict and manage. It is characterized by a state of low systemic vascular resistance (SVR) and high cardiac index (CI). Its incidence in the literature ranges from 9 to 44% of operated patients, while its mortality can reach 25% of cases. MicroRNAs (miRNAs), a class of small non-coding RNA molecules responsible for post-transcriptional regulation of gene expression.

Objectives: To identify miRNAs able to predict which patients evolve to VS after on-pump CABG and; To evaluate the potential organic consequences of exposure to CPB, through the profile of miRNAs and their cellular targets by bioinformatics.

Methods: Exploratory, case-control study nested to a cohort of 87 low surgical risk patients undergoing on-pump CABG between January 2018 and December 2019. Fifteen patients who evolved with VS (VASO Group) were compared with 15 who did not (NONVASO) for miRNA profile in peripheral blood samples collected before the surgical procedure. During follow-up, clinical and laboratory data from the included patients were collected into the Research Electronic Data Capture (REDCAP) database. Based on the changes found in miRNAs, we performed computational analysis to predict the potential molecular targets of this miRNA profile and the organic consequences, using the Ingenuity Pathways Analysis (IPA) software.

Results: We found that 7 miRNAs had their expression significantly altered in the VASO group compared to the NONVASO group. The combination of miR-30d with miR-770-5p showed an AUC of 0.9615 (95% CI, 0.973-0.999; $P < 0.0001$) with sensitivity of 84.6% and specificity of 91.67% in distinguishing between patients in the VASO and NONVASO groups. Target prediction by bioinformatics points out that this miRNA profile in the VASO group enriches and alters the Apelin molecule pathway (APLN) and its receptor (APLNR), molecules responsible for vascular tone regulation.

Conclusion: The association of microRNAs miR-30d and miR-770-5p, represents a potential biomarker capable of distinguishing those patients who will develop VS after on-pump CABG. The APLN molecule may have an important role in SV after CPB.

Keywords: Vasoplegia. Shock. Myocardial revascularization. MicroRNAs. Circulating microRNA. Biomarkers.

1 – Introdução

A doença arterial coronariana (DAC) permanece entre as principais causas de morte nos países ocidentais. A cirurgia de revascularização do miocárdio (RVM) continua sendo a estratégia de revascularização de escolha para pacientes com padrão coronariano triarterial, lesão de tronco de coronária esquerda, diabéticos e paciente com disfunção importante do ventrículo esquerdo. (1) Apesar de a RVM constituir uma ferramenta valiosa no tratamento da DAC, a morbimortalidade perioperatória é uma preocupação constante por parte de cirurgiões, intensivistas e cardiologistas.

A Síndrome Vasoplégica (SV) é uma complicação frequente e letal no pós-operatório de cirurgias cardíacas com CEC. Trata-se de um estado de hipotensão importante, baixa resistência vascular sistêmica (RVS) e débito cardíaco (DC) normal ou elevado. (2,3) O primeiro relato que se tem na literatura da Síndrome Vasoplégica pós-CEC data de 1977, uma série de dois casos publicados por Akin e colaboradores. Eles observaram que os dois pacientes apresentaram um quadro até então desconhecido, de hipotensão associada a um índice cardíaco normal e resistência vascular sistêmica reduzida, sendo necessário o emprego de drogas vasopressoras. Isso chamou a atenção, uma vez que o esperado após o emprego da circulação extracorpórea eram resistências vasculares elevadas no período pós-operatório. (4)

Sua incidência na literatura varia de 9% a 44% dos pacientes operados, enquanto sua mortalidade pode chegar a 25% dos casos. (3,5) Essa divergência nos dados existe por não haver um consenso universal sobre esta condição e os diversos autores usarem diferentes parâmetros em seus estudos. (6)

A etiologia da síndrome vasoplégica após cirurgia cardíaca ainda não foi totalmente elucidada e muito do que se sabe hoje é trazido do conhecimento sobre choque séptico. (7,8) O modelo atual acredita que o contato do sangue com a superfície artificial da CEC e o trauma cirúrgico levam a uma série de alterações neuro-humorais e de mediadores inflamatórios (IL-6, TNF-A e IL-1) que resultem em uma Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS), além de deficiência na resposta de tônus vascular transitória e aumento da produção de óxido nítrico (NO). Sabe-se que os níveis de vasopressina (VP), noradrenalina (NE) e angiotensina II (ATII) passam por um primeiro momento de aumento dos seus níveis plasmáticos, seguido por sua depleção na hipófise, resultando em um segundo momento de baixos níveis plasmáticos e contribuindo para a vasodilatação. (7,9)

Nas últimas décadas foram desenvolvidos e validados sistemas de pontuação que tentam estimar o risco destas complicações antes que a cirurgia ocorra. O *Euroscore* e o *STS score* são os dois principais neste cenário e, com base em comorbidades e outras questões clínicas, fornecem valores estimados da mortalidade pós-operatória, insuficiência renal aguda, acidente vascular cerebral, ventilação mecânica prolongada, infecção profunda de ferida operatória, reoperação e internação prolongada. No entanto, eles não possuem a capacidade de prever se o paciente terá maior risco de Síndrome Vasoplégica (SV) após a intervenção cirúrgica(10–13). Nesse sentido de previsibilidade de doenças, os microRNAs têm se mostrado moléculas com importante utilidade.

MicroRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificantes, descobertas em 1993 no estudo do desenvolvimento da larva do nematódeo

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*). (14) Eles atuam regulando a tradução de outros miRNAs em proteínas, uma vez que se ligam aos RNAm, impedindo que seja traduzido pelo ribossomo em uma proteína. Dessa maneira, são responsáveis pela regulação de diversos processos de um organismo, como desenvolvimento, diferenciação celular, metabolismo e outros. (15)

Após a descoberta inicial das moléculas de miRNAs, sua utilidade como biomarcador foi testada e comprovada para doenças inflamatórias, cardiovasculares e diversos tipos de neoplasias malignas. (15–17)

Sabendo que a Síndrome Vasoplégica é uma complicação cuja etiologia faz parte do espectro inflamatório sistêmico pós-CEC, inserido no contexto de doenças cardiovasculares, hipotetizamos que os miRNAs teriam potencial de serem preditores deste mal, uma vez que a literatura mostra que eles funcionam como ótimos biomarcadores de doenças cardiovasculares. Os escores clínicos mais comuns não podem ser usados para prever a Síndrome Vasoplégica (SV).

Doenças graves e grandes cirurgias beneficiam-se de biomarcadores que são capazes de diagnosticar ou identificar o risco aumentado de complicações futuras, uma vez que isto evita mortes e complicações. MicroRNAs (miRNAs), uma classe de pequenas moléculas não codificantes de RNA responsáveis pela regulação pós-transcrição da expressão gênica, influenciam negativamente a expressão de um conjunto discreto de genes e surgiram para desempenhar um papel crítico na fisiologia e patogênese de várias doenças, além do emprego na área de diagnóstico. Levantamos a hipótese de que a quantificação de miRNA anteriormente à RVM poderia funcionar como biomarcador periférico sensível,

capaz de prever a SV. Para testar nossa hipótese, examinamos 754 miRNAs por PCR, em tempo real, em amostras de sangue total, coletadas de pacientes antes da cirurgia eletiva de revascularização do miocárdio com CEC, e comparamos os perfis de miRNA de pacientes que evoluíram (VASO) *versus* não evoluíram com SV (NONVASO) após a cirurgia. Além disso, realizamos análises computacionais para avaliar o papel potencial e a conexão entre os miRNAs e a fisiopatologia da SV.

2 – Objetivos

I2.1 - Objetivo geral

Estudar a relação do miRNA no desenvolvimento da Síndrome Vasoplégica em pacientes submetidos à revascularização do miocárdio por uso de circulação extracorpórea.

2.2 - Objetivos específicos:

- Identificar miRNAs capazes de prever quais pacientes evoluem para SV após RVM com CEC.
- Avaliar as potenciais consequências orgânicas da exposição à CEC, por meio do perfil de miRNAs e dos seus alvos celulares por bioinformática.

3 – Revisão da Literatura

3.1 – Definição de Síndrome Vasoplégica após cirurgia cardíaca

Em 1977, David Arkin e colaboradores descreveram dois casos de hipotensão após circulação extracorpórea (CEC) para realização de troca valvar aórtica. Os dois pacientes apresentaram quadros semelhantes dez minutos após o fim da circulação extracorpórea, constituído por um estado de pressão arterial baixa, elevado índice cardíaco e reduzida resistência vascular sistêmica. Para as aferições hemodinâmicas foi utilizado o método de termodiluição com cateter de Swan-Ganz. O paciente necessitou ser reabordado para retirada de um corpo estranho deixado na cirurgia e voltou a apresentar o quadro descrito após a CEC, na reabordagem. Cabe ressaltar que a descrição de Arkin limita-se a constatar dois quadros de hipotensão com índice cardíaco normal após a exposição à CEC, sem observar nem relatar a história natural e consequências deste quadro para o paciente. (4)

Os primeiros pesquisadores a descreverem detalhadamente a Síndrome Vasoplégica, sua evolução e a associação com maior mortalidade e complicações foram Walter Gomes e colaboradores. Em 1994, descreveram uma série de seis casos de pacientes operados que evoluíram para um estado de elevado índice cardíaco, baixa pressão arterial média e baixa resistência vascular sistêmica, atribuindo como possível causa o início do uso de cardioplegia sanguínea fria no serviço. Posteriormente, em 1996, descreveram uma série de 12 casos de pacientes operados com uso de circulação extracorpórea (CEC) que evoluíram com a já denominada Síndrome Vasoplégica

(SV). Assim como David Arkin, encontraram que a infusão de volume intravenoso não seria suficiente para a melhora dos níveis pressóricos, sendo necessário o uso de vasoconstritores como a noradrenalina até a reversão do quadro. Em sua revisão bibliográfica, descrevem todo o conhecimento da época, associam este estado a um padrão de sangramento difuso, acreditando ter como causa a resposta inflamatória sistêmica provocada pelo contato do sangue com o material empregado na máquina de circulação extracorpórea. Nesses 12 pacientes descritos, houve 25% de mortalidade (3 de 12) e 11 tiveram complicações durante a internação, a saber: sepse, pneumonia, acidente vascular cerebral isquêmico, hemorragia importante, insuficiência renal aguda, bloqueio atrioventricular total (BAVT), síndrome da angústia respiratória aguda (SARA), convulsão e parada cardíaca revertida. (18,19)

O conceito de SV permanece, até hoje, da mesma forma de quando foi descrito pela primeira vez. Sabe-se que é um estado de hipotensão importante, com baixa resistência vascular sistêmica e índice cardíaco normal ou elevado. Por outro lado, não há uma definição por parâmetros hemodinâmicos que seja universalmente aceita. Diversos autores utilizaram diferentes parâmetros e cortes ao estudar o assunto e isso dificulta a compreensão adequada desta síndrome. (6) Apesar da diversidade de definições, um índice cardíaco (IC) maior ou igual a 2,2 L/min/m² associado a uma pressão arterial média (PAM) menor que 65 mmHg, mesmo após uma reposição volêmica inicial, é compatível com quadro de SV.

Jentzer e colaboradores propuseram a utilização do uso de doses de, pelo menos, 0,5 mcg/kg/min de noradrenalina ou a dose equivalente de outros

vasopressores, uma vez que esta dose é a que define uma alta dose de vasopressor e está associada a uma mortalidade hospitalar maior do que 50%. (20) Busse, em seu artigo de revisão, define SV sem utilizar a pressão arterial média, bastando o índice cardíaco maior que 2,2 L/kg/m² e a resistência vascular sistêmica menor do que 800 dyn/s/cm dentro das 24h pós CEC. (7) Jacob e colaboradores entenderam que SV está instalada quando não se consegue atingir uma PAM de 65 mmHg com doses baixas de catecolaminas, sendo necessário doses altas destes fármacos associados a outros vasopressores não catecolaminas e infusão de cristaloides. (5) Durán definiu SV em seu trabalho de forma mais elaborada, com PAM < 50 mmHg, RVS menor que 800 dyn/s/cm (IRVS 1.400 dyn/cm⁵/m²), IC maior que 2,2 L/min/m² refratário a 3 bolus de fenilefrina e com necessidade de dose de noradrenalina maior do que 0,08 mcg/kg/min, após correção da volemia e dos parâmetros hematimétricos. (21)

Também já foi proposta uma classificação da SV em graus de gravidade de acordo com a PAM e a quantidade de vasopressores utilizados: leve, quando a PAM oscila entre 50 mmHg e 60 mmHg com necessidade de um vasopressor; moderada, quando a PAM oscila entre 50 mmHg e 60 mmHg com necessidade de dois vasopressores ou PAM < 50 mmHg com necessidade de um vasopressor; grave, quando a PAM permanece < 50 mmHg e há necessidade de dois vasopressores para restaurar os níveis mínimos de pressão arterial. (22)

3.2 – Incidência, fatores de risco e mortalidade

O choque circulatório, de maneira geral, resulta de quatro mecanismos fisiopatológicos essencialmente: hipovolemia, cardiogênico, obstrutivo e

distributivo. O choque séptico, que é uma forma de choque distributivo, é o de maior incidência no mundo, chegando a aproximadamente 62% dos casos. Os outros tipos de choque distributivos, isto inclui o choque vasoplégico após cirurgia cardíaca, correspondem a 4% dos choques de que se tem registro.

Conforme explicado anteriormente, a carência de definição por parâmetros hemodinâmicos aceita universalmente dificulta diversos aspectos do estudo adequado da vasoplegia pós-cirurgia cardíaca. Por este motivo observamos grande variação na incidência relatada. A literatura de revisão refere sua ocorrência entre 9% e 44% dos pacientes submetidos à cirurgia com CEC. (3) Em alguns subgrupos de pacientes, a incidência de vasoplegia é maior, como no caso de pacientes renais crônicos dialíticos, conforme relatado por Hossne Junior e colaboradores. (23)

A mortalidade, quando do seu diagnóstico, pode chegar a 25%, o que representa um risco proibitivo, uma vez que cirurgias eletivas cardíacas podem ter mortalidade esperada de menos de 1%. Percebe-se, então, o enorme problema que a VP e sua imprevisibilidade são no contexto perioperatório. (3,20,24)

Alguns fatores mostram associação positiva com a ocorrência de vasoplegia em diversos contextos. Muitos deles estão diretamente relacionados a várias situações comumente vistas no perioperatório de cirurgia cardíaca. Os principais são: transfusão sanguínea; exposição à circulação extracorpórea; transplante de órgãos, trauma, queimaduras e sepse; dispositivos de assistência ventricular; medicações.

Alfirevic e sua equipe realizaram um estudo para analisar a incidência de síndrome vasoplégica (SV) após cirurgias cardíacas com circulação

extracorpórea, identificando possíveis fatores de risco e investigando o papel da transfusão de sangue no desenvolvimento da SV. Foram avaliados 25.960 pacientes e a ocorrência de SV foi definida como leve, quando houve necessidade de infusão de norepinefrina no dia da cirurgia ou no primeiro dia de pós-operatório; ou profunda, quando houve necessidade de vasopressina com ou sem infusão de norepinefrina. Os resultados indicaram que a transfusão de concentrado de hemácias aumentou o risco de SV leve (OR ajustado = 1,07) e SV profunda (OR ajustado = 1,38), enquanto a transfusão de plasma fresco congelado e plaquetas também aumentaram o risco de SV. Foi observado um aumento dependente da dose no desenvolvimento de SV com cada unidade de concentrado de hemácias transfundida. (25)

A exposição à circulação extracorpórea parece ser o grande responsável pelo desencadeamento da SV no cenário da cirurgia cardíaca. Além disso, a temperatura atingida durante a CEC e o tempo de exposição à mesma também parecem influenciar. Levin e colaboradores demonstraram que não apenas a exposição, mas também a resposta da curva de pressão arterial (PA) na entrada de CEC pode ser um importante fator preditor de vasoplegia no pós-operatório. A probabilidade de um paciente com área sobre a curva de declínio de PA > 0 desenvolver vasoplegia no pós-operatório foi de 23% contra 16% daqueles que não apresentaram essa área detectável. Outro achado interessante de Levin foi que o tempo de CEC funcionou como fator de risco independente, com aumento do OR de 1.38 para cada 30 minutos de exposição.(26)

Hosne Junior e colaboradores fizeram uma análise retrospectiva de 50 doentes renais crônicos dialíticos submetidos à cirurgia de revascularização com (30 pacientes) e sem CEC (20 pacientes). Houve 30% de incidência de

vasoplegia no grupo submetido à cirurgia com CEC contra 3% no grupo sem CEC. No entanto, é importante observar que o grupo de cirurgia com CEC recebeu mais transfusão de sangue, que é um potencial desencadeador de vasoplegia. (23) Sun e colaboradores realizaram uma análise retrospectiva de 696 pacientes submetidos à cirurgia de revascularização com e sem CEC. A incidência de vasoplegia no grupo foi de 4,7%, sendo 6,9% no grupo com CEC e 2,8% no grupo sem CEC. Além disso, SV esteve relacionada com maior tempo de internação em UTI, maior tempo de hospitalização e ventilação mecânica prolongada. (27)

Os inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) e bloqueadores do receptor da aldosterona (BRA) são a classe de medicamentos mais estudada quanto à sua influência na resposta vasoplégica. Embora a evidência não seja robusta, o que se tem de conhecimento, até agora, embasa a decisão de suspender o uso de IECA / BRA antes de cirurgias cardíacas com CEC. Para investigar o efeito da interrupção desses medicamentos antes da cirurgia, Raja e Fida analisaram 421 publicações no *Medline/PubMed*; eles encontraram 11 artigos, incluindo três ensaios clínicos randomizados com amostras pequenas, que representaram as melhores evidências disponíveis sobre o assunto. Concluíram que a administração de IECA/BRA antes da cirurgia cardíaca contribui para a ocorrência de vasoplegia no pós-operatório e, com base na evidência até agora, a interrupção desses medicamentos antes da cirurgia cardíaca parece ser uma estratégia válida para evitar a SV no período pós-operatório. (28,29) Roshanov e colaboradores realizaram a análise de uma amostra de pacientes selecionados para a coorte prospectiva *VISION* de 14.687 pacientes submetidos a cirurgia não cardíaca. Esta análise encontrou que o

grupo de pacientes que suspendeu a medicação antes da cirurgia teve menos morte, menos hipotensão intraoperatória e menos eventos vasculares. (30)

Outra medicação menos estudada, mas que chama a atenção quanto aos seus potenciais efeitos vasoplégicos desde a década de 1980 é a amiodarona. Van Dyck e colaboradores relataram, em 1988, uma série de 37 casos de pacientes submetidos a diversos procedimentos cirúrgicos em uso de amiodarona, com elevada taxa de complicações diversas, incluindo um caso fatal de vasoplegia. Shein, em 1999, também relatou um caso de vasoplegia severa após infusão de amiodarona em um paciente submetido a angioplastia coronariana. (2) Já em 2017, Mehaffey e colaboradores estudaram todos os pacientes que foram submetidos a cirurgia cardíaca com CEC entre 2011 e 2016 em seu hospital. Compararam os desfechos e características dos 118 pacientes vasoplégicos que usaram azul de metileno (MB) com outros 3.490 que não necessitaram dessa medicação. Um dos achados foi que 46% dos pacientes vasoplégicos em uso de MB apresentaram o desfecho composto “morte em 30 dias, acidente vascular cerebral, insuficiência renal, reoperação, infecção profunda da ferida esternal ou ventilação prolongada”. Dentre esses pacientes, observaram que a incidência de MAE é menor naqueles que recebem azul de metileno de forma precoce em comparação aos que o recebem tardiamente. Administração precoce de MB foi definida como infusão da dose na sala de cirurgia, enquanto administração tardia de MB foi a infusão na unidade intensiva. Apesar de ser um trabalho com diversos vieses, é interessante o achado de que 15,3% dos vasoplégicos utilizavam amiodarona antes da cirurgia, contra apenas 2,2% dos não vasoplégicos. (31)

3.3 – Fisiopatologia

Apesar de o mecanismo fisiopatológico da SV pós-RVM ser mal compreendido, acredita-se que ela seja causada por diversos fatores simultaneamente: a resposta inflamatória sistêmica em consequência ao trauma cirúrgico e à CEC com aumento da produção de NO; deficiência de vasopressina e ativação de canais de potássio da musculatura lisa vascular. Todos esses fatores formam uma rede que resulta em um estado de vasodilatação refratária a vasopressores. O contato das proteínas do plasma humano com as biomembranas do circuito de CEC leva a alterações conformacionais, e estas passam a expressar receptores para células e a interagir com outras proteínas plasmáticas. Essas interações resultam na ativação de quatro sistemas: o sistema de contato, a via intrínseca da coagulação, a via extrínseca da coagulação, o sistema complemento e a fibrinólise. A ativação desses sistemas resulta na produção de bradicinina e caliceína (contato), trombina e fibrina (vias da coagulação), C5a e complexo terminal do complemento (sistema complemento), resultando no início das alterações celulares inflamatórias. Dentre estas alterações celulares está a que ocorre com os leucócitos, plaquetas e macrófagos. Os produtos das vias descritas acima ativam estas células, principalmente por meio da caliceína e C5a que passam a liberar enzimas proteolíticas, espécies reativas de oxigênio, conteúdos granulares e citadinas que levam as células endoteliais a produzirem NO e prostaciclina. Em paralelo a esta cascata inflamatória inicial, outra via que contribui para a resposta inflamatória, resultando na vasoplegia, é a lesão celular que ocorre no reservatório de cardiologia. Restos de hemácias hemolisadas, agregados

moleculares e proteínas desnaturadas entopem pequenos capilares, aumentando a resposta inflamatória. Outra via de lesão inflamatória é a de isquemia-reperfusão a qual ocorre com a abertura do clampe aórtico, levando à produção de espécies reativas de oxigênio que causam dano direto a proteínas, lipídios ao material genético celular. (32)

Observa-se, também, no período pós-cirurgia cardíaca, a redução dos níveis plasmáticos de vasopressina. Acredita-se, inicialmente, que o estado de choque induza secreção excessiva deste hormônio vasoconstritor, mediado por barorreflexo, seguido do seu esgotamento das reservas contidas na hipófise.

Na membrana da célula muscular lisa vascular, a deficiência de vasopressina e o aumento do óxido nítrico levam à ativação e abertura de canais de potássio sensíveis à ATP, resultando em hiperpolarização da membrana e diminuindo a entrada de cálcio na célula através de canais de cálcio-voltagem dependentes. A redução da entrada de cálcio na célula leva à desfosforilação da cadeia leve de miosina, aumento de GMP cíclico intracelular. Essas alterações levam à menor interação da actina e miosina e relaxamento da musculatura lisa vascular, isto é, vasodilatação. Importante ressaltar que grande parte do conhecimento e do modelo fisiopatológico da vasoplegia pós-CEC, na verdade, é uma adaptação do mesmo modelo de vasoplegia que ocorre na sepse, quando há uma resposta a um microrganismo patogênico. (2,5)

3.4 Tratamento da vasoplegia

O tratamento da vasoplegia, atualmente, baseia-se numa fase inicial de tentativa de aumentar o volume intravascular com reposição de cristaloides. Na

verdade, esta reposição funciona muitas vezes como uma estratégia diagnóstica, por ser uma prova terapêutica para excluir o diagnóstico de choque por hipovolemia. A noradrenalina constitui, atualmente, a medicação de primeira escolha para o tratamento da vasoplegia em sua forma inicial. Baseado no que se especula sobre a fisiopatologia da doença, e caso haja necessidade de maiores doses de catecolaminas, o tratamento é voltado para reposição de vasopressina. Uma droga menos estudada, mas bastante utilizada como linha final do tratamento é o azul de metileno. Por último, a hidroxicoalamina também parece apresentar benefício para este grupo de pacientes.

Como primeira droga de escolha, a norepinefrina é um vasopressor altamente eficaz, capaz de aumentar a pressão arterial e do volume sistólico diastólico final por meio da mobilização do volume esplâncnico não estressado e um efeito direto nos miócitos cardíacos por estimulação dos receptores β_1 adrenérgicos. O efeito sobre a frequência cardíaca é mínimo. Demais vantagens da norepinefrina sobre outros vasopressores são um efeito vasopressor forte, comparável à epinefrina e à fenilefrina, superior ao da dopamina; permite a utilização dos níveis de lactato para orientar a ressuscitação; aumenta o índice cardíaco sem aumentar a frequência cardíaca, portanto, sem aumentar demais o consumo de oxigênio pelo miocárdio, diferentemente da dopamina e epinefrina. No entanto, os vasopressores adrenérgicos têm efeitos colaterais potenciais, como aumento do estresse oxidativo, interação com o metabolismo energético celular e, ou modulação da resposta inflamatória, resultando no novo conceito de "de catecolaminização", que preconiza o uso de vasopressores não catecolamínicos para reduzir a exposição a catecolaminas. (8)

Neste contexto de descatecolaminização, entra a vasopressina, um vasoconstritor potente, que se mostra útil para tratamento baseado no que se sabe da fisiopatologia da vasoplegia. (3) Em pacientes com choque séptico, o efeito deletério de uso de catecolaminas em dose alta (noradrenalina > 0,5 mcg/Kg/min) levou o *Surviving Sepsis Campaign* a sugerir a associação de vasopressina 0,03 U/min visando a diminuir a dose de noradrenalina. O estudo VANCS, desenvolvido no InCor – FMUSP, comparou os efeitos da vasopressina e da noradrenalina nos pacientes vasoplégicos após cirurgia cardíaca. Dos 151 pacientes do grupo noradrenalina, o desfecho primário ocorreu em 74 (49.0%; IC 95%, 41.0% a 57.0%), contra 48 (32.2%; IC 95%, 24.7% a 39.7%) no grupo da vasopressina. Além disso, é importante ressaltar que o grupo vasopressina teve menor ocorrência de insuficiência renal aguda e de fibrilação atrial. Baseados nesses resultados, os autores sugerem que a vasopressina seja a droga de primeira linha na SV. (33) Gordon e colaboradores estudaram, ainda, a associação de hidrocortisona à terapia vasoconstritora, tanto noradrenalina quanto vasopressina em pacientes com choque distributivo por sepse em 409 pacientes. O desfecho primário foi o número de dias sem insuficiência renal durante o período de 28 dias após a randomização. Não houve diferença significativa de mortalidade entre os grupos. A adição do corticoide não mostrou melhora no número de dias livres de insuficiência renal, bem como não houve diferença significativa no desfecho quanto ao tipo de vasopressor usado. O número de sobreviventes que nunca desenvolveram insuficiência renal foi 94 de 165 pacientes (57.0%) no grupo da vasopressina e 93 de 157 pacientes (59.2%) no grupo da norepinefrina (diferença, -2.3% [IC 95%, -13.0% a 8.5%]). No entanto, um dado interessante deste estudo foi que houve menos utilização de

terapia de substituição renal no grupo da vasopressina do que no grupo da norepinefrina (25.4% para a vasopressina vs 35.3% para a norepinefrina; diferença, -9.9% [IC 95%, -19.3% a -0.6%]). (34)

O tratamento com azul de metileno (MB) tem sido proposto para SV pós CEC e para tratamento de choque séptico e queimaduras graves. Seu mecanismo de ação não consiste em ser um vasoconstritor direto, mas para inibir a produção endotelial de óxido nítrico (NO) pelo bloqueio do sistema do GMP cíclico, sem causar disfunção endotelial. Isso permite que ocorra o efeito vasoconstritor da noradrenalina. (2)

A dose de ataque de 1,5 mg/kg a 2 mg/kg parece trazer benefícios como a redução da quantidade de catecolaminas infundidas e redução da mortalidade.

(35) Ozal e colaboradores estudaram o uso profilático de MB na dose de 2 mg/Kg uma hora antes da cirurgia em cem pacientes submetidos à revascularização miocárdica com CEC. Mesmo sendo classificados como pacientes de alto risco para vasoplegia, uma vez que não eram suspensas as medicações como IECA e antagonistas de canal de cálcio, obtiveram 0% de incidência de vasoplegia contra 26% no grupo que não usou MB no pré-operatório. (36)

Existe uma preocupação quanto aos seus potenciais efeitos deletérios no organismo, como lesão endotelial, síndrome serotoninérgica. Meinardi e colaboradores estudaram o potencial de lesão endotelial em modelo animal na dose de 3 mg/Kg de MB; no entanto, a lesão não foi confirmada. (37) Top e colaboradores relataram um caso fatal de síndrome serotoninérgica em um paciente usuário de venlafaxina A. O paciente recebeu azul de metileno antes da cirurgia e, no pós-operatório, iniciou o quadro com agitação, redução da consciência, dilatação pupilar, clonos ocular, disartria, hiperatividade

neuromuscular e hiper-reflexia, predominantemente nos membros inferiores. Evoluiu com sudorese, hipersalivação, opistótono e uma síndrome piramidal bilateral. Após nove horas começou a apresentar hipertermia com pico de 43 graus e refratariedade aos vasopressores e à infusão de volume. (38) Outros relatos de caso com revisão de literatura apontam que o uso prévio de medicações como inibidores da MAO oxidase e inibidores da recaptção de serotonina podem favorecer seu aparecimento com o uso de azul de metileno. (39)

A hidroxicoalamina é uma vitamina do complexo B conhecida como vitamina B12 e pode ser obtida pela alimentação de origem animal. O relato de caso de Roderique chama a atenção para um paciente que apresentou vasoplegia durante o curso da CEC que respondeu satisfatoriamente à infusão de 5 g de hidroxicoalamina 70 minutos após o início do *by-pass*, com redução significativa das doses de vasopressores e aumento da pressão arterial média. (40)

Woehlck relatou um caso de choque por vasodilatação durante um transplante hepático, inicialmente tratado com vasopressina. Evoluiu com piora da perfusão periférica percebida pela perda da curva do oxímetro. A avaliação dos parâmetros hemodinâmicos pelo cateter de termodiluição indicava vasoconstrição periférica e foi necessário interromper a vasopressina, que foi substituída por azul de metileno. Para não exceder a dose de 5 mg/Kg/h, associaram hidroxicoalamina 2 g, dividida em doses de 250 mg a cada 30 minutos e, desta forma, obtiveram boa resposta pressórica. Além disso, uma hora após o término da cirurgia administraram mais 1 g de hidroxicoalamina que contribuiu para a redução dos níveis de noradrenalina. (41)

3.5 – MicroRNAs e suas aplicações como biomarcadores

Em 1993, Lee e colaboradores descreveram o primeiro miRNA em um trabalho que estudava a regulação gênica durante o desenvolvimento larval do nematódeo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Eles observaram que uma pequena molécula de RNAm transcrita a partir do gene *lin-4* não era traduzida em uma proteína. Esse RNA, na verdade, apresentava uma sequência de nucleotídeos complementar à da região 3' não traduzida (UTR) do RNAm *lin-14*, ligava-se a ele e inibia a sua tradução. (14)

Em 2000, Reinhart, Slack e colaboradores identificaram o *let-7*, um miRNA de 21 nucleotídeos que regulava os RNAm *lin-14*, *lin-28*, *lin-41*, *lin-42* e *daf-12*, também importantes no desenvolvimento larval do *C.elegans*. (42) Foi visto que a sequência do *let-7* assim como sua expressão temporal estão presentes e amplamente conservadas em uma variedade de organismos, incluindo humanos, fortalecendo a hipótese de que esses pequenos RNAs desempenhavam um papel na regulação gênica de todas as espécies. Essa descoberta gerou intenso interesse na identificação de novos miRNAs. (43)

Em 2002, Calin e colaboradores mostraram que os miR15 e miR16, localizados no cromossomo 13q14 estavam ausentes em mais da metade das amostras de tonsilas de paciente com leucemia linfocítica crônica de células B. Percebeu-se, então, que as doenças humanas poderiam ter importante correlação a determinados perfis de miRNA. (44)

Buscando investigar alterações cardíacas e sua relação com os miRNAs, Rooij e colaboradores, em 2006, demonstraram que 12 miRNAs encontravam-se alterados no miocárdio de ratos submetidos a bandagem com o objetivo de aumentar a pós-carga e promover a hipertrofia cardíaca. Esse estudo, além de demonstrar a relação dos miRNAs como responsáveis por alterações patológicas, também levantou a possibilidade de funcionarem como alvos terapêuticos em doenças cardíacas. (45)

No mesmo período, outros estudos investigaram a correlação de miRNAs e a função cardíaca a partir da deleção de genes. Foi demonstrado que o miRNA 1-2 é essencial na cardiogênese, uma vez que sua deleção teria causado diversas alterações morfológicas, de condução de impulsos elétricos e controle do ciclo celular. (46) Enquanto isso, Rooij e colaboradores descobriram que a hipertrofia cardíaca em resposta a algum estímulo lesivo é regulado pelo miRNA-208. (47)

Em 2008, Chim e colaboradores realizaram um trabalho importante que mostraria um enorme potencial de os miRNAs funcionarem como biomarcadores de fácil detecção no plasma humano. Eles demonstraram que quatro miRNAs existentes na placenta estavam presentes no plasma das gestantes apenas durante o período de gravidez. Desta forma seriam marcadores de gestação de fácil obtenção por amostras de sangue. (48)

Posteriormente, diversos investigadores buscaram correlação de miRNAs como biomarcadores de doenças cardiovasculares como doença arterial coronária, insuficiência cardíaca, fibrilação atrial, hipertrofia cardíaca e fibrose.

Ji, Takahashi e colaboradores, em 2009, avaliaram o efeito da injeção de isoproterenol para causar dano cardíaco em ratos e encontraram que o miR-208 foi o microRNA cardioespecífico com aumento significativo ($p < 0,0001$) e um comportamento temporal similar à troponina I. Sugeriram, então, o -208 como importante marcador de injúria miocárdica. (49) No entanto, D'Alessandra e colaboradores investigaram o perfil de miRNAs em ratos com ligadura cirúrgica da artéria coronária e pacientes humanos com infarto agudo do miocárdio com supra de ST (IAMCSST). Eles observaram que o miR-208 apresentou uma expressão muito baixa nos ratos com ligadura coronariana e em humanos com IAMCSST, sugerindo que o miR-208 talvez estivesse relacionado à cardiotoxicidade por estímulo B-adrenérgico do isoproterenol e não por injúria miocárdica. Além disso, observaram que os miR-1, -133, -133b e -499-5p estão aumentados no sangue periférico de humanos, provavelmente pelo dano às células cardíacas. Curiosamente, a curva do -499-5p teve um comportamento (ascensão, pico e declínio) semelhante ao da troponina I. (50)

A cardioespecificidade e seu aumento nas lesões cardíacas dos miR-208 e miR-499-5p foram confirmados posteriormente por Gidlof e colaboradores. Eles investigaram 424 pacientes com Síndrome Coronariana Aguda (SCA) internados em unidade coronariana. Dentre os tratados com RVM, evidenciaram que os níveis destes dois miRNAs em amostras de sangue do seio venoso coronariano foram indetectáveis antes da infusão de cardioplegia e significativamente aumentados após sua infusão. Também observaram que no seio venoso as concentrações foram significativamente maiores em comparação com amostras de sangue periférico. A análise de amostras de sangue periférico

desses pacientes mostrou que os miR-1, -208 e -499 tiveram excelentes poderes discriminatórios, a partir da área sob a curva (AUC), dos pacientes com SCA, porém inferiores aos da troponina T. (51)

Oerlemans e colaboradores realizaram uma interessante demonstração dos miRNAs como ferramenta diagnóstica em amostras de sangue periférico na Síndrome Coronária Aguda. As moléculas de miR-1, -499 e -21 tiveram boa capacidade discriminatória para SCA, isoladamente. Ao combinar os três miRNAs, somados aos níveis de troponina T ultrasensível, obteve-se uma AUC de 0,92, tornando a combinação desses biomarcadores um modelo mais acurado de diagnóstico do que a troponina T isoladamente. (52)

Quanto à capacidade de discriminação entre diferentes formas clínicas de apresentação da aterosclerose coronariana obstrutiva (angina estável, angina instável, infarto com supra de ST e infarto sem supra de ST), alguns trabalhos demonstram miRNAs que, isoladamente ou em combinação, são potenciais discriminadores dessas formas clínicas. Um dos achados do trabalho de Oerlemans e colaboradores, citado anteriormente, foi justamente que a avaliação dos níveis dos miRNAs miR-1, -499 e -208a foram capazes de apontar quais pacientes apresentavam angina instável e quais apresentavam infarto sem supra. A elevação de miR-1 e -499 esteve presente nos quadros de AI e de IAMSSST, enquanto o miR-208a elevou-se apenas naqueles pacientes com IAMSSST, isto é, quando houvesse lesão miocárdica. (52) Os níveis séricos de miR-486 e -92 foram capazes de distinguir entre angina estável, angina instável e infarto agudo no trabalho de Niculescu e colaboradores. (53) Além disso, Liu e colaboradores demonstraram que o miR-28 é um potencial biomarcador isolado

para angina instável em doentes com DAC e documentação angiográfica de doença, e estes mesmos autores, em outra publicação, mostraram que a associação dos miR-134, -198 e -370 nas células mononucleares de sangue periférico tem importante poder de discriminação entre angina instável e angina estável. (54,55)

Assinaturas de miRNAs, também chamadas de impressão digital, são abordagens diagnósticas, cujos diversos miRNAs são combinados visando a aumentar a sensibilidade e especificidade para diagnóstico de doenças. Essa combinação de miRNAs tem sido estudada no contexto da aterosclerose obstrutiva com bons resultados. Li e colaboradores realizaram inicialmente um levantamento do perfil de miRNAs em amostras de sangue periférico de 20 pacientes com IAM e 20 pacientes controle, em um projeto piloto. Encontraram significativamente alterados os miR-1, -134, -186, -208, -223 e -499. Numa segunda etapa, realizaram a dosagem apenas desses seis miRNAs nos seguintes 97 pacientes infartados e 80 controles e calcularam, por meio da Curva ROC, que a combinação desses seis microRNAs, quando presentes no sangue, apresenta melhor AUC para diagnóstico de IAM em comparação com a dosagem isolada da troponina T. (56) Um estudo de caso controle de Vogel e colaboradores identificou a assinatura de miRNAs biomarcadores com significativa acurácia para identificação de insuficiência cardíaca de etiologia não isquêmica. Eles avaliaram amostras de sangue periférico de 53 casos de disfunção ventricular esquerda e compararam com 39 controles. Os oito miRNAs miR-520d-5p, miR-558, miR-122, miR-200b, miR-622, miR-519e, miR-1231 e miR-1228, isoladamente, apresentaram boas sensibilidade e especificidade para

diagnóstico de disfunção ventricular esquerda. Quando em combinação, isto é, esta assinatura ou perfil de miRNA, aumentou ainda mais a acurácia com uma AUC de 0,8 (57)

Apesar de serem menos estudados, os microRNAs também exercem importante papel no diagnóstico de Fibrilação Atrial. Pela previsão de alvos por bioinformática, já foi demonstrado que diversos microRNAs como o miR-23a, miR-29a, miR-30, miR-124a, miR-125b, miR-150, miR-193, miR-214, miR-185, miR-494, miR-320 e miR-351 são capazes de regular a expressão de canais iônicos presentes no miocárdio. Além disso, o miR-1 e miR-133 já foram apontados como importantes moléculas responsáveis por arritmias em modelos animais. (58) O trabalho de Lu e colaboradores analisou amostras de tecido atrial de cães e de humanos com doença cardíaca reumática. Encontraram que o miR-328 estava significativamente aumentado tanto em tecido atrial humano quanto do animal. A partir da previsão de alvos, por bioinformática, observaram que o canal de cálcio *L-Type* tem suas subunidades alfa1c e beta1 reguladas por este miRNA, e a inativação do miR-328 em ratos reduziu a incidência de FA e aumentou os níveis de canais de cálcio *L-Type*. (59)

Na tentativa de utilizá-los como biomarcadores detectáveis no sangue, Liu e colaboradores, em uma coorte de 105 pacientes com FA paroxística e persistente em que foram analisadas amostras de plasma, encontraram que a redução dos níveis do miR-150 teve correlação significativa ao aumento da incidência de FA paroxística e FA persistente. Além disso, a análise por bioinformática utilizando a informação de quatro bancos de dados mostrou que este microRNA interfere na via de 18 genes relacionados à FA. (60)

A FA que ocorre após cirurgia de revascularização do miocárdio costuma ser autolimitada e de outra etiologia. Ela também foi pesquisada para biomarcadores em nível de miRNA por Harling e colaboradores. Eles elaboraram um estudo do tipo caso-controle e analisaram amostras de plasma de 34 pacientes submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio. Após extração e quantificação do RNA destas amostras, encontraram que o miR-483-5p nas amostras de plasma pré-operatórias foi capaz de prever aquele que desenvolveria FA pós-operatória com sensibilidade e especificidade de, respectivamente, 77,78% e 77,27%. A análise da curva ROC mostrou uma AUC de 0,78. Verificaram, também, que esse miRNA encontrava-se elevado no tecido atrial. Porém não realizaram análise por bioinformática para previsão de alvos, portanto não sugeriram mecanismos moleculares que integrassem o miRNA à arritmia. (61)

Outras condições cardiovasculares que têm sido estudadas quanto ao papel dos miRNAs são as cardites infecciosas e a Síndrome de Takotsubo, embora estas ainda careçam de estudos maiores. Não há miRNAs detectáveis no plasma que funcionem como biomarcadores de cardites infecciosas e os estudos publicados são de análises de miRNA de tecidos cardíacos. O trabalho de Corsten e colaboradores abrangeu pacientes com lesão miocárdica de etiologias diversas: aterosclerose coronariana, miocardite viral, disfunção diastólica e disfunção sistólica aguda do ventrículo esquerdo. Encontraram que os miR-208 e -499 elevam-se de forma significativa tanto no infarto agudo quanto na miocardite viral, acompanhando a curva da troponina. Isto demonstra a cardioespecificidade desses microRNAs, mas não os correlaciona

especificamente a casos de cardite infecciosa. (62) Nesse mesmo sentido, Xu e colaboradores demonstraram que o miR-21, um miRNA marcador de fibrose do tecido cardíaco, serve como marcador de progressão da miocardite viral crônica para a miocardiopatia dilatada. (63) Navarro e colaboradores analisaram os efeitos sobre o perfil de miRNA de ratos causado por *Trypanosoma Cruzi*, agente da Doença de Chagas em humanos. Encontraram nove microRNAs (miR-21, -142-5p, 142-3p, -222, -145, -149, -322, mo-miR146b e mmu-miR-146b) com expressão alterada no tecido cardíaco desses modelos, e o pico da expressão coincidiu com o pico da parasitemia, o que sugere que este grupo de miRNAs, de alguma forma, esteja ligado à magnitude da infecção e às alterações cardíacas da doença. Além disso, seis destes nove tiveram relação com a alteração do intervalo QTc (miR-146b, -21, -142-3p -142- 5p, -145-5p e -149-5p). (64) Até o momento não há referências a miRNAs biomarcadores de cardites infecciosas detectadas no plasma. (65)

A Síndrome de Takotsubo é uma causa menos frequente de infarto do miocárdio. Jaguszewski e colaboradores realizaram um estudo com 91 colaboradores para comparar o perfil de miRNAs de pessoas saudáveis, pacientes acometidos por IAMCSST e pacientes com Síndrome de Takotsubo. A assinatura genética composta pela combinação dos quatro miRNAs miR-1, miR-16, miR-26 e miR-133a apresentou uma sensibilidade de 96,77% e especificidade de 70,37% para a diferenciação entre Takotsubo de IAMCSST. (66)

Até o momento, não há relato de microRNAs que sejam biomarcadores específicos de vasoplegia na literatura.

4 – Métodos

4.1 - Ética na pesquisa

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo comitê de ética do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor – HCFMUSP) (Cappesq 4435/16/101 – 15380), que foi conduzido, seguindo as diretrizes da Declaração de Helsinque. Todos os pacientes incluídos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.2 – Desenho do estudo, critérios de inclusão e exclusão e grupos

Este estudo tem caráter exploratório, uma vez que não há relato na literatura associando miRNA e VS. O desenho adotado foi o de um caso-controle e, inicialmente, foram selecionados 87 pacientes submetidos à revascularização do miocárdio com CEC, de janeiro de 2018 a dezembro de 2019, em procedimento eletivo ou de urgência, para os quais foi confeccionada, pelo menos, uma anastomose proximal na aorta. Foram excluídos os pacientes que realizaram revascularização do miocárdio sem CEC, que utilizaram previamente drogas vasoativas, balão intra-aórtico, angina instável sintomática no momento da cirurgia, que apresentassem doenças do colágeno ou neoplasia ou que tivessem sofrido infarto agudo do miocárdio há menos de três semanas. Após essa seleção inicial, 11 pacientes foram excluídos pelo fato de o cirurgião ter optado por realizar a cirurgia sem CEC. Procedeu-se, então, ao acompanhamento clínico dos 76 pacientes restantes, dos quais 15 evoluíram com Síndrome Vasoplégica (incidência de 19,7%). Selecionamos, então, 30 pacientes, 15 vasoplégicos (VASO) e 15 não vasoplégicos (NONVASO), para

análise do perfil de miRNA no sangue periférico, levando em consideração o baixo risco cirúrgico (STS score < 2%). A seleção dos 15 não vasoplégicos se deu pelo critério de proximidade de data cirúrgica com os doentes vasoplégicos.

De forma a tornar os grupos comparáveis, foi demonstrado que não houve diferença estatística para as seguintes características clínicas: idade, sexo, IMC, história familiar de doença coronariana, diabetes, insuficiência renal crônica, doença pulmonar, doença arterial oclusiva periférica, doença cerebrovascular, hemoglobina, hematócrito, creatinina, HbA1C, intervenção coronariana percutânea prévia, classe funcional, fibrilação atrial / *flutter*, fração de ejeção, número de vasos principais afetados, uso prévio de IECA, bloqueadores beta e bloqueadores de canais de cálcio. Houve diferença estatística para a variável maior nível de glicose intraoperatória. As características dos pacientes incluídos no estudo estão resumidas na tabela 1.

Características dos pacientes		
Parâmetros pré-operatórios	NONVASO group (N=15)	VASO group (N=15)
Idade Média (IQR) - anos	66.0 (49.0–76.0)	68.0 (48.0–76.0)
EuroSCORE - média (SD)	1.1 (0,4)	0.9 (0.4)
STS - média (SD)	0.5 (0.3)	0.7 (0.2)
Homens - (%)	14 (93.3)	14 (93.3)
Índice de massa corporal (IMC), kg/m ² - média (SD)	25.6 (2.2)	25.9 (3.5)
Diabetes melito - n (%)	9 (60.0)	9 (60.0)
Hipertensão - n (%)	10 (66.7)	13 (86.7)
História familiar de doença cardíaca - n (%)	1 (6.6)	1 (6.6)
Insuficiência Renal - n (%)	1 (6.6)	1 (6.6)
Doença arterial periférica - n (%)	1 (6.6)	3 (20)
Acidente vascular cerebral prévio - n (%)	1 (6.6)	3 (20)
Intervenção coronariana percutânea prévia - n (%)	3 (20)	2 (13.3)
Hemoglobina (mg/dL) - média (SD)	14.16 (1.7)	14.4 (1.3)
Hematócrito % - média	42.9 (3.8)	42.3 (5.1)
Hemoglobina glicada % - média (SD)	6.3 (1.0)	6.5 (1.2)
Glicose (mg/dL) - média (SD)	133.8 (41.1)	130.3 (47.8)
Creatinina (mg/dL) - média (SD)	1.0 (0.26)	1.1 (0.18)
Anatomia coronariana		
Biarterial - n (%)	3 (20)	1 (6.7)
Triarterial - n (%)	12 (80)	14 (93.3)
IECA/ BRA 48 horas antes da cirurgia - n (%)	9 (60)	7 (46,6)
Betabloqueador - n (%)	10 (67)	7 (46,6)
Bloqueador de canal de cálcio - n (%)	3 (20)	5 (33,3)
Fração de ejeção - % (SD)	59 (10.7)	60.8 (6.1)
Parâmetros intraoperatórios		
Tempo de CEC - minutos	101	85
Hemoglobina mais baixa intraoperatória (mg/dL) - média (SD)	9.3	8.4
Tempo de anóxia cardíaca (minutos) - média (SD)	69.93 (19.92)	75.60 (15.95)
Glicose intraoperatória mais alta (mg/dL) - média (SD)	208,3**	173,8**
Transfusão de hemocomponentes - n (%)	1(6.6)	1(6.6)
Parâmetros pós-operatórios		
Creatinina - média (SD)	1.5 (0.5)	1.3 (0.4)
Tempo de UTI (horas) - média (SD)	325.6 (257.9)	234.4 (165.7)
Hemoglobina (mg/dL) - média (SD)	10.8 (1.6)	10.3 (1.0)

Tabela 1 – Comparação entre os grupos vasoplegia e não vasoplegia quanto às variáveis pré, intra e pós-operatórias. Os dados são apresentados como número de pacientes e porcentagem entre parênteses para variáveis dicotômicas ou mediana e intervalo interquartil (IQR) ou desvio-padrão (S.D). Os símbolos *** representam $p < 0.0001$.

4.3 - Monitorização do paciente, técnica cirúrgica, material biológico e acompanhamento do paciente

O preparo dos pacientes para a cirurgia de revascularização do miocárdio ocorreu conforme o protocolo da instituição, da seguinte forma: o paciente entra na sala de cirurgia onde são cateterizadas a veia periférica para acesso venoso e a artéria radial para cateter de pressão arterial invasiva. Com esse acesso realizam-se a indução anestésica e a intubação orotraqueal. Com o paciente já anestesiado, fazemos a cateterização venosa central com cateter de duplo lúmen e a cateterização vesical com cateter de Foley. O monitor Vigileo com sensor FloTrac foi instalado em todos os pacientes para uso após o fechamento do tórax para quantificar o débito cardíaco e orientar o diagnóstico de SV.

A técnica cirúrgica utilizada consiste nas seguintes etapas: abertura do esterno e dissecação da artéria mamária esquerda pediculada ou esqueletizada, de acordo com a preferência do cirurgião; dissecação da veia safena pela técnica convencional sem preservação da gordura perivascular; heparinização com heparina não fracionada, controlada por um tempo de coagulação ativada maior do que 480 segundos; instalação do circuito de CEC com canulação da linha arterial na aorta ascendente e da linha venosa no átrio direito; entrada em CEC, clampeamento da aorta ascendente e infusão de cardioplegia sanguínea fria de forma anterógrada na raiz da aorta, obtendo parada cardíaca; confecção das pontes planejadas; abertura do clampe aórtico e retomada dos batimentos cardíacos; saída de CEC, reversão da heparinização com sulfato de protamina, revisão de hemostasia e fechamento.

Duas amostras de sangue venoso de 5 ml foram coletadas de todos os pacientes durante a cirurgia. A primeira, após a indução anestésica, durante a passagem do cateter venoso central. A segunda, após a saída de CEC cardiopulmonar, pelo menos 15 minutos após a reversão completa da heparina com protamina. Usamos *Tempus™ Blood RNA Tube* para coleta das amostras de sangue e o armazenamos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. No final da cirurgia, o paciente foi encaminhado para a UTI pós-operatória, ainda com monitor de débito cardíaco, acompanhado diariamente por um membro do grupo de pesquisa para verificar os parâmetros clínicos e diagnosticar a SV nas primeiras 48 horas de pós-operatório. Todos os pacientes receberam o sensor Flo Trac acoplado ao monitor EV1.000, ambos da *Edwards Lifescience*, para monitoramento do índice cardíaco, ilustrados na figura 1. Os critérios de diagnóstico de SV adotados neste estudo foram descritos anteriormente no *VANCS Trial*. (33) A SV foi definida como hipotensão ($\text{PAM} < 65\text{ mmHg}$) refratária a, pelo menos, 1.000 mL de infusão intravenosa de fluido cristalóide, associada a um índice cardíaco maior que $2,2\text{ L/min}^2/\text{m}^2$, nas primeiras 48 horas após a CEC. Outras causas de choque precisaram ser excluídas, como choque cardiogênico, choque hipovolêmico ou tamponamento cardíaco. Durante o acompanhamento, os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes incluídos foram coletados para o banco de dados do *Research Electronic Data Capture* (REDCAP). Os parâmetros hemodinâmicos observados pela equipe foram anotados na ficha de controle de sinais vitais e parâmetros hemodinâmicos, exemplificados na figura 2.

A figura 3 ilustra o fluxograma do paciente inserido no estudo.



Figura 1 - Monitor Vigileo® com sensor FloTrac® da *Edwards Lifescience*™ utilizado na monitorização do índice cardíaco para diagnóstico de SV. Dentre os parâmetros que o monitor fornece, utilizamos o índice cardíaco acima de 2,2 L/min/m².

HORA	T	R	FC	RIT	PA	PVC	PAP			PAE/PCP	DC	IC	RVS	RVP	FR	MOD AP	VC PREP	P. INSP FLO.	OBSERVAÇÕES
							M	S	D										
07																			2,00
08	36,7	19	78	Rt	80/11	80	127	63		5.2	2.9				Sat 100%	CNOZ 0,11	min	dx: 141 mg/dl	(6)
09																			
10	36,0	19	80	Rt	86/8	86	129	71		4.2	2.4				Sat 100%	CNOZ 0,21	min	dx: 152 mg/dl	(6)
11																			
12	36,3	20	77	Rt	79/4	79	116	61		4.8	2.6				Sat 100%	CNOZ 0,21	min	dx: 156 mg/dl	(6)
13																			
14	36,4	18	79	Rt	80/04	80	129	63		5.1	2.8				Sat 100%	X X		dx: 161 mg/dl	(6)
15																			
16	36,2	19	87	Rt	78/05	78	135	60		7.2	4.0				Sat 96%	X X		dx: 172 mg/dl	(6)
17																			
18	37	20	93	Rt	77/03	77	122	62		5.7	3.2				Sat 96%	X X		dx: 179 mg/dl	(6)
19																			
20	37°	21	87	Rt	6.8/03	6.8	109	52		6.3	3.9				AA	95%	5/2	dx: 118 mg	E, 6
21																			
22	36,4	18	92	Rt	79/7	79	128	61		6.3	3.3				AA	96%		dx = 180 mg/dl	F, 8
23																			
00	36,8	22	83	Rt	77/5	77	121	60		5.2	3.1				AA	98%		dx = 146 mg/dl	E, 9
01																			
02	✓	18	81	Rt	74/5	74	118	58		5.6	3.1				AA	98%		dx = 166 mg/dl	F, 1
03																			
04	36°	19	76	Rt	80/6	80	124	62		4.9	2.8				AA	97%		dx = 131 mg/dl	C, 0,2
05																			
06	✓	20	79	Rt	70/4	70	112	54		5.3	3.0				AA	98%		dx = 107 mg/dl	A, 0
LACTATO OPERATORIAL: 15/18 MARECHES 1,8/2,0 EXAMES LABORATORIAIS Alternativa-2,9 RR= 0,15																			
P	K	Na	Hb	Ht	pH	PCO ₂	P ₅₀	Sat O ₂	BE	Bic	U	C	GI	Amil	Leuc	glico	glico	glico	Placog = 111.000
M	4,0	138	12,4	38	7,41	47,2	131	98,9	4,5	25,9	38	0,76			8.930	108	1,18		Placog = 160.000
M	ABD		11,3	36	7,35	49,4	38,5	99,3	11,3	26,9	36	0,36			9,0	108	1,14		
T	33	134	11,3	36	7,14	38,6	134	99,4	2,2	25,9					13.220	108	1,14		
R					7,28	48,2	31,2	56,4	2,2	22,6	20,4	2,52	6,91	52	25	1,64	0,32	1,22	TTPD = 26,2
N	34	136	11,3	36	7,42	48,4	35,6	66,6	2,1	23,5	12,4		6,75						Rei TTPD = 0,92

Figura 2 – Ficha de controle dos parâmetros hemodinâmicos do pós-operatório anotado pela equipe de enfermagem do setor de pós-operatório. T – temperatura axilar, R – frequência respiratória, FC – frequência cardíaca, PA – pressão arterial média, PVC – pressão venosa central, S – pressão sistólica, D – pressão diastólica, M - pressão média, DC – débito cardíaco, IC – índice cardíaco.

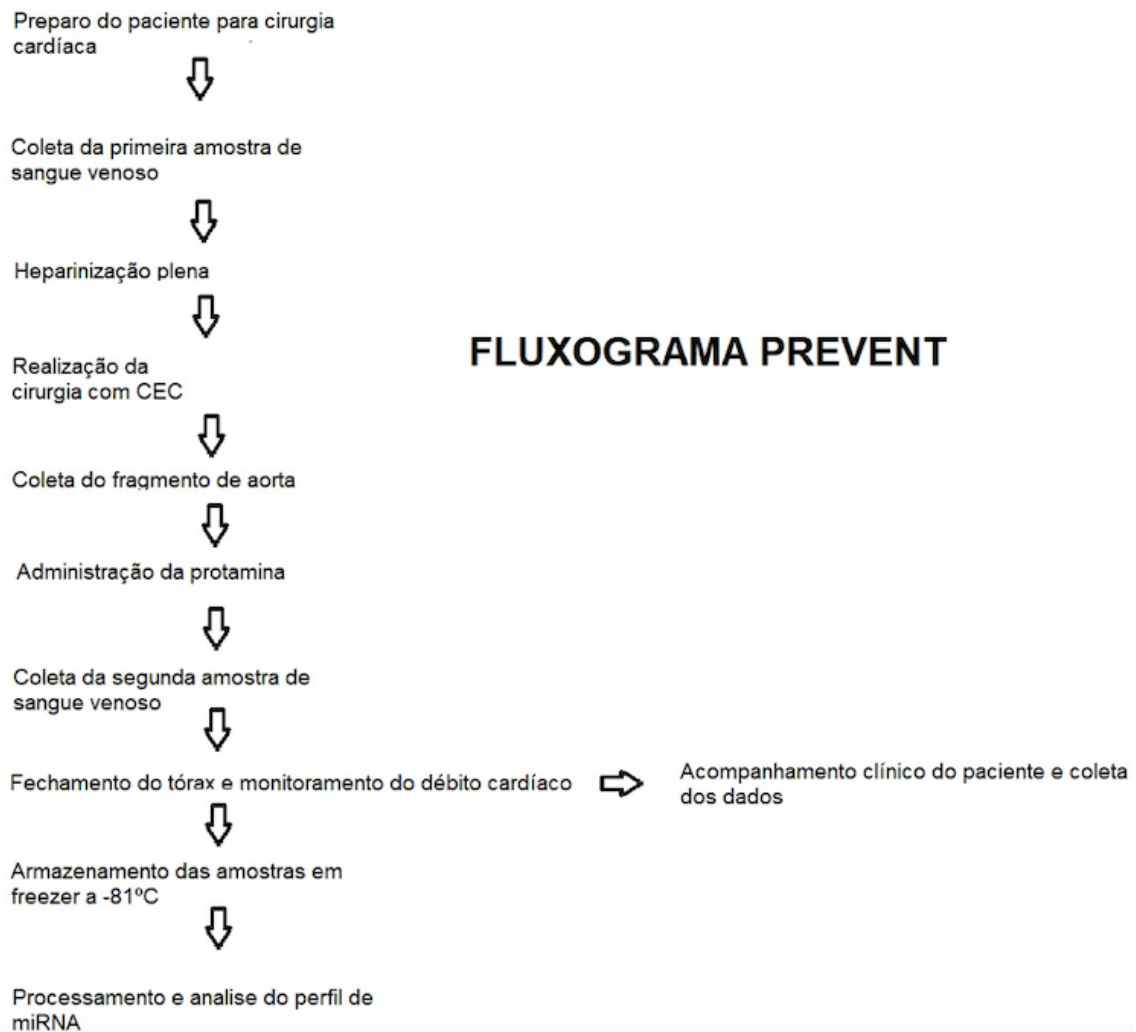


Figura 3 – Fluxograma do paciente incluído no estudo. O paciente tem suas amostras de material biológico coletadas ao longo da cirurgia, posteriormente o tórax é fechado, o paciente é encaminhado para a unidade pós-operatória onde os dados são coletados e o membro pesquisador acompanha o caso para dar ou não o diagnóstico de vasoplegia. As amostras de material biológico são encaminhadas para armazenamento a -81oC para posterior descongelamento, processamento e análise do perfil de miRNA.

Após a coleta de todas as amostras e dos diagnósticos de SV, iniciou-se a fase de análise do material coletado. As amostras foram descongeladas em gelo e extraídas de acordo com o protocolo do fabricante, utilizando o *kit Tempus*

TM 12-Port RNA Isolation - Thermofisher Scientific- USA (Figura 4). Após a extração do RNA total, incluindo os miRNAs, foram analisados quanto à qualidade no Nanodrop 2.000 (Thermofisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) e obtivemos (A260 / 280, relação A260 / 230 maior que 1,9); e, quanto à integridade do RNA, valor de RIN maior que 7,0, avaliado no equipamento bioanalisador - Agilent - Alemanha.



Figura 4 – *Tempus*TM Blood RNA Tube. Tubo utilizado na armazenagem a -81°C das amostras de sangue para preservação do material genético.

4.4 - Perfil de miRNA de sangue total

Para a reação de transcrição reversa de cada amostra, foram utilizados tubos eppendorf de 0,2 mL, com volume final de 7,5 μ L, com 3 μ L de RNA total e 4,5 μ L da mistura RT, que consistiu em: 0,8 μ L Megaplex™ RT Primers (10x), 0,20 μ L de dNTPs (100 mM), 1,5 μ L de enzima de transcriptase reversa MultiScribe™ (50U / μ L), 0,8 μ L de tampão RT (10x), 0,9 μ L de MgCl₂ (25 mM), 0,10 μ L de inibidor de RNase (20U / μ L) e 0,20 μ L de nuclease. Em seguida, foram submetidos a 40 ciclos a 16°C por 2 min; 42°C por 1 minuto e 50°C por 1 segundo, seguido de extensão a 85°C por 5 min, finalizando a 4°C, no Veriti® Thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). A pré-amplificação foi realizada após a transcrição reversa usando 2,5 μ L do produto transcrito e 22,5 μ L da mistura de pré-amplificação com condições de ciclo que incluíram 10 min a 95°C, 2 min a 55°C e 2 min a 72°C, 12 ciclos de 15 s a 95°C e 4 min a 60°C e 10 min a 99,9°C, no Veriti® Thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). O perfil de miRNA foi realizado no instrumento AB7.900 (Applied Biosystems) usando cartão microfluídico TaqMan™ Array Human MicroRNA A + B Cards- TLDA- v2.0- um total de 384 TaqMan® MicroRNA Assays por cartão.), que permite a avaliação quantitativa de 754 miRNAs, incluindo genes endógenos.

4.5 - Análise da expressão e análise estatística do miRNA

Para analisar as diferenças nos níveis de expressão miRNA entre os dois grupos, fizemos o *upload* dos arquivos de dados brutos gerados em tempo real (extensão.SDS) em um *software ThermoFisher Cloud v1.0*. Este *software* explora um teste t de amostras independentes para comparar os dados do limiar de PCR em tempo real (Ct) com uma amostra de controle de referência representativa, selecionada aleatoriamente, usando um limiar de p de 0,05, e os níveis relativos de expressão miRNA são apresentados como mudança de dobra (FC). Os arquivos de dados foram primeiramente pré-processados, usando correções automáticas de linha de base e verificados, manualmente, em cada ensaio para analisar se o valor Ct correspondia ao ponto médio da curva de amplificação logarítmica. O método do ciclo de limiar comparativo foi usado para calcular os níveis relativos de expressão miRNA (ΔCt) após a normalização da média global. MiRNAs com um Ct médio >36 e detectados em $<80\%$ de todas as amostras foram considerados abaixo do nível de detecção e excluídos de análises posteriores. Os MiRNAs com valores limiares de $p \leq 0,05$ e $FC \geq 1,5$ absoluto foram considerados expressos de forma diferente. Para análises de miRNAs individuais foi utilizado o teste t pareado para variáveis que seguissem a distribuição normal (teste Anderson-Darling) e para as outras foi utilizado o teste não paramétrico Mann-Whitney pareado. Para analisar a associação entre variáveis de resultado e variáveis explicativas, foram utilizados modelos de regressão logística simples e múltiplos e, para avaliar este modelo, foi utilizado o *C-Statistics* (AUC). As medidas diagnósticas foram calculadas usando o ponto

de corte pelo método de Youden, avaliando sensibilidade, especificidade, precisão, valor preditivo positivo e negativo. O *software GraphPad Prism* versão 8.01 foi utilizado para realizar análises individuais e curvas ROC.

4.6 - Análises de previsão de alvo e de enriquecimento de vias

A previsão e identificação de alvos dos sete miRNAs desregulados em VASO vs NONVASO foram realizadas usando o *software Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) (Qiagen, EUA- www.ingenuity.com) que se baseia em três algoritmos de banco de dados (*TargetScan*, *TarBase* e *miRecords*). Os caminhos canônicos IPA e as análises de rede utilizam um banco de dados gráfico de redes de genes que interagem (*Ingenuity Knowledge Base*, IKB). Uma lista contendo os sete miRNAs foi carregada no IPA e analisada com base no conteúdo da data de 2021-07 usando o teste exato de Fisher para medir o significado da associação entre cada lista e o caminho enriquecido. As moléculas são representadas como nós, e a relação biológica entre dois nós é representada como uma borda (linha). Todas as bordas são suportadas por, pelo menos, uma referência da literatura, de um livro didático ou de informações canônicas armazenadas no IKB. O diagrama de acordes foi criado para representar os miRNAs e seus alvos putativos relacionados com os caminhos de sinalização apelina.

A figura 5 exemplifica uma das etapas da análise do IPA em que é usado um diagrama de nós para correlacionar o miRNA a suas moléculas e genes alvo.

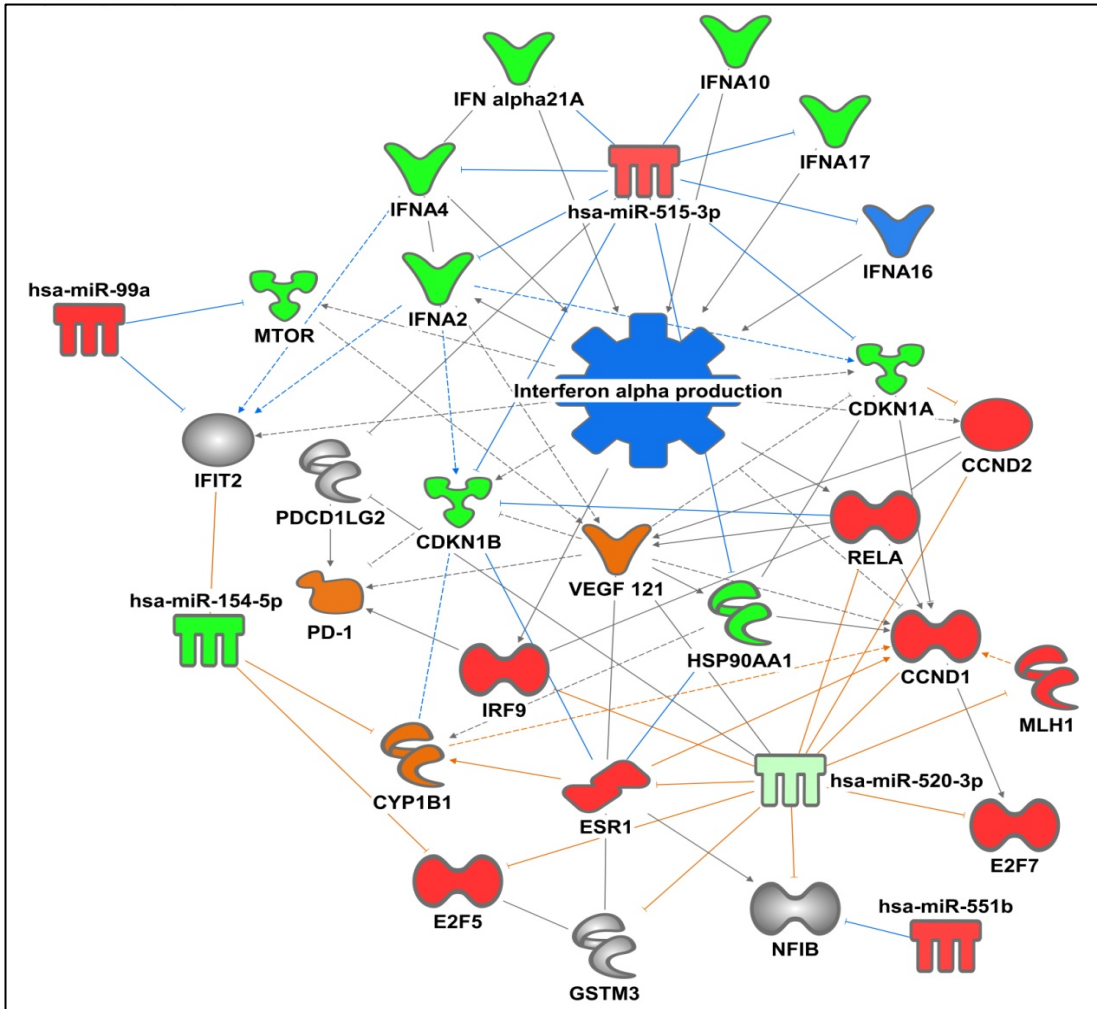


Figura 5 – Exemplo de diagrama gerado pelo IPA em que cada linha representa uma relação biológica existente entre os miRNAs e outras moléculas sustentadas por uma referência da literatura, de um livro didático ou de informações canônicas armazenadas no IKB. Por meio disso, é possível prever um efeito final.

5 – Resultados

5.1 Comparação entre os grupos VASO e NONVASO

A tabela 1 mostra as características pré, intra e pós-operatórias dos dois grupos comparados. Os dados são apresentados como número de pacientes e porcentagem entre parênteses para variáveis dicotômicas ou mediana e intervalo interquartil (IQR) ou desvio-padrão (S.D). Não houve diferença entre as variáveis pré-operatórias. É importante ressaltar que houve diferença significativa para a variável glicose intraoperatória mais elevada. Outro dado que chama a atenção é os grupos também serem equivalentes quanto ao risco cirúrgico, aferidos pelo STS *score* e *EuroSCORE II*.

5.2 - MiRNAs circulantes desregulados em amostras de sangue durante o período pré-operatório de pacientes que se submeteram à cirurgia de revascularização miocárdica com CEC e desenvolveram e não desenvolveram VS

Identificamos entre os 754 miRNAs triados, oito diferentemente expressos no sangue de VASO *versus* NONVASO, como mostrado em um gráfico de vulcão, (Figura 6A) dos quais seis estavam sobreexpressos (pontos vermelhos): hsa-miR-548c-3p, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-183-3p, hsa-miR-571, hsa-miR-383-5p e dois estavam subexpressos (pontos azuis): hsa-miR-1236-3p, hsa-miR-770-5p. A Tabela 2 mostra a lista dos miRNAs desregulados, seu símbolo, ID do miRbase, o valor de sua variação e os valores de p. Para auxiliar o entendimento, classificamos os miRNAs desregulados e os representamos em dois gráficos agrupados nas figuras 6A e 6B. Realizamos o teste não paramétrico Mann-Whitney pareado e, para a detecção de *outliers*, o

método ROUT (baseado na taxa de falsa descoberta - FDR). Após essas análises, observamos que sete dos oito miRNAs eram estatisticamente significativos ($P \leq 0,05$) na comparação entre VASO e NONVASO; o hsa-miR-1236-3p não ultrapassou o ponto de corte do valor P após o teste de análise estatística não paramétrica de Mann-Whitney.

Lista de miRNAs circulantes com expressão alterada (VASO x NONVASO)			
Símbolo do miRNA	miRbaseID	Alteração	valor p
hsa-miR-548c-3p	MIMAT0003285	3,7	0.00317
hsa-miR-30d-5p	MIMAT0000245	3,1	0.03974
hsa-miR-199b-5p	MIMAT0000263	2,8	0.01588
hsa-miR-183-3p	MIMAT0004560	2,3	0.02891
hsa-miR-571	MIMAT0003236	2,2	0.02505
hsa-miR-383-5p	MIMAT0000738	2	0.02417
hsa-miR1236-3p	MIMAT0005591	-2,60	0.03820
hsa-miR770-5p	MIMAT0003948	-15,6	0.03709

Tabela 2 – Lista dos microRNAs com expressão alterada, seu símbolo, miRbaseID, valor da alteração e valor p

Perfil de expressão de miRNAs

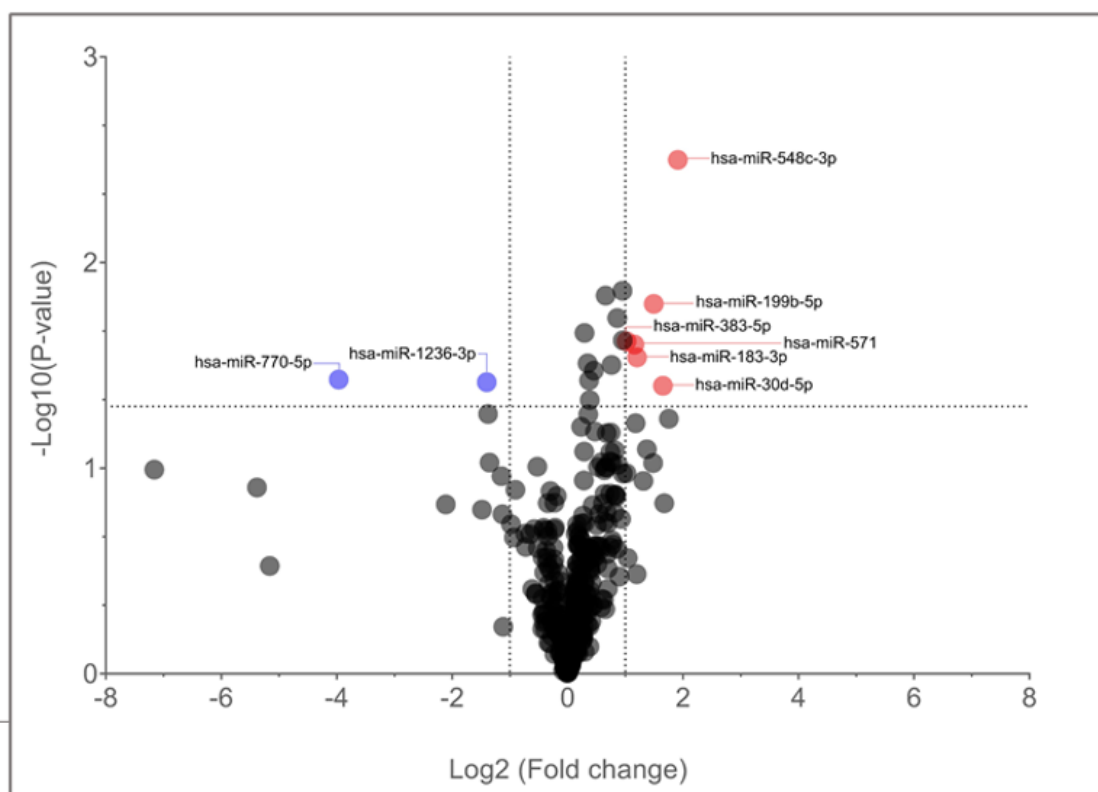


Figura 6A – Gráfico volcano em que o eixo y representa o valor p da expressão de miRNA, enquanto o eixo x representa a quantidade de vezes em que a expressão está alterada. A linha pontilhada que cruza perpendicularmente o eixo y representa o valor acima do qual a expressão do miRNA é significativa com $p < 0.05$. Há duas linhas pontilhadas cruzando perpendicularmente o eixo x que marcam aqueles miRNAs que têm sua expressão aumentada (à direita) e diminuída (à esquerda). Os pontos coloridos, portanto, representam aqueles miRNAs com sua expressão alterada de forma significativa.

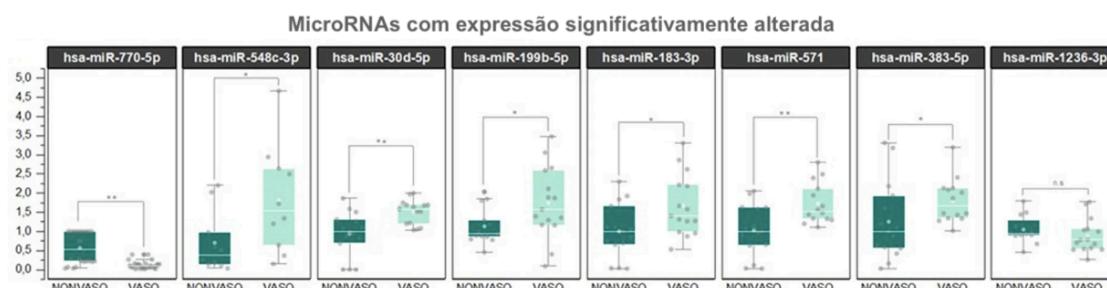


Figura 6B - O teste não paramétrico de Mann-Whitney e, para a detecção de *outliers*, o método ROUT (baseado na taxa de descoberta falsa - FDR) foram usados para comparar os dois grupos, aplicando os valores de ΔCt após a normalização da média global e o cálculo da expressão relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (alteração de dobra) para cada miRNA. Considerando o valor de $P \leq 0,05$ como estatisticamente significativo

Observamos, também, na análise da curva ROC abaixo, que a associação do hsa-miR-30d com o hsa-miR-770-5p apresentou a maior AUC, tornando-se o melhor preditor de vasoplegia nas amostras pré-operatórias de sangue dos pacientes.

5.3 - Combinação de miR-30d-5p e hsa-miR-770-5p no sangue total como potencial preditor de VS

Para explorar o potencial dos miRNAs quanto à sua capacidade de prever SV antes da RVM foram geradas curvas ROC para miRNAs individuais e para todas as combinações possíveis entre dois miRNAs, além de analisar seu valor diagnóstico sinérgico (Tabelas 3 e 4). As maiores AUCs de miRNAs isolados foram obtidas nas curvas ROC para hsa-miR-770-5p e hsa-miR-30d-5p, com os seguintes valores, respectivamente: 0,8333 [intervalo de confiança (IC) de 95%, 0,6622-1,000; valor de P = 0,0047] e 0,8178 (IC de 95%, 0,6640-0,9715; valor de P = 0,0030). A combinação desses dois miRNAs produziu um valor de AUC de 0,9615 (IC95%, 0,973-0,999; P < 0,0001) com sensibilidade de 84,6% e especificidade de 91,67% na distinção entre pacientes dos grupos VASO e NONVASO (Figura 7), mostrando um poder de biomarcador superior ao de um único miRNA.

miRNA	AUCs	Desvio Padrão	p-valor
miR-770-5p	0,8333	0,08729	0,0047
miR-30d	0,8178	0,07845	0,003
miR-548c	0,79	0,1023	0,0284
miR-571	0,7857	0,08836	0,0088
miR-199	0,7436	0,09859	0,0287
miR-183	0,7289	0,09323	0,0327
miR-1236	0,6389	0,1103	0,2225

Tabela 3 - Tabela mostrando valores de AUC de cada miRNA isoladamente. Maior AUC obtida ocorreu com o hsa-miR-30d e com o hsa-miR-770-5p.

	miR-770-5p	miR-548c	miR-1236	miR-199	miR-183	miR-30d	miR-571
miR-770-5p	0,8333	0,9259	0,8269	0,8923	0,8782	0,9615	0,9306
miR-548c	-	0,7900	0,7667	0,8333	0,7700	0,8700	0,8778
miR-1236	-	-	0,6389	0,7400	0,6611	0,8389	0,8095
miR-199	-	-	-	0,7436	0,7795	0,8308	0,8132
miR-183	-	-	-	-	0,7289	0,8222	0,8381
miR-30d	-	-	-	-	-	0,8178	0,8095
miR-571	-	-	-	-	-	-	0,7857

Tabela 4 – Tabela mostrando valores de AUC da combinação de todos os pares de miRNAs possíveis. Maior AUC obtida ocorreu com a combinação do hsa-miR-30d com o hsa-miR-770-5p. A combinação desses dois miRNAs produziu um valor de AUC de 0,9615 (IC95%, 0,973-0,999; P < 0,0001) com sensibilidade de 84,6% e especificidade de 91,67% na distinção entre pacientes dos grupos VASO e NONVASO.

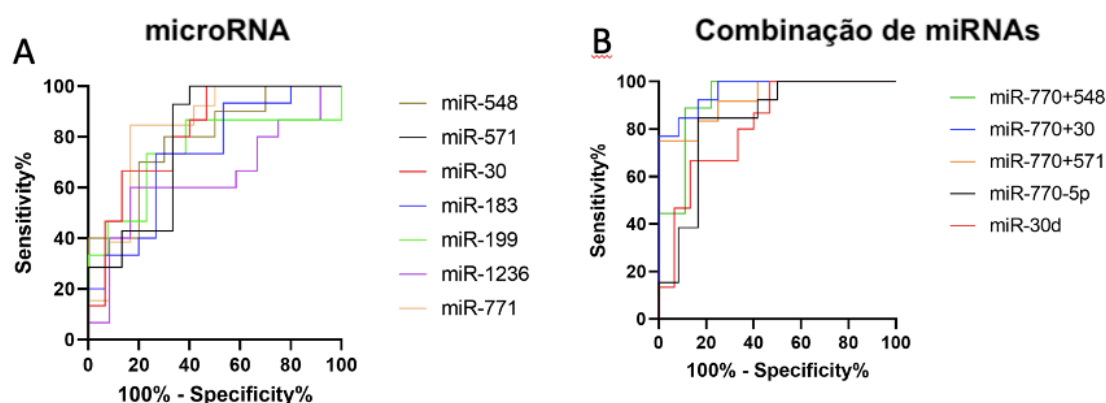


Figura 7 – (A) A curva ROC para cada miRNA individual produziu os dois maiores valores de AUC de 0,8333 [intervalo de confiança (IC) de 95%, 0,6622-1,000; valor de P = 0,0047] e 0,8178 (IC de 95%, 0,6640-0,9715; valor de P = 0,0030) para hsa-miR-770-5p e hsa-miR-30d-5p, respectivamente. (B) Comparação das curvas ROC isoladas dos miR30d e 770-5p com as três maiores AUC de microRNAs combinados.

5.4 - A previsão de alvos de miRNA e a análise de enriquecimento do conjunto de genes

Realizamos análises por bioinformática para identificar todos os possíveis alvos dos sete miRNAs circulantes desregulados em pacientes com SV. Obtivemos a lista de alvos de três bancos de dados de previsão de alvos diferentes, considerando aqueles previstos como alvos moderados, altos ou validados experimentalmente. Os genes previstos como alvos dos miRNAs desregulados em pacientes com vasoplegia foram significativamente enriquecidos em vias canônicas relacionadas à resposta imune, estresse celular, lesão e sinalização cardiovascular. A Figura 8-A mostra as 15 principais vias canônicas mais significativamente enriquecidas em gráficos de barras empilhadas. O número total de moléculas dentro de cada via está na parte superior de cada barra plotada. Nessa análise, aplicamos um ponto de corte log corrigido de Benjamini-Hochberg (valor P) de 1,3. A principal via enriquecida foi a "Via de sinalização hepática da apelina", com 14 das 26 moléculas dentro da via (53,8%), contendo o maior número de alvos potenciais dos miRNAs desregulados. Na lista das vias mais enriquecidas,

também identificamos outras quatro vias relacionadas ao sistema apelínico, por exemplo, vias de sinalização da apelina em fibroblastos cardíacos, músculos, pâncreas e células endoteliais. A Figura 8 mostra, na forma de um diagrama de cordas, a quantidade de conexão entre as cinco vias canônicas relacionadas à sinalização por apelina com várias entidades ou nós (gene/proteína/miRNAs) dentro dessas próprias vias ou indiretamente conectadas com seus nós. Quanto mais inter-relacionamento e conexões o nó tiver, mais relevante ele será. O tamanho de cada nó é proporcional ao número de conexões com as cores dos acordes parcialmente misturadas com as cores de suas entidades conectadas.

A

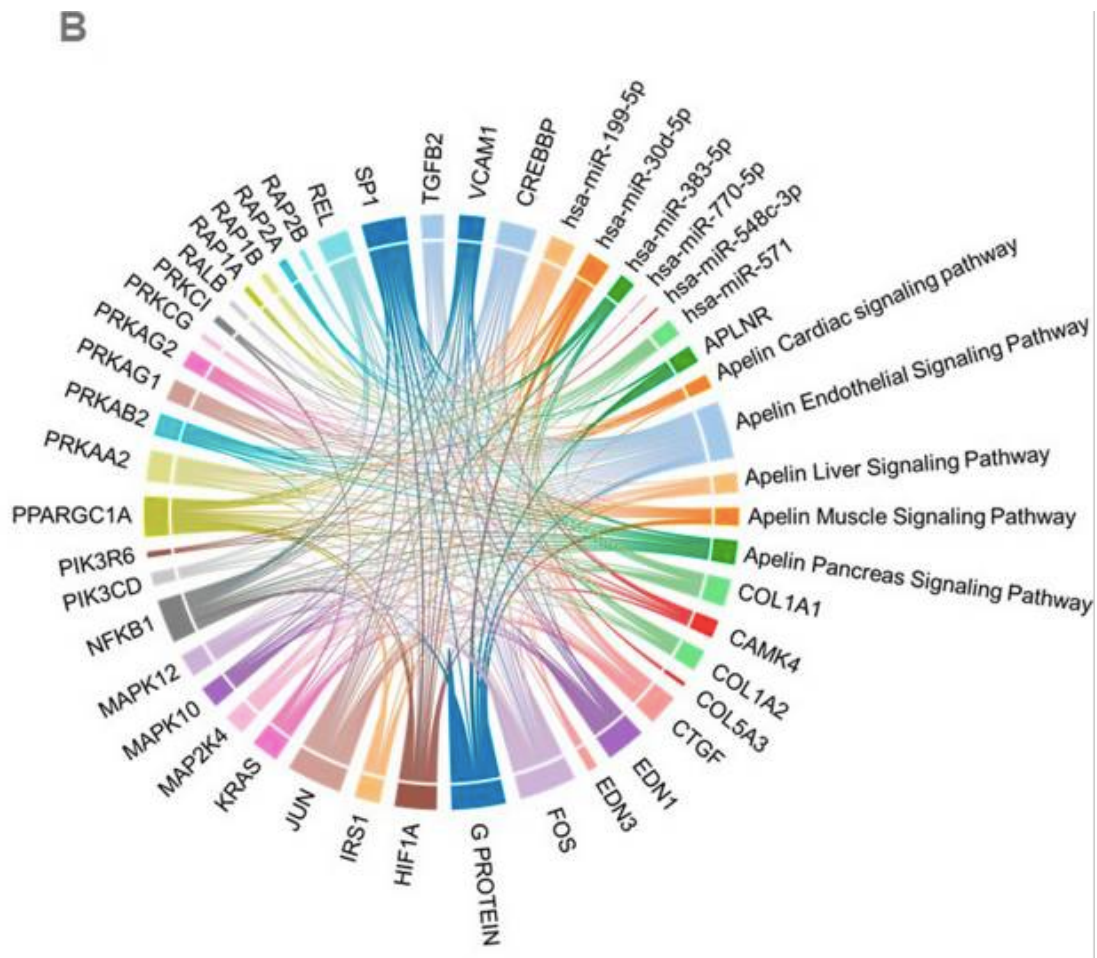


Figura 8 – (A) As 15 principais vias canônicas mais significativamente enriquecidas representadas como gráficos de barras empilhadas. O número total de moléculas em cada via está na parte superior de cada barra representada. A principal via enriquecida foi a "Via de sinalização hepática da apelina", com 14 das 26 moléculas da via (53,8%) contendo o maior número de alvos dos miRNAs desregulados. (B) Diagrama de cordas que representa a quantidade de conexão entre as cinco vias canônicas relacionadas à via de sinalização da apelina: no fígado, endotelial, músculo/cardiomiócito, fibroblastos cardíacos e pâncreas, com várias entidades ou nós (gene/proteína/miRNAs) dentro dessas vias ou indiretamente conectados aos nós das vias. Quanto mais inter-relacionamento e conexões o nó tiver, mais relevantemente será representado por cores diferentes. O tamanho era proporcional ao número de conexões. Nesse diagrama específico, as cores dos acordes foram parcialmente misturadas com as cores de suas entidades conectadas.

5.5 – Apelina e miRNA

Uma proporção significativa dos alvos potenciais dos miRNAs desregulados no grupo VASO pertence às vias canônicas de sinalização da apelina (APLN) e isso tem efeitos distintos nos diversos tecidos. Seis miRNAs tinham como alvo as vias canônicas da APLN, como mostram as Figuras 9 (A – E). Dentre eles temos o hsa-miR-770-5p, que foi subexpresso, e outros cinco que foram superexpressos: hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-383-5p, hsa-miR-548c-3p, hsa-miR-571. Essa via é fundamental em diferentes órgãos/tecidos/células do corpo, como nos hepatócitos (figura 9A), cardiomiócitos (figura 9B), fibroblastos cardíacos (figura 9C), células pancreáticas (figura 9D), células endoteliais e células musculares lisas vasculares (figura 9E). Três nós estão presentes nas cinco vias mostradas nas figuras 9A-E: apelina (APLN), hsa-miR-199-5p e seu alvo previsto, o receptor de apelina (APLNR). Nos hepatócitos (Fig. 9A), o hsa-miR-199-5p tem três alvos previstos: o receptor de apelina (APLNR), o colágeno tipo 1 (COL5A3) e a glicogênio sintase quinase 3 beta (GSK3b). A endotelina 1 (EDN1) e a endotelina 3 (EDN3) são alvos previstos do hsa-miR-383-5p e do hsa-miR-571, respectivamente, e ambos já demonstraram ser capazes de aumentar a expressão de APLN. A ATII tem um efeito inibitório na APLN. O hsa-miR-30d-5p tem três alvos previstos: substrato 1 do receptor de insulina (IRS1), cadeia alfa 1 e 2 do colágeno tipo I (COL1A1 e COL1A2). Em cardiomiócitos (figura 9B), o hsa-miR-199-5p tem três alvos previstos: APLNR, o fator de transcrição fator induzível por hipóxia 1 subunidade alfa (Hif1) e a enzima catalase (CAT), que também é um alvo previsto do hsa-miR-30d-5p. Nos fibroblastos cardíacos (figura 9C), o hsa-miR-199-5p e outros três miRNAs: hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-

571 e hsa-miR-548c-5p têm a quinase ativada por AMP (AMPK) como alvo em comum. Esses mesmos quatro miRNAs têm alvos diferentes na sinalização da apelina em células pancreáticas (figura 9D), levando a um aumento previsto na resistência à insulina.

É interessante observar que, especialmente no conjunto células endoteliais / célula muscular vascular (figura 9E), o efeito destes quatro miRNAs: hsa-miR-199-5p, hsa-miR-30d, hsa-miR-548c-5p e hsa-miR-571 é a inibição da vasodilatação, mostrando que os pacientes que desenvolvem SV são portadores, no pré-operatório, de maior tendência à vasoconstrição. Além disso, nas células endoteliais, o hsa-miR-770-5p é regulado negativamente no grupo VASO e tem como alvo a molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM1), uma sialoglicoproteína de superfície celular expressa pelo endotélio ativado por citocinas.

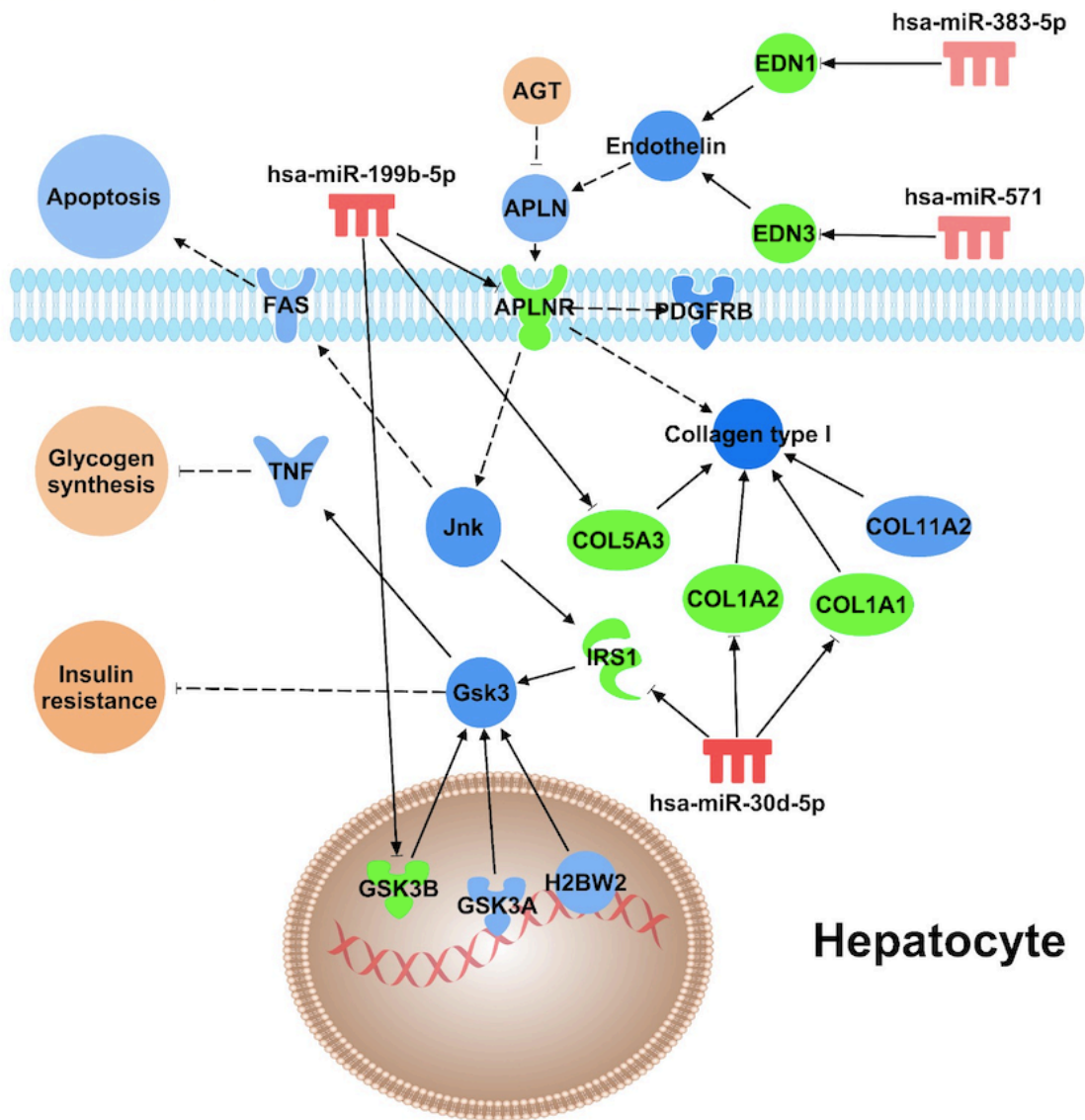


Figura 9A

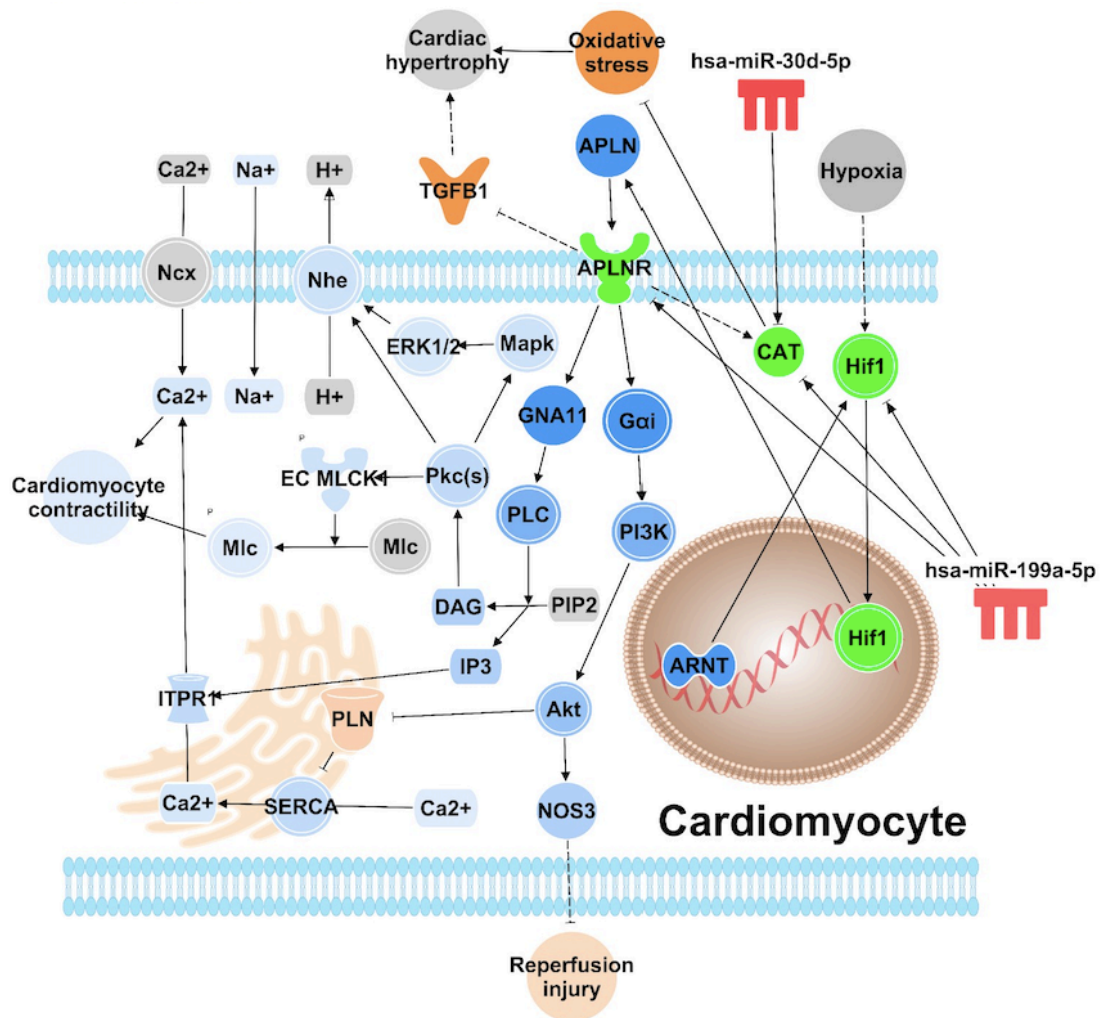


Figura 9B

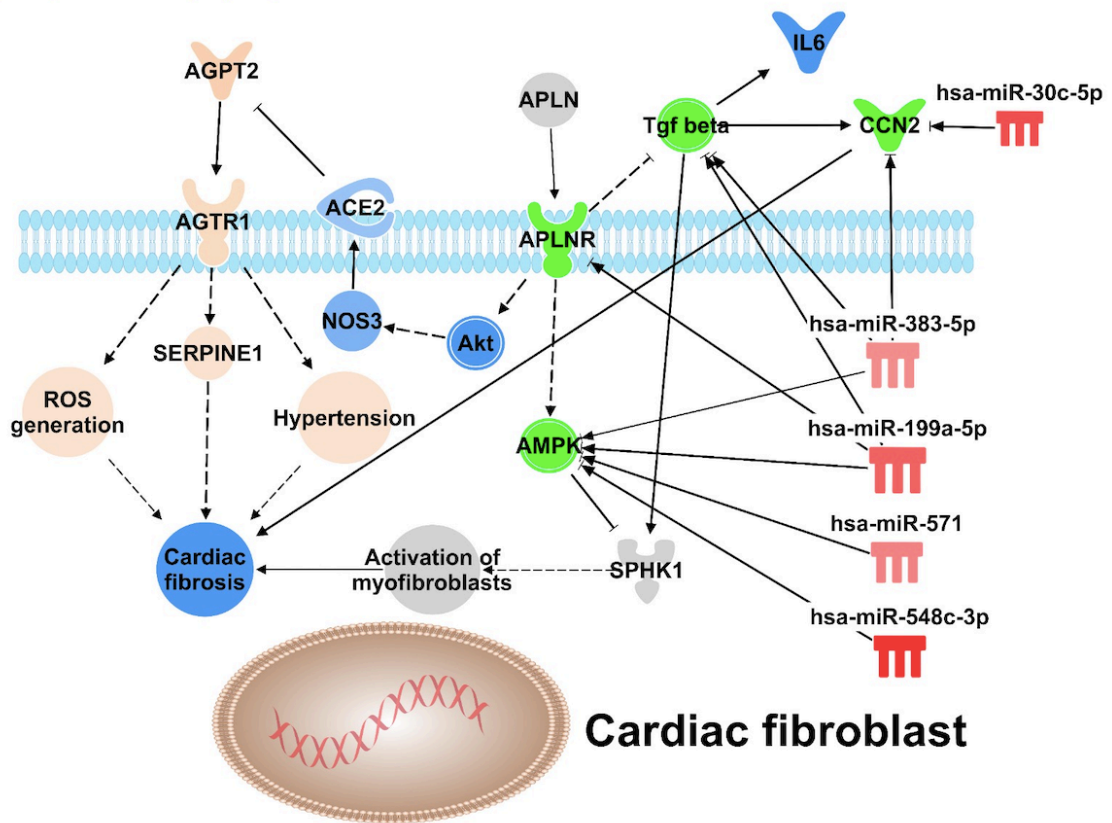


Figura 9C

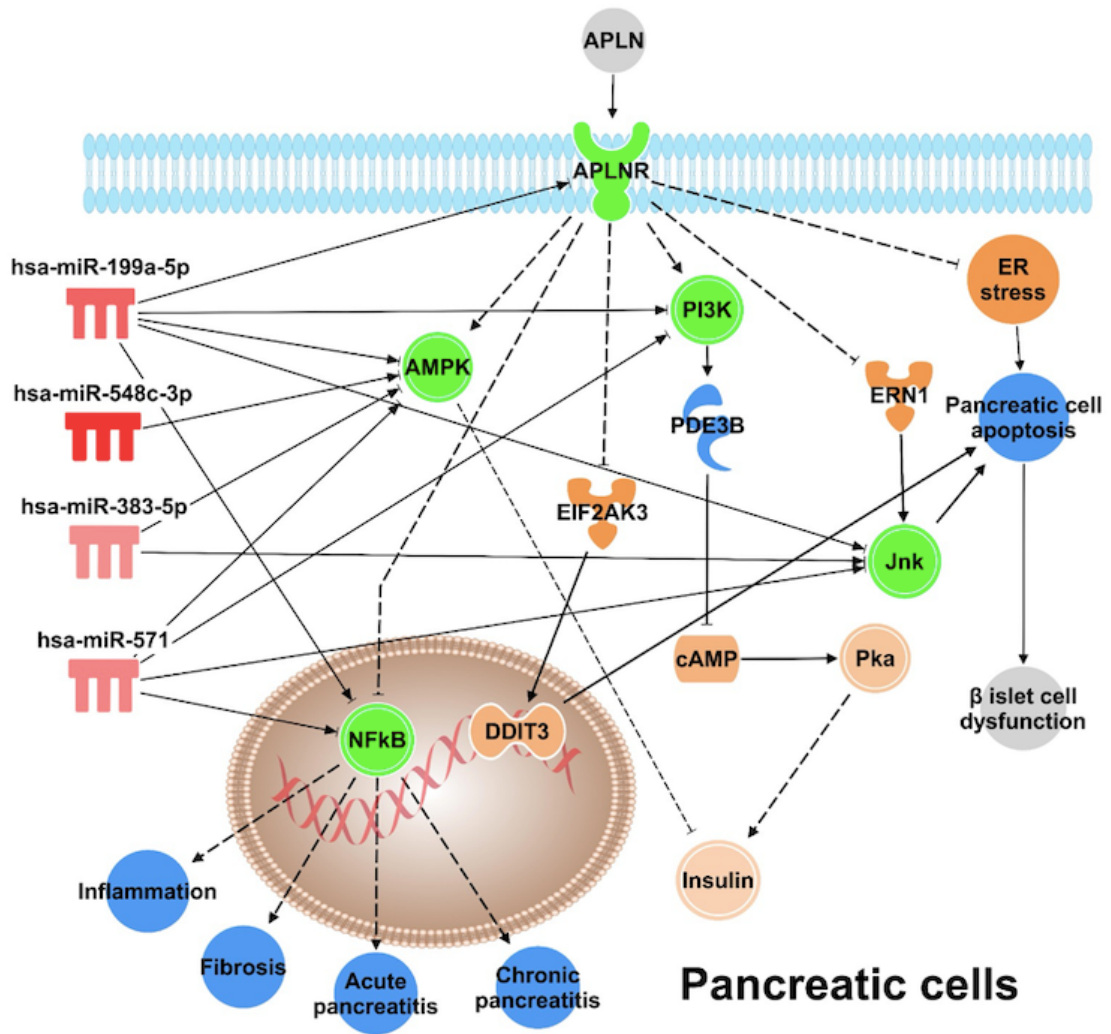


Figura 9D

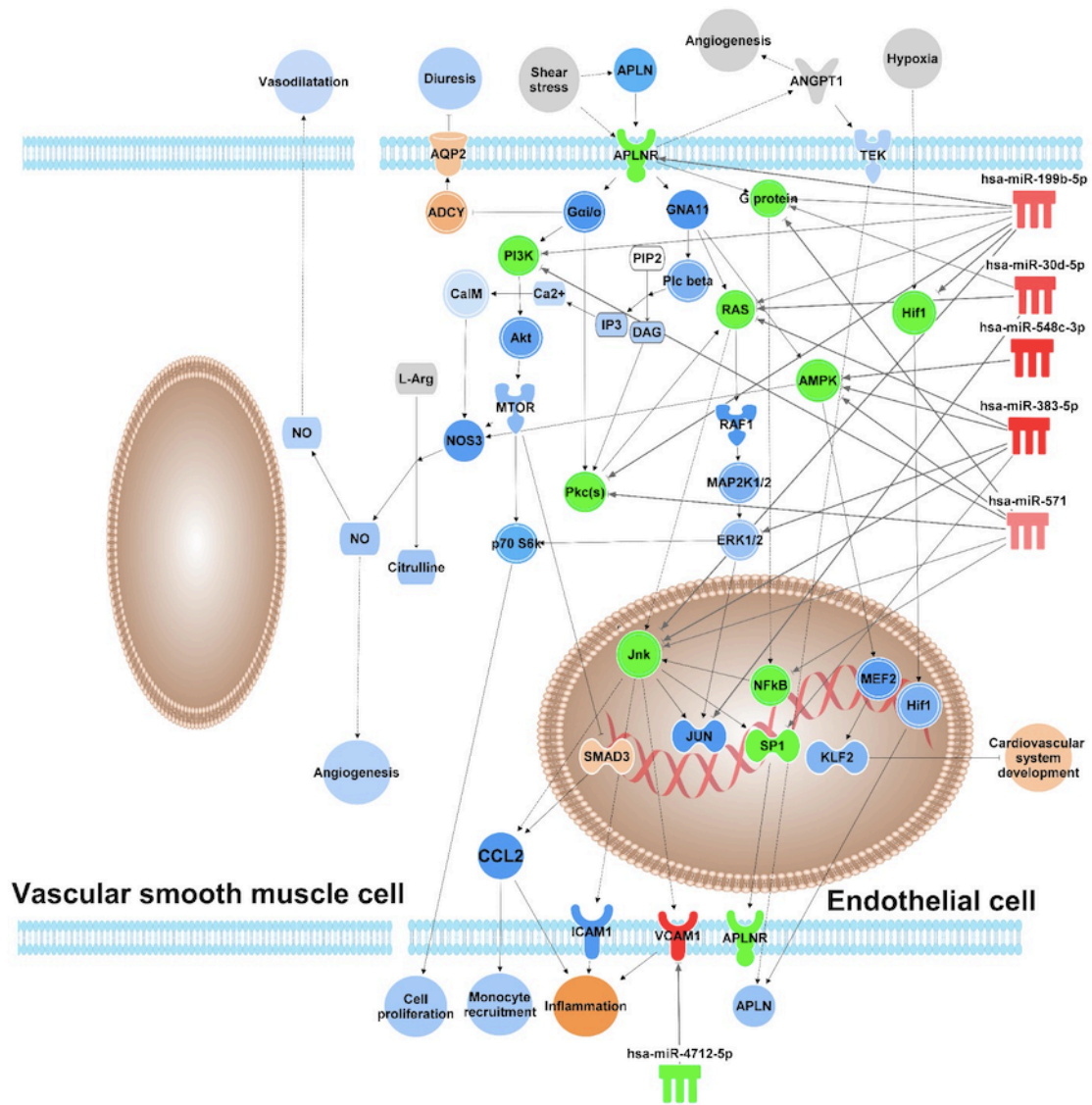


Figura 9E.

Figura 9 – Via canônica de sinalização da apelina em diferentes tecidos: A) hepatócito; B) cardiomiócito; C) fibroblasto cardíaco; D) célula pancreática; E) endotélio e célula muscular lisa vascular. Os miRNAs estão representados em verde e vermelho, indicando sua expressão aumentada e diminuída, respectivamente. As moléculas e efeitos estão representados em laranja e azul, mostrando seus efeitos aumentados e diminuídos, respectivamente.

6 – Discussão

Neste estudo de caso controle aninhado a uma coorte de pacientes em pós-operatório de revascularização do miocárdio, demonstrou-se pela primeira vez uma associação entre microRNAs e Síndrome Vasoplégica. Mostramos que o padrão de miRNAs desregulados que encontramos em nossos resultados pode constituir uma assinatura genética de miRNA para Síndrome Vasoplégica pós-CEC, a serem dosados no sangue de pacientes em pré-operatório de cirurgias de revascularização do miocárdio. Considerando que a incidência de vasoplegia pode chegar a 44% com uma alta mortalidade de aproximadamente 25%, a utilização da combinação dos hsa-miR-30d e hsa-770-5p como biomarcadores de SV se tornaria uma ótima ferramenta para a decisão entre revascularização cirúrgica, tratamento clínico ou angioplastia.

A escolha de investigar a síndrome vasoplégica após cirurgia de revascularização miocárdica (RVM) e seu potencial relacionamento com microRNAs (miRNAs) foi motivada por diversas razões. A síndrome vasoplégica é uma complicação importante e desafiadora que pode ocorrer após a RVM, caracterizada pela disfunção persistente da vasculatura periférica e uma resposta inadequada à administração de vasopressores. Esta condição está associada a um aumento significativo da morbimortalidade, tempo de internação hospitalar e custos relacionados ao tratamento.

A identificação de biomarcadores eficazes para prever a ocorrência da síndrome vasoplégica é de extrema importância, pois permitiria adotar medidas preventivas, intervenções terapêuticas precoces ou até contra-indicação à cirurgia, resultando em melhores desfechos clínicos e redução da

morbimortalidade associada. Nesse contexto, a investigação do papel dos miRNAs como potenciais biomarcadores se torna relevante.

Os miRNAs são pequenos RNAs não codificantes que desempenham um papel fundamental na regulação pós-transcricional dos genes, modulando a expressão de múltiplos alvos. Eles têm sido amplamente estudados em várias doenças cardiovasculares, incluindo a disfunção vascular. Os miRNAs circulantes têm despertado interesse crescente como potenciais biomarcadores, devido à sua estabilidade e capacidade de refletir alterações fisiopatológicas em diferentes órgãos e tecidos, conforme demonstrado na revisão de literatura.

No caso específico da síndrome vasoplégica após a RVM, este estudo identificou uma associação entre miRNAs específicos e a patogênese dessa complicação. Notavelmente, os hsa-miR-30d e hsa-miR-770-5p demonstraram uma alta área sob a curva (AUC) em análises de curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*), indicando boa capacidade de discriminação entre pacientes que desenvolvem a síndrome vasoplégica e aqueles que não apresentam a complicação. Além disso, esses miRNAs também demonstraram boa sensibilidade e especificidade na predição dessa condição.

A identificação desses miRNAs como biomarcadores confiáveis poderia ter implicações significativas na prática clínica, permitindo uma triagem mais precisa e estratificação de risco dos pacientes submetidos à RVM, bem como a implementação de medidas preventivas e terapêuticas direcionadas aos indivíduos de maior risco.

Alguns escores de risco foram desenvolvidos e são utilizados para ajudar especialistas na tomada de decisão, baseados na comparação entre o risco da doença e o risco da intervenção cirúrgica. Os escores de risco mais utilizados

para prever complicações após cirurgias cardíacas não contemplam a possibilidade da ocorrência de SV, que são o *EuroSCORE II* e o *STS Score*. O primeiro é um modelo de regressão logística desenvolvido e baseado em dados pré-operatórios coletados prospectivamente de 22.381 pacientes submetidos à cirurgia cardíaca e que nos dá percentualmente a probabilidade de morte intra-hospitalar. (67) O segundo é um sistema de pontuação desenvolvido pela *Society of Thoracic Surgeons* que leva em consideração uma quantidade maior de variáveis, fornece riscos de outras comorbidades, além do óbito, e atualmente é reconhecido como superior ao *EuroSCORE II* para previsão de desfechos. (11) No entanto nenhum dos dois modelos, sendo os mais utilizados no mundo para estimativa de risco em cirurgia cardíaca, abrangem o risco de SV. Em 2016, Vessem e colaboradores realizaram uma análise retrospectiva de 225 pacientes com insuficiência cardíaca submetidos à cirurgia de reconstrução ventricular e implante de dispositivos de assistência e desenvolveram um modelo de risco de vasoplegia para esta população. Obtiveram uma AUC deste modelo de 0.759 (IC 95% de 0.690 - 0.829). (68)

A SV é um evento observado em outras situações além do pós-operatório de cirurgia cardíaca e pode ser desencadeado por outros estados de doença que levam a um excesso de produção de NO. Entre esses estados estão a sepse, a anafilaxia e o transplante hepático. (69) A análise computacional identificou alvos moleculares desta assinatura de miRNA (hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-383-5p, hsa-miR-548c-3p, hsa-miR-571 e hsa-miR-770-5p) que alteram principalmente a via da apelina no fígado, cardiomiócito, pâncreas e vasos sanguíneos. A via da apelina em tecido hepático foi a que teve percentualmente mais enriquecimento de suas vias. A previsão de alvos por análise

computacional mostra, com base no perfil de miRNA contido no sangue pré-operatório, que os pacientes que desenvolvem SV apresentavam, antes de serem expostos à CEC, maior tendência a vasoconstrição, como ilustrado pela figura 9E. Por algum motivo estes pacientes, ao serem expostos a RVM com CEC, desenvolvem um estado patológico de vasodilatação. É possível que a exposição destes pacientes à cirurgia com CEC inverta o perfil de miRNA, levando a um estado de vasodilatação patológica mediada pela apelina.

A apelina (APLN) é um peptídeo que possui um receptor acoplado a uma proteína G (APLNR) que age no sistema cardiovascular como potente inotrópico e vasodilatador. O APLNR foi descrito pela primeira vez em 1993 como um receptor de angiotensina que não se ligava a esta molécula. Em 1998 a APLN foi identificada como ligante deste receptor. (70,71) Sabe-se que ela exerce importante influência no desenvolvimento adequado do sistema cardiovascular. Estudos experimentais em modelo animal mostram que a exclusão do gene desta molécula leva à disfunção ventricular, intolerância a exercício, incapacidade de resposta hipertrófica do miocárdio e insuficiência cardíaca como resposta a sobrecargas de pressão. (72)

O efeito mais importante da APLN é sua capacidade de promover vasodilatação, dependente da liberação de NO pelo endotélio. Este efeito pode ser diminuído na presença de um inibidor da NO sintase endotelial (eNOS), sugerindo que a via APLN / APLNR exerça um efeito vasodilatador pela ativação da via da eNOS. (73,74) Ishida et al demonstraram que a administração aguda de apelina diminuiu significativamente a pressão arterial sistólica em modelo animal, mas foi incapaz de alterar a pressão arterial sistólica em animais deficientes em APLNR. Curiosamente, o efeito hipotensor da apelina também foi

observado em modelos de animais hipertensos crônicos. (75) Outro ponto a favor da vasodilatação dependente de NO é o efeito apelinérgico ser dependente da integridade do endotélio vascular. Em vasos com endotélio íntegro, a infusão de apelina induz a vasodilatação, efeito oposto ao do receptor de angiotensina. No entanto, em vasos com lesão e ausência do endotélio, o efeito da apelina diretamente sobre a célula muscular lisa resulta em vasoconstrição. (72)

A relação da apelina com microRNAs já foi demonstrada em estudos sobre hipertensão arterial pulmonar (HP). Toshner e colaboradores mostraram que os pacientes com HP apresentam diminuição da expressão e da função do receptor de proteína morfogênica óssea tipo II (BMPR-II). Betero e colaboradores avaliaram que a perda da função do BMPR-II está associada à superexpressão da família miRNA miR-130/301. Além disso, os miR-424 e -503 exercem importante papel na regulação da proliferação endotelial nos pacientes com HP. (72,76,77)

Acredita-se que o modelo fisiopatológico da SV seja o mesmo em diversos cenários como na sepse, SIRS, lesão pulmonar aguda e pós-CEC. Todos estes estados de doença citados têm em comum o miR-30d, com efeitos celulares bem descritos (78–80). Demonstramos, neste estudo, que a desregulação desse importante miRNA da SV em outros cenários também se faz presente na vasoplegia pós-CEC.

Não há até o momento correlação publicada entre miR-770-5p e Síndrome Vasoplégica. A literatura sobre esta molécula mostra que ela exerce papel na injúria da nefropatia diabética e está relacionada a diferentes estados de doença como diabetes, cardiomiopatia dilatada e cânceres de pulmão não-pequenas células, de mama e de estômago. (81–87)

O trabalho de Yuan e colaboradores mostrou que humanos e animais com fibrose pulmonar tinham subexpressão do miR-770-5p. A administração do miR-770-5p reduziu significativamente as lesões fibróticas nos pulmões de camundongos expostos à poeira de sílica. Assim como nos nossos pacientes, a expressão do miR-770-5p também estava diminuída na SV. Sabendo que tanto a SV quanto a Fibrose Pulmonar são doenças com importante componente inflamatório, este miRNA pode estar correlacionado à atividade de inflamação nestes dois quadros. (88)

7 - Conclusão

A associação dos microRNAs miR-30d e miR-770-5p representa um potencial biomarcador capaz de distinguir aqueles pacientes que irão desenvolver SV após RVM com CEC. A previsão de alvos de miRNA, por análise computacional, aponta que os pacientes que desenvolvem SV após RVM com CEC possuem um perfil de miRNA, antes da cirurgia, que lhes confere maior tendência à vasoconstrição, provavelmente mediada pela molécula de APLN e seu receptor APLNR.

8 – Referências Bibliográficas

1. Gaudino MFL, Spadaccio C, Taggart DP. State-of-the-Art Coronary Artery Bypass Grafting: Patient Selection, Graft Selection, and Optimizing Outcomes. *Interv Cardiol Clin*. 2019 Apr;8(2):173-198. doi: 10.1016/j.iccl.2018.11.007. Epub 2019 Jan 28. PMID: 30832941.
2. Liu H, Yu L, Yang L, Green MS. Vasoplegic syndrome: An update on perioperative considerations. *J Clin Anesth*. 2017 Aug;40:63-71. doi: 10.1016/j.jclinane.2017.04.017. PMID: 28625450.
3. Fischer GW, Levin MA. Vasoplegia during cardiac surgery: current concepts and management. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 2010 Summer;22(2):140-4. doi: 10.1053/j.semtcvs.2010.09.007. PMID: 21092891.
4. Arkin DB, Saidman LJ, Benumof JL. Hypotension following cardiopulmonary bypass. *Anesth Analg*. 1977 Sep-Oct;56(5):720-4. doi: 10.1213/00000539-197709000-00022. PMID: 562100.
5. Datt V, Wadhwa R, Sharma V, Virmani S, Minhas HS, Malik S. Vasoplegic syndrome after cardiovascular surgery: A review of pathophysiology and outcome-oriented therapeutic management. *J Card Surg*. 2021 Oct;36(10):3749-3760. doi: 10.1111/jocs.15805. Epub 2021 Jul 12. PMID: 34251716.
6. Shaefi S, Mittel A, Klick J, Evans A, Ivascu NS, Gutsche J, Augoustides JGT. Vasoplegia After Cardiovascular Procedures-Pathophysiology and Targeted Therapy. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2018 Apr;32(2):1013-1022. doi: 10.1053/j.jvca.2017.10.032. Epub 2017 Oct 27. PMID: 29223724.
7. Busse LW, Barker N, Petersen C. Vasoplegic syndrome following cardiothoracic surgery-review of pathophysiology and update of treatment options. *Crit Care*. 2020 Feb 4;24(1):36. doi: 10.1186/s13054-020-2743-8. PMID: 32019600; PMCID: PMC7001322.
8. Levy B, Fritz C, Tahon E, Jacquot A, Auchet T, Kimmoun A. Vasoplegia treatments: the past, the present, and the future. *Crit Care*. 2018 Feb 27;22(1):52. doi: 10.1186/s13054-018-1967-3. PMID: 29486781; PMCID: PMC6389278.
9. Jochberger S, Velik-Salchner C, Mayr VD, Luckner G, Wenzel V, Falkensammer G, Ulmer H, Morgenthaler N, Hasibeder W, Dünser MW. The vasopressin and copeptin response in patients with vasodilatory shock after cardiac surgery: a prospective, controlled study. *Intensive Care Med*. 2009 Mar;35(3):489-97. doi: 10.1007/s00134-008-1279-1. Epub 2008 Sep 30. PMID: 18825368.
10. Kalender M, Adademir T, Tasar M, Ecevit AN, Karaca OG, Salihi S, Buyukbayrak F, Ozkokeli M. Validation of EuroSCORE II risk model for coronary artery bypass surgery in high-risk patients. *Kardiochir Torakochirurgia Pol*. 2014 Sep;11(3):252-6. doi: 10.5114/kitp.2014.45672. Epub 2014 Sep 28. PMID: 26336431; PMCID: PMC4283878.
11. Ad N, Holmes SD, Patel J, Pritchard G, Shuman DJ, Halpin L. Comparison of EuroSCORE II, Original EuroSCORE, and The Society of Thoracic Surgeons Risk Score in Cardiac Surgery Patients. *Ann Thorac Surg*. 2016 Aug;102(2):573-9. doi: 10.1016/j.athoracsur.2016.01.105. Epub 2016 Apr 23. PMID: 27112651.
12. O'Brien SM, Feng L, He X, Xian Y, Jacobs JP, Badhwar V, Kurlansky PA, Furnary AP, Cleveland JC Jr, Lobdell KW, Vassileva C, Wyler von Ballmoos MC, Thourani

- VH, Rankin JS, Edgerton JR, D'Agostino RS, Desai ND, Edwards FH, Shahian DM. The Society of Thoracic Surgeons 2018 Adult Cardiac Surgery Risk Models: Part 2-Statistical Methods and Results. *Ann Thorac Surg.* 2018 May;105(5):1419-1428. doi: 10.1016/j.athoracsur.2018.03.003. Epub 2018 Mar 22. PMID: 29577924.
13. Shahian DM, Jacobs JP, Badhwar V, Kurlansky PA, Furnary AP, Cleveland JC Jr, Lobdell KW, Vassileva C, Wyler von Ballmoos MC, Thourani VH, Rankin JS, Edgerton JR, D'Agostino RS, Desai ND, Feng L, He X, O'Brien SM. The Society of Thoracic Surgeons 2018 Adult Cardiac Surgery Risk Models: Part 1-Background, Design Considerations, and Model Development. *Ann Thorac Surg.* 2018 May;105(5):1411-1418. doi: 10.1016/j.athoracsur.2018.03.002. Epub 2018 Mar 22. PMID: 29577925.
 14. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993 Dec 3;75(5):843-54. doi: 10.1016/0092-8674(93)90529-y. PMID: 8252621.
 15. van Rooij E. The art of microRNA research. *Circ Res.* 2011 Jan 21;108(2):219-34. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.227496. PMID: 21252150.
 16. Wu F, Guo NJ, Tian H, Marohn M, Gearhart S, Bayless TM, Brant SR, Kwon JH. Peripheral blood microRNAs distinguish active ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2011 Jan;17(1):241-50. doi: 10.1002/ibd.21450. Epub 2010 Sep 1. PMID: 20812331; PMCID: PMC2998576.
 17. Kaur A, Mackin ST, Schlosser K, Wong FL, Elharram M, Delles C, Stewart DJ, Dayan N, Landry T, Pilote L. Systematic review of microRNA biomarkers in acute coronary syndrome and stable coronary artery disease. *Cardiovasc Res.* 2020 May 1;116(6):1113-1124. doi: 10.1093/cvr/cvz302. PMID: 31782762.
 18. Gomes WJ, Carvalho AC, Palma JH, Gonçalves I Jr, Buffolo E. Vasoplegic syndrome: a new dilemma. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1994 Mar;107(3):942-3. PMID: 8127127.
 19. Gomes WJ, Silas MG, Lopes MG, Palma JH, Teles CA, Branco JN et al. Síndrome vasoplégica: nova forma de síndrome pós perfusão. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 1996; 11(1) 39-43. DOI: 10.1590/S0102-76381996000100008
 20. Jentzer JC, Vallabhajosyula S, Khanna AK, Chawla LS, Busse LW, Kashani KB. Management of Refractory Vasodilatory Shock. *Chest.* 2018 Aug;154(2):416-426. doi: 10.1016/j.chest.2017.12.021. Epub 2018 Jan 9. PMID: 29329694.
 21. Durán Bruce M, Gomar Sancho C, Holguera JC, Muliterno Español E. Factores implicados en el desarrollo de vasoplejía tras cirugía cardiaca con circulación extracorpórea. Estudio prospectivo observacional [Factors involved in the development of vasoplegia after cardiac surgery with extracorporeal circulation. A prospective observational study]. *Rev Esp Anesthesiol Reanim.* 2014 May;61(5):246-53. Spanish. doi: 10.1016/j.redar.2013.11.015. Epub 2014 Feb 5. PMID: 24507583.
 22. Tsiouris A, Wilson L, Haddadin AS, Yun JJ, Mangi AA. Risk assessment and outcomes of vasoplegia after cardiac surgery. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 2017 Oct;65(10):557-565. doi: 10.1007/s11748-017-0789-6. Epub 2017 Jun 13. PMID: 28612323.

23. Hossne Junior NA, Miranda M, Monteiro MR, Branco JN, Vargas GF, Pestana JO, Gomes WJ. Cardiopulmonary bypass increases the risk of vasoplegic syndrome after coronary artery bypass grafting in patients with dialysis-dependent chronic renal failure. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2015 Jul-Aug;30(4):482-8. doi: 10.5935/1678-9741.20140092. PMID: 27163423; PMCID: PMC4614932.
24. Shanmugam G. Vasoplegic syndrome--the role of methylene blue. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2005 Nov;28(5):705-10. doi: 10.1016/j.ejcts.2005.07.011. Epub 2005 Sep 6. PMID: 16143539.
25. Alfirevic A, Xu M, Johnston D, Figueroa P, Koch CG. Transfusion increases the risk for vasoplegia after cardiac operations. *Ann Thorac Surg*. 2011 Sep;92(3):812-9. doi: 10.1016/j.athoracsur.2011.04.020. Epub 2011 Jul 23. PMID: 21788009.
26. Levin MA, Lin HM, Castillo JG, Adams DH, Reich DL, Fischer GW. Early on-cardiopulmonary bypass hypotension and other factors associated with vasoplegic syndrome. *Circulation*. 2009 Oct 27;120(17):1664-71. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.814533. Epub 2009 Oct 12. PMID: 19822810.
27. Sun X, Zhang L, Hill PC, Lowery R, Lee AT, Molyneaux RE, Corso PJ, Boyce SW. Is incidence of postoperative vasoplegic syndrome different between off-pump and on-pump coronary artery bypass grafting surgery? *Eur J Cardiothorac Surg*. 2008 Oct;34(4):820-5. doi: 10.1016/j.ejcts.2008.07.012. Epub 2008 Aug 19. PMID: 18715792.
28. Raja SG, Fida N. Should angiotensin converting enzyme inhibitors/angiotensin II receptor antagonists be omitted before cardiac surgery to avoid postoperative vasodilation? *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2008 May;7(3):470-5. doi: 10.1510/icvts.2007.174698. Epub 2008 Feb 13. PMID: 18272542.
29. Bertrand M, Godet G, Meersschaert K, Brun L, Salcedo E, Coriat P. Should the angiotensin II antagonists be discontinued before surgery? *Anesth Analg*. 2001 Jan;92(1):26-30. doi: 10.1097/00000539-200101000-00006. PMID: 11133595.
30. Roshanov PS, Rochweg B, Patel A, Salehian O, Duceppe E, Belley-Côté EP, Guyatt GH, Sessler DI, Le Manach Y, Borges FK, Tandon V, Worster A, Thompson A, Koshy M, Devereaux B, Spencer FA, Sanders RD, Sloan EN, Morley EE, Paul J, Raymer KE, Punthakee Z, Devereaux PJ. Withholding versus Continuing Angiotensin-converting Enzyme Inhibitors or Angiotensin II Receptor Blockers before Noncardiac Surgery: An Analysis of the Vascular events In noncardiac Surgery patients cOhort evaluatioN Prospective Cohort. *Anesthesiology*. 2017 Jan;126(1):16-27. doi: 10.1097/ALN.0000000000001404. PMID: 27775997.
31. Mehaffey JH, Johnston LE, Hawkins RB, Charles EJ, Yarboro L, Kern JA, Ailawadi G, Kron IL, Ghanta RK. Methylene Blue for Vasoplegic Syndrome After Cardiac Operation: Early Administration Improves Survival. *Ann Thorac Surg*. 2017 Jul;104(1):36-41. doi: 10.1016/j.athoracsur.2017.02.057. Epub 2017 May 24. PMID: 28551045; PMCID: PMC5523819.
32. Omar S, Zedan A, Nugent K. Cardiac vasoplegia syndrome: pathophysiology, risk factors and treatment. *Am J Med Sci*. 2015 Jan;349(1):80-8. doi: 10.1097/MAJ.0000000000000341. PMID: 25247756.
33. Hajjar LA, Vincent JL, Barbosa Gomes Galas FR, Rhodes A, Landoni G, Osawa EA, Melo RR, Sundin MR, Grande SM, Gaiotto FA, Pomerantzeff PM, Dallan LO, Franco RA, Nakamura RE, Lisboa LA, de Almeida JP, Gerent AM, Souza DH,

- Gaiane MA, Fukushima JT, Park CL, Zambolim C, Rocha Ferreira GS, Strabelli TM, Fernandes FL, Camara L, Zeferino S, Santos VG, Piccioni MA, Jatene FB, Costa Auler JO Jr, Filho RK. Vasopressin versus Norepinephrine in Patients with Vasoplegic Shock after Cardiac Surgery: The VANCS Randomized Controlled Trial. *Anesthesiology*. 2017 Jan;126(1):85-93. doi: 10.1097/ALN.0000000000001434. PMID: 27841822.
34. Gordon AC, Mason AJ, Thirunavukkarasu N, Perkins GD, Cecconi M, Cepkova M, Pogson DG, Aya HD, Anjum A, Frazier GJ, Santhakumaran S, Ashby D, Brett SJ; VANISH Investigators. Effect of Early Vasopressin vs Norepinephrine on Kidney Failure in Patients With Septic Shock: The VANISH Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2016 Aug 2;316(5):509-18. doi: 10.1001/jama.2016.10485. PMID: 27483065.
 35. Leyh RG, Kofidis T, Strüber M, Fischer S, Knobloch K, Wachsmann B, Hagl C, Simon AR, Haverich A. Methylene blue: the drug of choice for catecholamine-refractory vasoplegia after cardiopulmonary bypass? *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2003 Jun;125(6):1426-31. doi: 10.1016/s0022-5223(02)73284-4. PMID: 12830064.
 36. Ozal E, Kuralay E, Yildirim V, Kilic S, Bolcal C, Küçükarslan N, Günay C, Demirkilic U, Tatar H. Preoperative methylene blue administration in patients at high risk for vasoplegic syndrome during cardiac surgery. *Ann Thorac Surg*. 2005 May;79(5):1615-9. doi: 10.1016/j.athoracsur.2004.10.038. PMID: 15854942.
 37. Menardi AC, Viaro F, Vicente WV, Rodrigues AJ, Evora PR. Hemodynamic and vascular endothelium function studies in healthy pigs after intravenous bolus infusion of methylene blue. *Arq Bras Cardiol*. 2006 Oct;87(4):525-32. English, Portuguese. doi: 10.1590/s0066-782x2006001700019. PMID: 17128324.
 38. McDonnell AM, Rybak I, Wadleigh M, Fisher DC. Suspected serotonin syndrome in a patient being treated with methylene blue for ifosfamide encephalopathy. *J Oncol Pharm Pract*. 2012 Dec;18(4):436-9. doi: 10.1177/1078155211433231. Epub 2012 Jan 10. PMID: 22235061.
 39. Basta MN. Postoperative Serotonin Syndrome Following Methylene Blue Administration for Vasoplegia After Cardiac Surgery: A Case Report and Review of the Literature. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth*. 2021 Mar;25(1):51-56. doi: 10.1177/1089253220960255. Epub 2020 Sep 21. PMID: 32951524.
 40. Roderique JD, VanDyck K, Holman B, Tang D, Chui B, Spiess BD. The use of high-dose hydroxocobalamin for vasoplegic syndrome. *Ann Thorac Surg*. 2014 May;97(5):1785-6. doi: 10.1016/j.athoracsur.2013.08.050. PMID: 24792267.
 41. Woehlck HJ, Boettcher BT, Lauer KK, Cronin DC, Hong JC, Zimmerman MA, Kim J, Selim M. Hydroxocobalamin for Vasoplegic Syndrome in Liver Transplantation: Restoration of Blood Pressure Without Vasospasm. *A A Case Rep*. 2016 Dec 15;7(12):247-250. doi: 10.1213/XAA.0000000000000398. PMID: 27749291.
 42. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000 Feb 24;403(6772):901-6. doi: 10.1038/35002607. PMID: 10706289.
 43. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Müller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M,

- Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000 Nov 2;408(6808):86-9. doi: 10.1038/35040556. PMID: 11081512.
44. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Nov 26;99(24):15524-9. doi: 10.1073/pnas.242606799. Epub 2002 Nov 14. PMID: 12434020; PMCID: PMC137750.
 45. van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, Richardson JA, Olson EN. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Nov 28;103(48):18255-60. doi: 10.1073/pnas.0608791103. Epub 2006 Nov 15. PMID: 17108080; PMCID: PMC1838739.
 46. Zhao Y, Ransom JF, Li A, Vedantham V, von Drehle M, Muth AN, Tsuchihashi T, McManus MT, Schwartz RJ, Srivastava D. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell*. 2007 Apr 20;129(2):303-17. doi: 10.1016/j.cell.2007.03.030. Epub 2007 Mar 29. PMID: 17397913.
 47. van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*. 2007 Apr 27;316(5824):575-9. doi: 10.1126/science.1139089. Epub 2007 Mar 22. PMID: 17379774.
 48. Chim SS, Shing TK, Hung EC, Leung TY, Lau TK, Chiu RW, Lo YM. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem*. 2008 Mar;54(3):482-90. doi: 10.1373/clinchem.2007.097972. Epub 2008 Jan 24. PMID: 18218722.
 49. Ji X, Takahashi R, Hiura Y, Hirokawa G, Fukushima Y, Iwai N. Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury. *Clin Chem*. 2009 Nov;55(11):1944-9. doi: 10.1373/clinchem.2009.125310. Epub 2009 Aug 20. PMID: 19696117.
 50. Dimmeler S, Zeiher AM. Circulating microRNAs: novel biomarkers for cardiovascular diseases? *Eur Heart J*. 2010 Nov;31(22):2705-7. doi: 10.1093/eurheartj/ehq221. Epub 2010 Jul 6. PMID: 20605798.
 51. Gidlöf O, Smith JG, Miyazu K, Gilje P, Spencer A, Blomquist S, Erlinge D. Circulating cardio-enriched microRNAs are associated with long-term prognosis following myocardial infarction. *BMC Cardiovasc Disord*. 2013 Feb 28;13:12. doi: 10.1186/1471-2261-13-12. PMID: 23448306; PMCID: PMC3598930.
 52. Oerlemans MI, Mosterd A, Dekker MS, de Vrey EA, van Mil A, Pasterkamp G, Doevendans PA, Hoes AW, Sluijter JP. Early assessment of acute coronary syndromes in the emergency department: the potential diagnostic value of circulating microRNAs. *EMBO Mol Med*. 2012 Nov;4(11):1176-85. doi: 10.1002/emmm.201201749. Epub 2012 Oct 1. PMID: 23023917; PMCID: PMC3494874.
 53. Niculescu LS, Simionescu N, Sanda GM, Carnuta MG, Stancu CS, Popescu AC, Popescu MR, Vlad A, Dimulescu DR, Simionescu M, Sima AV. MiR-486 and miR-92a Identified in Circulating HDL Discriminate between Stable and Vulnerable

- Coronary Artery Disease Patients. *PLoS One*. 2015 Oct 20;10(10):e0140958. doi: 10.1371/journal.pone.0140958. PMID: 26485305; PMCID: PMC4617647.
54. Liu J, Liu Y, Sun YN, Li S, Liu XQ, Li J, Li CM, Tian W, Zhou YT, Shang XM. miR-28-5p Involved in LXR-ABCA1 Pathway is Increased in the Plasma of Unstable Angina Patients. *Heart Lung Circ*. 2015 Jul;24(7):724-30. doi: 10.1016/j.hlc.2014.12.160. Epub 2015 Jan 21. PMID: 25704294.
 55. Hoekstra M, van der Lans CA, Halvorsen B, Gullestad L, Kuiper J, Aukrust P, van Berkel TJ, Biessen EA. The peripheral blood mononuclear cell microRNA signature of coronary artery disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Apr 9;394(3):792-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.03.075. Epub 2010 Mar 15. PMID: 20230787.
 56. Li C, Fang Z, Jiang T, Zhang Q, Liu C, Zhang C, Xiang Y. Serum microRNAs profile from genome-wide serves as a fingerprint for diagnosis of acute myocardial infarction and angina pectoris. *BMC Med Genomics*. 2013 May 4;6:16. doi: 10.1186/1755-8794-6-16. PMID: 23641832; PMCID: PMC3655858.
 57. Mayr M, Zampetaki A, Kiechl S. MicroRNA biomarkers for failing hearts? *Eur Heart J*. 2013 Sep;34(36):2782-3. doi: 10.1093/eurheartj/eh261. Epub 2013 Jul 25. PMID: 23886919.
 58. Yang B, Lu Y, Wang Z. Control of cardiac excitability by microRNAs. *Cardiovasc Res*. 2008 Sep 1;79(4):571-80. doi: 10.1093/cvr/cvn181. Epub 2008 Jul 9. PMID: 18614549.
 59. Lu Y, Zhang Y, Wang N, Pan Z, Gao X, Zhang F, Zhang Y, Shan H, Luo X, Bai Y, Sun L, Song W, Xu C, Wang Z, Yang B. MicroRNA-328 contributes to adverse electrical remodeling in atrial fibrillation. *Circulation*. 2010 Dec 7;122(23):2378-87. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.958967. Epub 2010 Nov 22. Erratum in: *Circulation*. 2011 Sep 20;124(12):e334. PMID: 21098446.
 60. Liu Z, Zhou C, Liu Y, Wang S, Ye P, Miao X, Xia J. The expression levels of plasma microRNAs in atrial fibrillation patients. *PLoS One*. 2012;7(9):e44906. doi: 10.1371/journal.pone.0044906. Epub 2012 Sep 18. PMID: 23028671; PMCID: PMC3445571.
 61. Harling L, Lambert J, Ashrafian H, Darzi A, Gooderham NJ, Athanasiou T. Elevated serum microRNA 483-5p levels may predict patients at risk of post-operative atrial fibrillation. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2017 Jan;51(1):73-78. doi: 10.1093/ejcts/ezw245. Epub 2016 Jul 15. PMID: 27422887; PMCID: PMC5226070.
 62. Corsten MF, Dennert R, Jochems S, Kuznetsova T, Devaux Y, Hofstra L, Wagner DR, Staessen JA, Heymans S, Schroen B. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet*. 2010 Dec;3(6):499-506. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.110.957415. Epub 2010 Oct 4. PMID: 20921333.
 63. Xu HF, Ding YJ, Zhang ZX, Wang ZF, Luo CL, Li BX, Shen YW, Tao LY, Zhao ZQ. MicroRNA-21 regulation of the progression of viral myocarditis to dilated cardiomyopathy. *Mol Med Rep*. 2014 Jul;10(1):161-8. doi: 10.3892/mmr.2014.2205. Epub 2014 May 2. PMID: 24804616.
 64. Navarro IC, Ferreira FM, Nakaya HI, Baron MA, Vilar-Pereira G, Pereira IR, Silva AM, Real JM, De Brito T, Chevillard C, Lannes-Vieira J, Kalil J, Cunha-Neto E,

- Ferreira LR. MicroRNA Transcriptome Profiling in Heart of Trypanosoma cruzi-Infected Mice: Parasitological and Cardiological Outcomes. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Jun 18;9(6):e0003828. doi: 10.1371/journal.pntd.0003828. PMID: 26086673; PMCID: PMC4473529.
65. Schulte C, Karakas M, Zeller T. microRNAs in cardiovascular disease - clinical application. *Clin Chem Lab Med*. 2017 May 1;55(5):687-704. doi: 10.1515/cclm-2016-0576. PMID: 27914211.
 66. Jaguszewski M, Osipova J, Ghadri JR, Napp LC, Widera C, Franke J, Fijalkowski M, Nowak R, Fijalkowska M, Volkmann I, Katus HA, Wollert KC, Bauersachs J, Erne P, Lüscher TF, Thum T, Templin C. A signature of circulating microRNAs differentiates takotsubo cardiomyopathy from acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2014 Apr;35(15):999-1006. doi: 10.1093/eurheartj/eh392. Epub 2013 Sep 17. PMID: 24046434; PMCID: PMC3985061.
 67. Nashef SA, Roques F, Sharples LD, Nilsson J, Smith C, Goldstone AR, Lockowandt U. EuroSCORE II. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2012 Apr;41(4):734-44; discussion 744-5. doi: 10.1093/ejcts/ezs043. Epub 2012 Feb 29. PMID: 22378855.
 68. van Vesseme ME, Palmén M, Couperus LE, Mertens B, Berendsen RR, Tops LF, Verwey HF, de Jonge E, Klautz RJ, Schalijs MJ, Beeres SL. Incidence and predictors of vasoplegia after heart failure surgery. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2017 Mar 1;51(3):532-538. doi: 10.1093/ejcts/ezw316. PMID: 28364440.
 69. Evora PR, Rodrigues AJ, Vicente WV, Vicente YA, Basseto S, Basile Filho A, Capellini VK. Is the cyclic GMP system underestimated by intensive care and emergency teams? *Med Hypotheses*. 2007;69(3):564-7. doi: 10.1016/j.mehy.2007.01.041. Epub 2007 Mar 23. PMID: 17363182.
 70. O'Dowd BF, Heiber M, Chan A, Heng HH, Tsui LC, Kennedy JL, Shi X, Petronis A, George SR, Nguyen T. A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene*. 1993 Dec 22;136(1-2):355-60. doi: 10.1016/0378-1119(93)90495-o. PMID: 8294032.
 71. Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX, Kawamata Y, Fukusumi S, Hinuma S, Kitada C, Kurokawa T, Onda H, Fujino M. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Oct 20;251(2):471-6. doi: 10.1006/bbrc.1998.9489. PMID: 9792798.
 72. Yang P, Maguire JJ, Davenport AP. Apelin, Elabela/Toddler, and biased agonists as novel therapeutic agents in the cardiovascular system. *Trends Pharmacol Sci*. 2015 Sep;36(9):560-7. doi: 10.1016/j.tips.2015.06.002. Epub 2015 Jul 1. PMID: 26143239; PMCID: PMC4577653.
 73. Besserer-Offroy É, Bérubé P, Côté J, Murza A, Longpré JM, Dumaine R, Lesur O, Auger-Messier M, Leduc R, Marsault É, Sarret P. The hypotensive effect of activated apelin receptor is correlated with β -arrestin recruitment. *Pharmacol Res*. 2018 May;131:7-16. doi: 10.1016/j.phrs.2018.02.032. Epub 2018 Mar 9. PMID: 29530600.
 74. Tatemoto K, Takayama K, Zou MX, Kumaki I, Zhang W, Kumano K, Fujimiya M. The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul Pept*. 2001 Jun 15;99(2-3):87-92. doi: 10.1016/s0167-0115(01)00236-1. PMID: 11384769.

75. Kidoya H, Ueno M, Yamada Y, Mochizuki N, Nakata M, Yano T, Fujii R, Takakura N. Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis. *EMBO J*. 2008 Feb 6;27(3):522-34. doi: 10.1038/sj.emboj.7601982. Epub 2008 Jan 17. PMID: 18200044; PMCID: PMC2241654.
76. Toshner M, Tajsic T, Morrell NW. Pulmonary hypertension: advances in pathogenesis and treatment. *Br Med Bull*. 2010;94:21-32. doi: 10.1093/bmb/ldq012. Epub 2010 May 6. PMID: 20447940.
77. Bertero T, Lu Y, Annis S, Hale A, Bhat B, Saggarr R, Saggarr R, Wallace WD, Ross DJ, Vargas SO, Graham BB, Kumar R, Black SM, Fratz S, Fineman JR, West JD, Haley KJ, Waxman AB, Chau BN, Cottrill KA, Chan SY. Systems-level regulation of microRNA networks by miR-130/301 promotes pulmonary hypertension. *J Clin Invest*. 2014 Aug;124(8):3514-28. doi: 10.1172/JCI74773. Epub 2014 Jun 24. Erratum in: *J Clin Invest*. 2022 May 16;132(10): PMID: 24960162; PMCID: PMC4109523.
78. Jiao Y, Zhang T, Zhang C, Ji H, Tong X, Xia R, Wang W, Ma Z, Shi X. Exosomal miR-30d-5p of neutrophils induces M1 macrophage polarization and primes macrophage pyroptosis in sepsis-related acute lung injury. *Crit Care*. 2021 Oct 12;25(1):356. doi: 10.1186/s13054-021-03775-3. PMID: 34641966; PMCID: PMC8507252.
79. Caserta S, Kern F, Cohen J, Drage S, Newbury SF, Llewelyn MJ. Circulating Plasma microRNAs can differentiate Human Sepsis and Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). *Sci Rep*. 2016 Jun 20;6:28006. doi: 10.1038/srep28006. PMID: 27320175; PMCID: PMC4913253.
80. Caserta S, Mengozzi M, Kern F, Newbury SF, Ghezzi P, Llewelyn MJ. Severity of Systemic Inflammatory Response Syndrome Affects the Blood Levels of Circulating Inflammatory-Relevant MicroRNAs. *Front Immunol*. 2018 Feb 5;8:1977. doi: 10.3389/fimmu.2017.01977. PMID: 29459855; PMCID: PMC5807656.
81. Guo J, Han J, Liu J, Wang S. MicroRNA-770-5p contributes to podocyte injury via targeting E2F3 in diabetic nephropathy. *Braz J Med Biol Res*. 2020;53(9):e9360. doi: 10.1590/1414-431x20209360. Epub 2020 Jul 17. PMID: 32696822; PMCID: PMC7372943.
82. Zhang JF, Zhang JS, Zhao ZH, Yang PB, Ji SF, Li N, Shi QD, Tan J, Xu X, Xu CB, Zhao LY. MicroRNA-770 affects proliferation and cell cycle transition by directly targeting CDK8 in glioma. *Cancer Cell Int*. 2018 Dec 3;18:195. doi: 10.1186/s12935-018-0694-9. PMID: 30524203; PMCID: PMC6276177.
83. Wang M, Wei J, Ji T, Zang K. miRNA-770-5p expression is upregulated in patients with type 2 diabetes and miRNA-770-5p knockdown protects pancreatic β -cell function via targeting BAG5 expression. *Exp Ther Med*. 2021 Jul;22(1):664. doi: 10.3892/etm.2021.10096. Epub 2021 Apr 22. PMID: 33986829; PMCID: PMC8112148.
84. Huang K, Wen S, Huang J, Wang F, Pang L, Wang Y, Sun X. Integrated Analysis of Hub Genes and miRNAs in Dilated Cardiomyopathy. *Biomed Res Int*. 2020 Sep 15;2020:8925420. doi: 10.1155/2020/8925420. PMID: 33015184; PMCID: PMC7512046.

85. Li Y, Liang Y, Sang Y, Song X, Zhang H, Liu Y, Jiang L, Yang Q. MiR-770 suppresses the chemo-resistance and metastasis of triple negative breast cancer via direct targeting of STMN1. *Cell Death Dis.* 2018 Jan 11;9(1):14. doi: 10.1038/s41419-017-0030-7. PMID: 29323124; PMCID: PMC5849036.
86. Liu J, Luo R, Wang J, Luan X, Wu D, Chen H, Hou Q, Mao G, Li X. Tumor Cell-Derived Exosomal miR-770 Inhibits M2 Macrophage Polarization *via* Targeting MAP3K1 to Inhibit the Invasion of Non-small Cell Lung Cancer Cells. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Jun 14;9:679658. doi: 10.3389/fcell.2021.679658. PMID: 34195198; PMCID: PMC8236888.
87. Chen B, Ji F, Wen X, Jin Z. Circular RNA circ_ASAP2 promotes cell viability, migration, and invasion of gastric cancer cells by regulating the miR-770-5p/CDK6 axis. *Int J Clin Exp Pathol.* 2020 Nov 1;13(11):2806-2819. PMID: 33284890; PMCID: PMC7716128.
88. Yuan J, Li P, Pan H, Xu Q, Xu T, Li Y, Wei D, Mo Y, Zhang Q, Chen J, Ni C. miR-770-5p inhibits the activation of pulmonary fibroblasts and silica-induced pulmonary fibrosis through targeting TGFBR1. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2021 Sep 1;220:112372. doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.112372. Epub 2021 May 31. PMID: 34082245.