



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA

Juliana Rodrigues Lara

Identificação de eventos moleculares associados à
reestenose coronariana

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Patologia.

Orientadora: Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori
Coorientador: Dr. João Paulo de Castro Marcondes
Coorientadora: Dra. Mariana Gobbo Braz

Botucatu

2017

Juliana Rodrigues Lara

Identificação de eventos moleculares associados à
reestenose coronariana

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori

Coorientador: Prof. Dr. João Paulo de Castro Marcondes

Coorientadora: Profa. Dra. Mariana Gobbo Braz

Botucatu

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Lara, Juliana Rodrigues.

Identificação de eventos moleculares associados à reestenose coronariana / Juliana Rodrigues Lara. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Daisy Maria Favero Salvadori

Coorientador: Mariana Gobbo Braz

Coorientador: João Paulo de Castro Marcondes

Capes: 20206003

1. Artérias coronárias - Doenças. 2. Stents (Cirurgia).
3. Dano ao DNA. 4. Expressão gênica. 5. Metaloproteases. 6.
Polimorfismo (Genética).

Palavras-chave: Danos no DNA; Doenças coronarianas;
Expressão gênica; Metaloproteinase; Polimorfismo gênico.

Agradecimentos Especiais

À minha orientadora Daisy Maria Fávero Salvadori, obrigada pelo apoio e incentivo nas decisões do doutorado. Tenho você como meu maior exemplo, extremamente correta e justa. Conhece cada aluno só de olhar, tenho uma admiração enorme por esta qualidade, afinal, não é qualquer pessoa que tem esta sensibilidade. Agradeço por ter me proporcionado o desenvolvimento deste título. Diria que todos os problemas que poderiam acontecer... Aconteceram, desde coletas a certas técnicas como a do *microarray*. Foi desafiador... Isso fez a diferença... Aprendi muito... Obrigada por ter sido insistente.

Aos meus Coorientadores: João Paulo de Castro Marcondes, eu não tenho palavras pra descrever a minha eterna gratidão pelo que fez por mim. Você foi muito precioso nesta jornada... Obrigada por me auxiliar em tudo... Desde as correções de qualificação, técnicas moleculares, discussões de resultados e principalmente com a finalização do doutorado, enfim sou muito grata a você. E principalmente pela sua amizade. E a Mariana Gobbo Braz obrigada pela coorientação e por todos os momentos vividos. Admiro sua conduta profissional e ética. Obrigada pela amizade e por tudo no doutorado desde o desenho do projeto até sua finalização.

Aos meus amigos: Daisy Maria Fávero Salvadori, João Paulo de Castro Marcondes, André Luiz Ventura Sávio, Fábio Henrique Fernandes e Elaine Aparecida de Camargo: obrigada por tudo o que fizeram por mim, principalmente agora, nesses últimos dias. Assumiram uma posição, a qual eu jamais esquecerei e serei eternamente grata por me ajudarem a concluir um sonho.

Agradecimentos Pessoais

Dedico a realização deste sonho a Deus, que me proporcionou chegar até aqui, auxiliando no desafio de cada dia com coragem, sabedoria e perseverança.

Ao meu pai Eduardo Rodrigues Lara (*in memoriam*) que me deixou há três dias... Em 37 anos, não me lembro de ter tido um dia com essa tamanha tristeza, dor e vazio... Que saudade pai...e a minha mãe Valdívia F. Rodrigues Lara...Obrigada por tudo que fizeram na minha vida e principalmente no doutorado...Vocês são meus anjos da guarda, meus tesouros, meu alicerce...Deus foi muito bom em me presentear com essa família. O amor que sinto por vocês é imensurável, exatamente como diz o trecho dessa música: “Nem mesmo o céu, nem as estrelas, nem mesmo o mar e o infinito. Nada é maior que o meu amor, nem mais bonito. Me desespero a procurar alguma forma de lhe falar: Como é grande o meu amor por vocês”. OBRIGADA POR TUDO QUE FIZERAM POR MIM.

Ao meu irmão Eduardo Rodrigues Lara Júnior... Dú obrigada por ser meu parceiro, companheiro, amigo e conselheiro. Voltaremos a rir novamente.

À Gabriela Lara Padovani, minha filha de 4 anos, nasceu e cresceu com o doutorado... Não entende nada sobre, mas fala muitos assuntos relacionados... Por exemplo: quando chega da escola, pergunto o que fez de gostoso na escola e a resposta é: DNA mamãe, estudo igual a você... Por mais que tenha sido uma brincadeira no parquinho...É o tal do DNA que aprendeu...Gabi, minha princesa, obrigada por me ensinar sobre a simplicidade da vida TODOS os dias, você é muito prática, te amo filha.

Esse trabalho é fruto da união de uma grande equipe: OMICS (Laboratório de Toxicogenômica e Nutrigenômica), amigos que me ajudaram com centenas de

coletas, inúmeras análises para o teste do cometa, lavagem e preparo de materiais, momentos de muita alegria, palavras de carinho e conforto, agradeço a todos vocês: Brenda Anfilo, Bruna Jerônimo (Croc), Bruno Luperini, Luciana Feliciano, Tathiana Dorini, Raphael Toledo, Gabriela Bittencourt, Renato Paschoal Prado, Maruhen Silveira, Amanda de Camargo, Danielle Almeida, Pablo Bertolini, Glenda Nicioli, Helenice Lego, Leonardo Menezes, Mário Botasso, Jhennifer Rebecca, Marília Porto, João Paulo de Castro Marcondes, André Luiz Ventura Sávio, Fábio Henrique Fernandes e Elaine Aparecida de Camargo.

Ao meu namorado Uilian de Andreis, obrigada por estar presente em minha vida.

Pelos colos, abraços, conselhos e principalmente por fazer meus dias diferentes diria que, felizes.

Às minhas amigas Katina Meneghetti de Souza, Aline Aun, Flávia Nogueira e Nayara Micarelli (Lab. Genotox) por serem tão especiais. Meninas, obrigada por cada abraço e pelas gargalhadas.

À Marjore Golim e sua equipe pela atenção e dedicação na análise de citometria de fluxo.

Ao Igor (técnico da Unipex) agradeço a atenção, dedicação, responsabilidade e disponibilidade pela realização de algumas técnicas.

Aos médicos cardiologistas que com muito carinho auxiliaram nos resultados para a realização das coletas de sangue: Beneficência Portuguesa-SP (Dr. Décio Salvadori Júnior e Dr. Ricardo Augusto Favero Salvadori) Hospital das Clínicas de Botucatu – UNESP (Dr. Fábio Carvalho, Dr. Luís Alexandre Filippi Cicchetto e Dr. André Spadaro), em especial a Dra Regina Moura chefe do setor – HC Botucatu- por permitir a realização da coleta.

Aos recepcionistas, enfermeiros(as), médicos(as), técnicos(as) de enfermagem e de radiologia da hemodinâmica do HC de Botucatu, pela prontidão no momento das coletas e pelo carinho, uma equipe maravilhosa. Meu muito obrigada a todos: Fabio Forti, Ana C. Domingues, Cassio R. Ortalan, Dora Piolli, Paulo Pereira, Neide Santos, Norton Ceranto, Vander Braz, Raquel de Melo, Cristiane de Souza, Ricardo Andres, Tatiane Fernandes, Flávia Silva, Marcos Dell'Acqua, Elizabet Bretanha, Liliane Vasques, Adão do Amaral, Eliane Scolastrici, Elizabete Pereira, Karen Brenneiseir, Silvana Capelleti, Suzana Almeida, Elaine Salvador, Dalva Passareli, Valéria Tognini, João Arruda e Meyre Yassuda.

Aos meus queridos pacientes, sem vocês, essa pesquisa jamais seria realizada. Obrigada pelas bênçãos que muitos me deram, carinho e pela troca de conhecimento.

Ao Departamento de Patologia e à Vânia Soler pela competência, profissionalismo e apoio em todo esse processo.

Ao Prof. Tit. Carlos Roberto Padovani, obrigada pelas análises estatísticas iniciais utilizadas para a realização do relatório FAPESP.

Ao Grupo de Apoio à Pesquisa e ao José Eduardo Corrente e Eloiza Paschoalinotte por todo suporte para a conclusão desse trabalho.

Ao David Martins Correa Júnior, meu muito obrigada pela disponibilidade, atenção e agilidade com a análise de bioinformática (análise do *microarray*)

À FAPESP nº do processo: 2011/18660-1, CAPES e CNPQ por acreditarem no potencial do nosso estudo e pelo suporte financeiro.

“Não pretendemos que as coisas mudem, se sempre fazemos o mesmo. A crise é a melhor benção que pode ocorrer com as pessoas e países, pois a crise traz progressos. A criatividade nasce da angústia, como o dia nasce da noite escura. É na crise que nascem as invenções, os descobrimentos e as grandes estratégias. Quem supera a crise, supera a si mesmo sem ficar ‘superado’. Quem atribui à crise seus fracassos e penúrias, violenta seu próprio talento e respeita mais os problemas do que as soluções. A verdadeira crise é a crise da incompetência... Sem crise não há desafios; sem desafios, a vida é uma rotina, uma lenta agonia. Sem crise não há mérito. É na crise que se aflora o melhor de cada um...”

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	III
1.INTRODUÇÃO	1
1.1 Doenças cardiovasculares	1
1.2 Angioplastia coronariana transluminal percutânea	5
1.3 Reestenose intra-stent	8
1.4 Fatores genéticos associados à reestenose	11
1.4.1 Polimorfismos gênicos	11
1.4.2 Expressão gênica	200
2. OBJETIVO	222
2.1 Objetivos específicos	222
3. MATERIAL E MÉTODOS	233
3.1 População do estudo	233
3.2 Coleta de sangue	244
3.3 Isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMC)	255
3.4 Extração de RNA de células mononucleares do sangue periférico	255
3.5 Teste do cometa	277
3.6 Extração de DNA e genotipagem	28
3.6.1 <i>Análise dos polimorfismos MMP-2 (-1575), MMP-9 (Arg 279 G/n), CYP2C19*2 (G681A), eNOS (G894T) e IL-6 (-174 G>C) pelo ensaio Taqman</i>	29
3.6.2 <i>Análise dos polimorfismos MMP-3 (-1612 5A/6A) e MMP-9 (-1562 C>T) pela técnica PCR - RFLP - (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism)</i>	29
3.6.3 <i>Revelação do produto amplificado por eletroforese em gel de agarose</i>	31
3.6.4 <i>Aplicação da enzima de restrição (RFLP)</i>	32
3.6.5 <i>Análise do produto da PCR-RFLP para os genes MMP-3 (-1612 5A/6A) e MMP-9 (-1562 C>T)</i>	32
3.7 Extração do RNA de células mononucleares do sangue periférico	33
3.8 Expressão gênica pela técnica de microarranjos (microarray)	34
3.8.1 <i>Análise de enriquecimento funcional e construção de redes</i>	34
3.9 Dosagem de citocinas por citometria de fluxo - CBA	35
3.10 Análise estatística	36

4. RESULTADOS	38
5. DISCUSSÃO	63
6. CONCLUSÕES	766
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	777
ANEXO I	911
ANEXO II	93
ANEXO III	1033
ANEXO IV	1077

RESUMO

Atualmente, o procedimento mais utilizado para o tratamento das lesões coronarianas é a angioplastia com implante de *stent*. Embora existam vantagens com esse procedimento, a reestenose continua sendo um dos principais limitadores do sucesso terapêutico. Sabe-se que inflamação, com acúmulo de células mononucleares ativadas, pode contribuir para o desenvolvimento da reestenose. Assim, estratégias para a identificação de biomarcadores de risco e para a redução das taxas de reestenose representam desafios na área da cardiologia intervencionista. Desta forma, o presente estudo teve como objetivos a identificação de possíveis marcadores genéticos de risco (polimorfismo dos genes *MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-9 -1562*, *MMP-9 Arg 279 Gln*, *CYP2C19*2*, *NOS3* e *IL-6*), bem como a avaliação de eventos moleculares e bioquímicos (lesões oxidativas no DNA, perfil de expressão gênica e de citocinas) que possam estar envolvidos no desenvolvimento da reestenose. Foram avaliados 330 indivíduos, 220 pacientes coronarianos com e sem reestenose após implante de *stent* e 110 indivíduos controles (sem implante de *stent* e com obstrução coronariana menor que 20%). Os resultados mostraram aumento significativo de danos no DNA de células do sangue periférico nos pacientes com reestenose *intra-stent*, mas nenhuma alteração nos níveis plasmáticos de citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α). Com relação aos polimorfismos gênicos, os dados mostraram que o alelo G do gene *MMP-9 (Arg279Gln)* foi mais frequente nos pacientes coronarianos com reestenose *intra-stent*. A análise de perfil de genes de células mononucleares do sangue periférico revelou alvos potenciais para inibição da reestenose *intra-stent*. Com relação aos pacientes com obstrução arterial < 20% (grupo controle) foram 493 (400 hiperexpressos e 93 hipoexpressos) e 21 (6 hiperexpressos e 15 hipoexpressos) transcritos diferencialmente expressos respectivamente em pacientes sem e com reestenose *intra-stent*. Entre os pacientes com e sem reestenose, foram 243 transcritos diferencialmente expressos (91 hiperexpressos e 152 hipoexpressos). A ontologia genética mostrou que nos pacientes com reestenose dentre os processos biológicos com maior número de genes diferencialmente expressos envolvidos estavam os

relacionados ao reparo do DNA, diferenciação de células T α e β , resposta celular à IL-4, produção de citocinas, regulação da transcrição, regulação do metabolismo lipídico, divisão celular, organização da matriz extracelular, migração de leucócitos, cicatrização de feridas, regulação positiva da angiogênese, coagulação sanguínea, regulação da apoptose de células endoteliais e formação de plaquetas. Concluindo, nossos resultados fornecem base para novas hipóteses e testes para o claro entendimento dos mecanismos de reestenose intra-stent e para novas estratégias de tratamento.

ABSTRACT

Currently, angioplasty is the most commonly procedure used for the treatment of flow limitation in coronary arteries. Nevertheless, in-stent restenosis continues to remain the principal reason for treatment failure after contemporary coronary stenting. It is known that inflammation, with the accumulation of activated mononuclear cells, may contribute to the development of restenosis. Therefore, strategies for the identification of risk biomarkers and for the reduction of restenosis rates are challenges in the field of interventional cardiology. The present study aimed to identify genetic markers associated to restenosis. DNA damage, gene expression profile and gene polymorphisms (*MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-9 -1562*, *MMP-9 Arg 279 Gln*, *CYP2C19 * 2*, *NOS3* and *IL-6*) were evaluated. A total of 330 subjects, 220 coronary patients with or without restenosis after stent implantation, and 110 control subjects (without stent implantation and coronary obstruction of less than 20%) were invited to participate in this study. Results showed significant increase of DNA damage in peripheral blood cells of patients with intra-stent restenosis, and no alteration in the plasma cytokines concentration (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α). Regarding the gene polymorphisms, data showed that G allele of *MMP-9 (Arg279Gln)* was more frequent in coronary patients with intra-stent restenosis. In the gene profiling analysis of mononuclear cells from peripheral blood 243 probesets with differential expression were identified between patients with and without restenosis, and 21 and 493 between patients without stenting coronary and those with and without in stent restenosis, respectively. The genes identified have varied functions, including some related to cellular growth and metabolism, DNA repair, cytokine production, regulation of transcription, cell division, extracellular matrix organization, leukocyte migration, regulation of endothelial cell apoptosis, and platelet formation, such as the *MMP-9*, *NFAT5*, *REL*, *ATM*, *FOXO3* and *UTS2R* genes. Taken together, our results provide the basis for further specific functional hypothesis generation and testing of the mechanisms of in stent restenosis.

1.INTRODUÇÃO

1.1 Doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCVs) são responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade principalmente em países desenvolvidos onde se estima cerca de 17,5 milhões de óbitos, o que representa 31% de todas as mortes (WHO 2016). Segundo dados da Sociedade Brasileira de Cardiologia, as DCVs são responsáveis por cerca de 349.938 óbitos por ano, atingindo cerca de 29% do total de mortes registradas em 2015 (SBC 2016). Em 2016, as DCVs causaram o dobro de mortes daquelas pelos vários tipos de câncer; 2,3 vezes mais do que as causadas por acidentes e violências; 3 vezes as por doenças respiratórias e 6,5 vezes as por infecções, incluindo a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (SBC 2016). Estudos do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, em São Paulo, mostraram que 60% das vítimas de DCVs são do sexo masculino, com idade de aproximadamente 56 anos, dados que colocam o Brasil entre os 10 países com maior índice de mortes por DCVs (Brasil 2014).

Dentre as DCVs, destacam-se as doenças coronarianas (DCs) resultantes da oclusão ou estreitamento das artérias coronárias devido à formação de placas ateroscleróticas. As DCs, responsáveis por cerca de 7,4 milhões de mortes por ano no Brasil (Brasil 2014; Katz et al. 2015; WHO 2016), estão associadas a um conjunto de fatores de risco, que inclui idade avançada, gênero, tabagismo, obesidade, hipertensão arterial, diabetes, fatores genéticos, hipercolesterolemia e sedentarismo (Thomas 2016; Guasch-Ferré et al. 2016).

A aterosclerose é um processo inflamatório crônico, multifatorial e progressivo, promovido, inicialmente, pela formação de estrias gordurosas na camada íntima das artérias, que são resultantes do acúmulo de lipoproteínas como a lipoproteína de baixa densidade (LDL ou “mau” colesterol) (McLaren et al. 2011). Na parede das artérias, as LDLs são oxidadas e desencadeiam resposta inflamatória que leva à síntese de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (McLaren et al. 2011; Ramji & Davies 2015). Nesse processo ocorre o recrutamento de monócitos que, ao adentrarem a camada íntima, se diferenciam em macrófagos. Nesses, as citocinas alteram a expressão de genes relacionados à regulação do metabolismo e transporte de colesterol, levando-os a englobar o LDL oxidado e a contribuir para a formação das células espumosas que se acumulam na camada íntima da artéria formando uma lesão inicial que se matura e progride para a placa aterosclerótica (Chistiakov et al. 2015; Buckley & Ramji 2015). Durante a progressão da placa, as células espumosas podem entrar em apoptose ou necrose, liberando conteúdo lipídico e formando um núcleo necrótico. Ao final, macrófagos, células endoteliais e linfócitos T estimulam a migração de células musculares lisas da camada média para a íntima, levando à formação de uma capa fibrótica constituída de matriz extracelular (Figura 1). O balanço entre a formação dessa matriz, que confere estabilidade à placa, e a liberação de enzimas que a degradam devido a apoptose dos macrófagos, irá ser determinante para o processo de ruptura da placa, o qual provoca agregação plaquetária que pode levar à obstrução do fluxo sanguíneo na artéria, trombose, acidente vascular cerebral, infarto agudo do miocárdio (IAM) e, em alguns casos, ao óbito (Figura 2) (McLaren et al. 2011; Chistiakov et al. 2015; Tabas et al. 2015; Buckley & Ramji 2015; Moss & Ramji 2016).

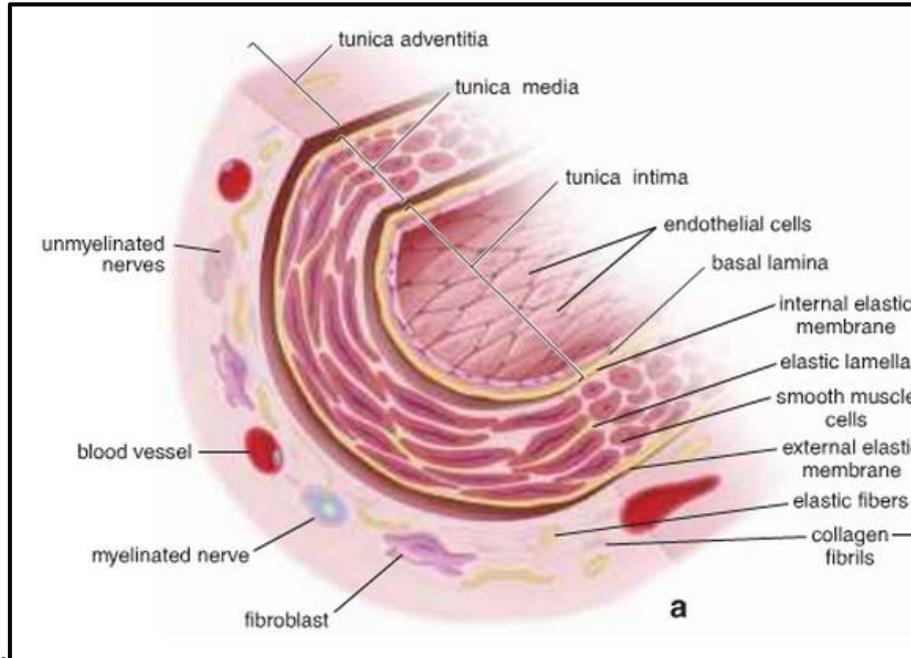


Figura 1: Esquema de corte transversal de uma artéria, evidenciando as camadas íntima, média e adventícia e seus componentes (Ross & Pawlina 2015).

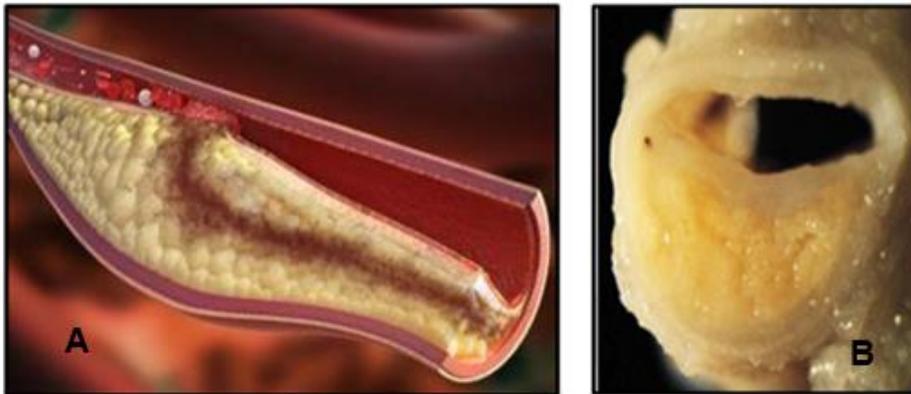


Figura 2. A e B Artérias coronárias com placa aterosclerótica, evidenciando o estreitamento do lúmen arterial. Fonte: *Google* imagens (placa aterosclerótica), 12/01/2016.

Os monócitos são células fagocitárias caracterizadas pela expressão de CD14 e CD16 (Ziegler-Heitbrock et al. 2010; Merino et al. 2011; Wise et al. 2016) e que produzem citocinas pro-inflamatórias (TNF, IL-1 β , IL-6, e IL-12p70) e anti-inflamatória

(IL-10) (Fokkema et al. 2003; Suárez-Santamaría et al. 2010; Yang et al. 2012). A ativação dos monócitos por estímulos inflamatórios provoca sua migração para locais de lesões teciduais e a diferenciação em macrófagos. O acúmulo exacerbado e prolongado de macrófagos nesses locais contribui para o desenvolvimento das doenças inflamatórias, como é o caso da aterosclerose (Yang et al. 2012; Wong et al. 2012; Hilgendorf et al. 2015).

Os monócitos têm papel relevante no processo de reestenose, pois a lesão mecânica local gerada pelo implante de *stent* na parede arterial promove sua ativação e recrutamento, que, juntamente com diversos outros fatores, levam à proliferação de células musculares lisas e consequente hiperplasia da camada neointima (Hokimoto et al. 2002; Martin & Boyle 2011).

Diversas citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , INF- γ , IL1-B, IL-6, IL-8, IL-12) e anti-inflamatórias (IL-10, TGF- β) são secretadas por células endoteliais, macrófagos ativados e células Th1 (Liao et al. 2013), e desempenham papel crucial na progressão da placa aterogênica por modular a atividade, função e recrutamento dos componentes do sistema imunológico e de células vizinhas, como as musculares lisas (Libby et al. 2013). A interleucina IL-8, por exemplo, pode estar presente em qualquer tecido, sendo liberada durante processos infecciosos, isquemia, traumas e outras perturbações da homeostase. A IL-8 atrai por neutrófilos para a placa aterosclerótica, participando da sua progressão. Dessa forma, a IL-8 vem sendo considerada como possível marcador para a doença aterosclerótica periférica (Araújo et al. 2015).

Duas citocinas anti-inflamatórias, a IL-10 e o TGF- β , podem ter efeitos benéficos, diminuindo a progressão da placa aterosclerótica por meio da modulação da proliferação de células vasculares, da produção de colágeno, além de suprimir a ativação de células imunológicas como macrófagos e linfócitos (Saraiva & O'Garra

2010; Robertson et al. 2012). Adicionalmente, as citocinas IL-4, INF- γ e TNF- α podem inibir a expressão de IL-10 nas células B por meio da ativação do microRNA-19a (Ren et al. 2016).

1.2 Angioplastia coronariana transluminal percutânea

Na década de 60, a angioplastia coronariana transluminal percutânea (ACTP) se tornou o principal procedimento para o tratamento da oclusão arterial (Dotter & Judkins 1964). A ACTP é um procedimento minimamente invasivo que consiste na introdução, via artéria femoral, de um pequeno balão acoplado a um catéter. Quando alcança a lesão estenótica, o balão é insuflado para remodelar a parede da artéria e, assim, reestabelecer o fluxo sanguíneo (angioplastia por balão; Figura 3). No final da década de 80, pela primeira vez, foram utilizados os *stents* metálicos para o tratamento da doença arterial coronariana (Sigwart et al. 1987). O implante do *stent* é realizado acoplado o aparato metálico ao redor do balão que, ao ser insuflado, dilata sua estrutura fazendo com que se modele como suporte físico para manter a luz da artéria desobstruída (Figura 4) (Hossainy et al. 2015; John et al. 2016). Mais recentemente, foram introduzidos no mercado os *stents* eluídos em drogas (*stents* farmacológicos), cuja função é reduzir ainda mais o risco de complicações resultantes do procedimento angioplástico, como a reestenose *intra-stent*.

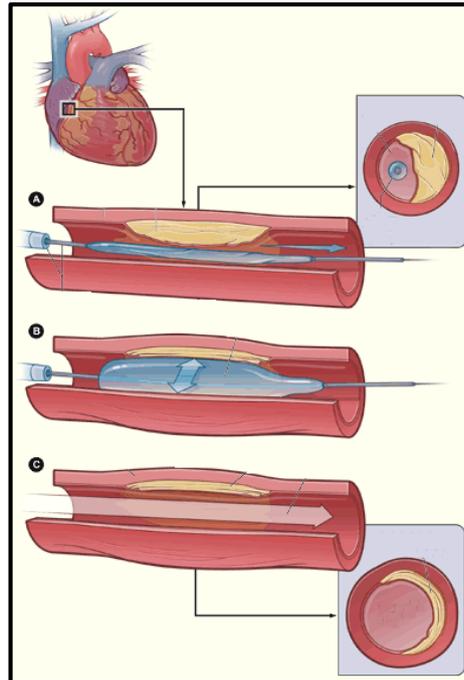


Figura 3: Esquema mostrando angioplastia por balão. Fonte: *Google* imagens 04/11/2016.

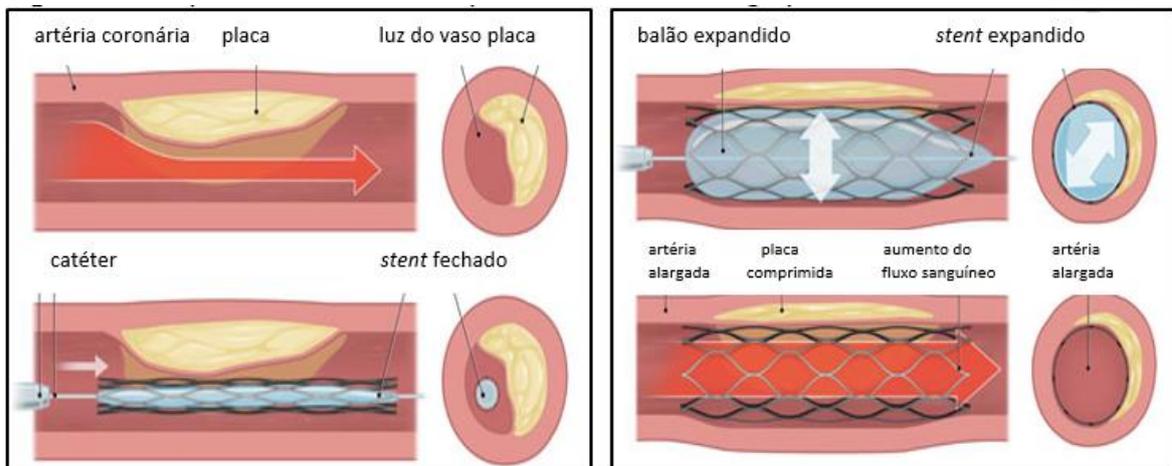


Figura 4. Esquema mostrando o procedimento de angioplastia coronária transluminal percutânea com implante de *stent*. Fonte: *Google* imagens (placa aterosclerótica), 12/06/2016.

Os *stents* farmacológicos (SFs) são constituídos por uma plataforma metálica revestida por polímero carreador de fármaco com atividade antiproliferativa (Figura 5).

Atualmente, existem dois tipos de SFs: os de primeira e os de segunda geração. Os de primeira geração são eluídos com as drogas sirolimus e paclitaxel, enquanto os de segunda geração com everolimus e zotarolimus (Maeng et al. 2013; Kobayashi et al. 2016; Partida & Yeh 2016).

Há estudos mostrando que, além dos fármacos, o tipo de estrutura do SF pode estar associado aos efeitos adversos do procedimento. Por exemplo, estruturas mais espessas e polímeros mais duráveis como os encontrados nos *stents* de primeira geração estão relacionados à maior susceptibilidade para o desenvolvimento de trombose tardia (Kandzari et al. 2011; Gada et al. 2013).

Contudo, mesmo com os recentes avanços tecnológicos e farmacológicos, a reestenose *intra-stent* ainda é um risco para os pacientes submetidos à ATPC (Bliden et al. 2007).

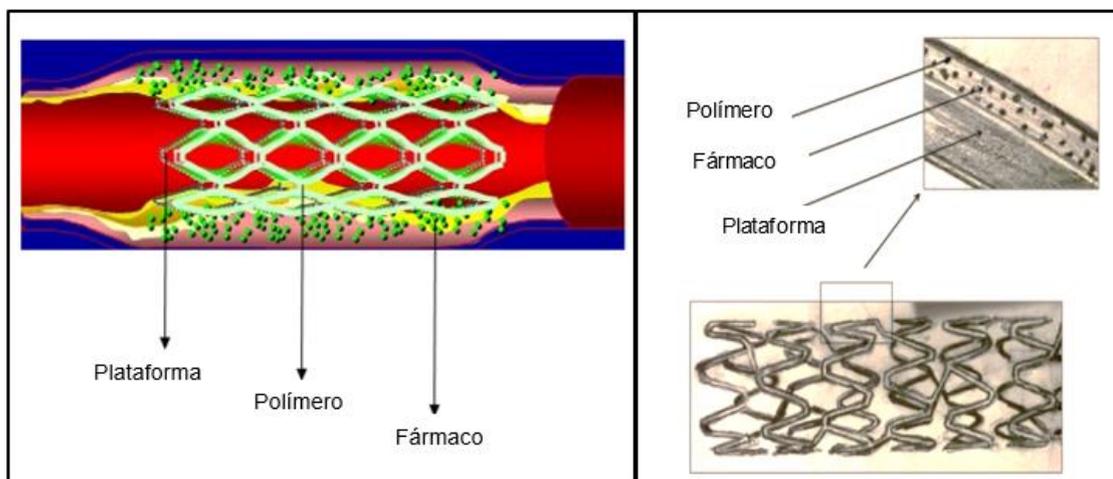


Figura 5. Esquemas mostrando os componentes do *stent* farmacológico. Fonte: *Google* imagens (*STENT*: plataforma, polímero e droga), 15/08/2016.

1.3 Reestenose *intra-stent*

Embora a resposta inflamatória local e a proliferação celular após implante do *stent* seja observada em todos os pacientes, em alguns, a recuperação da lesão é acompanhada por uma proliferação excessiva de células musculares lisas (CMLs) e pela produção de matriz extracelular que leva ao espessamento da parede e estreitamento do lúmen arterial. A proliferação excessiva de CMLs após o implante de *stent*, resultando no estreitamento *de novo* da luz da artéria é denominada de reestenose *intra-stent*. Tal processo ocorre geralmente dentro de um período de 6 a 12 meses após o procedimento (Armstrong et al. 2007; Bangalore et al. 2013; Osborn & Jaffer 2015; Mizuno & Mizuno-Horikawa 2016).

Os mecanismos da reestenose vêm sendo estudados em modelos animais, mostrando que se trata de uma resposta de má adaptação da artéria coronária ao trauma induzido durante a angioplastia (processo de cicatrização endotelial) (Tu & Wang 2016). Assim, a patogênese da reestenose se inicia com a lesão endotelial promovida pelo estiramento induzido pelo próprio procedimento angioplástico, que leva à exposição dos componentes da camada subendotelial e média, como o colágeno, o fator de *Von Willebrand*, fibronectina e laminina. Essa lesão, por sua vez, provoca agregação plaquetária e o acúmulo de fibrina, com consequente formação de trombo. Posteriormente, ocorre a proliferação de CMLs devido à exposição a mitógenos, como a angiotensina II e plasmina, além da liberação de citocinas e mitógenos pelas plaquetas, células endoteliais, inflamatórias e pelas próprias CMLs. As CMLs saem, então, da quiescência (G0) e entram em estado proliferativo, migrando para o lúmen da artéria e sintetizando colágeno e matriz extracelular, com

a consequente formação da camada neoíntima (Robertson et al. 2012; Lingman 2013; Puré et al. 2016; Partida & Yeh 2016).

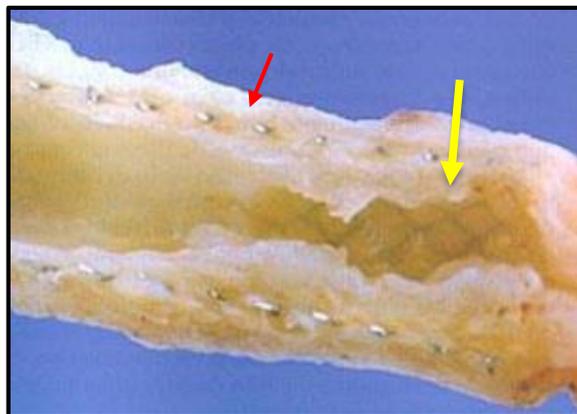


Figura 6. Fotografia de segmento de artéria coronariana apresentando reestenose *intra-stent*. A seta vermelha indica a estrutura metálica do *stent* e a seta amarela a camada neoíntima. Fonte: *Google* imagens (placa aterosclerótica), 12/06/2016.

Conforme mencionado anteriormente, o uso dos *stents* farmacológicos levou a redução considerável da prevalência de reestenose: cerca de 5% a 10% nos pacientes com SF frente aos 20% a 30% com *stents* não eluídos em fármacos (Papafaklis et al. 2012; Taniwaki et al. 2014; Hong et al. 2015). A redução de reestenose nos SF ocorre especialmente em virtude do efeito antiproliferativo das drogas eluídas (Park et al. 2013; Capodanno et al. 2013). De modo geral, os fármacos utilizados impedem a migração e proliferação de leucócitos e de células musculares lisas e endoteliais (Zhang et al. 2013; Ng et al. 2015).

Entre os fármacos mais utilizados nos SFs, o paclitaxel tem seu efeito associado à estabilização dos microtúbulos, inibindo a proliferação e migração das CMLs, fibroblastos e leucócitos, e a secreção de matriz extracelular (Ng et al. 2015). Além disso, essa droga pode promover bloqueio do ciclo celular na fase tardia G2/M

e a indução de apoptose (Von Gruenigen et al. 2012; Merlin et al. 2013; Partida & Yeh 2016). A evolução clínica e angiográfica de pacientes com infarto agudo do miocárdio revelou redução de reestenose naqueles que receberam SFs eluídos com o paclitaxel quando comparados a grupo tratado com *stents* não farmacológicos (Grotti et al. 2016). Estudos recentes mostraram, também, a eficácia do paclitaxel no tratamento da doença arterial periférica femoropoplíteal, sem risco de trombose de *stent* (Dake et al. 2011; Yokoi et al. 2016; Meng et al. 2016).

O sirolimus, outra droga utilizada nos SFs e também conhecido como rapamicina, é um antibiótico com função imunossupressora (Kaplan et al. 2014), isolado do *Streptomyces hygroscopicus* (Srinija et al. 2016). Sua eficácia na inibição da reestenose está associada ao efeito antiproliferativo, com capacidade de bloquear o ciclo celular na fase G1, inibindo, assim, a proliferação das células musculares lisas e endoteliais (Alfonso & Fernandez 2011; Falotico & Narayanan 2016). Recentemente, Jang et al. (2015) demonstraram, em modelo animal, que o sirolimus é capaz de inibir a proliferação das células da neoíntima, reduzindo a reestenose intra-*stent*. Embora os *stents* eluídos com sirolimus ou paclitaxel tenham considerável efetividade na diminuição da reestenose, o atraso ou diminuição na endotelização, pode ser um dos agentes causadores da trombose tardia de *stent* (Kon et al. 2011; Habib & Finn 2015).

Os fármacos zotarolimus e everolimus (dos *stents* de segunda geração), ambos análogos da rapamicina, atuam na prevenção da reestenose devido suas propriedades citotóxicas, que levam ao bloqueio da proliferação celular (Habib & Finn 2015). Esses compostos agem por meio da ligação à proteína FKBP12, formando um complexo que impossibilita a atividade do complexo-1 do mTOR (mTORC1) (*Mammalian Target of Rapamycin*), inibindo, assim, a proliferação celular e angiogênese (Faivre et al. 2006; Alfonso & Fernandez 2011; Bangalore et al. 2013;

Garcia-echeverria & Maira). Tanto o zotarolimus como o everolimus são drogas mais lipofílicas que o sirolimus, característica, esta, que proporciona maior retenção na parede arterial, favorecendo as atividades antiproliferativas e anti-inflamatórias. Um aspecto desfavorável ao everolimus é que possui meia-vida plasmática mais curta (Stefanini & Holmes 2013; Puranik et al. 2013; Huang et al. 2014).

Embora as pesquisas clínicas revelem vantagens no uso dos SFs, continua a existir a preocupação com o risco de reestenose e, conseqüentemente, de infarto do miocárdio. Portanto, a redução desses riscos representa um desafio para o campo da cardiologia intervencionista (Schaer & Zhang 2015).

1.4 Fatores genéticos associados à reestenose

1.4.1 Polimorfismos gênicos

A reestenose não é um fenômeno aleatório, uma vez que alguns pacientes apresentam maior risco de ocorrência. Existem vários fatores clínicos relacionados à lesão que explicam parte do risco para a reestenose. Dentre esses estão diabetes, hipertensão arterial, estenose grave da artéria coronária e doenças multiarteriais (Curcio et al. 2011; Zapata-Arriaza et al. 2016). Embora a análise de tais fatores seja útil para a predição do risco para a reestenose, pode não elucidar os mecanismos que levam ao seu desenvolvimento. Assim, a investigação de alguns parâmetros genéticos, como a integridade do DNA, alterações no transcriptoma e polimorfismos gênicos, pode auxiliar no entendimento dos mecanismos moleculares que favorecem o desenvolvimento da reestenose.

A avaliação de danos e lesões oxidativas na molécula de DNA, por exemplo, é uma ferramenta importante para o estudo de doenças crônicas como diabetes, artrite e doenças cardiovasculares (Collins et al. 2014). Embora ainda sejam escassos na literatura, há dados que evidenciam que a reestenose está relacionada ao aumento de quebras de fita dupla no DNA (Luo et al. 2013). Além disso, foi observado em modelo animal que danos persistentes no DNA (lesões oxidativas e quebras de fita dupla) podem estar relacionados à diminuição progressiva da expressão de diversos genes que desempenham papel relevante na progressão da estenose (Forte et al. 2013).

Dentre os vários estudos genéticos que vêm sendo realizados com o objetivo de identificar fatores de risco para a reestenose, os que avaliam polimorfismos de genes relacionados às metaloproteinases de matriz extracelular (*MMPs*), ao metabolismo de drogas, ao estresse oxidativo, à resposta inflamatória têm merecido especial atenção (Yadav et al. 2014; Amato et al. 2015; Kumar et al. 2016; Reichert et al. 2016).

As *MMPs* pertencem a um grupo de proteases dependentes de zinco, que atuam na degradação de colágeno, elastina, proteoglicanas, laminina, fibronectina e de praticamente todos os componentes da matriz extracelular, importantes para a rigidez arterial e remodelamento vascular (Papazafiropoulou & Tentolouris 2009; Rostoff et al. 2014; Serra et al. 2014; Amato et al. 2015). Diversos polimorfismos gênicos (SNPs – *Single-Nucleotide Polymorphism*), tanto em região promotora (*MMP-2 -1575*; *MMP-3 -1612*; *MMP-9 -1562* e *IL-6 -163*) como codificadora (*MMP-9 Arg279Gln*) dos respectivos genes, podem levar a alterações na expressão e atividade das *MMPs* (Liu et al. 2012; Diederichs et al. 2016; Jia et al. 2016; Ponomarenko et al.

2016). Tais polimorfismos têm sido relacionados ao risco aumentado para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares incluindo a aterosclerose, aneurismas, reestenose *intra-stent* e insuficiência cardíaca (Galis & Khatri 2002; Newby 2005; Wang et al. 2011; Niu & Qi 2012).

O gene *MMP-2* está localizado no cromossomo 16q12.2 e possui 27.049 pb e 13 éxons que codificam uma proteína de 72 kDa (Saeed et al. 2013). A *MMP-2*, também conhecida como gelatinase A, é expressa de forma ubíqua em quase todas as células que compõem o tecido cardíaco, incluindo os cardiomiócitos, sendo responsável pela degradação de substratos extras e intracelulares, tais como colágeno desnaturado, colágeno tipo IV e proteínas sarcoméricas, incluindo a troponina I e cadeias leves de miosina (Kandasamy et al. 2010; DeCoux et al. 2014; Radunovic et al. 2016). Há evidências que sugerem que a transição G → A no polimorfismo -1575G/A do *MMP-2* reduz sua ativação transcricional promovida pela ação estrogênica (Harendza et al. 2003). Foi demonstrando em uma população mexicana a associação entre o polimorfismo do *MMP-2* (-1575) e a ocorrência de infarto do miocárdio (Pérez-Hernández et al. 2012). Recentemente, foi observado em uma população brasileira que o genótipo CC de outro polimorfismo do *MMP-2* (-735C/T) também apresentava papel relevante na hipertensão resistente (Sabbatini et al. 2017).

•

O gene *MMP-3* está localizado no cromossomo 11q22.2, apresenta 135 kb e codifica uma proteína de 51 kDa, a *MMP-3*, também conhecida como estromelisina-1, que é produzida por vários tipos de células, incluindo fibroblastos, células musculares

lisas e macrófagos (Klein & Bischoff 2011; Ferrari et al. 2012; El-Aziz & Mohamed 2016). A MMP-3 exerce efeito catabólico sobre os colágenos do tipo III, IV, V, IX e X, proteoglicanas, laminina, elastina e fibronectina, além de facilitar a conversão de outras MMPs (MMP-1, MMP-8, MMP-7 e MMP-9), de suas formas inativas às formas ativas (Hoppmann et al. 2004; Shalia et al. 2010; Garofalo et al. 2011; El-Aziz & Mohamed 2016).

O polimorfismo 5A/6A do *MMP-3* caracteriza-se pela inserção de uma adenina (A) no início da estrutura de transcrição da região promotora (-1612 / -1617), resultando em uma sequência de seis adeninas consecutivas (6A), enquanto o alelo selvagem tem apenas cinco sequências (5A). A presença da variante 6A na região promotora de *MMP-3* permite a ligação do repressor ZBP-89 (*Zinc-binding protein-89*) e de NFκB, levando à hipoexpressão e diminuição dos níveis da proteína codificada (Skorupski et al. 2013; Borghaei et al. 2016; Li et al. 2016). De fato, alguns estudos mostraram que a expressão gênica e proteica em amostras de tecido vascular é mais elevada em homozigotos 5A, intermediária em heterozigotos e mais baixa em homozigotos 6A (Medley et al. 2003; Lichtinghagen et al. 2003; Koch et al. 2010). Além disso, há relatos que os homozigotos para o alelo 6A apresentam maior predisposição para o espessamento da parede arterial, muito provavelmente pela diminuição na expressão de MMP-3 e menor degradação da matriz extracelular (Gnasso et al. 2000; Rauramaa et al. 2000). O genótipo homozigoto 6A foi também associado ao desenvolvimento de placa aterosclerótica com estenose significativa e progressão para reestenose (Ye 2006; El-Aziz & Mohamed 2016). Por outro lado, estudo de meta-análise mostrou a relação do alelo 5A do polimorfismo *MMP-3* 5A/6A com infarto agudo do miocárdio (papel na ruptura da placa), com a progressão da doença

pulmonar obstrutiva crônica e ao risco de acidente vascular isquêmico (Wen et al. 2014).

O gene *MMP-9*, localizado no cromossomo 20q13.11, possui 13 exons e 12 introns e codifica uma proteína de 92 kDa, a MMP-9, também conhecida como gelatinase B (Luizon & Almeida Belo 2012). Esta degrada a maioria dos componentes da matriz extracelular, principalmente colágeno e elastina, atuando na remodelação vascular e desempenhando papel importante no processo inflamatório (Gong et al. 2008; Huang et al. 2010; Heo et al. 2011; Fingleton 2017).

Vários estudos em ratos *knock-out* para o gene *MMP-9* mostram que a respectiva protease é essencial para a reparação tecidual e para adequada resposta inflamatória, e que alterações na regulação da MMP-9 contribuem para o desenvolvimento de lesões arteriais, em parte por facilitar a invasão de monócitos na placa aterosclerótica (Libra et al. 2009; Langers et al. 2012). Além disso, foi descrito que o aumento da expressão do *MMP-9* está associado com a progressão, desestabilidade e ruptura da placa aterosclerótica, aumentando o risco de infarto agudo do miocárdio (Koenig & Khuseyinova 2007; Opstad et al. 2013). Nesse sentido, diversos autores sugerem que o aumento na concentração plasmática da MMP-9 poderia ser um marcador precoce do risco para doenças cardiovasculares (Blankenberg et al. 2003; Squire et al. 2004; Jefferis et al. 2010). De fato, as CMLs da artéria coronária em estado proliferativo apresentam aumento da expressão de MMP-9, sendo a atividade proteolítica da enzima considerada determinante na migração das CMLs e, portanto, responsável pela formação da camada neoíntima após implante de *stent* (Newby 2005; Sheu et al. 2013; Gliesche et al. 2016).

A variante *MMP-9 -1562C/T* possui a atividade do promotor comprometida, levando à diminuição da expressão do gene devido a alterações na ligação do aparato transcricional ao DNA (Zhang et al. 1999; Glebauskiene et al. 2017). Por outro lado, a variante *Arg279Gln* do gene (que leva à substituição do aminoácido glutamina por arginina) situa-se dentro do domínio de ligação à fibronectina de tipo II e leva a alterações na atividade catalítica da enzima (Blankenberg et al. 2003). Esses dois polimorfismos já foram associados à progressão da doença arterial coronariana e ao risco aumentado de hemorragia intracerebral (Zhi et al. 2010; Lacchini et al. 2010; Opstad et al. 2012; Opstad et al. 2013; C.-Q. Yang et al. 2014; Opstad et al. 2014; Juan et al. 2015).

O gene da óxido nítrico sintetase (NOS), localizado no cromossomo 7 (7q35-q36), codifica proteína responsável pela síntese do óxido nítrico (ON) em células endoteliais e macrófagos (Park et al. 2011; Kumar et al. 2017). Os efeitos biológicos do ON endotelial (sintetizado pela eNOS) incluem a vasodilatação, inibição da proliferação e migração das CMLs, inibição da agregação plaquetária e da adesão dos glóbulos brancos à parede dos vasos sanguíneos (Liu et al. 2007; Li & Förstermann 2013; Kumar et al. 2017). Foi descrito que células endoteliais lesadas liberam mais endotelina-1, angiotensina II e fatores de crescimento (TGF- β , VEGF) e menos óxido nítrico, mecanismo que pode contribuir para a proliferação e migração das células do músculo liso, levando à reestenose *intra-stent* (Pallero et al. 2010; Siragusa & Fleming 2016; Zeng et al. 2017).

Os polimorfismos do gene *eNOS3* (óxido nítrico sintase endotelial 3) parecem ter papel relevante no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como a doença arterial coronariana, fibrilação atrial e hipertensão (Li 2011; Yang et al. 2014). Em 2002, Gomma et al. haviam chamado a atenção sobre a relação entre o polimorfismo 298G/A do *eNOS3* e o risco para a reestenose coronariana. Mais tarde, Shuvalova et al. (2012) demonstraram que tanto o polimorfismo 298G/T (*eNOS3*) quanto o 599C/T (glutathiona peroxidase) estariam associados ao desenvolvimento da reestenose *intra-stent*. Recentemente, Zeng et al. (2017) observaram que os polimorfismos T786C e G298A do *eNOS3* estavam relacionados à modulação da resposta à terapia de intervenção em pacientes implantados com *stent* não farmacológico, e que o alelo C do polimorfismo T786C estava relacionado a risco aumentado de reestenose *intra-stent*. Outro polimorfismo da *eNOS* recentemente associado a doenças cardiovasculares, especialmente infarto agudo do miocárdio e hipertensão, foi o G894T (Yalcin et al. 2014; Liu et al. 2014; Levinsson et al. 2014; Zholdybayeva et al. 2016).

Polimorfismos de genes responsáveis pela codificação de citocinas também foram associados ao desenvolvimento de doenças coronarianas (Phulukdaree et al. 2013). O gene *IL-6*, por exemplo, que está localizado no cromossomo 7p21, codifica uma citocina pró-inflamatória (IL-6) que estimula a produção de proteínas que modulam a adesão dos monócitos às células endoteliais (Raman et al. 2013). Nos últimos anos foi demonstrado que os indivíduos que possuíam a variante gênica *IL-6-174 rs1800795 G>C* apresentavam maior risco para doenças coronarianas (Wang et al. 2015; Buraczynska et al. 2015; Reichert et al. 2016). Segundo alguns pesquisadores, o polimorfismo G → C na posição -174 altera a atividade da região

promotora do gene, levando ao aumento da expressão e concentração plasmática da IL-6 em portadores do alelo G (Jiménez-Sousa et al. 2017). Recentemente, foi demonstrado que o aumento da expressão dessa citocina em placas reestenóticas de pacientes com doença arterial periférica pode levar a alteração dos mecanismos de apoptose, proliferação e migração de fibroblastos e miofibroblastos, os quais podem contribuir para a formação da neoíntima (Krishnan et al. 2016).

Outros genes cujos polimorfismos foram indiretamente relacionados a diversas doenças é o *CYPs*, localizado no cromossomo 10q24 e que contém 9 exons (Gu et al. 2014). O citocromo P450 (*CYPs*) é uma família de enzimas metabolizadoras altamente expressas pelas células hepáticas e que estão envolvidas na ativação e desativação de mais de 90% dos compostos químicos, entre os quais os utilizados como medicamentos (Lewis 2004; Ortiz de Montellano 2015). Em média, 55% do metabolismo de fármacos em seres humanos ocorrem especialmente pela ação de cinco enzimas: CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1 e CYP3A4/5 (Rowland et al. 2013; Arora et al. 2015). A CYP2C19 é considerada uma das principais proteínas dentro da família do CYP450, sendo responsável por metabolizar em torno de 10% de todas as drogas utilizadas clinicamente, dentre as quais o clopidogrel (Zhou et al. 2009; Zanger & Schwab 2013).

O clopidogrel é um fármaco antiplaquetário oral utilizado para inibir a ativação e agregação de plaquetas na doença arterial coronariana, doença vascular periférica e para prevenir o infarto do miocárdio (Abraham 2011; Remko et al. 2016). A resposta deficiente ao medicamento pode ocorrer em cerca de 25% dos pacientes tratados, levando a risco até 12 vezes maior para eventos isquêmicos recorrentes, como, por

exemplo, a trombose de *stent* que pode causar infarto do miocárdio (Cutlip et al. 2007; Ferguson et al. 2008; Shuldiner 2009). Embora o mecanismo que leva à variabilidade na resposta ao clopidogrel não seja completamente conhecido, sabe-se que polimorfismos gênicos relacionados à absorção intestinal (*MDR1- multidrug resistance 1*) e ao metabolismo do composto (*CYP450*) podem estar envolvidos (Suh et al. 2006; Simon et al. 2009).

Estudos recentes sobre o papel de polimorfismos do gene *CYP2C19* nas respostas clínicas ao tratamento com o clopidogrel demonstraram que indivíduos com a variante *CYP2C19*2 rs4244285 A>G* apresentaram maiores chances de desenvolver síndromes coronarianas agudas (Paré et al. 2010; Harmsze et al. 2010; Zabalza et al. 2012; Nassar et al. 2014). Recentemente, Kulmyrzaeva et al. (2016) observaram que os pacientes que desenvolveram trombose de *stent* possuíam os genótipos *CYP3A4*1B* e *CYP2C19*2*, que estão relacionados a uma menor capacidade de metabolização do clopidogrel e, conseqüentemente, a reduzida atividade antiplaquetária.

1.4.2 Expressão gênica

Estão entre os objetivos centrais da cardiologia molecular a caracterização de mecanismos que regulam as funções cardiovasculares complexas e a identificação de padrões de expressão de genes associados a doenças. A transcrição de genes é o mecanismo regulatório mais importante pelo qual um fenótipo e estado funcional de uma célula e um tecido são determinados. Portanto, a avaliação quali-quantitativa do perfil de expressão gênica é o primeiro passo na natureza dos processos biológicos (Zohlnhöfer et al. 2001). No entanto, são ainda escassos estudos sobre o perfil de expressão gênica em células da neointima na reestenose *intra-stent*.

Realmente, devido ao difícil acesso e disponibilidade limitada de amostra tecidual da neointima humana, a compreensão sobre sua formação no processo de reestenose baseia-se, principalmente, em modelos animais e em cultura de células (Gallo et al. 1999; Feng et al. 1999). Recentemente, foi descrito que, em porcos, o implante de *stent* leva ao aumento do mRNA e da proteína HFABP (*heart-type fatty acid-binding protein*) em células musculares lisas de aorta, e que esta proteína promoveria alteração em diversas vias relacionadas a processo inflamatório, crescimento e migração celular, como, por exemplo, as vias das adipocitocinas, TGF- β , *toll-like receptor*, Wnt, Hedgehog, ErbB and Notch (Chen et al. 2016).

Em 2001, Zohlnhöfer et al. foram pioneiros em avaliar a expressão gênica em fragmentos de tecido humano de reestenose *intra-stent*, coletado por aterectomia rotacional. Os autores detectaram 223 genes diferencialmente expressos, especialmente aqueles que codificam a desmina, a trombospondina-1, ciclooxigenase-1 e a proteína de ligação FK506 12 (FKBP12), a qual seria uma justificativa para o uso da rapamicina em *stents* farmacológicos. Mais tarde, Ashley et

al. (2006) utilizando a técnica de microarranjos de cDNA para avaliar a expressão de 22.000 genes em células coletadas da região da reestenose *intra-stent*, mostraram que dentre os diferencialmente expressos estavam predominantemente aqueles relacionados à proliferação celular e a processo inflamatório. Em 2004, o *National Institute of Health* dos Estados Unidos iniciou um grande estudo (*CardioGene Study: genomics of in-stent restenosis*) com os objetivos de determinar o padrão de expressão de genes e proteínas em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com reestenose *intra-stent* e identificar biomarcadores preditivos da doença e novos alvos terapêuticos (Ganesh et al. 2004). Em 2011 esse estudo foi finalizado e foram identificados 47 genes diferencialmente expressos, relacionados a várias funções, entre as quais crescimento celular e metabolismo, como os genes *NAB2* e *LAMP* (Ganesh et al. 2011).

A literatura e a prática médica confirmam que o implante do *stent* coronariano é considerado estratégia segura e amplamente aceita para tratar doenças coronarianas. No entanto, a ainda existente taxa de reestenose *intra-stent* desperta grande interesse de pesquisadores e da indústria farmacêutica e da tecnologia médica para superar tal limitação. Nos últimos anos, vários estudos vêm sendo direcionados para que os *stents* possam atuar como plataformas para terapias gênicas (*gene-eluting stents*). Para isso, três principais obstáculos requerem otimização para seu uso na prática clínica: a definição das vias biológicas alvo da terapia; o tipo de vetor gênico e a superfície onde esses vetores estariam ligados para posterior liberação (Fishbein et al. 2016; Lekshmi et al. 2017). Portanto, para que genes a partir da superfície de um *stent* intra-arterial possam ser oportunidades terapêuticas é fundamental conhecer os mecanismos moleculares relacionados à reestenose.

2. OBJETIVO

O estudo teve como objetivo identificar biomarcadores moleculares relacionados à reestenose coronariana após angioplastia com implante de *stent*, visando contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos na hiperplasia endotelial coronariana.

2.1 Objetivos específicos

- Investigar a relação entre polimorfismos dos genes *MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-9*, *CYP2C19*2*, *eNOS3* e *IL-6* e o risco para o desenvolvimento da reestenose coronariana *intra-stent*;
- analisar o perfil de citocinas plasmáticas circulantes nos pacientes coronarianos com reestenose;
- avaliar os níveis de danos oxidativos no DNA de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com reestenose;
- identificar o perfil de expressão gênica de células mononucleares do sangue periférico em pacientes com reestenose.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 População do estudo

Os Comitês de Ética em Pesquisa do Hospital Beneficência Portuguesa e da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP aprovaram a realização deste estudo (ANEXO I). Todos os participantes do estudo manifestaram concordância com a participação voluntária por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO II).

O estudo foi realizado com pacientes maiores de 18 anos, de ambos os sexos, com diagnóstico de angina estável, instável ou isquemia silenciosa documentada, portadores de lesões em artéria coronária nativa (excluindo-se lesões de tronco de coronária esquerda), *all comers* e submetidos a mesmo protocolo técnico de implante de *stent* eluído ou não em drogas. Na avaliação da angiografia coronariana de controle, em média 6 meses após o implante do *stent*, foram selecionados 110 pacientes com reestenose angiográfica (obstrução $\geq 50\%$ da luz do vaso) e 110 sem reestenose (obstrução $\leq 50\%$). O grupo controle foi composto por 110 indivíduos que, encaminhados para a cinecoronariografia, não apresentavam lesão passível de angioplastia coronariana (obstrução arterial $> 20\%$). Os pacientes foram recrutados no Hospital Beneficência Portuguesa de São Paulo – SP e no Hospital das Clínicas de Botucatu - SP. Os dados pessoais, informações gerais (hábito tabagista, prática de exercício físico etc) e o histórico médico foram obtidos por meio de questionário (ANEXO III) e do prontuário dos pacientes. Os pacientes foram considerados tabagistas, quando fumaram 100 ou mais cigarros durante a vida e continuavam fumando; ex-tabagistas, quando fumaram pelo menos 100 cigarros durante a vida,

mas haviam deixado o hábito há um ano e não tabagistas, que nunca fumaram ou fumaram menos de 100 cigarros durante toda a vida (OPAS apud INCA 2001). Foram considerados sedentários os pacientes não praticavam nenhum tipo de esporte ou exercício e ativos aqueles com atividades físicas de 1 a 5 vezes por semana (IPAQ 2005). A maioria dos pacientes recrutados fazia uso de medicamentos (Tabela 1).

Tabela 1- Medicamentos utilizados pelos pacientes

Medicamentos	Grupo Controle	Sem reestenose	Com reestenose
Antihipertensivos	89	85	80
Antiplaquetários	19	85	36
Antilipêmicos	63	72	57
Vasodilatadores	32	48	52
Antidiabéticos	10	29	12
Antiarrítmicos	2	2	2
Antidepressivos	10	15	18
Antitireoideanos	11	1	2

3.2 Coleta de sangue

No momento da cinecoronariografia, de cada paciente foram coletados ~15 mL de sangue periférico, em tubos do tipo *Vacutainer*[®] com anticoagulante ácido etileno diamino tetra acético (EDTA). O isolamento das células mononucleares (linfócitos e monócitos) foi realizado dentro do período de 4 horas. O sangue total e o plasma foram aliquotados e armazenados a - 80°C.

3.3 Isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

O isolamento das células mononucleares (linfócitos e monócitos) do sangue periférico foi realizado utilizando-se Ficoll-Paque® (*Amersham Biosciences*). Para isso, 3 mL de sangue total foram adicionados em um tubo tipo *falcon* contendo 3 mL de Ficoll e, em seguida, centrifugados a 2500 rpm, 10°C, por 30 minutos. A camada leucocitária formada foi removida, homogeneizada em 3 mL de meio RPMI 1640 e novamente centrifugada a 1500 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado, o sedimento contendo as células mononucleares ressuspensionado em meio RPMI e, em seguida, aliquoteado. Uma das alíquotas (200 µl) foi destinada ao teste do cometa; outra (500µl) para a extração de RNA e a terceira (50 µl) utilizada para a análise por citometria de fluxo, para a confirmação da presença de linfócitos, monócitos e granulócitos (Figuras 13 e 14).

3.4 Extração de RNA de células mononucleares do sangue periférico

Após o isolamento de células mononucleares, aproximadamente 500 µL foram ressuspensionados em 1mL de *QIAzol Lysis Reagent* e centrifugado a 4°C, por 10 minutos a 12.000 g. Posteriormente, o material foi Incubado a 30°C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 µL de clorofórmio e as amostras vigorosamente homogeneizadas e incubadas a temperatura ambiente a 30°C por 3 minutos. Na sequência, as amostras foram centrifugadas a 4°C, por 10 minutos a 12.000 g, o sobrenadante transferido para tubo de 1,5 mL, e foram adicionados 500 µL de isopropanolol. As amostras foram então vigorosamente homogeneizadas, incubadas

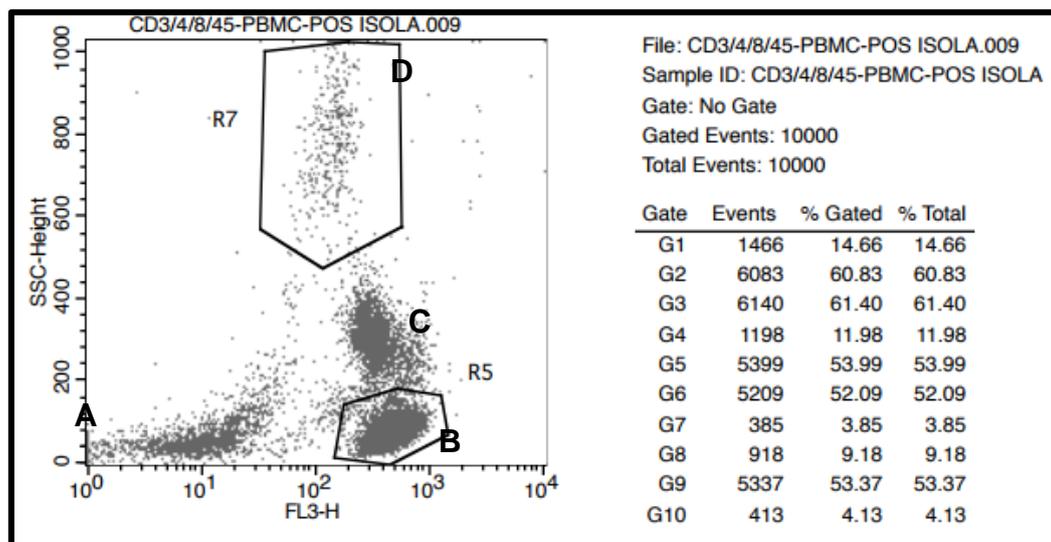


Figura 13. Subpopulações de células mononucleares identificadas por citometria de fluxo: **(A)** debris, hemácias e plaquetas; **(B)** linfócitos; **(C)** monócitos e **(D)** granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos)

a temperatura ambiente a 30°C por 10 min e posteriormente centrifugadas a 12.000 g, a 4°C, por 10 minutos. Após a remoção do sobrenadante, o sedimento foi lavado com 500 µL de álcool etílico 75% e centrifugado a 7.500g, a 4°C, por 5 cinco minutos. A amostra foi diluída em 30 µL de água livre de RNase, a concentração e pureza verificadas por espectrofotometria (Nanodrop, *Thermo Scientific*) e a integridade em Bioanalyser (*Agilent Technologies*), de acordo com protocolo do fabricante. Todas as amostras apresentaram RIN (*RNA integrity number*) acima de 7.

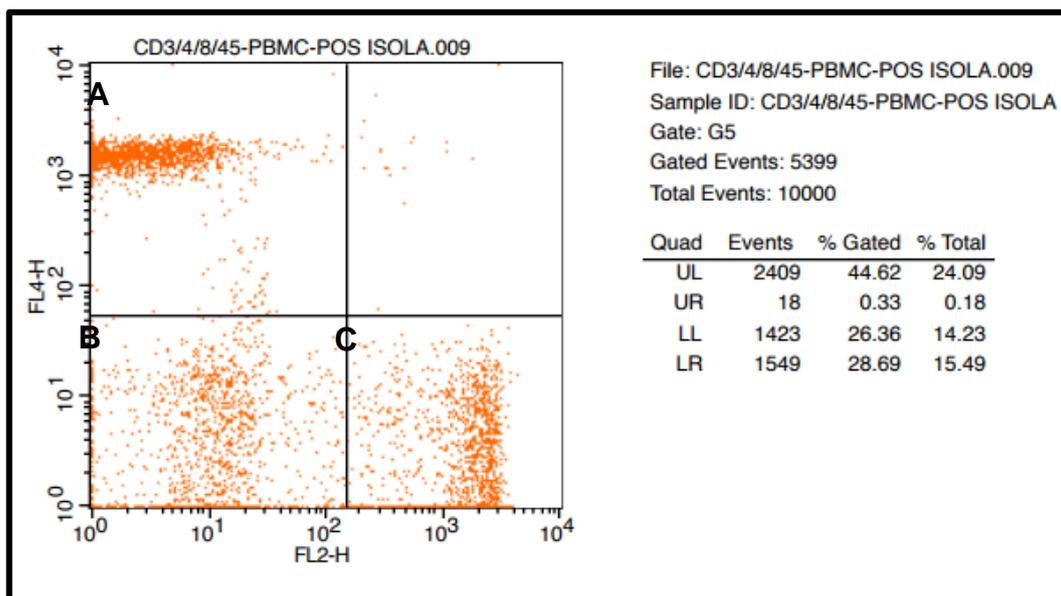


Figura 14. Subpopulações de células mononucleares identificadas por citometria de fluxo: **(A)** 44,62% de linfócitos, **(B)** 26,36% de monócitos e **(C)** 28,69 de granulócitos marcados com os anticorpos CD3,4,8 e 45.

3.5 Teste do cometa

Para a avaliação de danos primários no DNA foi utilizado o teste do cometa, de acordo com metodologia descrita por (Gontijo & Tice 2003). Como recomendado, as amostras celulares apresentaram taxa de viabilidade acima de 80%. Alíquotas de 60 μ l de células mononucleares (linfócitos e monócitos) foram misturadas a 100 μ l de agarose de baixo ponto de fusão a 0,5% (37°C). A suspensão resultante foi colocada sobre uma lâmina de microscópio previamente recoberta com uma camada de agarose de ponto de fusão normal a 1,5%. Em seguida, a lâmina foi deixada a temperatura de 4°C, por 10 minutos, para solidificação da agarose e, então, imersa em solução de lise (2,5M de NaCl, 100 mM de EDTA, 10 mM de TrisHCl, 1% de N-lauroil sarcosinato, 1% de Triton X-100

e 10% de DMSO), na qual permaneceu por aproximadamente 48 horas. Para a avaliação de danos oxidativos no DNA, a lâmina foi colocada em solução de PBS por 5 minutos e posteriormente em solução tampão (40 mM Hepes, 100 mM KCl, 0,2 mg/ml BSA, and 0,5 mM EDTA com pH 8) por 5 minutos. As lâminas foram incubadas em câmara úmida, a 37°C por 30 minutos, com 50 µl da enzima formamidopirimidina-DNA glicosilase (FPG) ou 50 µl endonuclease III (endo III) (1:1000), as quais reconhecem, respectivamente, purinas e pirimidinas oxidadas. Após esse período, as lâminas permaneceram por 5 minutos a 4°C. Em seguida, foram colocadas em uma cuba horizontal de eletroforese, onde permaneceram em tampão alcalino (NaOH 10 N, 200 EDTA 200 mM, pH > 13) por 20 minutos, a 4° C. A eletroforese foi conduzida a 25 V e 300 mA por 20 minutos. Posteriormente, as lâminas foram transferidas para cubas contendo solução de neutralização (0,4 M de Tris-HCL, pH 7,5), onde permaneceram por 15 minutos. Após esse período, foram fixadas com etanol absoluto. No momento da análise, as lâminas foram coradas com *Sybr gold* (1:10.000; Invitrogen; Grand Island, NY, USA) e examinadas em aumento de 400x, em microscópio de fluorescência acoplado a sistema de análise de imagem (*Comet Assay IV – Perceptive Instruments, UK*).

3.6 Extração de DNA e genotipagem

A extração do DNA de células de sangue total foi realizada utilizando-se o *kit Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin* (GE), de acordo com as instruções do fabricante. Para avaliação da qualidade do DNA foi utilizado gel de agarose 2% e os DNAs extraídos mantidos a - 80°C para posterior genotipagem.

3.6.1 Análise dos polimorfismos MMP-2 (-1575), MMP-9 (Arg 279 G/n), CYP2C19*2 (G681A), eNOS (G894T) e IL-6 (-174 G>C) pelo ensaio Taqman

As genotipagens foram realizadas por PCR em tempo real utilizando-se o ensaio de *Taqman*® (*Applied Biosystems*), de acordo com as instruções do fabricante. A reação foi composta de 1,75 µl de água estéril, 5 µl de *master mix*, 0,25 µl da sonda (*TaqMan assay*) e 3 µl de DNA (5 ng), com volume final de 10 µl. As condições de ciclagem foram: 60°C por 1 minuto, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 60°C por 1 minuto. A Tabela 2 apresenta as regiões polimórficas dos genes de interesse, bem como o ensaio para a detecção dos SNPs (*single nucleotide polymorphism*).

3.6.2 Análise dos polimorfismos MMP-3 (-1612 5A/6A) e MMP-9 (-1562 C>T) pela técnica PCR - RFLP - (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism)

O DNA extraído foi amplificado utilizando-se a técnica de PCR convencional para os genes *MMP-3* (-1612 5A/6A) rs 35068180 e *MMP-9* (-1562 C>T) rs3918242. Para o gene *MMP-3* (-1612 5A/6A) rs 35068180 foram utilizadas as seguintes condições experimentais: 1X solução tampão, 0,2 mM dNTP, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 µM de cada *primer* 1,25 U Platinum Taq DNA Polimerase (*Applied Biosystems*) e 100 ng de DNA, com a condição de ciclagem de 95°C por 5 minutos (desnaturação do DNA), 30 ciclos de 30 segundos a 94°C (desnaturação), 62°C por 30 segundos (*annealing*), 72°C por 1 minuto (extensão da molécula), seguida de outra etapa de extensão a 72°C por 10 minutos. Para o gene *MMP-9* (-1562 C>T) rs3918242 as

condições experimentais foram: 1X solução tampão (*Applied Biosystems*), 0,2 mM

Tabela 2 – Ensaio *Taqman* aplicado nas genotipagens de *MMP-2* (-1575), *MMP-9* (Arg 279 Gln), *CYP2C19*2* (G681A), *eNOS* (G894T) e *IL-6* (-174 G>C)

Genes	rs	Assay ID
<i>MMP-2</i> (-1575)	243866	C__3225942_10
<i>MMP-9</i> (Arg 279 Gln)	17576	C__11655953_10
<i>CYP2C19*2</i> (G681A)	4244285	C__25986767_70
<i>NOS3</i> (Glu298Asp)	1799983	C__3219460_20
<i>IL-6</i> (-174 G>C)	1800795	C__1839697_20

Regiões polimórficas

***MMP-2* (-1575)**

AGCTGTGATGATCAAGACATAATC[A/G]TGACCTCCAATGCCCCCCACAAGT

***MMP-9*(Arg 279 Gln)**

CTCCTCGCCCCAGGACTCTACACCC[A/G]GGACGGCAATGCTGATGGGAAAC

***CYP2C19*2*(G681A)**

TTCCCACTATCATTGATTATTTCCC[A/G]GGAACCCATAACAAATTACTTAAAA

***NOS3* (Glu298Asp)**

CCCTGCTGCTGCAGGCCCCAGATGA[G/T]CCCCAGAACTCTTCCTTCTGCC

***IL-6* (-174 G>C)**

ACTTTTCCCCCTAGTTGTGTCTTGC[C/G]ATGCTAAAGGACGTACATTGCACA

dNTP, 2,0 mM de MgCl₂, 0,2 μM de cada *primer* (IDT), 1,25 U *Platinum Taq DNA Polimerase* (*Applied Biosystems*) e 100 ng de DNA, em um volume total da reação de 50 μl. As condições de ciclagem foram 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 15 segundos a 94°C, 62°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, com uma etapa final de extensão de 72°C por 10 minutos. Em todas as reações foi utilizado controle negativo (*mix* de reagentes sem DNA) para verificação da amplificação. A Tabela 3 apresenta as sequências dos *primers* utilizados.

Tabela 3. Sequência de *primers* utilizados para amplificação dos genes *MMP-3* (-1612 5A/ 6A) e *MMP-9* (-1562 C>T)

Primers	Sequência (5'→3')
<i>MMP-3 (F)</i>	GGT TCT CCA TTC CTT TGA TGG GGG GA AgA
<i>MMP-3 (R)</i>	CTT CCT GGA ATT CAC ATC ACT GCC ACC ACT
<i>MMP-9 (F)</i>	GCC TGG CAC ATA GTA GGC CC
<i>MMP-9(R)</i>	CTT CCT AGC CAGCCG GCA TC

	Região Promotora	Referência
<i>MMP-3 (F)</i>	-1871 – 1851	Gnasso <i>et al.</i> (2000)
<i>MMP-3 (R)</i>		
<i>MMP-9 (F)</i>	-1339 -1319	Gnasso <i>et al.</i> (2000)
<i>MMP-9 (R)</i>		

3.6.3 Revelação do produto amplificado por eletroforese em gel de agarose

A revelação do produto amplificado foi realizada em gel de agarose 2% corado com 1µL de brometo de etídio. A eletroforese foi realizada a 100V, 4mA por 30 minutos em tampão TBE (Tris-Borato 45mM/EDTA 1mM). A visualização foi realizada sob luz ultra-violeta (UV), e foram consideradas PCR positivas as amostras que exibiram uma banda de 130pb para o gene *MMP-3* e de 435 pb para o gene *MMP-9* como marcador (Figura 15).

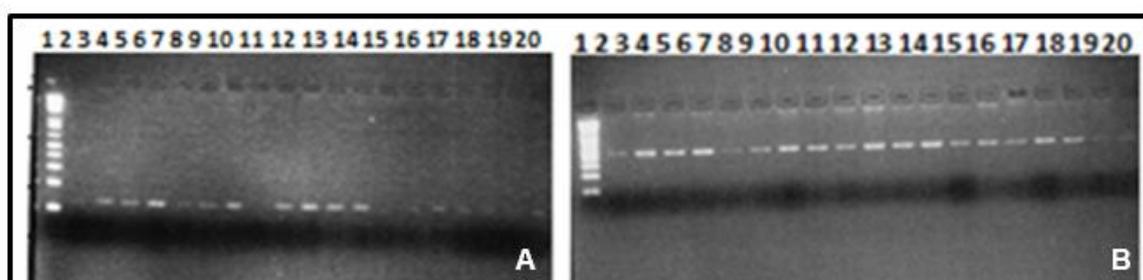


Figura 15 – Gel de eletroforese para os genes (A) *MMP-3* (5A/6A) 130 pb e (B) *MMP-9* (-1562) 435 pb. No poço nº 1 foi colocado o marcador de peso molecular de 1kb (*Applied Biosystems*).

3.6.4 Aplicação da enzima de restrição (RFLP)

Dos 50µL de DNA amplificados de ambos os genes, 10 µL foram utilizados na RFLP. Para o gene *MMP-3* (-1612 5A/6A) rs 35068180, a enzima utilizada foi a Tth111I (PstI) (*Thermo Scientific - FastDigest*), e para o *MMP-9* (-1562 C>T) rs3918242, a Sph I (PaeI), de acordo com o protocolo do fabricante. A Tabela 4 apresenta os sítios de reconhecimento das enzimas.

Tabela 4. Sítios de reconhecimento das enzimas Tth111I (PstI) e SphI (PaeI)

Enzima de restrição	Sítio de reconhecimento
Tth111I (PstI)	5'...G A C N↓N N G T C...3' 3'...C T G N N↑N C A G...5'
SphI (PaeI)	5'...G C A T G↓C...3' 3'...C↑G T A C G...5'

3.6.5 Análise do produto da PCR-RFLP para os genes *MMP-3* (-1612 5A/6A) e *MMP-9* (-1562 C>T)

Os produtos da PCR-RFLP para os genes *MMP-3* (-1612 5A/6A) rs 35068180 e *MMP-9* (-1562 C>T) rs3918242 foram aplicados em gel de agarose 4%, e as bandas visualizadas sob luz ultravioleta (UV). Os polimorfismos foram interpretados de acordo com os padrões de bandas mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Padronização das bandas genóticas de *MMP-3* (-1612 5A/6A) e *MMP-9* (-1562 C>T)

	Genótipos	Bandas correspondentes
<i>MMP-3</i> (rs35068180)	6A/6A	130 pb
	5A/5A	97 pb
	5A/6A	130 e 97 pb
<i>MMP-9</i> (rs3918242)	C/C	435 pb
	T/T	247 e 188 pb
	C/T	435, 247 e 188 pb

3.7 Extração do RNA de células mononucleares do sangue periférico

Para a análise da expressão gênica em linfócitos e monócitos (PBMC) isolados conforme descrito no item 4.6 foi inicialmente realizada a extração do RNA pelo método de separação por fases por Qiazol. A qualidade do RNA foi avaliada por espectrometria (*Nano Drop*): na razão 260/280, a variação foi entre 255 a 596 ng/μl; para a razão 260/280, entre 1,98 a 2,08 e na razão 230/260 variou entre 1,92 a 2,06. A integridade das amostras foi analisada em *Bioanalyser (Agilent)* e aquelas com valores de RIN (*RNA Integrity Number*) iguais ou acima de 7 foram consideradas ideais para a análise de expressão gênica pela técnica de microarranjos.

3.8 Expressão gênica pela técnica de microarranjos (*microarray*)

A análise de expressão gênica em larga escala (*microarrays*) foi realizada com amostras de 15 indivíduos de cada um dos três grupos de estudo (Grupo controle, sem reestenose e com reestenose). Para isso, foram utilizadas lâminas de vidro *SurePrint G3 Human* (GE 8x60K *Microarray kit*) comercializadas pela *Agilent Technologies*. Resumidamente, as amostras de RNA foram amplificadas e marcadas com cianina (Cy3), com o *1-Color Low Input Linear Amplification kit* (Agilent). O cRNA marcado foi purificado utilizando-se o *kit RNeasy MinElute Cleanup Kit* (Qiagen) e, posteriormente, eluído em água *RNAse-free*; sendo, então, quantificado. As etapas de fragmentação do cRNA e hibridação (em câmara de hibridação *SureHyb* por 17 horas a 65°C) das amostras nas lâminas foram realizadas com o *Gene Expression Hybridization kit*. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com soluções específicas, contendo Triton-X em acetonitrila. Todas as etapas foram realizadas de acordo com as especificações do fabricante. A leitura das lâminas foi realizada no *SureScan Microarray Scanner* (Agilent Technologies).

3.8.1 Análise de enriquecimento funcional e construção de redes

Os mRNAs diferencialmente expressos em cada uma das comparações foram separadamente submetidos às ferramentas de anotação funcional fornecidas pelo *Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery* (DAVID), versão 6.8. (Dennis et al. 2003). Para a análise de enriquecimento, as listas foram comparadas com os seguintes termos biológicos: *function categories* (COG ONTOLOGY, SP PIR KEYWORDS, UP SEQ FEATURE), *Gene Ontology terms* (GOTERM BP FAT, GOTERM CC FAT, GOTERM MF FAT), *pathways* (BBID, BIOCARTA, KEGG

PATHWAY) e *protein domains* (INTERPRO, PIR SUPERFAMILY, SMART). Vias redundantes foram removidas utilizando o REViGO (Supek et al. 2011). As comparações foram consideradas significativas quando geraram pelo menos três genes para cada termo biológico, apresentando o *score* dEASE com correção de Benjamini-Hochberg ajustada para $< 0,05$. As redes de ontologia e gênica foram contruídas utilizando-se o Cytoscape (Shannon et al. 2003) e *Ingenuity Pathway Analysis-IPA* (Krämer et al. 2014).

3.9 Dosagem de citocinas por citometria de fluxo - CBA

O kit CBA (BD) (*cytometric beads array*) - *Human Inflammatory Cytokines* (Cat. 551811, Becton Dickinson BD), foi utilizado para a quantificação das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8 e anti-inflamatórias IL- β , IL-10, IL-12 e TNF- α no plasma de 133 pacientes, sendo 42 do grupo controle, 45 do grupo com *stent* e sem reestenose e 46 com *stent* e com reestenose. Seis diferentes *beads* com diferentes intensidades de fluorescência foram conjugadas a um anticorpo de captura específico para cada citocina formando o CBA, e lidos em citômetro (FACSCalibur, Becton Dickinson and Company, USA). As *beads* foram identificadas conforme suas respectivas intensidades de fluorescência. No CBA, as *beads* de captura das citocinas foram misturadas com o anticorpo de detecção conjugado com o fluorocromo PE, em seguida incubadas com as amostras para formar o ensaio tipo "sanduíche". Os tubos para aquisição foram preparados com 50 μ L da amostra, 50 μ L do conjugado de *beads* e 50 μ L do reagente de detecção, sendo usado o mesmo procedimento para reconstituir a curva padrão. Após este passo, os tubos foram homogeneizados e

incubados sem a presença de luz, em temperatura ambiente, por três horas. O *software CellQuest (BD)* foi utilizado para gerar os resultados expressos em pg/mL.

3.10 Análise estatística

Para os dados do teste do cometa foi inicialmente realizada análise seguindo o modelo linear generalizado, utilizando a distribuição gama para se obter a normalização necessária. Para isso, foi utilizado o GENMOD do programa SAS for Windows v.9.2. O Test t de Student e Anova seguido de Tukey foram utilizados para avaliação dos dados demográficos e para as variáveis bioquímicas e hemodinâmicas. O teste do Qui-quadrado e o teste exato de Fisher foram utilizados para comparação das proporções gênicas pelo *software Prism V.5*. O teste de Qui-quadrado foi também utilizado para avaliar o equilíbrio de Hardy-Weinberg e para comparação das frequências genotípicas entre os grupos. Para significância estatística foi adotado $p < 0,05$.

Para as análises de bioinformática, a quantificação dos dados e controle de qualidade foram realizadas com o *Feature Extraction (FE) software* versão 15.5 (*Agilent Technologies, Inc. Life Sciences and Chemical Analysis Group, Santa Clara, CA, USA*) e os dados de expressão carregados em *R-environment* (<http://www.r-project.org>) v.3.0.0. Para aplicação do pré-processamento/normalização foi usado o pacote Agilp seguindo o tutorial da Agilent, com os seguintes passos: execução da função AProcess; execução da função Baseline com log base 2 e execução do AALoess. O ajuste de fundo foi realizado subtraindo os valores medianos de fundo a partir dos valores medianos de expressão. Os dados transformados por log2 e em seguida normalizados utilizando a função quantil do pacote *aroma.light* (Bolstad et al.

2003). Os genes diferencialmente expressos foram identificados utilizando-se o teste-F com correção Benjamini-Hochberg com a intenção de comparação entre todos os grupos. O pacote *Multtest* (Pollard et al. 2004) foi utilizado para realizar estas análises estatísticas. Foram considerados os valores inferiores a 0,05, incluindo a correção Benjamini-Hochberg. Foi realizado um teste t simples para obter os genes diferencialmente expressos, pois o de Bonferroni não resultou em qualquer gene diferencialmente expresso.

4. RESULTADOS

A Tabela 6 apresenta as características da população estudada. Foram avaliados 330 pacientes distribuídos uniformemente entre os grupos controle, com *stent* e sem reestenose (obstrução $\leq 50\%$) e com *stent* e reestenose (obstrução $\geq 50\%$), sendo 202 do gênero masculino (61%), com média de idade de $63,3 \pm 10,2$ anos, e 128 do feminino (39%), com a média de idade $42,67 \pm 12,5$ anos. Não foram observadas diferenças significativas em relação à idade e peso dos pacientes e foi confirmada a prevalência de doença coronariana no gênero masculino ($p < 0,05$). Não foi detectada relação entre hábito de fumar e sedentarismo e a presença de reestenose.

As variáveis bioquímicas (colesterol total, triglicérides, ácido úrico, glicemia e TSH) e hemodinâmicas (pressão arterial) estão apresentadas na Tabela 7. Os resultados mostraram prevalência de níveis aumentados de colesterol (≥ 240 mg/dl) e triglicérides (200 – 499 mg/dL) nos grupos com obstrução arterial (com e sem reestenose). Destaca-se, no entanto, que os pacientes do grupo controle, apresentaram triglicérides nos níveis limítrofes (150 – 199 mg/dL). A proporção de pacientes com glicemia normal (< 100 mg/dL) e alterada (≥ 126 mg/dL) não diferiu significativamente nos grupos com obstrução arterial. No entanto, no grupo controle a proporção de pacientes com valores de glicemia dentro da normalidade foi significativamente maior que aqueles com glicemia alterada (≥ 126 mg/dL) ($p < 0,05$). Os dados sobre pressão arterial não indicaram diferenças entre os grupos na proporção de indivíduos com valores de pressão arterial limítrofes, bem como na proporção de indivíduos com hipertensão grau 1. Entretanto, dentro de cada um dos

grupos observou-se maior proporção de pacientes com hipertensão grau 1 (pressão sistólica 140-159 mm HG/ diastólica 90-99 mmHg).

Tabela 6 - Características da população estudada

Variáveis		Grupos		
		Controle n = 110 (%)	Sem reestenose n = 110 (%)	Com reestenose n = 110 (%)
Gênero	Masculino	50 (46,4) ^{aA}	73 (66,4) ^{bA}	79 (71,8) ^{bA}
	Feminino	60 (53,6) ^{aA}	37 (33,6) ^{bB}	31 (28,2) ^{bB}
Idade (anos)	Masculino	60,5 ± 10,26 ^{aA}	58,93 ± 13,0 ^{aA}	61,30 ± 13,43 ^{aA}
	Feminino	62,1 ± 9,28 ^{aA}	56,4 ± 10,5 ^{aA}	61,37 ± 13,67 ^{aA}
Tabagismo	Não fumantes	47 (42,7) ^{aA}	42 (38,2) ^{aA}	32 (29,1) ^{aA}
	Fumantes	21 (19,1) ^{aB}	22 (20,0) ^{aB}	33 (30,0) ^{aA}
	Ex-fumantes	42 (38,2) ^{aA}	40 (36,4) ^{aA}	39 (35,5) ^{aA}
Atividade Física	Ativo	33 (30,0) ^{aA}	45 (43,0) ^{abA}	53 (49,0) ^{bA}
	Sedentário	77 (70,0) ^{aB}	59 (57,0) ^{bA}	55 (51,0) ^{bA}

Dados expressos em média e desvio padrão. Letras minúsculas: comparação entre grupos (linha); letras maiúsculas: comparação dentro do mesmo grupo (coluna); letras diferentes: diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Com relação às citocinas, apenas as pró-inflamatórias IL-6 e IL-8 foram detectadas no plasma sanguíneo, porém em número reduzido de pacientes (IL-6: 2/42 do grupo controle; 8/45 do sem reestenose e 3/46 do com reestenose; IL- 8: 0/42 do grupo controle; 3/45 do sem reestenose e 2/46 do com reestenose) (Figura 16). Devido ao pequeno número de indivíduos com valores detectáveis de citocinas, não foi possível realizar análise estatística.

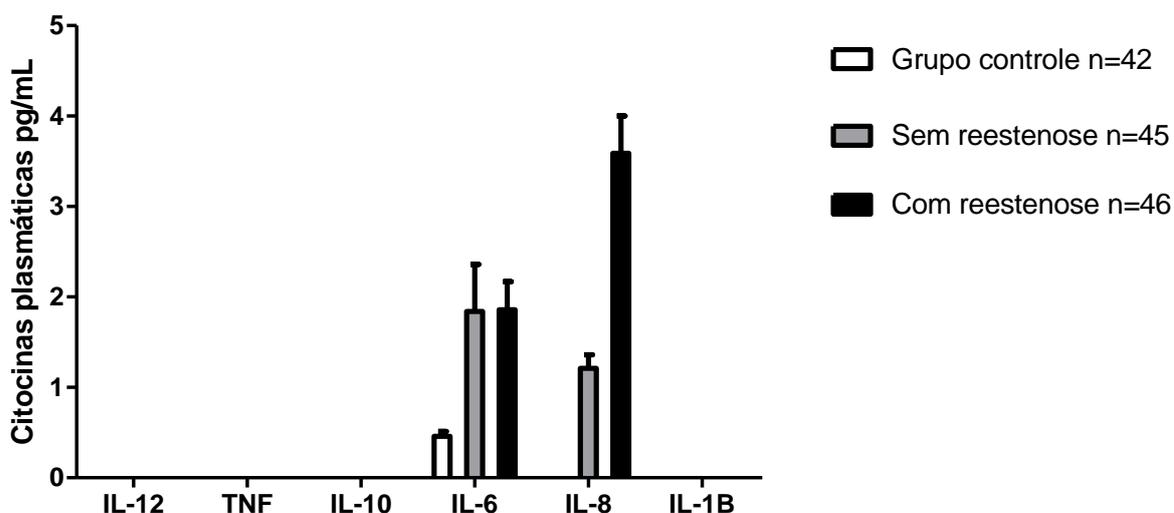


Figura 16. Concentração de citocinas plasmáticas (média \pm DP)

As Tabelas 8 e 9 apresentam as distribuições alélicas e genóticas dos polimorfismos dos genes *MMP-2*, *MMP-3*, *MMP-9*, *CYP2C19*2*, *eNOS* e *IL-6* na população estudada. Apenas para a frequência alélica da variante *MMP-9* (Arg279Gln) foi observada diferença significativa entre os grupos, ou seja, o alelo G ocorreu com maior frequência no grupo com *stent* sem reestenose. Neste mesmo grupo foi também observada menor frequência do genótipo AA. No entanto, quando os genótipos com o alelo G (AG + GG) foram agrupados, ficou evidente proporção significativamente maior nos pacientes sem reestenose *intra-stent* ($p < 0,05$) (Tabela 8).

A fim de avaliar possível relação entre os diferentes polimorfismos gênicos e a presença de obstrução coronária mais extensa, os pacientes com implante de *stent* (com e sem reestenose) foram agrupados e as frequências alélicas e genóticas comparadas às do grupo controle. Neste caso, observou-se que as frequências do alelo G e do genótipo GG do polimorfismo *MMP-9* (Arg279Gln) foram

significativamente maiores no grupo com *stent* (com e sem reestenose) ($p < 0,01$). Para o polimorfismo *MMP-9* (-1562) o genótipo CC ($p < 0,05$) ocorreu com maior frequência no grupo de pacientes com doença coronariana (CR + SR) (Tabela 9).

A partir da população total do estudo ($n = 330$) foram aleatoriamente selecionados 90 pacientes (30 do grupo controle, 30 com *stent* e sem reestenose e 30 com *stent* e com reestenose) para avaliação dos níveis de danos no DNA (teste do cometa). As Tabelas 10 e 11 apresentam, respectivamente, as características dessa subpopulação e os níveis de danos no DNA (*tail intensity*) de células mononucleares do sangue periférico. Os pacientes com reestenose *intra-stent* apresentaram níveis de danos primários (quebras de fitas simples e duplas e sítios álcali-lábeis) ($p < 0,0001$) e oxidativos (em bases púricas) no DNA ($p < 0,05$) significativamente mais altos que os pacientes dos grupos controle e sem reestenose.

Tabela 7. Distribuição da população de acordo com os valores de referência de exames clínicos e bioquímicos

Variáveis Referência ¹	Valores de	Grupo controle n = 110 (%)	Sem reestenose n = 110 (%)	Com reestenose n = 110 (%)
Colesterol Total (mg/dL)	< 200 (desejável)	-	-	-
	200 - 230 (limítrofe)	55 (50) ^{aA}	35 (32) ^{bA}	44 (40) ^{bA}
	≥ 240 (alto)	55 (50) ^{aA}	75 (68) ^{bB}	66 (60) ^{bB}
Triglicérides (mg/dL)	< 150(desejável)	-	-	-
	150 - 199 (limítrofe)	81 (74) ^{aA}	52 (49) ^{bA}	62 (56) ^{bA}
	200 – 499 (alto)	29 (26) ^{aB}	58 (51) ^{bA}	48 (44) ^{bA}
	≥ 500 (muito alto)	-	-	-
Ácido Úrico (mg/dL)	Normal < 5,5	96 (87) ^{aA}	96 (87) ^{aA}	94 (85) ^{aA}
	Alto >5,5	14 (13) ^{aB}	14 (13) ^{aB}	16 (15) ^{aB}
Glicemia (mg/dL)	Normal < 100	73 (66) ^{aA}	55 (50) ^{aA}	64 (58) ^{aA}
	Pré-diabética 100 - < 126	-	-	-
	Diabetess ≥ 126	37 (33) ^{aB}	55 (50) ^{aA}	46 (42) ^{aA}
Pressão arterial Sistólica/Diastólica (mmHg)	130 – 139/85-89 (limítrofe)	26 (24) ^{aA}	24 (22) ^{aA}	27 (25) ^{aA}
	140-159/90-99 (grau 1)	84 (76) ^{aB}	86 (78) ^{aB}	83 (75) ^{aB}
	160-179/100-109 (grau 2)	-	-	-
	≥ 180/≥ 110 (grau 3)	-	-	-
	≥ 140/< 90 (grau4)	-	-	-

¹ Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2013. Dados expressos em média e desvio padrão. Letras minúsculas: comparação entre grupos (linha); letras maiúsculas: comparação dentro do mesmo grupo (coluna). Letras diferentes: diferenças estatisticamente significativas (p<0,05).

Tabela 8. Frequências alélicas e genotípicas na população de estudo

Genes		Controle n (%)	Sem Reestenose n (%)	Com Reestenose n (%)
MMP-2 (-1575) rs243866	AA	10 (9,1) ^a	13 (11,8) ^a	14 (12,7) ^a
	AG	30 (27,3) ^a	34 (30,9) ^a	32 (29,1) ^a
	GG	70 (63,7) ^a	63 (57,3) ^a	64 (58,2) ^a
	A	0,23 ^a	0,27 ^a	0,27 ^a
	G	0,77 ^a	0,73 ^a	0,73 ^a
MMP-3 (-1612) rs35068180	5A/5A	20 (18,2) ^a	17 (15,5) ^a	20 (18,2) ^a
	5A/6A	42 (38,2) ^a	40 (36,4) ^a	46 (41,8) ^a
	6A/6A	48 (43,6) ^a	53 (48,2) ^a	45 (41,0) ^a
	5A	0,37 ^a	0,34 ^a	0,40 ^b
	6A	0,63 ^a	0,66 ^a	0,60 ^a
MMP-9 (Arg 279 Gln) rs17576	AA	47 (42,7) ^a	38 (34,5) ^a	47 (42,7) ^a
	AG	48 (43,6) ^a	43 (39,1) ^a	36 (32,7) ^a
	GG	15 (13,6) ^a	29 (26,4) ^a	27 (24,5) ^a
	A	0,65 ^a	0,54 ^b	0,59 ^{ab}
	G	0,35 ^a	0,46 ^b	0,41 ^{ab}
MMP-9 (-1562) rs3918242	CC	94 (85,5) ^a	81 (73,6) ^a	88 (80,0) ^a
	CT	16 (14,5) ^a	29 (26,4) ^a	22 (20,0) ^a
	TT	00 (00,0) ^a	00 (00,0) ^a	00 (00,0) ^a
	C	0,93 ^a	0,87 ^a	0,90 ^a
	T	0,07 ^a	0,13 ^a	0,10 ^a
CYP2C19*2 (G681A) rs4244285	GG	82 (74,6) ^a	75 (68,2) ^a	82 (74,6) ^a
	GA	26 (23,6) ^a	26 (23,6) ^a	25 (22,7) ^a
	AA	2 (1,8) ^a	9 (8,2) ^a	3 (2,7) ^a
	G	0,86 ^a	0,80 ^a	0,86 ^a
	A	0,14 ^a	0,20 ^a	0,14 ^a
eNOS3 (G894T) rs1799983	GG	51 (46,4) ^a	58 (52,7) ^a	45 (40,9) ^a
	GT	41 (37,3) ^a	38 (34,6) ^a	51 (46,4) ^a
	TT	18 (16,4) ^a	14 (12,7) ^a	14 (12,7) ^a
	G	0,65 ^a	0,70 ^a	0,65 ^a
	T	0,35 ^a	0,30 ^a	0,35 ^a
IL-6 (-174) rs1800795	GG	59 (53,7) ^a	57 (51,8) ^a	48 (43,7) ^a
	GC	36 (32,7) ^a	38 (34,6) ^a	47 (42,7) ^a
	CC	15 (13,6) ^a	15 (13,6) ^a	15 (13,6) ^a
	G	0,70 ^a	0,70 ^a	0,65 ^a
	C	0,30 ^a	0,30 ^a	0,35 ^a

n = 110 pacientes / grupo. Letras diferentes: diferenças significativas entre os grupos (p<0,05).

Tabela 9. Frequências genotípicas e alélicas nos grupos de pacientes do estudo

GENES (Polimorfismo)	GRUPO CONTROLE n (%)	PACIENTES COM STENT* n (%)
MMP-2 (-1575)		
GG	70 (63,6) a	127 (57,7) a
GA	30 (27,3) a	66 (30,0) a
AA	10 (9,1) a	27 (12,3) a
G	0,64 a	0,73 a
A	0,36 a	0,27 a
MMP-3 (-1612)		
6A/6A	48 (43,6) a	96 (43,6) a
6A/5A	42 (38,2) a	85 (38,7) a
5A/5A	20 (18,2) a	39 (17,7) a
6A	0,63 a	0,63 a
5A	0,37 a	0,37 a
MMP-9 (Arg279Gln)		
AA	47 (42,7) a	76 (34,5) a
AG	48 (43,6) a	79 (35,9) a
GG	15 (13,6) a	65 (29,5) b
A	0,65 a	0,53 a
G	0,35 a	0,47 b
MMP-9 (-1562)		
CC	95 (86,3) a	169 (84,5) b
CT	15 (13,6) a	51 (23,2) a
TT	-	-
C	0,86 a	0,88 a
T	0,13 a	0,12 a
CYP2C19*2(G681A)		
GG	82 (74,5) a	157 (71,4) a
GA	25 (22,7) a	51 (23,2) a
AA	3 (2,72) a	12 (5,4) a
G	0,85 a	0,83 a
A	0,15 a	0,17 a
eNOS3 (G894T)		
GG	51 (46,4) a	103 (46,8) a
GT	41 (37,3) a	117 (53,2) a
TT	18 (8,2) a	27 (12,3) a
G	0,65 a	0,67 a
T	0,35 a	0,33 a
IL-6 (-174) G>C		
GG	59 (53,6) a	105 (47,7) aA
GC	57 (51,8) a	85 (38,6) aA
CC	48 (43,6) a	62 (28,2) aA
G	0,70 a	0,67 a
C	0,30 a	0,33 a

Letras minúsculas: comparação entre grupos (linha). Letras diferentes: diferenças significativas ($p < 0,05$); * inclui pacientes com e sem reestenose ($n = 220$).

Tabela 10. Características da população selecionada para a avaliação de lesões no DNA

Variáveis		Grupos		
		Controle n = 30 (%)	Sem reestenose n = 30 (%)	Com reestenose n = 30 (%)
Sexo	Masculino	22 (73,33) aA	11 (36,66) bB	18 (60) aA
	Feminino	08 (26,67) aB	19 (63,34) bB	12 (40) aB
Idade (anos)	Masculino	63,63 ± 7,16aA	64,67 ± 7,93aA	61,44 ± 8,67aA
	Feminino	64,75 ± 12,04aA	58,5 ± 7,38aA	59,66 ± 10,08aA
Tabagismo	Tabagista	05 (17) aA	08 (27) aA	05 (17) aA
	Não tabagista	10 (33) aA	09 (30) aA	09 (30) aA
	Ex-tabagista	15 (50) aA	13 (43) aA	16 (53) aA
Atividade Física	Sedentário	20 (67) aA	20 (67) aA	22 (73) aA
	Ativo	10 (33) aA	10 (33) aA	08 (27) aA

Dados expressos em média e desvio padrão. Letras minúsculas: comparação entre grupos (linha); letras maiúsculas: comparação dentro do mesmo grupo. Letras diferentes: diferenças significativas ($p < 0,05$).

Tabela 11. Níveis de danos no DNA (*tail intensity*) de células tectados pelo teste do cometa

Grupo	Quebra no DNA	Purinas oxidadas	Pirimidinas oxidadas
Controle (n = 30)	69,96 ± 20,16	62,75 ± 23,53	62,97 ± 22,40
Sem reestenose (n = 30)	66,95 ± 22,81	62,31 ± 26,87	55,54 ± 24,86
Com reestenose (n = 30)	77,39 ± 16,28**	66,96 ± 24,53*	64,89 ± 20,23

Dados expressos em média ± desvio padrão; *p<0,05, ** p<0,001 (comparação entre os grupos).

Os padrões de expressão gênica em células mononucleares de sangue periférico, obtidos pela técnica de *microarrays* estão apresentados nas Figuras 17, 20 e 22 (ANEXO IV – Lista completa dos transcritos). Nos pacientes com *stent* sem reestenose, 493 transcritos (incluindo genes e RNAs longos não codificadores) apresentaram-se diferencialmente expressos (400 hiperexpressos e 93 hipoexpressos) em relação a aqueles sem *stent* (grupo controle; Figura 17). Dentre os transcritos hiper e hipoexpressos, 306 e 80, respectivamente, apresentam funções já conhecidas. A ontologia genética mostrou que dentre os hiperexpressos estão genes relacionados ao desenvolvimento embrionário da placenta, desenvolvimento de células do nodo auriculoventricular, silenciamento gênico por RNA, regulação positiva da expressão gênica (epigenética), organização telomérica, organização da estrutura de actina/miosina, transcrição, regulação positiva da vasoconstrição, regulação positiva da transcrição do promotor da RNA polimerase II, regulação da proliferação de células T, regulação negativa da expressão gênica (epigenética), entre outros. Dentre os hipoexpressos, estão genes associados ao

crescimento de organismos multicelulares, secreção de interferon gama, regulação da transcrição do promotor da RNA polimerase II e agregação plaquetária. (Tabela 12; Figura 18).

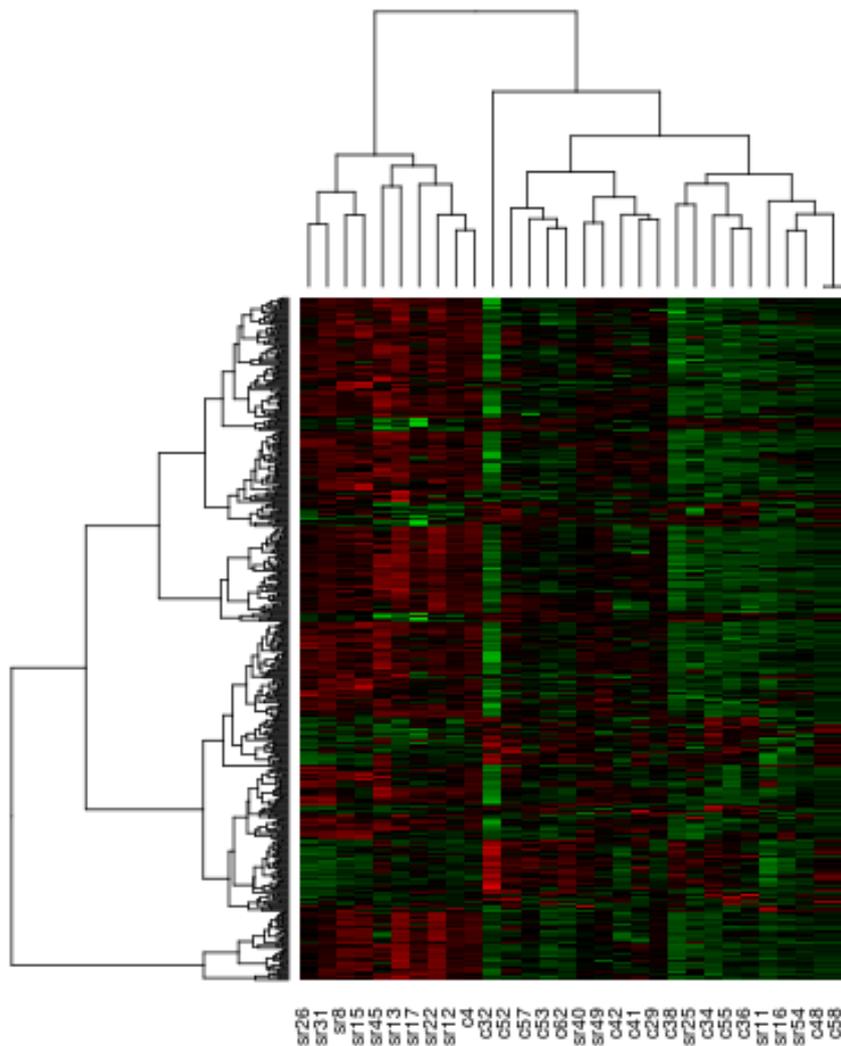
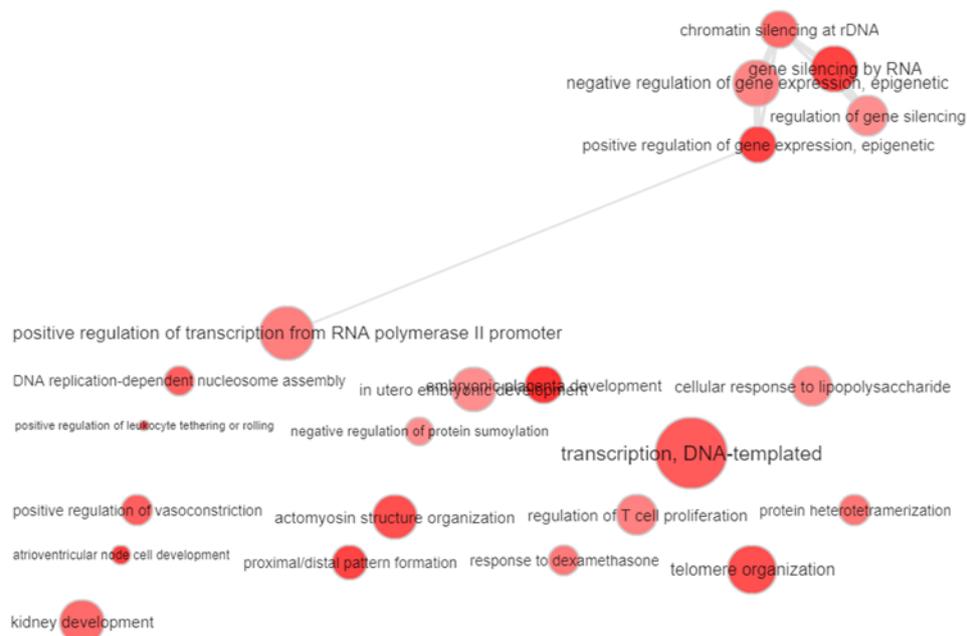


Figura 17. Agrupamentos hierárquicos obtidos pela análise de expressão gênica em células mononucleares do sangue periférico de pacientes do grupo controle (C) e do grupo com *stent* e sem reestenose (SR). Os números representam os códigos dos pacientes no estudo; vermelho indica hiperexpressão do gene; hipoeexpressão; preto, ausência de modulação gênica; cinza, sem informação.

A)



B)

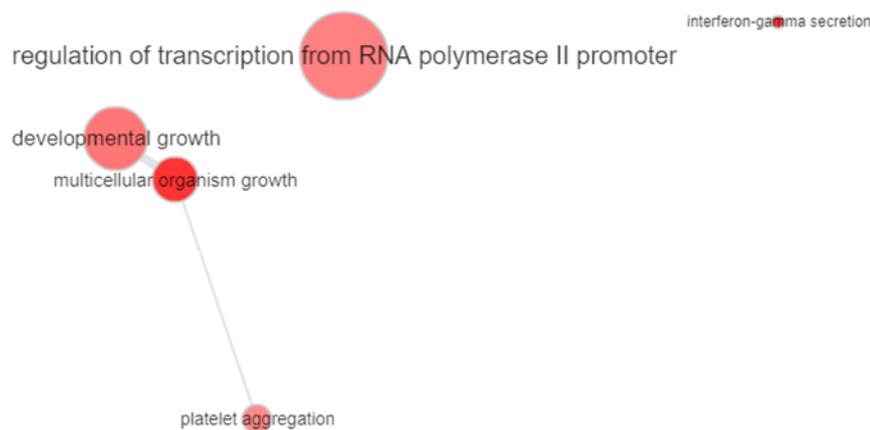


Figura 18. Redes de ontologia genética obtidas a partir dos genes hiper (A) e hipoexpressos (B) em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com *stent* coronariano sem reestenose em relação a pacientes sem implante de *stent* (grupo controle).

Tabela 12. Processos biológicos associados a genes diferencialmente expressos em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com *stent* coronariano sem reestenose em relação a pacientes sem implante de *stent* (grupo controle)

PROCESSOS BIOLÓGICOS	GENES
Desenvolvimento embrionário da placenta	<i>HSF1, TFEB, PKD1(+)</i>
Desenvolvimento de células do nodo auriculoventricular	<i>MAML1, NKX2-5 (+)</i>
Silenciamento de genes por RNA	<i>POLR2H, HIST1H3D, HIST1H4D, NUPL2, HIST1H3H (+)</i>
Regulação positiva da expressão gênica (epigenética)	<i>POLR2H, HIST1H3D, HIST1H4D, HIST1H3H (+)</i>
Padrão de formação proximal / distal	<i>HOXA10, HOXA9, CTNNB1 (+)</i>
Organização telomérica	<i>HIST1H3D, HIST1H4D, HIST1H3H (+)</i>
Organização da estrutura de actina/miosina	<i>FRMD3, PHACTR1, CNN2 (+)</i>
Regulação positiva da rolagem de leucócitos	<i>ITGA4, PTAFR (+)</i>
Transcrição	<i>POLR2H, SBNO2, HMX1, ZNF467, EZH1, TFEB, HDGFRP2, CBX7, CTNNB1, HSF1, HOXA9, LBX1, HMG20B, ZNF497, POLR2J2, ZSCAN2, FOXP4, VSX1, ZNF2, MEF2D, NCOA4, HIF3A, MGA, ZNF713, MAFA, ZNF746, UNCX (+)</i>
Organização de nucleossomos dependente da replicação de DNA	<i>HIST1H3D, HIST1H4D, HIST1H3H (+)</i>
Regulação positiva da vasoconstrição	<i>TBXA2R, UTS2R, PTAFR (+)</i>
Desenvolvimento renal	<i>LZTS2, WDPCP, PKD1, MME (+)</i>
Silenciamento de cromatina no rdna	<i>HIST1H3D, HIST1H4D, HIST1H3H (+)</i>
Heterotetramerização de proteínas	<i>HIST1H3D, HIST1H4D, HIST1H3H (+)</i>
Resposta à dexametasona	<i>FOXO3, PTAFR (+)</i>
Regulação positiva da transcrição do promotor da RNA polimerase II,	<i>MEF2D, SBNO2, HSF1, EZH1, GALR3, MAML1, HOXA10, HIF3A, TFEB, PKD1, ZNF746, FOXO3, MAFA, NKX2-5, CTNNB1 (+)</i>
Regulação da proliferação de células T	<i>LGALS3, CTNNB1 (+)</i>
Regulação negativa da expressão gênica (epigenética)	<i>HIST1H3D, HIST1H4D, HIST1H3H (+)</i>
Resposta celular ao lipopolissacarídeo	<i>SBNO2, HSF1, TBXA2R, NFKBIL1 (+)</i>
Desenvolvimento embrionário <i>in utero</i>	<i>ATP7A, ANKRD11, PKD1, EIF4E2, CTNNB1 (+)</i>
Regulação do silenciamento gênico	<i>HIST1H3D, HIST1H3H (+)</i>
Regulação negativa da sumoilação	<i>HMG20B, CTNNB1 (+)</i>
Crescimento de organismos multicelulares	<i>SP2, APBA2, GNAS (+)</i>
Secreção de interferon gama	<i>GATA3, BTN3A2 (-)</i>
Desenvolvimento	<i>GATA3, GNAS (-)</i>
Regulação da transcrição do promotor da RNA polimerase II	<i>SP2, ZNF783, ZSCAN18, LRRFIP1 (-)</i>
Agregação plaquetária	<i>TSPAN32, GNAS (-)</i>

(+): hiperexpressão; (-): hipoexpressos

A análise de redes gênicas mostrou associação de genes relacionados ao movimento celular e morfologia tecidual, dos quais destacamos os genes *FOXO3* (*forkhead box O3*), *MEF2D* (*myocyte enhancer factor 2D*) e *MMP-12* (*matrix metalloproteinase 12*) (Figura 19)

Nos pacientes com *stent* com reestenose 21 transcritos apresentaram-se diferencialmente expressos (6 hiperexpressos e 15 hipoexpressos) em relação aos pacientes sem *stent* (grupo controle; Figura 20). Dentre os transcritos hiper e hipoexpressos, 6 e 14, respectivamente, apresentam funções descritas. Devido ao número reduzido de genes associados, não foi possível gerar redes gênicas para esta comparação. No entanto, a ontologia genética mostrou que dentre os hiperexpressos estavam genes relacionados à regulação negativa do metabolismo celular, regulação da tradução, resposta ao dano no DNA (transdução por mediadores da classe p53), regulação negativa de processos biológicos, proliferação celular, resposta celular ao dano no DNA, resposta celular ao estresse, transdução de sinal em resposta ao dano do DNA, entre outros. Dentre os hipoexpressos, estão genes associados ao desenvolvimento do sistema circulatório e desenvolvimento de vasos sanguíneos (Figura 21; Tabela 13).

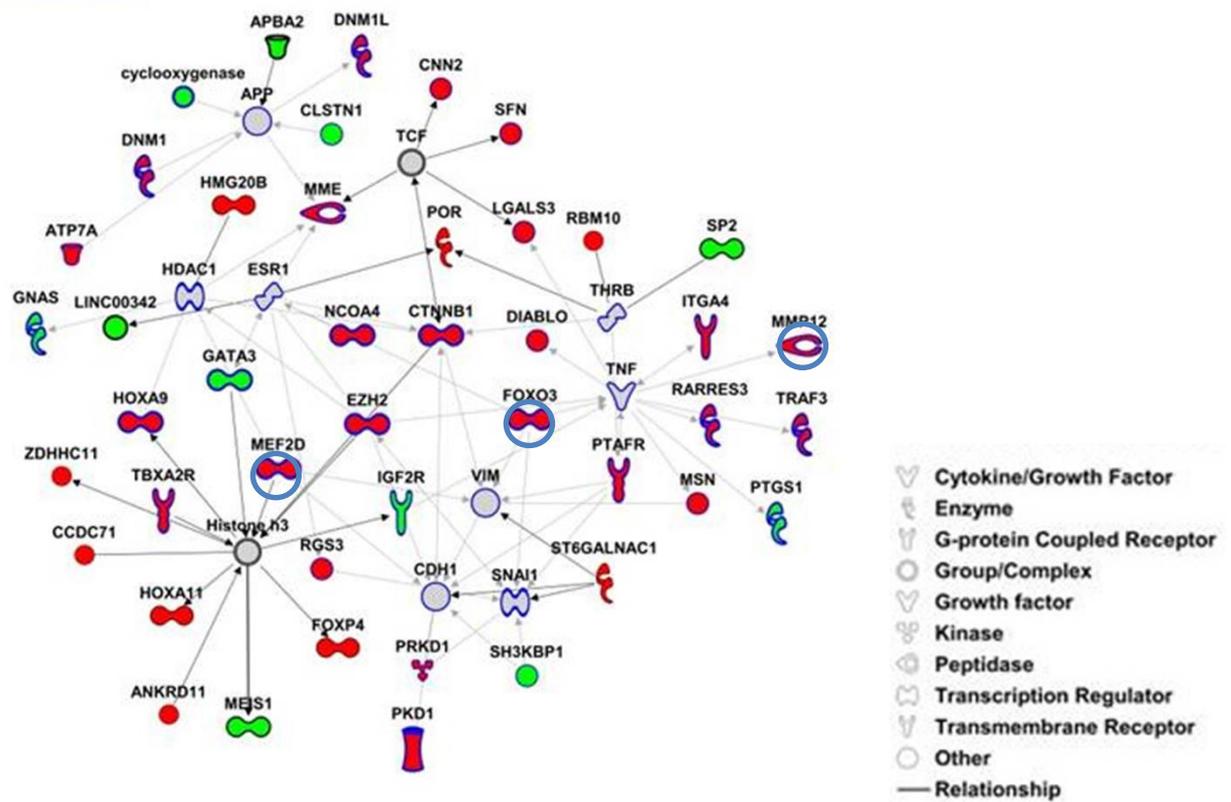


Figura19: Rede de interação de genes diferencialmente expressos em pacientes com *stent* sem reestenose em relação a pacientes sem *stent* (grupo controle). Vermelho - genes hiperexpressos; verde – genes hypoexpressos; em círculo azul estão destacados genes relacionados a movimento celular e morfologia tecidual.

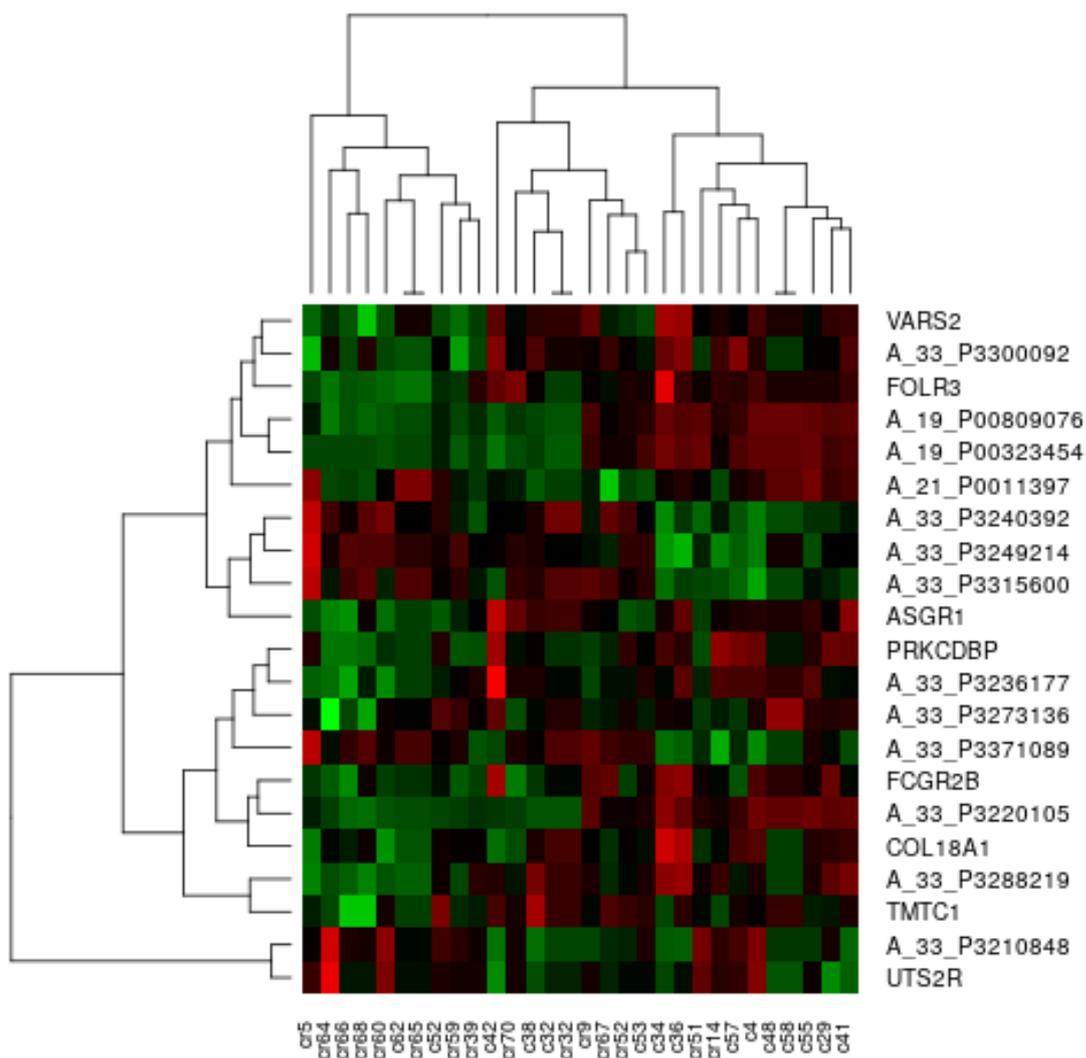


Figura 20. Agrupamentos hierárquicos obtidos pela análise de expressão gênica em células monoclulares do sangue periférico de pacientes do grupo controle (C) e do grupo com *stent* com reestenose (CR). Os números representam os códigos dos pacientes no estudo; vermelho indica hiperexpressão do gene; hypoexpressão; preto, ausência de modulação gênica; cinza, sem informação.

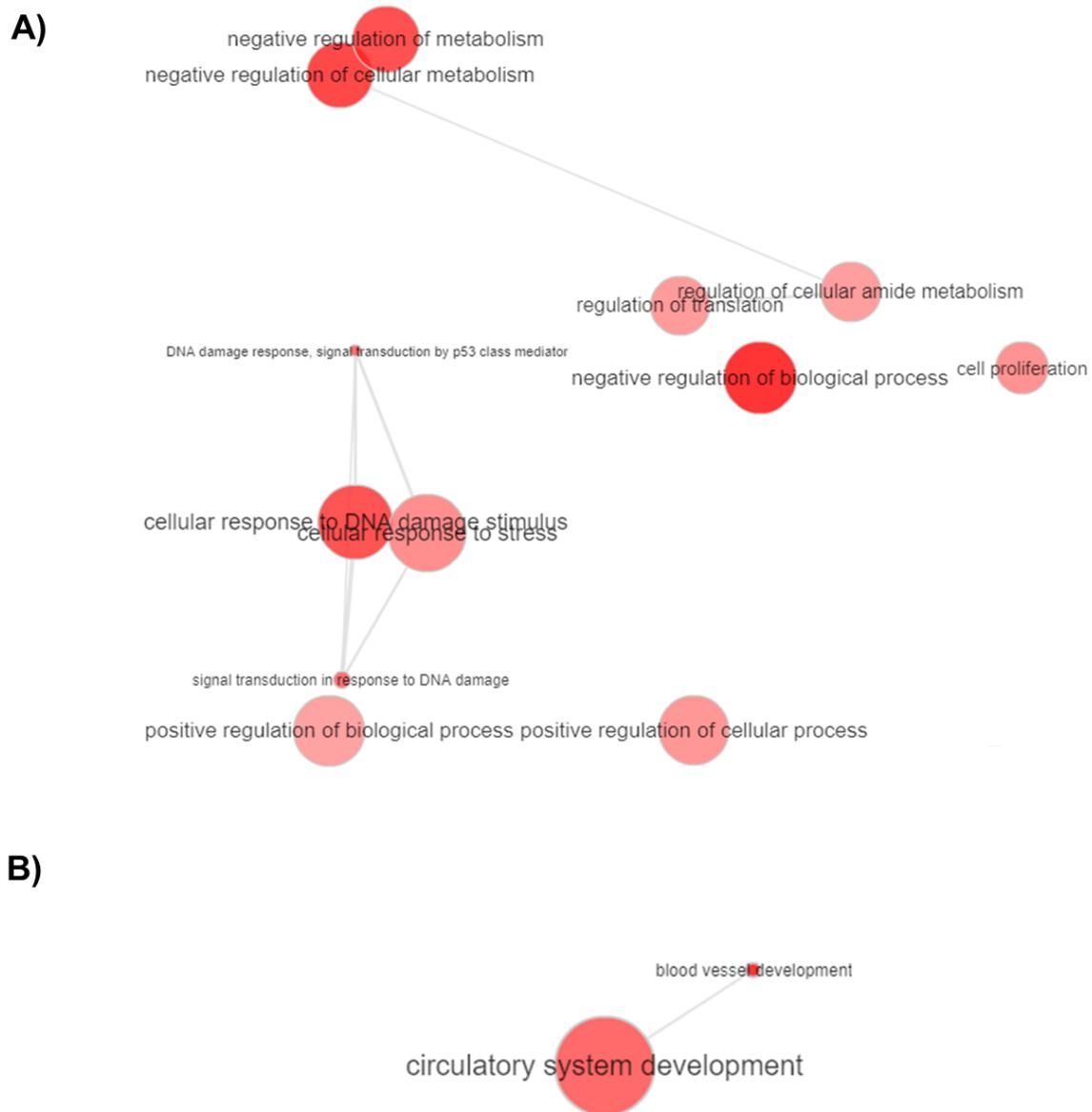


Figura 21. Redes de ontologia genética obtidas a partir dos genes hiper **(A)** e hipoexpressos **(B)** em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com stent coronariano com reestenose em relação a pacientes sem implante de stent (grupo controle).

Tabela 13. Genes diferencialmente expressos em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com *stent* coronariano com reestenose em relação a pacientes sem implante de *stent* (grupo controle)

PROCESSOS BIOLÓGICOS	GENES
Regulação negativa do metabolismo celular	<i>ELFN1, CNOT6L, YY1, FOXO3 (+)</i>
Regulação negativa do metabolismo	<i>ELFN1, CNOT6L, YY1, FOXO3 (+)</i>
Regulação do metabolismo celular de amido	<i>CNOT6L, FOXO3 (+)</i>
Regulação da tradução	<i>CNOT6L, FOXO3 (+)</i>
Resposta ao dano no DNA (transdução por mediadores da classe p53)	<i>CNOT6L, FOXO3 (+)</i>
Regulação negativa de processos biológicos	<i>ELFN1, CNOT6L, YY1, FOXO3, UTS2R (+)</i>
Proliferação celular	<i>CNOT6L, FOXO3, UTS2R (+)</i>
Resposta celular ao dano no DNA	<i>CNOT6L, YY1, FOXO3 (+)</i>
Resposta celular ao estresse	<i>CNOT6L, YY1, FOXO3 (+)</i>
Transdução de sinal em resposta ao dano do DNA	<i>CNOT6L, FOXO3 (+)</i>
Regulação positiva de processos biológicos	<i>CNOT6L, YY1, FOXO3, UTS2R (+)</i>
Regulação positiva de processos celulares	<i>CNOT6L, YY1, FOXO3, UTS2R (+)</i>
Desenvolvimento do sistema circulatório	<i>COL18A1, NDST1, ANG (-)</i>
Desenvolvimento de vasos sanguíneos	<i>COL18A1, NDST1, ANG (-)</i>

(+): hiperexpressão; (-): hipoexpressos

Os pacientes com *stent* com reestenose apresentaram 243 transcritos diferencialmente expressos (91 hiperexpressos e 152 hipoexpressos) em relação a aqueles sem reestenose *intra-stent* (Figura 22). Desses, 85 hiper e 132 hipoexpressos apresentam funções já descritas. A ontologia genética mostrou que os genes hiperexpressos estão especialmente relacionados ao reparo do DNA, transcrição da RNA polimerase II, diferenciação de células T α e β , transdução de sinal, processo catabólico do mRNA de histonas, coesão das cromátides irmãs na mitose, desubiquitinação da proteína K48-linked, resposta celular à IL-4, regulação da transcrição, produção de citocinas, regulação do metabolismo lipídico, divisão celular,

entre outros. Já os genes hipoexpressos estão relacionados à organização da matriz extracelular, migração de leucócitos, processo catabólico do colágeno, cicatrização de feridas, resposta ao lipopolisacarídeo, adesão célula-matriz, resposta inflamatória, degranulação de plaquetas, regulação positiva da angiogênese, proteólise, resposta ao glucocorticóide, regulação positiva da quimiotaxia de macrófagos, coagulação sanguínea, regulação positiva da apoptose de células endoteliais, regulação positiva da coagulação sanguínea, regulação negativa da adesão célula-matriz, , formação de plaquetas e regulação do processo apoptótico, entre outros (Figura 23, Tabela 14). A análise de redes gênicas demonstrou associação entre genes relacionados à função e desenvolvimento do sistema cardiovascular. Desses destacamos o *MMP-9*, *REL* (ou *C-REL*; *REL proto-oncogene, NF-kB subunit*) e *ATM* (*ATM serine/threonine kinase*) (Figura 24).

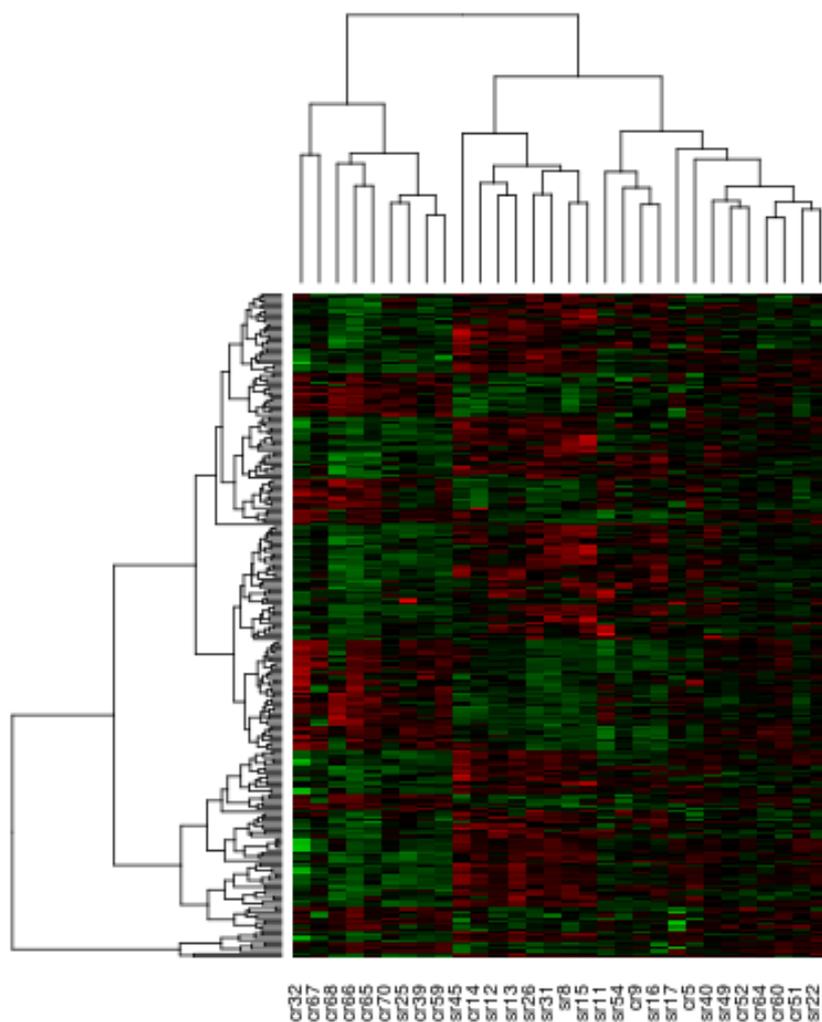
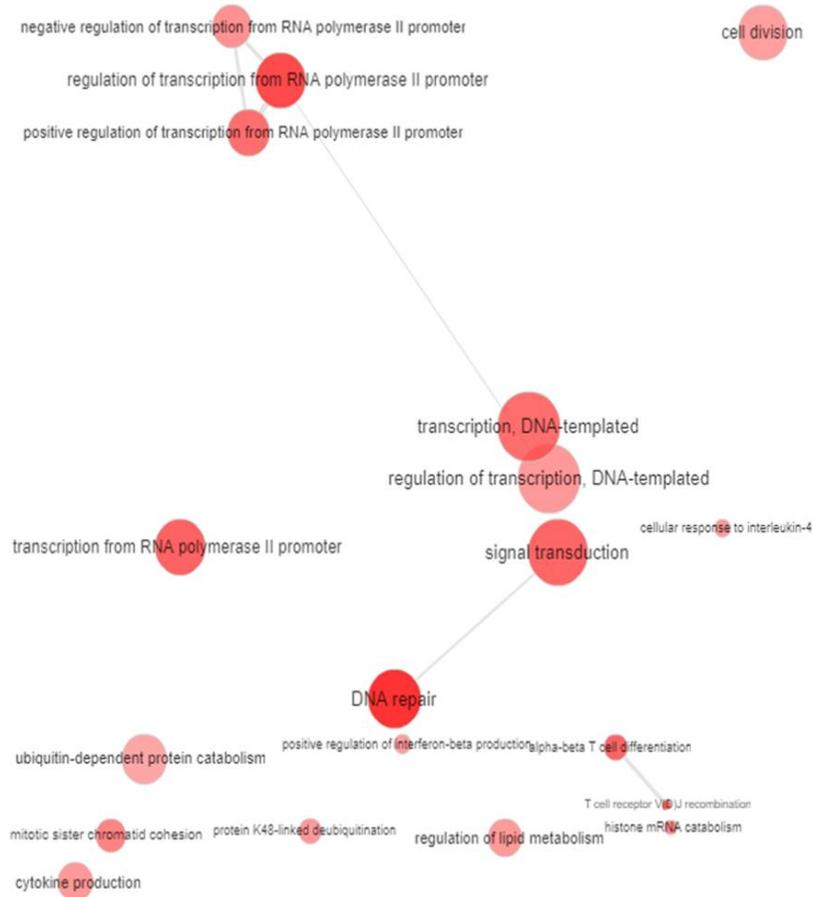


Figura 22. Agrupamentos hierárquicos obtidos pela análise de expressão gênica em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com *stent* sem reestenose (SR) e com *stent* com reestenose (CR). Os números representam os códigos dos pacientes no estudo; vermelho indica hiperexpressão do gene; hipoeexpressão; preto, ausência de modulação gênica; cinza, sem informação.

A)



B)

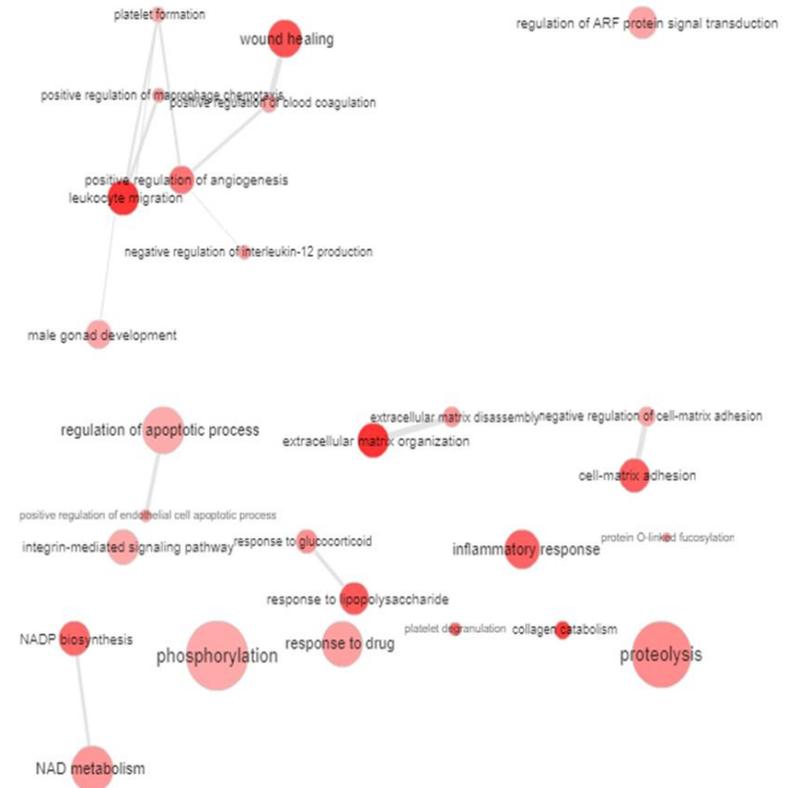


Figura 23. Redes de ontologia genética obtidas a partir dos genes hiper (A) e hipoexpressos (B) em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com *stent* coronariano com reestenose em relação a pacientes sem reestenose *intra-stent*.

Tabela 14. Genes diferencialmente expressos em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com *stent* coronariano com reestenose em relação a pacientes sem reestenose *intra-stent*

PROCESSOS BIOLÓGICOS	GENES
Reparo do DNA	<i>PDS5A, SMC3, ATM, RPS3, BOD1L1 (+)</i>
Regulação da transcrição do promotor da RNA polimerase II	<i>TSHZ2, TCF7, CREB1, ARID4B, HIRA, ZSCAN18 (+)</i>
Recombinação V (D) J do receptor de células T	<i>TCF7, BCL11B (+)</i>
Transcrição da RNA polimerase II	<i>BACH2, REL, BCL11B, CREB1, GATA3, NFAT5 (+)</i>
Diferenciação de células T α e β	<i>TCF7, BCL11B (+)</i>
Transdução de sinal	<i>MAVS, BCL11B, CREB1, GATA3, NFAT5, PRKCH, ITPKB, SMC3, ATM (+)</i>
Regulação positiva da transcrição do promotor da RNA polimerase II	<i>MAVS, REL, BCL11B, CREB1, GATA3, ARID4B, NFAT5, KAT6B (+)</i>
Regulação negativa da transcrição do promotor da RNA polimerase II	<i>TSHZ2, TCF7, ZBTB20, BACH2, REL, GATA3 (+)</i>
Transcrição	<i>TSHZ2, TCF7, ZBTB20, NR1D2, ARID4B, HIRA, SAP30L, ZSCAN18, KAT6B, ZNF587, RPS3, MYCBP2 (+)</i>
Processo catabólico de mrna de histonas	<i>ZCCHC11, ATM (+)</i>
Coesão das cromátides irmãs na mitose	<i>PDS5A, SMC3 (+)</i>
Desubiquitinação da proteína K48-linked	<i>OTUD4, USP34 (+)</i>
Resposta celular à IL-4	<i>TCF7, GATA3 (+)</i>
Regulação da transcrição	<i>NR1D2, CREB1, ARID4B, SAP30L, KAT6B, ZNF587, USP34, RPS3, MYCBP2 (+)</i>
Produção de citocinas	<i>ZCCHC11, NFAT5 (+)</i>
Regulação do metabolismo lipídico	<i>NR1D2, BCL11B(+)</i>
Regulação positiva da produção de INF- β	<i>MAVS, ZBTB20 (+)</i>
Divisão celular	<i>PDS5A, DYNLT3, SMC3, RPS3 (+)</i>
Catabolismo proteico dependente de ubiquitina	<i>USP34, USP24, TTC3 (+)</i>
Organização da matriz extracelular	<i>ATP7A, CSGALNACT1, COL18A1, ITGB2, ITGB3, THBS1 (-)</i>
Migração de leucócitos	<i>DOK2, MMP9, ITGB2, ITGB3, MMP1 (-)</i>
Processo catabólico do colágeno	<i>COL18A1, MMP9, MMP1, ADAM15 (-)</i>
Cicatrização de feridas	<i>CASP3, SDC1, CNN2, ITGB3 (-)</i>
Resposta ao lipopolisacarídeo	<i>CXCL1, TNFRSF10C, CASP3, ADM, JUNB (-)</i>
Adesão célula-matriz	<i>ITGB2, ITGB3, BCL2L11, ADAM15 (-)</i>
Resposta inflamatória	<i>CXCL1, TNFRSF10C, SDC1, TBXA2R, ITGB2, THBS1, PTAFR (-)</i>
Biossíntese de NADP	<i>NADK2, NADK (-)</i>
Degranulação de plaquetas	<i>F13A1, WDR1, ITGB3, THBS1 (-)</i>
Regulação positiva da angiogênese	<i>ADM, TBXA2R, ITGB2, THBS1 (-)</i>
Proteólise	<i>CASP3, MMP9, MME, PGA4, LTA4H, MMP1, ADAM15 (-)</i>
Resposta ao glucocorticóide	<i>CASP3, SDC1, ADM (-)</i>

(+):

Regulação positiva da quimiotaxia de macrófagos	<i>CMKLR1, THBS1 (-)</i>
Processo metabólico de NAD	<i>NADK2, NADK (-)</i>
“Desmontagem” da matriz extracelular	<i>MMP9, MMP1, ADAM15 (-)</i>
Fucosilação da proteína <i>O-linked</i>	<i>ADAMTS7, THBS1 (-)</i>
Regulação negativa da produção de IL-12	<i>CMKLR1, THBS1 (-)</i>
Coagulação sanguínea	<i>NFE2, ANXA8L1, F13A1, ITGB3 (-)</i>
Resposta a drogas	<i>COL18A1, CASP3, TBXA2R, THBS1, JUNB (-)</i>
Regulação positiva da apoptose de células endoteliais	<i>COL18A1, THBS1 (-)</i>
Regulação positiva da coagulação sanguínea	<i>TBXA2R, THBS1 (-)</i>
Regulação negativa da adesão célula-matriz	<i>THBS1, ADAM15 (-)</i>
Regulação da transdução de sinal da proteína ARF	<i>PSD, PSD4 (-)</i>
Desenvolvimento da gônada masculina	<i>NCOA4, BCL2L11, ADAM15 (-)</i>
Via de sinalização mediada por integrinas	<i>ITGB2, ITGB3, ADAM15 (-)</i>
Fosforilação	<i>NADK2, UCKL1, NADK (-)</i>
Formação de plaquetas	<i>CASP3, WDR1 (-)</i>
Regulação do processo apoptótico	<i>TNFRSF10C, RASSF5, CARD6, RBM10 (-)</i>

hiperexpressão; (-): hipoexpressos

5. DISCUSSÃO

Embora a angioplastia coronariana transluminal percutânea (ACTP) com implante de *stent* seja o principal procedimento para o tratamento da obstrução coronariana, a reestenose *intra-stent* continua sendo uma das principais limitações da técnica (Rosenfield et al. 2015; Hong et al. 2015). Assim sendo, este estudo buscou identificar marcadores genéticos que possam estar relacionados ao desenvolvimento da reestenose e que possam contribuir para novas estratégias de prevenção e tratamento.

Inicialmente, nossos dados mostraram que não houve diferença na proporção de homens e mulheres que, encaminhados para cinecoronariografia, não apresentavam obstrução coronariana significativa (<20%; grupo controle). No entanto, a prevalência de doença coronariana com necessidade de implante de *stent* foi maior em homens, assim como foi maior a incidência de reestenose *intra-stent* no gênero masculino. No Brasil, são raras as informações estatísticas sobre ACTP com implante de *stent*. Meireles et al. (2010) mostraram que, no período de 07/2006 a 12/2007, dos pacientes com doença coronariana multiarterial submetidos à revascularização completa com implante de *stent* havia predomínio do sexo masculino (68,1%), com média de idade de $59,7 \pm 9,9$ anos. Mais recentemente, Ataíde et al. (2015) reportaram que cerca de 70% dos pacientes submetidos a intervenção coronária percutânea com tratamento de dois ou mais vasos no período de 06/ 2012 a 06/2014 eram homens. Embora homens e mulheres compartilhem a maioria dos fatores de risco clássicos para doença coronariana, a significância e a

ponderação relativa desses fatores são diferentes (Maas & Appelman 2010). Em idades mais jovens (< 50 anos) fumar é mais deletério a mulheres do que a homens, assim como o risco relativo de hipercolesterolemia. Por desenvolverem doença cardiovascular 7 a 10 anos mais tarde do que os homens, o risco nas mulheres é muitas vezes subestimado devido à percepção errônea de que são "protegidas". No entanto, as doenças cardiovasculares ainda são a principal causa de morte em mulheres (Murray et al. 2014).

O tabagismo é um importante fator de risco associado ao desenvolvimento de doenças coronarianas (Benowitz & Burbank 2016). Foi observado que indivíduos tabagistas apresentam diminuição na síntese de colágeno, fato que pode enfraquecer a parede arterial, tornando-a mais suscetível à formação de aneurismas e à instabilidade das placas ateroscleróticas (Faarvang et al. 2016). De fato, há relatos que a taxa de reestenose após angioplastia é maior em tabagistas (Rodella et al. 2010; Shimosato et al. 2012). Embora nossos achados não evidenciem a relação direta entre tabagismo e reestenose, o grupo de indivíduos com reestenose *intra-stent* foi o único que apresentou número semelhante de não-fumantes, fumantes e ex-fumantes. Além disso, quando somados fumantes e ex-fumantes, tornou-se mais claro que o tabagismo é um importante fator de risco para doença coronariana. De forma complementar, nossos dados do perfil lipídico também confirmaram que concentrações aumentadas de colesterol total e triglicerídeos são eventos intimamente associados a doenças cardiovasculares.

A literatura científica mostra que os fatores de risco para doenças coronarianas, especialmente a estenose e a reestenose, estão associados a aumento da proliferação de células endoteliais, a ativação de macrófagos e de moléculas de adesão, a processos inflamatórios, peroxidação lipídica, liberação de

cálcio intracelular e a danos no citoesqueleto (Jongstra-Bilen et al. 2006; Allen & Bayraktutan 2009; Steven et al. 2015; Panth et al. 2016). Nossos dados mostraram que os pacientes com reestenose *intra-stent* apresentavam, também, aumento significativo de danos no DNA (quebras de fitas simples e dupla, sítios álcali-lábeis e lesões oxidativas em base púricas) de células mononucleares do sangue periférico. Tal achado é coerente com as demais ocorrências associadas às doenças coronarianas, uma vez que o estresse oxidativo e inflamatório, são considerados potentes mecanismos de genotoxicidade (Birben et al. 2012). Embora não existam outros estudos associando a reestenose a maiores níveis de danos na molécula de DNA, há inúmeras evidências que tais danos podem levar a instabilidade genômica e, conseqüentemente, alterar mecanismos relacionados à senescência, apoptose, autofagia e proliferação celular. No caso específico das células vasculares, essas alterações genéticas podem promover mudanças funcionais como diminuição da capacidade vasodilatadora, aumento da vasoconstrição, da pressão arterial e da rigidez vascular, além do aumento do risco para a aterosclerose (Bautista-Niño et al. 2016).

Diferentemente dos níveis de danos no DNA de células do sangue periférico ter se mostrado como potencial biomarcador da reestenose, no geral a concentração de citocinas plasmáticas não demonstrou relação com a doença coronariana, uma vez que foram detectadas apenas a IL-6 e IL-8, porém em número muito pequeno de pacientes, impossibilitando a análise estatística dos dados. Muito provavelmente, isto tenha ocorrido pela ação da estatina, tratamento utilizado por todos os pacientes do estudo. Farmacologicamente, as estatinas, além de propriedades hipolipemiantes (bloqueio da biossíntese do colesterol) e imunomoduladoras, possuem atividade anti-inflamatória (diminuição do estresse oxidativo pela redução dos níveis de

citocinas inflamatórias) que pode ter mascarado os resultados da concentração de citocinas circulantes (Waiczies et al. 2005; Cannon et al. 2006; Tousoulis et al. 2014).

O papel das citocinas na progressão da placa aterogênica e no processo de reestenose é indiscutível. Assim, no estudo dos polimorfismos gênicos possivelmente associados ao desenvolvimento da reestenose *intra-stent*, foi também incluído o gene *IL-6*. No entanto, da mesma forma do observado para os níveis plasmáticos das citocinas, não detectamos associação entre a variante *-174 rs1800795 G>C* do gene e o processo de reestenose. Todavia, últimos anos, vários pesquisadores relataram que o mesmo polimorfismo gênico estava relacionado a maior risco para o desenvolvimento de doenças coronarianas, embora a reestenose não estivesse entre elas (Wang et al. 2015; Buraczynska et al. 2015; Reichert et al. 2016).

Estudos de epidemiologia molecular mostram que, dentre os polimorfismos associados à reestenose estão especialmente aqueles de genes envolvidos em vias de apoptose, vasodilatação, agregação plaquetária, remodelamento da matriz celular, metabolismo lipídico, proliferação de células musculares e estresse oxidativo (Monraats et al. 2005; Monraats et al. 2006; Monraats et al. 2007). Aqui, além do *IL-6*, foram avaliados polimorfismos dos genes *MMP-2*, *MMP-3* e *MMP-9* (degradação de colágeno, elastina, proteoglicanas, laminina, fibronectina e de praticamente todos os componentes da matriz extracelular importantes para a rigidez arterial e remodelamento vascular), *CYP19A2* (metabolismo químico) e *NOS3* (vasodilatação, inibição da proliferação e migração das células musculares lisas, inibição da agregação plaquetária e da adesão dos glóbulos brancos à parede dos vasos sanguíneos). Dentre esses, apenas as variantes dos genes relacionados ao

remodelamento da matriz extracelular estavam associadas à obstrução coronária (*MMP-9* Arg279Gln e *MMP-9*-1562).

O gene *MMP-9* codifica uma metaloproteinase (*MMP-9* ou gelatinase B) com habilidade de degradar componentes da matriz extracelular, mais especificamente, os colágenos tipo IV e V. A *MMP-9* pode ser produzida por células mononucleares normais, granulócitos, células musculares lisas, células endoteliais vasculares e múltiplos outros tipos celulares. Foram identificadas 10 variantes de sequência no *MMP-9*, quatro das quais na região promotora, cinco na de codificação e uma na sequência 3' não traduzida (Zhang et al. 1999). Todas as variantes identificadas são substituições de base única, sendo a maioria decorrente da transição citidina-timidina. Três das cinco substituições na região de codificação do gene (*éxons* 1, 2 e 6) levam a mudanças nos códons e, conseqüentemente, nos aminoácidos. A variante Arg279Gln (rs17576, Arg279Gln) situa-se no exon 6 que codifica a sequência necessária para a ligação da enzima ao seu substrato. Neste caso, a transição adenina-guanina (CAG→CGG) leva a alteração no sítio de ligação ao substrato, interfere na atividade catalítica da enzima, mas não do nível plasmático da *MMP-9* (Blankenberg et al. 2003).

Assim como no presente estudo, o polimorfismo *Arg279Gln* foi também associado ao desenvolvimento de outras doenças em populações de diferentes países (Hu et al. 2005; Natividad et al. 2006; Srivastava et al. 2010; Maral et al. 2015). De especial interesse foi a relação existente entre este polimorfismo e o risco de pacientes com angina estável apresentarem eventos futuros. Os pesquisadores observaram que os portadores do alelo G (AG/GG) apresentavam maior risco de morte e infarto do miocárdio não fatal do que aqueles homozigotos para o alelo A (AA) (Blankenberg et al. 2003). Segundo Natividad et al. (2006), a substituição da

arginina (A) pela glutamina (G) pode afetar as propriedades da MMP-9 com impacto funcional no processo de remodelação da matriz extracelular.

Diferentemente do *MMP-9 Arg279Gln*, o polimorfismo *MMP-9 1562C>T* localizado na região promotora leva a alteração na expressão do gene. Foi demonstrado que o sítio polimórfico é importante elemento regulador, sendo local de ligação para uma proteína repressora da transcrição. Com a transição citidina-timidina essa interação DNA-proteína é abolida e a atividade do promotor aumenta cerca de 1,5 vez. Assim, o genótipo homocigoto C/C e os genótipos com o alelo T (C/T, T/T) apresentam, respectivamente, baixa e alta atividade da região promotora do gene MMP-9 (Zhang et al. 1999). De fato, foram observados níveis mais elevados da MMP-9 no soro de pacientes com aterosclerose coronariana (Spurthi et al. 2012) e associação entre os níveis de MMP-9 circulante e eventos cardiovasculares e mortalidade (Blankenberg et al. 2003; Weiss et al. 2010).

Outros estudos também relacionaram a variante *1562C>T* a doenças cardiovasculares, incluindo a aterosclerose coronariana e síndrome coronária aguda (Qin et al. 2005; Abilleira et al. 2006; Saedi et al. 2012; Opstad et al. 2013; Opstad et al. 2014). Recentemente, estudo de meta-análise mostrou que o polimorfismo *MMP9 C-1562T* é um fator de risco associado à maior susceptibilidade para o infarto do miocárdio, especialmente em populações de origem europeia, uma vez que não foi observada tal associação em populações asiáticas. No entanto, os autores chamaram a atenção para a necessidade de aumentar o tamanho amostral e para a avaliação da interação genes/ambiente (Juan et al. 2015). Realmente, em outro estudo de meta-análise, incluindo apenas indivíduos de origem chinesa (5468 indivíduos a partir de 10 diferentes estudos), Li et al. (2016) mostraram que nessa

população o polimorfismo *MMP-9-1562C>T* também estava associado a doença arterial coronariana.

Outro importante achado sobre os polimorfismos do gene *MMP-9* foi a influência sobre a rigidez arterial (fator determinante do risco cardiovascular) e sobre a atividade da elastase, enzima que degrada a elastina, principal componente elástico da parede arterial. Segundo Yasmin et al. (2006), variações genéticas na proteína *MMP-9* podem ter efeitos sobre o *turnover* das proteínas da matriz na parede das artérias e tanto o alelo G como o T dos polimorfismos *MMP-9 Arg279Gln* e *MMP-9-1562C>T*, respectivamente, estariam relacionados à rigidez aórtica e ao aumento do risco de hipertensão arterial, devido a maior degradação da matriz da parede por conta do aumento da atividade/expressão enzimática da elastase.

Nossos resultados sobre a relação entre os polimorfismos do gene *MMP-9* e a reestenose estão de acordo com diversos estudos que mostram que a metaloproteinase-9 representa umas das principais enzimas envolvidas no processo de reestenose *intra-stent* (Ge et al. 2006; Jones et al. 2009; Katsaros et al. 2010; Tarr et al. 2013). O processo inflamatório causado pela intervenção coronariana pode levar à desnudação endotelial, ruptura da placa aterosclerótica e lesão da parede arterial, com a liberação de citocinas, fatores quimiotáticos, além da *MMP-9* (Katsaros et al. 2010; Liu et al. 2013; Yabluchanskiy et al. 2013). No entanto, embora existam relatos sobre o aumento dos níveis séricos e plasmáticos da *MMP-9* associados ao processo de reestenose, nossos achados evidenciaram menor expressão do gene *MMP-9* nos pacientes com reestenose. Um dos fatores que pode ter contribuído para tal discordância é o fato da maioria desses estudos ter determinado as concentrações séricas ou plasmáticas da *MMP-9* pouco tempo após a angioplastia (de 24h a duas semanas) (Ge et al. 2006; Katsaros et al. 2010; Liu et

al. 2013), enquanto em nosso delineamento experimental a expressão do gene foi avaliada no mínimo 6 meses após o implante do *stent*. Outro fator que pode ter contribuído para a menor expressão do *MMP-9* seria o uso do medicamento clopidogrel, utilizado durante e após a angioplastia, que, por seu efeito antagonista ao receptor plaquetário P2Y12, teria diminuído a expressão plaquetária de CD40 e, conseqüentemente, da produção da *MMP-9* (Graff et al. 2005). É interessante destacar que, em nosso estudo, 73,3% dos pacientes com reestenose haviam utilizado continuamente o clopidogrel, contra apenas 40% daqueles sem reestenose. Embora Tarr et al. (2013) tenham observado que o aumento dos níveis plasmáticos da *MMP-9* em sua forma ativa (após três meses do implante do *stent*) estivesse independentemente associado ao processo de reestenose em pacientes tratados com clopidogrel, os níveis plasmáticos da proteína retornaram aos níveis basais após seis meses, não diferindo dos pacientes do grupo controle.

Além do *MMP-9*, outros 243 genes apresentaram-se diferencialmente expressos e parecem ter relação com vias envolvidas no processo de reestenose. Dentre elas, as que apresentaram maior número de genes modulados foram as relacionadas à organização da matriz extracelular, à migração de leucócitos, ao processo catabólico do colágeno, à produção de citocinas, à transcrição da RNA polimerase II, à formação de plaquetas e ao reparo do DNA, e pelo menos quatro dos genes diferencialmente expressos foram comuns a todas essas vias. O *NFAT5* (*nuclear factor of activated T-cells 5*), que apresentou-se hiperexpresso nos pacientes com reestenose, codifica proteína pertencente à família dos fatores de transcrição NFAT e está associado à síntese de citocinas e receptores imunológicos, podendo, portanto, atuar na modulação da resposta e ativação das células imunológicas frente a estímulos estressores (Alberdi et al. 2017). Estudos *in vitro*

mostraram que a inibição de NFAT diminui a migração, motilidade e proliferação das células musculares lisas por alterar mecanismos relacionados ao metabolismo do Ca^{++} e de proliferação mediada pela PDGF-BB (*platelet-derived growth factor-BB*), podendo, portanto, estar envolvidos na patogenia da reestenose (Yu et al. 2006; Bobe et al. 2011; Kudryavtseva et al. 2013).

Outro dos genes que se apresentou hiperexpresso em pacientes com reestenose, que atua em várias vias e que pode ter relação com o processo foi o *C-REL (REL proto-oncogene, NF- κ B subunit)*. As proteínas Rel ou fator nuclear kappa B (NF- κ B) são constituídas por um grupo de fatores de transcrição estruturalmente relacionados que incluem cinco proteínas NF- κ B nos mamíferos (RelA/NF- κ B-p65, RelB, c-Rel, NF-B1/NF- κ B-p105 e NF-B2/NF- κ B-p100) (Hu et al. 2015). Sabe-se que a lesão vascular leva a ativação das proteínas NF κ B e a consequente indução da proliferação de células musculares lisas com alteração de seu estado contrátil para um fenótipo “sintetizador” com características semelhantes a dos fibroblastos, e a expressão de moléculas inflamatórias como TNF- α , IL-1, M-CSF (*macrophage-colony stimulating factor*), GM-CSF (*granulocyte macrophage-colony stimulating factor*) e MCP-1 (Bonomini et al. 2015). Recentemente foi demonstrado em modelo animal que inibidor da ativação do complexo-quinase I κ B inibia, também, a ativação de NF κ B reduzindo a formação da neointima após lesão promovida pela angioplastia, demonstrando o possível papel das proteínas NF κ B no processo de reestenose (Grassia et al. 2010).

Além dos dois genes citados anteriormente, o *ATM (ATM serine/threonine kinase)* também estava hiperexpresso nas células mononucleares do sangue periférico dos pacientes com reestenose. O gene *ATM* codifica uma Ser/Thr proteínoquinase, membro da família PIKK (*phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-related protein*

kinase) (Lavin 2008). Uma de suas funções mais estudadas é a resposta ao dano no DNA. De modo geral, após a ocorrência de quebras de fita dupla, a ATM é rapidamente ativada por autofosforilação na Ser1981 e fosforila diversos substratos envolvidos na replicação do DNA, reparo, controle dos *checkpoints* do ciclo celular e apoptose (Shah & Mahmoudi, 2013). Portanto, a hiperexpressão do *ATM* poderia estar relacionada ao aumento de quebras de fita simples e dupla e de lesões oxidativas no DNA, que observamos nos pacientes com reestenose. Recentemente, Semlitsch et al. (2015) demonstraram em estudo *in vitro* que o LDL (*Low Density Lipoproteins*) oxidado induziu aumento da expressão de ATM em células endoteliais e fibroblastos não transformados. Por outro lado, em fibroblastos deficientes em ATM, o LDL oxidado foi citotóxico e induziu aumento de danos no DNA (quebras de fita e micronúcleos) provavelmente devido à ação das espécies reativas de oxigênio. Sendo assim, a ativação do gene *ATM* pode representar uma resposta adaptativa importante para que a viabilidade celular seja mantida nos locais de inflamação vascular e aterosclerose (Semlitsch et al. 2011).

É importante destacar que nossos dados do transcriptoma de células mononucleares de sangue periférico, além de apontar diferenças entre pacientes com e sem reestenose *intra-stent*, mostraram que, em relação aos pacientes sem implante de *stent* (com obstrução coronárias > 20%; grupo controle) aqueles com reestenose apresentaram menor número de transcritos diferencialmente expressos e, conseqüentemente, de processos biológicos alterados do que os pacientes sem reestenose em relação ao mesmo grupo controle. No entanto, alguns aspectos devem ser considerados nesta abordagem. Inicialmente, deve ser lembrado que mesmo sem a necessidade do implante de *stent*, os pacientes do grupo controle apresentavam sinais clínicos indicativos para a realização da cinecoronariografia,

além de alterações bioquímicas e hemodinâmicas (dislipidemia, hipertensão). Por outro lado, sabe-se que o implante de *stent per se* pode promover, em todos os pacientes, lesão endotelial com consequente resposta inflamatória local e aumento da proliferação celular e que alguns pacientes apresentam resposta exacerbada à lesão, com consequente formação da camada neointima e diminuição do lúmen arterial (reestenose) (Osborn & Jaffer 2015; Mizuno & Mizuno-Horikawa 2016; Partida & Yeh 2016). Assim, as diferenças entre os pacientes com *stent* (com ou sem reestenose) e os do grupo controle devem ser cuidadosamente analisadas.

Portanto, com base nas premissas de que os pacientes sem implante de *stent* não eram indivíduos “saudáveis”, e que a lesão endotelial/inflamação/ proliferação celular são respostas fisiológicas à angioplastia, pode-se supor que o organismo teria que alterar maior número de vias e processos biológicos para impedir a ocorrência da reestenose. Assim, seria de se esperar que os pacientes com reestenose apresentassem menos vias e processos biológicos alterados do que os sem reestenose em relação aos pacientes sem implante de *stent* (grupo controle).

Dentre os processos biológicos alterados nos pacientes com reestenose em comparação aos sem implante de *stent* merecem destaque aqueles relacionados à proliferação celular e à resposta ao dano no DNA. Nesse sentido, a hiperexpressão do gene *UTS2R* (*urotensin 2 receptor*) chamou a atenção, uma vez que foi demonstrado *in vivo*, que antagonistas do UTRS2 diminuem o acúmulo de macrófagos nas placas de ateroma da carótida, devido à diminuição da quimiocina MCP-1 (*macrophage chemoattractant protein 1*), levando à diminuição significativa do processo aterosclerótico (Watson et al. 2013). A hiperexpressão de *YY* (*Yin Yang 1 transcription factor*) e *FOXO3* (*forkhead box O3*) também podem ser vistas como eventos relevantes. Foi demonstrado, por exemplo, que o fator de transcrição *YY1*

apresenta sítios de homologia para o promotor do *micro-RNA29a*, o qual está associado ao aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias e captação de lipídeos pelos macrófagos (Jian et al. 2017). No caso do *FOXO3*, foi observado *in vivo* que sua ativação por *AMPK α 1* promove a diferenciação de monócitos em macrófagos por meio do aumento da expressão de genes relacionados à autofagia, levando ao desenvolvimento da aterosclerose (Zhang et al. 2017).

No caso dos pacientes com implante de *stent* sem reestenose em relação aos sem implante de *stent*, estavam alterados genes especialmente relacionados à resposta celular ao lipossacarídeo, transcrição gênica e regulação positiva da transcrição do promotor da RNA polimerase II (*HSF1*, *FOXO3*, *MEF2D*, *EZH1* e *HIF3A*). Estudo *in vitro* revelou aumento da proliferação celular, produção de colágeno e secreção de fatores inflamatórios em fibroblastos humanos derivados da carótida após estes serem submetidos a estiramento mecânico que mimetizava aquele promovido pela angioplastia (Li et al. 2013). Segundo os autores esses aumentos ocorreram provavelmente devido a hiperexpressão da proteína HSF1. Dando sustentação aos nossos achados, havia sido previamente relatado que leucócitos provenientes de pacientes que sofreram acidente vascular cerebral isquêmico também apresentavam aumento da expressão de genes associados à hipóxia, dentre os quais o *HIF3A* (Yan et al. 2014).

Embora ainda exista a necessidade da validação (por PCR em tempo real) dos genes que se apresentaram diferencialmente expressos no presente estudo, nossos dados indicam que principalmente aqueles relacionados à ativação do sistema imunológico, à resposta inflamatória e à proliferação podem representar potenciais marcadores moleculares para a detecção precoce da ocorrência da

reestenose *intra-stent* e como alvos pra novas estratégias de prevenção deste fator limitante da angioplastia com implante de *stent*.

É inquestionável a crescente sofisticação do *design* dos *stents*, especialmente dos que combinam suporte mecânico com a administração local de fármacos à parede vascular, os quais têm resultado em grande progresso no tratamento da doença arterial coronariana e periférica. No entanto, o avanço da genômica permitiu que nas últimas duas décadas nova geração de *stent* fosse desenvolvida e entrasse na fase de estudo pré-clínico: são os *stents* eluidos com vetores gênicos capazes de tratar lesões não oclusivas e, com isso, retardar o processo aterosclerótico (Fishbein et al. 2016). Assim sendo, neste momento as pesquisas estão sendo especialmente direcionadas à identificação dos genes mais eficazes, à efetiva e segura hiperexpressão de transgenes nas artérias com *stent*, bem como à escolha dos vetores gênicos mais adequados. Portanto, acreditamos que os resultados deste estudo poderão fornecer informações importantes para o desenvolvimento desta nova estratégia de tratamento das doenças coronarianas obstrutivas.

6. CONCLUSÕES

Diante dos objetivos colocados, este estudo trouxe as seguintes conclusões:

- Pacientes com implante de stent apresentaram maior frequência do genótipo GG e do alelo G do polimorfismo *MMP-9 Arg279Gln (G>A)* e do genótipo CC do *MMP-9 (-1562 C>T)* podendo este estar relacionado a maior risco de doença coronariana;
- A avaliação dos níveis de citocinas inflamatórias não é considerada um bom marcador para a reestenose;
- Pacientes com reestenose *intra-stent* apresentam maiores níveis de danos no DNA de células mononucleares do sangue periférico do que aqueles sem reestenose;
- Pacientes com reestenose apresentam transcriptoma de células mononucleares do sangue periférico diferente daqueles sem reestenose;
- Pacientes com implante de *stent*, com ou sem reestenose, apresentam transcriptoma de células mononucleares do sangue periférico diferente daqueles com obstrução coronariana < 20%;
- Pacientes com reestenose apresentam transcriptoma mais próximo ao dos com obstrução coronariana < 20% que os sem reestenose.
- Hiperexpressão do gene *c-REL* pode estar relacionada ao processo de reestenose *intra-stent*

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abilleira S, Bevan S, Markus HS. 2006. The role of genetic variants of matrix metalloproteinases in coronary and carotid atherosclerosis. *J Med Genet.* 43:897–901.
- Abraham NS. 2011. Prescribing proton pump inhibitor and clopidogrel together: current state of recommendations. *Curr Opin Gastroenterol.* 27:558–564.
- Alberdi M, Iglesias M, Tejedor S, Merino R, López-Rodríguez C, Aramburu J. 2017. Context-dependent regulation of Th17-associated genes and IFN γ expression by the transcription factor NFAT5. *Immunol Cell Biol.* 95:56–67.
- Alfonso F, Fernandez C. 2011. Second-Generation Drug-Eluting Stents. *J Am Coll Cardiol.* 58:26–29.
- Allen CL, Bayraktutan U. 2009. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. *Int J Stroke Off J Int Stroke Soc.* 4:461–470.
- Amato B, Compagna R, Amato M, Grande R, Butrico L, Rossi A, Naso A, Ruggiero M, de Franciscis S, Serra R. 2015. Adult Vascular Wall Resident Multipotent Vascular Stem Cells, Matrix Metalloproteinases, and Arterial Aneurysms. *Stem Cells Int.* 2015:1–16.
- Araújo PV, Ribeiro MS, Dalio MB, Rocha LA, Viaro F, Joviliano RD, Piccinato CE, Évora PRB, Joviliano EE. 2015. Interleukins and Inflammatory Markers in In-Stent Restenosis after Femoral Percutaneous Transluminal Angioplasty. *Ann Vasc Surg.* 29:731–737.
- Armstrong C, Abilleira S, Sitzer M, Markus HS, Bevan S. 2007. Polymorphisms in MMP Family and TIMP Genes and Carotid Artery Intima-Media Thickness. *Stroke.* 38:2895–2899.
- Arora S, Taneja I, Challagundla M, Raju KSR, Singh SP, Wahajuddin M. 2015. In vivo prediction of CYP-mediated metabolic interaction potential of formononetin and biochanin A using in vitro human and rat CYP450 inhibition data. *Toxicol Lett.* 239:1–8.
- Ashley EA, Ferrara R, King JY, Vailaya A, Kuchinsky A, He X, Byers B, Gerckens U, Oblin S, Tsalenko A, et al. 2006. Network Analysis of Human In-Stent Restenosis. *Circulation.* 114:2644–2654.
- Ataíde A de MM, Tanajura LFL, Abizaid AAC, Centemero MP, Costa JR, Loures VA, Abizaid ACL, Braga SLN, Sousa AGMR, Sousa JEMR. 2015. Predisposing factors for incomplete angiographic revascularization in patients with multivessel percutaneous coronary intervention. *Rev Bras Cardiol Invasiva.* 23:201–206.
- Bagyura Z, Kiss L, Hirschberg K, Berta B, Széplaki G, Lux Á, Szelid Z, Soós P, Merkely B. 2017. Association between VEGF Gene Polymorphisms and In-Stent Restenosis after Coronary Intervention Treated with Bare Metal Stent. *Dis Markers.* 2017:1–7.
- Bangalore S, Toklu B, Amoroso N, Fusaro M, Kumar S, Hannan EL, Faxon DP, Feit F. 2013. Bare metal stents, durable polymer drug eluting stents, and biodegradable polymer drug eluting stents for coronary artery disease: mixed treatment comparison meta-analysis. *BMJ.* 347:1–20.
- Bautista-Niño P, Portilla-Fernandez E, Vaughan D, Danser A, Roks A. 2016. DNA Damage: A Main Determinant of Vascular Aging. *Int J Mol Sci.* 17:748.
- Benowitz NL, Burbank AD. 2016. Cardiovascular toxicity of nicotine: Implications for electronic cigarette use. *Trends Cardiovasc Med.* 26:515–523.
- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 5:9–19.
- Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, Meyer J, Cambien F, Tiret L. 2003. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation.* 107:1579–1585.
- Bliden KP, DiChiara J, Tantry US, Bassi AK, Chaganti SK, Gurbel PA. 2007. Increased Risk in Patients With High Platelet Aggregation Receiving Chronic Clopidogrel Therapy Undergoing Percutaneous Coronary Intervention. *J Am Coll Cardiol.* 49:657–666.

- Bobe R, Hadri L, Lopez JJ, Sassi Y, Atassi F, Karakikes I, Liang L, Limon I, Lompré A-M, Hatem SN, et al. 2011. SERCA2a controls the mode of agonist-induced intracellular Ca²⁺ signal, transcription factor NFAT and proliferation in human vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol.* 50:621–633.
- Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. 2003. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics.* 19:185–193.
- Bonomini F, Favero G, Rezzani R. 2015. NF- κ B — A Key Factor in Atherogenesis and Atheroprogession. In: Božič-Mijovski M, editor. *Thromb Atheroscler Atherothrombosis - New Insights Exp Protoc.* InTech.
- Borghaei RC, Gorski G, Seutter S, Chun J, Khaselov N, Scianni S. 2016. Zinc-binding protein-89 (ZBP-89) cooperates with NF- κ B to regulate expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in response to inflammatory cytokines. *Biochem Biophys Res Commun.* 471:503–509.
- Brasil. 2014. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Datasus. Sistema de informações de mortalidade. Óbitos por residência por ano do óbito segundo capítulo CID-10. [cited 2017 Aug 4]. Available from: <http://datasus.saude.gov.br/>
- Buckley ML, Ramji DP. 2015. The influence of dysfunctional signaling and lipid homeostasis in mediating the inflammatory responses during atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis.* 1852:1498–1510.
- Buraczynska K, Kurzepa J, Ksiazek A, Buraczynska M, Rejdak K. 2015. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) Gene Polymorphism in Stroke Patients. *NeuroMolecular Med.* 17:385–390.
- Cannon CP, Steinberg BA, Murphy SA, Mega JL, Braunwald E. 2006. Meta-analysis of cardiovascular outcomes trials comparing intensive versus moderate statin therapy. *J Am Coll Cardiol.* 48:438–445.
- Capodanno D, Ferreiro JL, Angiolillo DJ. 2013. Antiplatelet therapy: new pharmacological agents and changing paradigms. *J Thromb Haemost JTH.* 11:316–329.
- Chen K, Chen QJ, Wang LJ, Liu ZH, Zhang Q, Yang K, Wang HB, Yan XX, Zhu ZB, Du R, et al. 2016. Increment of HFABP Level in Coronary Artery In-Stent Restenosis Segments in Diabetic and Nondiabetic Minipigs: HFABP Overexpression Promotes Multiple Pathway-Related Inflammation, Growth and Migration in Human Vascular Smooth Muscle Cells. *J Vasc Res.* 53:27–38.
- Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. 2015. Contribution of neovascularization and intraplaque haemorrhage to atherosclerotic plaque progression and instability. *Acta Physiol.* 213:539–553.
- Collins A, Koppen G, Valdiglesias V, Dusinska M, Kruszewski M, Møller P, Rojas E, Dhawan A, Benzie I, Coskun E, et al. 2014. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: The ComNet Project. *Mutat Res.* 759:27–39.
- Curcio A, Torella D, Indolfi C. 2011. Mechanisms of Smooth Muscle Cell Proliferation and Endothelial Regeneration After Vascular Injury and Stenting. *Circ J.* 75:1287–1296.
- Cutlip DE, Windecker S, Mehran R, Boam A, Cohen DJ, van Es G-A, Steg PG, Morel M, Mauri L, Vranckx P, et al. 2007. Clinical end points in coronary stent trials: a case for standardized definitions. *Circulation.* 115:2344–2351.
- Dake MD, Ansel GM, Jaff MR, Ohki T, Saxon RR, Smouse HB, Zeller T, Roubin GS, Burket MW, Khatib Y, et al. 2011. Paclitaxel-eluting stents show superiority to balloon angioplasty and bare metal stents in femoropopliteal disease: twelve-month Zilver PTX randomized study results. *Circ Cardiovasc Interv.* 4:495–504.
- DeCoux A, Lindsey ML, Villarreal F, Garcia RA, Schulz R. 2014. Myocardial matrix metalloproteinase-2: inside out and upside down. *J Mol Cell Cardiol.* 77:64–72.
- Dennis G, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki RA. 2003. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol.* 4:R60.
- Diederichs S, Bartsch L, Berkmann JC, Fröse K, Heitmann J, Hoppe C, Iggena D, Jazmati D, Karschnia P, Linsenmeier M, et al. 2016. The dark matter of the cancer genome: aberrations in regulatory elements, untranslated regions, splice sites, non-coding RNA and synonymous mutations. *EMBO Mol Med.* 8:442–457.

- Dotter CT, Judkins MP. 1964. Transluminal Treatment of Arteriosclerotic Obstruction: Description of a New Technic and a Preliminary Report of Its Application. *Circulation*. 30:654–670.
- El-Aziz TAA, Mohamed RH. 2016. Matrix Metalloproteinase 3 Gene Polymorphism and Its Level Predict Morbidity After Acute Myocardial Infarction. *Am J Clin Pathol*. 145:134–139.
- Faarvang A-SA, Rørdam Preil SA, Nielsen PS, Beck HC, Kristensen LP, Rasmussen LM. 2016. Smoking is associated with lower amounts of arterial type I collagen and decorin. *Atherosclerosis*. 247:201–206.
- Favre S, Kroemer G, Raymond E. 2006. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov*. 5:671–688.
- Falotico R, Narayanan P. 2016. Local vascular delivery of sirolimus to prevent restenosis following vascular injury. U.S. Patent No. 9,265,598. [cited 2017 Aug 4]. Available from: <http://www.google.ch/patents/US9265598>
- Feng Y, Yang JH, Huang H, Kennedy SP, Turi TG, Thompson JF, Libby P, Lee RT. 1999. Transcriptional profile of mechanically induced genes in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 85:1118–1123.
- Ferguson AD, Dokainish H, Lakkis N. 2008. Aspirin and clopidogrel response variability: review of the published literature. *Tex Heart Inst J*. 35:313–320.
- Ferrari MM, Rossi G, Biondi ML, Viganò P, Dell'utri C, Meschia M. 2012. Type I collagen and matrix metalloproteinase 1, 3 and 9 gene polymorphisms in the predisposition to pelvic organ prolapse. *Arch Gynecol Obstet*. 285:1581–1586.
- Fingleton B. 2017. Matrix metalloproteinases as regulators of inflammatory processes. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. In press.
- Fishbein I, Alferiev IS, Chorny M, Levy RJ. 2016. Gene Delivery from Stents for Prevention of In-Stent Restenosis. *Eur Med J*. 1:106–113.
- Fokkema SJ, Loos BG, De slegte C, Burger W, Piscaer M, Ijzerman Y, Van der velden U. 2003. Increased release of IL-12p70 by monocytes after periodontal therapy. *J Clin Periodontol*. 30:1091–1096.
- Forte A, Corte AD, Grossi M, Bancone C, Provenzano R, Finicelli M, Feo MD, Santo LSD, Nappi G, Cotrufo M, et al. 2013. Early cell changes and TGF β pathway alterations in the aortopathy associated with bicuspid aortic valve stenosis. *Clin Sci*. 124:97–108.
- Gada H, Kirtane AJ, Newman W, Sanz M, Hermiller JB, Mahaffey KW, Cutlip DE, Sudhir K, Hou L, Koo K, Stone GW. 2013. 5-Year Results of a Randomized Comparison of XIENCE V Everolimus-Eluting and TAXUS Paclitaxel-Eluting Stents. *JACC Cardiovasc Interv*. 6:1263–1266.
- Galis ZS, Khatri JJ. 2002. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res*. 90:251–262.
- Gallo R, Padurean A, Jayaraman T, Marx S, Roque M, Adelman S, Chesebro J, Fallon J, Fuster V, Marks A, Badimon JJ. 1999. Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulators of the cell cycle. *Circulation*. 99:2164–2170.
- Ganesh SK, Joo J, Skelding K, Mehta L, Zheng G, O'Neill K, Billings EM, Helgadottir A, Andersen K, Thorgeirsson G, et al. 2011. Time course analysis of gene expression identifies multiple genes with differential expression in patients with in-stent restenosis. *BMC Med Genomics*. 4:20.
- Ganesh SK, Skelding KA, Mehta L, O'Neill K, Joo J, Zheng G, Goldstein J, Simari R, Billings E, Geller NL, et al. 2004. Rationale and study design of the CardioGene Study: genomics of in-stent restenosis. *Pharmacogenomics*. 5:952–1004.
- Garcia-echeverria C, Maira SM. Combination of a phosphatidylinositol-3-kinase (pi3k) inhibitor and a mtor inhibitor. U.S. Patent No. 20,160,136,175. [cited 2017 Aug 4]. Available from: <http://www.google.com/patents/US20160136175>
- Garofalo R, Cesari E, Vinci E, Castagna A. 2011. Role of metalloproteinases in rotator cuff tear. *Sports Med Arthrosc Rev*. 19:207–212.

- Ge J, Shen C, Liang C, Chen L, Qian J, Chen H. 2006. Elevated matrix metalloproteinase expression after stent implantation is associated with restenosis. *Int J Cardiol.* 112:85–90.
- Glebauskiene B, Liutkeviciene R, Vilkeviciute A, Kriauciuniene L, Jakstiene S, Zlatkute E, Tamosiunas A, Zemaitiene R, Vaitkiene P, Zaliuniene D. 2017. Does MMP-9 Gene Polymorphism Play a Role in Pituitary Adenoma Development? *Dis Markers.* 2017:1–9.
- Gliesche DG, Hussner J, Witzigmann D, Porta F, Glatter T, Schmidt A, Huwyler J, Meyer Zu Schwabedissen HE. 2016. Secreted Matrix Metalloproteinase-9 of Proliferating Smooth Muscle Cells as a Trigger for Drug Release from Stent Surface Polymers in Coronary Arteries. *Mol Pharm.* 13:2290–2300.
- Gnasso A, Motti C, Irace C, Carallo C, Liberatoscioli L, Bernardini S, Massoud R, Mattioli PL, Federici G, Cortese C. 2000. Genetic variation in human stromelysin gene promoter and common carotid geometry in healthy male subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20:1600–1605.
- Gomma AH, Elrayess MA, Knight CJ, Hawe E, Fox KM, Humphries SE. 2002. The endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp and -786T>C) gene polymorphisms are associated with coronary in-stent restenosis. *Eur Heart J.* 23:1955–1962.
- Gong Y, Hart E, Shchurin A, Hoover-Plow J. 2008. Inflammatory macrophage migration requires MMP-9 activation by plasminogen in mice. *J Clin Invest.* 118:3012–3024.
- Gontijo AMMC, Tice R. 2003. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: *Mutagênese Ambient.* 1st ed. Canoas: ULBRA. (Orgs) Ribeiro, LR; Salvadori DMF e Marques EK; p. 247–279.
- Graff J, Harder S, Wahl O, Scheuermann E-H, Gossmann J. 2005. Anti-inflammatory effects of clopidogrel intake in renal transplant patients: Effects on platelet-leukocyte interactions, platelet CD40 ligand expression, and proinflammatory biomarkers. *Clin Pharmacol Ther.* 78:468–476.
- Grassia G, Maddaluno M, Musilli C, Stefano DD, Carnuccio R, Lauro MVD, Parratt CA, Kennedy S, Meglio PD, Ianaro A, et al. 2010. The IκB Kinase Inhibitor Nuclear Factor-κB Essential Modulator–Binding Domain Peptide for Inhibition of Injury-Induced Neointimal Formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30:2458–2466.
- Grotti S, Liistro F, Angioli P, Ducci K, Falsini G, Porto I, Ricci L, Venteruzzo G, Turini F, Bellandi G, Bolognese L. 2016. Paclitaxel-Eluting Balloon vs Standard Angioplasty to Reduce Restenosis in Diabetic Patients With In-Stent Restenosis of the Superficial Femoral and Proximal Popliteal Arteries: Three-Year Results of the DEBATE-ISR Study. *J Endovasc Ther.* 23:52–57.
- Gu S, Sun Y, Han R, Wang L, Wang D, Wang J, Li X. 2014. Association between genetic polymorphisms of cytochrome P450 2C19 and the risk of cerebral ischemic stroke in Chinese. *BMC Med Genet.* 15:1–7.
- Guasch-Ferré M, Zheng Y, Ruiz-Canela M, Hruby A, Martínez-González MA, Clish CB, Corella D, Estruch R, Ros E, Fitó M, et al. 2016. Plasma acylcarnitines and risk of cardiovascular disease: effect of Mediterranean diet interventions. *Am J Clin Nutr.* 103:1408–1416.
- Habib A, Finn AV. 2015. Endothelialization of Drug Eluting Stents and its Impact on Dual Anti-platelet Therapy Duration. *Pharmacol Res Off J Ital Pharmacol Soc.* 93:22–27.
- Harendza S, Lovett DH, Panzer U, Lukacs Z, Kühnl P, Stahl RAK. 2003. Linked Common Polymorphisms in the Gelatinase A Promoter Are Associated with Diminished Transcriptional Response to Estrogen and Genetic Fitness. *J Biol Chem.* 278:20490–20499.
- Harmsze AM, van Werkum JW, ten Berg JM, Zwart B, Bouman HJ, Breet NJ, van 't Hof AWJ, Ruven HJT, Hackeng CM, Klungel OH, et al. 2010. CYP2C19*2 and CYP2C9*3 alleles are associated with stent thrombosis: a case-control study. *Eur Heart J.* 31:3046–3053.
- Heo SH, Cho C-H, Kim HO, Jo YH, Yoon K-S, Lee JH, Park J-C, Park KC, Ahn T-B, Chung KC, et al. 2011. Plaque rupture is a determinant of vascular events in carotid artery atherosclerotic disease: involvement of matrix metalloproteinases 2 and 9. *J Clin Neurol Seoul Korea.* 7:69–76.
- Hilgendorf I, Swirski FK, Robbins CS. 2015. Monocyte Fate in Atherosclerosis Significance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 35:272–279.

- Hokimoto S, Oike Y, Saito T, Kitaoka M, Oshima S, Noda K, Moriyama Y, Ishibashi F, Ogawa H. 2002. Increased expression of monocyte chemoattractant protein-1 in atherectomy specimens from patients with restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Circ J Off J Jpn Circ Soc.* 66:114–116.
- Hong K-S, Ko S-B, Lee JS, Yu K-H, Rha J-H. 2015. Endovascular Recanalization Therapy in Acute Ischemic Stroke: Updated Meta-analysis of Randomized Controlled Trials. *J Stroke.* 17:268–281.
- Hoppmann P, Koch W, Schömig A, Kastrati A. 2004. The 5A/6A polymorphism of the stromelysin-1 gene and restenosis after percutaneous coronary interventions. *Eur Heart J.* 25:335–341.
- Hossainy SFA, Stewart G, Williams MA, Royal J, Consigny PM, Happ DM, Scheinpflug K, Hu T. 2015. Method of coating a stent with a release polymer for 40-O-(2-hydroxy)ethyl-rapamycin. U.S. Patent No. 8,961,588. [cited 2017 Aug 4]. Available from: <http://www.google.ch/patents/US8961588>
- Hu Y, Liu J, Zhao Q, Xu P, Chen Y, Zhou H, Li X. 2015. Correlation between mimecan expression and coronary artery stenosis in patients with coronary heart disease. *Int J Clin Exp Med.* 8:21641–21646.
- Hu Z, Huo X, Lu D, Qian J, Zhou J, Chen Y, Xu L, Ma H, Zhu J, Wei Q, Shen H. 2005. Functional polymorphisms of matrix metalloproteinase-9 are associated with risk of occurrence and metastasis of lung cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 11:5433–5439.
- Huang G-J, Yang C-M, Chang Y-S, Amagaya S, Wang H-C, Hou W-C, Huang S-S, Hu M-L. 2010. Hispolon Suppresses SK-Hep1 Human Hepatoma Cell Metastasis by Inhibiting Matrix Metalloproteinase-2/9 and Urokinase-Plasminogen Activator through the PI3K/Akt and ERK Signaling Pathways. *J Agric Food Chem.* 58:9468–9475.
- Huang Y, Ng HCA, Ng XW, Subbu V. 2014. Drug-eluting biostable and erodible stents. *J Controlled Release.* 193:188–201.
- Humphries S, Bauters C, Meirhaeghe A, Luong L, Bertrand M, Amouyel P. 2002. The 5A6A polymorphism in the promoter of the stromelysin-1 (MMP3) gene as a risk factor for restenosis. *Eur Heart J.* 23:721–725.
- IPAQ. 2005. International Physical Activity Questionnaire. Guidelines for Data Processing and Analysis of the.
- Jang E-J, Bae I-H, Park DS, Lee S-Y, Lim KS, Park J-K, Shim J-W, Sim DS, Jeong MH. 2015. Effect of a novel peptide, WKYVMV- and sirolimus-coated stent on re-endothelialization and anti-restenosis. *J Mater Sci Mater Med.* 26:251.
- Jefferis BJ, Whincup P, Welsh P, Wannamethee G, Rumley A, Lennon L, Thomson A, Lawlor D, Carson C, Ebrahim S, Lowe G. 2010. Prospective study of matrix metalloproteinase-9 and risk of myocardial infarction and stroke in older men and women. *Atherosclerosis.* 208:557–563.
- Jia Y, Liu Y, Tian R, Xu T, Fang Z. 2016. The association study of MMP2 polymorphisms with susceptibility to adolescent idiopathic scoliosis in Han Chinese. *Int J Clin Exp Pathol.* 9:10714–10720.
- Jian D, Dai B, Hu X, Yao Q, Zheng C, Zhu J. 2017. ox-LDL increases microRNA-29a transcription through upregulating YY1 and STAT1 in macrophages: ox-LDL increases miR-29a transcription in macrophages. *Cell Biol Int.* 9999:1–11.
- Jiménez-Sousa MA, Medrano LM, Liu P, Fernández-Rodríguez A, Almansa R, Gomez-Sanchez E, Ortega A, Heredia-Rodríguez M, Gómez-Pesquera E, Tamayo E, Resino S. 2017. IL-6 rs1800795 polymorphism is associated with septic shock-related death in patients who underwent major surgery: a preliminary retrospective study. *Ann Intensive Care.* 7:1–9.
- John JS, Suresh M, Kuriakose NR, Vincent S, Babu A, Saleem A. 2016. A study on the effect of clinical pharmacist provided patient counselling on the glycemic control of patients undertaking coronary artery bypass graft surgery or percutaneous transluminal coronary angioplasty. *World J Pharm Pharm Sci.* 5:1111–1121.
- Jones GT, Tarr GP, Phillips LV, Wilkins GT, van Rij AM, Williams MJA. 2009. Active matrix metalloproteinases 3 and 9 are independently associated with coronary artery in-stent restenosis. *Atherosclerosis.* 207:603–607.
- Jongstra-Bilen J, Haidari M, Zhu S-N, Chen M, Guha D, Cybulsky MI. 2006. Low-grade chronic inflammation in regions of the normal mouse arterial intima predisposed to atherosclerosis. *J Exp Med.* 203:2073–2083.

- Juan Z, Wei-Guo Z, Heng-Liang S, Da-Guo W. 2015. Association of Matrix Metalloproteinase 9 C-1562T Polymorphism with Genetic Susceptibility to Myocardial Infarction: A Meta-Analysis. *Curr Ther Res Clin Exp.* 77:40–45.
- Kandasamy AD, Chow AK, Ali MAM, Schulz R. 2010. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. *Cardiovasc Res.* 85:413–423.
- Kandzari DE, Mauri L, Popma JJ, Turco MA, Gurbel PA, Fitzgerald PJ, Leon MB. 2011. Late-Term Clinical Outcomes With Zotarolimus- and Sirolimus-Eluting Stents. *JACC Cardiovasc Interv.* 4:543–550.
- Kaplan B, Qazi Y, Wellen JR. 2014. Strategies for the management of adverse events associated with mTOR inhibitors. *Transplant Rev.* 28:126–133.
- Katsaros KM, Kastl SP, Zorn G, Maurer G, Wojta J, Huber K, Christ G, Speidl WS. 2010. Increased Restenosis Rate After Implantation of Drug-Eluting Stents in Patients With Elevated Serum Activity of Matrix Metalloproteinase-2 and -9. *JACC Cardiovasc Interv.* 3:90–97.
- Katz M, Laurinavicius AG, Franco FGM, Conceicao RD, Carvalho JAM, Pesaro AEP, Wajngarten M, Santos RD. 2015. Calculated and perceived cardiovascular risk in asymptomatic subjects submitted to a routine medical evaluation: The perception gap. *Eur J Prev Cardiol.* 22:1076–1082.
- Klein T, Bischoff R. 2011. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids.* 41:271–290.
- Kobayashi Y, Nam C-W, Tonino PAL, Kimura T, De Bruyne B, Pijls NHJ, Fearon WF. 2016. The Prognostic Value of Residual Coronary Stenoses After Functionally Complete Revascularization. *J Am Coll Cardiol.* 67:1701–1711.
- Koch W, de Waha A, Hoppmann P, Schömig A, Kastrati A. 2010. Haplotypes and 5A/6A polymorphism of the matrix metalloproteinase-3 gene in coronary disease: Case–control study and a meta-analysis. *Atherosclerosis.* 208:171–176.
- Koenig W, Khuseynova N. 2007. Biomarkers of atherosclerotic plaque instability and rupture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27:15–26.
- Kon H, Sakai H, Otsubo M, Takano H, Okamoto K, Sato T, Kimura T, Inoue K. 2011. Contrast Staining Outside the Sirolimus-Eluting Stent Leading to Coronary Aneurysm Formation: A Case of Very Late Stent Thrombosis Associated With Hypersensitivity Reaction. *Circ Cardiovasc Interv.* 4:e1–e3.
- Krämer A, Green J, Pollard J, Tugendreich S. 2014. Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis. *Bioinformatics.* 30:523–530.
- Krishnan P, Purushothaman K-R, Purushothaman M, Turnbull IC, Tarricone A, Vasquez M, Jain S, Baber U, Lascano RA, Kini AS, et al. 2016. Enhanced neointimal fibroblast, myofibroblast content and altered extracellular matrix composition: Implications in the progression of human peripheral artery restenosis. *Atherosclerosis.* 251:226–233.
- Kudryavtseva O, Aalkjaer C, Matchkov VV. 2013. Vascular smooth muscle cell phenotype is defined by Ca²⁺-dependent transcription factors. *FEBS J.* 280:5488–5499.
- Kulmyrzaeva N, Tatarunas V, Skipskis V, Smagulova G, Seitmaganbetova N, Veikutiene A, Lesauskaite V. 2016. Gene polymorphism of *CYP2C19*2*, **3* and *CYP3A4*1B* and early stent thrombosis: case reports and literature review. *Pers Med.* 13:423–428.
- Kumar A, Misra S, Kumar P, Sagar R, Prasad K, Pandit AK, Chakravarty K, Kathuria P, Yadav AK. 2016. Association between Endothelial nitric oxide synthase G894T gene polymorphism and risk of ischemic stroke in North Indian population: a case-control study. *Neurol Res.* 38:575–579.
- Kumar N, Shaw P, Uhm HS, Choi EH, Attri P. 2017. Influence of Nitric Oxide generated through microwave plasma on L6 skeletal muscle cell myogenesis via oxidative signaling pathways. *Sci Rep.* 7:542.
- Lacchini R, Jacob-Ferreira ALB, Luizon MR, Coeli FB, Izidoro-Toledo TC, Gasparini S, Ferreira-Sae MC, Schreiber R, Nadruz W, Tanus-Santos JE. 2010. Matrix metalloproteinase 9 gene haplotypes affect left ventricular hypertrophy in hypertensive patients. *Clin Chim Acta.* 411:1940–1944.

- Langers AMJ, Verspaget HW, Hawinkels LJAC, Kubben FJGM, van Duijn W, van der Reijden JJ, Hardwick JCH, Hommes DW, Sier CFM. 2012. MMP-2 and MMP-9 in normal mucosa are independently associated with outcome of colorectal cancer patients. *Br J Cancer*. 106:1495–1498.
- Lavin MF. 2008. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9:759–769.
- Lekshmi KM, Che H-L, Cho C-S, Park I-K. 2017. Drug- and Gene-eluting Stents for Preventing Coronary Restenosis. *Chonnam Med J*. 53:14–27.
- Levinsson A, Olin A-C, Björck L, Rosengren A, Nyberg F. 2014. Nitric oxide synthase (NOS) single nucleotide polymorphisms are associated with coronary heart disease and hypertension in the INTERGENE study. *Nitric Oxide*. 39:1–7.
- Lewis DF. 2004. 57 varieties: the human cytochromes P450. *Pharmacogenomics*. 5:305–318.
- Li H, Förstermann U. 2013. Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. *Curr Opin Pharmacol*. 13:161–167.
- Li J, Zhang Y, Cui L, Wang J, Pang X, Lai Y, Yao Y, Liu X, Li Y. 2013. Mechanical stretch changes coronary artery fibroblasts function by upregulating HSF1 protein expression. *Int J Biol Macromol*. 59:105–110.
- Li Y. 2011. Endothelial nitric oxide synthase G894T gene polymorphism and essential hypertension in the Chinese population: a meta-analysis involving 11,248 subjects. *Intern Med Tokyo Jpn*. 50:2099–2106.
- Li YY, Yang XX, Zhou YH, Gong G, Geng H-Y, Kim HJ, Zhou CW, Qian Y, Wang XM, Wu J. 2016. Matrix metalloproteinase-9 Gene-1562C>T Gene Polymorphism and Coronary Artery Disease in the Chinese Han Population: A Meta-Analysis of 5468 Subjects. *Front Physiol*. 7:1–10.
- Liao W, Lin JX, Leonard WJ. 2013. Interleukin-2 at the Crossroads of Effector Responses, Tolerance, and Immunotherapy. *Immunity*. 38:13–25.
- Libby P, Lichtman AH, Hansson GK. 2013. Immune effector mechanisms implicated in atherosclerosis: from mice to humans. *Immunity*. 38:1092–1104.
- Libra M, Scalisi A, Vella N, Clementi S, Sorio R, Stivala F, Spandidos DA, Mazzarino C. 2009. Uterine cervical carcinoma: role of matrix metalloproteinases (review). *Int J Oncol*. 34:897–903.
- Lichtinghagen R, Bahr MJ, Wehmeier M, Michels D, Haberkorn CI, Arndt B, Flemming P, Manns MP, Boeker KHW. 2003. Expression and coordinated regulation of matrix metalloproteinases in chronic hepatitis C and hepatitis C virus-induced liver cirrhosis. *Clin Sci*. 105:373–382.
- Lingman M. 2013. Acute coronary syndromes. The prognostic importance of hypertension, diabetes and vectorcardiographic markers. Gothenburg: University of Gothenburg. Available from: <https://gupea.ub.gu.se/handle/2077/33111>
- Liu D, Guo H, Li Y, Xu X, Yang K, Bai Y. 2012. Association between Polymorphisms in the Promoter Regions of Matrix Metalloproteinases (MMPs) and Risk of Cancer Metastasis: A Meta-Analysis. *PLoS ONE*. 7:1–10.
- Liu J, Liu Q, Wan Y, Zhao Z, Yu H, Luo H, Tang Z. 2014. Osteopontin promotes the progression of gastric cancer through the NF-κB pathway regulated by the MAPK and PI3K. *Int J Oncol*. 45:282–290.
- Liu W, Liu Y, Jiang H, Ding X, Zhu R, Li B, Zhao Y. 2013. Plasma Levels of Interleukin 18, Interleukin 10, and Matrix Metalloproteinase-9 and -137G/C Polymorphism of Interleukin 18 Are Associated with Incidence of In-stent Restenosis After Percutaneous Coronary Intervention. *Inflammation*. 36:1129–1135.
- Liu X, Huang Y, Pokreisz P, Vermeersch P, Marsboom G, Swinnen M, Verbeken E, Santos J, Pellens M, Gillijns H, et al. 2007. Nitric oxide inhalation improves microvascular flow and decreases infarction size after myocardial ischemia and reperfusion. *J Am Coll Cardiol*. 50:808–817.
- Luizon MR, Almeida Belo V. 2012. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 polymorphisms and haplotypes as disease biomarkers. *Biomark Biochem Indic Expo Response Susceptibility Chem*. 17:286–288.
- Luo T, Cui S, Bian C, Yu X. 2013. DNA double-strand break repair is activated in carotid artery restenosis. *Cell Mol Biol*. 59:1869–75.

- Maas AHEM, Appelman YEA. 2010. Gender differences in coronary heart disease. *Neth Heart J*. 18:598–602.
- Maeng M, Holm NR, Erglis A, Kumsars I, Niemelä M, Kervinen K, Jensen JS, Galløe A, Steigen TK, Wiseth R, et al. 2013. Long-Term Results After Simple Versus Complex Stenting of Coronary Artery Bifurcation Lesions. *J Am Coll Cardiol*. 62:30–34.
- Maral S, Acar M, Balcik OS, Uctepe E, Hatipoglu OF, Akdeniz D, Altun HU, Kosar A, Gunduz M, Gunduz E. 2015. Matrix Metalloproteinases 2 and 9 Polymorphism in Patients With Myeloproliferative Diseases: A STROBE-Compliant Observational Study. *Medicine (Baltimore)*. 94:e732.
- Martin DM, Boyle FJ. 2011. Drug-eluting stents for coronary artery disease: a review. *Med Eng Phys*. 33:148–163.
- McLaren JE, Michael DR, Ashlin TG, Ramji DP. 2011. Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells: Implications for cardiovascular disease therapy. *Prog Lipid Res*. 50:331–347.
- Medley TL, Kingwell BA, Gatzka CD, Pillay P, Cole TJ. 2003. Matrix metalloproteinase-3 genotype contributes to age-related aortic stiffening through modulation of gene and protein expression. *Circ Res*. 92:1254–1261.
- Meireles GCX, Sumita MK, Forte AA da C, Favarato D, Quintão RC, Filho A, De LM. 2010. Analysis of Brazilian Public Health System values for complete percutaneous myocardial revascularization in multiarterial patients. *Arq Bras Cardiol*. 94:300–305.
- Meng M, Gao B, Wang X, Bai Z, Sa R, Ge B. 2016. Long-term clinical outcomes of everolimus-eluting stent versus paclitaxel-eluting stent in patients undergoing percutaneous coronary interventions: a meta-analysis. *BMC Cardiovasc Disord*. 16:34.
- Merino A, Buendia P, Martin-Malo A, Aljama P, Ramirez R, Carracedo J. 2011. Senescent CD14+CD16+ Monocytes Exhibit Proinflammatory and Proatherosclerotic Activity. *J Immunol*. 186:1809–1815.
- Merlin JJP, Venkadesh B, Hussain R, Rajendra Prasad N, Shibli SMA, Raj AV, Rajan SS. 2013. Paclitaxel loaded poly-d,l-lactide-co-glycolide nanoparticles: Enhanced anticancer effect in non-small cell lung carcinoma cell line. *Biomed Prev Nutr*. 3:1–9.
- Mizuno S, Mizuno-Horikawa Y. 2016. Transforming Growth Factor- β (beta) Targeting Strategies for Prevention of Coronary Arterial Restenosis Post-angioplasty. In: *Coron Graft Fail*. Springer, Cham; p. 703–714.
- Monraats PS, Kurreeman FAS, Pons D, Sewgobind V, de Vries FR, Zwinderman AH, de Maat MPM, Doevendans PA, De Winter RJ, Tio RA, others. 2007. Interleukin 10: a new risk marker for the development of restenosis after percutaneous coronary intervention. *Genes Immun*. 8:44.
- Monraats PS, Pires NMM, Agema WRP, Zwinderman AH, Schepers A, de Maat MPM, Doevendans PA, de Winter RJ, Tio RA, Waltenberger J, et al. 2005. Genetic inflammatory factors predict restenosis after percutaneous coronary interventions. *Circulation*. 112:2417–2425.
- Monraats PS, de Vries F, de Jong LW, Pons D, Sewgobind VDKD, Zwinderman AH, de Maat MPM, 't Hart LM, Doevendans PA, de Winter RJ, et al. 2006. Inflammation and apoptosis genes and the risk of restenosis after percutaneous coronary intervention: Pharmacogenet Genomics. 16:747–754.
- Moss JWE, Ramji DP. 2016. Cytokines: Roles in atherosclerosis disease progression and potential therapeutic targets. *Future Med Chem*. 8:1317–1330.
- Murray CJL, Vos T, Lozano R, Naghavi M, Flaxman AD, Michaud C, Ezzati M, Shibuya K, Salomon JA, Abdalla S, et al. 2014. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet Lond Engl*. 380:2197–2223.
- Nassar S, Amro O, Abu-Rmaileh H, Alshaer I, Korachi M, Ayeshe S. 2014. ABCB1 C3435T and CYP2C19*2 polymorphisms in a Palestinian and Turkish population: A pharmacogenetic perspective to clopidogrel. *Meta Gene*. 2:314–319.
- Natividad A, Cooke G, Holland MJ, Burton MJ, Joof HM, Rockett K, Kwiatkowski DP, Mabey DC, Bailey RL. 2006. A coding polymorphism in matrix metalloproteinase 9 reduces risk of scarring sequelae of ocular Chlamydia trachomatis infection. *BMC Med Genet*. 7:40.

- Newby AC. 2005. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev.* 85:1–31.
- Ng VG, Mena C, Pietras C, Lansky AJ. 2015. Local delivery of paclitaxel in the treatment of peripheral arterial disease. *Eur J Clin Invest.* 45:333–345.
- Niu W, Qi Y. 2012. Matrix metalloproteinase family gene polymorphisms and risk for coronary artery disease: systematic review and meta-analysis. *Heart Br Card Soc.* 98:1483–1491.
- OPAS apud INCA. 2001. Organización Panamericana de la Salud. Guías para el Control y Monitoreo de la Epidemia Tabáquica. In: Instituto Nacional de Câncer (INCA). Abordagem e tratamento do fumante: consenso 2001. Rio de Janeiro: INCA.
- Opstad TB, Arnesen H, Pettersen AA, Seljeflot I. 2014. The MMP-9 -1562 C/T Polymorphism in the Presence of Metabolic Syndrome Increases the Risk of Clinical Events in Patients with Coronary Artery Disease. *PLOS ONE.* 9:1–7.
- Opstad TB, Pettersen AA, Arnesen H, Seljeflot I. 2013. The Co-Existence of the IL-18+183 A/G and MMP-9 -1562 C/T Polymorphisms Is Associated with Clinical Events in Coronary Artery Disease Patients. *PLOS ONE.* 8:1–6.
- Opstad TB, Pettersen A-AR, Weiss TW, Åkra S, Øvstebø R, Arnesen H, Seljeflot I. 2012. Genetic variation, gene-expression and circulating levels of matrix metalloproteinase-9 in patients with stable coronary artery disease. *Clin Chim Acta.* 413:113–120.
- Ortiz de Montellano PR, editor. 2015. Cytochrome P450. Cham: Springer International Publishing.
- Osborn EA, Jaffer FA. 2015. Imaging inflammation and neovascularization in atherosclerosis: clinical and translational molecular and structural imaging targets. *Curr Opin Cardiol.* 30:671–680.
- Pallero MA, Talbert Roden M, Chen Y-F, Anderson PG, Lemons J, Brott BC, Murphy-Ullrich JE. 2010. Stainless Steel Ions Stimulate Increased Thrombospondin-1-Dependent TGF-Beta Activation by Vascular Smooth Muscle Cells: Implications for In-Stent Restenosis. *J Vasc Res.* 47:309–322.
- Panth N, Paudel KR, Parajuli K. 2016. Reactive Oxygen Species: A Key Hallmark of Cardiovascular Disease. *Adv Med.* 2016:1–12.
- Papafaklis MI, Chatzizisis YS, Naka KK, Giannoglou GD, Michalis LK. 2012. Drug-eluting stent restenosis: Effect of drug type, release kinetics, hemodynamics and coating strategy. *Pharmacol Ther.* 134:43–53.
- Papazafiropoulou A, Tentolouris N. 2009. Matrix metalloproteinases and cardiovascular diseases. *Hippokratia.* 13:76–82.
- Paré G, Mehta SR, Yusuf S, Anand SS, Connolly SJ, Hirsh J, Simonsen K, Bhatt DL, Fox KAA, Eikelboom JW. 2010. Effects of *CYP2C19* Genotype on Outcomes of Clopidogrel Treatment. *N Engl J Med.* 363:1704–1714.
- Park G-M, Park D-W, Kim Y-G, Cho SW, Sun B-J, Hwang KW, Kim YR, Ahn J-M, Song H-G, Kim W-J, et al. 2013. Long-term luminal change after drug-eluting stent implantation: Serial angiographic follow-up study of the ZEST randomized trial. *Catheter Cardiovasc Interv.* 81:274–282.
- Park SY, Jeong KJ, Panupinthu N, Yu S, Lee J, Han JW, Kim JM, Lee J-S, Kang J, Park CG, et al. 2011. Lysophosphatidic acid augments human hepatocellular carcinoma cell invasion through LPA1 receptor and MMP-9 expression. *Oncogene.* 30:1351–1359.
- Partida RA, Yeh RW. 2016. Contemporary Drug-Eluting Stent Platforms. *Interv Cardiol Clin.* 5:331–347.
- Pérez-Hernández N, Vargas-Alarcón G, Martínez-Rodríguez N, Martínez-Ríos MA, Peña-Duque MA, Peña-Díaz A de la, Valente-Acosta B, Posadas-Romero C, Medina A, Rodríguez-Pérez JM. 2012. The matrix metalloproteinase 2-1575 gene polymorphism is associated with the risk of developing myocardial infarction in Mexican patients. *J Atheroscler Thromb.* 19:718–727.
- Phulukdaree A, Khan S, Ramkaran P, Govender R, Moodley D, Chuturgoon AA. 2013. The Interleukin-6 -147 G/C Polymorphism Is Associated with Increased Risk of Coronary Artery Disease in Young South African Indian Men. *Metab Syndr Relat Disord.* 11:205–209.

- Pollard KS, Dudoit S, Van der Laan MJ. 2004. Multiple testing procedures and applications to genomics. *UC Berkeley Div Biostat Work Pap Ser.* 1:1–43.
- Ponomarenko P, Rasskazov D, Suslov V, Sharypova E, Savinkova L, Podkolodnaya O, Podkolodny NL, Tverdokhlebskiy NN, Chadaeva I, Ponomarenko M, Kolchanov N. 2016. Candidate SNP Markers of Chronopathologies Are Predicted by a Significant Change in the Affinity of TATA-Binding Protein for Human Gene Promoters. *BioMed Res Int.* 2016:1–21.
- Puranik AS, Dawson ER, Peppas NA. 2013. Recent advances in drug eluting stents. *Int J Pharm.* 441:665–679.
- Puré E, Krolkoski M, Monslow J. 2016. A role for hyaluronan synthase 3 in the response to vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 36:224–225.
- Qin Q, Zhao B, Mao Y, Cui R, Kou L, Li Y, Zhao F, Hui R. 2005. Association of matrix metalloproteinase-9 and platelet membrane glycoprotein VI polymorphisms with acute coronary syndrome. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi.* 33:622–626.
- Radunovic M, Nikolic N, Milenkovic S, Tomanovic N, Boricic I, Dimitrijevic M, Novakovic I, Basta-Jovanovic G. 2016. The MMP-2 and MMP-9 promoter polymorphisms and susceptibility to salivary gland cancer. *J BUON.* 21:597–602.
- Raman K, Chong M, Akhtar-Danesh G-G, D'Mello M, Hasso R, Ross S, Xu F, Paré G. 2013. Genetic Markers of Inflammation and Their Role in Cardiovascular Disease. *Can J Cardiol.* 29:67–74.
- Ramji DP, Davies TS. 2015. Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev.* 26:673–685.
- Rauramaa R, Vaisanen SB, Luong L-A, Schmidt-Trucksass A, Penttila IM, Bouchard C, Toyry J, Humphries SE. 2000. Stromelysin-1 and Interleukin-6 Gene Promoter Polymorphisms Are Determinants of Asymptomatic Carotid Artery Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20:2657–2662.
- Reichert S, Schlitt A, Benten A-C, Hofmann B, Schaller H-G, Schulz S. 2016. The interleukin 6 c.-174 CC genotype is a predictor for new cardiovascular events in patients with coronary heart disease within three years follow-up. *Cytokine.* 83:136–138.
- Remko M, Remková A, Broer R. 2016. A Comparative Study of Molecular Structure, pKa, Lipophilicity, Solubility, Absorption and Polar Surface Area of Some Antiplatelet Drugs. *Int J Mol Sci.* 17:388.
- Ren J, Liu Z, Wang Q, Giles J, Greenberg J, Sheibani N, Kent KC, Liu B. 2016. Andrographolide Ameliorates Abdominal Aortic Aneurysm Progression by Inhibiting Inflammatory Cell Infiltration through Downregulation of Cytokine and Integrin Expression. *J Pharmacol Exp Ther.* 356:137–147.
- Robertson KE, McDonald RA, Oldroyd KG, Nicklin SA, Baker AH. 2012. Prevention of coronary in-stent restenosis and vein graft failure: Does vascular gene therapy have a role? *Pharmacol Ther.* 136:23–34.
- Rodella LF, Filippini F, Bonomini F, Bresciani R, Reiter RJ, Rezzani R. 2010. Beneficial effects of melatonin on nicotine-induced vasculopathy. *J Pineal Res.* 48:126–132.
- Rosenfield K, Jaff MR, White CJ, Rocha-Singh K, Mena-Hurtado C, Metzger DC, Brodmann M, Pilger E, Zeller T, Krishnan P, et al. 2015. Trial of a Paclitaxel-Coated Balloon for Femoropopliteal Artery Disease. *N Engl J Med.* 373:145–153.
- Ross MH, Pawlina W. 2015. *Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology.* 7 edition. Philadelphia: LWW.
- Rostoff P, Szczeklik W, Piwowarska W, Konduracka E, Sanak M, Nessler J. 2014. Association of common cyclooxygenase-2 (COX-2) gene polymorphisms with clinical and angiographic characteristics of patients with coronary artery disease. *Przegl Lek.* 71:314–318.
- Rowland A, Miners JO, Mackenzie PI. 2013. The UDP-glucuronosyltransferases: Their role in drug metabolism and detoxification. *Int J Biochem Cell Biol.* 45:1121–1132.
- Sabbatini AR, Barbaro NR, de Faria AP, Ritter AMV, Modolo R, Correa NB, Brunelli V, Pinho C, Fontana V, Moreno H. 2017. Matrix metalloproteinase-2 – 735C/T polymorphism is associated with resistant hypertension in a specialized outpatient clinic in Brazil. *Gene.* 620:23–29.

- Saedi M, Vaisi-Raygani A, Khaghani S, Sharifabrizi A, Rezaie M, Pasalar P, Rahimi Z, Pourmotabbed T. 2012. Matrix metalloproteinase-9 functional promoter polymorphism 1562C>T increased risk of early-onset coronary artery disease. *Mol Biol Rep.* 39:555–562.
- Saeed HM, Alanazi MS, Parine NR, Shaik J, Semlali A, Alharbi O, Azzam N, Aljebreen A, Almadi M, Shalaby MA. 2013. Matrix metalloproteinase-2 (-1306 c>t) promoter polymorphism and risk of colorectal cancer in the Saudi population. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP.* 14:6025–6030.
- Saraiva M, O'Garra A. 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol.* 10:170–181.
- SBC. 2016. Sociedade Brasileira de Cardiologia. [cited 2017 Aug 4]. Available from: <http://www.cardiometro.com.br/>
- Schaer GL, Zhang C. 2015. Implementation of miRNAs to Reduce In-Stent Restenosis in the Future. *J Am Coll Cardiol.* 65:2328–2330.
- Semlitsch M, Shackelford RE, Zirkl S, Sattler W, Malle E. 2011. ATM protects against oxidative stress induced by oxidized low-density lipoprotein. *DNA Repair.* 10:848–860.
- Serra R, Gallelli L, Conti A, De Caridi G, Massara M, Spinelli F, Buffone G, Calìò FG, Amato B, Ceglia S, et al. 2014. The effects of sulodexide on both clinical and molecular parameters in patients with mixed arterial and venous ulcers of lower limbs. *Drug Des Devel Ther.* 8:519–527.
- Shalia KK, Shah VK, Mashru MR, Soneji SL, Vasvani JB, Payannavar S, Walvalkar A, Mokal R, Mithbawkar SS, Bootwalla M, et al. 2010. Matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) -1612 5A/6A promoter polymorphism in coronary artery disease in Indian population. *Indian J Clin Biochem.* 25:133–140.
- Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 13:2498–2504.
- Sheu MJ, Lin HY, Yang YH, Chou CJ, Chien YC, Wu TS, Wu CH. 2013. Demethoxycurcumin, a major active curcuminoid from *Curcuma longa*, suppresses balloon injury induced vascular smooth muscle cell migration and neointima formation: An in vitro and in vivo study. *Mol Nutr Food Res.* 57:1586–1597.
- Shimosato T, Geddawy A, Tawa M, Imamura T, Okamura T. 2012. Chronic administration of nicotine-free cigarette smoke extract impaired endothelium-dependent vascular relaxation in rats via increased vascular oxidative stress. *J Pharmacol Sci.* 118:206–214.
- Shuldiner AR. 2009. Association of Cytochrome P450 2C19 Genotype With the Antiplatelet Effect and Clinical Efficacy of Clopidogrel Therapy. *JAMA.* 302:849.
- Shuvalova YA, Kaminnyi AI, Meshkov AN, Shirokov RO, Samko AN. 2012. Association between polymorphisms of eNOS and GPx-1 genes, activity of free-radical processes and in-stent restenosis. *Mol Cell Biochem.* 370:241–249.
- Sigwart U, Puel J, Mirkovitch V, Joffre F, Kappenberger L. 1987. Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty. *N Engl J Med.* 316:701–706.
- Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, Quteineh L, Drouet E, Méneveau N, Steg PG, Ferrières J, Danchin N, Becquemont L. 2009. Genetic Determinants of Response to Clopidogrel and Cardiovascular Events. *N Engl J Med.* 360:363–375.
- Siragusa M, Fleming I. 2016. The eNOS signalosome and its link to endothelial dysfunction. *Pflüg Arch - Eur J Physiol.* 468:1125–1137.
- Skorupski P, Jankiewicz K, Miotła P, Marczak M, Kulik-Rechberger B, Rechberger T. 2013. The polymorphisms of the MMP-1 and the MMP-3 genes and the risk of pelvic organ prolapse. *Int Urogynecology J.* 24:1033–1038.
- Spurthi KM, Galimudi RK, Srilatha G, Sahu SK, Nallari P, Hanumanth SR. 2012. Influence of Gelatinase B Polymorphic Variants and Its Serum Levels in Atherosclerosis. *Genet Test Mol Biomark.* 16:850–854.

- Squire IB, Evans J, Ng LL, Loftus IM, Thompson MM. 2004. Plasma MMP-9 and MMP-2 following acute myocardial infarction in man: correlation with echocardiographic and neurohumoral parameters of left ventricular dysfunction. *J Card Fail.* 10:328–333.
- Srinija P, Guravaiah M, Devi C. 2016. Rapamycin - A Future versatile drug. *Int J Adv Res Biol Sci.* 3:283–287.
- Srivastava P, Mandhani A, Kapoor R, Mittal RD. 2010. Role of MMP-3 and MMP-9 and their haplotypes in risk of bladder cancer in North Indian cohort. *Ann Surg Oncol.* 17:3068–3075.
- Stefanini GG, Holmes DRJ. 2013. Drug-Eluting Coronary-Artery Stents. *N Engl J Med.* 368:254–265.
- Steven S, Münzel T, Daiber A. 2015. Exploiting the Pleiotropic Antioxidant Effects of Established Drugs in Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci.* 16:18185–18223.
- Suárez-Santamaría M, Santolaria F, Pérez-Ramírez A, Alemán-Valls M-R, Martínez-Riera A, González-Reimers E, de la Vega M-J, Milena A. 2010. Prognostic value of inflammatory markers (notably cytokines and procalcitonin), nutritional assessment, and organ function in patients with sepsis. *Eur Cytokine Netw.* 21:19–26.
- Suh J-W, Koo B-K, Zhang S-Y, Park K-W, Cho J-Y, Jang I-J, Lee D-S, Sohn D-W, Lee M-M, Kim H-S. 2006. Increased risk of atherothrombotic events associated with cytochrome P450 3A5 polymorphism in patients taking clopidogrel. *CMAJ Can Med Assoc J J Assoc Medicales Can.* 174:1715–1722.
- Supek F, Bošnjak M, Škunca N, Šmuc T. 2011. REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. *PLoS ONE.* 6:1–9.
- Tabas I, García-Cardena G, Owens GK. 2015. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J Cell Biol.* 209:13–22.
- Taniwaki M, Stefanini GG, Silber S, Richardt G, Vranckx P, Serruys PW, Buszman PE, Kelbaek H, Windecker S. 2014. 4-Year Clinical Outcomes and Predictors of Repeat Revascularization in Patients Treated With New-Generation Drug-Eluting Stents. *J Am Coll Cardiol.* 63:1617–1625.
- Tarr GP, Williams MJA, Wilkins GT, Chen VHT, Phillips LV, van Rij AM, Jones GT. 2013. Intra-Individual Changes of Active Matrix Metalloproteinase-9 Are Associated with Clinical In-Stent Restenosis of Bare Metal Stents. *Cardiology.* 124:28–35.
- Thomas AC. 2016. Targeting Therapies to Treat Vein Graft Disease and Restenosis. In: Tintoiu IC, Underwood MJ, Cook SP, Kitabata H, Abbas A, editors. *Coron Graft Fail State Art.* Cham: Springer International Publishing; p. 715–723.
- Tousoulis D, Psarros C, Demosthenous M, Patel R, Antoniadis C, Stefanadis C. 2014. Innate and Adaptive Inflammation as a Therapeutic Target in Vascular Disease. *J Am Coll Cardiol.* 63:2491–2502.
- Tu QM, Wang ZW. 2016. Study on mechanism of c-Myc in restenosis after coronary artery bypass grafting. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 20:2363–2367.
- Von Gruenigen VE, Huang HQ, Gil KM, Frasura HE, Armstrong DK, Wenzel LB. 2012. The association between quality of life domains and overall survival in ovarian cancer patients during adjuvant chemotherapy: A Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecol Oncol.* 124:379–382.
- Waiczies S, Prozorovski T, Infante-Duarte C, Hahner A, Aktas O, Ullrich O, Zipp F. 2005. Atorvastatin Induces T Cell Anergy via Phosphorylation of ERK1. *J Immunol.* 174:5630–5635.
- Wang J, Xu D, Wu X, Zhou C, Wang H, Guo Y, Cao K. 2011. Polymorphisms of matrix metalloproteinases in myocardial infarction: a meta-analysis. *Heart Br Card Soc.* 97:1542–1546.
- Wang Q, Tong X, Ji Y, Li H, Lu W, Song Z. 2015. Meta-analysis of the correlation between IL-6 -174 G/C polymorphism and polycystic ovarian syndrome: IL-6 -174 G/C polymorphism and PCOS. *J Obstet Gynaecol Res.* 41:1087–1092.
- Watson AMD, Olukman M, Koulis C, Tu Y, Samijono D, Yuen D, Lee C, Behm DJ, Cooper ME, Jandeleit-Dahm K a. M, et al. 2013. Urotensin II receptor antagonism confers vasoprotective effects in diabetes associated atherosclerosis: studies in humans and in a mouse model of diabetes. *Diabetologia.* 56:1155–1165.

- Weiss TW, Furenes EB, Trøseid M, Solheim S, Hjerkin EM, Seljeflot I, Arnesen H. 2010. Prediction of cardiovascular events by matrix metalloproteinase (MMP)-9 in elderly men: *Thromb Haemost*. 103:679–681.
- Wen D, Du X, Nie SP, Dong JZ, Ma CS. 2014. Association Between Matrix Metalloproteinase Family Gene Polymorphisms and Ischemic Stroke: a Meta-analysis. *Mol Neurobiol*. 50:979–985.
- WHO. 2016. World Health Organization. Cardiovascular diseases (CVDs). WHO. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>
- Wise AF, Williams TM, Rudd S, Wells CA, Kerr PG, Ricardo SD. 2016. Human mesenchymal stem cells alter the gene profile of monocytes from patients with Type 2 diabetes and end-stage renal disease. *Regen Med*. 11:145–158.
- Wong BW, Meredith A, Lin D, McManus BM. 2012. The Biological Role of Inflammation in Atherosclerosis. *Can J Cardiol*. 28:631–641.
- Yabluchanskiy A, Ma Y, Iyer RP, Hall ME, Lindsey ML. 2013. Matrix Metalloproteinase-9: Many Shades of Function in Cardiovascular Disease. *Physiology*. 28:391–403.
- Yadav L, Puri N, Rastogi V, Satpute P, Ahmad R, Kaur G. 2014. Matrix metalloproteinases and cancer - roles in threat and therapy. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP*. 15:1085–1091.
- Yalcin AA, Faruk Akturk I, Celik O, Erturk M, Sabri Hancer V, Yalcin B, Isiksacan N, Uzun F, Ozbey Ozyilmaz S, Biyik I. 2014. Coronary Artery Ectasia Is Associated with the c.894G>T (Glu298Asp) Polymorphism of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene. *Tohoku J Exp Med*. 232:137–144.
- Yan J, Liu J, Greer JM, McCombe PA. 2014. Increased expression of the hypoxia-related genes in peripheral blood leukocytes of human subjects with acute ischemic stroke. *Clin Exp Neuroimmunol*. 5:216–226.
- Yang C-Q, Li W, Li S-Q, Li J, Li Y-W, Kong S-X, Liu R-M, Wang S-M, Lv W-M. 2014. MCP-1 stimulates MMP-9 expression via ERK 1/2 and p38 MAPK signaling pathways in human aortic smooth muscle cells. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol*. 34:266–276.
- Yang H, Lundbäck P, Ottosson L, Erlandsson-Harris H, Venereau E, Bianchi ME, Al-Abed Y, Andersson U, Tracey KJ, Antoine DJ. 2012. Redox modification of cysteine residues regulates the cytokine activity of high mobility group box-1 (HMGB1). *Mol Med Camb Mass*. 18:250–259.
- Yang Y, Du K, Liu Z, Lu X. 2014. Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) 4b/a Gene Polymorphisms and Coronary Artery Disease: Evidence from a Meta-Analysis. *Int J Mol Sci*. 15:7987–8003.
- Yasmin, McEnery CM, O'Shaughnessy KM, Harnett P, Arshad A, Wallace S, Maki-Petaja K, McDonnell B, Ashby MJ, Brown J, et al. 2006. Variation in the human matrix metalloproteinase-9 gene is associated with arterial stiffness in healthy individuals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 26:1799–1805.
- Ye S. 2006. Influence of matrix metalloproteinase genotype on cardiovascular disease susceptibility and outcome. *Cardiovasc Res*. 69:636–645.
- Yokoi H, Ohki T, Kichikawa K, Nakamura M, Komori K, Nanto S, O'Leary EE, Lottes AE, Snyder SA, Dake MD. 2016. Zilver PTX Post-Market Surveillance Study of Paclitaxel-Eluting Stents for Treating Femoropopliteal Artery Disease in Japan. *JACC Cardiovasc Interv*. 9:271–277.
- Yu H, Sliedregt-Bol K, Overkleeft H, Marel GA van der, Berkel TJC van, Biessen EAL. 2006. Therapeutic Potential of a Synthetic Peptide Inhibitor of Nuclear Factor of Activated T Cells as Antirestenotic Agent. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 26:1531–1537.
- Zabalza M, Subirana I, Sala J, Lluís-Ganella C, Lucas G, Tomás M, Masiá R, Marrugat J, Brugada R, Elosua R. 2012. Meta-analyses of the association between cytochrome CYP2C19 loss- and gain-of-function polymorphisms and cardiovascular outcomes in patients with coronary artery disease treated with clopidogrel. *Heart*. 98:100–108.
- Zanger UM, Schwab M. 2013. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther*. 138:103–141.
- Zapata-Arriaza E, Moniche F, González A, Bustamante A, Escudero-Martínez I, Laviana FJT, Prieto M, Mancha F, Montaner J. 2016. Predictors of Restenosis Following Carotid Angioplasty and Stenting. *Stroke*. 47:1–9.

- Zeng W, Zhang R, Li R, Luo J, Hu X. 2017. Association of the Endothelial Nitric Oxide Synthase Gene T786C Polymorphism with In-Stent Restenosis in Chinese Han Patients with Coronary Artery Disease Treated with Drug-Eluting Stent. Devaney J, editor. PLOS ONE. 12:1–12.
- Zhang B, Ye S, Herrmann SM, Eriksson P, de Maat M, Evans A, Arveiler D, Luc G, Cambien F, Hamsten A, et al. 1999. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation*. 99:1788–1794.
- Zhang M, Zhu H, Ding Y, Liu Z, Cai Z, Zou M-H. 2017. AMP-activated protein kinase α 1 promotes atherogenesis by increasing monocyte-to-macrophage differentiation. *J Biol Chem*. 292:7888–7903.
- Zhang Y, Bourantas CV, Farooq V, Muramatsu T, Diletti R, Onuma Y, Garcia-Garcia HM, Serruys PW. 2013. Bioresorbable scaffolds in the treatment of coronary artery disease. *Med Devices Auckl NZ*. 6:37–48.
- Zhi H, Wang H, Ren L, Shi Z, Peng H, Cui L, Ma G, Ye X, Feng Y, Shen C, et al. 2010. Functional polymorphisms of matrix metalloproteinase-9 and risk of coronary artery disease in a Chinese population. *Mol Biol Rep*. 37:13–20.
- Zholdybayeva EV, Talzhanov YA, Aitkulova AM, Tarlykov PV, Kulmambetova GN, Iskakova AN, Dzholdasbekova AU, Visternichan OA, Taizhanova DZ, Ramanculov YM. 2016. Genetic risk factors for restenosis after percutaneous coronary intervention in Kazakh population. *Hum Genomics*. 10:1–8.
- Zhou S-F, Liu J-P, Chowbay B. 2009. Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metab Rev*. 41:89–295.
- Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJM, Liu Y-J, MacPherson G, Randolph GJ, et al. 2010. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*. 116:e74–e80.
- Zohlh ofer D, Richter T, Neumann F-J, N hrenberg T, Wessely R, Brandl R, Murr A, Klein CA, Baeuerle PA. 2001. Transcriptome Analysis Reveals a Role of Interferon- γ in Human Neointima Formation. *Mol Cell*. 7:1059–1069.

ANEXO I

Aprovação do Comitê de Ética de Pesquisa, da Faculdade de
Medicina – UNESP– Câmpus de Botucatu



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Júnior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 16.616-870
Fone: (14) 3880-1608 / 3890-1609
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
kleber@fmb.unesp.br
e-mail coordenadora: amolina@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1987.

Botucatu, 08 de dezembro de 2016

OF. 127/2016-CEP

Ilustríssima Senhora
Prof^a. Dr^a. Daisy Maria Fávero Salvadori
DD. Departamento de Patologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu.

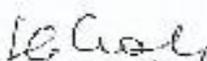
Prezada Dra Daisy

Atendendo a solicitação de Vossa Senhoria, informo que o Projeto de Pesquisa (Protocolo CEP 4071/2012) "Alterações genômicas relacionadas à reestenose coronariana após implante de Stent", aprovado por esse CEP em 06/02/2012, foi desenvolvido pela aluna **Juliana Lara Padovani**, com objetivo de Tese de Doutorado, sobre orientação de Vossa Senhoria, e colaboração de Décio Salvadori Júnior e Elaine Aparecida de Camargo.

Através de documento postado no CEP em 07/12/2016, o título do Projeto sofreu alteração, passando a denominar-se "Identificação de eventos moleculares associados à reestenose coronariana" por sugestão da banca de qualificação.

Após a defesa do referido projeto é necessário entrar no site do CEP onde está disponível o **Modelo de Relatório Final de Atividades**, o qual deverá ser elaborada e enviado para análise final, e conseqüente arquivamento.

Atenciosamente,


Prof^a Dr^a Silvana Andréa Molina Lima
Coordenadora do CEP

ANEXO II

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelos
Comitês de Ética em Pesquisa da Beneficência Portuguesa e
da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
GRUPO CONTROLE**

FACULDADE DE MEDICINA DA UNESP – BOTUCATU
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA – CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PATOLOGIA

PROJETO DE PESQUISA

ALTERAÇÕES GENÔMICAS RELACIONADAS À REESTENOSE CORONARIANA APÓS IMPLANTE DE STENT

Você está sendo convidado (a) a participar do GRUPO CONTROLE, ou seja, grupo de pessoas sem a doença em estudo (reestenose coronariana). Este grupo de pessoas é utilizado para comparar com o grupo que tem a doença, a fim de verificar quais são as diferenças. A estenose é o fechamento da artéria coronária que impede a passagem do sangue e que ocorre devido a placas de gordura dentro da artéria. Qualquer pessoa pode desenvolver esta doença, mas aquelas que apresentam diabetes, hipertensão arterial, colesterol aumentado, aumento de peso, estresse e os fumantes, têm maior risco. Quando ocorre o fechamento da artéria pela placa de gordura, na maioria dos casos é indicado o procedimento de angioplastia coronariana, com implante de *stent* (prótese metálica expansível, semelhante a uma mola), para permitir a expansão da artéria e a passagem do sangue. Em certas situações, alguns pacientes que fizeram a angioplastia, voltam a ter o entupimento da artéria. No entanto, as causas desse novo fechamento da artéria (reestenose) não são totalmente conhecidas. Dessa forma, este estudo está sendo desenvolvido visando contribuir para esclarecer quais são os motivos que levam à reestenose.

Esse termo de consentimento que você deverá assinar foi elaborado de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, sobre pesquisa envolvendo seres humanos.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pacientes submetidos à angiografia no Hospital Beneficência Portuguesa de São Paulo

I. IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE (VOLUNTÁRIO)

Nome:		
RG:	Código (não preencher) :	
Endereço:		
Cidade:		Bairro:
CEP:	Estado:	Telefone:

II. DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

Convido o (a) Sr.(a) a participar do Projeto de Pesquisa “Alterações genômicas relacionadas à reestenose coronariana após implante de stent” que será desenvolvido por mim, Juliana Lara Padovani, no Laboratório de Toxicogenômica e Nutrigenômica, do Departamento de Patologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

- 1- Pesquisador responsável: Daisy Maria Fávero Salvadori
- 2- Pesquisadores colaboradores: Décio Salvadori Junior
- 3- Avaliação de Risco da Pesquisa: Não haverá riscos extras porque a coleta da amostra de sangue para este estudo será feita durante a angioplastia.
- 4- Duração prevista da participação do paciente na entrevista: 10 minutos

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA:

1 - Justificativa e Objetivos da Pesquisa: este estudo tem como objetivo contribuir para se entender como a reestenose coronariana (novo fechamento da coronária no local em que foi colocado o stent) acontece e como preveni-la.

2 - Procedimentos utilizados: pacientes encaminhados para a realização de cinecoronariografia e que não apresentaram lesão passível da realização de angioplastia coronária. No momento em que for retirado o cateter será coletada uma amostra de sangue.

3 - Amostra coletada: 15ml de sangue.

4 - Desconfortos e riscos: não haverá risco e desconforto extras, uma vez que o sangue será coletado no momento da retirada do cateter da veia, não havendo necessidade de nova picada.

5 - Benefícios que poderão ser obtidos: no futuro, os resultados deste estudo poderão contribuir para a identificação precoce de pessoas que têm maior risco para desenvolver esse problema no coração (fechamento da artéria coronária) e também para a sua prevenção.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

- 1- Fui esclarecido sobre garantia de ter acesso a qualquer momento, às informações sobre procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas?
[] SIM [] NÃO
- 2- Fui esclarecido que terei a liberdade de retirar meu consentimento e sair desta pesquisa a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo quanto à continuidade do meu tratamento.
[] SIM [] NÃO
- 3- Fui esclarecido de que a segurança de minha identidade será preservada, mantendo-se todas as informações em caráter confidencial?
[] SIM [] NÃO
- 4- Fui esclarecido sobre a disponibilidade de assistência por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa?
[] SIM [] NÃO
- 5- Fui esclarecido sobre a viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa?
[] SIM [] NÃO
- 6- Fui esclarecido que não receberei qualquer remuneração financeira por participar desta pesquisa?
[] SIM [] NÃO
- 7- Fui informado de que os médicos e pesquisadores que participam deste projeto de pesquisa estarão a minha disposição (24 horas) para esclarecimento de qualquer questão relacionado à pesquisa?
[] SIM [] NÃO

V. CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Eu, _____ abaixo assinado, declaro que fui esclarecido sobre o objetivo do presente estudo, sobre os eventuais desconfortos que poderei sofrer, assim como sobre os benefícios do estudo. Concordo, portanto, em participar, na qualidade de voluntário, do referido Projeto de Pesquisa, sob livre e espontânea vontade. Também tenho ciência de que a não concordância com o estudo, em qualquer momento, não acarretará prejuízo ao meu tratamento.

_____, ____ de _____ de _____

Paciente ou responsável

ou

Pesquisador

VI - INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS:

Nome: Daisy Maria Fávero Salvadori

Endereço: Rua Antônio Sabino Santa Rosa, nº70. Apto 34C

Telefone: 14- 3882-6448

Nome: Dr. Décio Salvadori Junior

Endereço: Rua Fernandes de Abreu, nº151. Apto 1901

Telefone: 11- 3073-1207

OBS: Este documento será elaborado em duas vias, sendo uma via entregue ao sujeito da pesquisa e a outra mantida arquivada pela pesquisadora.

Qualquer dúvida adicional, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, através do fone: (14) 3811-61-43

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

FACULDADE DE MEDICINA DA UNESP – BOTUCATU
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA – CURSO DE PÓS- GRADUAÇÃO EM
PATOLOGIA

PROJETO DE PESQUISA

ALTERAÇÕES GENÔMICAS RELACIONADAS À REESTENOSE CORONARIANA APÓS IMPLANTE DE STENT

Você está sendo convidado (a) a participar de um estudo sobre reestenose. A estenose é o fechamento da artéria coronária que impede a passagem do sangue e que ocorre devido a placas de gordura dentro da artéria. Qualquer pessoa pode desenvolver esta doença, mas aquelas que apresentam diabetes, hipertensão arterial, colesterol aumentado, aumento de peso, estresse e os fumantes, têm maior risco. Quando ocorre o fechamento da artéria pela placa de gordura, na maioria dos casos é indicado o procedimento de angioplastia coronariana, com implante de *stent* (prótese metálica expansível, semelhante a uma mola), para permitir a expansão da artéria e a passagem do sangue. Em certas situações, alguns pacientes que fizeram a angioplastia, voltam a ter o entupimento da artéria. No entanto, as causas desse novo fechamento da artéria (reestenose) não são totalmente conhecidas. Dessa forma, este estudo está sendo desenvolvido visando contribuir para esclarecer quais são os motivos que levam à reestenose.

Esse termo de consentimento que você deverá assinar foi elaborado de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, sobre pesquisa envolvendo seres humanos.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pacientes submetidos à angioplastia no Hospital Beneficência Portuguesa de São Paulo

I. IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE (VOLUNTÁRIO)

Nome:		
RG:		Código (não preencher) :
Endereço:		
Cidade:		Bairro:
CEP:	Estado:	Telefone:

II. DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

Convido o (a) Sr.(a) a participar do Projeto de Pesquisa “Alterações genômicas relacionadas à reestenose coronariana após implante de stent” que será desenvolvido por mim, Juliana Lara Padovani, no Laboratório de Toxicogenômica e Nutrigenômica, do Departamento de Patologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

Pesquisador responsável: Daisy Maria Fávero Salvadori

Pesquisadores colaboradores: Décio Salvadori Junior

Avaliação de Risco da Pesquisa: Não haverá riscos extras porque a coleta da amostra de sangue para este estudo será feita durante a angioplastia.

Duração prevista da participação do paciente na entrevista: 10 minutos

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA:

1 - Justificativa e Objetivos da Pesquisa: este estudo tem como objetivo contribuir para se entender como a reestenose coronariana (novo fechamento da coronária no local em que foi colocado o stent) acontece e como preveni-la.

2 - Procedimentos utilizados: em média 6 meses após o implante de *stent*, o médico fará nova angiografia (introdução de cateter para filmar o interior das artérias coronárias) para avaliar se há risco da coronária fechar novamente. No momento em que for retirado o cateter será coletada uma amostra de sangue.

3 - Amostra coletada: 15ml de sangue.

4 - Desconfortos e riscos: Não haverá risco e desconforto extras, uma vez que o sangue será coletado no momento da retirada do cateter da veia, não havendo necessidade de nova picada.

5 - Benefícios que poderão ser obtidos: no futuro, os resultados deste estudo poderão contribuir para a identificação precoce de pessoas que têm maior risco para desenvolver esse problema no coração (fechamento da artéria coronária) e também para a sua prevenção.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

- 8- Fui esclarecido sobre garantia de ter acesso a qualquer momento, às informações sobre procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas?
 SIM NÃO
- 9- Fui esclarecido que terei a liberdade de retirar meu consentimento e sair desta pesquisa a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo quanto à continuidade do meu tratamento.
 SIM NÃO
- 10- Fui esclarecido de que a segurança de minha identidade será preservada, mantendo-se todas as informações em caráter confidencial?
 SIM NÃO
- 11- Fui esclarecido sobre a disponibilidade de assistência por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa?
 SIM NÃO
- 12- Fui esclarecido sobre a viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa?
 SIM NÃO
- 13- Fui esclarecido que não receberei qualquer remuneração financeira por participar desta pesquisa?
 SIM NÃO
- 14- Fui informado de que os médicos e pesquisadores que participam deste projeto de pesquisa estarão a minha disposição (24 horas) para esclarecimento de qualquer questão relacionado à pesquisa?
 SIM NÃO

V. CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Eu, _____ abaixo assinado, declaro que fui esclarecido sobre o objetivo do presente estudo, sobre os eventuais desconfortos que poderei sofrer, assim como sobre os benefícios do estudo. Concordo, portanto, em participar, na qualidade de voluntário, do referido Projeto de Pesquisa, sob livre e espontânea vontade. Também tenho ciência de que a não concordância com o estudo, em qualquer momento, não acarretará prejuízo ao meu tratamento.

_____, ____ de _____ de _____

_____ **ou** _____
 Paciente ou responsável Pesquisador

VI - INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS:

Nome: Daisy Maria Fávero Salvadori

Endereço: Rua Antônio Sabino Santa Rosa, nº70. Apto 34C

Telefone: 14- 3882-6448

Nome: Dr. Décio Salvadori Junior

Endereço: Rua Fernandes de Abreu, nº151. Apto 1901

Telefone: 11- 3073-1207

OBS: Este documento será elaborado em duas vias, sendo uma via entregue ao sujeito da pesquisa e a outra mantida arquivada pela pesquisadora.

Qualquer dúvida adicional, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, através do fone: (14) 3811-61-43

ANEXO III

Questionário

Código do tubo

QUESTIONÁRIO PARA PACIENTES SUBMETIDOS À ANGIOGRAFIA CORONARIANA

***Ao final da angiografia coronariana, o médico deverá assinalar o GRUPO diagnosticado para o paciente:**

- **GRUPO 1:** Grupo Controle: sem lesão
- **GRUPO 2:** Pacientes com obstrução $\leq 50\%$
- **GRUPO 3:** Pacientes com obstrução $\geq 50\%$

1) Identificação

Data: ____/____/____

Nome: _____

Sexo: M () F ()

Data de nascimento: ____/____/____

Local do nascimento: _____

Etnia: _____ Cor da pele: _____

Peso (Kg): _____ Altura (m): _____

Fones para contato: _____

2) Problemas de Saúde

- () Colesterol elevado
- () Triglicérides elevado
- () Ácido úrico elevado
- () Pressão alta
- () Diabetess
- () Problema cardíaco
- () Problemas com a tireóide
- () Depressão

Outros: _____

Observações: _____

3) Medicamentos que está usando:

4) Assinale quais doenças seus pais, tios ou irmão têm:

	Diabetess		Pressão Alta		Obesidade		Problema no coração	
	P	M	P	M	P	M	P	M
Pai/Mãe								
Avô (a)								
Tio (a)								
Irmão (a)								

P= Paterno M= Materno

5) Atividade Física:

Pratica alguma atividade física?

Sim () Não ()

Com qual frequência:

() 1 vez na semana

() 2 vezes na semana

() 3 ou mais vezes na semana

6) Tabagismo

Fumante () Sim () Não

Há quanto tempo (anos) _____

Quantos cigarros/dia _____

Tipo: () cachimbo () charuto () palha () papel com filtro ()
outros

Já fumou () Sim () Não

Há quanto tempo deixou de fumar
(meses) _____

Quantos cigarros
(dia) _____

Durante quanto tempo fumou (meses)

Tipo: () cachimbo () charuto () palha () papel

ANEXO IV

Lista de transcritos

Lista de genes e *probes* diferencialmente expressos* SR X CTR

Ordem	Símbolo Oficial	<i>p</i>	Log 2 fold change	Ordem	Símbolo Oficial	<i>p</i>	Log 2 fold change
1	lnc-CHIC1-2	0,046042	-2,63937	36	lnc-AC114947.1.1-2	0,014817	-1,63384
2	PAX8-AS1	0,045685	-2,12346	37	XLOC_I2_015760	0,009699	-1,63032
3	XLOC_I2_003293	0,039218	-2,06972	38	SH3KBP1	0,005861	-1,62311
4	LOC340335	0,001419	-2,04769	39	A_33_P3234410	0,044922	-1,62197
5	MAGI2-AS3	0,021973	-2,01744	40	APBA2	0,049187	-1,6182
6	LOC100131564	0,008059	-2,00621	41	RCSD1	0,006872	-1,61502
7	ANKRD20A5P	0,039082	-1,9664	42	LRRFIP1	0,010958	-1,61118
8	AMY1C	0,012765	-1,95856	43	APBA2	0,015946	-1,60179
9	NEAT1	0,008766	-1,8532	44	MLH3	0,022868	-1,60153
10	LOC100131541	0,006361	-1,8528	45	MEIS1	0,012531	-1,59754
11	MAGI2-AS3	0,040584	-1,84994	46	RPS3	0,015148	-1,59553
12	LINC00342	0,022208	-1,82135	47	ADHFE1	0,023659	-1,59513
13	PFN1P2	0,041274	-1,82103	48	FLJ38717	0,005296	-1,5931
14	LOC100131564	0,020044	-1,8144	49	RABGGTB	0,040535	-1,59303
15	A_33_P3884179	0,016278	-1,79366	50	LOC441268	0,006007	-1,58468
16	KANSL1-AS1	0,043555	-1,7929	51	LINC00174	0,011371	-1,57823
17	MAP3K7CL	0,022883	-1,77794	52	A_21_P0012018	0,019274	-1,57769
18	GOLGA8A	0,014213	-1,76529	53	A_24_P392690	0,009352	-1,57577
19	A_19_P0031890 4	0,030902	-1,76398	54	LINC01001	0,017798	-1,57297
20	NUTM2B-AS1	0,007708	-1,76233	55	TSPAN32	0,009549	-1,56745
21	A_21_P0012288	0,046599	-1,72328	56	MIR4697HG	0,005819	-1,56176
22	KANSL1-AS1	0,040348	-1,72265	57	ZNF783	0,040364	-1,56174
23	SETD1B	0,027197	-1,71641	58	C6orf48	0,035409	-1,55708
24	GOLGA8A	0,009499	-1,71212	59	GATA3	0,009875	-1,55586
25	A_33_P3305467	0,010329	-1,70671	60	PRKCH	0,041295	-1,55489
26	A_33_P3298980	0,02415	-1,70515	61	LINC00665	0,009924	-1,55348
27	A_33_P3365193	0,032471	-1,6872	62	IGF2R	0,013005	-1,55023
28	HIST1H2AC	0,015807	-1,67748	63	A_33_P3273136	0,008822	-1,54493
29	PAX8-AS1	0,027415	-1,67449	64	LOC200772	0,020124	-1,54262
30	LOC102724689	0,048126	-1,67447	65	FBXL16	0,030171	-1,54188
31	DKFZP58611420	0,009573	-1,65049	66	PI4KAP2	0,008126	-1,53868
32	A_33_P3237674	0,011601	-1,6504	67	CLSTN1	0,007837	-1,5365
33	RAD51-AS1	0,005448	-1,64238	68	PABPC1L	0,012813	-1,53573
34	SLC26A11	0,007014	-1,63887	69	MTURN	0,00842	-1,53557
35	AMY1B	0,048036	-1,63788	70	CTSLP8	0,03623	-1,53517

Lista de genes e *probes* diferencialmente expressos* SR X CTR

Ordem	Símbolo Oficial	<i>p</i>	Log 2 fold change	Ordem	Símbolo Oficial	<i>p</i>	Log 2 fold change
71	SNORD11	0,026566	-1,53196	106	OR5V1	0,031039	1,511445
72	LINC01004	0,008057	-1,53138	107	SNORA17	0,030626	1,51161
73	NPIP8	0,014973	-1,52532	108	CTNNB1	0,000835	1,512249
74	DENR	0,020112	-1,5231	109	SCARNA9L	0,001359	1,512539
75	CXCR2P1	0,005764	-1,52268	110	XLOC_I2_008130	0,007022	1,513627
76	ACVR1C	0,034287	-1,52182	111	ZBTB32	0,003001	1,518722
77	BTN3A2	0,027939	-1,52004	112	REXO1	0,042047	1,522936
78	A_33_P3245665	0,029849	-1,51979	113	TRIP12	0,000651	1,523289
79	GNAS	0,010798	-1,51839	114	A_33_P3218564	0,03314	1,523336
80	ZSCAN18	0,030599	-1,51797	115	A_33_P3370515	0,004644	1,524202
81	FBLN5	0,012816	-1,51628	116	A_21_P0008601	0,040046	1,524474
82	STIM1	0,008402	-1,51572	117	SPATA21	0,041373	1,524646
83	TPP1	0,017493	-1,51285	118	A_21_P0014876	0,036467	1,526606
84	Inc-PDE5A-1	0,014817	-1,51076	119	SPOCK2	0,0283	1,529762
85	A_21_P0014584	0,02576	-1,50765	120	XLOC_I2_015561	0,022264	1,533322
86	PTGS1	0,006466	-1,50703	121	A_33_P3289976	0,018877	1,534701
87	A_24_P350307	0,045898	-1,50593	122	A_33_P3375910	0,035708	1,535775
88	MORN3	0,011004	-1,50575	123	Inc-ENPP6-1	0,005945	1,535944
89	WHAMMP2	0,010923	-1,50493	124	IP6K1	0,019053	1,536339
90	PDS5A	0,022783	-1,50435	125	DNAH17	0,041383	1,537493
91	CCDC92	0,012003	-1,50131	126	TMEM8C	0,024611	1,538621
92	GSDMB	0,03746	-1,50129	127	HIST1H3D	0,034253	1,542027
93	SP2	0,009567	-1,50101	128	ITGA4	0,039414	1,543061
94	A_21_P0005117	0,038904	1,500266	129	HMX1	0,033437	1,54314
95	WDPCP	0,014172	1,500485	130	C18orf12	0,043851	1,545176
96	PAEP	0,040361	1,500901	131	TMEM8C	0,004707	1,545473
97	NUDT8	0,02741	1,503609	132	Inc-PMM2-6	0,040594	1,545975
98	TOR2A	0,047917	1,503706	133	Inc-STX17-1	0,033906	1,548022
99	KIR2DS4	0,045408	1,506092	134	LOC101929866	0,044347	1,548241
100	MTRNR2L1	0,010987	1,506107	135	ACAD10	0,028215	1,561713
101	Inc-RABL3-1	0,0469	1,506334	136	A_21_P0008219	0,017478	1,563844
102	LOC729162	0,030914	1,506344	137	PCDHGA7	0,019723	1,565122
103	LINC01122	0,00909	1,508844	138	MEF2D	0,028283	1,565737
104	A_33_P3274001	0,030189	1,509666	139	TMEM88B	0,004337	1,566802
105	DOK3	0,035491	1,50989	140	A_33_P3295814	0,040292	1,567403

Lista de genes e *probes* diferencialmente expressos* SR X CTR

Ordem	Símbolo Oficial	<i>p</i>	Log 2 fold change	Ordem	Símbolo Oficial	<i>p</i>	Log 2 fold change
141	HIST1H4D	0,030011	1,570063	176	SFTA1P	0,002949	1,608894
142	RFPL4AL1	0,043328	1,572407	177	lnc-CDC42-1	0,023181	1,611287
143	SCARNA2	0,047232	1,573366	178	CASKIN1	0,015194	1,612564
144	GLI4	0,042373	1,575101	179	lnc-RP11-15819.5.1-2	0,044437	1,613137
145	XLOC_I2_015295	0,042374	1,577017	180	MMP25-AS1	0,017922	1,614081
146	NKX2-5	0,040304	1,578346	181	CCDC129	0,045327	1,614841
147	A_33_P3299047	0,040726	1,57975	182	ZDHHC20	0,003365	1,614844
148	KRT73	0,024059	1,580056	183	MME	0,040703	1,616309
149	E1A_r60_1	0,024595	1,582679	184	lnc-DTYMK-3	0,001811	1,61986
150	A_33_P3319937	0,020402	1,583508	185	MON1B	0,048084	1,620563
151	FAM219A	0,02165	1,585297	186	AIF1L	0,031528	1,621684
152	A_33_P3306526	0,038527	1,585987	187	MIATNB	0,049248	1,622172
153	TMEM238	0,026835	1,586442	188	lnc-EIF5AL1-1	0,015791	1,622807
154	A_33_P3297545	0,023876	1,586688	189	ATP7A	0,019222	1,625043
155	OR10H2	0,015099	1,587349	190	DENND6A	0,012032	1,626663
156	DBET	0,019161	1,587776	191	VPS9D1	0,012209	1,627305
157	A_33_P3347522	0,007036	1,587941	192	A_33_P3223631	0,012896	1,630648
158	ARAFP2	0,019123	1,589106	193	RGS3	0,027352	1,630768
159	A_33_P3231677	0,044209	1,589126	194	NFKBIL1	0,018297	1,632043
160	A_33_P3701139	0,048455	1,5898	195	A_33_P3321682	0,020076	1,633098
161	CHST6	0,036382	1,59043	196	SNORD3B-1	0,017069	1,636486
162	TERC	0,033649	1,590978	197	SNORD71	0,022028	1,637137
163	EXOC3L1	0,040392	1,591941	198	AIF1L	0,046456	1,640365
164	LOC100499194	0,025608	1,592157	199	RNF165	0,009241	1,642105
165	LOC101928521	0,026317	1,593124	200	A_33_P3291329	0,018367	1,643029
166	lnc-MOXD1-1	0,037064	1,594241	201	LOC439951	0,021247	1,646371
167	A_33_P3441583	0,013983	1,594703	202	XLOC_I2_005952	0,015843	1,646405
168	GALR3	0,010385	1,595158	203	lnc-TMEM105-2	0,016607	1,647177
169	TUSC8	0,022212	1,596244	204	A_33_P3410201	0,001093	1,64957
170	LINC01504	0,00947	1,596758	205	LCE1D	0,030418	1,652236
171	UNCX	0,034157	1,599608	206	A_33_P3385988	0,043469	1,653402
172	ADAMTS7P1	0,038535	1,601085	207	A_23_P333129	0,029621	1,653686
173	POR	0,016341	1,601938	208	KRTAP1-3	0,015174	1,654159
174	CYP2B6	0,005375	1,604024	209	RNU6ATAC	0,025209	1,654193
175	lnc-KIAA0196-2	0,046875	1,605141	210	MAML1	0,003153	1,659415

Lista de genes e *probes* diferencialmente expressos* SR X CTR

Ordem	Símbolo Oficial	<i>p</i>	Log 2 fold change	Ordem	Símbolo Oficial	<i>p</i>	Log 2 fold change
211	HCN2	0,019669	1,662351	246	LOC401286	0,049187	1,730889
212	C9orf173-AS1	0,035014	1,662512	247	LOC101927059	0,049589	1,7328
213	CNN2	0,048758	1,664106	248	TUBA3D	0,02348	1,734513
214	BOLA3-AS1	0,028364	1,669334	249	A_33_P3327140	0,004557	1,741321
215	A_19_P00322569	0,046918	1,67003	250	ADAMTS7	0,012106	1,743471
216	GPR150	0,026361	1,67159	251	TPSG1	0,014299	1,746909
217	HSF1	0,034579	1,672183	252	A_33_P3283061	0,047275	1,748458
218	GE_BrightCorner	0,003131	1,674487	253	CALY	0,008602	1,7495
219	A_21_P0013166	0,035162	1,677131	254	ELFN1	0,015296	1,750274
220	LINC01088	0,021733	1,684359	255	DIABLO	0,003595	1,754122
221	A_33_P3373433	0,002031	1,684489	256	BCAS4	0,022369	1,755297
222	BCORP1	0,027841	1,685829	257	LBX1	0,000562	1,755898
223	FOXP4	0,00382	1,687074	258	ZNF467	0,015173	1,756363
224	FSD1	0,025085	1,688191	259	EIF4E2	0,02974	1,756374
225	CCM2L	0,005157	1,689083	260	TBC1D3L	0,035453	1,756675
226	MAFA	0,049031	1,690061	261	KCNH3	0,024174	1,75722
227	lnc-MCCC1-1	0,018462	1,692168	262	SLC25A3P1	0,019887	1,760958
228	HMBS	0,036993	1,694433	263	SNORD33	0,025611	1,762468
229	LOC102723701	0,012193	1,696042	264	LOC100130152	0,046657	1,767299
230	SNORD68	0,005112	1,697419	265	A_33_P3412687	0,027796	1,767956
231	CD72	0,016512	1,698161	266	LOC644277	0,032835	1,768162
232	TTY15	0,03054	1,700074	267	A_19_P00321388	0,01122	1,770159
233	A_33_P3218741	0,01316	1,704531	268	A_33_P3362737	0,035672	1,770908
234	A_24_P724153	0,03875	1,705746	269	ACBD7	0,01439	1,776295
235	MTRNR2L2	0,03763	1,706604	270	DYTN	0,04598	1,780499
236	NCOA4	0,007808	1,709133	271	A_33_P3341540	0,002869	1,780978
237	SCGB3A1	0,019141	1,70993	272	UTS2R	0,00617	1,78105
238	A_33_P3334342	0,017305	1,710318	273	lnc-C16orf42-2	0,024591	1,781253
239	LOC101927285	0,005864	1,71501	274	A_33_P3312030	0,038392	1,787056
240	CBX7	0,038837	1,718708	275	TFEB	0,002399	1,791637
241	CCDC78	0,034754	1,721178	276	lnc-ZKSCAN1-1	0,031301	1,794857
242	HMG20B	0,030592	1,721256	277	PPA2	0,029804	1,804665
243	DDX3Y	0,04176	1,721328	278	A_32_P194962	0,026457	1,808643
244	DNM1	0,004259	1,721921	279	SMR3A	0,04687	1,808784
245	PRR36	0,008637	1,722632	280	ARHGAP33	0,010807	1,810864

Lista de genes e *probes* diferencialmente expressos* SR X C

Ordem	Símbolo Oficial	<i>p</i>	Log 2 fold change	Ordem	Símbolo Oficial	<i>p</i>	Log 2 fold change
281	VWA1	0,046564	1,811415	316	NKX2-5	0,040304	1,578346
282	A_33_P3310512	0,001739	1,811546	317	A_33_P3299047	0,040726	1,57975
283	ZC3HAV1L	0,012851	1,813319	318	A_32_P194962	0,026457	1,808643
284	FAM57B	0,030884	1,816849	319	SMR3A	0,04687	1,808784
285	A_33_P3407601	0,02629	1,817275	320	ARHGAP33	0,010807	1,810864
286	NIP7	0,007475	1,824831	321	LOC101929452	0,014592647	2,766130116
287	SEMA6C	0,022314	1,829087	322	DPEP3	0,016821083	2,78889732
288	A_24_P15640	0,031416	1,832587	323	A_33_P3287105	0,000190066	2,827069788
289	A_32_P115558	0,016078	1,834717	324	RNVU1-18	0,004204532	2,914189831
290	FAM21C	0,01406	1,839211	325	LINC00999	0,011462451	2,425238906
291	PTMS	0,007312	1,840133	326	RNU2-1	0,017922413	2,431874845
292	PTMS	0,040327	1,84015	327	A_33_P3355717	0,0184938	2,435610951
293	VSX1	0,015709	1,841356	328	EIF1AY	0,045771	1,8554
294	A_33_P3421108	0,026162	1,841486	329	ANXA8	0,045274	1,857269
295	LOC400590	0,04561	1,843817	330	Inc-EPHA6-1	0,026284	1,862758
296	LGALS3	0,009814	1,848041	331	SNORA37	0,038981	1,865053
297	A_33_P3230037	0,029452	1,849698	332	LOC100132874	0,041126	1,87341
298	LKAAEAR1	0,030837	1,850174	333	HOXA9	0,03195	1,876399
299	SURF1	0,016225	1,852812	334	Inc-FBLN2-1	0,015346	1,877935
300	Inc-CDH4-1	0,044214	1,853859	335	A_33_P3277805	0,015399	1,879563
301	A_21_P0008601	0,040046	1,524474	336	SBNO2	0,009867	1,883284
302	SPATA21	0,041373	1,524646	337	ZSCAN2	0,013706	1,8844
303	PCDHGA7	0,019723	1,565122	338	Inc-ERICH1-5	0,005592	1,901915
304	MEF2D	0,028283	1,565737	339	SORBS3	0,018948	1,906126
305	TMEM88B	0,004337	1,566802	340	IQSEC3	0,030675	1,909196
306	A_33_P3295814	0,040292	1,567403	341	A_21_P0014502	0,015793	1,912044
307	E1A_r60_1	0,024595	1,582679	342	LINC00523	0,021127	1,917015
308	A_33_P3319937	0,020402	1,583508	343	LZTS2	0,002234	1,925536
309	FAM219A	0,02165	1,585297	344	HMHB1	0,03704	1,928211
310	Inc-DTYMK-3	0,001811	1,61986	345	SNORA54	0,030218	1,929773
311	MON1B	0,048084	1,620563	346	LOC644277	0,020352	1,934022
312	AIF1L	0,031528	1,621684	347	A_33_P3374903	0,007492	1,940019
313	SCARNA2	0,047232	1,573366	348	VAMP2	0,005332	1,941308
314	GLI4	0,042373	1,575101	349	MIEF1	0,021078	1,941456
315	XLOC_I2_015295	0,042374	1,577017	350	A_21_P0011406	0,019613	1,944302

Tabela XX – Lista de genes e *probes* diferencialmente expressos* SR X CTR

Ordem	Símbolo Oficial	p	Log 2 fold change	Ordem	Símbolo Oficial	p	Log 2 fold change
351	A_33_P3381762	0,03812	1,948567	386	PNPLA2	0,009079	2,107143
352	RAPH1	0,025299	1,948589	387	A_33_P3315899	0,029979	2,109597
353	Inc-C5orf47-2	0,03157	1,948723	388	POLR2H	0,033332	2,116473
354	A_33_P3415617	0,003296	1,95101	389	KANK3	0,001402	2,12996
355	PPDPF	0,020005	1,959061	390	TTC28	0,000941	2,136063
356	Inc-LTBP3-2	0,028827	1,959601	391	Inc-C1orf222-2	0,015181	2,137253
357	A_19_P0080565 1	0,020329	1,960262	392	A_33_P3226237	0,028004	2,137311
358	A_33_P3390546	0,011488	1,960729	393	AHSA2	0,003911	2,14215
359	LINC00888	0,019816	1,961605	394	A_33_P3417123	0,012245	2,142281
360	KLRF1	0,02674	1,978102	395	LINC00884	0,040868	2,143152
361	SEPT7-AS1	0,032171	1,981117	396	SNORD10	0,033628	2,145377
362	FOXO3	0,045173	1,982449	397	LOC284454	0,001307	2,150081
363	Inc-ZKSCAN1-1	0,0444	1,984298	398	LOC283335	0,001172	2,151426
364	CEACAM19	0,013548	1,991364	399	PKD1	0,016981	2,155893
365	LINC01001	0,010363	1,991368	400	RBM10	0,001304	2,159543
366	A_33_P3283064	0,00937	1,998664	401	LOC284379	0,008835	2,159689
367	TNRC18	0,043096	2,011707	402	A_33_P3252134	0,000404	2,166684
368	LOC400558	0,006931	2,013563	403	ZNF746	0,022861	2,166932
369	HOXA10	0,039007	2,013847	404	SNORD52	0,034311	2,173968
370	A_33_P3247095	0,001172	2,033	405	ZNF713	0,000607	2,174665
371	NMNAT1	0,001927	2,033067	406	RBFOX3	0,033121	2,17986
372	LETM1	0,001174	2,041327	407	XLOC_I2_013837	0,0256	2,180184
373	A_33_P3225572	0,009761	2,060609	408	A_21_P0008917	0,041193	2,198592
374	A_33_P3337742	0,041876	2,076506	409	HDGFRP2	0,000583	2,202752
375	HYAL4	0,000783	2,083881	410	A_33_P3263747	0,031631	2,20351
376	SSTR3	0,028167	2,084009	411	A_33_P3258846	0,006005	2,222469
377	CYGB	0,018454	2,085869	412	A_33_P3388527	0,025517	2,227925
378	A_33_P3719214	0,000468	2,089125	413	ZNF497	0,046131	2,239928
379	RN7SK	0,02312	2,097342	414	PYY2	0,016423	2,241872
380	XLOC_I2_010854	0,02614	2,097401	415	SNORD3B-1	0,009759	2,243098
381	LOC100128364	0,043052	2,099891	416	TINAGL1	0,024337	2,244766
382	PPP1R14A	0,041286	2,100627	417	KCNQ2	0,012125	2,244934
383	MGA	0,000663	2,10068	418	A_33_P3311646	0,000688	2,251995
384	Inc-UBR2-1	0,023026	2,103208	419	Inc-CMTM4-1	0,041355	2,258145
385	FAM131C	0,042507	2,104618	420	CCDC71	0,010365	2,259479

Lista de genes e *probes* diferencialmente expressos* SR X CTR

Ordem	Símbolo Oficial	<i>p</i>	Log 2 fold change	Ordem	Símbolo Oficial	<i>p</i>	Log 2 fold change
421	LDHAL6A	0,011174	2,261198	458	A_33_P3247077	0,000716318	2,479625513
422	NUPL2	0,001352	2,267499	459	PRKXP1	0,021378972	2,479867739
423	GBP6	0,000446	2,270299	460	A_33_P3374365	0,021959701	2,486154919
424	GLUD1P3	0,012918	2,275194	461	A_33_P3327818	0,001196456	2,486831336
425	LY6G6D	0,026368	2,278246	462	LOC645553	0,01865089	2,494673063
426	A_33_P32613358	0,002041	2,283587	463	COX6B2	0,000296916	2,498450056
427	A_33_P3412560	0,000881	2,292067	464	ZNF2	0,000205652	2,50844338
428	SNORA73A	0,046437	2,29877	465	TMEM200C	0,047532196	2,511410229
429	A_33_P3229390	0,001017	2,30022	466	TBXA2R	0,000312253	2,514881905
430	WDR90	0,035352	2,300989	467	A_33_P3244361	0,000342045	2,515563627
431	TPP1	0,016156	2,303108	468	lnc-BTRC-2	0,025312451	2,518760773
432	lnc-EPHA6-1	0,006878	2,315317	469	RNA5-8S5	0,026174911	2,526197609
433	A_33_P3284854	0,022021	2,317673	470	TAS1R3	0,03792115	2,533390819
434	SNORD105B	0,003631	2,320507	471	A_33_P3336223	0,000333102	2,553589535
435	POLR2J2	0,000277	2,324094	472	AMN	0,018416776	2,565891707
436	A_33_P3381292	0,025982	2,329772	473	XLLOC_I2_013383	0,029211104	2,576613898
437	FBRSL1	0,013089	2,336647	474	PTAFR	0,028700948	2,577875723
438	LINC00963	0,000292	2,359848	475	SNORA73B	0,03492269	2,581016552
439	LOC100133182	0,014081	2,378281	476	A_19_P0031765 3	0,017196297	2,607413287
440	A_33_P3263512	0,000165	2,391856	477	A_33_P3234540	0,021233966	2,609728659
441	A_21_P0013714	0,048436	2,392141	478	A_33_P3246010	0,028142329	2,635331597
442	A_33_P3256344	0,000491497	2,394057167	479	lnc-RTL1-2	0,02003753	2,637570514
443	A_33_P3392213	0,000494665	2,397912876	480	HIF3A	0,037105817	2,665900382
444	DNASE1L1	0,038163416	2,404367697	481	A_33_P3272352	0,00014269	2,68199351
445	LOC400590	0,033806585	2,404874061	482	FAM118A	0,000304572	2,73158533
446	lnc-NLGN2-1	0,038260555	2,406692295	483	CCDC177	0,049350802	2,736300168
447	XLLOC_I2_004844	0,009748792	2,406712609	484	KIAA1875	0,000217989	2,764298143
448	PSD4	0,013182079	2,408523283	485	LOC101929452	0,014592647	2,766130116
449	A_33_P3278159	0,000240617	2,413017191	486	DPEP3	0,016821083	2,78889732
450	A_33_P3335920	0,036494418	2,417337256	487	A_33_P3287105	0,000190066	2,827069788
451	LINC00999	0,011462451	2,425238906	488	RNVU1-18	0,004204532	2,914189831
452	RNU2-1	0,017922413	2,431874845	489	A_21_P0004121	0,02221734	2,975944148
453	A_33_P3355717	0,0184938	2,435610951	490	NYX	0,027174084	3,023547254
454	SNORA73B	0,032432963	2,436639834	491	MOCS3	0,009716969	3,174885831
455	A_33_P3245620	0,00107076	2,450216586	492	PHOSPHO1	0,040142944	3,227700961
456	UVSSA	0,024733271	2,451527627	493	LINC00941	0,013405177	9,514392564
457	A_21_P0011573	0,044159917	2,471547732				

Tabela XX – Lista de genes e *probes* diferencialmente expressos* CR X CTR

Ordem	Símbolo Oficial	<i>p</i>	Log 2 fold change	Ordem	Símbolo Oficial	<i>p</i>	Log 2 fold change
1	KANSL1-AS1	0,015107465	-1,990727481	12	ASGR1	0,016886351	-1,534862312
2	KANSL1-AS1	0,009439003	-1,981128896	13	ANG	0,00418403	-1,519404438
3	KANSL1-AS1	0,014192276	-1,88728404	14	FCGR2B	0,011628079	-1,50543677
4	FOLR3	0,034264559	-1,786116245	15	WHAMMP2	0,033850799	-1,500832389
5	A_33_P3288219	0,00813901	-1,660557254	16	YY1	0,010776913	1,501600234
6	COL18A1	0,031798533	-1,649142503	17	FOXO3	0,023739792	1,533924958
7	NDST1	0,019704915	-1,585002163	18	ELFN1	0,045202046	1,534322553
8	MCUR1	0,005501978	-1,575177602	19	CNOT6L	0,042132676	1,549159857
9	VARS2	0,005249848	-1,568905043	20	UTS2R	0,014416214	1,635419746
10	PRKCDBP	0,0030607	-1,567560495	21	SGTB	0,049263918	1,635915574
11	TMTC1	0,021497681	-1,536821863				

Lista de genes e *probes* diferencialmente expressos* CR X SR

Ordem	Símbolo Oficial	p	Log 2 fold change	Ordem	Símbolo Oficial	p	Log 2 fold change
1	FOLR3	0,019621268	-7,07538612	36	YWHAZP3	0,006261952	-1,921492973
2	MYOM2	0,04477464	-4,086259472	37	AHSA2	0,011632455	-1,920126127
3	MMP9	0,016130031	-2,876929622	38	R3HDM4	0,018844773	-1,896125693
4	LINC00884	0,007072381	-2,659467149	39	Inc-AL445989.1-2	0,009615943	-1,886007465
5	Inc-RTL1-2	0,023274806	-2,539679331	40	RBFOX3	0,047702655	-1,879266514
6	MOCS3	0,026863675	-2,486188322	41	A_33_P3375133	0,006782978	-1,855534657
7	SDC1	0,025714853	-2,462399239	42	LOC441455	0,047202505	-1,83870955
8	Inc-BTRC-2	0,037553971	-2,405384385	43	LOC284379	0,044935226	-1,838372508
9	PYY2	0,01347781	-2,340808021	44	MAP2K3	0,006484321	-1,827650808
10	ZNF497	0,018338601	-2,339316492	45	ITGB3	0,048605148	-1,823690036
11	CCDC71	0,005349104	-2,291163936	46	CNN2	0,018747343	-1,808156542
12	LY6G6D	0,02812168	-2,217459119	47	NCOA4	0,004199519	-1,798835018
13	PTAFR	0,049362396	-2,205098987	48	Inc-SLC9A1-1	0,024553775	-1,798227741
14	ITGB2	0,00560283	-2,175245353	49	BTNL8	0,038242363	-1,787132863
15	KRT23	0,045560457	-2,152449057	50	LINC01506	0,020927114	-1,785509741
16	LOC100132874	0,017744803	-2,147117886	51	Inc-ASB4-3	0,01066039	-1,774123153
17	LOC643802	0,009810145	-2,071329528	52	HMBS	0,022525356	-1,761274134
18	MIEF1	0,009974512	-2,042564071	53	A_33_P3412687	0,037779206	-1,746014327
19	FOXH1	0,048747169	-2,038968703	54	A_33_P3327818	0,032226315	-1,737331897
20	PSD	0,036989635	-2,038548924	55	A_33_P3260021	0,009042159	-1,735690022
21	PSD4	0,025764773	-2,03625533	56	BRD3	0,012097225	-1,733171242
22	UVSSA	0,041177504	-2,031328443	57	A_33_P3256344	0,021474421	-1,72918741
23	XLOC_I2_013837	0,042716946	-2,023589865	58	PPP3R1	0,030188183	-1,726291147
24	CXCL1	0,033719123	-2,01618421	59	LOC101929866	0,01027431	-1,714235074
25	PRKXP1	0,049145819	-2,014232894	60	MT-ND6	0,029294442	-1,713816451
26	A_33_P3324781	0,008222628	-2,011760934	61	RAB37	0,006269349	-1,710886721
27	BCL2L11	0,015541919	-1,997221147	62	CSGALNACT1	0,001932608	-1,704986404
28	A_33_P3381292	0,040284756	-1,979396501	63	XLOC_I2_015885	0,041248478	-1,698862954
29	Inc-C5orf47-2	0,017080193	-1,977303224	64	CEACAM19	0,047056611	-1,694320028
30	KMT2E-AS1	0,026611046	-1,958311092	65	A_21_P0013759	0,041857711	-1,694260017
31	TNFRSF10C	0,037681959	-1,950914439	66	Inc-STX17-1	0,009109075	-1,690168763
32	GLUD1P3	0,037843839	-1,929122372	67	EIF4E2	0,049654671	-1,687207313
33	LOC100130152	0,014285587	-1,928503757	68	LGALS3	0,02545045	-1,683666645
34	TACSTD2	0,03825127	-1,926827216	69	ATP7A	0,010086247	-1,682605771
35	DNAJB5	0,046852265	-1,925952882	70	BTN2A1	0,010235729	-1,682539163

Lista de genes e *probes* diferencialmente expressos* CR x SR

Ordem	Símbolo Oficial	p	Log 2 fold change	Ordem	Símbolo Oficial	p	Log 2 fold change
71	WHAMMP1	0,006366578	-1,677098535	106	SMG5	0,003229226	-1,570423848
72	A_33_P3257486	0,042324813	-1,667597843	107	LOC284454	0,039415698	-1,569500499
73	LOC100499194	0,017358029	-1,666850495	108	JUNB	0,015614466	-1,566488144
74	MME	0,027994461	-1,660166519	109	EXOC3L1	0,030328782	-1,566120413
75	TBXA2R	0,022256741	-1,660017205	110	LTA4H	0,031189388	-1,564222133
76	MMP1	0,025808029	-1,656639173	111	HSPB8	0,011640824	-1,563214618
77	NADK2	0,011522842	-1,654464879	112	TAB2	0,024274228	-1,563103449
78	VASP	0,001929819	-1,65392615	113	DPCD	0,007386354	-1,561985023
79	KANK3	0,028528842	-1,649540164	114	ACTA2-AS1	0,011163314	-1,557166357
80	A_21_P0013166	0,04127201	-1,646932465	115	A_33_P3244361	0,028758424	-1,552861468
81	A_33_P3336223	0,022445726	-1,646038832	116	IGSF9	0,02691728	-1,551704314
82	DNAH17	0,016930366	-1,643516449	117	PGA4	0,026176099	-1,549527766
83	HRASLS2	0,040813994	-1,639918092	118	MB21D1	0,005992787	-1,544524828
84	CMKLR1	0,001636089	-1,624542088	119	LOC102724231	0,004786792	-1,541764945
85	ATXN3	0,012413644	-1,618341731	120	HDGFRP2	0,035592942	-1,540843954
86	A_33_P3272352	0,025225001	-1,617178258	121	A_33_P3392213	0,04602794	-1,540096578
87	RNVU1-18	0,0179425	-1,616774875	122	CA4	0,016860979	-1,539521427
88	FOXN2	0,049030346	-1,616407125	123	COL18A1	0,000875511	-1,537718172
89	RNU2-1	0,025126423	-1,614337659	124	A_33_P3260974	0,031621567	-1,537053137
90	RAB1B	0,001785589	-1,607363088	125	NFE2	0,013209809	-1,536333454
91	WHAMMP3	0,026707672	-1,605544102	126	DNAJC3	0,037529502	-1,532207956
92	TTC28	0,020840416	-1,605215988	127	lnc-KIDINS220-6	0,039054024	-1,531716166
93	ANXA8L1	0,048059684	-1,60333043	128	F13A1	0,030337415	-1,530949678
94	A_33_P3288871	0,038506144	-1,602102441	129	RBM10	0,047313314	-1,530282979
95	ODF3B	0,024238299	-1,597553212	130	LOC283335	0,035527384	-1,527485021
96	RFPL4AL1	0,034699062	-1,590424216	131	NHSL2	0,025756914	-1,525976396
97	LINC01504	0,010655617	-1,590258816	132	A_33_P3263512	0,022942127	-1,525938074
98	SLC25A29	0,006326189	-1,587359478	133	ADAM15	0,011006399	-1,525524092
99	LINC01119	0,040280809	-1,585376259	134	WDR1	0,002520453	-1,523157378
100	NADK	0,014939785	-1,581649981	135	ADM	0,014604927	-1,521168221
101	ADAM15	0,00442155	-1,57933304	136	KLHDC7B	0,033580003	-1,520254717
102	ADAMTS7	0,041522467	-1,578400411	137	A_33_P3375910	0,038993359	-1,519721841
103	UCKL1	0,044964466	-1,578349933	138	DOK2	0,018729956	-1,515618986
104	CARD6	0,008175345	-1,576321213	139	A_33_P3412695	0,03121217	-1,514821092
105	CASP3	0,002908851	-1,574559215	140	SLC45A4	0,003927891	-1,514733317

Lista de genes e *probes* diferencialmente expressos* CR X SR

Ordem	Símbolo Oficial	p	Log 2 fold change	Ordem	Símbolo Oficial	p	Log 2 fold change
141	PBX2	0,003957394	-1,514445792	176	ITPKB	0,003911534	1,530505649
142	RASSF5	0,005343819	-1,513520609	177	CREB1	0,047661154	1,53157029
143	GPR162	0,021012492	-1,513338097	178	FAM73A	0,014238457	1,532634919
144	ALYREF	0,005485965	-1,509469447	179	NR1D2	0,018743836	1,533369711
145	MIAT	0,045291682	-1,507439415	180	RAD51-AS1	0,040272857	1,533524157
146	THBS1	0,04732898	-1,507188741	181	GATA3	0,012253235	1,535275781
147	RNA5-8S5	0,047283444	-1,50654015	182	MEGF6	0,003389047	1,53592279
148	A_32_P152696	0,025776349	-1,504883562	183	NT5E	0,020753225	1,539849695
149	KCNAB2	0,01445231	-1,504711872	184	NPIP15	0,026295054	1,540265204
150	CLEC4D	0,043237709	-1,5034301	185	LINC01001	0,047615029	1,54220133
151	STAC3	0,037167458	-1,502700773	186	LOC142937	0,047850494	1,542251402
152	FLJ43681	0,003429142	-1,501707495	187	A_19_P0080301g	0,045374635	1,543879337
153	CNOT4	0,002917648	1,500190358	188	A_21_P0013065	0,02983896	1,549750988
154	SAP30L	0,012666206	1,500535289	189	ACVR1C	0,034942778	1,549795254
155	DENND1B	0,025744465	1,502711555	190	PWARNS	0,021268657	1,55579158
156	BACH2	0,031019597	1,503139183	191	PDS5A	0,036261065	1,556556486
157	ADTRP	0,043011975	1,503655573	192	RAPGEF6	0,038562428	1,559628556
158	DOCK10	0,045341977	1,503675604	193	MIR4697HG	0,010766829	1,561536524
159	ACSL3	0,010299334	1,5039178	194	GOLGA4	0,028560576	1,566092788
160	LINC00174	0,026043361	1,509616267	195	Inc-DHX40-1	0,008115959	1,571596778
161	FAM171A1	0,034148309	1,510116062	196	BCL11B	0,026227425	1,5744721
162	TPP1	0,024185246	1,510406	197	TTC3	0,021974843	1,575262199
163	RAD51-AS1	0,012260451	1,510635803	198	TSHZ2	0,048509783	1,577019651
164	ZCCHC11	0,016174101	1,510969814	199	LRBA	0,009192988	1,581286751
165	ARID4B	0,049827853	1,511937985	200	ATM	0,029389383	1,582887806
166	RCSD1	0,020384612	1,51280931	201	MAVS	0,028864251	1,586732915
167	PARP11	0,011123313	1,514478454	202	DKFZP586I1420	0,040335728	1,587994082
168	CEP68	0,043723589	1,515289309	203	A_24_P79855	0,018547503	1,588428059
169	KAT6B	0,0477561	1,515767121	204	USP34	0,039031893	1,588563313
170	CEP68	0,039659161	1,516824128	205	XLOC_I2_013931	0,035887887	1,592097893
171	ZNF587	0,018184083	1,520272021	206	OTUD4	0,006275394	1,595076228
172	MAVS	0,039670622	1,522562001	207	NPIP8	0,022905733	1,595164021
173	ZSCAN18	0,000516012	1,525724306	208	TCF7	0,033900309	1,596960571
174	ANKRD11	0,025524212	1,526299984	209	Inc-C21orf58-1	0,02500706	1,59749801
175	SLC35E2B	0,003022669	1,527078378	210	MYCBP2	0,002086403	1,603057998

Tabela XX – Lista de genes e *probes* diferencialmente expressos* CR X SR

Ordem	Símbolo Oficial	p	Log 2 fold change	Ordem	Símbolo Oficial	p	Log 2 fold change
211	USP24	0,007631815	1,609368634	228	Inc-AC073263.1-2	0,022227371	1,687847548
212	RPS3	0,012810385	1,612080548	229	DOCK9	0,023199954	1,688899043
213	Inc-FAM105B-1	0,009961652	1,614538572	230	TNPO1	0,011851091	1,703876173
214	Inc-PPA2-1	0,017771054	1,615122975	231	A_33_P3237674	0,045399595	1,710188835
215	LOC606724	0,043673437	1,622235578	232	CYP1B1	0,029413289	1,711356704
216	ZBTB20	0,009815068	1,622862833	233	SMC3	0,045689551	1,718933105
217	A_19_P0080068 1	0,007580113	1,632437418	234	CYFIP2	0,003243616	1,722613246
218	LINC01004	0,010286433	1,644236616	235	BOD1L1	0,009735421	1,760086723
219	LINC01004	0,024800454	1,647577822	236	Inc-AC114947.1.1-2	0,008155708	1,795586779
220	NFAT5	0,009158439	1,647927489	237	POLR2J4	0,019289225	1,797021859
221	TTN	0,018902875	1,654640013	238	Inc-FAM105B-1	0,00671728	1,844078472
222	PRKCH	0,013620253	1,658309702	239	FLJ38717	0,007167841	1,860491574
223	LRRC58	0,015267278	1,659962	240	LOC100131541	0,047445134	1,861944075
224	A_33_P3266993	0,021738715	1,666130976	241	PFN1P2	0,034161219	1,958170399
225	HIRA	0,019895993	1,668506267	242	LOC340335	0,011342579	1,97845621
226	CCSER2	0,023257219	1,676921118	243	DYNLT3	0,035637718	2,145486187
227	REL	0,015073202	1,685343836				