



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU



Curso de Graduação em Física Médica

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

EMERSON ARAUJO ALVES DOS SANTOS

**ENVOLVIMENTO DE miRNAs NO PROCESSO DE CALCIFICAÇÃO DE
CÉLULAS DE MUSCULATURA LISA**

BOTUCATU

2023

EMERSON ARAUJO ALVES DOS SANTOS

**ENVOLVIMENTO DE miRNAS NO PROCESSO DE CALCIFICAÇÃO DE
CÉLULAS DE MUSCULATURA LISA**

Trabalho de conclusão de curso de
graduação apresentado ao Instituto de
Biociências de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”,
para obtenção do título de Bacharel em
Física Médica.

Orientador: Prof.^o Dr. Willian Fernando Zambuzzi

BOTUCATU

2023

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Santos, Emerson Araujo Alves dos.

Envolvimento de miRNAs no processo de calcificação de células de musculatura lisa / Emerson Araujo Alves dos Santos. - Botucatu, 2023

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Física Médica) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Willian Fernando Zambuzzi
Capes: 20800002

1. Calcificação vascular. 2. Epigenética. 3. MicroRNAs.

Palavras-chave: Calcificação vascular; Enriquecimento funcional; Regulação epigenética; Regulação via miRNA.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Belanilza e Manoel e a minha família, pela confiança e apoio em toda minha jornada.

Agradeço aos meus amigos da graduação Giovanni, Leticia, Lucas, Maria Gabriela (Melita), Gabriel (Cola) e Guilherme (Guizão) por toda força e parceria durante esse importante período. A todos colegas, que estiveram ao meu lado durante toda a trajetória acadêmica. O apoio mútuo, as discussões enriquecedoras e o compartilhamento de experiências foram fundamentais para o meu crescimento pessoal e para o sucesso deste trabalho.

Agradeço a todos meus amigos do laBio, Geórgia, Marcel, Gerson, Anderson, Guilherme, Thaís, Suelen e Matheus por proporcionar vários dos momentos de aprendizado, evolução, momentos de alegria e descontração, até porque não vivemos apenas de trabalho, e por toda a parceria desde o momento que entrei para estágio no departamento.

Agradeço a moradia estudantil da Unesp de Botucatu e aos amigos feitos lá, em especial à Laís, Lucas (Skel) e ao Lucas (Pangaré), Eros, Carolina, Marcelo (Basilisco) e Débora, com quem pude conviver durante o período de graduação.

Agradeço às instituições que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, seja por meio de parcerias, disponibilização de recursos ou fornecimento de dados. Sua colaboração foi fundamental para o desenvolvimento da pesquisa.

Agradeço a todos os participantes da minha pesquisa, que gentilmente se dispuseram a contribuir com seu tempo e conhecimento. Sem a participação deles, este trabalho não seria possível.

Agradeço à minha universidade e aos professores que compartilharam seus conhecimentos ao longo do curso. Agradeço também a todos os funcionários e colaboradores da instituição, que tornaram possível a minha formação acadêmica.

Agradeço ao programa de permanência da Unesp e a Cope por financiar as bolsas Cope Conecta (EDITAL N° 02/2021 – Cope) e Unesp Presente (EDITAL N° 002/2022 - PROGRAD/PROEC/ACI/AUIN) ao qual este projeto estava associado.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Willian Zambuzzi por ter me aceitado como seu aluno e sempre ter sido um grande apoiador, seja no crescimento profissional, acadêmico ou pessoal.

Por fim, expresso minha gratidão a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para o meu crescimento pessoal e acadêmico ao longo dessa jornada. Seja com palavras de incentivo, apoio emocional ou feedback construtivo, cada um de vocês deixou uma marca positiva em minha vida.

“A menos que modifiquemos à nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

(Albert Einstein)

RESUMO

Atualmente as doenças cardiovasculares (DCV) estão entre as maiores causas de mortes no mundo. Grande parte dos indivíduos portadores de doenças como Diabetes *Mellitus*, Doença renal crônica ou Hipertensão podem desencadear problemas relacionados às DCVs. Uma condição que pode se associar aos processos patológicos citados anteriormente é a Calcificação Vascular (CV). A CV se caracteriza pela deposição de cálcio e fosfato no tecido muscular de vasos e artérias levando a mudança fenotípica da célula. Antes considerada uma doença de desenvolvimento passivo, esta causa ganhou grande atenção, já que diversos autores destacam que este processo recapitula eventos morfogênicos de osteogênese. Apesar da atenção, pouco se compreende sobre os processos moleculares envolvidos nesta patologia, evidenciando assim a necessidade de maiores investigações, sobretudo trazendo uma compreensão epigenética. Entre os principais mecanismos epigenéticos destacamos a regulação via miRNAs. Diversos estudos demonstram a grande importância dos miRNAs em mecanismos reguladores do processo de CV envolvendo fatores de inibição e/ou de promoção da doença. A partir destas informações, este trabalho buscou identificar miRNAs envolvidos no processo de mudança fenotípica de células do músculo liso vascular durante o processo de CV. Por meio de ensaios *in silico* e *in vitro*, analisamos possíveis reguladores relacionados tanto ao estímulo quanto a inibição de proteínas envolvidas na CV. Nossos dados sugerem que uma gama de miRNAs, após serem analisados e enriquecidos, podem estar diretamente associados a diversos fatores indutores de CV, através de vias de sinalização celular, ações enzimáticas e atividades inflamatórias. Concomitante às análises *in silico* e aliados ao uso de banco de dados, as análises *in vitro* revelaram que alguns miRNAs modulam positiva ou negativamente o processo de calcificação e que esses mesmos miRNAs apresentam variadas relações com outros processos biológicos que resultam na calcificação.

Palavras chaves: Calcificação vascular, Regulação Epigenética, Regulação via miRNA, Enriquecimento funcional.

Abstract

Cardiovascular diseases (CVD) are currently among the biggest causes of death in the world. Many people with diseases such as diabetes mellitus, chronic kidney disease or hypertension can develop CVD-related problems. One condition that can be associated with the pathological processes mentioned above is Vascular Calcification (VC). VC is characterized by the deposition of calcium and phosphate in the muscle tissue of vessels and arteries, leading to phenotypic changes in the cell. Previously considered a disease of passive development, this cause has now gained a great deal of attention, as several authors point out that this process recapitulates the morphogenic events of osteogenesis. Despite the attention, little is understood about the molecular processes involved in this pathology, thus highlighting the need for further research, especially into epigenetics. Among the main epigenetic mechanisms is regulation via miRNAs. Several studies have shown the great importance of miRNAs in regulatory mechanisms of the CV process, involving factors that inhibit and/or promote the disease. Based on this information, this study sought to identify miRNAs involved in the process of phenotypic change in vascular smooth muscle cells during the VC process. Using *in silico* and *in vitro* assays, we analyzed possible regulators related to both the stimulation and inhibition of proteins involved in VC. Our data suggest that a range of miRNAs, after being analyzed and enriched, may be directly associated with various VC-inducing factors, through cell signaling pathways, enzymatic actions and inflammatory activities. Concomitant with the *in silico* analyses and allied to the use of databases, the *in vitro* analyses revealed that some miRNAs positively or negatively modulate the calcification process and that these same miRNAs have varied relationships with other biological processes that result in calcification.

Keywords: Vascular calcification, Epigenetic regulation, miRNA regulation, Functional enrichment.

LISTA DE FIGURA

FIGURA 1. TIPOS DE CALCIFICAÇÕES BIOLÓGICAS: FATORES ATRIBUÍDOS A POSSÍVEIS CAUSAS DA CALCIFICAÇÃO VASCULAR.	11
FIGURA 2. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE UM miRNA: PROCESSO DESDE A TRANSCRIÇÃO DO PRI-miRNA, PROCESSAMENTO E TRANSPORTE PARA FORA DO CITOPLASMA FEITO PELAS ENZIMAS DROSHA E XPO5, RESPECTIVAMENTE, ATÉ A CLIVAGEM PELA DICER.	16
FIGURA 3. FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL: FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA UTILIZADA NESTE TRABALHO PARA AS ANÁLISES <i>IN SILICO</i> E <i>IN VITRO</i>.	17
FIGURA 4. PERFIL DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE miRNAs <i>Up</i> E <i>Down</i> REGULADOS: GRÁFICOS DE VOLCANO DOS PARÂMETROS B1 (A), B2 (B), B3 (C), B4 (D), B5 (E) E B6 (F), ONDE OS miRNAs SIGNIFICATIVOS FORAM DEFINIDOS POR $-\log_{10}adj. P. Val > 2$ E $\log (FC) > 1$.	21
FIGURA 5. ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL DO PARÂMETRO B2 BASEADO EM ASPECTOS DO GO: A CLASSIFICAÇÃO DOS ASPECTOS FOI FEITA DE ACORDO COM A CONTAGEM DOS ALVOS DE miRNAs (COUNT) E A TAXA DE DESCOBERTA DE FALSOS POSITIVOS (FDR). PARA O EIXO VERTICAL FOI UTILIZADO AS ONTOLOGIAS DO GO COM PARÂMETROS DAS 3 CATEGORIAS PRÉ-DEFINIDAS E PARA O EIXO HORIZONTAL USADO A PORCENTAGEM DE GENES PRESENTES NAS ONTOLOGIAS (GENE RATIO).	23
FIGURA 6. ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL DO PARÂMETRO B3 BASEADO EM ASPECTOS DO GO: A CLASSIFICAÇÃO DOS ASPECTOS FOI FEITA DE ACORDO COM A CONTAGEM DOS ALVOS DE miRNAs (COUNT) E A TAXA DE DESCOBERTA DE FALSOS POSITIVOS (FDR). PARA O EIXO VERTICAL FOI UTILIZADO AS ONTOLOGIAS DO GO COM PARÂMETROS DAS 3 CATEGORIAS PRÉ-DEFINIDAS E PARA O EIXO HORIZONTAL USADO A PORCENTAGEM DE GENES PRESENTES NAS ONTOLOGIAS (GENE RATIO).	25
FIGURA 7. ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL DO PARÂMETRO B6 BASEADO EM ASPECTOS DO GO: A CLASSIFICAÇÃO DOS ASPECTOS FOI FEITA DE ACORDO COM A CONTAGEM DOS ALVOS DE miRNAs (COUNT) E A TAXA DE DESCOBERTA DE FALSOS POSITIVOS (FDR). PARA O EIXO VERTICAL FOI UTILIZADO AS ONTOLOGIAS DO GO COM PARÂMETROS DAS 3 CATEGORIAS PRÉ-DEFINIDAS E PARA O EIXO HORIZONTAL USADO A PORCENTAGEM DE GENES PRESENTES NAS ONTOLOGIAS (GENE RATIO).	27
FIGURA 8. ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL DO PARÂMETRO B2 BASEADO EM ASPECTOS DO KEGG PATHWAYS: A CLASSIFICAÇÃO DOS ASPECTOS FOI FEITA DE ACORDO COM A CONTAGEM DOS ALVOS DE miRNAs (COUNT) E A TAXA DE DESCOBERTA DE FALSOS POSITIVOS (FDR). PARA O EIXO VERTICAL FOI UTILIZADO AS VIAS DE SINALIZAÇÃO DEFINIDAS PELO KEGG PATHWAYS E PARA O EIXO HORIZONTAL USADO A PORCENTAGEM DE GENES PRESENTES NAS VIAS DE SINALIZAÇÃO (GENE RATIO).	29
FIGURA 9. ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL DO PARÂMETRO B3 BASEADO EM ASPECTOS DO KEGG PATHWAYS: A CLASSIFICAÇÃO DOS ASPECTOS FOI FEITA DE ACORDO COM A CONTAGEM DOS ALVOS DE miRNAs (COUNT) E A TAXA DE DESCOBERTA DE FALSOS POSITIVOS (FDR). PARA O EIXO VERTICAL FOI UTILIZADO AS VIAS DE SINALIZAÇÃO DEFINIDAS PELO KEGG PATHWAYS E PARA O EIXO HORIZONTAL USADO A PORCENTAGEM DE GENES PRESENTES NAS VIAS DE SINALIZAÇÃO (GENE RATIO).	31
FIGURA 10. ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL DO PARÂMETRO B6 BASEADO EM ASPECTOS DO KEGG PATHWAYS: A CLASSIFICAÇÃO DOS ASPECTOS FOI FEITA DE ACORDO COM A CONTAGEM DOS ALVOS DE miRNAs (COUNT) E A TAXA DE DESCOBERTA DE FALSOS POSITIVOS (FDR). PARA O EIXO VERTICAL FOI UTILIZADO AS VIAS DE SINALIZAÇÃO DEFINIDAS PELO KEGG PATHWAYS E PARA O EIXO HORIZONTAL USADO A PORCENTAGEM DE GENES PRESENTES NAS VIAS DE SINALIZAÇÃO (GENE RATIO).	33
FIGURA 11. FENÓTIPO OSTEOGÊNICO DE VSMC EM SOBRECARGA DE Ca^{+2} E P: REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA EXPRESSÃO GÊNICA RELATIVA DE A-SMA (A), RUNX2 (B), OTX (C) FETUÍNA (D), TNAP (E) E NPP1 (F) NORMALIZADOS PELO NÍVEL DE EXPRESSÃO DOS GENES 18S, B-ACTINA E GAPDH. OS NÍVEIS FORAM DETERMINADOS USANDO O MÉTODO LIMAR CRÍTICO COMPARATIVO $\Delta\Delta CT$ E MOSTRADOS EM UM FORMATO GRÁFICO COM VALORES NORMALIZADOS EM FUNÇÃO DO VALOR ATRIBUÍDO AO CONTROLE 1. OS RESULTADOS ANALISADOS POR TESTE T FORAM REPRESENTADOS COMO A MÉDIA $\pm$ DESVIO PADRÃO DE TRÊS EXPERIMENTOS INDEPENDENTES. *$p < 0,05$, **$p < 0,01$, ***$p < 0,001$ E ****$p < 0,0001$ EM RELAÇÃO AO SEU RESPECTIVO CONTROLE.	38

FIGURA 12. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DA MAQUINARIA DE PROCESSAMENTO DE MI-RS:	
EXPRESSÃO GÊNICA DAS TRÊS ENZIMAS ENVOLVIDAS NA BIOGÊNESE E MATURAÇÃO DOS MI-RS FORAM REALIZADAS ATRAVÉS DA ANÁLISE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (Q-PCR) E CORRIGIDA PELOS TRÊS CONTROLES ENDÓGENOS (GAPDH, B-ACTINA E 18S). EM (A) DROSHA, EM (B) XPO5 E EM (C) DICER. OS RESULTADOS ANALISADOS POR TESTE T REPRESENTAM A MÉDIA ± DESVIO PADRÃO DE TRÊS EXPERIMENTOS INDEPENDENTES EXPRESSOS EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 E ****p < 0,0001.	39
FIGURA 13. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DOS MI-RNAs ENVOLVIDOS NA CALCIFICAÇÃO VASCULAR:	
A ANÁLISE QUANTITATIVA POR TEMPO REAL (Q-PCR) DOS MI-RNA'S FOI CORRIGIDA PELO CONTROLE ENDÓGENO RNU6 E OBTIDAS PELO PROGRAMA PRISM8. (A) MI-R 30B, (B) MI-R 103A, (C) MI-R 125A, (D) MI-R 143 E (E) MI-R 145. OS RESULTADOS ANALISADOS POR TESTE T REPRESENTAM A MÉDIA ± DESVIO PADRÃO DE TRÊS EXPERIMENTOS INDEPENDENTES EXPRESSOS EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 E ****p < 0,0001.....	40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: PRIMERS UTILIZADOS NA ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	19
TABELA 2: CONTRASTE DE PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DE PREDIÇÃO DE ALVOS DE MI RNAS.	20

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	10
	Células Musculares Lisas Vasculares	10
	Calcificação Vascular.....	11
	Epigenética.....	12
	Metilação de DNA	13
	Modificação das histonas	14
	Regulação via miRNA	15
2.	OBJETIVOS	17
3.	MATERIAIS E METODOLOGIAS	17
	Experimento <i>in vitro</i>	18
	Cultivo de células:.....	18
	Grupos experimentais:	18
	Extração de RNA total:	18
	Síntese de cDNA e RT-qPCR:	18
	Experimento <i>in silico</i>	19
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	20
	Resultados <i>in silico</i>	20
	Parâmetros de filtragem	20
	Predição de Alvos	20
	Enriquecimento Funcional	21
	Resultados <i>in vitro</i>	37
	Análise de expressão gênica	37
5.	CONCLUSÃO	41
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1. INTRODUÇÃO

CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES

As células musculares lisas vasculares (do inglês: vascular *smooth muscle cells* - VSMCs) são células contráteis altamente especializadas que possuem notável plasticidade, despontando ser um dos principais elementos da biologia vascular. Estão presentes no interior de vasos sanguíneos e podem ser definidas com base na localização anatômica e sua funcionalidade. Em artérias saudáveis, as VSMCs apresentam formato fusiforme e estão localizadas na camada média. Possuem papéis importantes na complacência e na retração elástica da artéria em resposta a mudanças nas condições hemodinâmicas. Para tal, este tipo celular desenvolveu um repertório de proteínas contráteis apropriadas (incluindo alfa-actina muscular lisa, do inglês: *alpha smooth muscle Actin* - α -SMA), receptores agonistas, canais iônicos, moléculas transdutoras de sinais e ainda apresentam a capacidade de expressar proteínas como elastinas, colágenos e proteoglicanos (BASATEMUR et al., 2019).

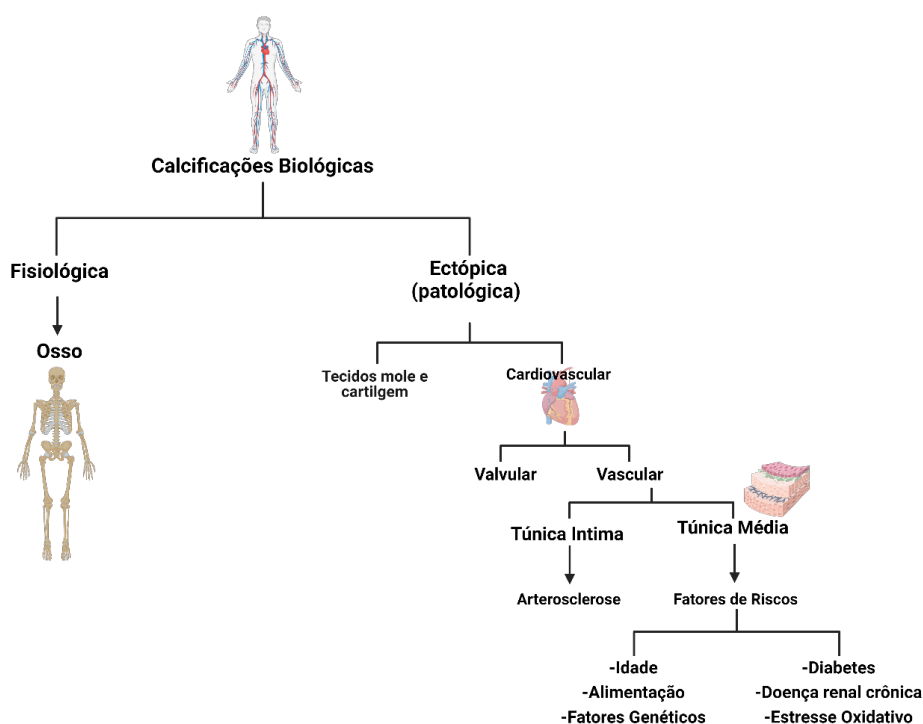
Em condições patológicas, as VSMCs se diferenciam em um fenótipo sintético e migratório – com redução da expressão de proteínas contráteis, aumento da proliferação, migração e produção de matrix extracelular (MEC) (DAVIS-DUSENBERY; WU; HATA, 2011). Avanços no campo do desenvolvimento de multiômicas aumentaram o entendimento da complexidade desse processo e revelaram que durante o aparecimento de alguns tipos de doenças, como diabetes *melitus*, aterosclerose e doença renal crônica (do inglês *Chronic Kidney Disease* - CKD), as VSMCs podem assumir fenótipos múltiplos, podendo apresentar semelhanças a macrófagos, células-tronco mesenquimais, condrócitos, miofibroblastos e até osteoblastos (CHAKRABORTY et al., 2021). Embora já tenham sido identificados muitos fatores que desempenham um papel na regulação do crescimento de VSMC, como fatores de crescimento (EGF, FGF, PDGF), interleucinas, angiotensina II e trombina, pouco é conhecido sobre os mecanismos que regulam as alterações no estado diferenciado das VSMCs, principalmente durante o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (TRION; VAN DER LAARSE, 2004), como é o caso da calcificação vascular.

CALCIFICAÇÃO VASCULAR

Uma patologia que vem se destacando dentre os indivíduos com problemas cardiovasculares é a calcificação vascular (CV). Este processo normalmente ocorre a partir da deposição de fosfatos de cálcio na parede arterial, sendo regulado biologicamente por processos celulares, e ocasionando uma mudança fenotípica das VSMCs. As células mais afetadas se encontram, principalmente, na túnica média e esta condição é conhecida como esclerose de Mönckeberg (CANCELA, 2011; OLIVEIRA et al., 2013).

Através de recentes descobertas, foram identificados alguns fatores que podem desencadear a calcificação vascular, como representado na **figura 1**. O avanço da idade e o estresse oxidativo, que pode danificar as células na parede dos vasos sanguíneos e desencadear a liberação de fatores pró-calcificantes, (LEE; LEE; JEON, 2020) estão entre eles. Outro fator de risco associado é a dislipidemia, que pode contribuir para o desenvolvimento da doença a partir dos altos níveis de colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL). Neste caso, as partículas de LDL podem oxidar e desencadear respostas inflamatórias, levando à deposição de cálcio na parede dos vasos (TRION; VAN DER LAARSE, 2004; TOWLER, 2008). Doenças como diabetes *mellitus*, hipertensão e doença renal crônica também estão entre as causas.

Figura 1. Tipos de calcificações biológicas: Fatores atribuídos a possíveis causas da calcificação vascular.



Fonte: Adaptado de (LANZER et al., 2014).

Se diagnosticada previamente, é possível controlar o processo de CV por meio da prática de exercícios físicos e alimentação planejada, a fim de prever os níveis de ingestão de cálcio e fosfatos. Através do aprofundamento de estudos genéticos e bioquímicos, sabe-se que podem ocorrer interações proteicas que acarretam tanto na ativação quanto na inibição de genes e proteínas que atuam na calcificação das células (SONG et al., 2020). Otsuka et al. mostraram várias linhas de evidências, sugerindo que a calcificação arterial compartilha características com a formação e calcificação do osso esquelético, como diferenciação de condrócitos e osteoblastos, mineralização, deposição de matriz óssea e reabsorção óssea (OTSUKA et al., 2014). Proteínas relacionadas ao osso, incluindo a proteína morfogênica óssea 2 e 4 (BMP-2, BMP-4), osteocalcina (BGLAP), osteonectina (ON), entre outras, foram relatadas estar presente em artérias calcificadas (OTSUKA et al., 2014; DA SILVA et al., 2020). Outros estudos compararam a CV à remodelação óssea, onde a transdiferenciação de VSMCs em células semelhantes a osteoblastos é considerada o fator fisiopatológico mais essencial na CV (DURHAM et al., 2018; JAMINON et al., 2019). Entretanto, todos esses fatores anteriormente citados responsáveis por influenciar a CV dependem de mecanismos não-convencionais de controle de regulação gênica. Dentre estes principais mecanismos, destacam-se os epigenéticos.

EPIGENÉTICA

A epigenética é a área da ciência que investiga mecanismos biológicos relacionados às mudanças fenotípicas transmitidas através da divisão celular, mas não correspondente a mudança na sequência do DNA. Os mecanismos epigenéticos regulam todos os processos biológicos desde a concepção até a morte (DEANS; MAGGERT, 2015). Algumas alterações químicas na molécula de DNA e nas histonas podem atuar modificando a arquitetura da cromatina e alterando a acessibilidade de fatores de transcrição a elementos reguladores de genes. Portanto, essas modificações são essenciais para manter as células em um estado indiferenciado ou direcioná-las para a especificação do destino celular (RODRIGUES; SHVEDUNOVA; AKHTAR, 2021). Os mecanismos epigenéticos são divididos em metilação (5-metilcitosina) e hidroximetilação (5-hidroximetilcitosina) do DNA, modificações de histonas, referindo-se ao estudo estrutural da cromatina na regulação do genoma, composta por quatro proteínas histonas centrais (H2A, H2B, H3 e H4) enroladas em torno de um segmento de DNA de 147 pares de base e por fim, os miRNAs, significativos elementos de controle pós-transcricionais

na maquinaria epigenética, reconhecidos como importantes reguladores da expressão gênica (BACCARELLI; BOLLATI, 2009; POTACZEK et al., 2017).

Sendo o sistema vascular altamente regulado por mecanismos epigenéticos, evidências crescentes têm mostrado que os marcadores epigenéticos exercem um papel crucial no desenvolvimento vascular, na diferenciação e função das células endoteliais e musculares lisas e permitem uma alta flexibilidade em resposta a mudanças fisiológicas ou patológicas repentinas (WU et al., 2015).

Metilação de DNA

A metilação do DNA é um processo epigenético bastante relevante que regula a expressão gênica, a estabilidade do genoma e *imprinting* parental (MULLER; PRADO, 2008). Sendo dividido em dois fatores, a hipometilação refere-se a uma perda de metilação do DNA, levando à regulação positiva da expressão gênica, e a hipermetilação sendo o aumento da metilação no DNA, resultando no silenciamento transcricional estável e expressão gênica reduzida (PILETIČ; KUNEJ, 2016). Durante a hipermetilação, ocorre a adição covalente de um grupo metil no quinto carbono dos resíduos de citosina presentes em dinucleotídeos CpG, que são comumente encontrados em regiões com alta concentração de CpG, também conhecidas como ilhas CpG (CGI). Ilhas CpG são regiões com mais de 50% de GC e uma razão observada/esperada de CG maior que 60%. A adição do grupo metil é catalisada por enzimas chamadas DNA metiltransferases (DNMTs) (PILETIČ; KUNEJ, 2016).

As enzimas da família DNMT estão implicadas no mecanismo de metilação do DNA. Há evidências de que a DNMT1 atua como uma metiltransferase de manutenção, operando nas forquilhas de replicação. As enzimas DNMT3A e DNMT3B estão envolvidas na aquisição *de novo* do status de metilação do DNA, introduzindo a metilação da citosina em locais CpG não metilados anteriormente. Por outro lado, a oxidação de metilcitosina a hidroximetilcitosina tem demonstrado ser a base do mecanismo ativo de desmetilação do DNA, sendo as enzimas *Ten-Eleven Translocation* (TET) responsáveis por catalisar esta reação. Geralmente, o DNA não-metilado é associado à abertura e permissividade da cromatina, enquanto a presença de nucleossomos e cromatina condensada está relacionada ao DNA metilado nos promotores de genes (ASSIS et al., 2018).

Modificação das histonas

O genoma humano é composto por 24 cromossomos diferentes, que incluem 22 autossomos, além dos cromossomos X e Y. Cada cromossomo é constituído por uma única e extensa molécula de DNA que se encontra ligada a grupos de proteínas histonas, formando estruturas denominadas nucleossomos. Cada nucleossomo é composto por um octâmero de proteínas que consiste em duas cópias de cada tipo de proteína histona (H1, H2A, H2B, H3 e H4), os quais estão associados a uma sequência de DNA de aproximadamente 147 pares de base, que se encontra enrolada ao redor do octâmero (FERNANDES, 2020).

A cromatina é formada pela organização da molécula de DNA em nucleossomos, que não apresentam uma estrutura uniforme e podem conter segmentos altamente condensados (heterocromatina) e outros menos compactados (eucromatina). A conformação da cromatina é dinâmica e pode ser modificada em resposta a sinais internos e externos. As histonas possuem caudas terminais de aminoácidos expostas, que contêm cerca de 20-35 aminoácidos e sofrem modificações bioquímicas capazes de afetar a atividade transcricional dos genes associados (RIVAS; TEIXEIRA; KREPISCHI, 2019).

As diferentes modificações das histonas podem afrouxar ou estreitar a associação entre histonas e DNA, facilitando ou restringindo o acesso ao DNA dos fatores de transcrição e da maquinaria transcricional. Metilação, acetilação e fosforilação de histonas são algumas das modificações descritas como marcas ativadoras ou silenciadoras da expressão gênica. Cada marca isoladamente não confere ao gene um estado de transcrição ativo ou inativo; as modificações nas histonas compõem um painel de marcas que é lido em conjunto por enzimas específicas (*readers*) (VAN LEEUWEN; VAN STEENSEL, 2005). A introdução dessas modificações é efetuada por enzimas chamadas de “escritoras” (*writers*), que incluem metiltransferases (HMTs) e acetiltransferases (HATs), responsáveis pela metilação e acetilação de caudas de histonas, respectivamente.

Da mesma forma que a metilação de DNA, tais marcas epigenéticas de histonas são estáveis, mas podem ser reversíveis, e sua remoção é efetuada por enzimas também específicas (*erasers*), como histona desmetiltransferases (HDMTs) e desacetilases (HDACs) (QIN et al., 2020). Existem formas variantes de histonas que se distinguem das histonas-padrão por um ou poucos aminoácidos, são menos comuns na cromatina. No entanto, em certas áreas específicas da cromatina, as histonas regulares são substituídas por essas variantes menos frequentes. Essas variações de histonas fornecem uma base

mais fundamental para a diferenciação da cromatina, que é essencial para os processos epigenéticos, tais como a segregação dos cromossomos (RIVAS; TEIXEIRA; KREPISCHI, 2019).

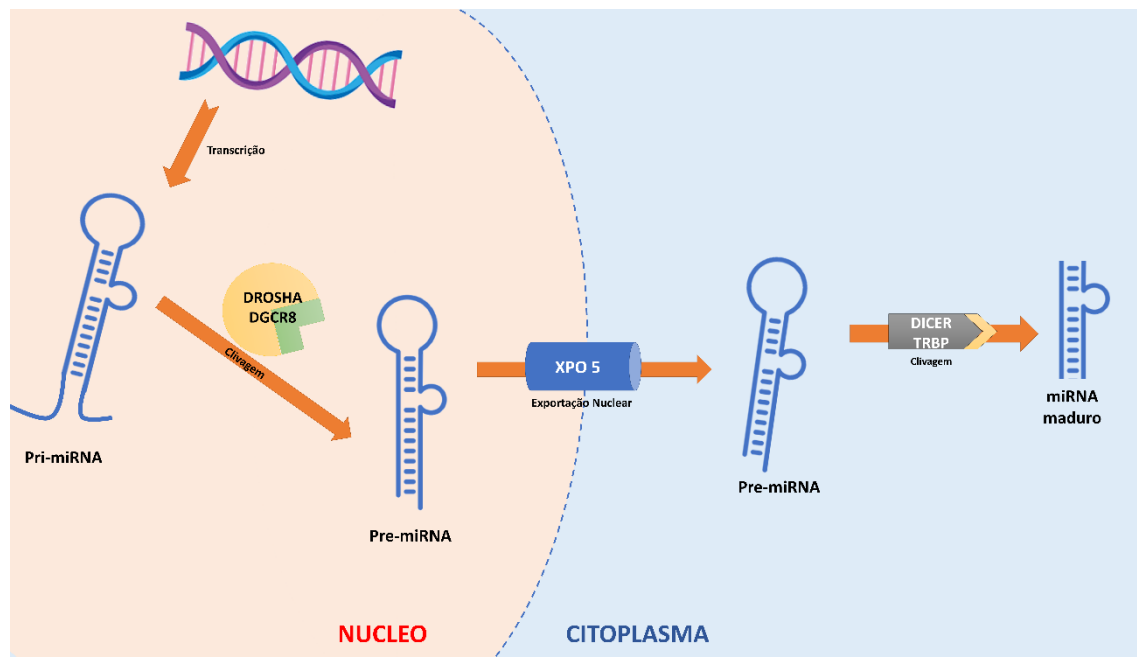
Regulação via miRNA

Os microRNAs (miRNAs) são pequenas moléculas de ácido ribonucleico (RNA) que não codificam proteínas, e que têm ganhado destaque nos últimos anos por seu papel como reguladores da expressão gênica e envolvimento em doenças. Eles compreendem uma classe de RNAs não-codificantes curtos com 18 a 25 nucleotídeos de comprimento e estão envolvidos na maquinaria de interferência de RNA (RNAi), responsáveis por regular a expressão gênica pós-transcricional, colaborando para diversas funções fisiológicas e fisiopatológicas, incluindo a regulação do tempo de desenvolvimento e formação de padrão, restrição do potencial de diferenciação, célula-sinalização, doenças cardiovasculares e carcinogênese. (CORDES; SRIVASTAVA, 2009; SATO et al., 2011; JORGE et al., 2021).

Os miRNAs são gerados a partir de transcritos primários nascentes (pri-miRNA), por meio de duas etapas de clivagem sequenciais. Primeiro, a enzima DROSHA processa o pri-miRNA no núcleo, gerando um precursor em forma de grampo de cabelo (pré-miRNA). Em seguida, o pré-miRNA é transportado para o citoplasma pela proteína exportina 5 (XPO5), onde é clivado pela enzima DICER, como mostrado na **Figura 2** (O'BRIEN et al., 2018). O resultado dessa clivagem é um pequeno duplex de RNA, que é então carregado na proteína Argonauta (AGO). Nesse processo, a proteína AGO prefere manter apenas uma das fitas do miRNA maduro, removendo a outra (ALI SYEDA et al., 2020). O AGO transportado com o miRNA associa-se a outros cofatores, como complexos poli(A)-deadilação (O'BRIEN et al., 2018), que constituem o complexo efetor chamado complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). O miRISC (complexo de silenciamento induzido por miRNA) induz o decaimento do RNA mensageiro (mRNA) e a supressão traducional por meio da interação com as sequências complementares na região 3' não traduzida (3'-UTR) do mRNA do gene alvo. Os miRNAs visam a maioria dos mRNAs, permitindo que eles tenham importantes papéis reguladores em diversos processos fisiológicos e de desenvolvimento (ALI SYEDA et al., 2020). Na maioria das vezes, os miRNAs podem regular redes de genes dinâmica e/ou transitoriamente, como *loops* de *feedback* e *feedforward*, e a regulação do estado

estacionário do gene, como a regulação positiva de um miRNA durante a diferenciação (O'BRIEN et al., 2018).

Figura 2. Processo de produção de um miRNA: Processo desde a transcrição do pri-miRNA, processamento e transporte para fora do citoplasma feito pelas enzimas DROSHA e XPO5, respectivamente, até a clivagem pela DICER.



Fonte: Próprio autor, 2023.

Sabe-se que o sistema vascular é amplamente regulado por mecanismos epigenéticos e pesquisas recentes sugerem que os marcadores epigenéticos desempenham um papel crucial no desenvolvimento vascular, bem como na diferenciação e função das células endoteliais e musculares lisas. Esses marcadores também permitem alta flexibilidade em resposta a mudanças fisiológicas ou patológicas repentinas, associando a hiper e hipometilação de promotores e ação de miRNA a muitos estados de doença, como doenças neurodegenerativas, cardiovasculares, autoimunes e o câncer (WU et al., 2015; PILETIČ; KUNEJ, 2016).

Apesar de avanços significativos nos estudos na área, algumas questões ainda permanecem para serem trabalhadas com o intuito de um conhecimento mais profundo acerca dos mecanismos moleculares envolvidos com a calcificação de células de musculatura lisa. Com esta proposta, a regulação da expressão de miRNA e a identificação dos genes que são alvos específicos de cada miRNA na CV, permanecem em grande, parte obscuras.

2. OBJETIVOS

Visando ampliar os conhecimentos relativos aos processos da calcificação vascular, o objetivo central deste projeto foi investigar o envolvimento dos miRNAs na regulação do processo de calcificação da célula de musculatura lisa.

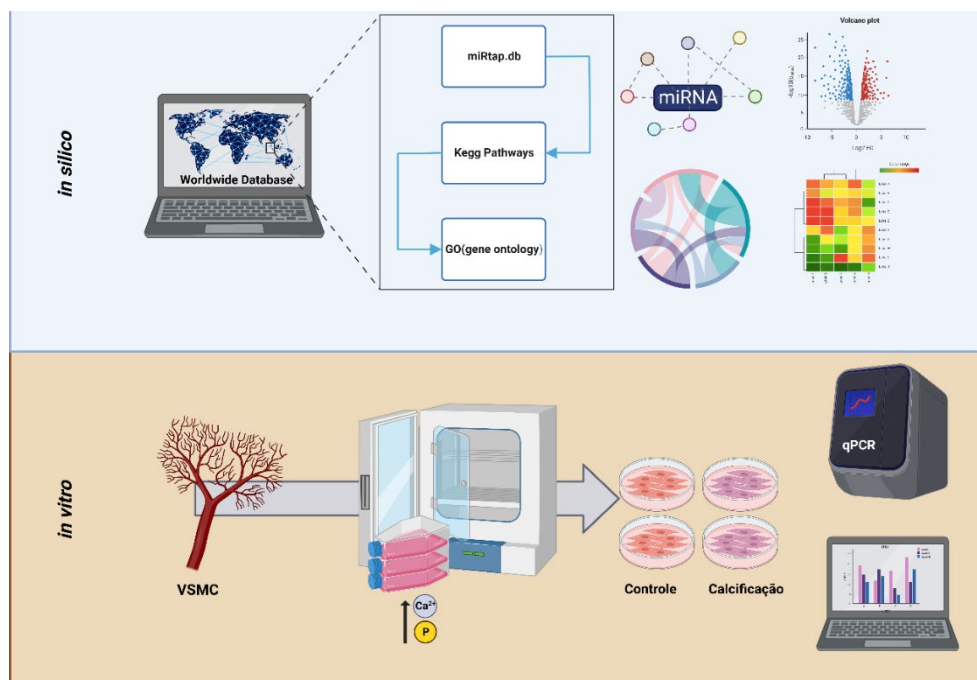
Os objetivos específicos foram:

- Promover a cultura das células de musculatura lisa vascular e expô-las ao meio com *overload* de cálcio e fosfato;
- Validar o modelo através da expressão de genes relacionados à diferenciação osteoblástica e inflamação;
- Verificar, com base em dados e experimentos disponibilizados em variados bancos de dados, a correlação de aparecimento de miRNAs em células de musculatura lisa vascular saudáveis e em células em processo de calcificação.
- Avaliar a expressão gênica de alguns miRNAs encontrados no estudo *in silico*.

3. MATERIAIS E METODOLOGIAS

As análises desse trabalho foram divididas em duas etapas, análises *in silico* e análises *in vitro*, como mostradas pela **figura 3**.

Figura 3. Fluxograma experimental: Fluxograma da metodologia utilizada neste trabalho para as análises *in silico* e *in vitro*.



Fonte: Próprio autor, 2023.

EXPERIMENTO *IN VITRO*

Cultivo de células:

Células de musculatura lisa provenientes de aorta humana (AoSMC, do inglês *Aortic Smooth Muscle Cells*), foram obtidas da empresa Lonza (Walkersville, MD) e mantidas em meio de cultura específico com os kits de suplementos: SmBM Meio Basal (Lonza, CC-3181), suplementado com *SmGM-2 SingleQuots* [0,5 mg / mL de hEGF, 5 mg / mL de insulina, 1 mg / mL de hFGF, 50 mg / mL de gentamicina / anfotericina-B e 5% de soro fetal bovino (Lonza, CC-4149)]. A linhagem foi plaqueada e mantida rigorosamente sob as condições indicadas pelo fabricante, até que atingissem 80% de confluência, a 37 ° C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

Grupos experimentais:

Os grupos foram divididos em (a) Controle - células mantidas sem nenhuma suplementação adicional e (b) Calcificação – células mantidas em meio com *overload* de Ca⁺²/ P (2,7 mM de cálcio e 2,6 mM de fosfato) por 72h (KAPUSTIN et al., 2015).

Extração de RNA total:

Após a indução das células à calcificação, os grupos experimentais foram coletados, homeinizados em TRIzol®. Para isolar o RNA total foi utilizado o método TRIzol®/Clorofórmio/Isopropanol, de acordo com as especificações do fabricante. A quantidade e pureza do RNA extraído foram estimadas em aparelho de espectrofotometria, utilizando as razões OD 260/280 ($\geq 1,8$) e OD 260/230 ($\geq 1,5$) (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Uniscience). As amostras foram armazenadas em biofreezer a -80 °C.

Síntese de cDNA e RT-qPCR:

Para a síntese de cDNA utilizou-se o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA) de acordo com as instruções do fabricante. O qPCR foi realizado em um total de 10 µL, contendo PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix 2x (5 µL) (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA), 0,4 µM de cada primer (Tabela 1), 50 ng de cDNA e H₂O livre de nuclease, no equipamento QuantStudio® 3 Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts,

USA). Para o cálculo da quantidade relativa utilizamos o método limiar crítico comparativo $\Delta\Delta CT$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), sendo os resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes, realizados em triplicata e como os controles internos, os genes GAPDH, β -ACTINA, 18S e para os miRNAs, utilizado o RNU 6 para normalização dos dados.

Tabela 1: Primers utilizados na análise da expressão gênica.

Genes e miRNAs	Gene ID	SEQUÊNCIA F	SEQUÊNCIA R
α -SMA (TAGLN)	6876	AGCGTGGCTATTCCTTCGT	CTCATTTTCAAAGTCCAGAGCTACA
RUNX2	860	CTGTGGTTACTGTCATGGCG	AGGTAGCTACTTGGGGAGGA
OTX (SP7)	121340	CCA GGC AAC ACT CCT ACT CC	GCC TTG CCA TAC ACC TTG C
FETUIN	26998	CGT GGA AAT CGC AGT CTC CT	GAA TTC CGC TCA TCC TGT TCT
TNAP (ALPL)	249	CTATCCTGGCTCCGTGCTCCC	TTGTGGTGGAGCTGACCCTT
ENPP1	5167	TTT GCC GAT TGA GGA TTT TC	CCA CTG ACG ACA TTG ACA CC
DROSHA	29102	CGG CGA CGA CCC ATT CGA AC	GAA TCG AAC CCT GAT TCC CCG TC
XPO5	57510	AAG AGA TGC TGG AGG AGC AA	TGC CCA GGT CTG TAA GCT CT
DICER	23405	GAACGCTTTTGTGCTGCTGA	GCCTCCCCAGTCCTTTACAC
HSA-MIR-30B	407030	CCA AGT TTC AGT TCA TGT AAA	GTC AGC TGA AGT AAA CAT CCA CCT CCC AG
HSA-MIR-103B	100302238	TAC TGC CCT CGG CTT CTT TAC AG	CAA TGC CTT CAT AGC CCT GTA CAA T
HSA-MIR-125A	406910	TCT AGG TCC CTG AGA CCC TT	CGC CAG GCT CCC AAG AAC CTC A
HSA-MIR-143	406935	CGC AGC GCC CTG TCT C	GCT GCA GAA CAA CTT CTC TCT TCC TGA G
HSA-MIR-145	406937	AAC CAT GAC CTC AAG AAC AGT ATT TCC AGG	ACC TTG TCC TCA CGG TCC AGT TTT C
GAPDH	2597	AGG CCG GTG CTG AGT ATG TC	TGC CTG CTT CAC CAC CTT CT
β -ACTINA	60	TCT TGG GTA TGG AAT CCT GTG	AGG TCT TTA CGG ATG TCA ACG
18S	106632259	TAG TTG GAT CTT GGG AGC GG	TAG AAC CGC GGT CCT ATT CC
RNU 6	26827	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTGCGT

Fonte: Autoria própria, 2023.

Experimento *in silico*

Os dados para experimentação foram obtidos através do *The Bio Studies database/ArrayExpress* do experimento catalogado como E-GEOD-68913, intitulado como “*Differential miRNA expression in Cells and Matrix Vesicles in Vascular Smooth Muscle Cells from Rats with Kidney Disease*” onde foi coletado os arquivos de dados para análise (CHEN; MOE, 2015).

Todos os passos seguintes foram processados utilizando a linguagem R. Os pacotes de funções de maior relevância foram *Tidyverse* (WICKHAM et al., 2019), que fornece ferramentas de programação funcional para manipulação de métodos e listas produzidos em uma estrutura específica; *Limma* (RITCHIE et al., 2015), para análise de expressão gênica (miRNAs); além dos pacotes: *Biobase* (FALCON; MORGAN; GENTLEMAN,

2007), *miRNetap* (PAJAK; SIMPSON, 2016) e *miRNetap.db* (PAJAK; SIMPSON, 2015), utilizados para a predição de alvos; e, por fim, *ClusterProfiler* (WU et al., 2021) e *org.Rn.eg.db* (CARLSON, 2019) para a realização de enriquecimento funcional.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

RESULTADOS *IN SILICO*

Parâmetros de filtragem

No início da análise, foram utilizados parâmetros de filtragem para melhor identificar miRNAs em comum nos fatores de estudo do experimento E-GEOD-68913 (CHEN; MOE, 2015), em que foram utilizadas células de músculo liso vasculares (VSMCs) e Vesículas de Matriz (VM), ambas nas situações saudáveis e de recorrência de calcificação. A Tabela 2 descreve como foram dispostos tais parâmetros.

Tabela 2: Contraste de parâmetros para avaliação de predição de alvos de miRNAs.

Parâmetro	Contraste de Parâmetros de Filtragem
B1	(VM + VSMC (Calcificadas)) – (VM+ VSMC (Saudáveis))
B2	VM (Calcificadas + Saudáveis) - VSMC (Calcificadas + Saudáveis)
B3	VM Saudável – VSMC Saudável
B4	VSMC Saudável – VSMC Calcificada
B5	VM Saudável – VM Calcificada
B6	VM Calcificada – VSMC Calcificada

Fonte: Autoria própria, 2023.

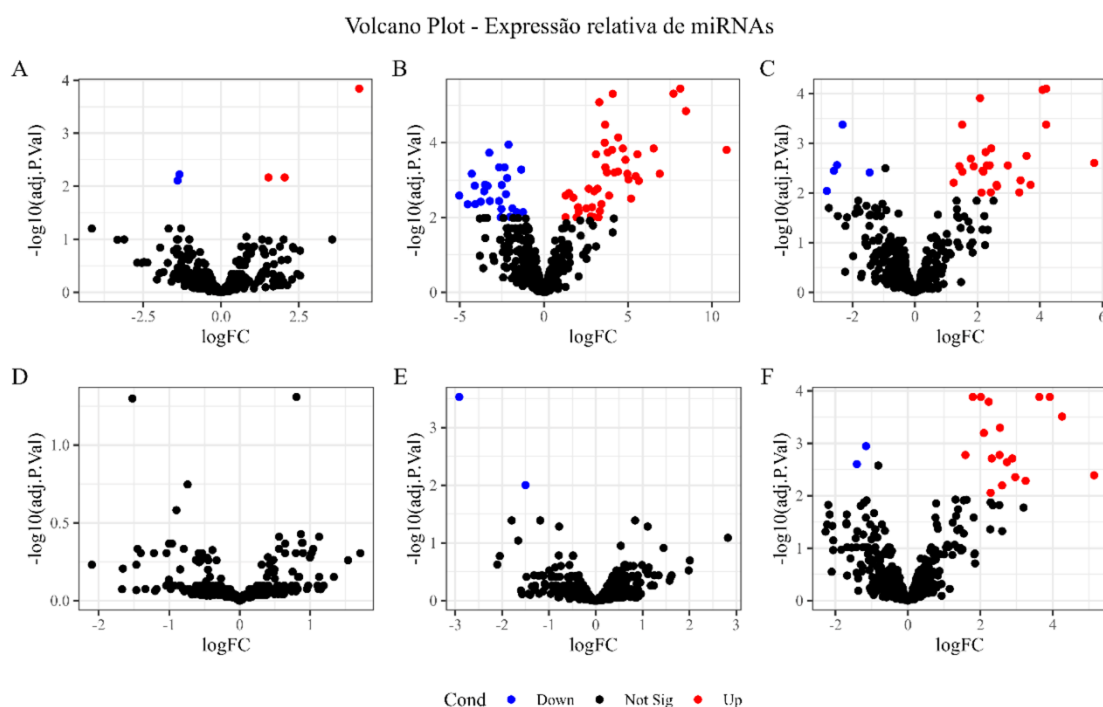
Os parâmetros contrastados por B1, B2, B3, B4, B5, B6 foram utilizados para nomear cada índice de filtragem. Estes, por sua vez, foram separados em grupos para análise de fontes (VSMC ou VM) saudáveis vs. Calcificadas, apenas as fontes (englobando saudáveis e doentes).

Predição de Alvos

Os parâmetros designados anteriormente permitiram a obtenção de listas de predição de miRNAs. Avaliados através de código de linguagem R e utilizando pacotes de banco de dados, como *BioBase* (FALCON; MORGAN; GENTLEMAN, 2007),

*miRNA*tap (PAJAK; SIMPSON, 2016) e *miRNA*tap.db (PAJAK; SIMPSON, 2015), foram obtidos os dados apresentados na **Figura 4**.

Figura 4. Perfil de expressão diferencial de miRNAs *Up* e *Down* regulados: Gráficos de Volcano dos parâmetros B1 (A), B2 (B), B3 (C), B4 (D), B5 (E) e B6 (F), onde os miRNAs significativos foram definidos por $-\log_{10}(adj.P.Val) > 2$ e $|\log(FC)| > 1$.



Fonte: Autoria própria, 2023.

Conforme observado na **Figura 4**, alguns miRNAs se destacaram por estarem superexpressos (*Up*), em vermelho, ou subexpressos (*Down*), em azul. Foi utilizado o $-\log_{10}(adj.P.Val) > 2$ para miRNAs significantes e $|\log(FC)| > 1$, onde valores negativos são considerados *Down* regulados e valores positivos são considerados *Up* regulados.

Dentre todos os parâmetros obtidos na **Tabela 2** e analisados junto a **Figura 4**, apenas B4 não apresentou resultados significantes. Entretanto, com os resultados obtidos de B1 até B6 (Fig.4 A-E), foi possível prosseguir para a próxima etapa de análise.

Enriquecimento Funcional

Com a ideia de empregar o enriquecimento funcional nos miRNAs significantes, foram aplicados pacotes de funções no R. O pacote *org.Rn.eg.db* foi utilizado para enriquecimento utilizando o banco de dados GO (*Gene Ontology*) (CARBON;

MUNGALL, 2018), enquanto o pacote *ClusterProfiler* (WU et al., 2021) foi utilizado para enriquecimento utilizando KEGG PATHWAYS (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (KANEHISA et al., 2023).

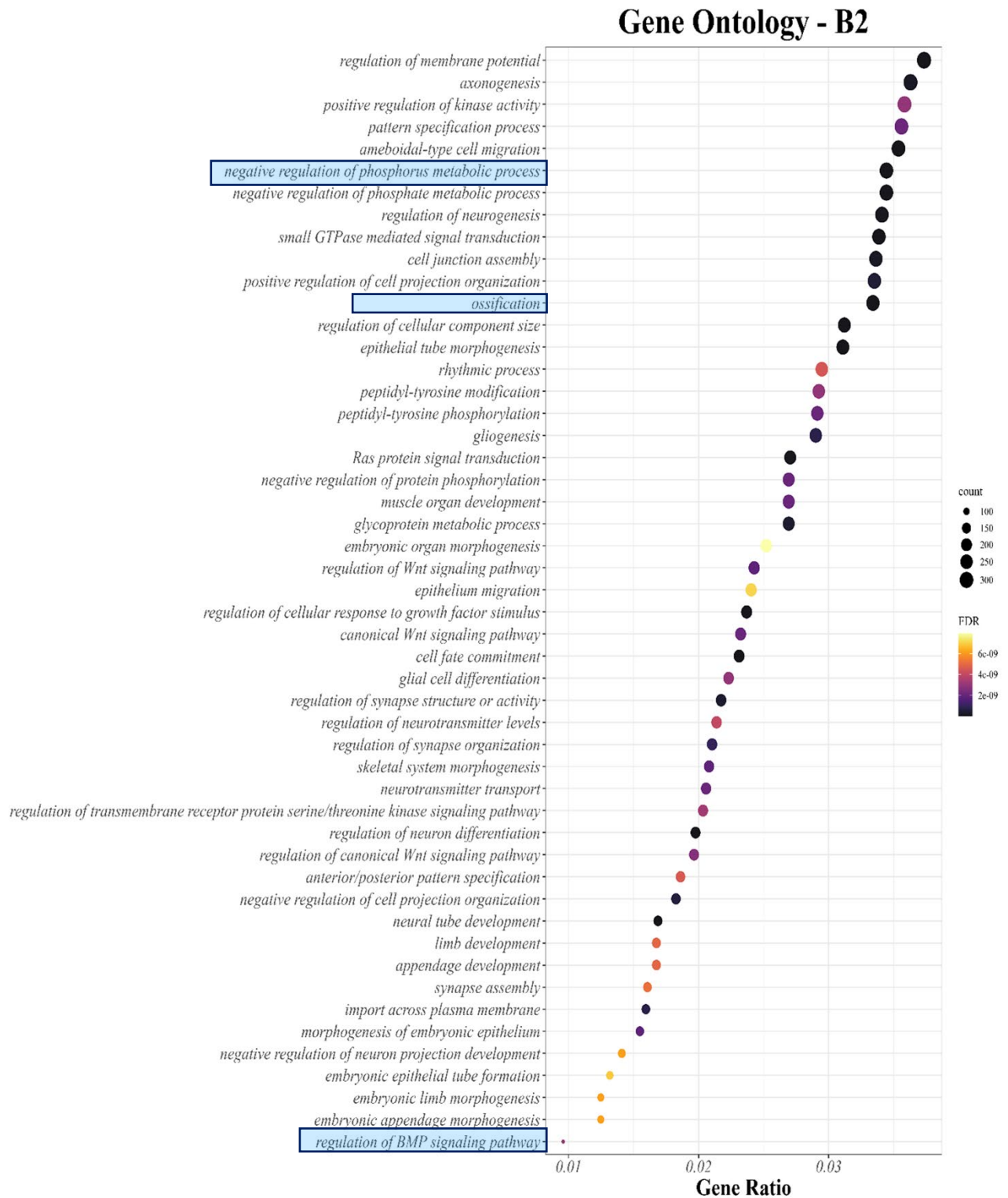
Enriquecimento Funcional utilizando Gene Ontology

Utilizando o banco de dados Gene Ontology (GO), foi realizado o enriquecimento funcional dos dados obtidos no teste anterior. Para este passo do experimento, foi utilizado apenas os parâmetros B2, B3 e B6, em que os resultados se apresentaram mais significativos e relevantes para a análise. Tal análise consiste em encontrar os miRNAs significativos durante os experimentos de predição e associá-los a parâmetros de ontologias biológicas, com relação a 3 aspectos de acordo com o banco de dados, descrito pelos autores:

- **Função molecular:** “Atividades de nível molecular realizadas por produtos gênicos. Os termos de função molecular descrevem atividades que ocorrem no nível molecular, como “catálise” ou “transporte”. Os termos de função molecular GO representam atividades em vez de entidades (moléculas ou complexos) que realizam as ações e não especificam onde, quando ou em que contexto a ação ocorre[...]”(CARBON; MUNGALL, 2018);
- **Componente celular:** “As localizações relativas às estruturas celulares nas quais um produto gênico desempenha uma função, sejam compartimentos celulares (por exemplo, mitocôndria) ou complexos macromoleculares estáveis dos quais fazem parte (por exemplo, o ribossomo[...]”(CARBON; MUNGALL, 2018);
- **Processo Biológico:** “Os processos maiores, ou 'programas biológicos' realizados por múltiplas atividades moleculares. Exemplos de termos amplos de processos biológicos são reparo do DNA ou transdução de sinal[...]”(CARBON; MUNGALL, 2018).

Com base nestes aspectos e os dados obtidos da predição, foram gerados *dot plots* de enriquecimento para os parâmetros, mostrados nas **Figuras 5, 6 e 7**.

Figura 5. Enriquecimento Funcional do parâmetro B2 baseado em aspectos do GO: A classificação dos aspectos foi feita de acordo com a contagem dos alvos de miRNAs (Count) e a taxa de descoberta de falsos positivos (FDR). Para o eixo vertical foi utilizado as ontologias do GO com parâmetros das 3 categorias pré-definidas e para o eixo horizontal usado a porcentagem de genes presentes nas ontologias (Gene Ratio).

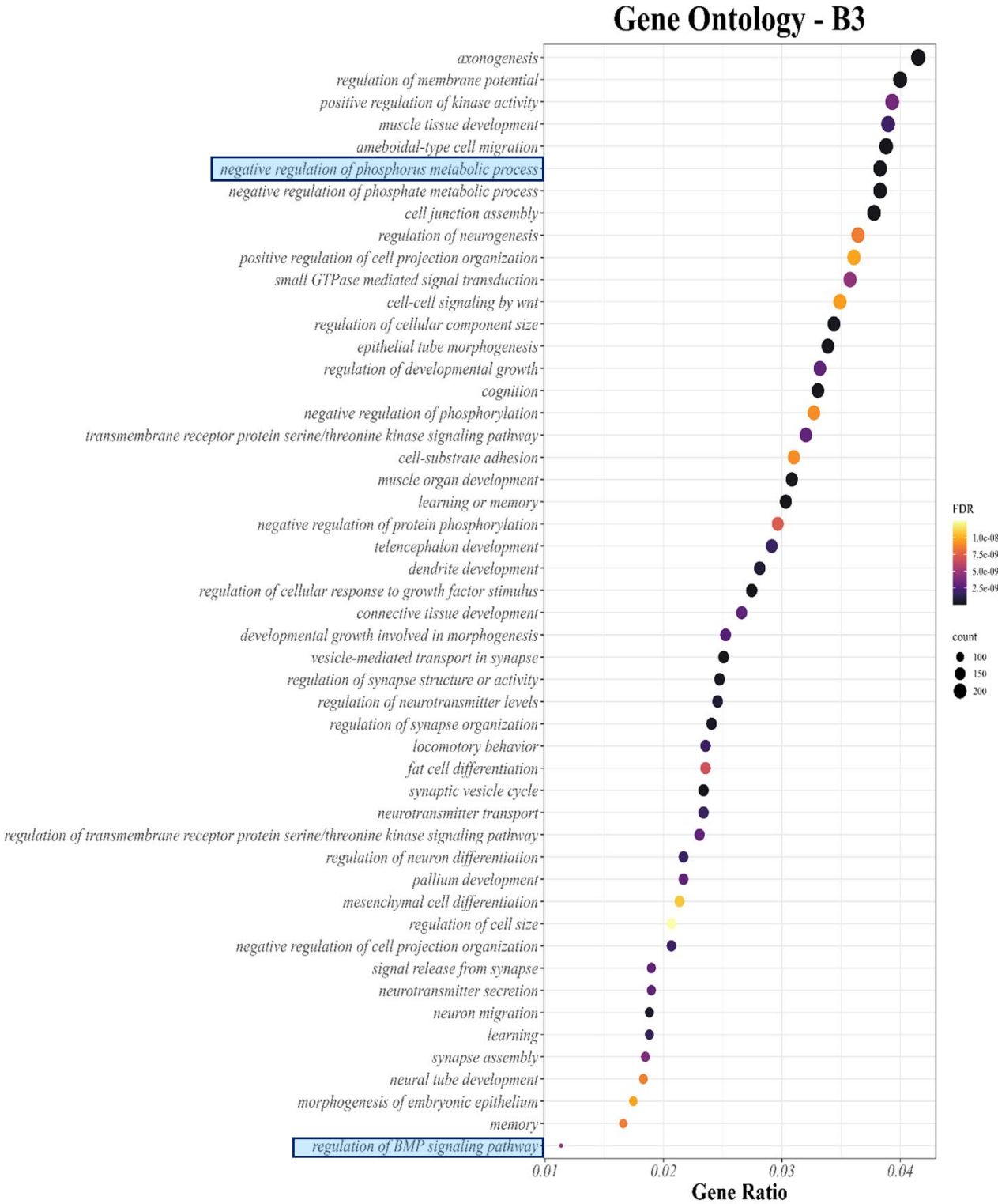


Fonte: Autoria própria, 2023.

Para o enriquecimento funcional do parâmetro B2 baseados nos aspectos do *Gene Ontology*, foram utilizados 4 parâmetros para a construção do gráfico, o primeiro deles, o Count, desempenhou um papel crucial na contagem dos alvos de miRNAs. Aqui, a quantidade de alvos se correlacionou diretamente com o diâmetro dos pontos. No que diz respeito ao eixo horizontal, utilizamos o Gene Ratio. Esse parâmetro abrange intervalos de porcentagem de genes presentes entre todas as ontologias do banco de dados GO. Já para o eixo vertical, usamos os aspectos mais relacionados das ontologias descritas no GO.

Dentre os resultados obtidos, o gráfico da **Figura 6** mostra as 50 ontologias com maior destaque dentre todas pertencentes ao banco de dados, como *regulation of membrane potential* (GO:0042391), *axonogenesis* (GO:0007409). Junto com estes resultados, foi encontrado algumas ontologias de interesse do estudo, como *ossification* (GO:0001503), *negative regulation of phosphorus metabolic process* (GO:0010563) e *regulation of BMP signaling pathway* (GO:0030510).

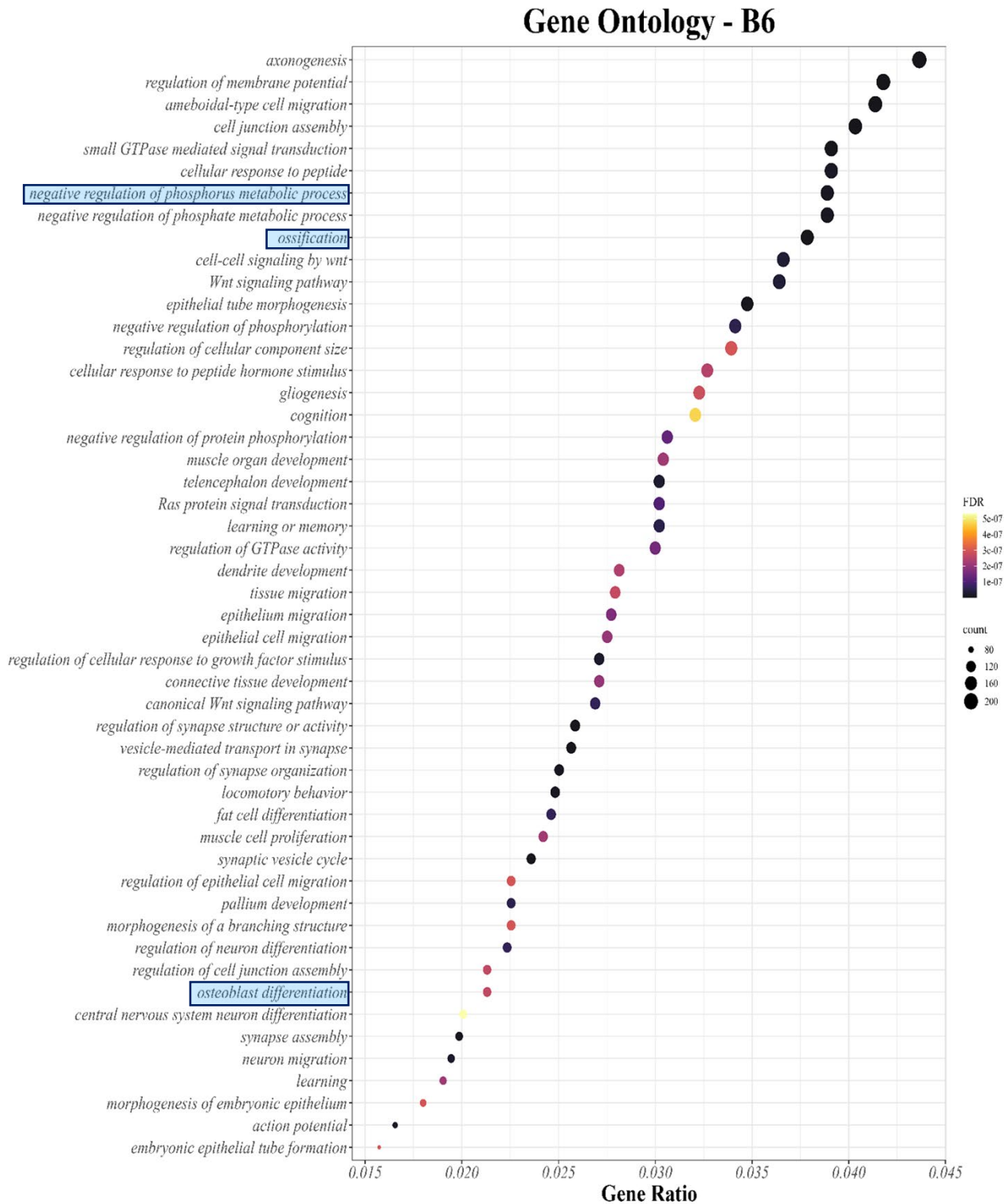
Figura 6. Enriquecimento Funcional do parâmetro B3 baseado em aspectos do GO: A classificação dos aspectos foi feita de acordo com a contagem dos alvos de miRNAs (*Count*) e a taxa de descoberta de falsos positivos (FDR). Para o eixo vertical foi utilizado as ontologias do GO com parâmetros das 3 categorias pré-definidas e para o eixo horizontal usado a porcentagem de genes presentes nas ontologias (*Gene Ratio*).



Fonte: Autoria própria, 2023.

Para o enriquecimento funcional do parâmetro B3 também baseados nos aspectos do Gene Ontology, foram utilizados os mesmos parâmetros utilizados anteriormente em B2. As ontologias em destaque ao estudo foram: *regulation of BMP signaling pathway* (GO:0030510) e *negative regulation of phosphorus metabolic process* (GO:0010563).

Figura 7. Enriquecimento Funcional do parâmetro B6 baseado em aspectos do GO: A classificação dos aspectos foi feita de acordo com a contagem dos alvos de miRNAs (Count) e a taxa de descoberta de falsos positivos (FDR). Para o eixo vertical foi utilizado as ontologias do GO com parâmetros das 3 categorias pré-definidas e para o eixo horizontal usado a porcentagem de genes presentes nas ontologias (Gene Ratio).



Fonte: Autoria própria, 2023.

Por fim, o enriquecimento funcional para o parâmetro B6 baseado em ontologias do GO, utilizando os mesmos parâmetros definidos anteriormente, mostram que, para ontologias de interesse ao estudo, as que se destacaram foram *negative regulation of Phosphorus metabolic process* (GO:0010563), *ossification* (GO:0001503) e *Osteoblast differentiation* (GO:0001649).

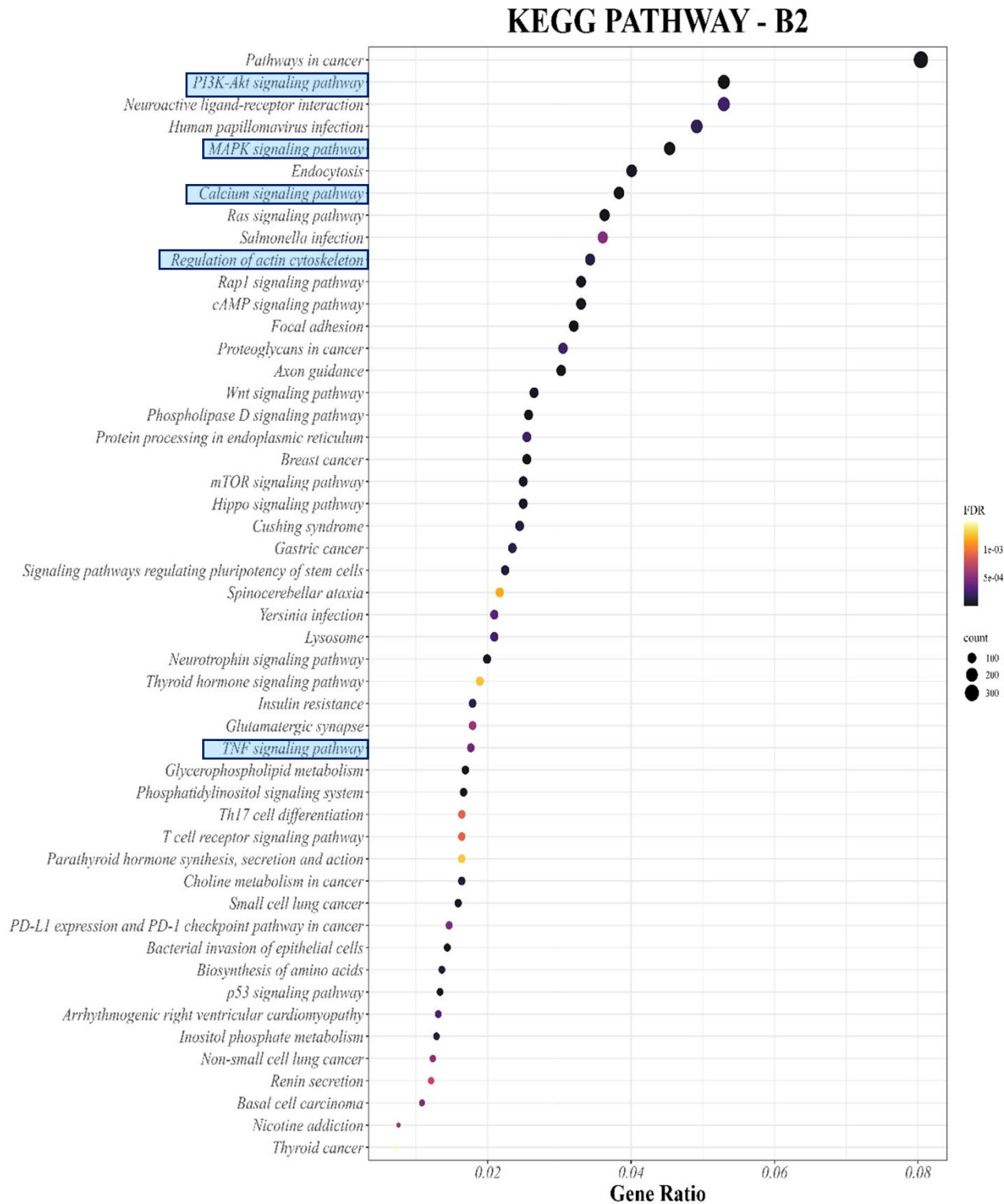
Enriquecimento Funcional utilizando KEGG Pathways

Para o enriquecimento funcional por vias de sinalização, utilizamos o banco de dados *KEGG Pathways* (KEGG). Também para este passo do experimento, foi utilizado apenas os parâmetros B2, B3 e B6, em que houve resultados mais significativos e relevantes para a análise. Nesta análise, consistiu-se em encontrar os miRNAs significativos durante os experimentos de predição de alvos e associá-los a parâmetros de vias de sinalização, com relação aos aspectos definidos de acordo com o banco de dados, sendo estes:

- Metabolismo;
- Processamento de informação genética;
- Processamento de informação ambiental;
- Processos celulares;
- Sistemas orgânicos;
- Doenças humanas;
- Desenvolvimento de drogas.

E com base nestes aspectos e os dados obtidos da predição de alvos, foram gerados *dot plots* de enriquecimento funcional para os dados parâmetros.

Figura 8. Enriquecimento Funcional do parâmetro B2 baseado em aspectos do KEGG PATHWAYS:
A classificação dos aspectos foi feita de acordo com a contagem dos alvos de miRNAs (Count) e a taxa de descoberta de falsos positivos (FDR). Para o eixo vertical foi utilizado as vias de sinalização definidas pelo KEGG Pathways e para o eixo horizontal usado a porcentagem de genes presentes nas vias de sinalização (Gene Ratio).



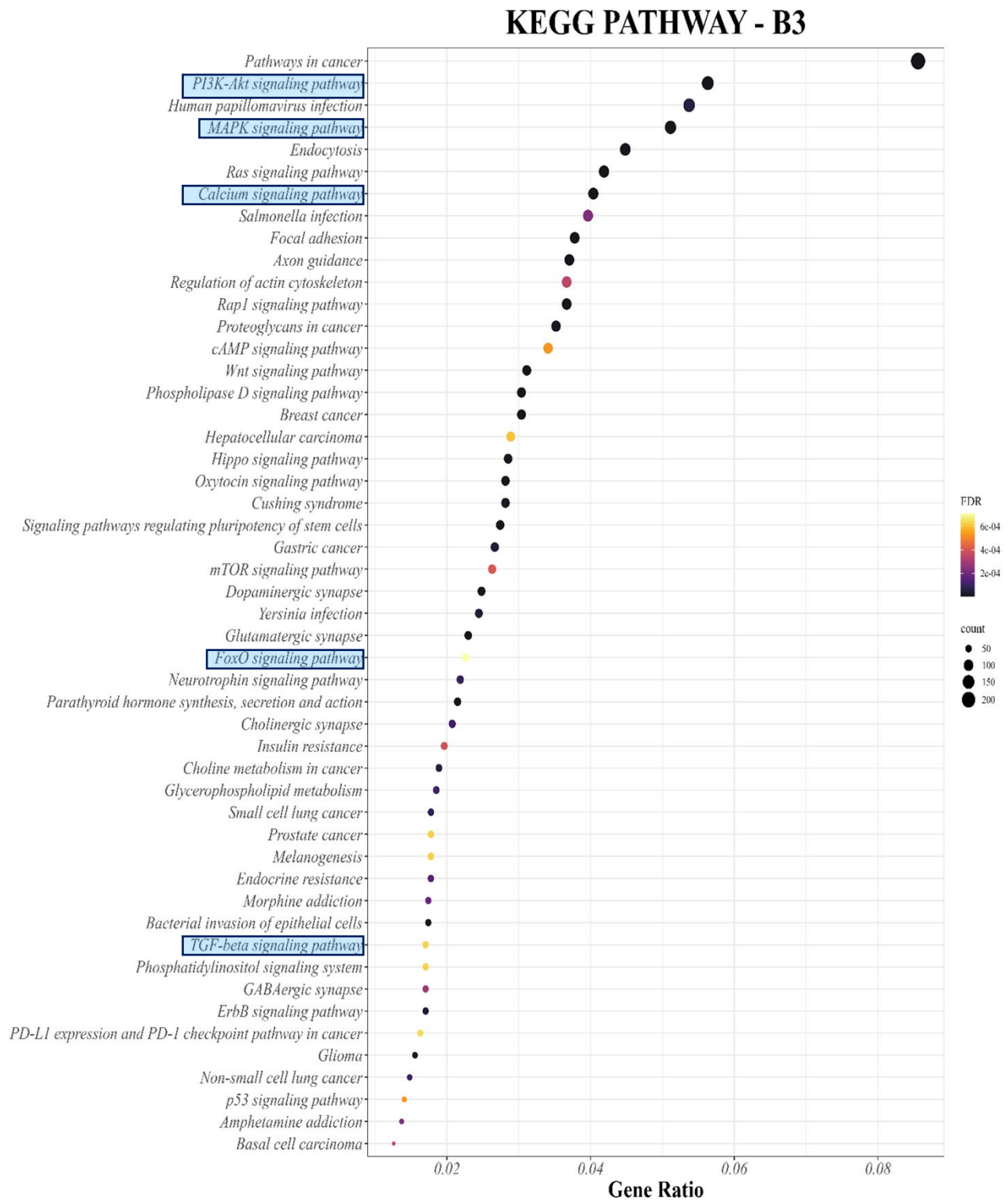
Fonte: Autoria própria, 2023.

Para o enriquecimento funcional do parâmetro B2 utilizando a base de dados do *KEGG Pathways*, foram utilizados 4 parâmetros para a construção do gráfico, estes foram: *Count*, para a contagem dos alvos de miRNAs, em que a quantidade de alvos está diretamente proporcional ao diâmetro dos pontos; FDR, que relaciona a taxa de falsos positivos à intensidade de cor; Para o eixo horizontal, foi utilizado o *Gene Ratio*, para intervalos de porcentagem de genes presentes dentre todas as vias de sinalização da base de dados *KEGG Pathways* e para o eixo vertical, os aspectos mais relacionados a vias de sinalização descritas no *KEGG Pathways*.

Após estabelecidos todos os parâmetros, foi obtido as top 50 vias de sinalizações relacionadas aos miRNAs identificados no experimento. Algumas vias de sinalização de potencial interesse ao estudo pôde ser identificadas nesta lista, com por exemplo PI3k-Akt *signaling pathway* (rno04151) e *Calcium signaling pathway* (rno04020), MAPK *signaling pathway* (rno04010), *regulation actin of cytoskeleton* (rno04810), TNF *signaling pathway* (rno04668).

Figura 9. Enriquecimento Funcional do parâmetro B3 baseado em aspectos do KEGG PATHWAYS:

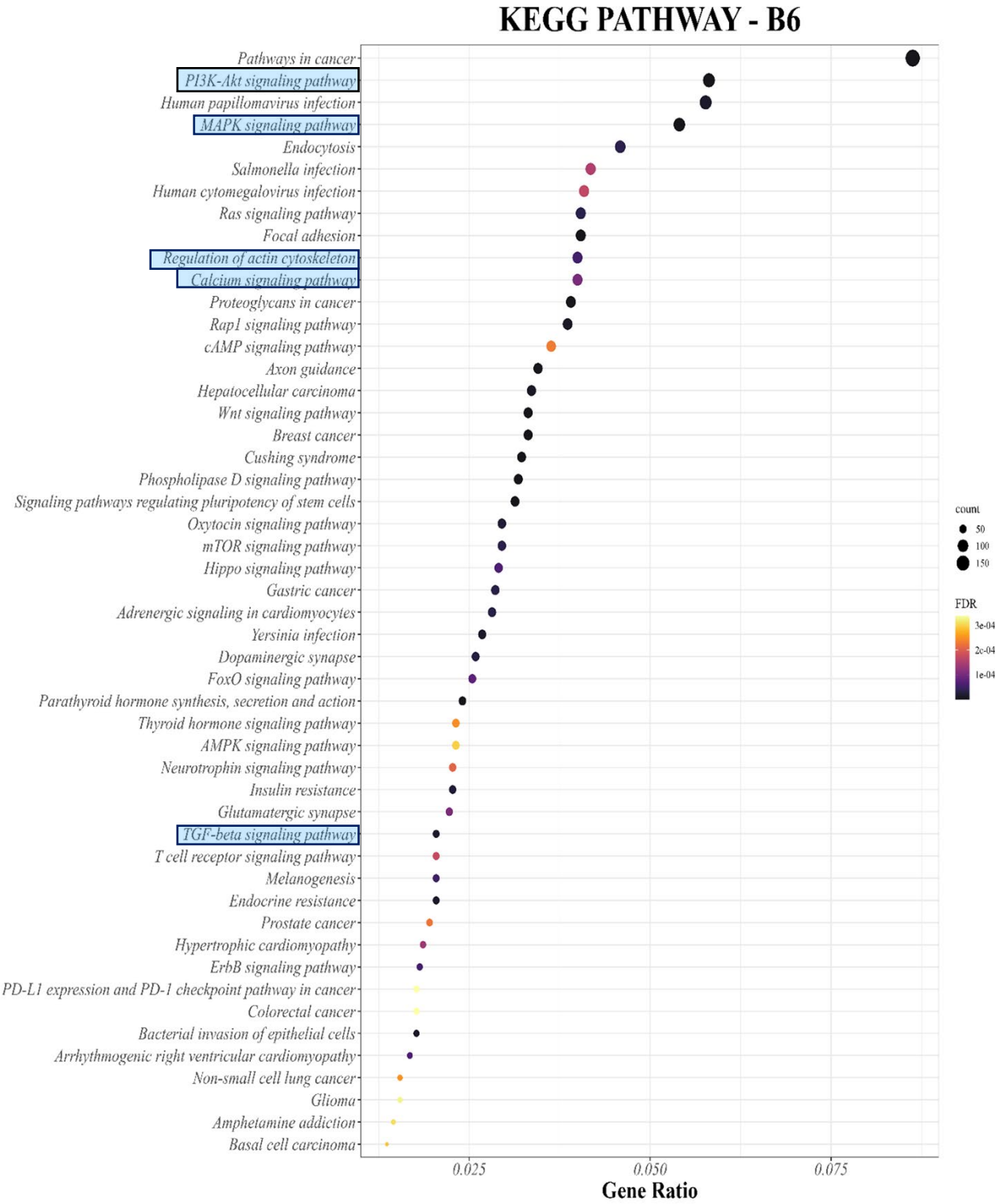
A classificação dos aspectos foi feita de acordo com a contagem dos alvos de miRNAs (Count) e a taxa de descoberta de falsos positivos (FDR). Para o eixo vertical foi utilizado as vias de sinalização definidas pelo KEGG Pathways e para o eixo horizontal usado a porcentagem de genes presentes nas vias de sinalização (Gene Ratio).



Fonte: Autoria própria, 2023.

Para o enriquecimento funcional do parâmetro B3 utilizando a base de dados do *KEGG Pathways*, foram utilizados os mesmos fatores usados no parâmetro anterior. Alguns resultados de potencial importância apareceram, como *PI3k-Akt signaling pathway* (rno04151), *FoxO signaling pathway* (rno04068) e *Calcium signaling pathway* (rno04020), *MAPK signaling pathway* (rno04010), *regulation of actin cytoskeleton* (rno04810) e *TGF- β signaling pathway* (rno04350).

Figura 10. Enriquecimento Funcional do parâmetro B6 baseado em aspectos do KEGG PATHWAYS: A classificação dos aspectos foi feita de acordo com a contagem dos alvos de miRNAs (Count) e a taxa de descoberta de falsos positivos (FDR). Para o eixo vertical foi utilizado as vias de sinalização definidas pelo KEGG Pathways e para o eixo horizontal usado a porcentagem de genes presentes nas vias de sinalização (Gene Ratio).



Fonte: Autoria própria, 2023.

E por fim, para o enriquecimento funcional do parâmetro B6 utilizando a base de dados do KEGG Pathways, foram utilizados os mesmos fatores para obtenção do gráfico. As vias de sinalização que possivelmente podem estar relacionadas ao estudo são: *PI3k-Akt signaling pathway* (rno04151), *Calcium signaling pathway* (rno04020), *FoxO signaling pathway* (rno04068) e *TGF- β signaling pathway* (rno04350), *regulation of actin cytoskeleton* (rno04810).

Através do enriquecimento funcional, utilizando dos parâmetros do KEGG e GO, onde há o envolvimento de vias de sinalização, processos biológicos, componentes celulares e função morfológica relativos aos miRNAs encontrados como hiper e hiporegulados, foram identificados alguns fatores de grande importância na CV. Dentre esses fatores, destaca-se a sinalização de Ca^{2+} (KEGG: rno04020), em que sua presença em células normais se dá ao processo de desencadeamento da contração. Entretanto, a presença de Ca^{2+} em vasos sanguíneos doentes, pode indicar a possibilidade das VSMCs estarem perdendo suas propriedades contráteis e adotando um fenótipo de “reparo” ou “sintético”, que pode ser acompanhado da conversão para um tipo de célula que expressa várias proteínas reguladoras ósseas (PROUDFOOT, 2019).

A regulação de processos metabólicos de Fósforo (GO: 0010563) também tem sua participação direta associada a CV. Uma vez que a regulação da homeostase de P é controlada pela mudança das taxas de remodelação óssea, há a influência deste fator nos níveis de reabsorção de fosfato inorgânico (Pi). Além disso, em VSMCs ateroscleróticas, pôde-se observar que há expressão de fatores osteogênicos nas células, como *Cbfa1* e RUNX. Ademais, com um maior aumento da concentração de P no meio, também há o estímulo de OSTERIX, outro importante fator do ciclo de diferenciação osteoblástico (HRUSKA et al., 2007).

Outros processos identificados nos enriquecimentos, incluindo principalmente duas ontologias diretamente ligadas a calcificação e formação óssea, são a ossificação (GO:0001503), definida como “formação de osso ou de uma substância óssea, ou a conversão de tecido fibroso ou de cartilagem em osso ou substancia óssea” (CARBON; MUNGALL, 2018), e a diferenciação de osteoblastos (GO:0001649), que também corresponde a presença de variados fatores de indução a calcificação de células arteriais. O processo de osteogênese ocorre através de muitos reguladores-chave da formação óssea e proteínas estruturais ósseas, que são expressos nas camadas arteriais mediais calcificadas (MIZOBUCHI; TOWLER; SLATOPOLSKY, 2009). Altos níveis de fosfato extracelular podem induzir VSMCs a diferenciar-se em células semelhantes a osteoblastos, induzindo também a expressão de *Cbfa1/Runx2*; e aumento de expressão de genes associados ao processo de diferenciação óssea, como Osteocalcina (BGLAP), Osteopontina (OPN) e fosfatase alcalina (ALP) (ENGELSE et al., 2001; SLATOPOLSKY, 2009; MIZOBUCHI; TOWLER).

Um outro fator importante e que merece destaque é a sinalização/regulação de algumas moléculas dentro do metabolismo celular, como a a sinalização de TGF- β (rno04350), FoxO, PI3k-Akt e a regulação de BMP (GO:0030510).

O TGF- β é uma família de moléculas de sinalização, onde são pertencentes moléculas ligantes que interagem com receptores específicos, co-receptores e proteínas moduladoras. Esta família de ligantes tem como subfamílias os fatores de diferenciação de crescimento (GDFs), ativinas e inibinas, fatores de determinação nodais, sendo comumente envolvidos na homeostase e fisiopatologia do sistema cardiovascular. As proteínas de TGF-beta e BMP modulam e interagem com respostas inflamatórias, recrutando células semelhantes a osteoblastos e condroblastos para promoção do remodelamento calcificado e ossificação tipo endocondral (YANG et al., 2020). As proteínas BMPs também são uma das subfamílias de ligantes que fazem parte da família de moléculas de sinalização TGF- β . Essas proteínas são superexpressas em regiões ossificadas, por miofibroblastos e pré-osteoblastos, em específico as BMP4 e BMP2, sendo esta última um participante como indutora a ativação pró-osteogênica de células intersticiais (YANG et al., 2020).

A Fox Head Box é uma família de proteínas composta por 39 membros, com 19 subgrupos, sendo definidas por letras que vão de A à S. Em específico a FoxO (rno04068), sinalizada pelo enriquecimento funcional, é uma proteína responsável por ativar fatores de transcrição e crescimento (LALMANSINGH et al., 2012; TIA et al., 2018). Estudos recentes apontam que FoxO1 e FoxO3 se relacionam ao processo de calcificação quando estas são induzidas com meio osteogênico ou reguladas por vias de Akt-FoxO no processo regulador de expressão do mir-155 (LI et al., 2021; SAMANTA et al., 2021). Ambas proteínas agem na supressão da ativação de Akt, seja pré-reguladas ou pós-reguladas, e em específico FoxO3, facilita o processo de calcificação ativando a produção de proteínas apoptóticas (LALMANSINGH et al., 2012; LI et al., 2021).

A sinalização de PI3k-Akt (rno04151), que é uma sinalização onipresente reconhecida como via fundamental para regular a proliferação, diferenciação, apoptose e regulação do ciclo celular, tem seu envolvimento na CV relacionado à estimulação de PI3K, quando ativada promove a fosforilação de Akt. A Akt desempenha um papel importante na ativação do NF- κ B, que por sua vez, também participa da patogênese da CV, desencadeando processos inflamatórios que podem levar à transformação osteogênica das VSMCs (HE et al., 2019).

Complementarmente, a sinalização de MAPK (rno04010), que são proteínas-quinase específicas de serina/treonina, ativadas dentro de cascatas que regulam a proliferação, diferenciação e morte celular (SUN et al., 2015a). A presença da sinalização de MAPK na CV pode estar relacionada a regulação da enzima ERK1/2, que quando inibida, promove aumento da síntese de elastina no conteúdo aórtico e quando ativada participa do processo de fosforilação de RUNX2, proteína participante no processo de diferenciação osteoblástica (ZENG et al., 2021, p. 2).

E por fim, e não menos importante, a sinalização do citoesqueleto de actina (rno04810), que é regulada por múltiplas vias de sinalização, ativadas por ambos os receptores tirosina quinase (RTKs) e receptores acoplados à proteína G (GPCRs). Os principais componentes de sinalização incluem proteínas G triméricas, proteínas G pequenas, lipídios quinases, proteínas quinases dependentes de Ca^{2+} , ROCK e MAPKs (GERTHOFFER, 2007). Sua relação a CV pode se dar através da inativação de $\text{PKC}\alpha$ e $\text{PKC}\delta$, através da ruptura de citoesqueletos de actina/microtúbulos, uma vez que várias proteínas relacionadas aos citoesqueletos de actina e microtúbulos, incluindo talina, vinculina, troponina, proteínas associada a microtúbulos 2 e α -tubulina, foram relatadas como substratos de proteínas quinase C (PKC) e que a inibição das atividades de $\text{PKC}\alpha$ e $\text{PKC}\delta$ leva a um aumento na ruptura induzida por Pi de microtúbulos e actina, além da estimulação da sinalização osteogênica (LEE; KIM; JEONG, 2014). Todos esses processos de sinalização selecionados dentro das ontologias participam em alguma etapa da CV, sendo necessários mais estudos para a identificação dos miRNAs específicos envolvidos nesses processos.

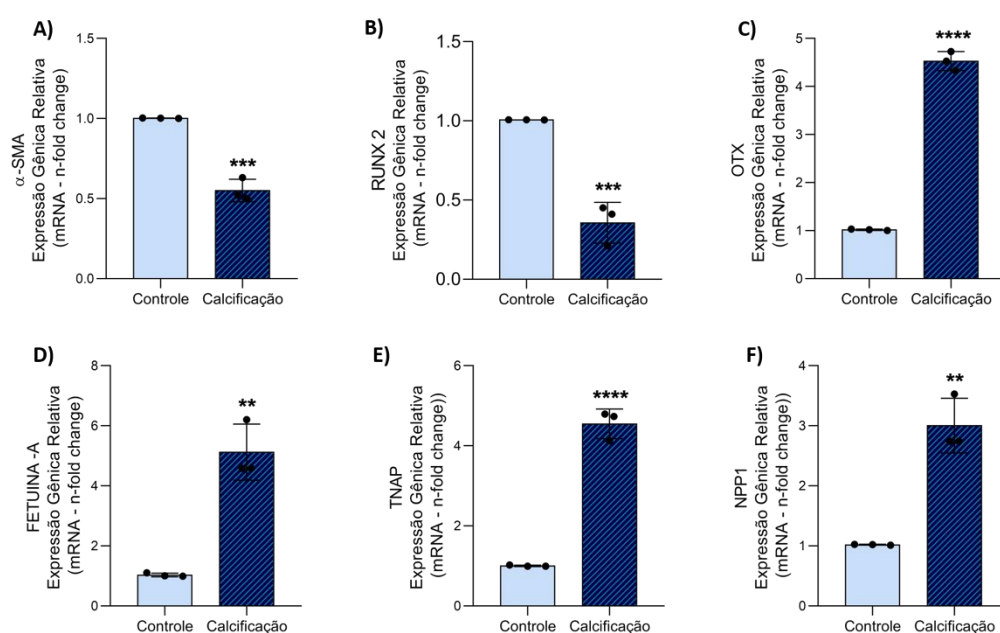
RESULTADOS *IN VITRO*

Análise de expressão gênica

Pensando em validar os dados encontrados na análise *in silico*, seguimos o protocolo previamente já descrito pelo nosso grupo (DA SILVA et al., 2020), onde as células de musculatura lisa vascular foram expostas ao meio com *overload* de cálcio e fosfato. Durante a evolução do processo de calcificação, a expressão de alguns marcadores contráteis, como o músculo liso 22 alfa ($\text{SM22}\alpha$), foi diminuída, enquanto a expressão de fatores relacionados à osteogênese, como proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), RUNX2, OTX, TNAP e NPP1 são regulados positivamente (BOSTRÖM et al., 1993; ZHANG et al., 2014; KROHN et al., 2016). Para validar o modelo proposto neste

estudo, realizamos várias análises com foco em biomarcadores já conhecidos na osteogênese e foi possível validar mais uma vez o modelo, como mostrado na figura 11, onde observamos o aumento significativo da expressão gênica de OTX, FETUINA-a, TNAP e NPP1 (**fig. 11 C-F**). Como discutido anteriormente, as VSMC têm a capacidade de expressar proteínas envolvidas exclusivamente na contração muscular, como a-SMA, e nossos dados apontam diminuição da expressão gênica deste marcador (**Fig. 11 A**), sugerindo a perda de função contrátil destas células, como já demonstrado pelo nosso grupo em trabalhos anteriores (STEITZ et al., 2001; DA SILVA et al., 2020;).

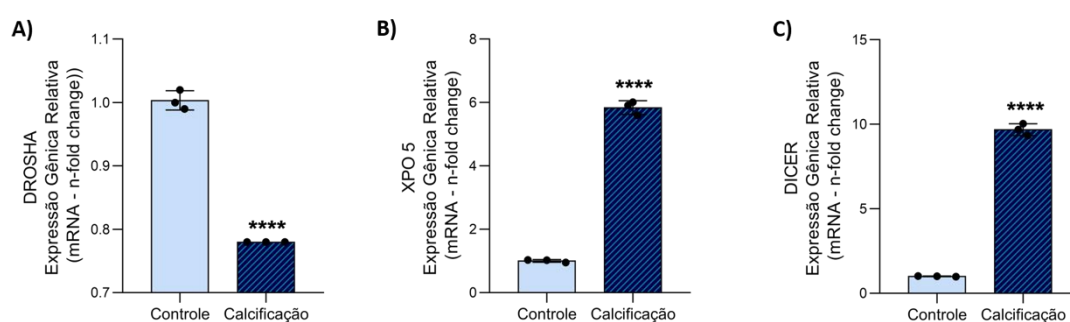
Figura 11. Fenótipo osteogênico de VSMC em sobrecarga de Ca^{+2} e P: Representação gráfica da expressão gênica relativa de α -SMA (A), RUNX2 (B), OTX (C) FETUÍNA (D), TNAP (E) e NPP1 (F) normalizados pelo nível de expressão dos genes 18S, β -ACTINA e GAPDH. Os níveis foram determinados usando o método limiar crítico comparativo $\Delta\Delta\text{CT}$ e mostrados em um formato gráfico com valores normalizados em função do valor atribuído ao controle 1. Os resultados analisados por teste T foram representados como a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ em relação ao seu respectivo controle.



Recentemente, os miRNAs despertaram o interesse dos biogeneticistas por atuarem como reguladores da patogênese das doenças vasculares, biomarcadores diagnósticos e alvos terapêuticos (HAYES; PERUZZI; LAWLER, 2014; TÜFEKCI et al., 2014). Estudos *in vivo* e *in vitro* apontaram papéis estimuladores ou inibitórios no desenvolvimento do prolapso da válvula mitral, fusão do folheto aórtico e vias de calcificação, especificamente diferenciação osteoblástica e modulação de fatores de transcrição das VSMC (NAPPI et al., 2021). Buscando investigar a participação dos

miRNAs no processo da CV, realizamos a quantificação da expressão de genes que codificam enzimas envolvidas na biogênese e maturação de miRNAs. Na figura 12 observamos uma diminuição na expressão de DROSHA (**fig. 12 A**) e um aumento significativo dos transcritos de XPO5 e DICER (**fig. 12 B e C**). Esta diminuição nos níveis de DROSHA pode indicar que no período escolhido (72h de tratamento), os miRs já podem ter sofrido a primeira clivagem e estão seguindo para o citoplasma, onde sofrerão a maturação final e então poderão entrar em ação.

Figura 12. Análise da expressão gênica da maquinaria de processamento de miRs: A expressão gênica das três enzimas envolvidas na biogênese e maturação dos miRs foram realizadas através da análise quantitativa em tempo real (q-PCR) e corrigida pelos três controles endógenos (GAPDH, β -ACTINA e 18S). Em (A) Drosha, em (B) XPO5 e em (C) Dicer. Os resultados analisados por teste T representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao grupo controle * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

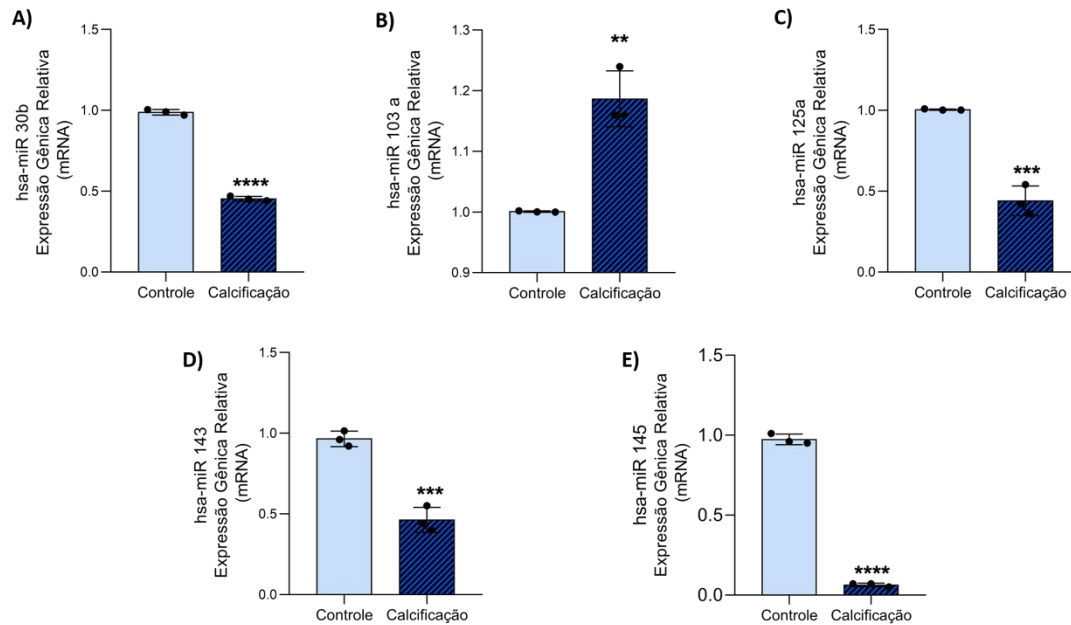


Os miRNAs selecionados para análise de transcritos gênicos foram baseados nos dados da pesquisa literária e pesquisa *in silico* realizada nos bancos de dados. A figura 13 traz a expressão dos principais miRs envolvidos no processo de CV e aqui damos destaque para o miR 103a (**fig. 13 B**), onde pode-se notar um aumento da expressão. Lei He, *et. al.* (2021) mostrou que o miR 103a é capaz de regular o processo de CV atuando na regulação do gene RUNX2, um dos principais envolvidos na osteogênese. Seus dados constatarem que a expressão de RUNX2 diminuiu significativamente após a regulação positiva da expressão do miR 103a. Demonstraram também que os níveis dos miRs 30b e 125a foram significativamente reduzidos no modelo de calcificação e como foi notado em nossos resultados, os níveis desses transcritos também estão *down*regulados (**Fig. 13 A e C**) (HE et al., 2021; SUN et al., 2015b). Outro autor mostrou ainda que em condições elevadas de Pi, VSMC sofrem um aumento no processo de calcificação, diminuição na proliferação e na taxa de migração quando os níveis dos miR 143-145 estão

negativamente regulados (RANGREZ et al., 2012), o que evidenciamos também em nossos dados (**Fig. 13 D e E**).

Nossos dados corroboram com estes achados e nos levam a apontar o miR 103a como um possível alvo no tratamento e diagnóstico da doença.

Figura 13. Análise da expressão gênica dos miRNAs envolvidos na calcificação vascular: A análise quantitativa por tempo real (q-PCR) dos miRNA's foi corrigida pelo controle endógeno RNU6 e obtidas pelo programa PRISM8. (A) miR 30b, (B) miR 103a, (C) miR 125a, (D) miR 143 e (E) miR 145. Os resultados analisados por teste T representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao grupo controle * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.



5. CONCLUSÃO

Levando em consideração as análises realizadas, evidenciamos que alguns miRNAs estavam sendo super ou subexpressos durante a calcificação, tendo estes ainda participação direta (inibição ou promoção da produção de proteínas e enzimas) ou indireta (regulações e sinalizações de vias relacionadas a inflamação e proteínas ligadas a diferenciação osteoblástica) no surgimento da patologia. No entanto, futuras análise para identificar os miRNA envolvidos na CV devem ser aprofundados, uma vez que isso pode ser de grande importância na terapêutica da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI SYEDA, Z. et al. Regulatory Mechanism of MicroRNA Expression in Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 5, p. 1723, 3 mar. 2020.

ASSIS, R. I. F. et al. RG108 increases NANOG and OCT4 in bone marrow-derived mesenchymal cells through global changes in DNA modifications and epigenetic activation. **PLOS ONE**, v. 13, n. 12, p. e0207873, 3 dez. 2018.

BACCARELLI, A.; BOLLATI, V. Epigenetics and environmental chemicals. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 21, n. 2, p. 243–251, abr. 2009.

BASATEMUR, G. L. et al. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. **Nature Reviews Cardiology**, v. 16, n. 12, p. 727–744, dez. 2019.

BOSTRÖM, K. et al. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. **Journal of Clinical Investigation**, v. 91, n. 4, p. 1800–1809, 1 abr. 1993.

CANCELA, A. L. E. **Avaliação da relação entre metabolismo mineral e doença arterial coronariana em pacientes com função renal preservada**. Doutorado em Nefrologia—São Paulo: Universidade de São Paulo, 2 set. 2011.

CARBON, S.; MUNGALL, C. **Gene Ontology Data Archive**. Zenodo, , 2 jul. 2018. Disponível em: <<https://zenodo.org/record/2529950>>. Acesso em: 3 abr. 2023

CARLSON, M. **org. Rn. eg. db: Genome wide annotation for Rat. R Package Version 3.8. 2.** [s.l: s.n.].

CHAKRABORTY, R. et al. Targeting smooth muscle cell phenotypic switching in vascular disease. **JVS-Vascular Science**, v. 2, p. 79–94, 2021.

CHEN, N. X.; MOE, S. M. **Differential miRNA expression in Cells and Matrix Vesicles in Vascular Smooth Muscle Cells from Rats with Kidney Disease**. Database. Disponível em: <<https://www.ebi.ac.uk/biostudies/arrayexpress/studies/E-GEOD-68913>>. Acesso em: 2 mar. 2023.

CORDES, K. R.; SRIVASTAVA, D. MicroRNA Regulation of Cardiovascular Development. **Circulation Research**, v. 104, n. 6, p. 724–732, 27 mar. 2009.

DA SILVA, R. A. et al. Osteogenic gene markers are epigenetically reprogrammed during contractile-to-calcifying vascular smooth muscle cell phenotype transition. **Cellular Signalling**, v. 66, p. 109458, fev. 2020.

DAVIS-DUSENBERY, B. N.; WU, C.; HATA, A. Micromanaging Vascular Smooth Muscle Cell Differentiation and Phenotypic Modulation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 11, p. 2370–2377, nov. 2011.

DEANS, C.; MAGGERT, K. A. What Do You Mean, “Epigenetic”? **Genetics**, v. 199, n. 4, p. 887–896, 1 abr. 2015.

DURHAM, A. L. et al. Role of smooth muscle cells in vascular calcification: implications in atherosclerosis and arterial stiffness. **Cardiovascular Research**, v. 114, n. 4, p. 590–600, 15 mar. 2018.

ENGELSE, M. A. et al. Vascular calcification: expression patterns of the osteoblast-specific gene core binding factor α -1 and the protective factor matrix gla protein in human atherogenesis. **Cardiovascular Research**, v. 52, n. 2, p. 281–289, 1 nov. 2001.

FALCON, S.; MORGAN, M.; GENTLEMAN, R. An Introduction to Bioconductor's ExpressionSet Class. 2007.

FERNANDES, V. A. Estudos in silico de moléculas ligantes de nucleossomo sobre a cromatina. 1 set. 2020.

GERTHOFFER, W. T. Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Cell Migration. **Circulation Research**, v. 100, n. 5, p. 607–621, 16 mar. 2007.

HAYES, J.; PERUZZI, P. P.; LAWLER, S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. **Trends in Molecular Medicine**, v. 20, n. 8, p. 460–469, ago. 2014.

HE, L. et al. microRNA-103a regulates the calcification of vascular smooth muscle cells by targeting runt-related transcription factor 2 in high phosphorus conditions. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 22, n. 3, p. 1036, 19 jul. 2021.

HE, X. et al. Indoxyl sulfate-induced calcification of vascular smooth muscle cells via the PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway. **Microscopy Research and Technique**, v. 82, n. 12, p. 2000–2006, 2019.

HRUSKA, K. A. et al. PHOSPHORUS METABOLISM AND MANAGEMENT IN CHRONIC KIDNEY DISEASE: Renal Osteodystrophy, Phosphate Homeostasis, and Vascular Calcification: RENAL OSTEODYSTROPHY. **Seminars in Dialysis**, v. 20, n. 4, p. 309–315, 17 jul. 2007.

JAMINON, A. et al. The Role of Vascular Smooth Muscle Cells in Arterial Remodeling: Focus on Calcification-Related Processes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 22, p. 5694, 14 nov. 2019.

JORGE, A. L. et al. MicroRNAs: understanding their role in gene expression and cancer. **Einstein (São Paulo)**, v. 19, p. eRB5996, 6 jul. 2021.

KANEHISA, M. et al. KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. D1, p. D587–D592, 6 jan. 2023.

KAPUSTIN, A. N. et al. Vascular Smooth Muscle Cell Calcification Is Mediated by Regulated Exosome Secretion. **Circulation Research**, v. 116, n. 8, p. 1312–1323, 10 abr. 2015.

KROHN, J. B. et al. Discoidin Domain Receptor-1 Regulates Calcific Extracellular Vesicle Release in Vascular Smooth Muscle Cell Fibrocalcific Response via Transforming Growth Factor- β Signaling. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 36, n. 3, p. 525–533, mar. 2016.

- LALMANSINGH, A. S. et al. Multiple modes of chromatin remodeling by Forkhead box proteins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1819, n. 7, p. 707–715, jul. 2012.
- LANZER, P. et al. Medial vascular calcification revisited: review and perspectives. **European Heart Journal**, v. 35, n. 23, p. 1515–1525, 1 jun. 2014.
- LEE, K.; KIM, H.; JEONG, D. Protein kinase C regulates vascular calcification via cytoskeleton reorganization and osteogenic signaling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 453, n. 4, p. 793–797, 31 out. 2014.
- LEE, S. J.; LEE, I.-K.; JEON, J.-H. Vascular Calcification—New Insights into Its Mechanism. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 8, p. 2685, 13 abr. 2020.
- LI, Y. et al. MiR155 modulates vascular calcification by regulating Akt-FOXO3a signalling and apoptosis in vascular smooth muscle cells. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 25, n. 1, p. 535–548, 2021.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 1 dez. 2001.
- MIZOBUCHI, M.; TOWLER, D.; SLATOPOLSKY, E. Vascular Calcification: The Killer of Patients with Chronic Kidney Disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 20, n. 7, p. 1453, jul. 2009.
- MULLER, H. R.; PRADO, K. B. EPIGENÉTICA: UM NOVO CAMPO DA GENÉTICA. 2008.
- NAPPI, F. et al. MicroRNAs in Valvular Heart Diseases: Biological Regulators, Prognostic Markers and Therapeutical Targets. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 22, p. 12132, 9 nov. 2021.
- O'BRIEN, J. et al. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, p. 402, 3 ago. 2018.
- OLIVEIRA, R. B. DE et al. Vascular calcification in chronic kidney disease: a review. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 35, n. 2, p. 147–161, 2013.
- OTSUKA, F. et al. Has Our Understanding of Calcification in Human Coronary Atherosclerosis Progressed? **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 34, n. 4, p. 724–736, abr. 2014.
- PAJAK, M.; SIMPSON, T. I. miRNA_{at}.db: microRNA Targets - Aggregated Predictions database use. 2015.
- PAJAK, M.; SIMPSON, T. I. **miRNA_{at}: miRNA_{at}: microRNA Targets—Aggregated Predictions**. , 2016.
- PILETIČ, K.; KUNEJ, T. MicroRNA epigenetic signatures in human disease. **Archives of Toxicology**, v. 90, n. 10, p. 2405–2419, out. 2016.

- POTACZEK, D. P. et al. Epigenetics and allergy: from basic mechanisms to clinical applications. **Epigenomics**, v. 9, n. 4, p. 539–571, abr. 2017.
- PROUDFOOT, D. Calcium Signaling and Tissue Calcification. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 11, n. 10, p. a035303, out. 2019.
- QIN, J. et al. Histone Modifications and their Role in Colorectal Cancer (Review). **Pathology & Oncology Research**, v. 26, n. 4, p. 2023–2033, out. 2020.
- RANGREZ, A. Y. et al. Inorganic Phosphate Accelerates the Migration of Vascular Smooth Muscle Cells: Evidence for the Involvement of miR-223. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. e47807, 18 out. 2012.
- RITCHIE, M. E. et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 7, p. e47–e47, 20 abr. 2015.
- RIVAS, M. P.; TEIXEIRA, A. C. B.; KREPISCHI, A. C. V. Epigenética: conceito, mecanismos e impacto em doenças humanas. **Genética na Escola**, v. 14, n. 1, p. 14–25, 27 abr. 2019.
- RODRIGUES, C. P.; SHVEDUNOVA, M.; AKHTAR, A. Epigenetic Regulators as the Gatekeepers of Hematopoiesis. **Trends in Genetics**, v. 37, n. 2, p. 125–142, fev. 2021.
- SAMANTA, J. et al. Induction of cardiomyocyte calcification is dependent on FoxO1/NFATc3/Runx2 signaling. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 57, n. 10, p. 973–986, dez. 2021.
- SATO, F. et al. MicroRNAs and epigenetics: MicroRNAs and epigenetics. **FEBS Journal**, v. 278, n. 10, p. 1598–1609, maio 2011.
- SONG, E. et al. Network determinants of cardiovascular calcification and repositioned drug treatments. **The FASEB Journal**, v. 34, n. 8, p. 11087–11100, ago. 2020.
- STEITZ, S. A. et al. Smooth Muscle Cell Phenotypic Transition Associated With Calcification: Upregulation of Cbfa1 and Downregulation of Smooth Muscle Lineage Markers. **Circulation Research**, v. 89, n. 12, p. 1147–1154, 7 dez. 2001.
- SUN, Y. et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, v. 35, n. 6, p. 600–604, 2 nov. 2015a.
- SUN, Z. et al. MiR-103 inhibits osteoblast proliferation mainly through suppressing Cav1.2 expression in simulated microgravity. **Bone**, v. 76, p. 121–128, jul. 2015b.
- TIA, N. et al. Role of Forkhead Box O (FOXO) transcription factor in aging and diseases. **Gene**, v. 648, p. 97–105, 30 mar. 2018.
- TOWLER, D. A. Vascular Calcification: A Perspective On An Imminent Disease Epidemic. **IBMS BoneKEy**, v. 5, n. 2, p. 41–58, 1 fev. 2008.

TRION, A.; VAN DER LAARSE, A. Vascular smooth muscle cells and calcification in atherosclerosis. **American Heart Journal**, v. 147, n. 5, p. 808–814, maio 2004.

TÜFEKCI, K. U. et al. The Role of MicroRNAs in Human Diseases. Em: YOUSEF, M.; ALLMER, J. (Eds.). **miRNomics: MicroRNA Biology and Computational Analysis**. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, 2014. v. 1107p. 33–50.

VAN LEEUWEN, F.; VAN STEENSEL, B. Histone modifications: from genome-wide maps to functional insights. **Genome Biology**, v. 6, n. 6, p. 113, 2005.

WICKHAM, H. et al. Welcome to the {tidyverse}. **Journal of Open Source Software**, v. 4, n. 43, p. 1686, 2019.

WU, S.-S. et al. The Role of Epigenetics in Arterial Calcification. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–8, 2015.

WU, T. et al. clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. **The Innovation**, v. 2, n. 3, p. 100141, ago. 2021.

YANG, P. et al. The role of bone morphogenetic protein signaling in vascular calcification. **Bone**, v. 141, p. 115542, dez. 2020.

ZENG, P. et al. ERK1/2 inhibition reduces vascular calcification by activating miR-126-3p-DKK1/LRP6 pathway. **Theranostics**, v. 11, n. 3, p. 1129–1146, 2021.

ZHANG, J. et al. Vascular calcification is coupled with phenotypic conversion of vascular smooth muscle cells through Klf5-mediated transactivation of the Runx2 promoter. **Bioscience Reports**, v. 34, n. 6, p. e00148, 1 dez. 2014.