UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

“Estudo da expressão sérica do microRNA-1281, proteína C reativa e avaliação função renal em indivíduos com aneurisma de aorta abdominal antes e após tratamento endovascular”.

LAIS MISSAE MURAKAMI DOMINGUES ESTRAIOTTO ALVES

Ribeirão Preto

2017

LAIS MISSAE MURAKAMI DOMINGUES ESTRAIOTTO ALVES

“Estudo da expressão sérica do microRNA-1281, proteína C reativa e avaliação função renal em indivíduos com aneurisma de aorta abdominal antes e após tratamento endovascular”.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de concentração Clínica Cirúrgica - opção: Cirurgia.

Orientador: Prof Dr. Edwaldo Edner Joviliano

RIBEIRÃO PRETO

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo, pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Alves, Lais Missae Murakami Domingues Estraiotto

Estudo da expressão sérica do microRNA-1281, Proteína C Reativa e avaliação da função renal em indivíduos com aneurisma de aorta abdominal antes e após tratamento endovascular.

93 p. : il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Departamento de Cirurgia e Anatomia.

Orientador: Prof Dr. Edwaldo Edner Joviliano.

1.Aneurisma de Aorta Abdominal 2. microRNAs 3. Biomarcadores

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lais Missae Murakami Domingues Estraiotto Alves

Estudo da expressão sérica do microRNA-1281, proteína C reativa e avaliação da função renal em indivíduos com aneurisma de aorta abdominal antes e após tratamento endovascular.

Dissertação apresentada ao Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de concentração: Clínica Cirúrgica – opção: Cirurgia.

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

E conhecereis a Verdade e a Verdade nos libertará.

João 8:32

À minha família
À todos aqueles que respeitam o conhecimento

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edwaldo Edner Joviliano, que, além de orientador, foi amigo, tolerante, paciente e carinhoso durante a execução desse trabalho e, mesmo quando longe, sempre se fez próximo. Por tudo isso, minha admiração e eterna gratidão.

A Deus, que em sua infinita Bondade nos deu a vida e o dom de apreciá-la.

Aos meus pais, Julia (in memorian) e Angelo, que me deram a oportunidade de viver, mostrando por meio de exemplos, o valor da família, da amizade e do trabalho árduo.

Aos meus irmãos, Luci, Luciane (in memorian) e Nilson que me apoiaram, não só durante a minha formação profissional, mas em todos os momentos da vida.

Ao meu marido, Alexsandro, meu amor, exemplo de conduta, que ao meu lado escolheu trilhar seu caminho e que me fez acreditar, mesmo quando duvidei, que tudo é possível.

Ao Dr. Erkki Larsson, que foi muito importante na minha formação pessoal e profissional.

A todos os meus professores, sem os quais não seria possível chegar até aqui.

Aos médicos assistentes e docentes da Cirurgia Geral e Cirurgia Vascular da Faculdade de Medicina de Marília e a todos os funcionários, que contribuíram grandemente na minha formação profissional e em nutrir o amor pela cirurgia.

Ao Dr. Gilberto Pastori, exemplo de médico, de cirurgião, de professor e de amigo, que me ensinou muito mais do que preceitos da medicina.

À Profa. Dra. Daniela P. C. Tirapelli e à toda equipe do Laboratório de Biologia Molecular da FMUSP- Ribeirão Preto, que contribuíram grandemente com a execução desse trabalho.

À Faculdade de Medicina USP de Ribeirão Preto, que me permitiu e forneceu toda a estrutura necessária para a realização desse estudo.

A todos os pacientes, que concordaram em participar do trabalho.

A todos os meus amigos, que foram e são de suma importância em deixar a vida mais leve.

Ao Dr Celso Charuri que me fez ver o real objetivo da vida.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta, seja com gestos, palavras ou pensamentos me ajudaram nessa caminhada.

RESUMO

Alves, LMMDE. **Estudo da expressão sérica do microRNA-1281, proteína C reativa e função renal em indivíduos com aneurisma de aorta abdominal antes e após tratamento endovascular.** Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Introdução: O aneurisma de aorta abdominal (AAA) é uma doença prevalente e silenciosa também relacionada com a atividade inflamatória. Atualmente, a abordagem endovascular tem sido utilizada como principal técnica devido à inúmeras vantagens. Porém tem uma maior taxa de reintervenções e necessita de seguimento periódico com angiotomografias, o que aumenta custos e tem implicações como alteração da função renal além do acúmulo progressivo de radiação. Tais condições justificam a busca por possíveis biomarcadores que possam contribuir para um melhor seguimento.

Objetivos: Neste estudo, buscou-se correlacionar o microRNA-1281, proteína C reativa (PCR) e a avaliação da função renal de indivíduos com AAA com a evolução dos mesmos após o tratamento endovascular.

Pacientes e métodos: Foram selecionados 30 pacientes consecutivos do Ambulatório de Cirurgia Vascular e Endovascular do HCFMRP-USP, no período de janeiro de 2014 a novembro de 2015, com aneurisma de aorta abdominal e com indicação para tratamento endovascular. As dosagens séricas e avaliações angiotomográficas foram feitas no pré-operatório e 6 meses após a intervenção.

Resultados: Houve uma hiperexpressão do microRNA-1281 nos pacientes com aneurisma e uma significativa redução dos seus níveis séricos após a correção endovascular. A expressão do miRNA-1281 apresentou correlação positiva com o clearance de creatinina. Houve também correlação positiva da PCR com a presença do aneurisma, e com seu diâmetro e não houve alteração significativa da função renal mensurada através das dosagens séricas de uréia, creatinina e cálculo indireto de clearance.

Conclusão: O estudo mostrou que o miRNA 1281 tem boa correlação com a evolução favorável pós-tratamento endovascular do AAA, não se observando o mesmo com a proteína C reativa. Novos estudos são necessários para validar e complementar tais achados.

Palavras-chaves: Aneurisma de aorta abdominal, correção endovascular de aneurisma de aorta abdominal, MicroRNAs, biomarcadores, PCR, miRNA-1281.

ABSTRACT

Alves, LMMDE. **Study of serum expression of microRNA-1281, C-reactive protein and renal function in subjects with abdominal aortic aneurysm before and after endovascular treatment.** Dissertation (master's degree) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Introduction: Abdominal aortic aneurysm (AAA) is a prevalent and silent disease. Currently, the endovascular approach has been widely used and is the main technique due to the innumerable advantages. However, it has a higher rate of reintervention and requires periodic follow-up with tomography over the years, which increases its costs and has implications such as altered renal function besides the accumulation of radiation. Such conditions justify the search for possible biomarkers that may perhaps replace CT.

Objectives: In this study, we sought to correlate the microRNA-1281, C-reactive protein (CRP) and the renal function evaluation of individuals with AAA with their evolution after endovascular treatment.

Patients and methods: We selected 30 consecutive patients from the Ambulatory of Vascular and Endovascular Surgery of the HCFMRP-USP, in the period from January of 2014 until November of 2015, with abdominal aortic aneurysm and with indication for endovascular treatment. Serum dosages were made preoperatively and 6 months after the intervention

Results: There was a hyperexpression of the micro-RNA -1281 in patients with aneurysm and a significant reduction of their serum levels after endovascular correction. Expression of miRNA-1281 showed a positive correlation with creatinine clearance. There was also a positive correlation of CRP with the presence of the aneurysm, and with its diameter, and there was no significant alteration of renal function measured through serum urea, creatinine and indirect clearance calculations.

Conclusion: The study showed that 1281 miRNAs may prove to be a potential biomarker for eventual follow-up of patients undergoing AAA endovascular repair. New studies are needed to validate and complement these findings.

Key words: Abdominal aortic aneurysm, endovascular correction of abdominal aortic aneurysm, MicroRNAs, biomarkers, PCR, miRNA-1281.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	aorta abdominal
AAA	aneurisma de aorta abdominal
Ang II	Angiotensina II
cDNA	DNA complementar
Ct	Threshold cycle
DEPC	dimetil pirocarbonato
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EVAR	Endovascular aneurysm repair
et al	entre outros
HC-FMRP	Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IL	Interleucina
JNK	proteína quinase ativada por stress
miR	microRNA
MMPs	Metaloproteinases
O ₂ ⁻	superóxido
OSR	Open Surgical Repair
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	Proteína C reativa
pré-miR	precursor do microRNA
pri-miR	microRNA primário
PPE	porcine pancreatic elastase
RISC	complexo silenciador RNA induzido
RNA _m	RNA mensageiro
RNM	Ressonância nuclear magnética
rpm	rotações por minuto
ROS	espécies reativas de oxigênio
RQ-PCR	reação em cadeia de polimerase em tempo real
TC	tomografia computadorizada
TIMPs	inibidores teciduais das metaloproteinases
USG	ultrassonografia
USP	Universidade de São Paulo
VHS	velocidade de hemossedimentação

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise do diâmetro normal da aorta em 3 segmentos. Adaptado de Steinberg CR et al, 1965.....	19
Tabela 2 – Média do diâmetro aórtico para idade e sexo. Adaptado de Hogejs D et al, 1988.....	20
Tabela 3 – Risco de ruptura do AAA associado a seu diâmetro. Adaptado de Brewster DC, 2003.....	22
Tabela 4 – Incidência do AAA por década. Adaptado de Bickerstaff LK et al, 1984.....	24
Tabela 5 – Comorbidades da população da amostra. Elaborado pela autora.....	52
Tabela 6 – Dados demográficos da população estudada com estatísticas descritivas de média, mediana, desvio padrão, mínimo e máximo para todas as medições mais a idade e peso, e frequência absoluta e relativa segundo sexo. Elaborada pela autora.....	55
Tabela 7 – Média, mediana e desvio padrão de todos os parâmetros aferidos segundo sexo, seguido do p-valor do teste de Wilcoxon. Elaborada pela autora.....	57
Tabela 8 – Coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis mais a idade dos indivíduos. Elaborada pela autora.....	58

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Fold do miRNA-1281 antes e após a correção do AAA. Elaborado pela autora.....	54
Gráfico 2 – Dosagem da proteína C reativa (mg/dL) antes e após a correção do aneurisma. Elaborado pela autora.....	54
Gráfico 3 – Dosagem de creatinina (mg/dL) antes e após a correção do AAA. Elaborado pela autora	56
Gráfico 4 – Associação entre o miRNA-1281 e creatinina, diâmetro do aneurisma, Proteína C reativa, triglicérides e colesterol total. Elaborado pela autora.....	60
Gráfico 5 – Relação entre o miRNA-1281 com as comorbidades apresentadas pelos doentes estudados. Elaborado pela autora.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo da biogênese dos microRNAs. Adaptado de Yang W et al, 2011.....37

Figura 2 – Amplification plot. O valor Ct é o número do ciclo no qual o sinal de fluorescência (ΔRn) de uma dada amostra cruza o valor de limiar dado pelo software ou decidido pelo utilizador. Adaptado de ABM- Real-Time PCR/Quantitative PCR (qPCR) – An Introduction (https://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/polymerase_chain_reaction_qpcr.php).....49

Figura 3 – Corte transversal de tomografia de controle de paciente do sexo masculino, demonstrando exclusão do aneurisma pela endoprótese.....56

Figura 4 – Reconstrução 3D de tomografia de paciente do sexo masculino, demonstrando a endoprótese na aorta.....57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 A AORTA	19
2.2 ANEURISMA DE AORTA	20
2.2.1 Classificação dos aneurismas.....	21
2.2.2 História natural do aneurisma	21
2.2.3 Epidemiologia	23
2.2.4 Patogenia	25
2.2.5 Diagnóstico.....	29
2.2.6 Tratamento	30
Tratamento cirúrgico do AAA.....	30
Tratamento endovascular do AAA.....	32
2.3 Proteína C reativa	33
2.4 Função renal e aneurisma de aorta abdominal	34
2.5 MicroRNAs.....	35
2.5.1 Biogênese dos microRNAs	36
2.5.2 Os microRNAs e a formação dos aneurismas	39
3. HIPÓTESE	43
4. OBJETIVOS.....	44
5. PACIENTES E MÉTODOS	45
Critério de inclusão	45
Critérios de exclusão	46
Coleta do Material.....	46
Proteína C reativa	46
microRNAs	47
Síntese de DNA complementar (cDNA) para miRNA	47
RQ-PCR do microRNA	48
Morfometria do aneurisma	50
6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
7 RESULTADOS.....	52
8 DISCUSSÃO.....	61
9 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	68

ANEXOS.....	87
ANEXO A.....	87
ANEXO B.....	92
ANEXO C	93

1 INTRODUÇÃO

Aneurisma, por definição, é uma dilatação anormal de um segmento vascular. Aneurismas de aorta abdominal (AAA) são dilatações localizadas com diâmetro de pelo menos 50% do diâmetro da aorta adjacente não aneurismática (Cronenwett JL et al, 2010; Pearce WH et al, 1993).

Os aneurismas de aorta abdominal (AAA) são os mais frequentemente encontrados na prática clínica e têm como maior complicação a ruptura. Afetam mais homens que mulheres na proporção de 4:1. A sua ocorrência é maior nos homens brancos e idosos. Costuma aparecer próximo aos 50 anos nos homens e 60 nas mulheres, com seu pico de incidência entre 80 e 85 anos (Maffei FHA et al, 2008; Cronenwett JL et al, 2010). A prevalência de AAA em uma dada população depende de fatores de risco associados que incluem idade avançada, gênero masculino, raça branca, história familiar positiva, tabagismo, hipertensão, hipercolesterolemia, doença oclusiva vascular periférica e doença arterial coronariana (Lobato AC et al, 2010; Cronenwett JL et al, 2010; Jones DW et al, 2004; Franks PJ et al, 1996; Lindholt JS et al, 2003).

Até a década de 90, a única opção de tratamento disponível para AAA era o reparo cirúrgico aberto, que está indicado quando o AAA atinge cinco centímetros e meio de diâmetro nos homens e cinco centímetros nas mulheres, em todos os aneurismas sintomáticos independente do diâmetro, ou se houver crescimento rápido (Dorros G et al, 1997). Atualmente a abordagem pode ser feita por via aberta ou endovascular, sendo que a utilização da última tem aumentado muito nos últimos anos, com estudos demonstrando vantagens como menor risco perioperatório (Greenhalgh et al, 2004; Prinssen M et al, 2004).

A relação entre a proteína C reativa (PCR) e os aneurismas também tem sido estudada, demonstrando que há relação positiva entre a PCR com a presença de aneurisma (Liao M et al, 2015), com o tamanho do aneurisma (de Haro J et al, 2012), como preditor da progressão do aneurisma

pós-tratamento (de Haro J et al, 2015) e como fator prognóstico do tratamento (Arnaoutoglou E et al, 2015).

Os microRNAs também têm sido alvo de muitos estudos na busca da compreensão do seu papel na fisiopatologia de várias doenças, inclusive neoplasias malignas e aneurismas (Stather PW et al, 2013; Maegdefessel L et al, 2014; Chang TC et al, 2007; Yamakuchi M et al, 2008; Kaller M et al, 2011, Reiner A et al, 2011) e se esses microRNAs podem vir a ser biomarcadores utilizáveis na prática clínica (Pengxiang L et al, 2014; Jin H et al, 2013). Portanto, o presente estudo visa avaliar a relação entre o microRNA-1281 e a PCR antes e após o tratamento endovascular do AAA, bem como a evolução da função renal, na tentativa de correlacionar com a evolução clínica, diâmetro do saco aneurismático e com possíveis complicações pós operatórias.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A AORTA

Aorta é um vaso do sistema arterial com dois segmentos distintos: torácico e abdominal, separados ao nível da décima vértebra torácica pelo hiato do músculo diafragma. A porção torácica é composta pela aorta ascendente, arco da aorta e aorta descendente. A porção abdominal é composta pela porção supra e infrarrenal, que termina ao nível da quarta vértebra lombar. O segmento da aorta abdominal infrarrenal se destaca por ser o local mais comum de surgimento do aneurisma. É também nesse local que existe uma prevalência aumentada de doença oclusiva aterosclerótica (Maffra Jr R, 2003).

Vários estudos foram realizados para avaliar o diâmetro normal da aorta. Em 1965, Steinberg CR et al estudou o diâmetro da aorta em três níveis e concluiu que nem a doença aterosclerótica, nem a hipertensão arterial, presentes nesses pacientes, influenciavam o diâmetro da aorta abdominal. Concluiu também que as mulheres apresentavam aortas com diâmetros inferiores que os homens. Os resultados são demonstrados na tabela a seguir:

	Homens com idade média de 53,9 anos	Mulheres com idade média de 56,9 anos
Nível do diafragma (T11 e T12)	26,9mm	24,4mm
Nível das artérias renais (L1 e L2)	21,4mm	18,7mm
Nível da bifurcação (L4 e L5)	18,7mm	17,5mm

Tabela 1: Análise do diâmetro da aorta em três segmentos. Adaptado de Steinberg CR et al, 1965.

Hogejs D et al, em 1988, estudou as aortas de 260 pacientes sem doença vascular prévia, com tomografia computadorizada, chegando aos seguintes resultados:

Média de idade (anos)					
	34	50	55	66	75
Masculino	1,6cm	1,69cm	1,77cm	1,84cm	1,96cm
Feminino	1,43cm	1,5cm	1,47cm	1,59cm	1,62cm

Tabela 2: Média do diâmetro aórtico, idade e sexo. Adaptado de Hogejs D et al, 1988.

Cronenwett JL e Garret HE, 1983, estudaram o calibre da AA infrarrenal em 73 mulheres, através de arteriografia, e encontraram calibre médio de 16,3mm. Liddington MI e Heather HP, 1992, analisaram, através de ultrassonografia, a aorta de 1195 homens, com idade entre 65 e 74 anos, encontrando um diâmetro médio de 20,1mm.

Da Silva ES, 1996, demonstrou, em um estudo realizado em cadáveres, que o diâmetro da AA infrarrenal aumenta com a idade, tendendo a dilatar-se precocemente no sexo masculino, sendo que os homens têm aortas mais dilatadas em relação às mulheres em todas as faixas etárias e que a raça não determina diferenças do diâmetro entre os indivíduos, quando são analisados os negros e brancos.

2.2 ANEURISMA DE AORTA

Aneurisma é uma dilatação anormal de um segmento vascular. Primeiramente descrito por Galeno (131-200 d.C.), o aneurisma é reconhecido como uma lesão local, permanente, irreversível, caracterizada por uma dilatação que excede uma vez e meia o diâmetro normal do vaso. Qualquer

tipo de vaso ou porção dele pode ser acometido, mas, preferencialmente, são comprometidas artérias cerebrais e a aorta (Sakalihasan N et al, 2005).

Essa lesão desenvolve-se lentamente, com dilatação progressiva, aumentando seu volume, podendo causar rompimento da parede vascular e provocar intensa hemorragia. Além disso, pode comprimir, deslocar e destruir estruturas vizinhas (Filho GB, 2000).

2.2.1 Classificação dos aneurismas

São classificados de acordo com sua morfologia, localização e etiologia. Aneurisma verdadeiro é aquele que compromete toda a espessura da parede vascular causando alterações de seus componentes. Dilatação vascular por delaminação das camadas da parede vascular por infiltração sanguínea não é um aneurisma, mas sim dissecção (Schoen FJ, 2005). Do ponto de vista morfológico, os aneurismas podem se apresentar como dilatações saculiformes de uma porção da parede, ou fusiformes com comprometimento de todo o diâmetro vascular (Nobre F; Serrano CV, 2005). Quanto à localização anatômica, os aneurismas de aorta ascendente, arco e descendente torácica, são denominados aneurismas de aorta torácica e os que acometem a porção da aorta logo abaixo do diafragma são denominados aneurismas de aorta abdominal (Guo DC et al, 2006).

Aneurismas de aorta abdominal (AAA) são dilatações que correspondem, geralmente, a diâmetros transversais de três centímetros para a aorta abdominal e 1,8 cm para as artérias ilíacas comuns, para valores médios de indivíduos normais. O diâmetro da aorta normal diminui progressivamente do tórax para os segmentos infrarrenais e apresenta variação de acordo com sexo, idade, raça, estatura, peso e área de superfície corporal (Cronenwett JL et al, 2010; Pearce WH et al, 1993).

2.2.2 História natural do aneurisma

No passado, os médicos conheciam a história natural dos aneurismas através do seguimento e observação clínica dos pacientes, que era a ruptura do aneurisma com consequente óbito. Shatz IJ et al (1962) realizou seguimento de 141 pacientes considerados inadequados para o tratamento

cirúrgico. Somente 34,4% sobreviveram cinco anos. A causa de óbito mais frequente foi a ruptura do AAA, que ocorreu em 45%.

Gore I e Hirst AE (1973) demonstraram um percentual de ruptura de AAA de 27,7% variável de acordo com o diâmetro do aneurisma. Naqueles com diâmetros inferiores a cinco centímetros, a taxa de ruptura foi de 9,5%. Entre cinco e sete centímetros, a taxa foi de 36% e naqueles maiores que sete centímetros, a taxa encontrada foi de 76%.

Diâmetro do aneurisma maior que seis centímetros no momento do diagnóstico é um fator de risco significativo e independente para ruptura de AAA. Sexo feminino, tabagismo, hipertensão, taxa de expansão AAA, pico de estresse da parede do AAA, aumento rápido do trombo intraluminal, aumento da rigidez da parede do AAA e pacientes transplantados são outros fatores preditores de ruptura (Dalman RL, 2006; Brown LC, 1999; Brown PM, 2003; Cronenwett JL, 1985; Norman PE PJ, 2007; Lederle FA, 2002; Powell JT, 2008; Limet R, 1991; Hatakeyama T, 2001).

Diâmetro do aneurisma (mm)	Risco de ruptura em 12 meses (%)
30-39	0
40-49	0,5 a 5
50-59	13 a 15
60-69	10 a 20
70-79	20-40
80 ou mais	30-50

Tabela 3: O risco de ruptura do AAA associado a seu diâmetro. Adaptado de Brewster DC, 2003.

A maioria dos AAA é assintomática e são mais comumente detectados como um achado de exame, como a ultrassonografia, a tomografia computadorizada de abdome ou a ressonância magnética, solicitados para outro propósito. A maioria dos AAA é silenciosa até sua ruptura, apesar de alguns deles serem identificados durante avaliação de sintomas abdominais. Aneurismas que causam dor abdominal têm maior risco de ruptura. AAA também podem se apresentar com complicações como trombose, embolização ou, mais raramente, com coagulação intravascular disseminada causando hemorragia e complicações trombóticas (Aboulafia DM, 1996; Fisher DF Jr, 1983).

A ruptura de um aneurisma é uma das emergências mais dramáticas da medicina, causando de 4 a 5% de mortes súbitas nos EUA. Pacientes com AAA roto classicamente apresentam dor abdominal forte, ou dor em região dorsal e massa abdominal pulsátil. Tipicamente cursa com hipotensão severa. Apenas cerca de 50% dos pacientes com AAA roto chegam vivos ao hospital e, desses, 50% não sobrevivem ao tratamento (Schermerhorn M 2009; Harris LM 1991).

Aproximadamente 50% dos pacientes com AAA que não são submetidos ao tratamento cirúrgico morrerão por ruptura do aneurisma. A mortalidade para ruptura de AAA está entre 30 e 80%, com uma média de 50% na maioria dos serviços (Zarins CK; Harris Jr JE, 1997).

2.2.3 Epidemiologia

O aneurisma de aorta tem grande relevância clínica. É a décima quarta causa de morte nos Estados Unidos. Nesse país, 4.500 mortes/ano são causadas por ruptura do aneurisma de aorta e mais 1.400 mortes decorrem dos 45.000 procedimentos realizados para prevenir a ruptura (Silverberg E et al, 1990; McPhee JT et al, 2001-2004).

Os AAA são os mais frequentemente encontrados na prática clínica e têm grande tendência a romper. Afetam mais homens que mulheres na proporção de 4:1. A sua ocorrência é maior nos homens brancos e idosos, sendo menos frequente nos de raça negra. Nos asiáticos a frequência é

equivalente à raça branca. Costuma aparecer próximo aos 50 anos nos homens e 60 nas mulheres, com seu pico de incidência entre 80 e 85 anos (Maffei FHA et al, 2008; Cronenwett JL et al, 2010).

A porção infrarrenal da aorta é particularmente suscetível à formação de aneurismas. Isso pode ser parcialmente explicado pela diferença embrionária na origem das células musculares lisas da aorta, variações na quantidade de elastina e colágeno nas diferentes porções da aorta e pelas forças hemodinâmicas que são diferenciadas na aorta infrarrenal. Aproximadamente 80% dos aneurismas aórticos ocorrem entre as artérias renais e a bifurcação aórtica (Ghorpade A et al, 1996; McDonald DA, 1968).

A prevalência de AAA em uma dada população depende de fatores de risco associados que incluem idade avançada, gênero masculino, raça branca, história familiar positiva, tabagismo, hipertensão, hipercolesterolemia, doença oclusiva vascular periférica e doença arterial coronariana. Fatores relacionados à taxa de crescimento do AAA incluem diâmetro da aorta no momento do diagnóstico e tabagismo. O tabagismo é considerado o fator de risco modificável mais importante para o desenvolvimento do AAA e a patogenia está provavelmente relacionada à sua habilidade de oxidar a alfa 1-antitripsina. A grande maioria dos pacientes com AAA (>90%) apresentam história de tabagismo (Lobato AC et al, 2010; Cronenwett JL et al, 2010; Jones DW et al, 2004; Franks PJ, 1996; Lindholt JS, 2003).

Bickerstaff LK et al, em 1984, em estudo de corte representativo da população dos Estados Unidos, no período de 1951 e 1980, identificou aumento significativo da incidência do AAA:

	1951-1960	1961-1970	1971-1980
Incidência de AAA por 100.000 pessoas/ano	8,7	26,5	36,5

Tabela 4: Incidência do AAA por década, adaptado de Bickerstaff LK et al, em 1984

2.2.4 Patogenia

A patogenia do AAA é multifatorial, apresentando fatores genéticos e familiares, degradação das fibras elásticas e colágeno, inflamação tissular e resposta auto-imune, fatores ambientais e hemodinâmicos, além de diferenças na estrutura parietal entre os diversos segmentos arteriais (Maffei FHA et al, 2008).

A aorta normal é composta por três camadas: íntima, túnica média e adventícia. A camada íntima é a mais interna da parede da aorta, composta de células endoteliais em contato direto com o sangue. Estas células podem contribuir para a formação de aneurisma através da produção de espécies reativas de oxigênio (Cronenwett JL et al, 2010).

A camada média contém elementos conectivos extracelulares (elastina, colágenos tipos I e III, e proteoglicanos) e células musculares lisas vasculares organizados em unidades lamelares funcionais. Estas unidades, que dão suporte de carga primária a estrutura da aorta saudável, estão esgotadas drasticamente ao longo de um período de anos ou décadas durante a patogênese do AAA. Na doença avançada, a degradação da elastina aumenta substancialmente a rigidez da aorta e a carga de colágeno. A rotura ocorre quando as fibras de colágeno residuais e recém-sintetizadas da média e adventícia não conseguem manter a integridade estrutural. A sequência exata de eventos que levam à rotura permanece desconhecida, mas certamente envolve a inflamação e proteólise da camada média, resultando em reduções importantes da resistência mural à tração (Wolinsky H; Glagov S, 1967).

A adventícia é composta de colágeno intersticial, fibroblastos, fibras nervosas e *vasa vasorum*, estando ativamente envolvida na patogênese do AAA. A densidade dos *vasa vasorum* diminui ao longo do comprimento da aorta a partir da raiz da aorta até a bifurcação. A especulação já existe há décadas a respeito de uma potencial relação entre a densidade reduzida de *vasa vasorum* na adventícia e a tendência para o aumento da formação de aneurisma na aorta distal. Evidência de causalidade do surgimento de aneurisma relacionada a diferenças regionais na vascularização da adventícia

da aorta permanece inconclusiva. No entanto, recentemente o aumento da inflamação impulsionando a neovascularização, tem sido reconhecido em espécimes cirúrgicos obtidos no momento da correção do aneurisma, encontrando-se mais proeminente nos locais de rotura da aorta. Embora esta neovascularização esteja claramente presente, ainda é incerto se ela promove ativamente a progressão da doença aneurismática com consequente rotura, ou simplesmente representa evidência de inflamação mural progressiva (Choke E et al, 2006).

O trombo intraluminal, além de ser um marcador indireto da progressão da doença, pode também mediar diretamente a progressão do AAA, através da ativação das metaloproteinases proteolíticas pela plasmina. Adicionalmente, o acúmulo de trombos pode prejudicar a difusão de oxigênio através da parede da aorta e resultar em hipóxia relativa e potencial de apoptose/necrose de células musculares lisas. O trombo laminar também pode alterar o pico de tensão da parede no AAA. Entretanto, a influência da presença de trombo no AAA permanece incerta, mas a maioria dos investigadores concorda que o trombo laminar geralmente aumenta a progressão da doença e o risco de rotura do AAA de diâmetro similar (Cronenwett JL et al, 2010).

Alterações nas forças hemodinâmicas do fluxo sanguíneo têm sido descritas como fatores importantes no desenvolvimento dos aneurismas. Sabe-se que o fluxo sanguíneo, quando alterado, pode promover alterações na estrutura e função das células endoteliais. Essas alterações podem culminar na liberação/inibição de fatores importantes que atuam na parede vascular (Salsac AV et al, 2004; Cheng C et al, 2006).

Regiões arteriais com complexa geometria, como estenose, bifurcações e ramificações são áreas propensas a lesões, pois o fluxo torna-se turbulento com formação de estase, recirculação e fluxo reverso (Nesbitt WS et al, 2000). Essa transição de fluxo altera a conformação das células endoteliais resultando na ativação da resposta inflamatória liberando espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo este um dos possíveis fatores de ativação das metaloproteinases (MMPs) (Kunsch C; Medford RM, 1999).

Diferentes estudos histomorfológicos têm demonstrado que o tecido do aneurisma é caracterizado pelo aumento da atividade elastolítica e collagenolítica causada por aumento da produção de metaloproteinases quando comparado com tecido aórtico normal. A progressiva degradação de proteínas da matriz fibrilar da camada média e da adventícia da aorta foi identificada como o processo que resulta na formação do AAA. Em particular, através da utilização de imuno-histoquímica e técnicas de zimografia in situ, várias MMPs têm sido relacionadas com a atividade elastolítica, expansão e eventual ruptura do AAA. Dentre essas MMPs estão a MMP-2 (conhecida como 72 kDa gelatinase/ collagenase tipo IV, cliva elastina e colágeno de tipo IV), MMP-9 (conhecida como 92 kDa gelatinase/ colagensase tipo IV, cliva elastina, colágeno I e IV) e MMP-3 (estromelisina-1) (Sangiorgi G et al, 2001; McMillan WD, 1999).

Os níveis de MMP-9 no plasma são aumentados na doença do AAA e mais RNAm de MMP-9 está presente nos tecidos da aorta aneurismática do que em tecido aórtico normal. Pacientes com AAA de dimensão intermediária (entre 5 e 6,9 cm) têm nível sérico maior do que os pacientes com menores que 4 cm ou maiores que 7 cm, embora não normalizada para o volume de tecido ou celularidade mural. Estes resultados implicam em papel significativo para atividade da MMP-9 na progressão da doença. Os níveis de MMP-9 consistentemente diminuem após o reparo de AAA, tanto endovascular quanto aberto, e os pacientes com os níveis persistentemente elevados após o reparo endovascular de aneurisma podem estar em maior risco para o desenvolvimento e a manutenção de vazamentos (Mc Millan WD et al, 1997; Sangiorgi G et al., 2001; Lorelli DR et al., 2002).

Tal como a MMP-9, a MMP-2 cliva elastina e colágeno do tipo IV. As amostras obtidas a partir de aneurismas de aorta demonstram relativamente menor atividade da MMP-2 do que da MMP-9, o que sugere que o aumento da atividade de MMP-2 pode representar um evento precoce na evolução temporal da patogênese da doença aneurismática. Os dados experimentais sugerem que tanto a MMP-2 como MMP-9 necessitam estar presentes e ativas para progressão máxima do aneurisma, implicando, assim, uma relação sinérgica e

co-dependente entre, pelo menos, duas das proteases mais ativas relevantes na doença AAA (Longo GM et al, 2002).

Em adição à proteólise e perda da celularidade da camada média, a inflamação é uma característica central da patofisiologia do aneurisma da aorta. Embora os eventos de iniciação da doença AAA humana permaneçam incertos, evidências experimentais sugerem que os produtos de degradação de elastina, ou peptídeos hidrofílicos liberados de eventos elastolíticos, estimulam e perpetuam a localização e ativação de células mononucleares dentro da parede da aorta. Produtos de degradação da elastina se ligam à proteínas de superfície e estimulam o aumento da quimiotaxia, ativação e fagocitose de células mononucleares. As concentrações séricas de produtos de degradação da elastina são elevadas em pacientes com AAA e correlacionam com os níveis de risco para a progressão da doença (Lindholt JS et al, 2006).

Outros eventos precoces de sinalização pró-inflamatórias incluem a produção de superóxido (O^{2-}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por fibroblastos, células aórticas constitutivas e leucócitos que se infiltram. O aumento da produção destas espécies reativas de oxigênio inibe o inibidor do ativador do plasminogênio-1, uma enzima que limita a ativação de MMP, e conduz a um aumento da proteólise e degradação da matriz. Níveis de estresse oxidativo são marcadamente maiores em espécimes cirúrgicos AAA do que no tecido aórtico normal (Miller Jr FJ et al, 2002).

As células inflamatórias presentes em espécimes cirúrgicos de AAA incluem macrófagos, linfócitos Th1, Th2 e B. O papel potencial diferencial de células Th1 e Th2 na mediação das doenças da aorta é uma questão de debate vigoroso. Embora exista alguma discussão, existe evidência experimental recente que sugere que as respostas de citocinas Th2 predominam na doença aneurismática e que a resposta de citocinas tipo Th1 é característica de doenças vasculares oclusivas ateroscleróticas. Linfócitos Th2 produzem interleucina-4 (IL-4), IL-5, IL-8 e IL-10, que, em conjunto, promovem a angiogênese mural, liberação adicional de citocinas pró-inflamatórias e apoptose de células musculares lisas. As células T helper com afinidade para o receptor de complexo principal de histocompatibilidade de classe II, que

produzem o interferon- γ de CD4⁺ são os linfócitos mais abundantes presentes no tecido do aneurisma aórtico. Ratos deficientes em células T CD4⁺ são resistentes à formação de AAA, mas a resposta pode ser parcialmente restaurada por tratamento com interferon- γ exógeno (Schýnbeck U et al, 2002; Xiong W et al, 2004).

Muitas respostas inflamatórias em células musculares lisas e macrófagos incluem a ativação da via quinase n-terminal (JNK) também conhecida como proteína-quinase ativada por estresse. A JNK é uma molécula de sinalização proximal que regula as funções proteolíticas e sintéticas de celulares musculares lisas vasculares, bem como a produção de citocina pró-inflamatória e a atividade proteolítica dos macrófagos. Produção e ativação de mais de 20 proteínas considerados relevantes para a patogênese de AAA, incluindo MMP-9 e IL-1a, são regulados, em certa medida pela atividade de JNK. Expressão de JNK é aumentada em estudos experimentais, bem como amostras de tecidos humanos com AAA (Yoshimura K et al, 2005).

Proteínas classicamente associadas à trombose e à regulação da cascata de coagulação também podem participar na patogênese do AAA. No estudo de Kölbel T et al, 2008, pacientes com aneurismas da aorta tinham uma concentração média três vezes maior da Proteína C ativada e do inibidor da Proteína C do que os controles. Níveis de Proteína C ativada/ inibidor da proteína também se correlacionam com diâmetro de AAA.

A osteopontina, um mediador pluripotencial do metabolismo ósseo, inflamação e calcificação vascular, pode também desempenhar um papel central no AAA. As concentrações no soro e no tecido de osteopontina são aumentadas na doença humana, e ratos deficientes em osteopontina demonstram atenuada formação de AAA em modelos experimentais (Golledge J et al, 2007).

2.2.5 Diagnóstico

Dor abdominal atípica ou dor nas costas podem estar presentes em casos de AAA, mas não são sintomas específicos, uma vez que a maioria

dos casos é silenciosa, e em geral são achados ocasionais durante exames de imagem para outras finalidades diagnósticas (Erbel R et al 2014).

Aproximadamente 5% dos AAAs são classificados como inflamatórios e se apresentam com dor abdominal ou com dor em região dorsal, perda de peso e VHS elevado (Hirsch AT, 2006).

Palpação clínica da massa abdominal pulsátil pode ser alerta da presença de AAA. Estudo caso-controle estimou que a sensibilidade da palpação para diagnóstico de AAA maior do que três centímetros é de 68% e a especificidade de 75% (Fink HA et al, 2000).

Metanálise feita com base em 15 estudos de rastreamento em pacientes assintomáticos, estimou que a sensibilidade do exame de palpação abdominal é de cerca de 39% (Lederle FA et al, 1999). Assim, ela não é recomendada como método único de rastreamento ou planejamento terapêutico (Guirguis- Blake JM et al, 2014).

Devido às limitações do exame clínico, os exames de imagem são fundamentais para rastreamento, diagnóstico e seguimento do AAA.

Dentre esses, os mais utilizados são a Ultrassonografia (USG), a Tomografia Computadorizada (TC) e a Ressonância Nuclear Magnética (RNM), sendo que o exame de RNM apresenta algumas contraindicações: presença de marca-passo transitório ou definitivo, presença de cliques intracerebrais e próteses metálicas no quadril. Tanto a TC como a RNM podem ser utilizadas sem contraste, porém para melhor visualização da luz do aneurisma e sua anatomia usam-se dois tipos de contraste administrados por via endovenosa, o contraste iodado e o gadolínio, respectivamente.

2.2.6 Tratamento

Tratamento cirúrgico do AAA

A existência de relatos de tratamento de aneurisma, data da antiguidade (Voorhees AB et al, 1952). A primeira ligadura de aorta foi realizada por Sir Astley Cooper em 1817 (Apud-Gross, 1949) para tratar um aneurisma ilíaco-femoral esquerdo. O primeiro sucesso em ressecar um AAA

foi obtido por Dubost, em 1951, utilizando um enxerto homólogo (Dubost C; Alary M, Oeconomos N, 1951).

No final da década de 50, o surgimento de novos materiais, como o orlon, teflon e Dácron, deu início à reposição do aneurisma pela prótese de tecido. Em 1957 foram realizados casos bem sucedidos de correção endovascular com implantação de enxerto intraluminal com tecido-Dácron (Debaquey ME et al, 1958).

Pacientes que apresentam AAA e dor abdominal ou em região dorsal, mesmo sendo atípica, estão sob maior risco de ruptura e a intervenção está recomendada. Se houver ruptura, mais da metade dos pacientes morre antes da hospitalização. Daqueles que são tratados, o desfecho depende da condição clínica, mas a mortalidade é em torno de 50%. Para aqueles com aneurisma assintomático a conduta de baseia no tamanho do aneurisma. Há consenso que pequenos aneurismas, fusiformes, de menos de 4,0 cm de diâmetro têm baixo risco de ruptura e devem ser monitorados. Aneurismas maiores que 5,4 cm devem ser operados em pacientes saudáveis. A cirurgia eletiva também deve ser considerada em aneurismas saculares (Chaikof E L et al, 2009).

A abordagem clássica inclui a inserção de um enxerto intraluminal por via de acesso aberta substituindo a aorta aneurismática.

Com o advento das próteses de material sintético que não sofriam rejeição, o tratamento cirúrgico do AAA deu um grande impulso, tornando-se um método confiável e com mortalidade, nos dias de hoje, inferior a 5% quando tratados eletivamente (Brown OW et al, 1981; Johansson G et al, 1990).

É sabido que comorbidades podem influenciar os resultados da cirurgia eletiva do AAA. Os fatores de risco podem não somente afetar a mortalidade e morbidade operatória, mas também a sobrevida tardia. Resultados de estudos multicêntricos têm demonstrado taxa de mortalidade de 0 - 3,7%(Zarins CK, Harris Jr JE, 1997).

Tratamento endovascular do AAA

O conceito inicial de colocação de stent intraluminal foi proposto por Dotter em 1969, quando o mesmo introduziu, por via percutânea, molas de aço inoxidável em artérias poplíteas de cães. Na década de 80, vários investigadores realizaram implantes de próteses endovasculares no tratamento de aneurismas experimentais (Baeko et al, 1986; Mirich D et al, 1989; Laborde JC et al, 1992; Chuter TAM et al, 1993).

A ideia inicial do tratamento endovascular do AAA foi do argentino Parodi, em 1979. Nove anos mais tarde, Palmaz apresentou os primeiros resultados de experimentos utilizando um novo dispositivo metálico criado por ele que denominou stent (Parodi JC et al, 1997). Parodi JC et al(1990) realizou com sucesso a exclusão do AAA com stent revestido com prótese de dácron em estudo experimental envolvendo 62 cães.

Parodi JC et al(1991) publicou o primeiro trabalho da literatura que demonstrou sucesso no tratamento endovascular do AAA em seres humanos.

Atualmente, a cirurgia aberta tem sido substituída, sempre que possível, por abordagens endovasculares, que são menos invasivas e necessitam de um menor volume de transfusão sanguínea, menor tempo cirúrgico, menor tempo de permanência em unidade de terapia intensiva e intra-hospitalar, requerendo, porém, um maior número de intervenções adicionais para manutenção da exclusão do saco aneurismático (Lobato AC et al, 2010, Cronenwett JL et al, 2010).

Variações morfológicas do AAA afetam diretamente o resultado das endopróteses. Alguns parâmetros devem ser analisados: o comprimento do colo proximal (infra-renal); aneurisma envolvendo as artérias ilíacas comuns (uni ou bilateral); severa doença oclusiva íleo-femoral; tortuosidades das artérias ilíacas superiores ou iguais a 70 graus, e artérias ilíacas e/ou femorais com diâmetro igual ou inferior a 6,0 mm. O comprimento ideal do colo proximal para a colocação da endoprótese é maior ou igual a 1,5cm. Em aneurismas de colo proximal curto, o procedimento poderá ser mais difícil de ser executado,

pois o stent pode se posicionar acima das artérias renais. O diâmetro do colo proximal ideal para o procedimento endovascular deve variar entre 16 e 26 mm. O colo distal do aneurisma deve possuir no mínimo um centímetro de comprimento com diâmetro similar àquele para o colo proximal, no caso de utilização de prótese endovascular tubular aorto-aórtica (Allen RC et al, 1997).

Uma grande variedade de métodos de imagem está disponível para avaliar e mensurar as aortas aneurismáticas como o duplex, TC, aortografia, ressonância nuclear magnética e ultrassom intravascular (Armon MP et al, 1998).

A mais utilizada é a TC helicoidal, pois permite a realização de cortes de 3 a 5 mm de intervalo e posterior mensuração de diversos pontos importantes para a seleção dos pacientes candidatos ao procedimento e escolha da endoprótese (Schumacher H et al, 1997). Essas imagens são processadas por programas especificamente projetados para realizar as medições do AAA. Até o momento, essa técnica demonstrou uma alta acurácia nas medidas obtidas, elevando a próximo de 100% o sucesso técnico do procedimento endovascular (Beebe HG et al, 2000).

A exclusão do aneurisma é definida como completa quando a endoprótese estiver intacta, sem alterações de sua estrutura (como furos) e a endoprótese apresentar uma perfeita fixação na parede arterial, tanto proximal quanto distal, sem evidências de refluxo ou vazamento. As duas porções distais da endoprótese devem estar em perfeito contato com a parede arterial, sem a interposição de trombo. Além disso, a endoprótese não poderá ficar hemodinamicamente comprometida por dobras ou torções devido a mau posicionamento ou variações da morfologia do AAA. A angiografia realizada ao término do procedimento não deverá demonstrar a presença de contraste entre a endoprótese e o aneurisma, caracterizando um vazamento (White GH et al, 1997).

2.3 Proteína C reativa

Além de fornecer pistas relacionadas com mecanismos fisiopatogênicos na doença aneurismática, biomarcadores, como a Proteína C

reativa, podem vir a ser úteis no monitoramento do status da doença, progressão, ou resposta a terapias médicas durante o tratamento supressivo da doença (Arnaoutglou et al, 2015; Liao et al, 2015; de Haro et al, 2012; de Haro et al 2015).

Os níveis séricos de PCR, um marcador inespecífico de inflamação sistêmica de alta sensibilidade, estão aumentados em pacientes com AAA de forma gradual e parecem estar relacionados ao tamanho do aneurisma (Bruemmer D et al, 2003; Norman P et al, 2004).

A Proteína C reativa como um único marcador para controle da doença é limitado, porém De Haro correlacionou seus níveis com a progressão do AAA após EVAR sem endoleaks demonstrando que pode vir a ser usado como adjuvante no acompanhamento desses pacientes (De Haro et al, 2015). A PCR não só se relacionou com o tamanho do aneurisma, como pode também ter papel como um preditor de mortalidade (Liao M et al, 2015).

2.4 Função renal e aneurisma de aorta abdominal

A queda na função renal é uma preocupação recorrente no tratamento do AAA, principalmente na correção pela técnica endovascular, tanto no pós-operatório precoce quanto tardio (Alsac JM et al, 2005; Parmer SS et al, 2006; Greenberg RK et al, 2004; Surowiec SM et al, 2004).

A associação entre volume de contraste e nefrotoxicidade permanece controversa. Alguns autores encontraram significativa correlação (Mehta M et al, 2004), enquanto outros não encontraram (Parfrey OS et al, 1989; Barret BJ et al, 1993).

Insuficiência renal crônica aumenta a incidência de nefrotoxicidade induzida por contraste. Contrastes de alta osmolaridade, desidratação, drogas nefrotóxicas, e diabetes mellitus aumentam ainda mais o risco de piora da função renal (Barret BJ, 1994; Parfrey OS et al, 1989; Barret PJ, Carlisle EJ, 1993). A incidência da piora da função renal em pacientes submetidos à cirurgia aberta de correção do AAA com função renal normal

antes da cirurgia é de 5,4% e aumenta de duas a três vezes em pacientes com disfunção renal prévia (Johnston WK, 1989; Joseph MG et al, 1989).

A mortalidade relacionada à insuficiência renal em pacientes tratados com EVAR com e sem disfunção renal prévia, encontrados por WALKER SR et al, 1998, são de 47% e 3%, respectivamente. Mehta M et al, 2004, concluiu que EVAR pode ser realizada em pacientes com insuficiência renal crônica não dialíticos, com níveis aceitáveis de morbidade e mortalidade, semelhantes aos encontrados na cirurgia aberta. Concluiu também que o EVAR aumentou, não significativamente, o risco de piora da função renal, diálise e mortalidade nos pacientes com insuficiência renal antes de cirurgia comparados aos pacientes com função renal normal e que hipotensão perioperatória e aumento do volume de contraste são fatores de risco significativos para aumento da creatinina no pós-operatório e morte.

Parmer SS e Carpenter JP, 2006, demonstraram função renal com queda progressiva após EVAR em 283 pacientes. Nesse estudo, compararam os efeitos da fixação supra ou infrarrenal e seus efeitos na função renal e encontraram aumento da creatinina sérica e diminuição do clearance de creatinina nos dois grupos após EVAR. Além disso, essa queda da função renal foi persistente nos pacientes seguidos por mais de 12 meses, sugerindo tanto que o tratamento influencia na queda da função renal quanto que a infusão de contraste pode ter efeito a longo prazo na função renal.

Parmer SS et al, 2006, comparou o efeito do EVAR e a cirurgia aberta na função renal em pacientes com insuficiência renal prévia e concluiu que os dois tratamentos podem ser realizados com preservação da função renal. Os pacientes com disfunção renal prévia submetidos à EVAR continuam sob o risco de desenvolver queda progressiva da função renal e medidas preventivas devem ser tomadas nessa população.

2.5 MicroRNAs

Os microRNAs (miRNAs) são sequências curtas (19 e 26) de nucleotídeos não codificantes de RNA, que são transcritas a partir de DNA. No entanto, elas não são traduzidas em proteínas. Eles regulam a expressão

gênica ligando-se a RNA mensageiro (RNAm) e impedindo a síntese de proteínas. Os miRNAs foram descritos pela primeira vez em 1993 no gene *lin-4* em *Caenorhabditis elegans*, como uma sequência de 22 nucleotídeos de RNA que inibiu a síntese de proteínas. Nos seres humanos, *let-7* foi o primeiro miRNA identificado. As sequências miRNA parecem ser altamente conservadas entre as plantas, micro-organismos e animais, sugerindo que representam uma via reguladora importante (Stather PW et al, 2013).

2.5.1 Biogênese dos microRNAs

Os miRNA maduros são formados através de um processo de três passos. Inicialmente, genes de miRNA são transcritos em miRNA primário (pri-miRNA). Em seguida, o pri-miRNA é clivado em precursor-miRNA (pré-miRNA), e transportado para o citoplasma. O pré-miRNA em dupla fita é então clivado formando microRNA maduro e proteínas *Argonaute*, componentes principais do complexo silenciador RNA induzido (RISC), que ligam-se à região de cadeia simples funcional do miRNA, enquanto a cadeia complementar normalmente é liberada e degradada. Raramente a cadeia complementar também é funcional, tornando-se seu próprio miRNA e afetando um outro RNAm. Os complexos de miRNA-RISC se ligam ao RNAm alvo, o que resulta em repressão translacional ou degradação do RNAm, regulando assim a expressão do RNAm. Como a interação entre miR e RNAm ocorre entre a 5'-UTR do miRNA e a região de 3'-UTR do RNAm, um único miRNA pode regular centenas de genes e um único gene pode ser regulado por vários miRNAs, como mostrado na figura 1 (Stather PW et al, 2013; Pratt A, Macrae I, 2009; Gregory RI et al, 2005):

Figura 1: Modelo da biogênese do micro RNA. Adaptado de Yang W et al, 2011

Para os miRNAs são conhecidos 2 mecanismos de ação: degradação do RNAm e inibição da sua tradução. O primeiro mecanismo ocorre quando há pareamento perfeito entre o miRNA e o gene alvo (Hutvagner G; Zamore P D, 2002) e o segundo quando o pareamento é imperfeito (Roush SF, 2006). O pareamento imperfeito pode levar à inibição da tradução, através do bloqueio da inicialização, retirada de ribossomos e inibição de alongamento (Petersen C et al, 2006). O possível papel do miRNA como regulador positivo da transcrição gênica também já foi demonstrado (Vasudevan S, 2011).

A concentração de miRNAs maduros nas células depende da regulação da transcrição, maturação e degradação fortemente reguladas (Ha M et al, 2014; Kai ZS et al, 2010). Foi proposto que aproximadamente ≈ 100 cópias de um miRNA maduro por célula são necessárias para a repressão biologicamente relevante da tradução de genes (Brown BD et al, 2007; Sarasin-Filipowicz et al, 2009). A regulação da concentração do miRNA, portanto, desempenha um papel importante no controle da função reguladora do miRNA. A transcrição de miRNA é regulada por fatores específicos de transcrição e

fatores epigenéticos (por exemplo, metilação do DNA, modificações das histonas) (Davis BN et al, 2009). Como genes codificadores de proteínas, certos miRNAs exibem um padrão de expressão específico de tecido (Guo Z et al, 2014), apoiando seu papel na diferenciação e desenvolvimento celular (Shivdasani RA, 2006). Além disso, a eficiência de processamento de miRNA é regulada através de várias modificações pós-traducionais da maquinaria de maturação (Drosha, DGCR8, Dicer, TRBP, AGO) (Ha M et al, 2014; Davis BN et al, 2009). Além disso, o próprio miRNA é submetido a modificações pós-transcricionais como a edição de RNA, metilação, uridilação e adenilação (Davis BN, 2009). Estas modificações, somadas à formação de complexos proteicos (por exemplo, AGO) e exposição à nucleases [por exemplo 5'-3' exoribonuclease 2 (XRN-2)], modulam a estabilidade e degradação do miRNA (Kai ZS et al, 2010).

MiRNAs mostram alta estabilidade (> 24 h) em células e plasma, com tempo de duração variando de um miRNA para outro (Gantier MP et al, 2011; Marzi MJ et al, 2016; Guo Y et al, 2015). Curiosamente, miRNAs também foram encontrados em praticamente todos os fluidos biológicos, incluindo o líquido cérebro-espinhal, lágrimas, saliva, leite materno, líquido amniótico, urina e fezes (Weber JA et al, 2010), demonstrando sua incrível estabilidade e apoiando seu grande potencial como biomarcadores não invasivos.

No plasma, os miRNAs são transportados e protegidos contra a degradação dependente de RNase por vários transportadores, tais como vesículas (exosomas, microvesículas, corpos apoptóticos), proteínas de ligação de RNA [AGO2 e nucleophosmina 1 (NPM1)] e lipoproteínas [HDL, lipoproteína de densidade intermediária (LDI) e LDL] (Mitchel PS et al, 2008).

A versão mais recente do registro miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/>) (18.0, lançada em novembro de 2011 e atualizada em junho 2014) lista 28.645 miRNAs maduros identificados em humanos. Estes miRNAs podem regular a expressão de mais de um terço dos genes humanos (Kozomara A; Griffiths-Jones S, 2014).

2.5.2 Os microRNAs e a formação dos aneurismas

Experimentos com células musculares lisas específicas enfatizam a importância dos miRNAs para a homeostase das células musculares lisas vasculares (Albinsson S et al, 2010), e por isso é provável que os miRNAs também desempenhem um papel importante na formação do aneurisma, que é caracterizado pela disfunção das células musculares lisas vasculares. Com efeito, demonstrou-se recentemente que o miRNA-29 desempenha um papel fundamental na formação de aneurismas (Boon RA et al, 2011; Maegdefessel L et al, 2012; Merk DR et al, 2012).

Estes estudos relatam que a inibição de miRNA-29 reduz a formação de aneurisma em diferentes modelos murinos. Especificamente, a inibição de toda a família miRNA-29 foi mostrada para impedir a angiotensina II induzir dilatação da aorta de camundongos do tipo selvagem (Boon RA et al. 2011). Inibidores de miRNA-29b reduziu a progressão do aneurisma no modelo de infusão de elastase pancreática porcina em camundongos C57BL6 e, embora em menor medida, no modelo de angiotensina II infusão em camundongos ApoE^{-/-} (Maegdefessel L et al, 2012).

Resultados semelhantes foram demonstrados em modelos genéticos usando ratos com Marfan (Fbn1C1039G /+), em que o bloqueio miRNA-29b impediu o desenvolvimento de aneurisma e apoptose da parede da aorta (Merk DR et al, 2012). Além disso, a expressão aumentada do miRNA-29 induziu expansão aneurismática grave em dois modelos murinos diferentes (Maegdefessel L et al, 2012).

Estes estudos apontam para o mesmo mecanismo molecular: miRNA-29 regula os níveis de múltiplos alvos de expressão com uma função na matriz extracelular, e a inibição terapêutica do miR-29 melhora a estrutura e a integridade da parede do vaso. Foi anteriormente demonstrado que, no coração, o miRNA-29 atua em diferentes alvos da matriz extracelular, tais como colágeno e elastina (van Rooij et al, 2008). Estes componentes da matriz extracelular são também induzidos após a inibição de miRNA-29 na vasculatura (Boon RA et al, 2011; Maegdefessel L et al, 2012; Merk DR, et al, 2012). Curiosamente, a inibição de miRNA-29 também pode ser usado para

aumentar a expressão de elastina em células de pacientes haplo insuficientes para a elastina e para aumentar a deposição de elastina em vasos de bioengenharia (Zhang W et al., 2015). Além de atuar nos componentes estruturais da matriz extracelular, miRNA-29 também tem como alvo a proteína anti-apoptótica MCL-1 (Mott JL et al., 2007) e, paradoxalmente, MMP-2 (Steele R et al., 2010). Na verdade, a diminuição da proteína MCL-1 foi encontrada em ratos com Marfan, e a inibição de miRNA-29 evitou apoptose (Merk DR et al., 2012), o que pode contribuir para os efeitos terapêuticos da inibição do miRNA-29.

Fisiologicamente, miRNA-29 provavelmente funciona como um travão endógeno sobre a expressão de proteínas da matriz extracelular, atenuando assim os efeitos pró-fibróticos. Consistentemente, tem sido descrito que a inibição do miRNA-29 in vivo induz a fibrose em vários órgãos, incluindo o coração (Van Rooij et al, 2008), fígado (Roderburg C et al, 2011), e nos rins (Qin W et al, 2011), caracterizada pelo aumento da deposição de matriz extracelular.

Nos aneurismas humanos, miRNA-29b (mas não miRNA-29a e miRNA-29c) apresentou expressão elevada em aneurismas torácicos em um estudo, ao passo que não foi regulamentado em outro estudo e apresentou baixa expressão em aneurismas de aorta abdominal. Um recente relatório adicional descreve a associação de níveis alterados miRNA-29 com formação de aneurisma em aneurismas torácicos humanos (Jones JA et al, 2011), e utilizando uma abordagem de bioinformática, miRNA-29 foi proposta para contribuir para a formação de aneurisma (Liao M et al, 2011).

Alguns microRNAs têm sido estudados no intuito de avaliar se desempenham um papel na patogenia dos aneurismas. Um dos primeiros estudos avaliando o papel de miRNAs para a formação dos aneurismas descreve o mecanismo pelo qual miR-143/145 regula a função de células musculares lisas (Elia L et al, 2009). Os autores demonstraram que em aneurismas torácicos humanos, miR-143 e miR-145 foram expressos em níveis mais baixos em comparação com aorta torácica saudáveis, que se correlacionou com a função de células musculares lisas. Outro estudo que

aponta para o papel de miR-143/145 na manutenção da função de células musculares lisas descreve a eliminação específica de células musculares lisas em ratos que apresentam disfunção contrátil dessas células e que pode ser revertida pela restauração de miR-143/145 (Albinsson S et al, 2010). Se há restauração de miRNA-143/145, a formação de aneurisma não foi relatada. Outro regulador principal do fenótipo das células musculares lisas vasculares, o miR-21, revelou inibir a formação de aneurisma em ratos (Maegdefessel L et al, 2012). A superexpressão miRNA-21 protegia contra a progressão do aneurisma, enquanto que a inibição de miRNA-21 aumentou ainda mais a formação de aneurisma em curso. Outro estudo demonstrou que o miRNA-26a tinha seus níveis reduzidos em dois tipos de ratos com AAA induzido (PPE e AngII) (van Rooij E et al, 2011).

Zhang W et al, 2015, estudaram a expressão dos miRNAs em pacientes com aneurisma de aorta abdominal. Avaliaram 10 casos com aneurisma e 10 controles através de microarray em amostras de sangue e concluíram que, dos 151 miRNA que apresentaram diferença de, pelo menos 2x o Fold, 3 apresentaram um grande aumento, acima de 5, nos doentes (miR 191-3p, miR 455-3p e miR-1281). Numa segunda etapa, esses resultados foram confirmados em um coorte maior de pacientes (60 casos e 60 controles) através do RT-qPCR, com aumento do fold de 5,90, 5.44 e 3,09 para o miR-191-3p, miR455-3p e miR-1281, respectivamente. E, baseando-nos nesses achados, estudamos o comportamento no miRNA-1281 após a correção do aneurisma de aorta abdominal.

2.5.3 MicroRNAs como biomarcadores

Alguns miRNAs como miRNA-191-3p, miRNA-455-3p e miRNA-1281 foram relacionados com o AAA, sugerindo a possibilidade de serem usados como marcadores da doença (Zhang W et al, 2015). No entanto, não há estudos que relacionem os miRNAs como marcadores no controle pós tratamento.

A elucidação de vias moleculares envolvidas na patogênese do AAA poderá contribuir para o diagnóstico e prognóstico dos pacientes. Neste

contexto, estudos recentes tem demonstrado o papel dos microRNAs como biomarcadores associados a várias doenças entre elas o AAA.

Diante do exposto, é possível afirmar que a formação de um aneurisma é um processo multifatorial complexo, envolvendo a remodelação destrutiva do tecido conjuntivo em todo o segmento afetado da parede da aorta. Este processo envolve uma inflamação crônica local, uma diminuição no número de células do músculo liso da túnica média, e fragmentação da matriz extracelular da aorta. Durante os últimos anos, um esforço considerável tem sido dedicado à elucidação dos mecanismos moleculares e vias de formação dos AAA, com trabalhos recentes focando o papel dos miRNAs. Devido aos múltiplos efeitos pós-transcricionais de miRNAs individuais, é possível que um único miRNA possa ser responsável pelo desenvolvimento do AAA, no entanto, é mais provável que uma variedade de miRNAs seja identificada como associada a aspectos específicos da formação do aneurisma. Ao compreender a fisiopatologia da formação do aneurisma, tratamentos específicos com drogas podem ser desenvolvidos para interromper o crescimento do mesmo ou para evitar sua rotura. O estudo dos miRNAs e sua modulação vai acrescentar à nossa compreensão da formação do AAA, e pode resultar em potenciais alvos terapêuticos e marcadores biológicos.

3. HIPÓTESE

Considerando os múltiplos fatores envolvidos na formação e expansão do aneurisma de aorta e nos recentes estudos que focam o papel da PCR e sua relação com o tamanho do AAA e a mortalidade dos pacientes tratados, associado também às alterações de função renal, assim como o papel dos microRNAs na formação do aneurisma, a avaliação dos níveis séricos destes poderiam se correlacionar com a evolução clínica do indivíduo e com as possíveis alterações anatômicas do saco aneurismático.

4. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Estudar a expressão do microRNA-1281, PCR e da função renal antes e após o tratamento endovascular em amostras de sangue de pacientes portadores de AAA infrarrenal correlacionando com a evolução clínica nos seis primeiros meses de pós-operatório.

Objetivos Específicos

- Quantificação sérica da expressão dos miR-1281 antes da cirurgia.
- Avaliar a resposta da concentração sérica do miR-1281 à correção endovascular de aneurisma de aorta abdominal.
- Correlacionar a expressão sérica da PCR com a presença do aneurisma e a evolução do saco aneurismático;
- Correlacionar o diâmetro do AAA com a expressão do miRNA-1281.
- Avaliar a evolução da função renal através das dosagens séricas da uréia e creatinina.

5. PACIENTES E MÉTODOS

Neste estudo, foram incluídos 41 pacientes consecutivos (independente do grupo étnico, idade e sexo) que foram submetidos à correção endovascular de AAA no período de janeiro de 2014 a novembro de 2015 selecionados a partir de casos atendidos no Ambulatório de Cirurgia Vascular e Endovascular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP).

Os pacientes foram acompanhados inicialmente, durante este estudo, por um período de seis meses, não sendo diagnosticados endoleaks em nenhum desses casos durante este período.

Cabe ressaltar que exames de vigilância (angiografia de aorta total por tomografia computadorizada ou por ressonância nuclear magnética) são realizados de rotina no controle pós-operatório de todos os pacientes submetidos à correção endovascular de AAA.

As coletas de sangue periférico para dosagem da PCR e microRNA-1281 foram realizadas antes e após 6 meses da correção do aneurisma.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP/FMRP-USP processo nº 3240/2014.

Critério de inclusão: Foram incluídos no presente estudo pacientes atendidos no Ambulatório de Cirurgia Vascular e Endovascular do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP) com diagnóstico de aneurisma de aorta abdominal com diâmetro maior que 5,5 cm para homens ou maior que 5,0 cm para mulheres e que tiveram indicação de tratamento endovascular com pelo menos 1,5 cm de colo proximal. Após informações detalhadas do tratamento e dos objetivos do trabalho somente os pacientes que assinaram o termo de consentimento livre esclarecido foram mantidos no estudo.

Crterios de excluso: Pacientes com doenas subjacentes (psicose medicamentosa, meningites, acidente vascular enceflico, esclerose mltipla, tumores e doenas autoimunes) ou utilizando medicamentos com possibilidade de interferir com a anlise dos marcadores em estudo; pacientes que perderam o seguimento com a especialidade ou faleceram durante o estudo; pacientes que no tiveram indicao de tratamento endovascular para o aneurisma, pacientes que evoluram com vazamentos (endoleaks) e pacientes que se recusaram a participar do estudo.

Acompanhamento: Foram realizados retornos ambulatoriais em 1, 3 e 6 meses, com Tomografia de controle em 1 e 6 meses, conforme protocolo do servio. As amostras de sangue para dosagem srica foram colhidas antes da cirurgia e no retorno de 6 meses.

Coleta do Material: Os voluntrios da pesquisa foram submetidos a uma ficha de entrevista clnica e termo de consentimento livre esclarecido (Anexo A) previamente coleta da amostra de sangue. Aps o preenchimento dos critrios de incluso e excluso, foram submetidos coleta de sangue atravs de veia perifrica (30 ml) que foram distribudos em lquotas:

- PCR (Plasma) – tubo com tampa roxa, contendo EDTA, o sangue foi centrifugado a 5200 RPM por 10 minutos a 4C, ento foi separado em tubo eppendorf (1 lquota de mais ou menos 1 mL) e congelado a -70C;
- MicroRNAs – tubo com tampa roxa, contendo EDTA, sangue total congelado a -80C. Todo o material coletado foi armazenado at o momento das anlises. A segunda coleta, aps 6 meses do tratamento, foi realizada seguindo os mesmos parmetros, durante a consulta de retorno.

Protena C reativa

Foi utilizado o mtodo imunoturbidimtrico com ltex. A protena C reativa reage com o anticorpo especfico formando imunocomplexos insolveis. A turbidez produzida pelos imunocomplexos proporcional concentrao de PCR na amostra e pode ser lida com espectroftmetro.

MicroRNAs

As amostras de sangue foram coletadas em tubos com EDTA em quantidade aproximada de 4 mL. O sangue total foi transferido para um tubo falcon estéril e livre de RNase de 50 mL e a esse foi acrescentado 20 mL de tampão para lise de glóbulos vermelhos. Após manter 15 min em gelo, centrifugou-se novamente por 10 min a 3000 RPM. O sobrenadante foi descartado, obtendo-se o *pellet* que foi ressuspensionado em 250 mL de PBS (*phosphate-buffered saline*) e 750 mL de Trizol (*Invitrogen*, EUA) e transferido para um tubo *eppendorf* de 1,5 mL. Acrescentou-se 200µl de clorofórmio, agitando-se vigorosamente por 15 segundos. A solução final foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm e a fase aquosa (superior) de cada *eppendorf* foi transferida para novos tubos. O RNA foi precipitado com 500µl de álcool isopropílico 100% e permaneceu a -80°C por pelo menos 12 horas.

Após esse período, a amostra foi centrifugada a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm, desprezando-se o sobrenadante a seguir. Foi acrescentado 1000µl de etanol 70% seguido de centrifugação refrigerada por 15 minutos a 14.000 rpm, novamente desprezando-se o sobrenadante. O *pellet* foi seco por inversão e permanência em temperatura ambiente por alguns minutos. A seguir a amostra foi novamente suspensa com água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato – inibidor de RNAase) com volume final de 15 mL. Esse material foi, em seguida, aliquotado, identificado e armazenado a - 80°C.

Foi utilizado o equipamento *Thermo Scientific NanoDrop 2000*, um espectrofotômetro que fornece a concentração de RNA em uma amostra de 1 a 2µl. Além da concentração, este aparelho nos fornece valores de razão referentes à pureza das amostras (razão 260/280).

Síntese de DNA complementar (cDNA) para miRNA

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

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

RQ-PCR do microRNA

O método de PCR em tempo real foi utilizado para a verificação da expressão diferencial do miRNA. Para a análise quantitativa da expressão, foram utilizados os sistemas disponíveis comercialmente *TaqMan Assay-on-demand* (Applied Biosystems).

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

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

Figura 2: Amplification plot. O valor C_t é o número do ciclo no qual o sinal de fluorescência (ΔR_n) de uma dada amostra cruza o valor de limiar dado pelo software ou decidido pelo utilizador. Adaptado de ABM- Real-Time PCR/Quantitative PCR (qPCR) – An Introduction (https://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/polymerase_chain_reaction_qpcr.php)

As condições padrão de amplificação foram 95°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto (anelamento e extensão simultânea). Os dados foram então exportados para planilhas do *software Excel* para cálculo dos valores de $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Foi estabelecido um *threshold* de 0,1 para o endógeno e também para os miRs estudados e o desvio entre as amostras considerado foi um valor de até 0,5.

O cálculo do Fold segue as seguintes etapas:

- 1) Cálculo da diferença de C_t entre o miRNA de cada placa e o controle normalizador (house keeping)
- 2) Cálculo da média de ΔC_t para o miRNA do grupo AAA e a média de ΔC_t do grupo tratado.
- 3) Cálculo da diferença das médias C_t para o miRNA do grupo AAA e para o grupo tratado= $\Delta\Delta C_t$. $\Delta\Delta C_t$ =Média ΔC_t AAA- Média ΔC_t tratado
- 4) Cálculo do Fold Change: $2^{-\Delta\Delta C_t}$

Morfometria do aneurisma

Foi utilizado o programa Osirix 32-bit para realização das medidas do aneurisma as quais foram plotadas em diagrama confeccionado previamente. As aferições foram realizadas em dois momentos (pré-operatório e 6 meses após o procedimento cirúrgico).

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para responder aos objetivos do estudo, foram utilizadas, além de técnicas básicas de análise exploratória como média, mediana, desvio padrão e análises de frequência, duas metodologias estatísticas: o teste não paramétrico de Wilcoxon Mann-Whitney e o teste de correlação de Pearson.

O teste não paramétrico de Wilcoxon Mann-Whitney foi utilizado para a comparação de médias dos parâmetros aferidos (momento inicial) entre os gêneros. O teste de correlação de Pearson foi aplicado com objetivo de se verificar a associação das variáveis mensuradas e o miRNA bem como entre elas (momento inicial).

Todos os testes de hipóteses desenvolvidos nesse trabalho consideram uma significância de 5%, isto é, a hipótese nula foi rejeitada quando p-valor foi menor que 0,05.

7 RESULTADOS

Foram recrutados 41 pacientes para o estudo. Onze pacientes foram excluídos do estudo. Os critérios de exclusão foram os seguintes:

- Infecção do sítio cirúrgico (n = 3 pacientes);
- oclusão accidental de artéria renal (n = 1 paciente);
- neoplasia (n = 1 paciente);
- vazamento tipo II (n = 3 pacientes);
- perda de seguimento (n = 2 pacientes);
- óbito (n = 1 paciente).

Entre os 30 pacientes incluídos no estudo, 4 eram mulheres (13,34%) e 26 eram homens (86,66%).

A idade média dos pacientes foi de 68,6 anos, variando entre 50 e 83 anos. A idade média entre os homens foi de 69,53 anos, variando de 50 a 83 anos e a idade média entre as mulheres foi de 62,5 anos, variando de 61 a 65 anos.

O peso médio foi de 73,8 Kg, com valores oscilando entre 45,0 Kg e 118,0 Kg.

Quanto às comorbidades, 26 deles eram tabagistas, 5 eram diabéticos, 20 hipertensos, 5 apresentavam doença arterial obstrutiva periférica e 8 dislipidemia, conforme tabela abaixo:

Comorbidade	Total	Porcentagem
Tabagismo	26	86,67%
HAS	20	66,67%
Dislipidemia	8	26,67%
DAOP	5	16,67%
DM	5	16,67%

Tabela 5: Comorbidades da população da amostra. Elaborado pela autora.

Foram considerados com Hipertensão Arterial Sistêmica quando a pressão sistólica/diastólica foi maior que 140/90 mmHg ou se estavam em uso de medicação hipotensora.

Dislipidemia foi considerada quando a dosagem de colesterol total foi maior que 200mg/dL e/ou a dosagem de triglicérides foi >150mg/dL ou se estavam em uso de hipolipemiante.

Foram considerados diabéticos aqueles pacientes que apresentaram glicemia >120mg/dL ou que estavam em uso de hipoglicemiante.

Quanto à Doença Arterial Obstrutiva Periférica, foram considerados somente os pacientes sintomáticos e com diminuição ou ausência de pulso periférico.

Para a variável Clearance foi observada uma média de 65,74, com um largo intervalo entre a menor taxa (30,64) e a maior (125,44), e sua alta variabilidade pode ser confirmada no desvio padrão de 21,29. Para creatinina observou-se uma média de 1,14, e com desvio padrão de 0,29 suas medições oscilaram entre 0,66 e 2,00. Foram considerados com disfunção renal prévia os pacientes com creatinina basal acima de 1,5mg/dL.

O diâmetro do aneurisma registrou uma média de 5,62, com a menor aferição no valor de 3,33 chegou a ter indivíduo com 8,90, e com uma variabilidade moderada com desvio padrão de 1,14.

O fold médio do miRNA-1281 antes do procedimento foi de 1,66, com valores variando de 0,21 a 8,14. Para os homens, foi de 1,64 e, para as mulheres, de 1,72. Após o tratamento endovascular foi 0,27 com $p < 0,0001$. Entre os homens, 0,27 e, entre as mulheres, 0,30.

Gráfico 1: Fold do miRNA-1281 antes e após a correção do AAA, $p > 0,0001$.
Elaborado pela autora

A avaliação da proteína C reativa antes do procedimento teve como resultado a média de 1,67mg/L, com valores extremos distantes que foram de 0,02 até 19,47 e, após o procedimento, 0,69mg/L.

Gráfico 2: Dosagem da proteína C reativa(mg/dL) antes e após a correção do aneurisma ($p = 0,48$). Elaborado pela autora.

O lipidograma mostrou uma média de colesterol de 179,9mg/dL, o valor menor foi de 60,00, e o maior, 287,00. Entre os homens, a média foi de 178,69mg/dL e, entre as mulheres, foi de 187,75mg/dL. A dosagem média de triglicérides foi 170,9mg/dL, sendo de 171,73mg/dL para os homens e 165,5mg/dL para as mulheres. A dosagem dos triglicérides apresentou um

comportamento estatístico semelhante ao colesterol total quando se comparou suas médias e valores mínimos. Entretanto, houve uma maior variabilidade dos triglicérides, com um extremo mais acentuado (360,00mg/dL).

A tabela abaixo mostra os principais dados demográficos dos pacientes do estudo.

Variável	Mínimo	Média	Mediana	Desvio Padrão	Máximo
Clearance	30.64	65.74	63.78	21.29	125.44
Creatinina	0.66	1.14	1.11	0.29	2.00
Diâmetro do aneurisma	3.33	5.62	5.57	1.14	8.90
miRNA 1281	0.21	1.66	1.00	1.95	8.14
Proteína C reativa	0.02	1.67	0.72	3.52	19.47
Colesterol total	60.00	179.90	179.00	51.99	287.00
Triglicérides	66.00	170.90	153.00	82.46	360.00
Idade	50.00	68.60	68.00	9.52	83.00
Peso	45.00	73.80	70.00	17.03	118.00
Feminino	N	4.00			
	%	13.33			
Masculino	N	26.00			
	%	86.67			

Tabela 6: dados demográficos da população estudada com estatísticas descritivas de média, mediana, desvio padrão, mínimo e máximo para todas as medições mais a idade e peso, e frequência absoluta e relativa segundo sexo. Elaborada pela autora.

Foram considerados com disfunção renal os pacientes que evoluíram com aumento da creatinina acima de 25% ou queda da filtração glomerular acima de 20% após o procedimento. Apresentaram disfunção renal 16,6% dos pacientes (5), todos foram homens. A creatinina média apresentou aumento de 0,07mg/dl, com $p=0,68$.

Gráfico 3: Dosagem de creatinina(mg/dL) antes e após a correção do AAA ($p=0,68$). Elaborado pela autora.

Obteve-se sucesso inicial no tratamento de todos os casos, que foram acompanhados pelo prazo de 6 meses. Nenhum dos casos apresentou vazamento, portanto, sem dilatação do aneurisma, demonstrados pela tomografia de controle de 6 meses, como mostra o exemplo das figuras a seguir.

Figura 3: Corte transversal de tomografia de controle de paciente do sexo masculino, demonstrando exclusão do aneurisma pela endoprótese

Figura 4: Reconstrução 3D de tomografia de paciente do sexo masculino, demonstrando a endoprótese na aorta.

Fazendo a correlação entre gênero e os níveis séricos do microRNA-1281, através do teste não paramétrico de Wilcoxon, não observou-se diferença estatisticamente significativa entre homens e mulheres ($P > 0.5$).

Variável	Feminino (n=4)			Masculino (n=26)			p-valor
	Média	Mediana	Desvio Padrão	Média	Mediana	Desvio Padrão	
Clearance	59.66	58.48	19.86	66.68	63.78	21.72	0.6041
Creatinina	1.31	1.20	0.54	1.12	1.11	0.23	0.7370
Diâmetro do aneurisma	6.05	6.10	0.73	5.55	5.46	1.18	0.3763
miRNA 1281	1.72	1.01	1.59	1.65	0.98	2.02	0.5218
Proteína C reativa	1.14	0.62	1.43	1.76	0.72	3.75	0.9271
Colesterol total	187.75	185.00	10.21	178.69	174.50	55.78	0.5620
Triglicérides	165.50	179.00	72.95	171.73	153.00	85.11	1.0000
Idade	62.50	62.00	1.91	69.54	70.50	9.89	0.0869

Tabela 7: Média, mediana e desvio padrão de todos os parâmetros aferidos segundo sexo, seguido do p-valor do teste de Wilcoxon. Elaborado pela autora.

Outros estudos estatísticos foram realizados verificando também as correlações de Pearson das variáveis numéricas (clearance de creatinina, creatinina, diâmetro do aneurisma, proteína C reativa, colesterol total e triglicérides) com relação ao miRNA-1281 e também a associação destas variáveis entre si (tabela 8). Para associação com o miRNA-1281 observamos

significância positiva da variável Clearance de creatinina (p-valor 0.0436, $r = 0.3709$).

Para a associação das mensurações entre si, observamos significância na correlação positiva, ou seja, quanto maior o valor observado em uma, maior o valor observado na outra, entre o diâmetro do aneurisma e proteína C reativa (p-valor 0.0009, $r = 0.5747$) e colesterol total e triglicérides (p-valor 0.0133, $r = 0.4470$) e significância na correlação negativa, ou seja, quanto maior uma variável, menor a outra, entre o Clearance e creatina (p-valor 0.0026, $r = -0.53044$) e entre o aumento do diâmetro do aneurisma e os valores de triglicérides (p-valor 0.0114, $r = -0.4402$).

Variável	Estatística	Clearance	Creatinina	Diâmetro do aneurisma	miRNA 1281	Proteína C reativa	Colesterol total	Triglicérides	Idade
Clearance	r p-valor	1							
Creatinina	r p-valor	-0.5304 0.0026	1						
Diâmetro do aneurisma	r p-valor	-0.0617 0.746	0.0885 0.642	1					
miRNA 1281	r p-valor	0.3709 0.0436	-0.2067 0.273	-0.0719 0.7058	1				
Proteína C reativa	r p-valor	-0.0857 0.6525	-0.0811 0.6699	0.5747 0.0009	0.0136 0.943	1			
Colesterol total	r p-valor	0.0071 0.9702	-0.0158 0.9341	-0.1179 0.5351	-0.2260 0.2298	-0.2345 0.2122	1		
Triglicérides	r p-valor	0.0645 0.7347	0.2530 0.1774	-0.4402 0.0149	-0.0320 0.8665	-0.2843 0.1278	0.4470 0.0133	1	
Idade	r p-valor	0.0226 0.9056	-0.1486 0.4331	0.1422 0.4537	-0.2645 0.1579	0.2781 0.1367	-0.1343 0.4792	-0.2561 0.1719	1

Tabela 8: Coeficientes de correlação de Pearson entre todas as variáveis mais a idade dos indivíduos. Elaborada pela autora.

Abaixo temos a análise gráfica das variáveis clearance, creatinina, diâmetro do aneurisma, proteína C reativa, colesterol total e triglicérides com relação ao miRNA-1281. Os pontos representam as observações (cada paciente) no eixo X temos os valores de miRNA-1281 e no eixo Y os valores das variáveis citadas acima. Observamos que para clearance há uma leve tendência de alta, corroborando com os resultados da análise de correlação e

nos demais casos não há uma tendência clara, corroborando com o fato de que não houve significância estatística na análise de correlação.

Gráfico 4: Associação entre o miRNA-1281 e creatinina, diâmetro do aneurisma, Proteína C reativa, triglicérides e colesterol total. Elaborado pela autora.

E, quando analisamos a expressão do miRNA-1281 com ausência e presença de cada comorbidade, observamos que, apesar de não haver significância estatística nos testes, na amostra há uma tendência de menores valores de miRNA-1281 para ausência das comorbidades, exceto tabagismo, que apresentou tendência contrária na amostra.

Gráfico 5: Relação entre o miRNA-1281 com as comorbidades apresentadas pelos doentes estudados. Elaborado pela autora.

8 DISCUSSÃO

O aneurisma de aorta abdominal é uma doença de grande relevância clínica, pois costuma ser assintomática e tem grande tendência a romper, tornando-se uma emergência de alta mortalidade.

A prevalência de AAA em uma dada população depende de fatores de risco associados que incluem idade avançada, gênero masculino, raça branca, história familiar positiva, tabagismo, hipertensão, hipercolesterolemia, doença oclusiva vascular periférica e doença arterial coronariana (Lobato AC et al, 2010; Cronenwett JL et al, 2010; Jones DW et al, 2004; Franks PJ et al, 1996; Lindholt JS et al, 2003). Num estudo populacional, Singh K et al (2001), concluíram que o risco de se desenvolver um AAA aumenta consideravelmente após os 60 anos. Os AAA estão presentes em cerca de 1% dos homens entre 55 e 64 anos e a prevalência aumenta de 2% a 4% a cada década a partir de então. No nosso estudo, encontramos uma maior prevalência do AAA nos homens (86,67%), com idade média de 68,6 anos, concordando com outros estudos que descrevem em média uma prevalência de quatro a seis vezes maior nos homens do que em mulheres (Scott RA et al, 1995; Lederle FA et al, 2001).

O tabagismo é considerado o maior fator de risco para a formação do aneurisma e parece ter mais influência a duração do tabagismo do que a carga tabágica (Hirsch AT et al, 2006; Lederle FA et al, 2000, Wilmink TB et al, 1999). Na nossa casuística encontramos 26 fumantes (86,67%), corroborando os dados da literatura.

A história natural do aneurisma é a dilatação progressiva até sua ruptura, que é uma das emergências mais dramáticas da medicina. Apenas cerca de 50% dos pacientes com AAA roto chegam vivos ao hospital e, desses, 50% não sobrevivem ao tratamento (Schermerhorn M 2009; Harris LM 1991). A mortalidade para ruptura de AAA está entre 30 e 80%, com uma média de 50% na maioria dos serviços. Cerca 50% dos pacientes com AAA que não são submetidos ao tratamento cirúrgico morrerão por ruptura do aneurisma (Zarins CK; Harris Jr JE, 1997). O risco de ruptura está relacionado à diversos fatores, como diâmetro, sexo feminino, tabagismo, hipertensão, taxa de expansão AAA,

pico de estresse da parede do AAA, aumento rápido do trombo intraluminal, aumento da rigidez da parede do AAA e pacientes transplantados (Dalman RL, 2006; Brown LC, 1999; Brown PM, 2003; Cronenwett JL, 1985; Norman PE PJ, 2007; Lederle FA, 2002; Powell JT, 2008; Limet R, 1991; Hatakeyama T, 2001). Ou seja, metade dos pacientes que têm indicação cirúrgica não teriam ruptura do seu aneurisma. Por outro lado, a ruptura também pode ocorrer em aneurismas com diâmetro inferior ao estabelecido para intervenção (Brewster DC, 2003).

A indicação atual para cirurgia é um diâmetro maior ou igual a 5,5cm. Ainda não há consenso sobre o tratamento dos AAAs entre 4,0cm e 5,4cm. Tanto *no United Kingdom Small Aneurysm Trial(UKSAT)* quanto no *Aneurysm Detection and Management (ADAM) Trial* parece não haver vantagem na intervenção precoce desses aneurismas. Daí a necessidade de uma melhor avaliação de risco que possa nos mostrar quais são os aneurismas mais propensos a romper, independentemente do diâmetro, para que possa haver uma diminuição da morbimortalidade tanto dos casos tratados quanto dos casos em que se opta por conduta expectante. Nesse ponto os marcadores biológicos podem contribuir de forma decisiva.

Durante muitos anos, a única opção de tratamento para o aneurisma de aorta foi a cirurgia aberta (OSR). Porém, após a introdução da técnica endovascular por Parodi et al (1994), a correção endovascular (EVAR) cresceu dramaticamente e se tornou a terapia mais utilizada atualmente. Muitos estudos demonstram que EVAR apresenta muitos benefícios em relação à OSR em questões como recuperação pós-operatória mais rápida, menor necessidade de cuidados intensivos e redução do tempo de internação (Prinssen M et al, 2004; EVAR Trial Participants, 2005). Esses benefícios poderiam resultar em redução de custos hospitalares para a correção do AAA. De fato, estudos recentes relataram que EVAR está associada à menores custos hospitalares (Hölzenbein J et al, 1997). Porém, a vantagem inicial da redução de custos vai desaparecendo progressivamente a longo prazo devido ao tempo de seguimento pós-operatório e maiores taxas de reintervenção. Estudos recentes mostram custos similares ou até maiores para o EVAR (Sternberg WC, Money SR, 2000; Dryjski M et al, 2002; Greenhalgh RM et al,

2010, Prinssen M et al, 2007). Esses custos se devem principalmente à necessidade de vigilância no follow-up desses pacientes com a tomografia computadorizada para diagnóstico de endoleaks, migração, torção ou acotovelamento da endoprótese e da necessidade de possíveis reintervenções (EVAR Trial Participants, 2005; Greenhalgh RM et al, 2010, Hayter CL et al, 2005).

Além disso, os pacientes submetidos à EVAR estão particularmente expostos à uma quantidade significativa e cumulativa de radiação ionizante e, conseqüentemente, a riscos de carcinogênese, devido ao uso da angiotomografia desde a abordagem pré-operatória até o final da vida (seguimento pós-operatório) (Berrington de Gonzalez A e Darby S, 2004).

Outro fator importante a ser considerado no tratamento endovascular é o comprometimento da função renal. Alguns autores relataram não haver efeitos a longo prazo na função renal (Greenberg RK et al, 2004; Jenkins MP et al, 2002; England A et al, 2006), enquanto outros encontraram um declínio significativo com o passar do tempo (Alsac JM et al, 2005; Surowiec SM et al, 2004; Sun Z et al, 2006; Raithel D et al, 2005).

A queda de função renal progressiva parece ser multifatorial e pode ser atribuída à disfunção renal prévia, à outras comorbidades presentes, ao procedimento para correção do AAA em si, ao tipo de prótese e aos procedimentos diagnósticos e terapêuticos necessários para avaliar e tratar complicações relacionadas à endoprótese durante o seguimento. Na nossa casuística, os níveis de creatinina e da taxa de filtração glomerular tiveram pouca variação antes e após o procedimento com $p=0,68$. Houve significância na associação entre essas duas variáveis ($p=0,0026$), como era previsto. Deve-se ressaltar essa análise considerou o período entre o pré-operatório e 6 meses de seguimento.

Portanto, considerando os altos custos para seguimento dos pacientes submetidos ao tratamento endovascular com a tomografia computadorizada, a limitação do uso de contraste em idosos e naqueles indivíduos já com disfunção renal prévia e do acúmulo de radiação, que aumenta o risco de desenvolvimento de neoplasias, justifica-se a busca de marcadores biológicos que possam auxiliar no acompanhamento desses pacientes, diminuindo a necessidade da utilização da TC.

A relação de diversos marcadores séricos e o AAA têm sido amplo um campo de estudo. Entre eles a PCR e os microRNAs.

Estudos sobre a proteína C reativa (PCR) e os aneurismas tem demonstrado que há relação positiva entre a PCR e a presença de aneurisma (Liao M et al, 2015), com o tamanho do aneurisma (de Haro J et al, 2012), como preditor da progressão do aneurisma pós-tratamento (de Haro J et al, 2015) e como fator prognóstico do tratamento (Arnaoutoglou E et al, 2015). No nosso estudo, também encontramos significância na associação entre a PCR e o diâmetro do aneurisma ($p=0,0009$), sendo que quanto maior o valor em uma variável, maior o valor na outra variável também ($r=-0,53044$).

Os microRNAs não eram conhecidos até o final do século 20, porém sua descoberta abriu um grande campo de pesquisa. Os microRNAs se mostraram importantes reguladores da expressão gênica. Estudos recentes sobre sua origem, biogênese e mecanismos de ação aumentaram muito o conhecimento sobre a biologia molecular do microRNA (Lee RC et al, 1993).

Devido à sua função de regulação genética em diversos processos biológicos e funções metabólicas (Fernandez-Hernando C et al, 2013, Moore KJ et al, 2010; Zhang X et al, 2015), bem como sua alta estabilidade em fluidos biológicos (Gantier MP et al, 2011; Marzi MJ et al, 2016; GUO Y et al, 2015; Mitchell Ps et al, 2008), os miRNAs circulantes têm sido apontados como uma grande possibilidade para a identificação de novos biomarcadores não invasivos de doenças (Pengxiang L et al, 2014; Jin H et al, 2013). Além disso têm sido alvo de muitos estudos na busca da compreensão do seu papel na fisiopatologia de várias doenças, inclusive neoplasias malignas e aneurismas (Stather PW et al, 2013; Maegdefessel L et al, 2014; Chang TC et al, 2007; Yamakuchi M et al, 2008; Kaller M et al, 2011, Reiner A et al, 2011).

Em comparação com os habituais biomarcadores proteicos, os miRNAs podem vir a ser marcadores de doença precoce (geralmente os biomarcadores de proteínas são liberados após danos nos tecidos) ou de maior especificidade. De fato, os miRNAs podem ser detectados quantitativamente pela técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR) com elevada sensibilidade, especificidade e

potencial de multiplexação (Creemers EE et al, 2012; Moldovan L et al, 2014). No entanto, RT-qPCR continua a ser uma técnica relativamente demorada em comparação com muitas análises atualmente utilizadas em laboratórios clínicos e atualmente não há consenso sobre um método de normalização de dados (Moldovan L et al, 2014; Engelhardt S, 2012).

Para que o uso do microRNA como marcador biológico seja de possível aplicação prática, métodos de detecção altamente confiáveis, econômicos e convenientes na prática clínica devem ser desenvolvidos para somar aos métodos atualmente utilizados como o RT-qPCR, microarrays e RNA blotting. Nesse sentido, pesquisas tem sido feitas utilizando as ferramentas nanotecnológicas (Cissel KA et al, 2008; Liu CG et al, 2008; Varallyay E et al, 2008; Fang S et al, 2006; Gao Z et al, 2006).

Além disso, a quantidade de miRNA em matrizes biológicas de fácil acesso (por exemplo, plasma, urina) é geralmente pequena, tornando mais difícil a quantificação de miRNA e a reprodutibilidade dos resultados (Moldovan L et al, 2014; Engelhardt S, 2012). Alguns miRNAs são modulados em mais de uma patologia, limitando a especificidade e, portanto, a aplicabilidade destes miRNAs como biomarcadores (Moldovan L et al, 2014).

Zhang W et al, 2015, estudaram a expressão dos miRNAs em pacientes com aneurisma de aorta abdominal através de microarray. Dos 151 miRNA que apresentaram diferença de, pelo menos 2x o Fold, 3 apresentaram um grande aumento, acima de 5, nos doentes (miR 191-3p, miR 455-3p e miR 1281). Porém não há estudos que avaliem tais miRNAs como marcadores pós tratamento, que foi o objetivo do nosso estudo.

No nosso estudo, o miR-1281 foi identificado no sangue total de pacientes com AAA e apresentou redução significativa de sua expressão após tratamento endovascular, com queda significativa do Fold (>5) após a sua correção ($p<0,001$), mostrando correlação positiva e significativa tanto com a presença do aneurisma quanto com a evolução clínica e anatômica favorável. Adicionalmente, não houve associação da expressão do microRNA com o diâmetro do aneurisma ($p=0,7058$).

Encontramos associação do miRNA também com o Clearance de creatinina ($p=0,046$). Estudos recentes mostraram relação de alguns miRNAs com disfunção renal, como o miR-148b, miR-25 e miR-30b, entre outros (Wen

L et al, 2017; Trionfini P, Benigni A, 2017). Porém não encontramos estudos que relacionem o miRNA-1281 com a regulação da função renal.

Rotllan N et al, em estudo recente demonstrou que a inibição do miR-1281, miR-148a, ou miR-185 levou à queda dos níveis de LDL, porém não avaliou sua relação com o colesterol total e triglicérides. No nosso estudo, não encontramos correlação entre a expressão do miRNA-1281 com os níveis de colesterol total ou triglicérides ($p>1$).

9 CONCLUSÕES

1) O tratamento endovascular foi efetivo em todos os casos estudados com exclusão do saco aneurismático.

2) Não houve alteração significativa da função renal, mensurada através das dosagens séricas de uréia e creatinina e cálculo indireto do clearance.

3) Houve correlação positiva entre a PCR e a presença do aneurisma e também com seu diâmetro.

4) Houve correlação positiva do miRNA-1281 com o clearance de creatinina.

5) Houve correlação positiva do miRNA-1281 com a presença do aneurisma e com a evolução clínica e anatômica favorável após o tratamento.

Os resultados sugerem que o miRNA-1281 pode contribuir como um possível marcador de acompanhamento após o tratamento endovascular, porém outros estudos, com maior número de amostras e com a modalidade convencional de tratamento cirúrgico e o estudo de casos com endoleaks, devem ser realizados no sentido de verificar sua validade e se outras variáveis, como o Clearance de creatinina, podem influenciar na sua expressão.

REFERÊNCIAS

ABOULAFIA DM, ABOULAFIA ED. Aortic aneurysm-induced disseminated intravascular coagulation. *Ann Vasc Surg* 1996; 10: 396-405. 25.

ALBINSSON S, SUAREZ Y, SKOURA A, et al. MicroRNAs are necessary for vascular smooth muscle growth, differentiation, and function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30:1118–1126.

ALLEN RC, WHITE RA, ZARINS CK, FOGARTY TJ. What are the characteristics of the ideal endovascular graft for abdominal aortic aneurysm exclusion? *J Endovasc Surg* 1997; 4: 195-202.

ALSAC JM, ZARINS CK, HEIKKINEN MA, KARWOWSKI J, ARKO FR, DESGRANGES P, et al. The impact of aortic endografts on renal function. *J Vasc Surg* 2005; 41: 926-30.

ARMON MP, WHITAKER SC, GREGSON RHS, WENHAN PW, HOPKINSON BR. Aortoiliac length in patients undergoing endovascular abdominal aortic aneurysm repair. *J Endovasc Surg* 1998; 5: 222-27.

ARNAOUTOGLU E, KOUVELOU G, PAPA N et al. Prospective evaluation of post- implantation inflammatory response after EVAR for AAA: influence on patients' 30 day outcome. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 2015; 49, no. 2: 175–183.

Authors/TASK Force members, ERBEL R, ABOYANS V, BOILEAU C, BOSSONE E, DI BARTOLOMEO R, EGGBRECHT H, EVANGELISTA A, FALK V, FRANK H, GAEMPERLI O, GRABENWOGER M, HAVERICH A, IUNGB, MANOLIS AJ, MEIJBOOM F, NIENABER CA, ROFFI M, ROUSSEAU H, SECHTEM U, SIRNE VCAF members. 2014 ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of aortic diseases: Document Covering acute and chronic aortic diseases of the thoracic and abdominal aorta of the adult. The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Aortic Diseases of the European Society of Cardiology. *Eur Hear J* 2014;

BAEKO A, PIASCEKI GS, SHAH DM et al. Transfemoral placement of intraluminal polyurethane prosthesis for abdominal aortic aneurysm. J Surg Res 1986; 40: 305-9.

BARRETT BJ. Contrast nephrotoxicity. J Am Soc Nephrol 1994; 5:125-37.

BARRETT BJ, CARLISLE EJ. Meta-analysis of the relative nephrotoxicity of high- and low-osmolality iodinated contrast media. Radiology 1993; 188:171-8.

BERRINGTON DE GONZALEZ A, DARBY S. Risk of cancer from diagnostic X-rays: estimates for the UK and 14 other countries. Lancet 2004; 363:345-51.

BOON RA, SEEGER T, HEYDT S, et al. MicroRNA-29 in aortic dilation: Implications for aneurysm formation. Circ Res 2011; 109:1115–1119.

BREWSTER DC, CRONENWETT JL, HALLETT JW JR, et al. Guidelines for the treatment of abdominal aortic aneurysms. Report of a subcommittee of the Joint Council of the American Association for Vascular Surgery and Society for Vascular Surgery. J Vasc Surg 2003; 37: 1106-17.

BICKERSTAFF LK, HOLLIER LH, MELTON III LJ, PAIOLERO PC, CHERRY KJ. Abdominal aortic aneurysms: the changing natural history. J Vasc Surg 1984; 1:6-12.

BROWN BD, GENTNER B, CANTORE A, COLLEONI S, AMENDOLA M, ZINGALE A et al. Endogenous microRNA can be broadly exploited to regulate transgene expression according to tissue, lineage and differentiation state. Nat Biotechnol 2007; 25: 1457-67.

BROWN LC, POWELL JT. Risk factors for aneurysm rupture in patients kept under ultrasound surveillance. UK Small Aneurysm Trial Participants. Annals of surgery. 1999 p. 289–96; discussion 296–7.

BROWN OW, HOLLER LH, PAIOLERO PC et al. Abdominal aortic aneurysm and coronary artery disease. A reassessment. Arch Surg 1981; 116: 148.

BROWN PM, ZELT DT, SOBOLEV B, HALLETT JW, STERNBACH Y. The risk of rupture in untreated aneurysms: The impact of size, gender, and expansion rate. *J Vasc Surg* 2003; 37: 280–4.

BRUEMMER D, COLLINS AR, NOH G, et al: Angiotensin II–accelerated atherosclerosis and aneurysm formation is attenuated in osteopontin-deficient mice. *J Clin Invest* 2003; 112:1318.

CHAIKOF EL, BREWSTER DC, DALMAN RL, MAKAROUN MS, ILLIG KA, SICARD GA, TIMARAN CH, (...), VEITH FJ. The care of patients with an abdominal aortic aneurysm: The Society for Vascular Surgery practice guidelines. *Journal of Vascular Surgery* 2009; 50 (4 SUPPL.), pp. S2-S49.

CHANG TC, WENTZEL EA, KENT OA, RAMACHANDRAN K, MULLENDRE M, LEE KH, FELDMAN G, YAMAKUCHI M, FERLITO M, LOWENTIN CJ, et al. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell* 2007, 26: 745-752.

CHENG C, TEMPEL D, HAPEREN VR, et al. Atherosclerotic lesion size and vulnerability are determined by patterns of fluid shear stress. *Circulation* 2006; 113:2744-2753.

CHOKE E, THOMPSON MM, DAWSON J, et al: Abdominal aortic aneurysm rupture is associated with increased medial neovascularization and overexpression of proangiogenic cytokines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:2077.

CHUTER TAM, GRREN RM, OURIEL et al. Intraluminal bypass of abdominal aortic graft placement. *J VAsc Surg* 1993; 18: 185-97.

CISSEL KA, RAHIMI Y, SHRESTHA S, HUNT EA, DEO SK. Bioluminescence-based detection of microRNA, miR21 in breast cancer cells. *Anal Chem* 2008; 80: 2319-2325.

CREEMERS EE, TIJSEN AJ, PINTO YM. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circ Res* 2012;110: 483-95.

CRONENWETT JL, GARRET HE. Arteriographic measurement of the abdominal aorta, iliac and femoral arteries in woman with atherosclerotic occlusive disease. Radiology 1983; 148: 389-92.

CRONENWETT JL, JOHNSTON KW. Rutherford Cirurgia Vascular, sétima edição, volume um, capítulo 8, Aneurismas Arteriais. 2010.

CRONENWETT JL, MURPHY TF, ZELENOCK GB, WHITEHOUSE WM, LINDENAUER SM, GRAHAM LM, et al. Actuarial analysis of variables associated with rupture of small abdominal aortic aneurysms. Surgery 1985; 98:472–83.

DA SILVA ES. Variações do diâmetro da AA infra-renal. Análise crítica baseada em estudo necroscópico. Tese de doutorado apresentada na FMUSP, 1996.

DALMAN RL, TEDESCO MM, MYERS J, TAYLOR CA. AAA disease: Mechanism, stratification, and treatment. Annals of the New York Academy of Sciences 2006. p. 92–109.

DAVIS DN, HATA A. Regulation of microRNA biogenesis: a myriad of mechanisms. Cell Commun Signal 2009;7:18.

DE HARO J, BLEDA S, ACIN F. C-reactive protein predicts aortic aneurysmal disease progression after endovascular repair. Int J Cardiol. 2015 Jan 1;202:701-6.

DE HARO J, ACIN F, BLEDA S, VARELA C, MEDINA FJ, ESPARZA L. Prediction of asymptomatic abdominal aortic aneurysm expansion by means of rate of variation of C reactive protein plasma levels, J. Vasc. Surg 2012; 56 (1) 45–52.

DEBAKEY ME, COOLEY DA, CRAWFORD ES et al. Clinical application of a new flexible knitted dacron arterial substitute. Arch Surg 1959; 77:713.

DORROS G, PARODI J, SCHONHOLZ C, JAFF MR, DIETRICH EP, WHITE G et al. Evaluation of endovascular abdominal aortic aneurysm repair: anatomical

classification, procedural success, clinical assessment and data collection. J Endovasc Surg 1997; 4: 203-225.

DRYJSKI M, O'BRIEN-IRR MS, HASSET J. Hospital costs for endovascular and open repair of abdominal aortic aneurysm. J Am Coll Surg 2003; 197: 64-70.

DUBOST C, ALLARY M, OECONOMOS N. Resection of an aneurysm of the abdominal aorta. Arch Surg 1952; 64: 405-8.

ELIA L, QUINTAVALLE M, ZHANG J, CONTU R, COSSU L, LATRONICO MV, PETERSON KL, INDOLFI C, CATALUCCI D, CHEN J, COURTNEIDGE SA, CONDORELLI G. The knockout of miR-143 and -145 alters smooth muscle cell maintenance and vascular homeostasis in mice: correlates with human disease. Cell Death Differ 2009 Dec;16(12):1590-8.

ENGELHARDT S. Small RNA biomarkers come of age. J Am Coll Cardiol 2012; 60:300-3.

ENGLAND A, BUTTERFIELD JS, ASHLEIGH RJ. Incidence and effect of bare suprarrenal stent struts crossing renal ostia following EVAR. Eur J Vasc Endovas Surg 2006; 32: 523-8.

EVAR Trial Participants. Endovascular aneurysm repair versus open repair in patients with abdominal aortic aneurysm(EVAR trial 1): randomized controlled trial. Lancet 2005; 365: 2179-86).

FANG S, LEE HJ, WARK AW, CORN RM. Attomole microarray detection of microRNAs by nanoparticle-amplified SPR imaging measurements of surface polyadenylation reactions. J Am Chem Soc 2006; 128: 14044-14046.

FERNÁNDEZ-HERNANDO C, RAMÍREZ C M, GOEDEKE L, & SUÁREZ Y. "MicroRNAs in metabolic disease." *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 33.2 (2013): 178-185.

FILHO GB. BOGLIOLO – Patologia. 6ª ed Guanabara-Koogan, p. 393-415, 2000

FINK HA, LEDERLE FA, ROTH CS, BOWLES CA, NELSON DB, HAAS MA. The accuracy of physical examination to detect abdominal aortic aneurysm. Arch Intern Med 2000; 160: 833–6.

FISHER DF JR, YAWN DH, CRAWFORD ES. Preoperative disseminated intravascular coagulation associated with aortic aneurysms. A prospective study of 76 cases. Arch Surg 1983; 118: 1252-5.

FRANKS PJ, EDWARDS RJ, GREENHALGH RM, POWELL JT: Smoking as a risk factor for abdominal aortic aneurism. Ann NY Acad Sci 1996; 800: 246-248.

GANTIER MP, McCOY CE, RUSINOVA I, SULEP D, WANG D, XU D, et al. Analysis of microRNA turnover in mammalian cells following Dicer1 ablation. Nucleic Acids Res 2011; 39:5692-703.

GAO Z, YANG Z. Detection of microRNAs using electrocatalytic nanoparticle tags. Anal Chem 2006;78:1470-1477.

GHORPADE A, BAXTER BT. Biochemistry and molecular regulation of matrix macromolecules in abdominal aortic aneurysms. Ann NY Acad Sci 1996; 800:138-50

GOLLEDGE J, MULLER J, SHEPHARD N, et al: Association between osteopontin and human abdominal aortic aneurysm. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2007; 27:655.

GORE I, HIRST AE. Atherosclerotic aneurysms of the abdominal aorta. A review. Prog Cardiovasc Dis 1973; 16:113-49.

GREENBERG RK, CHUTER TA, LAWRENCE-BROWN M, HAULON S, NOLTE L. Analysis of renal function after aneurysm repair with a device using suprarenal fixation (Zenith AAA Endovascular Graft) in contrast to open surgical repair. J Vasc Surg 2004; 39:1219-28.

GREENHALGH RM, BROWN LC, KWONG GP, POWELL JT, THOMPSON SG. Comparison of endovascular aneurysm repair with open repair in patients with

abdominal aortic aneurysm (EVAR trial 1), 30-day operative mortality results: randomised controlled trial. *Lancet* 2004; 364:843-8.

GREENHALGH RM, BROWN LC, POWELL JT, THOMPSON SG, EPSTEIN D, SCULPHER MJ; United Kingdom EVAR Investigators. Endovascular versus open repair of abdominal aortic aneurysms. *N Engl J Med* 2010; 362:183-71.

GREGORY RI, CHENDRIMADA TP, COOCH N, SHIEKHATTAR R. HumanRISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 2005;123(4):631e 40.

GROSS RE, BILL AH, PEIRCE EC. Methods for preservation and transplantation of arterial grafts-observations on arterial grafts in dogs-report of transplantation of preserved arterial grafts in 9 human cases. *Surg Gynec & Obst* 1949; 88: 689.

GUIRGUIS-BLAKE JM, BEIL TL, SUN X, SENGHER CA WE. Primary Care Screening for Abdominal Aortic Aneurysm: A Systematic Evidence Review for the U.S. Preventive Services Task Force. Agency for Healthcare Research and Quality. 2014.

GUO DC, PAPKE CL, HE R, MILEWICZ DM. Pathogenesis of thoracic and abdominal aortic aneurysms. *Ann N Y Acad Sci* 2006, 1085: 339-52 .

GUO Y, LIU J, ELFEINBEIN SJ, MA Y, ZHONG M, QIU C, et al. Characterization of the mammalian miRNA turnover landscape. *Nucleic Acid Res* 2015; 43: 2326-41.

GUO Z, MAKI M, DING R, YANG Y, ZHANG B, XIONG L. Genome-wide survey to tissue-specific microRNA and transcription factor regulatory networks in 12 tissues. *Sci Rep* 2014; 4:5150.

HA M, KIM VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15:509-24.

HARRIS LM, FAGGIOLI GL, FIEDLER R, CURL GR, RICOTTA JJ. Ruptured abdominal aortic aneurysms: Factors affecting mortality rates. *J Vasc Surg* 1991;14: 812-8.

HATAKEYAMA T, SHIGEMATSU H, MUTO T. Risk factors for rupture of abdominal aortic aneurysm based on three dimensional study. *J Vasc Surg* 2001; 33: 453–61.

HAYTER CL, BRADSHAW SR, ALLEN RJ, GUDUNGUTLA DT. Follow-up costs increase the cost disparity between endovascular and open abdominal aortic aneurysm repair. *J Vasc Surg* 2005; 42: 912-8.

HIRSCH AT, HASKAL ZJ, HERTZER NR, BAKAL CW, CREAGER MA, HALPERIN JL, HIRATZKA LF, MURPHY WR, OLIN JW, PUSCHETT JB, ROSENFELD KA, SACKS D, STANLEY JC, TAYLOR LM JR, WHITE CJ, WHITE J, WHITE RA, ANTMAN EM, SMITH SC JR, ADAMS CD, ANDERSON JL, FAXON DP, FUSTER V, GIBBONS RJ, HUNT SA, JACOBS AK, NISHIMURA R, ORNATO JP, PAGE RL, RIEGEL B; ACC/AHA 2005 Practice Guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic). *Circulation*. 2006 Mar 21;113(11):e463-654. Review.

HOGES, D; GILBERT, P.M.; BURNSTEIN, S; VOGELZANG, R.L.; Normal aortic diameters by CT. *J Comput Assist Tomog* 1988; 12: 602-3.

HOLLER LH, TAYLOR LM, OCHSNER J. Recommended indications for operative. Report of subcommittee of the Joint Council of the Society for Vascular Surgery and the North Chapter of International Society for Cardiovascular Surgery. *J Vasc Surg* 1992; 15: 1046-56.

HÖLZENBIEN J, KRETSCHMER G, GLANZI R, SCHÖN A, THURNHER S, WINKELBAUER F, TRUBEL W, MINAR E, AHMADI A, HUK I, INGRUBER H, EHRINGER H, LAMMER J, POLTERAUER P. Endovascular AAA treatment: expensive prestige or economic alternative? *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997; 14:266-72

HUTVÁGNER G, ZAMORE PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 2002; v. 297, n. 5589, p. 2056–60.

JENKINS MP, ONWUDIKE M, SINGH R, BOMANJI J, ADISESHIAH M. Endoluminal repair of abdominal aortic aneurysms causes more perioperative renal dysfunction than open repair. *Br J Surg* 2002; 87: 492.

JIN H, LI C, GE H, JIANG Y, LI Y. Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of intracranial aneurysm rupture a case control study. *Journal of Translational Medicine* 2013, 11: 296.

JOHANSSON G, NYDHAL S, OLOFSSON P, SWEDENBORG J. Survival in patients with abdominal aortic aneurysms. Comparison between operative and non operative management. *Eur J Vasc Surg* 1990; 4: 479-502.

JONES DW, EASTON JD, HALPERIN JL, HIRSH AT, MATSUMOTO AH, O'GARA PT, SAFIAN RD, SCHWARTZ GL, SPITTELL JA: American Heart Association. Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Writing Group V: Medical decision making and therapy. *Circulation* 2004; 109: 2634-2642.

JONES JA, STROUD RE, O'QUINN EC, et al. Selective microRNA suppression in human thoracic aneurysms: Relationship of miR-29a to aortic size and proteolytic induction. *Circ Cardiovasc Genet* 2011; 4:605–613.

JOHNSTON WK. Multicenter prospective study of nonruptured abdominal aortic aneurysms. II: Variables predicting morbidity and mortality. *J Vasc Surg* 1989; 9: 437-47.

JOSEPH MG, MCCOLLUM PT, LUSBY RJ. Abnormal preoperative creatinine levels and renal failure following abdominal aortic aneurysm repair. *Aust N Z J Surg* 1989; 59: 539-41.

KAI ZS, PASQUINELLI AE. MicroRNA assassins: factors that regulate the disappearance of miRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 2010; 17:5-10.

KALLER M, LIFFERS ST, OELJEKLAUS S, KULHMANN K, RÖH S, HOFFMANN R, WARSCHIED B, HERMEKING H. Genome-wide

characterization of miR34a induced changes in protein and mRNA expression by a combined pulsed SILAC and microarray analysis. *Mol Cell Proteomics* 2011, 10: M111. 010462

KUNSCH C, MEDFORD RM. Oxidative stress as a regulator of gene expression. *Circ Res* 1999; 82: 753-766.

KÖLBEL T, STRANDBERG K, DONATH T, MATTIASSON I, STENFLO J, LINDBLAD B: Activated protein C–protein C inhibitor complex in patients with abdominal aortic aneurysms: is it associated with diameter and growth rate? *Vasc Endovasc Surg* 2008; 42:135.

KOZOMARA A, GRIFFITHS-JONES S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Research* 2014; 42 (Database issue):D68-D73.

LABORDE JC, PARODI JC, CLEM MF et al. Intraluminal bypass of abdominal aortic aneurysm: feasibility study. *Radiology* 1992; 184: 185-90.

LEDERLE FA, JOHNSON GR, WILSON SE, BALLARD DJ, JORDAN WD, BLEBEA J, et al. Rupture rate of large abdominal aortic aneurysms in patients refusing or unfit for elective repair. *JAMA* 2002; 287: 2968–72.

LEDERLE FA, SIMEL DL. Does this patient have abdominal aortic aneurysm? *JAMA* 1999; 281: 77.

LEDERLE FA, JOHNSON GR, WILSON SE. Aneurysm Detection and Management Veterans Affairs Cooperative Study. Abdominal aortic aneurysm in women. *J Vasc Surg* 2001; 34:122-6.

LEDERLE FA, JOHNSON GR, WILSON SE, et al. The aneurysm detection and management study screening program: Validation cohort and final results. Aneurysm Detection and Management Veterans Affairs Cooperative Study Investigators. *Arch Intern Med* 2000; 160:1425-30.

LEDERLE FA, WILSON SE, JOHNSON GR, REINKE DB, LITTOOY FN, ACHER CW, et al. Immediate repair compared with surveillance of small abdominal aortic aneurysms. *N Engl J Med* 2002; 346:1437-44.

LEE RC, FEINBAUM RL, AMBROS V. The C, elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell 1993; 75:843-854.

LIAO M, ZOU S, WENG J, et al. A microRNA profile comparison between thoracic aortic dissection and normal thoracic aorta indicates the potential role of microRNAs in contributing to thoracic aortic dissection pathogenesis. J Vasc Surg 2011; 53:1341–1349.

LIAO M, LIU CL, LV BJ, et al. Plasma cytokine levels and risks of abdominal aortic aneurysms: A population-based prospective cohort study. Annals of medicine 2015; 47(3):245-252.

LIDDINGTON MI, HEATHER BP. The relationship between aortic diameter and body habits. Eur J Vasc Surg 1992; 6: 89-92.

LIMET R, SAKALIHASSAN N, ALBERT A. Determination of the expansion rate and incidence of rupture of abdominal aortic aneurysms. J Vasc Surg Off Publ Soc Vasc Surg [and] Int Soc Cardiovasc Surgery, North Am Chapter 1991; 14: 540–8.

LINDHOLT JS, JORGENSEN B, KLITGAARD NA, HENNEBERG EW. Systemic levels of cotinine and elastase, but not pulmonary function, are associated with the progression of small abdominal aortic aneurysms. Eur J Vasc Endovasc Surg 26:418-422, 2003.

LINDHOLT JS, SHI GP. Chronic inflammation, immune response, and infection in abdominal aortic aneurysms. Eur J Vasc Endovasc Surg 2006; 31:453.

LIU CG, CALIN GA, VOLINIA S, CROCE CM. MicroRNA expression. Profiling using microarrays. Nat Protoc 2008; 3:563 578.

LOBATO, AC et al. Cirurgia Endovascular- Editora ICVE de São Paulo, terceira edição, volume dois, Aneurismas de aorta infrarrenal, 2015.

LONGO GM, XIONG W, GREINER TC, et al: Matrix metalloproteinases 2 and 9 work in concert to produce aortic aneurysms. J Clin Invest 2002; 110:625.

LORELLI DR, JEAN-CLAUDE JM, FOX CJ, et al. Response of plasma matrix metalloproteinase-9 to conventional abdominal aortic aneurysm repair or endovascular exclusion: implications for endoleak. *J Vasc Surg* 2002; 35:916.

MAEGDEFESSEL L, AZUMA J, TOH R, ET AL. Inhibition of microRNA-29b reduces murine abdominal aortic aneurysm development. *J Clin Invest* 2012; 122:497–506.

MAEGDEFESSEL L, DALMAN RL, TSAO OS. Pathogenesis of abdominal aortic aneurysms: MicroRNAs, Proteases, Genetic Associations. *Annu Rev Med* 2014; 65:49-62.

MAFFEI, FHA e cols. Doenças Vasculares Periféricas, quarta edição, volume dois, capítulo 89: Aneurismas da Aorta Abdominal. 2008.

MAFFRA JR, R. O uso do embolizante Onyx na oclusão de vazamento pós tratamento endovascular de aneurisma de aorta abdominal. Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2003.

MARZI MJ, GHINI F, CERRUTI B, de PRETIS S, BONETTI P, GIACOMELLI C, et al. Degradation Dynamics of microRNAs revealed by a novel pulse-chase approach. *Genome Res* 2016; 26:554-65.

MCDONALD DA: 1968. Regional pulse-wave velocity in the arterial tree. *J Appl Physiol*, 24:73-78.

MCMILLAN WD, PEARCE WH. Increased plasma levels of metalloproteinase-9 are associated with abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 1999; 29:122–129.

MCMILLAN WD, TAMARINA NA, CIPOLLONE M, et al. Size matters: the relationship between MMP-9 expression and aortic diameter. *Circulation* 1997; 96:2228.

MCPHEE JT, HILL JS, ESLAMI MH. The impact of gender on presentation, therapy, and mortality of abdominal aortic aneurysm in the United States, 2001-2004. *J Vasc Surg* 2007; 45: 891-9.

MEHTA M, VEITH FJ, LIPSITZ EC, OHKI T, RUSSWURM G, CAYNE NS, SUGGS WD, FEUSTEL PJ. Is elevated creatinine level a contraindication to endovascular aneurysm repair? *Journal of Vascular Surgery* 2004; 39(1): 118-123.

MERK DR, CHIN JT, DAKE BA, et al. miR-29b participates in early aneurysm development in Marfan syndrome. *Circ Res* 2012; 110:312–324.

MILLER JR FJ, SHARP WJ, FANG X, et al. Oxidative stress in human abdominal aortic aneurysms: a potential mediator of aneurysmal remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 560.

MITCHELL PS, PARKIN RK, KROH EM, FRITZ BR, WYMAN SK, POGOSOVA- AGADJANYAN EL, et al. Circulating miRNA as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 10513-8.

MIRICH D, WRIGHT KC, WALLACE S et al. Percutaneously placed endovascular graft on aortic aneurysms: feasibility study. *Radiology* 1989; 70: 1033-7.

MOLDOVAN L, BATTE KE, TRGOVCICH J, WISLER J, MARSH CB, PIPER M. Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers. *J Cell Mol Med* 2014; 18: 371-90.

MOORE K J, RAYNER K J, SUÁREZ Y, & FERNÁNDEZ-HERNANDO C. "microRNAs and cholesterol metabolism." *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2010; v. 21, n. 12, p. 699-706.

MOTT JL, KURITA S, CAZANAVE S, BRONK SF, WERNEBURG NW, FERNANDEZ-ZAPICO ME. Transcriptional Suppression of mir-29b-1/mir-29a Promoter by c-Myc, Hedgehog, and NF-kappaB. *Journal of cellular biochemistry* 2010; 110(5):1155-1164.

NESBITT WS, MANGIN P, SALEM HH, JACKSON SP. The impact of blood rheology of the molecular and cellular events underlying arterial thrombosis. *J Mol Med* 2000; 84: 989-995.

NOBRE F, SERRANO CV. *Tratado de Cardiologia-SOCESP*. 1a ed. Manole, 2005.

NORMAN P, SPENCER CA, LAWRENCE-BROWN MM, JAMROZIK K: C-reactive protein levels and the expansion of screen-detected abdominal aortic aneurysms in men. *Circulation* 2004; 110:862.

NORMAN PE PJ. Abdominal aortic aneurysm: the prognosis in women is worse than in men. *Circulation* 2007; 115(22):2865–9.

PARFREY PS, GRIFFITHS SM, BARRETT BJ, et al. Contrast material induced renal failure in patients with diabetes mellitus, renal insufficiency, or both: a prospective controlled study. *N Engl J Med* 1989; 320:143-9.

PARMER SS, CARPENTER JP. Endovascular aneurysm repair with suprarenal vs infrarenal fixation: a study of renal effects. *J Vasc Surg* 2006; 43:19-9.

PARMER SS, FAIRMAN RM, KARMACHARYA J, CARPENTER JP, VELAZQUEZ OC, WOO EY. A comparison of renal function between open and endovascular aneurysm repair in patients with baseline chronic renal insufficiency. *Journal of Vascular Surgery* 2006; 44 (4), 706-711.

PARODI JC. Endovascular repair of abdominal aortic aneurysms and other arterial lesions. *Surg Technol Int* 1994; 3:431-6.

PARODI JC, PALMAZ JC, BARONE HD. Transfemoral intraluminal graft implantation for abdominal aortic aneurysms. *Ann Vas Surg* 1991; 5: 491-99.

PEARCE WH, SLAUGHTER MS, LEMAIRE S, et al. Aortic diameter as a function of age, gender in body surface area. *Surgery* 114:691, 1993.

PENGXIANG L, QUNYE Z, XIAO W, XINJIAN Y, YUN Z, YOUXIANG L, FAN J. Circulating microRNAs serve as novel biological markers for intracranial aneurysms. *J Am Heart Assoc* 2014 October; 3(5): e000972.

PETERSEN, CP; BORDELEAU, ME; PELLETIER, J. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Molecular cell* 2006; v. 21, n. 4, p. 533–42.

POWELL JT, BROWN LC, GREENHALGH RM, THOMPSON SG. The rupture rate of large abdominal aortic aneurysms: is this modified by anatomical suitability for endovascular repair? *Ann Surg.* 2008; 247:173–9.

PRATT A, MACRAE I. The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. *J Biol Chem* 2009; 284(27):17897e901.

PRINSSEN M, BUSKENS E, de JONG SE, BUTH J, MACKAAY AJ, van SAMBEEK MR, BLANKENSTEIJN JD; DREAM Trial participants. Cost-effectiveness of conventional and endovascular repair of abdominal aortic aneurysms: results of a randomized trial. *J Vasc Surg* 2007; 46:883-90.

PRINSSEN M, VERHOEVEN EL, BUTH J, CUYPERS PW, VAN SAMBEEK MR, BALM R, ET AL. A randomized trial comparing conventional and endovascular repair of abdominal aortic aneurysms. *N Engl J Med* 2004; 351: 1607-18.

QIN W, CHUNG ACK, HUANG XR, et al. TGF- β /Smad3 signaling promotes renal fibrosis by inhibiting miR-29. *J Am Soc Nephrol* 2011 22:1462–1474.

RAITHEL D, QU L, HETZEL G. Infrarenal fixation is the safest option. *Endovasc Today* 2005; 4(8):62-65.

REINER AB, DIMMELER S. MicroRNAs and aneurysm formation. *Trend Cardiovasc Med* 2011, 21: 172-177.

RODERBURG C, URBAN GW, BETTERMANN K, et al: 2011. Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology* 53:209–218.

ROTLLAN N, PRICE N, PATI P, GOEDEKE L, FERNÁNDEZ-HERNANDO C. MicroRNAs in lipoprotein metabolism and cardiometabolic disorders. *Atherosclerosis* 2016 Mar; 246:352-60. Epub 2016 Jan 18.

ROUSH, SF. Micromanagement: a role for microRNAs in mRNA stability. ACS Chemical Biology 2006; v. 1, n. 3, p. 132–4.

SAKALIHASAN N, LIMET R, DEFAWE OD. Abdominal aortic aneurysm. Lancet. 2005; 365: 1577-89.

SALSAC AV, SPARKS SR, LASHERAS JC. Hemodynamic changes occurring during the progressive enlargement of abdominal aortic aneurysms. Ann Vasc Surg 2004; 18:14-21.

SANGIORGI G, D'AVERIO R, MAURIELLO A, BONDIO M, PONTILLO M, CASTELVECCHIO S, TRIMARCHI S, TOLVA V, NANO G, RAMPOLDI V, SPAGNOLI LG, INGLESE L. Plasma levels of metalloproteinases-3 and -9 as markers of successful abdominal aortic aneurysm exclusion after endovascular graft treatment. Circulation 2001; 104 (12 Suppl 1):I288-95.

SARASIN- FILIPOWICZ M, KROL J, MARKIEWICZ I, HEIM MH, FILIPOWICZ W. Decreased levels of microRNA miR-122 in individuals with hepatitis C responding poorly to interferon therapy. Nat Med 2009; 15: 31-3.

SCHERMERHORN M. A 66-year-old man with an abdominal aortic aneurysm: Review of screening and treatment. JAMA 2009; 302:2015-22.

SCHÝNBECK U, SUKHOVA GK, GERDES N, LIBBY P: Th2 predominant immune responses prevail in human abdominal aortic aneurysm. Am J Pathol 2002; 161:499.

SCHOEN FJ. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. In Kuman, V.; Abbas, AK; Fausto N. Ed Elsevier Saunders 2005; 511-35.

SCHUMACHER H, ECKSTEIN HH, KALLINOWSKI F, ALLENBERG JR. Morphometry and classification in abdominal aortic aneurysms: patient selection for endovascular and open surgery. J Endovasc Surg 1997; 4: 39-44.

SCOTT RA, WILSON NM, ASHTON HA, et al. Influence of screening on the incidence of ruptured abdominal aortic aneurysm: 5-year results of a randomized controlled study. Br J Surg. 1995; 82:1066-70.

SHATZ IJ, FAIRBAIRN II JF, JUERGENS JL. Abdominal aortic aneurysms. A reappraisal. Circulation 1962; 26:200-5.

SILVERBERG E, BORING CC, SQUIRES TS. Cancer statistics, 1990.CA Cancer J Clin 1990;40:9-26.

SINGH K, BØNAA K H, JACOBSEN BK, BJØRK L, & SOLBERG S. "Prevalence of and risk factors for abdominal aortic aneurysms in a population-based study the Tromsø study." *American journal of epidemiology* 154.3 (2001): 236-244.

S.N. Base de MicroRNA (<http://microrna.sanger.ac.uk/>). Acesso em: 25/03/2017.

STATHER PW, WILD JB, SYLVIUS N, CHOKE E, SAYERS RD, BOWN M. MicroRNAs associated with the pathways involved in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *Artery Research* 2013; 7 (1): 28-35.

STEELE R, MOTT JL, & RAY RB. MBP-1 upregulates miR-29b, which represses Mcl-1, collagens, and matrix-metalloproteinase-2 in prostate cancer cells. *Genes Cancer* 1 2010:381–387.

STEINBERG CR, ARCHER M, STEINBERG I. Measurement of the abdominal aorta after intravenous angiography in health and arteriosclerotic peripheral vascular disease. *Am J Radiol*, 1965; 95: 703-8.

STERNBERGH WC 3rd, MONEY SR. Hospital cost of endovascular versus open repair of abdominal aortic aneurysms: a multicenter study. *J Vasc Surg* 2000; 31: 237-44.

SUN Z, MWIPATAYI BP, SEMMENS JB, LAWRENCE-BROWN MM.Short to midterm outcomes of fenestrated endovascular grafts in the treatment of abdominal aortic aneurysms: a systematic review. *J Endovasc Ther* 2006; 13: 747-53.

SUROWIEC SM, DAVIES MG, FEGLEY AJ, TANSKI WJ, PAMOUKIAN VN, STERNBACH Y, et al. Relationship of proximal fixation to postoperative renal dysfunction in patients with normal serum creatinine concentration. *J Vasc Surg* 2004; 39: 804-10.

TRIONFINI P, BENIGNI A. MicroRNAs as Master Regulators of Glomerular Function in Health and Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2017 Feb 23. pii: ASN.2016101117. doi: 10.1681/ASN.2016101117.

TROMP G, GATALICA Z, SKUNCA M, et al. Elevated expression of matrix metalloproteinase-13 in abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg* 2004; 18:414-420.

United Kingdom Small Aneurysm Trial Participants. Long-term outcomes of immediate repair compared with surveillance of small abdominal aortic aneurysms. *N Engl J Med* 2002; 346:1445-52.

VAN ROOIJ, E.; SUTHERLAND, L.B.; LIU, N.; WILLIAMS, A.H.; MCANALLY, J.; GERARD, R.D.; LEEPER, N.J.; RAIESDANA, A.; KOJIMA, Y.; CHUN, H.J.; AZUMA, J.; MAEGDEFESSEL, L.; KUNDU, R.K.; QUERTERMOUS, T.; TSAO, P.S.; SPIN, J.M. MicroRNA-26a is a novel regulator of vascular smoothmuscle cell function. *J Cell Physiol* 2011, 226, 1035–1043.

VARALLYAY E, BURGYAN J, HAVELDA Z. Micro RNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes. *Nat Protoc* 2008; 3:190-196.

VASUDEVAN, S. Posttranscriptional Upregulation by MicroRNAs. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, nov. 2011.

VOORHEES AB, JARETSKI A, BLAKEMORE AH. The use of tubes constructed from Vynon N cloth in biding arterial defects. *Ann Surg* 1952; 135:332.

WALKER SR, YUSUF SW, WENHAM PW, HOPKINSON BR. Renal complications following endovascular repair of abdominal aortic aneurysms. *J Endovasc Surg* 1998; 5: 318-22.

WEBER JA, BAXTER DH, ZHANG S, HUANG DY, HUANG KH, LEE MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 2010; 56:1733-41.

WEN L, ANDERSEN PK, HUSUM DM, NORREGAARD R, ZHAO Z, LIU Z. MicroRNA-148b regulates megalin expression and is associated with receptor downregulation in mice with unilateral ureteral obstruction. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2017 Mar 22;ajprenal.00585.2016

WHITE GH, YU W, MAY J, CHAUFOR X, STEPHEN MS. Endoleak as a complication of endoluminal grafting of abdominal aortic aneurysms: classification, incidence, diagnosis and management. *J Endovasc Surg* 1997; 4: 152-68.

WILMINK TB, QUICK CR, DAY NE. The association between cigarette smoking and abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 1999; 30: 1099-105.

WOLINSKY H, GLAGOV S: Nature of species differences in the medial distribution of aortic vasa vasorum in mammals. *Circ Res* 1967; 20:409.

XIONG W, ZHAO Y, PRALL A, et al: Key roles of CD4+ T cells and IFN-gamma in the development of abdominal aortic aneurysms in a murine model. *J Immunol* 2004; 172:2607.

YANG W, LEE DY, BEN-DAVID Y. The roles of microRNAs in tumorigenesis and angiogenesis. *International Journal of Physiology, Pathophysiology and Pharmacology* 2011;3(2):140-155.

YAMAKUCHI M, FERLITO M, LOWENSTEIN CJ. miR34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, 105: 13421-13426.

YOSHIMURA K, AOKI H, IKEDA Y, et al: Regression of abdominal aortic aneurysm by inhibition of c-Jun N-terminal kinase. *Nat Med* 2005; 11:1330.

ZHANG W, SHANG T, HUANG C, YU T, LIU C, QIAO T, HUANG D, LIU Z, LIU C. Plasma microRNAs serve as potential biomarkers for abdominal aortic aneurysm. *Clin Biochem*. 2015 October; 48(15): 988–992.

ZHANG X, DONG H, TIAN Y. miRNA biology in pathological processes. *MicroRNA detection and pathological functions*, 1 ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2015:7-22.

ZARINS CK, HARRIS JR JE. Operative repair for aortic aneurysms: the gold standard. *J Endovasc Surg* 1997; 4: 232-241.

ANEXOS

ANEXO A

Termo de consentimento livre e esclarecido

Título do estudo: Estudo da expressão sérica do microrna-1281, proteína C reativa e função renal em indivíduos com aneurisma de aorta abdominal antes e após tratamento endovascular

Marcadores em investigação: Quantificações plasmáticas de PCR, creatinina, colesterol e microRNA-1281.

Nome da investigadora principal: Lais Missae Murakami Domingues Estraiotto Alves

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

Introdução:

Você está sendo convidado para participar de um estudo de pesquisa clínica que envolve a realização de exames complementares de imagem e a doação de pequenas amostras de sangue.

Este documento descreve o estudo para o qual você está sendo convidado a participar e o que o estudo envolverá. Leia este documento com cuidado e não hesite em fazer qualquer pergunta a qualquer momento. Sua participação neste estudo é totalmente voluntária. Cabe a você decidir se quer participar ou não.

Se decidir participar, você receberá uma cópia assinada deste documento para guardar. Ainda, se decidir participar, você pode mudar de idéia em qualquer momento e se retirar do estudo sem dar explicações. Isso não irá afetar o padrão de assistência médica que recebe.

Natureza e objetivo do estudo:

Este estudo de pesquisa clínica esta sendo conduzido por seu médico para avaliar alguns componentes sanguíneos como marcadores na correção endovascular de aneurisma de aorta abdominal.

Você está sendo convidado a participar neste estudo de pesquisa clínica porque é portador de aneurisma de aorta abdominal que corresponde ao enfraquecimento da parede da artéria aorta o que resulta na dilatação da mesma com risco de rotura e de entupimento das artérias dos membros inferiores devido à migração de trombos contidos no aneurisma.

A correção endovascular de aneurisma de aorta abdominal corresponde a um procedimento no qual é realizada a exclusão do aneurisma da circulação através de dispositivos implantados por dentro dos vasos. Para isso, utiliza-se uma endoprótese (material que irá manter o aneurisma excluído da circulação) através das artérias femorais.

Ao participar desse trabalho você estará contribuindo para entender melhor a doença e para a verificação de possíveis tratamentos ou adequações do tratamento endovascular do aneurisma de aorta abdominal.

Duração do estudo:

A sua participação como voluntário deverá ter a duração máxima de 12 meses.

Procedimentos do estudo:

Marco 0: Você deverá comparecer para internação 1 dia antes do procedimento quando será colhido sangue.

Marco 1 mês: Você comparecerá novamente após um mês do procedimento para colher nova amostra sanguínea e ser submetido a seguimento também por exame de imagem (tomografia ou ressonância).

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

Marco 12 meses: Novo retorno será solicitado para a última coleta de sangue e novos exames de imagem (tomografia ou ressonância).

Riscos e benefícios:

Os riscos são inerentes ao procedimento cirúrgico que corresponde a correção endovascular de aneurisma de aorta. Não há riscos quanto a contaminação, pois os materiais utilizados serão descartáveis.

Não se sabe se os dados obtidos com a coleta de sangue irão ajudar a descobrir meios (medicações, etc.) para melhorar o tratamento endovascular do aneurisma de aorta abdominal.

É possível que a sociedade possa se beneficiar deste estudo. Existe uma possibilidade de que as informações obtidas neste estudo possam ajudar no desenvolvimento futuro de um novo tratamento para pacientes que sofrem da mesma condição que você.

Custos, não remuneração e compensação:

O estudo não requererá nenhum custo para o paciente quanto a material utilizado. Sua participação neste estudo não será remunerada.

Confidencialidade:

A garantia de sigilo dos seus dados, de acordo com as normas brasileiras, será assegurada.

Participação voluntária:

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

Outras informações importantes:

A investigadora principal deste estudo médico é a Dra. Lais Missae Murakami Domingues Estraiotto Alvez, que pode ser encontrada no seguinte endereço: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – HCFMRP-USP – Av. Bandeirantes, 3900 – 9º andar – Departamento de Cirurgia e Anatomia – Campus Universitário – Monte Alegre – CEP: 14049-900 – Ribeirão Preto/SP e telefone (horário comercial) 16 3602 2593, celular: 14 98810 6155.

1. Eu li ou leram para mim o termo de consentimento livre e esclarecido para esse estudo. Recebi todas as explicações sobre a natureza, objetivo, duração, efeitos e riscos previsíveis do estudo, assim como sobre as minhas responsabilidades. As minhas perguntas foram respondidas satisfatoriamente.
2. Concordo em participar do estudo. Concordo em cooperar totalmente com o médico e entrar em contato com ele/ela quando necessário para esclarecimento de dúvidas ou dos próximos passos do estudo.
3. Informei ao médico do estudo sobre todas as minhas doenças e medicações que venho usando, além de informar sobre todas as minhas consultas médicas recentes.
4. Informei também ao médico do estudo sobre qualquer participação minha em outros estudos clínicos no último ano.
5. Entendo que minha participação no estudo é voluntária e que posso me recusar a participar ou posso sair do estudo a qualquer momento. Caso eu me recuse a participar deste estudo, não serei penalizado de nenhuma forma e minha decisão não prejudicará qualquer cuidado médico ao qual eu tenha direito.
6. Ao assinar este documento autorizo a revisão de meus registros.
7. Receberei uma cópia assinada deste consentimento.

Nome do paciente: _____

(a ser preenchido pelo paciente)

Assinatura do paciente: _____

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

Data: _____

Nome da testemunha: _____

Assinatura da testemunha: _____

(se aplicável)

Data: _____

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

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

Nome: _____

Assinatura: _____

Data: _____

ANEXO B

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 30 de abril de 2014

Ofício nº 1418/2014
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **“AVALIAÇÃO DO PERFIL INFLAMATÓRIO E DE MicroRNAs APÓS CORREÇÃO ENDOVASCULAR DE ANEURISMA DE AORTA ABDOMINAL” - versão 3.1 de 31/03/2014**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 385ª Reunião Ordinária realizada em 28/04/2014 e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - versão 3.1 de 31/03/2014**, de acordo com o Processo HCRP nº 3240/2014.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE - apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE - apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/12 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores

PROF.DR. EDWALDO EDNER JOVILIANO(Orientador)

EMANUEL JUNIO RAMOS TENÓRIO

Depto. de Cirurgia e Anatomia

Campus Universitário - Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733;IRB-00002186 e Registro PB/CONEP n 5440
(16) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

ANEXO C

Expressão do miRNA-1281 antes e após 6 meses do tratamento

Pacientes	miRNA 1281 (PRE)	miRNA 1281(6M)
1	1,407576158	0,411743404
2	0,415422711	0,189652491
4	8,137120166	0,206251195
5	0,388919631	0,181143768
7	1,7756104	0,055176413
8	1,911800573	0,176709317
11	0,837747965	0,139251325
13	1,116777005	0,582014493
14	1,545279687	0,057931766
18	4,08866225	0,073383674
20	0,522348614	0,1915925
21	1,466375879	0,476979291
22	7,339880357	0,484581229
23	3,570706564	0,110147452
24	0,475338143	0,213701869
25	0,464061728	0,00170732
26	3,477386628	0,215518585
27	0,440214261	0,124433893
28	2,218855693	0,984003531
32	1,128548424	0,403316042
34	1,885646672	0,618195264
37	0,320705059	0,052144683
38	0,30194611	0,890440637
39	1,476409642	0,149493748
42	0,491710445	0,30506626
43	0,232805809	0,085699936
44	0,884358753	0,464950347
48	0,212548318	0,090884351
49	0,780542365	0,274150271
51	0,350402427	0,172520447