**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

# Transcriptoma e proteoma em sangue periférico na busca de novos marcadores de doenças cardiovasculares

Vivian Nogueira Silbiger

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata

São Paulo
2010

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

# Transcriptoma e proteoma em sangue periférico na busca de novos marcadores de doenças cardiovasculares

Vivian Nogueira Silbiger

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata

São Paulo
2010

Vivian Nogueira Silbiger

Transcriptoma e proteoma em sangue periférico na busca de novos marcadores de doenças cardiovasculares. Estudo em infarto agudo do miocárdio

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata
orientador/presidente

_____
1º. examinador

_____
2º. examinador

_____
3º. examinador

_____
4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

*Aos meus pais, pelo apoio incondicional em todos os momentos de minha vida.*
*Ao meu esposo, André Ducati Luchessi, pelo amor, respeito e compreensão, que foram fundamentais para a realização deste trabalho e que me incentivam, a cada dia, na busca por nossos sonhos e realizações.*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, por sempre colocar pessoas especiais*
*na minha vida e guiar meu caminho.*

Ao meu orientador e amigo, Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata, pela oportunidade de desenvolver este projeto e por sua orientação, que foi muito além dos estudos científicos da minha tese. Certamente aprendemos muito um com outro e, hoje, agradeço pela paciência que teve comigo. Como um pai, realmente me ensinou a crescer enquanto pesquisadora e pessoa. Muito obrigada.

À Profa. Assoc. Rosário Dominguez Crespo Hirata, pelo apoio durante a vida acadêmica e pelas críticas e sugestões no desenvolvimento deste projeto. Agradeço também pelo carinho e pela amizade aqui construída.

Aos amigos e colaboradores Lídio G. L. Neto e Carla Pastorelli, pelas horas de plantão em busca de amostras, e Débora Cavichioli, pelas infindáveis "reações em tempo real" para finalizar a tese.

À Cristina Moreno Fajardo, técnica do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico da FCF/USP, que, além do excelente apoio técnico, sempre nos relembra do amor de Deus para com seus filhos.

À Profa. Elvira Guerra, que compartilhou a amizade, o carinho e os sábios conselhos durante minha trajetória. Os momentos vividos em *Oxford* estão guardados para sempre no meu coração.

Aos demais amigos e colegas do Laboratório de Biologia Molecular aplicada ao Diagnóstico do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP).

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome do seu diretor, Prof. Tit. Jorge Mancini Filho, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas dessa mesma instituição, em nome do seu chefe, Profª. Dulcinéia Saes Parra Abdalla,.

À Profa. Primavera Borelli, coordenadora do programa de Pós-Graduação em Farmácia – Área de Análises Clínicas do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

*Al Prof. Catedrático Ángel María Carracedo Álvarez, que, además de abrir las puertas de su laboratorio desde mi iniciación científica, siempre me ha incentivado y ha creído en mi carrera profesional. Gracias también por la estancia de movilidad en el extranjero en la Universidad de Santiago de Compostela y la estancia en el Centro de Investigación Príncipe Felipe, oportunidades éstas que contribuyeron mucho al desarrollo de mi proyecto y a mi crecimiento científico y personal.*

*Al Prof. Dr. Joaquín Dopazo, por la estancia en su laboratorio de bioinformática del Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia, España, una oportunidad que aportó mucho a mi tesis doctoral.*

*A los investigadores y amigos del Centro de Investigación Príncipe Felipe, por toda la amable hospitalidad con la que me recibieron, en especial a mis amigos matemáticos Francisco García y David Monteiro, que tanto me ayudaron con mi aprendizaje en el área de procesamiento de los datos de array.*

*A los investigadores del Centro Nacional de Genotipado (CeGen) España, Dra. María Brión e Inés Quintela, que, además de toda la ayuda técnica y científica para el desarrollo de la tesis, fueron siempre muy amables y amigas.*

*Al Prof. Dr. Anxo Vidal, de la Universidad de Santiago de Compostela, España, que puso a disposición sus ordenadores y el programa de bioinformática Partek.*

Ao Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia do Estado de São Paulo, em nome da sua diretora, Dra. Amanda G. M. R. Sousa, pelo acesso à instituição e pela confiança.

Aos médicos Dr. Marcelo Sampaio, Dra. Elizabete dos Santos, Dr. Marcos Paulo, Dr. Rui Ramos, Dr. Álvaro Avezum e Dr. Dikran Armaganijan, colaboradores do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia do Estado de São Paulo, pela dedicação na seleção de pacientes a serem por mim analisados e pelo cuidados a eles prestados.

Aos pacientes que contribuíram anonimamente para este estudo, sem os quais este trabalho não teria sido construído, meus sinceros agradecimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela bolsa concedida (Proc. 142857/2006-8) entre novembro de 2006 e maio de 2007.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa e reserva técnica concedidas (Proc. 2006/03513-5) entre julho de 2007 e maio de 2010, tornando possíveis a realização deste trabalho e a participação em importantes reuniões científicas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa concedida (Proc. BEX5180/06-6) entre janeiro de 2008 e janeiro de 2009, possibilitando a realização do estágio na Universidade de Santiago de Compostela, Espanha.

Aos meus pais, Helcy Lylian Nogueira Silbiger e Reynado Silbiger, à minha irmã, Lara Silbiger, e ao meu cunhado, Óscar Curros, por sempre estarem presentes em todos os momentos, me apoiando e incentivando, independente de onde eu esteja. Vocês foram muito mais que família, foram pequenos orientadores super profissionais!

A minha pequena sobrina, Sophie, pelos momentos de alegria e descontração no corre-corre do dia-a-dia.

Ao amor, meu amigo, meu companheiro de trabalho, meu pesquisador favorito, meu esposo, André Ducati Luchessi. Não há palavras que possam expressar minha gratidão a ele, que prestou o apoio fundamental para a execução deste projeto e é a peça essencial da minha vida.

# RESUMO

Silbiger VN. *Transcriptoma e proteoma em sangue periférico para pesquisa de novos marcadores de doenças cardiovasculares* [tese].

INTRODUÇÃO: A principal manifestação clínica da doença aterosclerótica é o infarto agudo do miocárdio, caracterizada como emergência médica, que necessita de diagnóstico correto, rápido, preciso e terapia eficaz. Os estudos de transcriptoma e proteoma possibilitam obter informações que nos permite compreender de forma mais abrangente a evolução fisiopatológica das doenças, sendo as cardiovasculares particularmente favorecidas por terem etiologia multifatorial e sem dúvida multigênica, portanto a utilização destas ferramentas num modelo de doença aguda pode auxiliar, de forma singular, na obtenção de novas informações, tais como novos marcadores precoces de injúria. OBJETIVO: Identificar novos biomarcadores de doenças cardiovasculares através da análise do perfil de expressão de RNAm de células do sangue periférico e proteínas plasmáticas de pacientes com SCA. CASUÍSTICA E MÉTODOS: É um estudo caso-controle de pacientes com SCA recrutados no Pronto-Socorro do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia. Foram recrutados 84 indivíduos com Síndrome Coronariana Aguda (SCA), 47 indivíduos sem doença cardiovascular (grupo controle), de ambos os sexos com idade entre 30 a 65 anos, atendidos no Instituto Dante Pazzanese do Estado de São Paulo - Brasil. A avaliação de expressão gênica global de 10 pacientes e 6 controles (pareados) durante as primeiras 48 h após o IAM foi realizada através dos microarranjos de DNA (sistema *Affymetrix*) e a análise de plasma por separação em sistema de microarranjos (*ProteinChip*®), seguida da identificação e quantificação por espectrometria de massa, em sistema *SELDI-TOF/MS*. Os resultados de microarranjo de DNA foram validados tecnicamente (a partir das mesmas amostras processadas por microarranjo de DNA) e, posteriormente validados biologicamente (a partir das outras amostras não processadas por microarranjo de DNA) através da PCR em tempo real. RESULTADOS: Foram observados ao total 599 genes diferentemente expressos nas primeiras 48 h após IAM. Trinta e três genes foram selecionados e submetidos à validação técnica, sendo que destes, 20 genes foram submetidos à validação biológica através da PCR em tempo real. Os validados foram: ALOX15, AREG, BCL2A1, BCL2L1, CA1, COX7B, ECDHC3,KCNE1, IL18R1, IRS2, MYL4, MMP9 e TREML4. Na análise, foram identificados 479 espectros de

proteínas plasmáticas diferentemente expressos em relação ao controle, destes destacam-se 16 possíveis proteínas correspondentes ao peso molecular entre 6386.5 Da e 17807,7 Da. CONCLUSÃO: Os resultados desses estudos sugerem novos marcadores para avaliação da síndrome coronariana aguda e provavelmente com valor prognóstico importante.

**Palavras-chave:** Síndrome coronária aguda. Biomarcadores, SELDI-TOF/M. Microarranjo de DNA. PCR em tempo real.

## ABSTRACT

Silbiger VN. Transcriptomic and proteomic of peripheral blood as approaches to biomarkers cardiovascular discovers.

BACKGROUND: The main clinical manifestation of atherosclerosis is the acute myocardial infarction (AMI), which is a medical emergency that requires prompt diagnosis and efficient therapy. The transcriptomic and proteomic approaches are both powerful tools for the study of AMI and may be instrumental to identify news biomarkers involved in the inflammatory and apoptotic process of cardiovascular diseases. OBJECTIVE: The aim of this study is to determine the gene expression of RNAm and protein in blood cells following an AMI to identify new biomarkers. PATIENTS AND METHODS: For this study eighty four patients with acute coronary syndrome (ACS) and forty seven control individuals were selected among patients of the Instituto Dante Pazzanese, São Paulo state, Brazil. A global gene expression profile by *GeneChip® Exon 1.0 ST Array* (*Affymetrix*) and proteomic plasma profile by *ProteinChip® Biomarker System* and *SELDI-TOF/MS* were evaluated for ten patients from the ACS group and six from the control group. These patients were followed up for the first 48 h following the AMI. The genes differently expressed by microarray analysis were submitted to technical (same casuistic) and biologic (new casuistic) validation by PCR real time. RESULTS: 599 genes were differentially expressed at the first 48 h after AMI. Thirty-three genes were selected and submitted to the technical validation, and 20 were subjected to biological validation by real time PCR afterwards. The validated ones were: ALOX15, Areg, BCL2A1, BCL2L1, CA1, COX7B, ECDHC3, KCNE1, IL18R1, IRS2, MYL4, MMP9 and TREML4. At proteomic analysis, 479 peaks of plasma proteins differentially expressed were identified. 16 peaks were considered as high potentially biomarkers. Their molecular weight was between 6386.5 Da and 17807.7 Da. CONCLUSION: Results from this study were able to identify changes in gene and protein profiles in the plasma, and suggest new markers for evaluation of acute coronary syndrome and probably with important prognostic value.

Descriptors: Acute myocardial infarction. Transcriptomic. Proteomic

# LISTA DE ILUSTRAÇÕES

página

**Figura 1.** Representação esquematizada do protocolo de colheita de sangue periférico para o grupo IAM com SST e controle.....46

**Figura 2.** Perfil eletroforético obtido através do *Bioanalyzer* de amostra de RNAtotal concentrado.....49

**Figura 3.** Fluxo de atividade para análise em microarranjo de DNA.....50

**Figura 4.** Perfil eletroforético obtido através do *Bioanalyzer*, após depleção de RNAr.....52

**Figura 5.** Perfis eletroforéticos obtidos através do *Bioanalyzer* da reação de fragmentação da ss-DNA.....55

**Figura 6.** Estrutura molecular da *Biotin Allonomide Triphosphate – DNA Labeling Reagent*.....55

**Figura 7.** Perfil eletroforético da ss-DNA fragmentada e marcada com biotina e tratada com avidina.....56

**Figura 8.** Imagens obtidas de um microarranjo *GeneChip® Exon 1.0 ST*, após leitura no *GeneChip® Scanner 3000 7G*.....58

**Figura 9.** Esquema do fluxo de processamento do plasma para análise proteômica através do SELDI-TOF/MS.....67

**Figura 10.** Distribuição em gráfico *BoxPlot* das intensidades das sondas em escala logarítmica (eixo Y) por amostras (eixo X).....76

**Figura 11.** Distribuição gráfica das intensidades das sondas em escala logarítmica (eixo Y) dos *Bac spikes Controls* por amostras (eixo X).....77

**Figura 12.** Distribuição gráfica das intensidades das sondas em escala logarítmica (eixo Y) dos *Poly spikes Controls* por amostras (eixo X). .....77

**Figura 13.** Análise de componente principal representado em tridimensão dos dados normalizados pelo método RMA.....78

**Figura 14.** Histograma das intensidades dos sinais antes (A) e após a aplicação da sequência de filtros: *Setting to 0 log2 intensity below, Filtering by IQR* e *Filtering on DABG p-value*.....79

**Figura 15.** Diagrama de Venn dos genes diferentemente expressos em 1º IAM com SST e os demais tempos de colheita.....82

**Figura 16.** Diagrama de *Venn* dos genes diferentemente expressos em 1º IAM

com SST e 2º IAM com SST.....85

**Figura 17.** Perfis de expressão dos genes ALOX15, AREG, BCL2A1, BCL2L1, CA1, COX7B, ECHDC3, IL18R1, IRS2, KCNE1, MMP9, MYL4 e TREML4 do GC e durante os tempos de segmento investigados nos subgrupos 1° IAM com SST e 2° IAM com SST.....95-99

**Figura 18.** Representação gráfica na forma de caixa dos valores de expressão dos genes ALOX15, AREG, BCL2A1, BCL2L1, CA1, COX7B, ECHDC3, IL18R1, IRS2, KCNE1, MMP9, MYL4 e TREML4 divididos em GC, Angina instável, IAM sem SST e IAM com SS.100-101

**Figura 19.** Agrupamento hierárquico com base na distância Euclidiana das proteínas diferentemente expressas em 1º IAM com SST $T_0$.....104

**Figura 20.** Agrupamento hierárquico com base na distância Euclidiana das proteínas diferentemente expressas em 2º IAM com SST $T_0$.....106

**Figura 21**. Diagrama de *Venn* entre os resultados de expressão proteíca de 1º IAM com SST e 2º IAM com SST.....108

**Figura 22.** Análise de componente principal em terceira dimensão das 16 possíveis proteínas em IAM com SST.....109

**Figura 23**. Perfil por *Fold Change* em relação ao tempo das proteínas diferentemente expressas comuns entre a primeira colheita para 1º IAM com SST e 2º IAM com SST.....110

**Figura 24.** Figura esquemática das relações diretas e indiretas dos genes diferentemente expressos em pacientes com SCA.....121

# ÍNDICE DE TABELAS

página

**Tabela 1.** Código identificador do conjunto de iniciadores e sondas fornecidos pelo serviço "*Assay by design*" (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).....65

**Tabela 2.** Características clínicas, variáveis antropométricas, perfil lipídico, bioquímicos e hematológicos dos grupos 1º IAM com SST, 2º IAM com SST e controle.....72

**Tabela 3**. Características clínicas, variáveis antropométricas, perfil lipídico, bioquímicos e hematológicos dos grupos 1º SCA, 2º SCA e controle para validação biológica.....73

**Tabela 4.** Concentrações dos marcadores cardíacos cTnI, CK e CK-MB e PC-R observados nos pacientes com IAM com SST com e sem infarto prévio.....74

**Tabela 5.** Número absoluto da distribuição de amostras processadas e selecionadas, após avaliação dos controles de qualidade para os grupos 1º IAM com SST, 2º IAM com SST e controle.....79

**Tabela 6.** Genes diferencialmente expressos no grupo 1º IAM com SST $T_0$.....81

**Tabela 7.** Representação dos 29 genes diferencialmente expressos em 1º IAM com SST $T_0$ em relação às demais 48 h avaliadas após IAM.....83

**Tabela 8**. Genes diferencialmente expressos em relação ao grupo 2º IAM com SST $T_0$.....84

**Tabela 9.** Representação dos 8 genes diferencialmente expressos em 2º IAM com SST $T_0$ em relação às demais 48 h avaliadas após IAM.....85

**Tabela 10.** Lista dos 25 genes diferencialmente expressos comuns entre os pacientes dos grupos 1º IAM com SST e 2º IAM com SST.....86

**Tabela 11**. Representação dos 25 genes diferencialmente expressos em 1º IAM com SST e 2º IAM com SST em relação às demais 48 h avaliadas após IAM.....87

**Tabela 12**. Seleção dos genes de referência para validação técnica pela PCR em tempo, ordenados pela intensidade de expressão logarítimica da população estudada.....89

**Tabela 13.** Correlação de *Spearman* para os resultados de expressão gênica obtida pela técnica de microarranjo de DNA e PCR em tempo real.....90

**Tabela 14.** Resultados da expressão gênica diferencial, pela PCR em tempo real, dos genes selecionados pela validação biológica a partir dos grupos 1º SCA, 2º SCA e controle.....92

**Tabela 15.** Espectros de proteínas diferentemente expressas comuns entre a primeira colheita para 1º IAM com SST e 2º IAM com SST.....109

**ANEXO D**

**Tabela 1.** Genes diferencialmente expressos entre 1º IAM T2 versus GC.....158

**Tabela 2.** Genes diferencialmente expressos entre 1º IAM T12 versus GC.....174

**Tabela 3.** Genes diferencialmente expressos entre 1º IAM T24 versus GC.....179

**Tabela 4.** Genes diferencialmente expressos entre 1º IAM T36 versus GC.....179

**Tabela 5.** Genes diferencialmente expressos entre 1º IAM T48 versus GC.....181

**Tabela 6.** Genes diferencialmente expressos entre 2º IAM versus GC.....183

**Tabela7.** Genes validados listados de acordo com Localização cromossômica, celular, tipo e funções e doenças associadas.....187

**ANEXO E**

**Tabela 1.** Possíveis proteínas diferencialmente expressos entre 1º IAM $T_0$ vs GC.....193

**Tabela 2.** Possíveis proteínas diferencialmente expressos entre 1º IAM $T_2$ vs GC.....194

**Tabela 3.** Possíveis proteínas diferencialmente expressos entre 1º IAM $T_{12}$ vs GC....196

**Tabela 4.** Possíveis proteínas diferencialmente expressos entre 1º IAM $T_{24}$ vs GC....202

**Tabela 5.** Possíveis proteínas diferencialmente expressos entre 1º IAM $T_{36}$ vs GC....204

**Tabela 6.** Possíveis proteínas diferencialmente expressos entre 1º IAM $T_{48}$ vs GC....205

**Tabela 7.** Possíveis proteínas diferencialmente expressos entre 2º IAM versus GC....208

# LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|---|---|
| % | Porcentagem |
| < | Menor |
| = | Igual |
| > | Maior |
| ± | Mais ou menos |
| Δ | Delta |
| ∩ | Intersecção |
| ≥ | Maior ou igual |
| µg | Micrograma |
| 13-HODE | 13 - ácido hidroxioctadecadienoico |
| 1º IAM | Primeiro infarto agudo do miocárdio |
| 2º IAM | Segundo infarto agudo do miocárdio |
| 3’ | Três linha |
| 5’ | Cinco linha |
| ABCA1 | *ATP-binding cassette transporter A1* |
| ACC | Número de acesso do gene no banco de dados públicos do NCBI |
| HETE | Ácido hidroxieicosatetranoico |
| ADORA3 | *Adenosine A3 receptor* |
| AffyID | Número identificador da Affymetrix |
| ALOX15 | Arachidonate 15-lipoxygenase |
| ALT | Alanina aminotransferase |
| APE1 | AP-endonuclease |
| AREG | *Amphiregulin* |
| AST | Aspastato aminotransferase |
| Bcl-2 | *B-cell CLL/lymphoma 2* |
| BCL2A1 | *BCL2-related protein A1* |
| BCL2L1 | *BCL2-like 1* |
| Bcl-xl | *BCL2-like 1* |
| Bfl.1(A1) | *BCL2-related protein A1* |
| pb | Pares de base |
| CA1 | *carbonic anhydrase I* |
| cDNA | Ácido desoxiribonucléico complementar |

| | |
|---|---|
| CeGen | Centro Nacional de Genotipado |
| CK | Creatinoquinase |
| CK-MB | Creatinoquinase fração MB |
| COX7B | Cytochrome c oxidase subunit VIIb |
| CREM | cAMP responsive element modulator |
| cRNA | Ácido ribonucléico complementar |
| CSF1 | colony stimulating factor 1 |
| $C_T$ | Ciclo da linha de conte |
| cTnI | Troponina I |
| CytoBand | Banda citogenética |
| Da | Dalton |
| DABG | D*etection above background* |
| DC | Doença Cardiovascular |
| DHA | Ácido docosa-hexaenóico |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| dNTPs | Desoxirribonucleotídeo fosfato |
| dTTP | desoxiTimidina Trifosfatada |
| dUTP | desoxiUracila Trifosfatada |
| ECG | Eletrocardiograma |
| *ECHDC3* | *enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 3* |
| *EDTA* | ácido etilenodiamino tetra-acético |
| FAM | Fluoróforo 6-carboxifluoresceína |
| FC | *Fold change* |
| FDR | *False discover rate* |
| FOLR3 | folate receptor 3 (gamma) |
| g | Gramos |
| *g* | Gravidade |
| GAPDHS | G*lyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* |
| GC | Grupo controle |
| GPX3 | glutathione peroxidase 3 (plasma) |
| GSTM1 | glutathione S-transferase mu 1 |
| H | Horas |
| HCl | Ácido clorídrico |
| HDL | Lipoproteína de alta densidade |

| | |
|---|---|
| HUGO | *Human Genome Organization* |
| *HUPO PPP* | *Human Genome Organization – plasm protein project* |
| IAM | Infarto agudo do miocárdio |
| IAM com SST | Infarto agudo do miocárdio com elevação do segmento ST |
| IAM sem SST | Infarto agudo do miocárdio sem elevação do segmento ST |
| IDPC | Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia |
| IECA | Inibidor da enzima conversora de angiotensina |
| IL18R1 | *Interleukin 18 receptor 1* |
| IL1R1 | *Interleukin 1 receptor, type I* |
| IL1RL1 | *Interleukin 1 receptor-like 1* |
| IL-1β | *Interleukin 1 beta* |
| IL5RA | *Interleukin 5 receptor, alpha* |
| IL-6 | I*nterleukin 6* |
| IL-8 | I*nterleukin 8* |
| ILK | I*integrin liked kinas*e |
| ILR18 | *Interleukin 18 receptor* |
| IMC | Índice de massa corporal |
| IPA | *Ingenuity path analisys* |
| IRS2 | *Insulin receptor substrate 2* |
| iterPLIER | *Iterative Probe Logarithmic Intensity Error* |
| KCNE1 | *Voltage-gated channel, Isk-related family, member 1* |
| $Kg/m^2$ | Quilograma por metro quadrado |
| LDL | Lipoproteína de baixa densidade |
| LIMMA | Modelo linear para dados de microarranjos de DNA |
| log2 | Logaritmo na base 2 |
| LOX | *Lysyl oxidase* |
| LOX12 | *Lipoxygenase* |
| LPS | Lipopolissacarídeos |
| M | Molar |
| M | Metros |
| MALDI-TOF/MS | Matrix-assisted laser desorption/ionization acoplado ao espectrometro de massa |
| MCP-1 | Chemokine (C-C motif) ligand 2 |
| mg/L | Miligramas por litro |

| | |
|---|---|
| mg/dL | Miligramas por decilitro |
| mg/ml | Miligramas por mililitro |
| $MgCl_2$ | Cloreto de magnésio |
| Min | Minuto |
| mL | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| mM | Milimolar |
| mM/L | Milimolar por litro |
| mmHg | Milímetro de mercúrio |
| mmol/L | Milimol por litro |
| MMP9 | *Matrix metallopeptidase 9* |
| MYL4 | *Myosin, light polypeptide 4* |
| MYO5C | *Myosin VC* |
| NCBI | *National Center of Biotechnology Information* |
| n° | Número |
| ng | Nanogramas |
| nm | Nanometros |
| º | Grau |
| ºC | Graus Celsius |
| p | p-valor |
| PBMC | Células mononucleares do sangue periférico |
| PBS | Tampão salino fosfato |
| PCA-3D | Análise de componentes principais em três dimensões |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| PCRu | Proteína C reativa ultra sensível |
| PER1 | *Period homolog 1 (Drosophila)* |
| pH | Logarítimo negativo na base 10 da concentração de hidrogênio |
| PM | Massa molecular |
| POLE2 | *Polymerase (DNA directed), epsilon 2 (p59 subunit)* |
| *r* | coeficiente de regressão |
| RIN | Número de integridade de RNA |
| RMA | *Robust Multi-Array Analysis* |
| RNA | Ácido ribonucléico |
| RNAm | Ácido ribonucléico mensageiro |

| | |
|---|---|
| RNAr | Ácido ribonucléico transportador |
| rpm | Rotação por minuto |
| SAMSN1 | *SAM domain, SH3 domain and nuclear localization signals, 1* |
| SELDI-TOF/MS | *Surface-enhanced laser desorption/ionization* acoplado ao espectrometro de massa |
| SLC29A1 | *Solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 1* |
| SLITRK4 | *SLIT and NTRK-like family, member 4* |
| SMPD3 | *Sphingomyelin phosphodiesterase 3, neutral membrane (neutral sphingomyelinase II)* |
| *SRD5A3* | *Steroid 5 alpha-reductase 3* |
| ss-DNA | Ácido desorribonucleico de fita única |
| sTWEAK | *Soluble tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis* |
| $T_0$ | Tempo de colheita 0 |
| T12 | Tempo de colheita 2 |
| T2 | Tempo de colheita 3 |
| T24 | Tempo de colheita 4 |
| T36 | Tempo de colheita 5 |
| T4 livre | Tiroxina livre |
| T48 | Tempo de colheita 6 |
| TBE | Tampão borato EDTA |
| THBS1 | *Thrombospondin 1* |
| TLR4 | *Toll-like receptor 4* |
| TNFα | *Tumor necrosis factor* |
| TREML4 | *Triggering receptor expressed on myeloid cells-like 4* |
| TSH | Hormônio estimulante da tireóide |
| U/L | Unidade por litro |
| UDG | Uracil DNA glicosilase |
| UNG | Uracil N- glicosilase |
| UV | Ultra violeta |
| V | Volts |
| VEGF | *Vascular endothelial growth factor A* |
| VLDL | Lipoproteína de muito baixa densidade |
| µl | Microlitros |
| $\chi^2$ | Teste estatístico de Chi-quadrado |

SUMÁRIO

página

1 **INTRODUÇÃO** .....31
2 **OBJETIVO**.....40
2.1 Objetivos específicos.....40
3 **MATERIAL E MÉTODOS**..... 41
**3.1** CASUÍSTICA.....41
3.1.1 Características do grupo IAM com SST.....41
3.1.2 Características do grupo controle.....42
3.1.3 Características do grupo SCA para validação biológica.....42
3.1.4 Características do grupo controle para validação biológica.....43
3.1.5 Critérios de exclusão.....43
3.1.6 Variáveis analisadas.....43
**3.2** OBTENÇÃO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS .....45
**3.3** DETERMINAÇÕES LABORATORIAIS .....46
**3.4** ANÁLISE DESCRITIVA.....46
**3.5** ANÁLISE INFERENCIAL.....47
**3.6** ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA .....47
3.6.1 Extração do RNA total das células presentes no sangue periférico .....47
3.6.2 Processamento das amostras para hibridização em microarranjo e DNA.....49
*3.6.2.1 Adição de controles exógenos e depleção de RNAr*.....51
*3.6.2.2 Primeira etapa, síntese do cDNA*.....52
*3.6.2.3 Síntese e quantificação do cRNA*.....53
*3.6.2.4 Segunda etapa, síntese da ss-DNA*.....53
*3.6.2.5 Hidrólise do cRNA, purificação e quantificação da ss-DNA*.....54
*3.6.2.6 Fragmentação da ss-DNA*.....54
*3.6.2.7 Marcação da ss-DNA fragmentadas* .....55
*3.6.2.8 Hibridização*.....56
*3.6.2.9 Lavagem e coloração* .....57
*3.6.2.10 Leitura - GeneChip® Scanner 3000 7G*.....57
3.6.3 Processamento dos dados de microarranjo de DNA.....58
*3.6.3.1 Normalização e sumarização dos dados* .....59
*3.6.3.2 Controle de Qualidade*.....59
*3.6.3.3 Filtros***.**.....59

*3.6.3.4 Análise estatística dos dados de microarranjo de DNA*.....59
3.6.4 Validação Técnica pela PCR em tempo real .....60
*3.6.4.1 Seleção de genes-candidatos para validação técnica*.....60
*3.6.4.2 Síntese de cDNA para validação técnica* .....61
*3.6.4.3 Pré-amplificação para validação técnica*.....61
*3.6.4.4 PCR em tempo real e análise estatística para validação técnica*.....62
3.6.5 Validação Biológica pela PCR em tempo real.....63
**3.7** ANÁLISE PROTEÔMICA .....66
3.7.1 Obtenção do plasma.....66
3.7.2 Purificação do plasma .....66
3.7.3. SELDI-TOF/MS processamento e análise estatística.....67
**4 RESULTADOS**.....69
4.1 CASUÍSTICA .....69
4.1.1 Grupo IAM com SST.....69
4.1.2 Grupo controle.....69
4.1.3 Grupo SCA para validação biológica.....69
4.1.4 Grupo controle para validação biológica.....70
4.1.5 Dados demográficos.....70
4.1.6 Marcadores cardíacos e PCRu .....73
4.2 ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA .....75
4.2.1 Preparação dos dados de expressão gênica diferencial por microarranjo de DNA.....75
4.2.2 Expressão gênica diferencial por microarranjo de DNA.....80
*4.2.2.1 Genes diferentemente expressos em 1º IAM com SST*.....80
*4.2.2.2 Genes diferentemente expressos em 2º IAM com SST*.....83
*4.2.2.3 Intersecção entre os resultados de expressão gênica de 1º IAM com SST e 2º IAM com SST*.....85
4.2.3 Validação técnica pela PCR em tempo real.....88
*4.2.3.1 Seleção de genes-candidatos para validação técnica*.....88
*4.2.3.2 Resultados da validação técnica pela PCR em tempo real*.....89
4.2.4 Validação biológica pela PCR em tempo real.....91
4.3 ANÁLISE PROTEÔMICA .....102
4.3.1 Proteínas diferentemente expressas em 1º IAM com SST .....102
4.3.2 Proteínas diferentemente expressas em 2º IAM com SST .....105

4.3.3 Intersecção entre os resultados protéicos de 1º IAM com SST e 2º IAM com SST.....107
**5 DISCUSSÃO**.....111
**6 CONCLUSÕES** .....127
REFERÊNCIAS.....128
APÊNDICES.....140
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....141
APÊNDICE B – Ficha para colheita de dados individuais do paciente.....143
ANEXOS.....144
ANEXO A – Cópia do aval da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa.....145
ANEXO B– Ficha do Aluno .....147
ANEXO C – Currículo Lattes .....149
ANEXO D – Tabelas 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7.....158
ANEXO E – Tabelas 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7.....193
ANEXO F - Resumo 1.....211
ANEXO G – Resumo 2.....212
ANEXO H – Resumo 3.....213
ANEXO I – Resumo 4.....214
ANEXO J – Resumo 5.....215

# 1 INTRODUÇÃO

As doenças cardiov31asculares constituem atualmente a principal causa de morte e incapacitação humana no mundo, corresponde a 12,2% do total de obtidos (WHO, 2008). Em 2008, somente no Estado de São Paulo, a mortalidade por doenças do aparelho circulatório foi de 76.469 indivíduos, sendo 24,5% (18.736) decorrentes do infarto agudo do miocárdio (IAM) (DATASUS, 2010).

O IAM reflete a morte celular secundária à isquemia decorrente do desbalanço entre a oferta e a demanda de oxigênio, geralmente secundária à redução do fluxo sanguíneo coronário de um segmento do miocárdio, em consequência a ruptura de uma placa de ateroma, rica em gordura e atividade inflamatória (Charakida et al. 2006; Tousoulis et al. 2006). Essa evolução fisiopatológica é caracterizada como emergência médica, que necessita de diagnóstico correto, tratamento rápido e preciso. A maioria das mortes por IAM ocorre nas primeiras horas de manifestação da doença, sendo 40%-65% dos casos na primeira hora e, aproximadamente, 80% nas primeiras 24 horas (Piegas et al. 2009).

Os fatores de risco para a doença arterial coronariana estão bem estabelecidos, como idade avançada, sexo masculino, predisposição familiar, dislipidemia, Diabetes *Mellitus*, hipertensão, síndrome metabólica, estresse, tabagismo, vida sedentária, entre outros (Opie et al. 2006).

As evidências clínicas e experimentais sugerem que a inflamação está presente, desde as fases iniciais da aterosclerose, contribuindo para a formação das placas de ateroma, para sua evolução e complicações, com a Síndrome Coronária Aguda (SCA) (Sampaio et al. 2007). A SCA que inclui angina instável e IAM (com ou sem supradesnivelamento do ST [SST] constitui uma das maiores preocupações da cardiologia clínica.

O modelo vigente que melhor explica a aterosclerose está baseado na hipótese da "resposta a injúria". A disfunção endotelial é a etapa inicial que facilita a entrada de lípides e células inflamatórias (monócitos e linfócitos T) na parede arterial. Posteriormente, a secreção de citocinas e fatores de crescimento induzem a migração e proliferação das células musculares lisas, na íntima, que participam decisivamente na formação da placa aterosclerótica. Proteínas do sistema de coagulação e fibrinólise também estão envolvidas na inflamação e trombose, que podem ocasionar na ruptura da placa e oclusão do vaso (Mehta et al. 1998; Sampaio et al. 2007).

A definição clínica de IAM passou por importantes modificações desde a recomendação da Organização Mundial da Saúde (Anonymous 1979; Gillum et al. 1984). Em 2007, uma revisão universal dessa definição foi sugerida, na qual se estabelece o diagnóstico de IAM quando houver aumento característico e diminuição gradual da troponina ou aumento e diminuição mais rápidos de creatinoquinase CK fração MB (CK-MB), com pelo menos um dos seguintes critérios: a) sintomas isquêmicos; b) alterações eletrocardiográficas indicativas de isquemia (elevação, depressão do segmento ST ou BCRE novo); c) desenvolvimento de ondas Q patológicas no eletrocardiograma; ou d) evidência, em exames de imagem, de perda de viabilidade miocárdica ou contratilidade segmentar anormal (Thygesen et al. 2007).

No caso de pacientes admitidos com dor precordial prolongada e apresentando supradesnível do segmento ST ao eletrocardiograma, não são essenciais a dosagem dos marcadores bioquímicos de lesão miocárdica para o seu diagnóstico de IAM com SST. Estudo epidemiológico realizado no Pronto-Socorro do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia relata um total de 36.000 pacientes atendidos em 2003 (média de 3.050 ao mês), com taxa anual de internação hospitalar de 6,2% (2.287 pacientes), desta taxa, 860 (37,6%) pacientes tinham o diagnóstico de SCA, sendo o diagnóstico da alta hospitalar de 78 pacientes com IAM com SST (somente 9%) e 754 com SCA sem SST (87,6%) (dos Santos et al. 2006).

Cerca de 15%-25% dos pacientes não apresentam dor torácica como sintoma predominante sugestivo de isquemia miocárdica aguda (Piegas et al. 2009). Em pacientes com sintomas sugestivos, a elevação do segmento ST tem especificidade de 91% e sensibilidade de 46% para diagnóstico de IAM (Piegas et al. 2009). Contudo, o eletrocardiograma pode ser inespecífico nas primeiras horas, sendo importante avaliar traçados seriados em curto período de tempo (5-10 min), se o paciente permanecer sintomático.

A necrose miocárdica é acompanhada pela liberação de macromoléculas intracelulares e proteínas estruturais no interstício cardíaco, passíveis de detecção na corrente sanguínea periférica, após o infarto. Os mais utilizados, na ordem com que se elevam na circulação são: mioglobina (1 a 4 h), troponinas (2 às 12h) e isoforma MB da creatinoquinase (CK-MB) (3 às 12h) (Kou & Nassisi 2006).

A mioglobina é o primeiro parâmetro a se elevar na circulação, contudo, a confirmação diagnóstica de IAM, com base apenas nesse marcador, só é possível após avaliações em intervalos de tempos distintos após o infarto (Maisel et al. 2006).

Recomenda-se utilizá-la juntamente com outros marcadores cardíacos como a CK-MB e as troponinas (Maisel et al. 2006).

As troponinas estão presentes nos filamentos finos dos músculos estriados, formando um complexo com três polipeptídeos: a troponina C, a troponina I (cTnI) e a troponina T, envolvidas com os mecanismos que regulam o cálcio celular (contração muscular), e são utilizadas como indicadores de necrose celular no IAM (Dolci & Panteghini, 2006). Elas apresentam baixa sensibilidade nas primeiras 10 h (35% dos casos), e aumentam para 89% ao atingir o pico máximo (10 a 28 h) (Achar et al. 2005). Suas concentrações plasmáticas permanecem alteradas na circulação por até duas semanas. Este é um parâmetro importante para o diagnóstico de indivíduos que sofreram pequenas lesões cardíacas e que procuram auxílio médico tardiamente, como é o caso de pacientes diabéticos (Gondim et al. 2003). Entretanto, esses marcadores não são úteis para evidenciar episódios de re-infarto (Rajappa & Sharma 2005).

O CK-MB, presente nos músculos esqueléticos, está envolvido na fosforização reversível da creatina (Rajappa & Sharma 2005). Apresenta baixa sensibilidade nas primeiras 6 h (35% dos casos) e permanece inalterado quando ocorrem pequenas lesões (Achar et al. 2005). A atividade do CK-MB permanece elevada por até 36 h e, diferente das troponinas, permite detectar os casos de re-infarto (Rajappa & Sharma 2005).

Cabe ressaltar que os marcadores de IAM se alteram também em indivíduos com atividade física intensa, com traumas musculares, em pós-operatórios cardíacos e não cardíacos, e em outras condições patológicas (Panteghini 2004; Rajappa &Sharma 2005). As troponinas também se elevam em indivíduos com insuficiência renal, embolia pulmonar, hipotireoidismo, hipertensão e outras doenças (Maisel et al. 2006; Panteghini 2004).

Os peptídeos natriuréticos tipo B e N-terminal-pró-peptídeo natriurético tipo B são proteínas cardíacas que regulam a vasodilatação ventricular. Os aumentos destes peptídeos no plasma têm sido indicados como fatores de risco de mortalidade em pacientes com IAM (Jernberg et al. 2004). Pacientes com angina instável, sem evidência de necrose e com peptídeos natriuréticos tipo B plasmático aumentados, têm maior risco de evoluir para óbito (de Lemos et al. 2001). Entretanto, esses marcadores de prognóstico de IAM, também podem alterar-se em indivíduos com insuficiência renal, doenças tireoideanas, hipertensão, hipercortisolismo e outras condições patológicas que comumente estão envolvidas com IAM (Panteghini 2004).

A proteína C-reativa (PCRu) é um marcador de resposta inflamatória e tem sido indicado como marcador de diagnóstico de IAM (Ridker et al. 2000). Valores elevados de PCRu no plasma foram associados com o risco de ocorrência de episódios agudos de ruptura da placa aterosclerótica e IAM (Jefferson & Topol 2005). Entretanto, a PCRu tem baixa especificidade no diagnóstico, pois está alterada em inúmeros outros tipos de processos inflamatórios (Ridker et al. 2000).

Sendo assim, devido à baixa sensibilidade e especificidade metodológica dos marcadores supracitados, disponíveis até o momento, os investimentos em buscas de novos marcadores, que possam identificar de forma mais específicas e sensíveis o diagnóstico precoce e prognóstico de IAM, devem ser realizados.

As pesquisas genéticas estão direcionadas ao estudo de alterações no ácido desoxirribonucléico (DNA) que, isoladamente ou em conjunto, podem levam às modificações fenotípicas associadas à progressão ou instabilidade da aterosclerose (Wang 2005). Em nosso laboratório realizou-se uma série de estudos, nos quais foram demonstradas associações entre alterações genéticas e hipercolesterolêmicas, hipertensão, doença arterial coronariana e IAM (Forti et al. 2003).

Nestes estudos, observaram-se as relações entre mutações e polimorfismos em genes envolvidos no metabolismo lipídico e outras proteínas, com aumento de risco para DC e alterações de valores de proteínas, lipídios, apolipoproteinas, e lipoproteínas, tais como: apolipoproteína AI (Sorkin et al. 2005); apolipoproteína B (Cavalli et al. 2000; Machado et al. 2001); apolipoproteína E e receptor LDL (Salazar et al. 2002); receptor LDL (Salazar et al. 1999); PPARgama (Tavares et al. 2005); enzima conversora de angiotensina (Sakuma et al. 2004) e óxido nítrico sintase (eNOS) (Hirata et al. 2002). Estudaram-se também as alterações em genes relacionados com a resposta terapêutica às vastatinas (Guzman et al. 2000; Rodrigues et al. 2005; Sorkin et al. 2005). Revisando a literatura, verificou-se que a natureza e o número de genes envolvidos no desenvolvimento de doença arterial coronariana, não se encontram totalmente elucidados. De acordo com o banco de dados *Cardiovascular Gene Ontology*, atualmente já foram descritos 4.179 genes implicados no processo aterosclerótico, sendo que 245 genes com maior número de citações em trabalhos científicos, envolvidos com função endotelial, coagulação, inflamação e metabolismo lipídico, glicídico e outros processos.

Embora os processos fisiopatológicos de algumas doenças, que envolvem risco cardiovascular, indiquem a participação de poucos genes, como a hipercolesterolêmica

familial, a maioria das doenças cardiovasculares se manifesta pela interação de múltiplos genes e fatores ambientais que resultam em expressões gênicas (transcritos e proteínas) altamente diversas (Nabel 2003).

Além disso, em condições de estresse, podem ocorrer diferentes padrões de expressão, resultantes de distintas combinações de genes, a ativação e desativação de eventos envolvidos na transcrição e tradução, como processamento diferencial de ácido ribonucléico mensageiro (RNAm; *splicing* alternativo), modificações pós-transducionais e outros (Koizumi 2004). Stanton e colaboradores descreveram que mais de 200 transcritos de um total de 4.000 analisados, foram diferencialmente expressos, em experimentos com tecido muscular de ratos pós-infarto versos controles. A expressão foi monitorada durante 2 a 16 semanas, período em que se observou aumento gradual da expressão de genes ligados a remodelagem celular e metabolismo energético (Stanton et al. 2000).

A expressão diferencial de transcritos, também foi observada em tecido ventricular esquerdo de pacientes com cardiomiopatia idiopática dilatada (Friddle et al. 2000) e hipertrófica, pós-transplante cardíaco (Hwang et al. 2002).

No estudo proteômico com tecido cardíaco pós-infarto induzido em ratos, também foram observadas proteínas distintas em relação ao grupo controle e com diferentes funções, tais como, regulação de processos oxidativos, estrutura do citoesqueleto e sarcoma, metabolismo energético e resposta ao estresse (White et al. 2005). Sendo assim, o IAM é composto por uma alta variabilidade de transcritos e proteínas.

Entretanto, para a avaliação da dinâmica da expressão total do genoma em resposta a mudanças fisiológicas, ambientais, e na evolução da doença cardiovascular, há necessidade de utilizar sistemas de amplo espectros e de alto desempenho (Domon & Aebersold 2006a; Koizumi 2004).

A plataforma de análise de expressão de RNAm, em larga escala por microarranjos de DNA, fornece a “impressão digital” de genes previamente conhecidos e aqueles que estão envolvidos na progressão de doença arterial coronariana (Cook & Rosenzweig 2002; Napoli et al. 2003). Esta tecnologia está fundamentada no princípio da marcação de ácidos nucléicos (DNA, RNAm ou cDNA) e posterior hibridização de alta sensibilidade e especificidade com oligonucleotídeos fixados em superfície sólida (sondas de captura) (Hoheisel 2006). Isso possibilita a análise diferencial de transcritos entre diferentes células (normais e alteradas) e o acompanhamento de mudanças na expressão gênica durante a progressão de doenças, como a doença arterial coronariana.

As diferenças de expressão desses genes são confirmadas pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real que tem sido utilizada para validação de ensaios de microarranjos de DNA. A análise dos resultados obtidos possibilita a identificação de genes potencialmente úteis no diagnóstico precoce, no prognóstico e no monitoramento terapêutico após SCA.

A pesquisa  vem sendo aplicada em estudos de diversas doenças, como os carcinomas de mama, ovário, próstata, assim como, em linfomas e mielomas (Chatterjee & Zetter 2005); doenças pulmonares, como fibrose pulmonar idiopática, edema pulmonar, asma e outras (Tzouvelekis et al. 2004); Síndrome de Alzheimer (Marcotte et al. 2003); e aterosclerose (Tuomisto & Yla-Herttuala 2005).

A análise, por sua vez, tem vários formatos, sendo a mais versátil, a que permite uma ampla avaliação de proteínas, e a pré-classificação cromatográfica em superfícies sólidas específico-seletivas, seguida de análise por SELDI-TOF/MS [*Surface Enhanced Laser Desorption Ionization (SELDI) Time-of-Flight (TOF) Mass Spectrometry*] (Domon and Aebersold 2006b). Esta metodologia possibilita detectar, espectros de proteínas e peptídeos de baixo peso molecular e em baixas concentrações, que não seriam detectadas através de eletroforese bidimensional, seguida de análise por MALDI-TOF/MS [*Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) Time-of-Flight (TOF) Mass Spectrometry*] (Domon and Aebersold 2006b; Mateos-Caceres et al. 2004). A plataforma de SELDI-TOF/MS permite comparar os perfis protéicos em diversas condições fisiopatológicas, através da indentificação de suas massas moleculares, possibilitando, então o seu isolamento e sequenciamento, a fim de caracterizar novos biomarcadores associados a doenças (Domon and Aebersold 2006b).

Em revisão realizada por Hortion (2006) sobre estudos que utilizaram amostras de soro (18) e plasma humanos (6), demosntrou que mais de 50 peptídeos e proteínas são biomarcadores potenciais em diferentes doenças como alcoolismo (Nomura et al. 2004), câncer de ovário (Kozak et al. 2005; Woong-Shick et al. 2005;Zhang et al. 2004), câncer renal (Tolson et al. 2004), câncer de próstata (Le et al. 2005; Malik et al. 2005), câncer de pâncreas (Koomen et al. 2005) e IAM (Marshall et al. 2003).

Os estudos transcriptômicos e proteômicos, a partir dos tecidos periféricos sanguíneos, especificamente as células mononucleares e o plasma respectivamente, demonstram ser potenciais ferramentas para se detectar marcadores de processo inflamatório vascular e outros indicadores de lesão tecidual, que refletem o dano celular em qualquer parte do organismo (Tang et al. 2003). O sangue periférico fornece

informações sobre o estado do paciente em resposta a estímulos de citocinas e outros fatores solúveis liberados pelo endotélio, fígado, rim, coração, e outros tecidos, durante o processo inflamatório que precede o IAM (Hortin 2006).

A análise de transcriptoma de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) é extremamente promissora na determinação de doenças e no acompanhamento terapêutico, como vem sendo demonstrada em estudos com: lúpus eritematoso sistêmico, leucemia mielóide crônica, carcinoma renal e resposta a algumas drogas (Debey et al. 2006). Também se verificou que padrões de expressão gênica de PBMC, podem ser utilizados para distinguir doenças cerebrais em modelos animais (Tang et al. 2003).

Além disso, sabe-se que células endoteliais progenitoras, exercem papeis importantes na homeostasia vascular (Hill et al. 2003), na neovascularização, na angiogênese (Rabelink et al. 2004) e na regeneração miocárdica, após IAM (Yoon et al. 2005), alterando possivelmente o perfil de transcritos no sangue periférico total. A progressão de lesões e disfunções endoteliais em doença cardiovascular está relacionada com a depleção dessas células e PBMC, que por sua vez, estão relacionadas com o estresse oxidativo, com a atividade do óxido nítrico e outros processos fisiológicos (Dandona et al. 2005).

A análise de PBMC na SCA pode fornecer informações através das alterações de expressão gênica em resposta à lesão do endotélio vascular, desde que estejam envolvidas na fase inicial do processo de reparo tecidual, e com provável diferenciação das células endoteliais progenitoras que podem ser recrutadas neste mecanismo (Wojakowski et al. 2004).

Já a alteração, fornece perfis de proteínas liberadas durante a lesão miocárdica ou que sejam expressas em resposta ao evento fisiopatológico. Em estudo piloto realizado pela *Human Proteome Organization Plasma Proteome Project (HUPO PPP)*, foram identificados cerca de 345 proteínas plasmáticas, possivelmente envolvidas com processos cardiovasculares (Berhane et al. 2005).

O sistema inflamatório consiste de um conjunto de marcadores protéicos, potenciais para o risco de doença arterial coronariana, como a lipoproteína associada à fosfolipase A2 (ativador plaquetário da acetilhidrolase), a interleucina-6 (IL-6), a proteína A plasmática associada à gravidez, os imunomoduladores derivados de plaquetas, as células endoteliais e linfócitos, promotores de síntese de adesão molecular ou quimiotaxia e os ativadores das metaloproteinases (Freedman 2003).

Além da produção de proteínas inflamatórias, outros mecanismos estão envolvidos na SCA, como: a mudança na regulação do ciclo celular, na fosforilação de proteínas, na sinalização célula-célula, no transporte de íon e de elétrons; inibição ou indução da apoptose, entre outros (Reeve et al. 2005).

Em estudo realizado em 2003, os autores relatam que os perfis protéicos de 6 pacientes infartados, obtidos em um único momento durante a internação, foram significativamente distintos aos apresentados por indivíduos saudáveis (Marshall et al. 2003). Os autores sugerem que os peptídeos do sistema complemento C3 e fribrinopeptídeos A, são potenciais indicadores de IAM. Outro trabalho realizado com 11 pacientes infartados e 8 com angina estável, também obtido em um único momento durante a internação, sugerem que as isoformas da cadeia gama do fibrinogênio, isoformas de alfa-antitripsina, isoformas de apoliproteínas A-I e a cadeia pesada da γ– imunoglobulina, foram diferentemente expressas, quando comparadas com o grupo controle (Mateos-Caceres et al. 2004).

No entanto, estes estudos não mostraram o seguimento pós-conduta clínica e terapêutica. O monitoramento do curso do processo através do estudo transcriptômico e proteômico é de grande valia (Wang 2005), pois permite averiguar a cinética (meia-vida) e a potencialidade dos possíveis biomarcadores identificados; compreender melhor a resposta celular desencadeada pela SCA; avaliar a eficácia da intervenção coronariana percutânea e a resposta à terapia farmacológica dos pacientes.

A revisão realizada por Marcotte e colaboradores demonstrou que a correlação entre as análises de expressão de RNAm, de genes relacionados com a neuroinflamação e apoptose no tecido hipotalâmico e de outras regiões cerebrais, com as proteínas do líquido cerebrospinal, contribui de forma marcante para a compreensão do sistema neural, em condições normais e na presença da doença de Alzheimer (Marcotte et al. 2003). Relação similar foi observada em estudos de biomarcadores oncogênicos com diferentes tecidos neoplásicos (próstata, ovário e mama) e fluídos corpóreos (plasma, soro e urina) (Chatterjeed & Zetter 2005).

Além da busca de biomarcadores no diagnóstico e prognóstico mais precoce da SCA através dos estudos transcriptômicos e proteômicos, acredita-se que os resultados contribuam para o conhecimento dos mecanismos envolvidos na lesão e reparo tecidual.

Em trabalho de Tomic e colaboradores (2005), que teve como objetivo principal comparar pacientes submetidos à revascularização miocárdica, com ou sem circulação extracorpórea, investigou-se a expressão em leucócitos e o perfil de proteínas

plasmáticas mediadoras, exclusivamente do sistema inflamatório. As amostras foram colhidas em períodos distintos: antes da cirurgia, após 4 e 24 h, estabelecendo os mecanismos de respostas e relações entre concentrações protéicas e transcritos. Dessa forma, averigou-se que os leucócitos dos pacientes submetidos às cirurgias com circulação extracorpórea, expressam mais fatores de adesão e sinalização [molécula de adesão intercelular 2, interleucina 1, interleucina 8, receptor de interleucina 18 (ILR18) e receptores de *toll-like* 4 (TLR4), 5 e 6], em resposta às proteínas circulantes [fator de necrose tumoral α, IL-6, interleucina 10, interferon γ, fator de estimulação de colônias de granulócitos, proteína-1 de quimiotaxia a monócitos e proteína 1β de macrófagos] do que os sem circulação extracorpórea, consequentemente, promovem maior resposta inflamatória, que é prejudicial ao indivíduo (Tomic et al. 2005). Por fim, concluiu que para a melhor compreensão do evento fisiopatológico, há necessidade se realizar outros estudos transcriptômicos e proteômicos concomitantemente (Tomic et al. 2005).

Além disso, outros estudos demonstram que a expressão gênica das células endoteliais progenitoras pode alterar o perfil de transcritos nas análises do sangue periférico, uma vez que também estão envolvidas no reparo e remodelagem da lesão cardíaca (Wojakowski et al. 2004; Yoon et al. 2005). Estas células são mobilizadas da medula óssea, por sua vez, frente a sinalizadores plasmáticos (proteínas) de inflamação e citocinas hematopoiéticas, como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), IL-6 fator de crescimento do hepatócito e outros (Wojakowski et al. 2004).

Sendo assim, graças aos avanços tecnológicos e da bioinformática através das plataformas de grande alcance e alto desempenho, microaranjo de DNA e *SELDI-TOF/MS*, no presente estudo, foram avaliados os perfis de expressão de 22.011 genes das células do sangue periférico e de 3.844 espectros de proteínas plasmáticas, durante as 48 h após IAM com SST, colhidas em intervalos que possibilitaram avaliar, de forma detalhada, a dinâmica da resposta do organismo na SCA e a identificação de biomarcadores potencialmente úteis no diagnóstico e prognóstico das doenças cardiovasculares.

# 2 OBJETIVO

O objetivo desta pesquisa foi caracterizar novos biomarcadores de doenças cardiovasculares utilizando poderosas ferramentas para o estudo de alta performace de expressão de RNAm e de proteínas em sangue periférico, aproveitando-se do banco de dados e das tecnologias geradas em consequência da finalização do projeto genoma humano.

## 2.1 Objetivos específicos

1. Avaliar a expressão gênica de RNAm por microarranjo de DNA (22.011 genes e 287.327 exons) em sangue periféricos de pacientes com IAM com SST, nas primeiras 48 h após admissão hospitalar.

2. Validar tecnicamente através da PCR em tempo real os resultados de expressos de RNAm selecionados através de microarranjo de DNA.

3. Validar biologicamente através da PCR em tempo real os genes diferentemente expressos validados tecnicamente.

4. Analisar o perfi das proteínas plasmáticas através do *ProteinChip H50* seguido de SELDI-TOF/MS de paciente com IAM com SST durante as primeiras 48 h após admissão hospitalar.

# 3 MATERIAL E MÉTODOS

## 3.1 CASUÍSTICA

O estudo foi desenvolvido no Pronto-Socorro, Hemodinâmica, Unidade Coronária e Reabilitação do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia do Estado de São Paulo (IDPC).

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, conforme expresso pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Anexo A). Os indivíduos foram informados pelo investigador principal ou membro da equipe colaboradora designado por ele sobre os objetivos e importância da pesquisa desenvolvida neste trabalho. Somente participaram do estudo aqueles que consentiram em assinar o "Termo de Consentimento Livre e Esclarecido" (Apêndice A), conforme determina a resolução número 196, de 13 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde.

### 3.1.1 Características do grupo IAM com SST

No período de 16 de junho de 2006 a 31 de outubro de 2007, foram recrutados 10 pacientes com IAM com supradesnivelamento do segmento ST [SST] que faziam parte da rotina do Pronto-Socorro. Todos pacientes foram submetidos à intervenção coronariana percutânea com menos de uma hora após suspeita de IAM com SST.

Foram selecionados pacientes do sexo masculino, idade entre 36 a 65 anos que apresentaram sintomas de isquemia coronariana aguda nas últimas 8 horas: dor precordial ou retroesternal descrita como desconforto, aperto ou queimação com duração maior que 20 minutos; dispnéia ou síncope de provável origem isquêmica e o reconhecimento de supradesnivelamento do segmento ST > 1,0 mm em derivações contíguas no plano frontal, o bloqueio de ramo esquerdo novo ou o supradesnivelamento do segmento ST > 2,0 mm em derivações precordiais que sugerem alta probabilidade de IAM. Em caso de supradesnivelamento do segmento ST em derivações da parede inferior (DII, DIII e AVF), recomenda-se a obtenção de derivações direitas e V7, V8) (Piegas et al. 2009).

O grupo IAM com SST foi subdividio em indivíduos com e sem infarto prévio, uma vez que estes apresentam antecedentes de medicação prévia ambulatorial comuns à

pacientes após IAM. Caracterizou-se 1º IAM com SST os pacientes sem infarto prévio e 2º IAM com SST os pacientes com infarto prévio.

### 3.1.2 Características do grupo controle

O grupo controle foi constituído por 6 indivíduos, pareados por idade, sexo e fatores de risco, que não apresentavam história ou evidencia de doença clínica atual. A doença arterial coronária foi afastada por um teste ergométrico considerado totalmente dentro da normalidade, realizado na seção de Reabilitação do IDPC. Cumpre destacar que, este grupo foi composto por funcionários do hospital e por colegas de trabalho, que foram convidados a participar desta pesquisa e o fizeram de forma espontânea.

### 3.1.3 Características do grupo SCA para validação biológica

No período de 01 de junho de 2008 a 31 de novembro de 2009, foram recrutados pacientes com SCA que inclui angina instável e IAM (com ou sem SST) que faziam parte da rotina do Pronto-Socorro.

Foram selecionados pacientes de ambos os sexos e idade entre 30 a 65 anos que apresentaram sintomas de isquemia coronariana aguda nas últimas 48 horas: dor precordial ou retroesternal descrita como desconforto, aperto ou queimação com duração maior que 10 minutos; dispnéia ou síncope de provável origem isquêmica.

Estabelece-se o diagnóstico de IAM quando houver aumento característico e diminuição gradual da troponina ou aumento e diminuição mais rápida para creatinoquinase fração MB (CK-MB), com pelo menos um dos seguintes critérios: a) sintomas isquêmicos; b) alterações eletrocardiográficas indicativas de isquemia (elevação, depressão do segmento ST ou BCRE novo); c) desenvolvimento de ondas Q patológicas no eletrocardiograma; ou d) evidência, em exames de imagem, de perda de viabilidade miocárdica ou contratilidade segmentar anormal (Thygesen et al. 2007).

O grupo SCA para validação biológica inclui pacientes com angina instável, IAM com e sem SST. Foram subdivididos de acordo com relato de infarto prévio, uma vez que, estes apresentaram antecedentes de medicação prévia ambulatorial comuns à pacientes após IAM. Caracterizou-se 1º SCA pacientes sem infarto prévio e 2º SCA com infarto prévio.

### 3.1.4 Características do grupo controle para validação biológica

O grupo controle foi constituído por indivíduos de ambos os sexos e idade entre 30 a 65 anos que não apresentavam história ou evidencia de doença clínica atual. A doença arterial coronária foi afastada por um teste ergométrico considerado totalmente dentro da normalidade, realizado na seção de Reabilitação do IDPC. Cumpre destacar, que este grupo foi composto por doadores de sangue da "Fundação Pró-Sangue - Hemocentro de São Paulo" com sede no próprio IDPC. Os mesmos foram convidados a participar desta pesquisa e concordaram de forma espontânea em assinar o termo de consentimento esclarecido.

### 3.1.5 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os pacientes que apresentassem qualquer das seguintes condições: 1) insuficiência renal crônica; 2) insuficiência hepática, 3) distúrbio endócrino, com exceção de Diabetes *Mellitus* para validação biológica; 4) doenças inflamatórias; 5) neoplasia; 6) doença hematológica; 7) hipercolesterolemia familial conhecida ou presente em membros da família. Excluíram-se também os pacientes que antes do IAM apresentassem as seguintes cardiopatias: 1) miocardiopatia, incluindo doença de Chagas; 2) valvopatia; 3) doença congênita; 4) pericardiopatia.

Para a avaliação dessas condições, aplicou-se questionário aos indivíduos, e foram realizados os seguintes testes de triagem: glicemia, colesterol total e frações, tetraiodotironina (T4), TSH (*Thyroid-stimulating hormone*), uréia, creatinina, ácido úrico, leucograma, alanina aminotransaminase (ALT) e aspartato aminotransaminase (AST).

### 3.1.6 Variáveis analisadas

Os seguintes fatores de risco clássicos para doença arterial coronária foram avaliados em todos os grupos: Diabetes *Mellitus*, hipertensão arterial, tabagismo, antecedentes familiares, dislipidemias, obesidade. Foi considerado portador de:

1) Hipertensão arterial sistêmica - o paciente que mencionasse este fator de risco emitido por médico, com medidas de pressão arterial igual ou maior que 140 /90 mmHg ou que estivesse em uso de medicação anti-hipertensiva (Mion et al. 2004);

2) Diabetes *Mellitus* - o paciente que mencionasse este fator de risco emitido por médico em qualquer fase da vida, ou que fazia tratamento com hipoglicemiantes orais ou insulina.

3) Dislipidemias - considerou-se dislipêmico o paciente portador de dislipidemia em algum momento de sua vida ou relatado por médico sobre o nível de colesterol ou triglicéride elevado e, que realizou tratamento dietético e/ou usou medicamentos hipolipemiantes.

4) História familiar para doença coronária precoce - pacientes com relato de doença coronária em pais ou irmãos, abaixo dos 55 anos em homens, ou de 65 anos em mulheres.

5) Tabagismo - o paciente que consumia regularmente, no mínimo, um cigarro por dia, pelo menos, por um ano e que havia fumado no ano anterior à inclusão na pesquisa (Silva et al. 1998). Não fumante, o que nunca fumou ou que deixou de fumar há mais de um ano.

6) Obesidade - o critério de obesidade foi adotado com base no índice de massa corpórea para todos os participantes do estudo. O índice de massa corpórea foi calculado dividindo o peso em quilogramas pelo quadrado da altura em metros. Sobrepeso foi definido como índice de massa corpórea (IMC) > 25,0 Kg/m² e obesidade como IMC > 30,0 Kg/m², para homens e mulheres. O peso foi determinado com roupas leves, sem sapatos, utilizando balança mecânica Filizola modelo 31 e a altura mensurada com um antropômetro de 1,92 m.

7) Etilismo - os pacientes foram considerados etilistas se o consumo diário de etanol fosse maior que 80 g (i.e, 1 litro de vinho, 6 “latas” de cerveja, 3 doses de aguardente ou whisky).

8) Sedentarismo- os pacientes foram considerados sedentários quando não praticavam regularmente atividade física (no mínimo 2 vezes por semana com 1 h de duração).

Considerou-se portador de infarto prévio aquele que apresentasse este antecedente documentado em seu prontuário médico ou, a confirmação de internação hospitalar em unidade de terapia intensiva com o diagnóstico.

Todos os medicamentos em uso diário, prévio à internação, foram considerados como medicação prévia ambulatorial. Deu-se especial atenção ao uso de medicamentos comuns a pacientes após IAM, como ácido acetil salicílico, betabloqueador, bloqueador dos canais de cálcio, nitrato, estatina, tienopiridínico, inibidor da enzima conversora da angiotensina (IECA), digitálicos e diurético.

Os pacientes que citaram “não saber” da presença de um determinado fator de risco, bem como infarto prévio e medicação prévia ambulatorial, foram considerados

não portadores do referido antecedente. Todos os dados clínicos foram coletados pelo autor da pesquisa ou membro da equipe colaborador designado por ele.

## 3.2 OBTENÇÃO DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

As colheitas sanguíneas foram realizadas por punção da veia antecubital dos pacientes do grupo IAM com SST, na seguinte ordem temporal:

**$T_0$** - a primeira colheita foi realizada no Pronto-Socorro antes do tratamento médico ser instituído.

**$T_2$** - a segunda colheita foi realizada na Hemodinâmica após intervenção coronariana percutânea, que corresponde aproximadamente 2 h após $T_0$.

**$T_{12}$** - a terceira colheita foi realizada na Unidade Coronária aproximadamente 12 h após $T_2$.

**$T_{24}$** - a quarta colheita foi realizada na Unidade Coronária aproximadamente 24 h após $T_2$.

**$T_{36}$** - a quinta colheita foi realizada na Unidade Coronária aproximadamente 36 h após $T_2$.

**$T_{48}$** - a sexta colheita foi realizada na Unidade Coronária aproximadamente 48 h após $T_2$.

A representação gráfica do protocolo de colheitas nas primeiras 48 h de admissão hospitalar para o grupo IAM com SST e controle pode ser observada na Figura 1.

Além destas seis colheitas propostas, após um ano os pacientes do grupo IAM com SST foram reconvocados e novamente colhidas as amostras de sangue periférico. Também foram avaliados os marcadores de isquêmia cardíaca, a fim de confirmar que neste segundo momento, os pacientes não estivessem em um novo processo isquêmico cardíaco (**1ANO**). O objetivo desta última análise, foi avaliar se os genes diferentemente expressos observados nas primeiras 48 h após IAM, retornam às concentrações normais após um ano. Por questões logísticas, não foi possível processar estas amostras para o estudo proteômico.

Para os pacientes do grupo SCA para validação biológica foi realizada uma única punção de sangue periférico por veia antecubital, que ocorreu após anamnese no Pronto-Socorro.

As amostras de sangue periférico dos indivíduos dos grupos controles para validação biológica foi realizada uma única vez em jejum de 12 h.

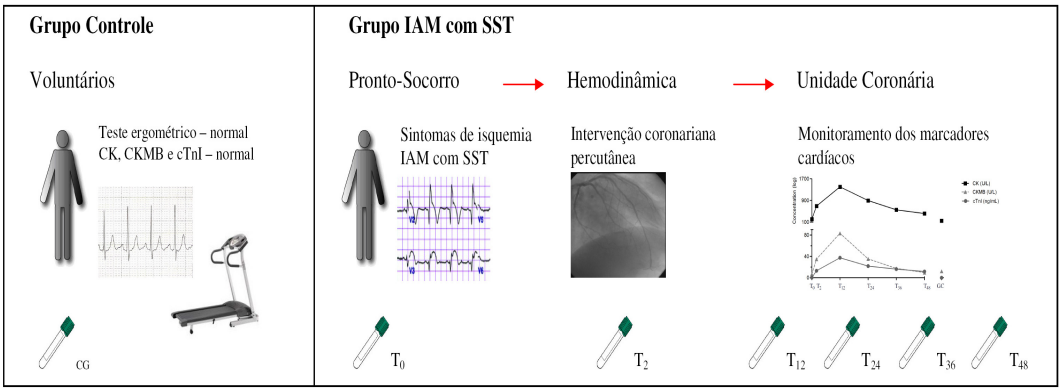



Figura 1. **Representação esquematizada do protocolo de colheita de sangue periférico para o grupo IAM com SST e controle.**
Nota: IAM, infarto agudo do miocárdio; SST, supradesnivelamento do segmento ST; CK, creatinoquinase, CK-MB, creatino quinase fração MB; cTnI, troponina I; $T_0$, primeira colheita; $T_2$, segunda colheita após intervenção coronariana percutânea; $T_{12}$, terceira colheita após 12h; $T_{24}$, quarta colheita após 24h; $T_{36}$, quinta colheita após 36h; $T_{48}$, sexta colheita após 48h.

## 3.3 DETERMINAÇÕES LABORATORIAIS

Os exames laboratoriais foram realizados em colaboração com o Laboratório de Análises Clínicas do IDPC.

Para análise do hemograma, foi colhido sangue total em tubo com anticoagulante (ácido etileno-diamino-tetracético [*EDTA*]). A contagem global da série vermelha, branca e de plaquetas foi executada por métodos de impedanciometria e citometria de fluxo, automatizados *ABX Pentra 80* (ABX, Kyoto, Japão).

Para análise de AST, ALT, CK e CK-MB (atividade) glicemia, ácido úrico, creatinina, uréia, triglicerídeos, colesterol total e colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL), foram usadas amostras de sangue em tubo sem anticoagulante, a partir dos métodos colorimétricos e enzimáticos automatizados *Dimension® RXL* (*Dade Behring,* Deerfield, EUA). O colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL) foram calculados, segundo a fórmula de Friedewald e colaboradores (Friedewald et al. 1972).

Para análise da PCRu, TSH 3ª geração, T4 livre e cTnI, utilizou-se sangue em tubo sem anticoagulante, sendo dosadas pelo método de quimioluminescência automatizada IMMULITE® (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, EUA).

## 3.4 ANÁLISE DESCRITIVA

Com objetivo de caracterizar a amostra estudada, os dados foram apresentados em forma de tabelas, com as frequências relativas (percentuais) e absolutas das classes de cada variável qualitativa. Para as variáveis quantitativas que apresentam uma

distribuição normal, os dados foram expressos em médias e desvio-padrão, para os dados que não apresentam uma distribuição normal foram expressos em medianas.

## 3.5 ANÁLISE INFERENCIAL

Para comparar as distribuições de frequência das variáveis qualitativas foi utilizado o teste do Qui-Quadrado ($\chi^2$) ou teste exato de Fisher, quando os valores esperados foram inferiores a 5 (Rosner 2006).

Antes de se efetuar os testes de comparações das variáveis quantitativas, avaliou-se os dados que seguiam uma distribuição normal, pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov* (Siegel & Castellan 1988).

Utilizou-se o teste não paramétrico de *Mann-Whitney* (Armitage & Berry 1994), quando o objetivo foi testar a hipótese de que as duas populações têm a mesma distribuição; para comparações entre mais de duas populações aplicou-se o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis*. Para as variáveis numéricas que apresentaram uma distribuição normal entre os grupos foi utilizado o teste *t* – de *Student*. Foram considerados estatisticamente significantes os resultados cujos níveis descritivos (valores de *p*) foram inferiores a 0,05.

Foram usados na elaboração do relatório técnico os softwares: *Microsoft Office Excel 2000* para o gerenciamento do banco de dados; Statistical Package for the Social Science v. 15.0 (SPSS Inc., Illinois, EUA) para a execução dos cálculos estatísticos.

## 3.6 ANÁLISE TRANCRIPTÔMICA

### 3.6.1 Extração do RNA total das células presentes no sangue periférico

O RNA intracelular das células presentes no sangue periférico foi mantido estável através da colheita em sistema comercial *PAXgene*™ *Blood RNA* (*PreAnalytiX GmbH*, Feldbachstrass, Suíça), que tem composição de reagentes exclusivos, que impedem que as moléculas de RNA se degradem por RNases e minimizam a indução da expressão gênica. As colheitas foram realizadas de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante, em que consiste em obter por punção venosa 2,5 mL de sangue periférico, mantê-lo em temperatura ambiente por aproximadamente 12 h e em seguida armazená-lo a -20ºC até a sua análise.

O conjunto de reagentes, *PAXgene*™ *Blood RNA* (*PreAnalytiX GmbH*, Feldbachstrass, Suíça), foi utilizado para extração do RNA intracelular das células

presentes no sangue periférico total humano. A extração inicia-se com a centrifugação a 5.000 x *g* para obter um precipitado de células presentes no sangue periférico, sendo majoritariamente de leucócito (4,8 x $10^6$ – 1,1 x $10^7$ leucócitos/ml). O precipitado é então lavado e incubado com tampões adequados em conjunto com a proteinase K para a digestão das proteínas. O lisado é submetido às etapas de lavagens através da coluna *PAXgene Shredder Spin Column* e a centrifugações para remover detritos celulares residuais, aplicado sob a coluna *PAXgene RNA Spin Column* que apresenta propriedades de ligação seletiva de RNA à membrana sílica gel. A seguir trata-se com DNase I e através do tampão de eluição, recupera-se o RNA.

As amostras de RNA total extraídas de um mesmo paciente e tempo de colheita foram concentradas através de centrifugações através membrana sílica gel do conjunto de reagentes *GeneChip® Blood RNA Concentration* (*PreAnalytiX GmbH*, Feldbachstrass, Suíça; *Affymetrix*, Santa Clara, EUA).

A integridade do RNA total extraído foi avaliada através do conjunto de reagentes *RNA 6000 Nano series II* (*Agilent Technologies* Inc., Miami, EUA) em sistema de eletroforese em *chip* do *Bioanalyzer modelo 2100* (*Agilent Technologies Inc*., Miami, EUA). Apenas as amostras com RIN > 7 (*Number of Integrated of RNA*) foram utilizadas. As concentrações foram determinadas utilizando o espectrofotômetro *UV-Vis NanoDrop® ND-1000* (*NanoDrop Technologies*, Wilmington, EUA). Na Figura 2, segue um exemplo de resultado obtido após extração de RNA total, e controlado a qualidade pelo sistema de eletroforese em *chip* do *Bioanalyzer modelo 2100* (*Agilent Technologies Inc*., Miami, EUA).

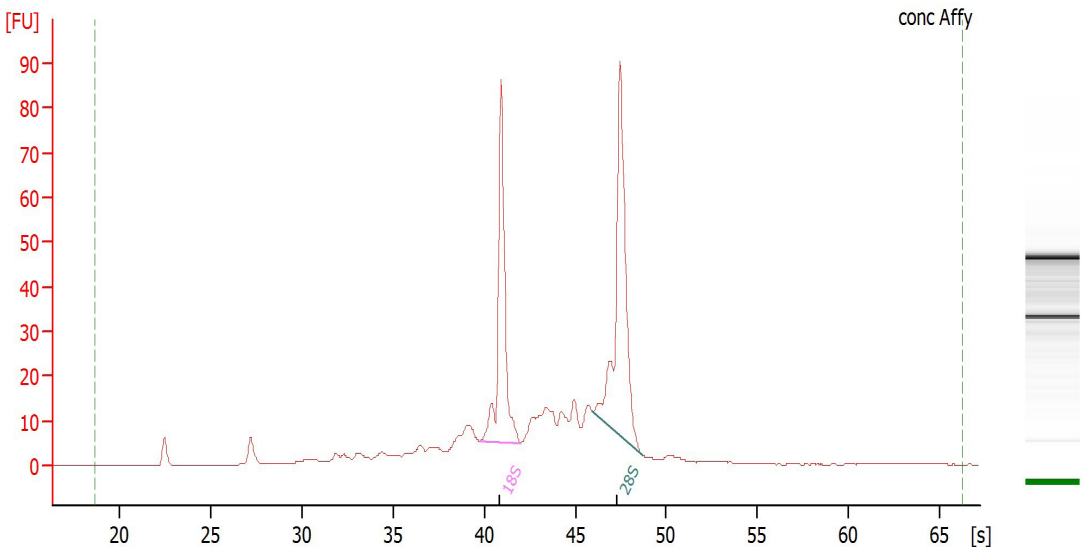



Figura 2. **Perfil eletroforético obtido através do *Bioanalyzer* de amostra de RNA total concentrado**. Os picos assinalados correspondem à porção 18 e 28S da subunidade do RNA ribossômico. A figura do lado direito ilustra o perfil de RNA simulando um gel de eletroforese.
Nota: Amostra DT3, RIN = 8,4.

### 3.6.2 Processamento das amostras para hibridização em microarranjo de DNA

No presente estudo, o processamento das amostras para hibridização em microarranjo de DNA foi realizado apenas com o RNA total dos pacientes do grupo IAM com SST e grupo controle.

Após isolamento do RNA total, realizaram-se as etapas seguintes de acordo com o manual do *GeneChip® Whole Transcript (WT) Sense Target Labeling Assay* – versão 4 (*Affymetrix*, Santa Clara, EUA) (Figura 3).

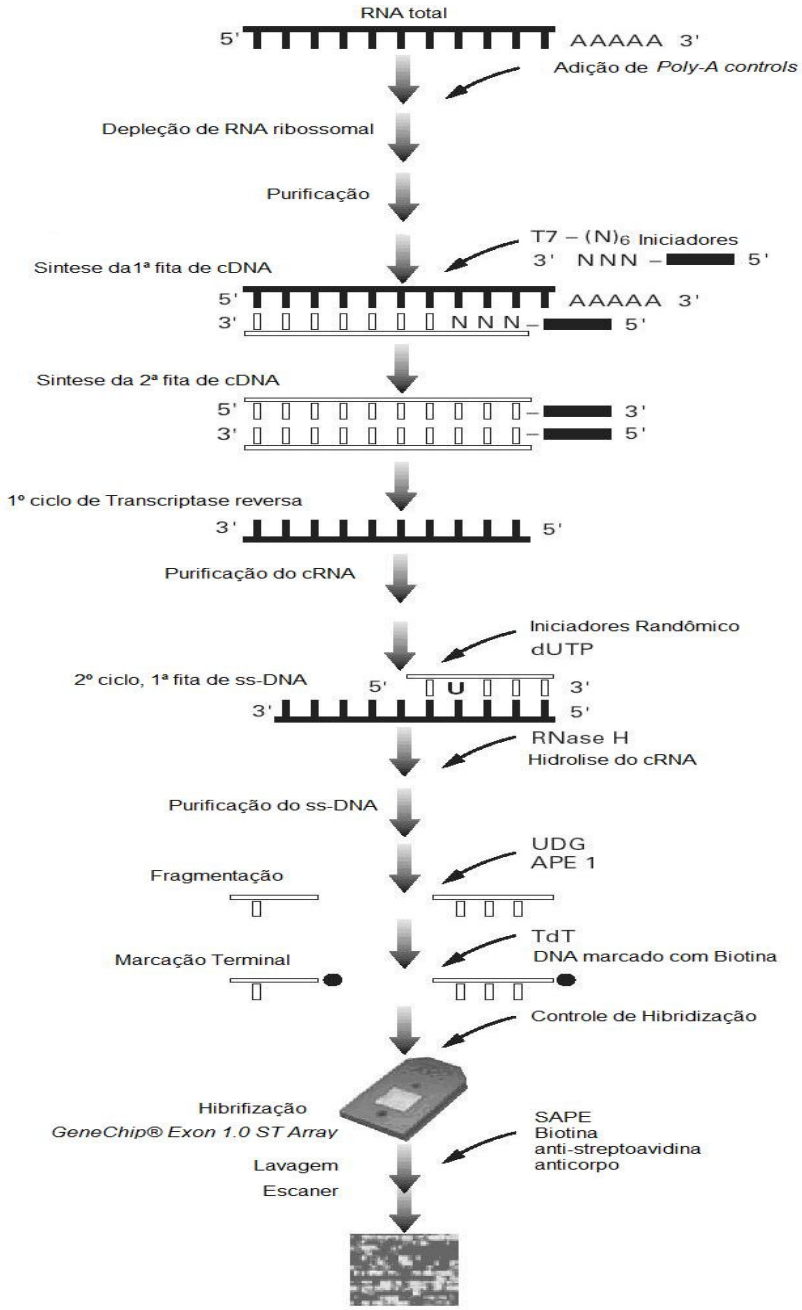



Figura 3. **Fluxo de atividade para análise em microarranjo de DNA.** O RNA total foi processado para obter em cDNA, cRNA, ss-DNA, fragmentado, marcado com biotina, hibridizado em microarranjo de DNA, lavado e escaneado.
Nota: RNA, ácido ribonucléico; cDNA, DNA complementar, dUTP, deoxiuridina-trifosfato; ss-DNA, fita simples de DNA; cRNA, RNA complementar ao cDNA; UDG, RNA complementar ao cDNA; APE1, purina/pririmidina endonuclease 1; TdT, *terminal deoxynucleotidyI transferase;* DNA, ácido desoxirribonucléico; SAPE, fluorófuro streptavidina-ficoeritrina.
FONTE: *GeneChip® Whole Transcript (WT) Sense Target Labeling Assay*– versão 4 (Affymetrix, Santa Clara, EUA).

*3.6.2.1 Adição de controles exógenos e depleção de RNAr*

A partir de 1µg de RNA total, adicionaram-se a cada amostra, controles positivos exógenos, denominados *Poly-A spikes*, que são transcritos poliadenilados do gene da *B. subtilis - lys, phe, thr e dap*, para monitorar as etapas que se seguem de depleção de RNA ribossômico (RNA), amplificações, fragmentação e marcação. Os controles fazem parte do conjunto de reagentes *Control GeneChip Eukaryotic Poly-A RNA* (*Affymetrix,* Santa Clara, EUA).

A *Affymetrix* recomenda a depleção das subunidades 18 e 28 do RNAr, para diminuir os ruídos gerados, que dificultam as análises, melhorar a sensibilidade da reação e diminuir os gastos desnecessários de reagentes, pois os mesmos representam aproximadamente 90% do RNA total de humanos. (*GeneChip® Human Exon 1.0 ST Array and GeneChip® WT Sense Target Labeling Assay for Genome-Wide, Exon-Level Expression Analysis* – nota técnica *Affymetrix, Santa Clara, EUA*).

A depleção de RNAr foi realizada através do conjunto de reagentes *Isolation RiboMinus Human/Mouse Transcriptome* (*Invitrogen*, Carlsbad, EUA) e otimizada de acordo com as modificações propostas no *GeneChip® Whole Transcript (WT) Sense Target Labeling Assay Manual* – versão 4 (*Affymetrix*, Santa Clara, EUA). O processo ocorre através da hibridização, com sondas marcadas com biotina para regiões das subunidades 18 e 28 do RNAr, que por afinidade se liga à estreptavidina, que está covalentemente ligada a partículas magnéticas. Sendo assim, são isoladas, utilizando uma estante magnética, *6 Tube Magnetic Stand-Ambion* (*Ambion*, Austin, EUA). Para aumentar a estringência da hibridização, adicionou-se Betane a 5M (*Sigma*, Saint Luis, EUA). Ao término desta etapa, fez-se necessário a utilização do conjunto de reagentes *cRNA Cleanup GeneChip® IVC* (*Affymetrix*, Santa Clara, EUA), para remoção e concentração do material. Na Figura 4, segue um exemplo de resultado obtido após depleção de RNAr.

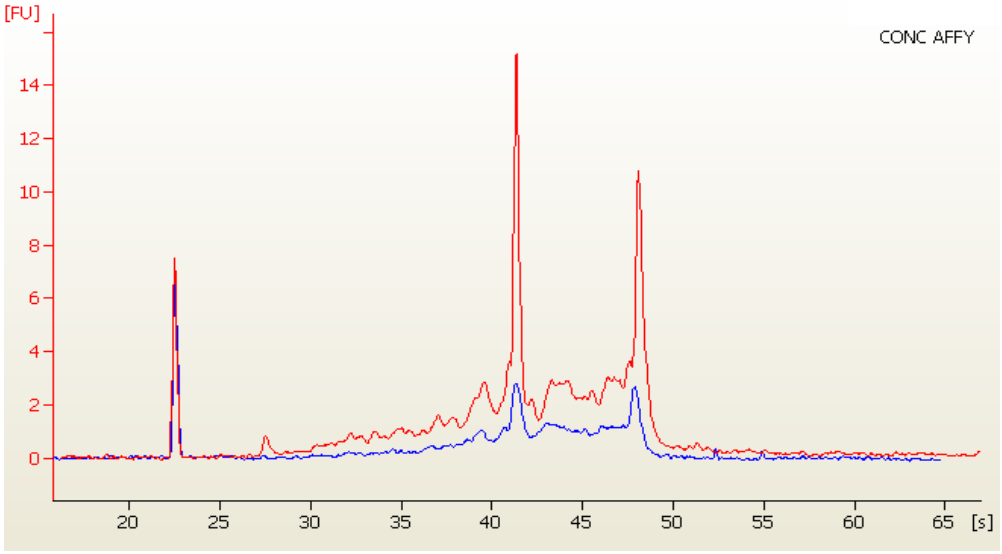



Figura 4. **Perfil eletroforético obtido através do *Bioanalyzer*, após depleção de RNAr.** Amostra em vermelho corresponde ao RNA total inicial concentrado (RIN = 6,8) e em Azul, após depleção de RNAr (RIN = 5,8).
Nota: Amostra ET2.

*3.6.2.2 Primeira etapa, síntese do cDNA*

A partir do RNA total concentrado, com depleção do RNAr, realizou-se a síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA), fita simples de RNA de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante (*Affymetrix)*. Os reagentes fazem parte dos conjuntos *GeneChip® WT cDNA Synthesis and Amplification* (*Affymetrix,* Santa Clara, EUA). Primeiro hibridizou-se a amostra com 5 µL do iniciador *T7- $(N)_6$* a 500 ng/µL a 70ºC por 5 min e, a 4ºC por 5 min – em termociclador *Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler* (*Applied Biosystems,* Foster City, EUA). Em seguida, adicionou-se à reação 2 µL de *5X 1st Stand Buffer;* 1µL de ditiotreitol (DTT) a 0,1 M; 0,5 µL de deoxidonucleotideos (dNTPs) a 10 mM; 0,5 µL de inibidor de *RNase* e 1µL de enzima transcriptase reversa *SuperScript II* (Invitrogen, Carlsbad, EUA). A programação utilizada no termociclador *Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler* (*Applied Biosystems,* Foster City, EUA) foi: incubação inicial de 25ºC por 10 min, 42ºC por 60 min e 70ºC por 10 min. Ao término do processo se obteve uma molécula híbrida, isto é, com uma fita de cDNA e uma fita de RNA.

Para sintetizar a 2ª fita de cDNA, adicionou-se à reação anterior 4,0 µL de $MgCl_2$ a 17.5 mM; 0,4 µL de dNTPs a 10 mM; 0,2 µL de *RNase H*; 0,6 µL de *DNA Polymerase I* e 4,8 µL de água livre de RNase, volume final da reação 20µL. Incubou-se a seguir a 16ºC por 120 min, sem aquecimento da tampa do termociclador *PTC 200 Thermal Cycler* (*MJ Research*, Waltham, EUA) e a 75ºC por 10 min, com aquecimento da tampa

do termociclador *Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler* (*Applied Biosystems,* Foster City, EUA).

*3.6.2.3 Síntese e quantificação do cRNA*

A partir do cDNA sintetizado, realizou-se uma transcrição *in vitro*, para se obter RNA complementar ao cDNA (cRNA), que corresponde à fita *antisense* do nosso material inicial, isto é, o RNA concentrado com remoção do RNAr. Em seguida, adicionou-se à reação anterior (volume 20 µL) 5 µL de *10X IVT Buffer*, 20 µL de *IVT NTP Mix* e 5µL de *IVT Enzyme Mix*, volume final 30 µL. A reação ficou incubada por 16 h a 37ºC no termociclador *Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems,* Foster City, EUA). Os reagentes fazem parte dos conjuntos de reagentes *GeneChip® WT cDNA Synthesis and Amplification* (*Affymetrix,* Santa Clara, EUA).

Com o objetivo de concentrar o cRNA sintetizado e purificar o material dos reagentes adicionados para síntese de cDNA e cRNA, utilizou-se o conjunto de reagentes *GeneChip® IVT cRNA Cleanup* (*Affymetrix,* Santa Clara, EUA). A seguir, quantificou-se o material, através do espectrofotômetro *UV-Vis NanoDrop® ND-1000* (*NanoDrop Technologies*, Wilmington, EUA), para que ao final, a amostra tivesse obrigatoriamente massa entre 8 a 10 µg, e obtivéssemos 5 µg de fita simples de cDNA.

*3.6.2.4 Segunda etapa, síntese da ss-DNA*

As amostras que apresentaram entre 8 a 10 µg de cRNA hibridaram-se com iniciadores randômicos à concentração de 3 µg/µL, volume final de 8 µL; incubou-se a 70ºC por 5 min e 25ºC por 5 min – em termociclador *Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler* (*Applied Biosystems,* Foster City, EUA). Em seguida, adicionou-se à reação 4 µL de *5X 1$^{st}$ Stand Buffer*, 2 µL de DTT a 0,1 M*,* 1,25 µL de dNTPs mais deoxiuridina-trifosfato (dUTP) a 10 mM e 4,75 µL de enzima transcriptase reversa *SuperScript II* (Invitrogen, Carlsbad, EUA). O programa do termociclador *Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler* (*Applied Biosystems,* Foster City, EUA) utilizado foi: 25ºC por 10 min, 42ºC por 90 min e 70ºC por 10 min. Desta forma, ao término do processo, teremos sequências de cRNAs e fitas simples de DNA (*single-stranded DNA, ss-DNA*), com incorporação de dUTP em maior razão que deoxitimidina trifosfato (dTTP). Os reagentes, usados nesta etapa, fazem parte dos conjuntos de reagentes *GeneChip® WT cDNA Synthesis and Amplificationt* (*Affymetrix,* Santa Clara, EUA).

*3.6.2.5 Hidrólise do cRNA, purificação e quantificação da ss-DNA*

Para eliminar as sequências de cRNA, submeteu-se as amostras obtidas do item anterior, a hidrolise, através de 1 µL da enzima *RNase H* do *GeneChip® WT cDNA Synthesis and Amplification Kit* (*Affymetrix,* Santa Clara, EUA) e incubou-se a 37ºC por 45 min, 95ºC por 5 min e 4ºC por 2 min – em termociclador *Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler* (*Applied Biosystems,* Foster City, EUA). Ao término desta etapa, se fez necessário a utilização do *GeneChip® Sample Cleanup Module* (*Affymetrix*, Santa Clara, EUA), para limpar e concentrar a matéria, fita simples de DNA (ss-DNA). A seguir quantificou-se o ss-DNA, através do espectrofotômetro *UV-Vis NanoDrop® ND-1000* (NanoDrop Technologies, Wilmington, EUA) e, ao final, a massa da amostra deveria estar obrigatoriamente com 5,5 µg, para a realização das reações de fragmentação, marcação e hibridização nos *GeneChip® Exon 1.0 ST Array* (*Affymetrix,* Santa Clara, EUA).

*3.6.2.6 Fragmentação da ss-DNA*

A reação de fragmentação é uma combinação de 5,5 µg de ss-DNA, 10 U/µL de uracil DNA glicosilase (UDG), 1,000 U/µL de purina/pririmidina endonuclease 1 (APE1), 4,8 µL de *10X cDNA fragmentaion Buffer* e água livre de RNases, para obter volume final da 48 µL. A reação foi incubada a 37ºC por 60 min, 93ºC por 2 min (para inativar as enzimas) e 4ºC por 2 min – em termociclador *Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler* (*Applied Biosystems,* Foster City, EUA). Os reagentes fazem parte do conjunto de reagentes *GeneChip® WT (Whole Transcript) Terminal Labeling (Affymetrix,* Santa Clara, EUA). A enzima UDG remove especificamente as bases uracil, incorporadas artificialmente às sequências de ss-DNA, gerando um sítio de clivagem, para que, em seguida, a APE1 clive a ligação fosfodiéster do carbono, em que estava a base uracil, deixando assim, as extremidades 3' e 5' livres.

Para averiguar se a fragmentação ocorreu adequadamente, realizou-se o controle por eletroforese com 2 µL da amostra, valendo-se do conjunto de reagentes *RNA 6000 Nano series II* (*Agilent Technologies Inc.*, Miami, EUA). Utilizou-se ainda, o sistema de eletroforese em *chip* com *Bioanalyzer modelo 2100* (*Agilent Technologies Inc.*, Miami, EUA), em que deve apresentar pico entre 20 a 200 bases, sendo que o ponto mais alto deve estar entre 40 a 70 bases, Figura 5.

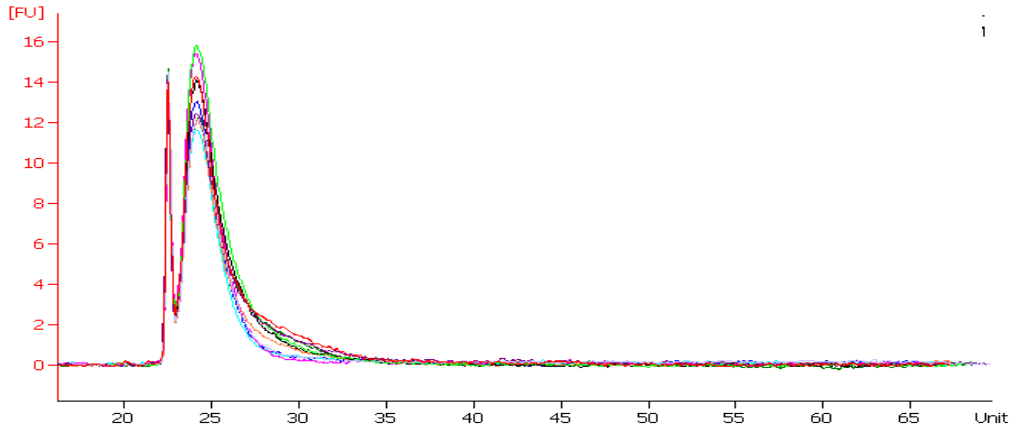



Figura 5. **Perfis eletroforéticos obtidos através do *Bioanalyzer* da reação de fragmentação da ss-DNA.**
Nota: Pico correspondente entre 20 a 200 bases. Amostra CTRL6.

### *3.6.2.7 Marcação da ss-DNA fragmentadas*

O material fragmentado foi então marcado através da enzima *terminal deoxynucleotidyI transferase* (TdT), em que transfere para a extremidade 3', a biotina (*Biotin Allonomide Triphosphate* – Figura 6). Adicionou-se aos 45 µL da reação de fragmentação, 12 µL de *5x TdT Buffer*, 2 µL da enzima TdT e 5 mM de *DNA Labeling Reagent*, volume final de 60 µL; incubou-se a 37ºC por 60 min, 70ºC por 10 min e 4ºC por 2 min - em termociclador *Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler* (*Applied Biosystems,* Foster City, EUA). Posteriormente o material foi armazenado a -80ºC.

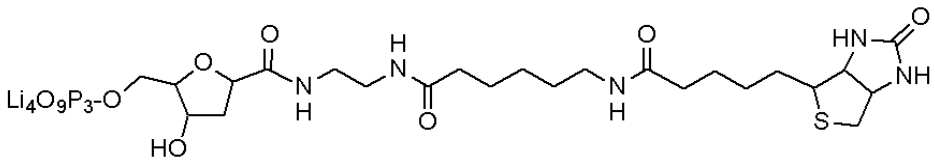



Figura 6. **Estrutura molecular da *Biotin Allonomide Triphosphate – DNA Labeling Reagent*.**
FONTE: *GeneChip® Whole Transcript (WT) Sense Target Labeling Assay– versão 4* (Affymetrix, Santa Clara, EUA).

Para averiguar se a marcação ocorreu de forma eficaz, realizou-se uma reação de conjugação das amostras marcadas com biotina, com uma solução a 2 mg/mL de avidina - *ImmunoPure NeutrAvidin* (*Pierce*, Rockford, EUA), em tampão fosfato salino (PBS) pH 7.2 (*Invitrogen*, Carlsbad, EUA). O produto da reação foi submetido à eletroforese em gel de poliacrilaminda, em gradiente a 4 - 20% (*Invitrogen*, Carlsbad, EUA), utilizando tampão TBE 1X (Tampão borato-EDTA; pH 8,0) (*Invitrogen*,

Carlsbad, EUA), em cuba de eletroforese horizontal - *Novex XCell SureLock Mini-Cell* (*Invitrogen*, Carlsbad, EUA) e fonte de eletroforese *EPS 1001* (*Amersham Pharmacia Biotech*, Buckinghamshire, Ingl.), a 150 V por 60 min. Os resultados foram visualizados sob luz UV, após coloração do gel com *SYBR Gold* (1X) (*Invitrogen*, Carlsbad, EUA) e foto documentados em sistema de captura de imagem *Chemilmager* (*Alpha Innotech Corporation*, San Leandro, EUA). Como referência, utilizou-se dois marcadores de DNA – 10 bp e 100 bp *DNA ladder* (*Invitrogen*, Carlsbad, EUA) e a própria amostra não submetida a esta reação.

A avidina ao ligar-se com a molécula de biotina, que está ligada à porção terminal da ss-DNA fragmentada, aumenta o seu peso molecular, impedindo que se desloque no TBE GEL a 4 - 20%, durante a eletroforese, de modo distinto às amostras não tratadas com avidina, Figura 7. Esta técnica é conhecida como *Gel-Shift*.

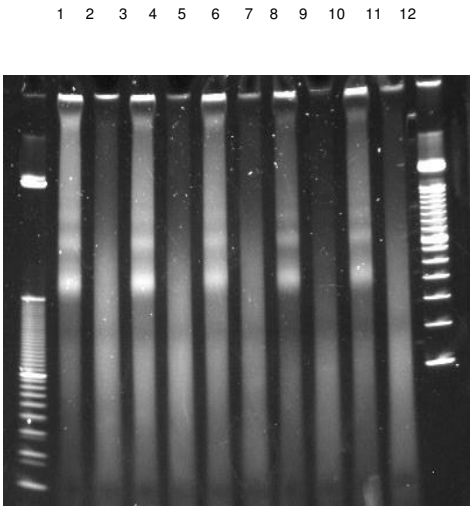



Figura 7. **Perfil eletroforético da ss-DNA fragmentada e marcada com biotina e tratada com avidina.**
Nota: 1- padrão de 10 pb; 2, 4, 6, 8 e 10 ss-DNA marcada com biotina e tratada com avidina; 3 - ss-DNA marcada com biotina; 12 - padrão de 100 pb.
Amostras: CTRL1; AT1; BT1; CT1; CTRL7.

### *3.6.2.8 Hibridização*

As etapas a seguir foram realizadas em colaboração com o Centro Nacional de Genotipagem da Espanha (CeGen), da Universidade de Santiago de Compostela (USC) e o Departamento de Bioinformática do Instituto Príncipe Felipe – Valência, durante o estágio *sandwich* no exterior, pelo programa PDEE/CAPES processo nº 5180/06-6, no período de 01 de janeiro a 31 de dezembro de 2008. As amostras foram enviadas em

gelo seco para a Espanha, pela transportadora OCASA Soluções Logísticas (São Paulo, Brasil) para a realização destes procedimentos.

Para a reação de hibridização utilizou-se o conjunto de reagentes *Control GeneChip® Expression 3'-Amplification Reagents Hybridization* (*Affymetrix,* Santa Clara, EUA) e seguiu-se o protocolo recomendado pelo fabricante. Nesta etapa, adicionaram-se às amostras, quatro controles de hibridização denominados controles *Bac spikes*, que são transcritos de: *E.coli, bioB, bioC* e *bioD* a 1,5 pM, 5 pM e 25 pM respectivamente, e de uma recombinação gênica do bacteriófago P1, *cre* a 100 pM; além destes, adicionou-se um controle para auxiliar no alinhamento da imagem digital, *Control Oligo B2* a 50 pM. Utilizou-se o tampão de hibridização 1X, dimetilsufoxido a 7% e água livre de RNase para um volume final de 220 µL; incubou-se a 99ºC por 5 min e 45ºC por 5 min – em termociclador *Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler* (*Applied Biosystems,* Foster City, EUA). As amostras, então pré-aquecida a 45ºC, foram inseridas no microarranjo *GeneChip® Exon 1.0 ST Array* (*Affymetrix,* Santa Clara, EUA) e incubadas à temperatura de 45ºC a 60 rpm por 17 horas no *GeneChip® Hybridization Oven 640* (*Affymetrix,* Santa Clara, EUA).

*3.6.2.9 Lavagem e coloração*

O processo de coloração e lavagem, para a remoção dos reagentes, realizou-se na estação de lavagem *GeneChip® Fluidics Station 450* (*Affymetrix,* Santa Clara, EUA), comandada pelo sistema operacional *GeneChip® Operating Software* (GCOS; *Affymetrix,* Santa Clara, EUA), protocolo FS450_0001. Utilizou-se os reagentes do *GeneChip® Hybridization, Wash, and Staint* (*Affymetrix,* Santa Clara, EUA) de acordo com o fabricante. O processo consiste na união covalente da biotina com o fluorófuro streptavidina-ficoeritrina (SAPE), seguido de um anticorpo anti-streptavidina-biotina, e novamente com SAPE a fim de conseguir uma amplificação do sinal de fluorescência.

*3.6.2.10 Leitura - GeneChip® Scanner 3000 7G*

Ao término das lavagens, inserem-se os *GeneChip® Exon 1.0 ST Array* (*Affymetrix,* Santa Clara, EUA) no carrossel de leitura - *GeneChip® Auto Loader with External Barcode Reader* (*Affymetrix,* Santa Clara, EUA), que está acoplado ao equipamento de leitura - *GeneChip® Scanner 3000 7G* (*Affymetrix,* Santa Clara, EUA), comandado pelo sistema operacional GCOS, que captura a intensidade dos sinais de fluorescência no comprimento de onda de 570 nm e transforma em valor numérico

quantitativo. A leitura de cada microarranjo demora aproximadamente 40 min. Esses sinais são armazenados como imagens de 16-*bits*, os valores das intensidades captados, de todas as sondas, são armazenados em formato. *CEL.* Segue um exemplo do conjunto de imagens obtidas nessa etapa, Figura 8.

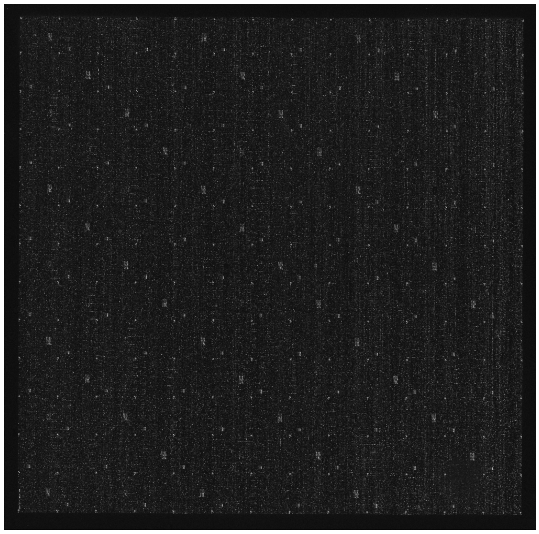


Figura 8. **Imagens obtidas de um microarranjo *GeneChip® Exon 1.0 ST*, após leitura no *GeneChip® Scanner 3000 7G.***
Nota: Amostras CTRL3.

### 3.6.3 Processamento dos dados de microarranjo de DNA

*3.6.3.1 Normalização e sumarização dos dados*

O processo de normalização denominado *Quantile Normalization* foi aplicado em conjunto com os seguintes algoritmos, necessários para a sumarização dos dados: RMA *(Robust Multi-Array Analysis*) (Irizarry et al. 2003) – para análise dos controles de qualidade, iterPLIER (*Iterative Probe Logarithmic Intensity Error*, *Affymetrix*, Santa Clara, EUA) – para expressão gênica diferencial. Gerando assim, para cada microarranjo um arquivo no formato. *CHP*, de acordo com o nível gênico avaliado (*core, extension* e *full*).

Ambas etapas foram realizadas, utilizando os programas *Affymetrix Expression Consult*$^{em}$ *Software v.1.0* (EC, *Affymetrix*, Santa Clara, EUA) e *Affymetrix Power Tolos* (APT, *Affymetrix*, Santa Clara, EUA). O APT foi executado sob a interface gráfica do pacote de programas do projeto *Bioconductor* (http://www.bioconductor.org), denominado *oneChannelGUI* v.1.8.8., desenvolvido em ambiente de programação estatístico R – http://r-project.org (Sanges et al. 2007).

*3.6.3.2 Controle de Qualidade*

Os parametros de controle de qualidade denominados: *Poly spikes*, *Bac spikes*, *Pos_vs_neg_auc, All probe set mean*, *All probe set RLE mean, %* P, *PM_mean* e *Bgrd_mean*, foram avaliados de acordo com as recomendações sugeridas pelos fabricantes (Quality Assessment of Exon and Gene Arrays; Quick Reference Card - QC Metrics for Exon and Gene Design Expression Arrays – *Affymetrix,* Santa Clara, EUA) e através do programa *Affymetrix Expression Console™ Software v.1.0* (EC; *Affymetrix*, Santa Clara, EUA).

Após esta avaliação, os dados processados foram importados para o programa *Partek® GS for Exon Data* (*Partek*, St. Louis, EUA), para análise do componente principal, tridimensional (PCA-3D), a fim de eliminar as amostras que estivessem divergentes das demais réplicas biológicas (*Identifying and Validating Alternative Splicing Events – Technical Note*, *Affymetrix*, Santa Clara, EUA).

*3.6.3.3 Filtros*

Uma vez selecionados os microarranjos que continuaram na análise, após avaliação dos controles de qualidade, os arquivos *.CEL* destes microarranjos, foram novamente submetidos à normalização pelo método *Quantile Normalization* e sumarização para gene nível pelo algoritmo iterPLIER, e realizado o cálculo de DABG (*detection above background*), através do programa APT sob interface gráfica do programa *oneChannelGUI v.1.8.8.*

Os filtros aplicados foram: 1- Filtering by IQR - que exclui os genes que estivessem fora do intervalo inter-quartilis de 0,25 da distribuição de intensidades; *2- Filtering on DABG p-value* - exclui genes com $p < 0,05$ para DABG e acima de 100% do ruído de fundo; 3- Setting to 0 log2 intensity below 1 – remoção dos genes cuja intensidade estivesse muito próxima ao zero.

*3.6.3.4 Análise estatística dos dados de microarranjo de DNA*

As análises estatísticas para expressão gênica diferencial entre os grupos IAM com SST e controle foram executadas utilizando o modelo linear e o método empírico de *Bayes,* implementados no pacote LIMMA (*Linear Models for Microarray Data*) (Gentleman et al. 2004), através da interface gráfica do programa *oneChannelGUI v.1.8.8.*(Sanges et al. 2007). As listas de genes diferentemente expressos foram comparados entre si por Diagramas de *Venn*, através do programa *Partek® GS for Exon*

*Data* (Partek, St. Louis, EUA). Foram considerados estatisticamente significantes as diferenças de expressão de RNAm cujos níveis descritivos foram inferiores a 0,001 e *Fold Change* ± 1,0.

### 3.6.4 Validação Técnica pela PCR em tempo real

Definiu-se validação técnica a investigação da correlação dos resultados obtidos de expressão de RNAm por análises de microarranjo de DNA com os resultados da expressão da PCR em tempo real, utilizando um mesmo grupo amostral, grupo IAM com SST e grupo controle.

#### *3.6.4.1 Seleção de genes-candidatos para validação técnica*

Ao término das análises estatística os genes diferentemente expressos, foram submetidos à avaliação biológica através no programa *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) (*Ingenuity® Systems*, Califórnia, EUA).

IPA disponibiliza um vasto banco de dados de genes e proteínas que, de forma dinâmica, auxilia na visualização de suas associações gênicas e protéicas, com medicamentos, vias metabólicas, funções metabólicas e doenças já descritas na literatura científica. Assim que o programa IPA auxiliou na seleção dos genes-candidatos a biomarcadores de doenças cardiovasculares a serem validados tecnicamente e, posteriormente, biologicamente pela PCR em tempo real.

Foram considerados os seguintes critérios de seleção, nesta ordem de relevância:

1) genes diferentemente expressos na primeira colheita para 1º IAM com SST que já foram associados com doença arterial coronariana e/ou com o desenvolvimento cardiovascular em estudos anteriores de acordo com IPA ($p<0,001$ e *Fold Change* ± 1,0);

2) genes diferentemente expressos comuns entre os grupos 1º IAM com SST e 2º IAM com SST, independente da variavel infarto prévio e tempo de colheita, que já foram associados com doença arterial coronariana e/ou com o desenvolvimento cardiovascular em estudos anteriores de acordo com IPA ($p<0,001$ e *Fold Change* ± 1,0);

3) genes diferentemente expressos na primeira colheita para 1º IAM com SST de acordo com o cálculo de p-valor ajustado por FDR < 0,05 (*false discovery rate*) (Benjamini & Hochberg 1995). Ainda que estes não estejam associados com doença arterial coronariana e/ou com o desenvolvimento cardiovascular em estudos anteriores de acordo com IPA;

4) genes diferentemente expressos em mais de um tempo de colheita para 1º IAM com SST e 2º IAM com SST que já foram associados com doença arterial coronariana e/ou com o desenvolvimento cardiovascular em estudos anteriores de acordo com IPA, sendo p<0,001 e *Fold Change* ± 1,0, exceto para o 1º IAM com SST $T_2$ que estabeleceu como critério p<0,001 e *Fold Change* ± 2,0.

5) genes diferentemente expressos na primeira colheita para 1º IAM com SST ou 2º IAM com SST que não estejam associados com doença arterial coronariana e/ou com o desenvolvimento cardiovascular em estudos anteriores de acordo com IPA e p-valor ajustado por FDR > 0,05.

6) genes diferentemente expressos na segunda e terceira colheita para 1º IAM com SST, que já foram associados com doença arterial coronariana e/ou com o desenvolvimento cardiovascular em estudos anteriores de acordo com IPA (p<0,001 e *Fold Change* ± 1,0) e ainda apresentem p-valor ajustado por FDR < 0,05.

Foram selecionados 33 genes-candidatos a biomarcadores de doenças cardiovasculares a serem validados tecnicamente pela PCR em tempo real.

*3.6.4.2 Síntese de cDNA para validação técnica*

A partir 1 ug de RNA total extraído de sangue periférico dos pacientes IAM com SST e controle o cDNA foi gerado utilizando-se o *High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix* (*Applied Biosystems*, Foster City, EUA) que contém iniciadores aleatórios (*random primers*), dNTPs, transcriptase reversa e tampão da enzima. O ensaio de transcriptase reversa (TR) foi realizado em termociclador *Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler* (*Applied Biosystems,* Foster City, EUA), com as seguintes etapas: 25ºC por 5 min, 42ºC por 30 min e 85ºC por 5 min. O cDNA obtido foi armazenado a -20ºC até a etapa de pré-amplificação.

*3.6.4.3 Pré-amplificação para validação técnica*

Devido ao baixo rendimento obtido no processo de extração de RNA através do *PAXgene™ Blood RNA Kit* e, na necessidade de processá-lo para posterior hibridização em microarranjo de DNA, a concentração e volume restante para a etapa de validação, foi limitada. Desta forma, optamos em executar apenas uma reação de TR para cada amostra e, a partir do cDNA, realizar uma pré-amplificação múltipla através do *TaqMan® PreAmp Master Mix* (*Applied Biosystems*, Foster City, EUA), com o conjunto de iniciadores dos genes selecionados para validação pela PCR em tempo real, de cada

gene individualmente. Para esta finalidade, utilizou-se 250 ng de cDNA, 2X do reagente *TaqMan® PreAmp Master Mix* e 0.2X de todos os iniciadores dos genes selecionados. O ensaio de pré-amplificação foi realizado em termociclador *Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler* (*Applied Biosystems,* Foster City, EUA), com as seguintes etapas: etapa inicial a 95ºC por 10 min (desnaturação inicial), amplificação por 14 ciclos a 95ºC por 15 e 60ºC por 4 min (extensão). O cDNA pré-amplificado foi então diluído na razão 1:20 com tampão Tris-1 [Tris-HCL a 10 mM/L (pH 8,0)] e armazenado a -20ºC até a PCR em tempo real.

*3.6.4.4 PCR em tempo real e análise estatística para validação técnica*

A medida quantitativa da expressão do RNAm de cada gene selecionado, foi realizada pela PCR em tempo real, utilizando o sistema de amplificação *TaqMan® PCR* (Applied Biosystems, Foster City, EUA). A análise da expressão gênica foi realizada por método de quantificação relativa, utilizando o gene GAPDHS (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)* como referência endógena. As sequências dos iniciadores e das sondas marcadas com fluorófuro, foram fornecidas (em solução 20 vezes concentrada) pelo serviço "*Assay by design*" (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA) e o código identificador dos 33 genes-candidatos a biomarcadores de doenças cardiovasculares (*Assay ID*), foi fornecido pelo fabricante. Estes dados estão descritos na Tabela 1.

A escolha dos oligonucleotídeos iniciadores para a PCR em tempo real foram realizadas observando as intensidade logarítmica de cada exon do gene selecionado, a fim de minimizar a possibilidade de avaliar a expressão de diferentes transcritos, como por exemplo, produtos de *splicing* alternativo. Esta observação foi possível através da sumarização dos dados de microarranjo de DNA a "exon nível" com o algoritmo PLIER (*Iterative Probe Logarithmic Intensity Error*, *Affymetrix*, Santa Clara, EUA) através do programa APT sob interface gráfica do programa *oneChannelGUI v.1.8.8.* (http://www.bioconductor.org; CALOGERO, 2007).

Buscou-se selecionar o gene de referência que apresentasse intensidade de expressão logarítimica próxima à média de intensidades observadas nos genes-candidatos e com menor coeficiente de variação possível. O gene de referência selecionado foi *GAPDHS*.

Os cDNA dos genes selecionados e do GAPDHS foram amplificados pela PCR individual. Os ensaios foram realizados no termociclador ABI Prism 7500 (*Applied*

*Biosystems*, Foster City, EUA). Nos ensaios de amplificação, utilizaram-se iniciadores a 90 nM e sonda de detecção marcada com FAM™ (fluorófuro 6-carboxifluoresceína) a 250 nM. Os demais reagentes foram fornecidos em solução 2x concentrada, denominada *TaqMan® Gene Expression Master Mix*, contendo dNTPs com dUTP, AmpErase® UNG (Uracil N- glicosilase), enzima *AmpliTaq Gold® DNA Polymerase*, uma referência passiva e tampão de reação *Gold PCR Buffer* (*Applied Biosystems*, Foster City, EUA). Foi utilizado volume final de 25µL por reação.

O programa da PCR em tempo real utilizado, foi constituído de: (1) um ciclo de 2 min a 50ºC, (ativação da UNG); (2) um ciclo de 10 min a 95ºC, (inativação da UNG); 40 ciclos de 15 seg a 95ºC (desnaturação) e 1 min a 60ºC (hibridização e extensão). Os sinais de fluorescência emitidos pelos fluorófuros das sondas *TaqMan®*, foram detectados pelo equipamento ABI Prism 7500 (*Applied Biosystems,* Foster City, EUA). Os dados foram analisados, utilizando-se o programa *Sequence Detection Software* v1. 2.3 (*Applied Biosystems,* Foster City, CA, EUA) que gera curvas semi-logarítmicas dos sinais de amplificação. Para a quantificação relativa da expressão gênica, foi utilizado o método comparativo com ciclo de *threshold* ($C_T$)(Livak and Schmittgen 2001). A fórmula utilizada foi $2^{-\Delta CT}$, onde $\Delta C_T = C_{T\ \text{gene de interesse}} - C_{T\ \text{gene de referência.}}$ Os resultados obtidos da PCR em tempo real e, as intensidades de sinais de expressão dos dados processados de microarranjo de DNA, por fim, foram submetidos à análise de correlação não paramétrica por teste de *Rank* de *Spearman,* através do programa *Partek® GS for Exon Data* (*Partek*, St. Louis, EUA). O coeficiente de correlação (*r*) é apresentado em uma escala de -1 a +1, valor mais próximo de +1 significa correlação perfeita positiva e -1 correlação perfeita negativa. Classificou-se como baixa correlação, quando $r \leq 0{,}45$; moderada quando entre 0,46 a 0,69, alta correlação quando $r \geq 0{,}70$, para o nível de significância estabelecido de $p < 0{,}05$.

### 3.6.5 Validação Biológica pela PCR em tempo real

Genes-candidatos a biomarcadores de doenças cardiovasculares cujo coeficiente correlação por teste de *Rank* de *Spearman* foi superior a 45% (*p*-valor < 0.05) entre os dados de expressão por microarranjo de DNA e PCR em tempo real foram submetidos à validação biológica.

Validação biológica neste estudo consistiu em avaliar se os genes candidatos foram diferentemente expressos entre os pacientes com SCA e indivíduos saudáveis a partir de

uma nova casuística selecionada, isto é, pacientes do grupo SCA para validação biológica e grupo controle para validação biológica.

A extração de RNA, síntese de cDNA e condições da PCR em tempo real para a validação biológica foram realizados das mesmas forma que na etapa anterior de validação técnica, sendo desnecessária a pré-amplificação múltipla através do *TaqMan*® *PreAmp Master Mix* (*Applied Biosystems*, Foster City, EUA).

Tabela 1. Código identificador do conjunto de iniciadores e sondass fornecidos pelo serviço "*Assay by design*" (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

| **Gene** | ***Assay ID*** |
|---|---|
| ABCA1 | Hs01059137_m1 |
| ADORA3 | Hs00252933_m1 |
| ALOX15 | Hs00609608_m1 |
| AREG | Hs00155832_m1 |
| BCL2A1 | Hs00187845_m1 |
| BCL2L1 | Hs00169141_m1 |
| CA1 | Hs00266139_m1 |
| COX7B | Hs00371307_m1 |
| CREM | Hs01590456_m1 |
| CSF1 | Hs00174164_m1 |
| ECHDC3 | Hs00226727_m1 |
| FOLR3 | Hs00357145_g1 |
| GAPDHS | Hs00266705_g1 |
| GPX3 | Hs00173566_m1 |
| GSTM1 | Hs01683722_gH |
| IL18R1 | Hs00175381_m1 |
| IL1R1 | Hs00991010_m1 |
| IL1RL1 | Hs00545034_g1 |
| IL5RA | Hs00602482_m1 |
| IRS2 | Hs00275843_s1 |
| KCNE1 | Hs00897540_s1 |
| MMP9 | Hs00957562_m1 |
| MYL4 | Hs00267321_m1 |
| MYO5C | Hs00218921_m1 |
| PER1 | Hs00242988_m1 |
| POLE2 | Hs00160277_m1 |
| RCN3 | Hs00276633_m1 |
| SAMSN1 | Hs00223275_m1 |
| SLC29A1 | Hs01085706_m1 |
| SLITRK4 | Hs00331273_s1 |
| SMPD3 | Hs00218713_m1 |
| THBS1 | Hs00170236_m1 |
| TLR4 | Hs00152937_m1 |
| TREML4 | Hs01080584_g1 |

Nota: Gene, de acordo com a nomenclatura HUGO (*Human Genome Organization*); *Assay ID*, código identificador fornecido pelo fabricante.

## 3.7 ANÁLISE PROTEÔMICA

No presente estudo, a análise foi realizada com o plasma dos pacientes do grupo IAM com SST e grupo controle.

### 3.7.1 Obtenção do plasma

Para análise do perfil de proteínas plasmáticas, o sangue periférico foi colhido com o tubo de heparina *Vacutainer*$^{TM}$ (*Becton Dickinson Company*, Plymouth, Reino Unido). O plasma foi separado por centrifugação a 1500 *x* g por 30 min (em período de no máximo 2 h após a colheita), distribuídos em alíquotas de 0,5 mL e armazenados a -80ºC, até o momento do processamento (PROTEINCHIP SYSTEM USERS GUIDE, 2006).

### 3.7.2 Purificação do plasma

O fluxo de processamento das amostras de plasma para análises encontra-se representado na Figura 9.

Com o propósito de eliminar quatorze proteínas mais abundantes (albumina, IgM, IgG, IgA, hepatoglobinas, transferrina, α1-antitripsina, fibrinogenio, α2- macroglobunina, α1-ácido glicoproteina, apolipoproteina AI, apolipoproteina AII, complemento C3 e transferrina), que correspondem a 85% da massa total de proteínas plasmáticas e, facilitar a identificação de componentes menores e em menor abundância, procedeu-se o a remoção de acordo com fabricante *Multiple Affinity Removal Spin Cartridge System* (*Agilent Technologies Inc*., Wilmington, USA). O processamento consistiu em: diluição em 16X com tampão A; filtração em coluna de 0.22 µm, lavagens e concentração final com *Nanosep 3K Omega Centrifugal Device* (*Pall Life Sciences*, Port Washington, USA).

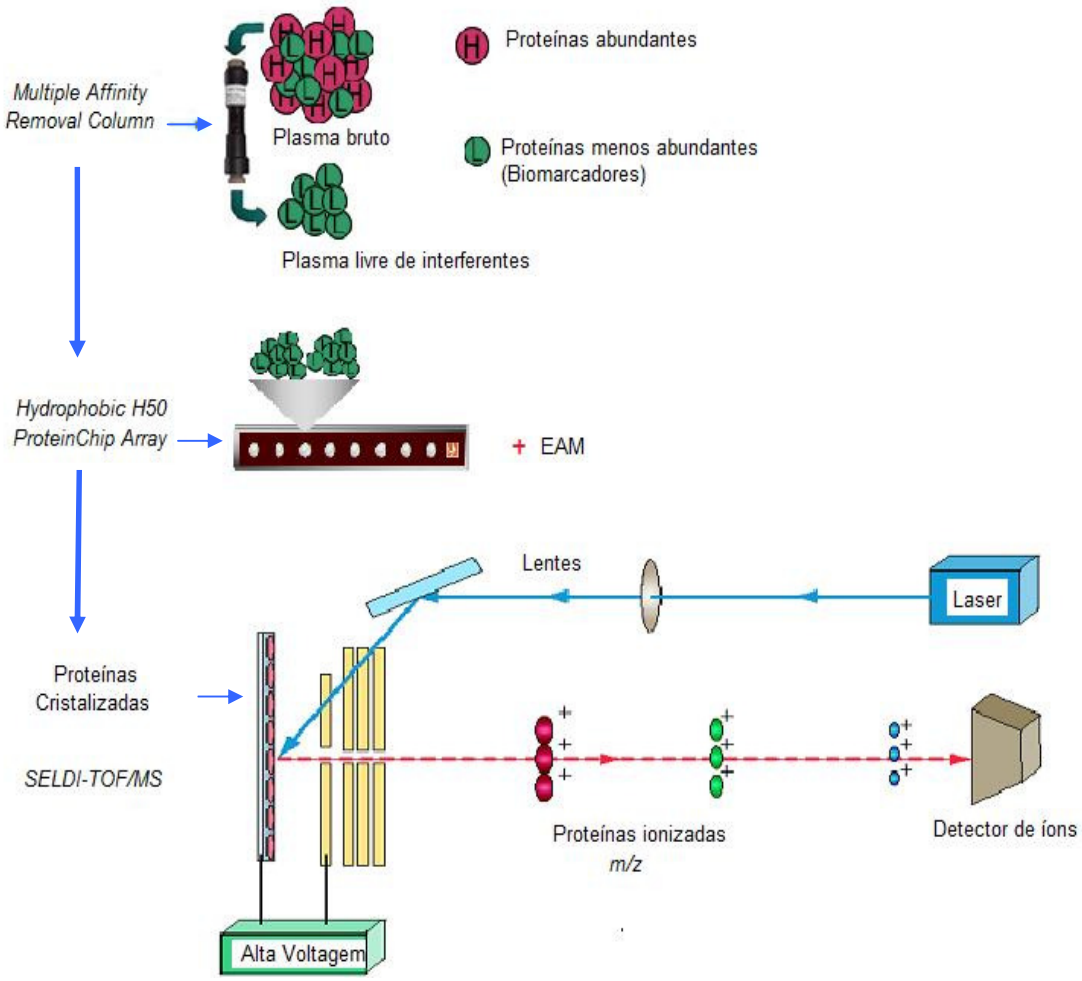



Figura 9. **Esquema do fluxo de processamento do plasma para análise proteômica através do SELDI-TOF/MS.** Iniciando uma etapa de purificação de protéinas abuntantes, seleção em matriz hidrofóbica, cristalização através da adição da solução EAM, ionização das proteínas e seu vôo (campo magnético/vácuo ) até o dector de íons.
Nota: SELDI-TOF/MS, do inglês *Surface Enhanced Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry;*EAM, do inglês, *Energy Absorbing Matrix sinapinic acid*; m/z, relação massa molecular e a carga ionizada; +, carga positiva da molécula ionizada.

### 3.7.3. SELDI-TOF/MS processamento e análise estatística

As amostras de plasma purificado foram conservadas em gelo seco para o transporte e, enviadas pela transportadora OCASA Soluções Logística (São Paulo, Brasil), aos colaboradores *Sun Biomedic Tecnology* (*SunBMT*, Lomalinda, EUA), para dar continuidade ao processamento das amostras.

Dezenove microlitros de cada amostra, juntamente com o tampão de ligação (9 M de uréia e 30 mg/ml de *CHAPS*), foram inseridos em uma matriz de interação hidrofóbica previamente tratadas com solução de 50% de acetonitrilo, denominada *Hydrophobic H50 ProteinChip arrays* (*Bio-Rad Laboratories*, Hercules, CA). Em

seguida, após lavagem, aplicou-se sob o orifício da matriz 1 µl da solução EAM (*Energy Absorbing Matrix sinapinic acid)*, que contém solução saturada de 50% de acetonitrilo e 0.5% de ácido trifluoroacético.

A interação com as proteínas retidas e a EAM, após secagem, formam cristais que possibilitam a análise individual das proteínas e peptídeos através do sistema SELDI-TOF/MS, utilizando-se o equipamento *Protein Reader System PBS-IIC* (*Ciphergen Biosystems* Inc., Fermont, EUA). Este espectômetro foi calibrado rigorosamente a cada leitura das amostras, com proteínas padrões, fornecidas pelo fabricante, *All-in-One Peptide Standard mass standard*, e foi capaz de detectar moléculas entre 2 a 20 kDa (PROTEINCHIP SYSTEM USERS GUIDE, 2006), sendo *m/z* a relação massa molecular e a carga ionizada da molécula.

Os dados foram normalizados com algoritmos desenvolvidos pela própria empresa colaboradora SunBMT, através do programa de bioinformática *Matlab 7.0* (Matlab Bioinformatics software) e, filtrados através do programa *BRB Array Tools* versão 3.7.2 (http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html), para espectros de proteínas com intensidade logarítmica acima do ruído de fundo ($p < 0.01$).

Os testes estatísticos foram gerados a partir das comparações entre os tempos de colheita para 1º IAM com SST e 2º IAM com SST em relação ao grupo controle. Utilizou-se o teste estatístico *t* de *Student* através do programa *Partek® GS for Exon Data* (*Partek*, St. Louis, EUA). Classificou-se como pico de proteína diferentemente expresso quando $p < 0,05$ e *Fold Change* ± 1,5. *Fold Change* definido como logaritmo na base 2, das diferenças entre as médias de expressão gênica de um dado gene ou proteína (Choe et al. 2005).

# 4 RESULTADOS

## 4.1 CASUÍSTICA

### 4.1.1 Grupo IAM com SST

Inicialmente foram selecionados 18 pacientes com IAM com SST, oito destes não preencheram os critérios clínicos de inclusão. Três apresentaram dor precordial por mais tempo que 8 h; um paciente foi considerado Diabético por fazer tratamento com hipoglicemiantes orais; dois pacientes embora apresentassem dor precordial do tipo isquêmica e ECG com SST, durante o processo de intervenção coronária percutânea constatou ausência de lesão das artérias coronárias; e por fim, dois pacientes desistiram de continuar no protocolo de pesquisa após 24 h.

O grupo IAM com SST foi subdivido em 5 pacientes sem infarto prévio (1º IAM com SST) e 5 com infarto prévio (2º IAM com SST), uma vez que este último fez uso diário de medicação prévia ambulatorial comum à pacientes após IAM (Tabela 1).

### 4.1.2 Grupo controle

Inicialmente foram selecionados 12 indivíduos controles. Seis não preencheram os critérios clínicos de inclusão. Um indivíduo apresentou resposta isquêmica durante o teste ergométrico; cinco foram excluídos por apresentarem alterações nos exames laboratoriais de triagem, ácido úrico elevado (1); CK-MB com valor duas vezes acima do valor de referência (1); ALT elevado (1); glicemia elevada (1); PCRu elevado (1).

Vale destacar que se buscou realizar um pareamento entre o grupo controle e IAM com SST, selecionando indivíduos que tivessem a mesma faixa-etária, os mesmos hábitos de vida e fatores de riscos semelhantes aos dos indivíduos com IAM com SST. Também se optou por indivíduos que não estivessem fazendo uso de medicações por pelo menos uma semana antes da realização da colheita de sangue periférico.

### 4.1.3 Grupo SCA para validação biológica

Foram recrutados 74 pacientes com SCA que faziam parte da rotina do Pronto-Socorro. Assim como proposto para o grupo IAM com SST, os pacientes foram subdivididos de acordo com antecedentes de infarto prévio, uma vez que estes apresentaram antecedentes de medicação prévias ambulatoriais comuns à pacientes após IAM.

O grupo 1º SCA, sem infarto prévio, selecionado para a etapa de validação biológica, foi composto por 11 pacientes com angina instável, 28 pacientes com IAM sem SST e 6 pacientes com IAM com SST, totalizando 45 pacientes.

Já o grupo 2º SCA, com infarto prévio, selecionado para a etapa de validação biológica foi composto por 15 pacientes com angina instável, 13 pacientes com IAM sem SST e 1 pacientes com IAM com SST, totalizando 39 pacientes.

### 4.1.4 Grupo controle para validação biológica

Foram recrutados 41 indivíduos do grupo controle para validação biológica, todos não apresentavam história ou evidencia de doença clínica atual, ou doença arterial coronária, de acordo com anamnese e teste ergométrico considerado totalmente dentro da normalidade, realizado na seção de Reabilitação do IDPC.

### 4.1.5 Dados demográficos

As características antropométricas, clínicas, concentrações séricas de lipídeos, bem como exames realizados na triagem para os pacientes com IAM com SST e grupo controle, estão descritas na Tabela 2. Os dados demográficos para o grupo IAM com SST são apresentados em pacientes com e sem infarto prévio.

Os grupos apresentaram distribuições similares quanto à idade, hábitos de fumar, consumo de álcool, sedentarismo, valores de índice de massa corpórea (IMC), proporções de indivíduos hipertensos, com história familiar para doença coronária precoce e concentrações séricas de lipídeos ($p > 0,05$).

Os pacientes com ou sem infarto prévio quando comparados com o grupo controle apresentaram valores médios de glicemia em jejum semelhantes e dentro dos padrões de normalidade, de acordo com a Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2008). Os demais exames de triagem como: uréia, creatinina, ácido úrico, T4 livre e TSH, não apresentaram diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

Como esperado, os pacientes dos grupos IAM com SST apresentaram valores significativamente mais elevados com relação às enzimas hepáticas AST, ALT, quando comparados com o grupo controle ($p<0,05$). Para excluir a presença de doença hepática, avaliou-se a atividade da gama-glutamiltransferase no soro dos pacientes com ALT elevado, e todos apresentaram valores dentro dos padrões de referência normal.

As características antropométricas, clínicas, concentrações séricas de lipídeos, bem como exames realizados na triagem para os pacientes com síndrome coronária aguda e

do grupo controle para validação biológica, estão descritas na Tabela 3. Os dados são apresentados de acordo com infarto prévio, 1º SCA e 2º SCA.

A média de idade foi maior em pacientes com 1º SCA ou 2º SCA quando comparados ao grupo controle ($p < 0,01$). Característica própria em doenças cardiovasculares de ocorrerem com maior frequência em indivíduos com idade mais avançada.

Ao comparar os dados apresentados pelos indivíduos dos grupos 1º SCA ou 2 SCA, verificou-se que há uma distribuição similar quanto ao gênero, frequência de Diabetes *Mellitus,* hipertensão, tabagismo, valores elevados de colesterol LDL, IMC, frações do colesterol (HDL, LDL, VLDL e triglicerídeos), glicose, creatinina, AST, ALT, leucócito, T4 livre, TSH, PCRu, angina instável ou IAM com SST ($p>0,05$). No entanto, as concentrações de uréia e colesterol total e a frequência de pacientes com IAM sem SST foram significativamente diferentes entre os dois grupos ($p < 0,05$; dados em negrito na tabela 3).

Tabela 2. Características clínicas, variáveis antropométricas, perfil lipídico, bioquímicos e hematológicos dos grupos 1º IAM com SST, 2º IAM com SST e controle.

| | GC (6) | 1° IAM com SST (5) | 2° IAM com SST (5) | *p** |
|---|---|---|---|---|
| Idade (anos) | 48 ± 8 | 53 ± 10 | 53 ± 11 | 0.42 |
| IMC (kg/m2) | 26 ± 2 | 27 ± 5 | 26 ± 3 | 0.97 |
| Hipertensão n° (%) | 2 (33) | 2 (40) | 5 (100) | 0.58 |
| Tempo de dor (horas) | N.A. | 3 ± 3 | 3 ± 1 | 0.59 |
| Histórico Familiar para doença coronária | 0 | 2 (40) | 2 (40) | 0.20 |
| Fumante n° (%) | 4 (67) | 3 (60) | 4 (80) | 0.78 |
| Sedentarismo n° (%) | 5 (83) | 2 (40) | 3 (60) | 0.33 |
| Medicação prévia ambulatorial n° (%) | 0 | 0 | 5 (100) | N.A. |
| Antiagregante n° (%) | 0 | 0 | 5 (100) | N.A. |
| Estatinas n° (%) | 0 | 0 | 4 (80) | N.A. |
| Betabloqueadores n° (%) | 0 | 0 | 4 (80) | N.A. |
| Diuréticos n° (%) | 0 | 0 | 1 (20) | N.A. |
| Nitratos n° (%) | 0 | 0 | 1 (20) | N.A. |
| Colesterol Total (mmol/l) | 5,7 ± 1,2 | 5,3 ± 1,2 | 4,8 ± 0,7 | 0.41 |
| Colesterol HDL (mmol/l) | 0,4 ± 0,1 | 0,3 ± 0,0 | 0,3 ± 0,0 | 0.16 |
| Colesterol LDL (mmol/l) | 3,7 ± 1,1 | 3,7 ± 1,1 | 3,1 ± 0,7 | 0.53 |
| Colesterol VLDL (mmol/l) | 0,5 ± 0,2 | 0,3 ± 0,3 | 0,4 ± 0,2 | 0.44 |
| Triglicerídeos (mmol/l) | 2,3 ± 0,8 | 1,7 ± 1,5 | 2,0 ± 0,8 | 0.48 |
| Glicose (mmol/l) | 5,4 ± 0,4 | 5,5 ± 0,6 | 5,4 ± 0,6 | 0.88 |
| Uréia (mmol/l) | 11,7 ± 2,0 | 9,7 ± 2,1 | 9,7 ± 1,3 | 0.21 |
| Creatinina (µmol/l ) | 88,3 ± 17,7 | 79,5± 17,7 | 79,5 ± 8,8 | 0.35 |
| Ácido Úrico (mmol/l) | 0,3 ± 0,1 | 0,3 ± 0,1 | 0,3 ± 0,0 | 0.10 |
| T4 livre (pmol/L) | 16,8 ± 1,3 | 10,3 ± 2,6 | 11,6 ± 1,3 | 0.05 |
| TSH (mU/L) | 1,9 ± 1,1 | 1,3 ± 0,7 | 0,9 ± 0,5 | 0.08 |
| ALT | 0,4 ± 0,0 | 3,5 ± 1,8 | 2,6 ± 2,5 | 0.01 |
| AST | 0,4 ± 0,1 | 1,2 ± 0,5 | 1,1 ± 0,3 | <0,01 |

Nota: Número de indivíduos entre parênteses; As variáveis contínuas estão apresentadas como média ± DP, comparadas por testes não paramétricos de *Kruskal-Wallis**. Variáveis categóricas foram comparadas pelo teste do Qui-quadrado ($\chi^2$). As variáveis categóricas que apresentam valor zero para GC foram comparadas pelo teste exato de *Fisher* entre os grupos 1º IAM com SST e 2º IAM com SST. Os indivíduos com pressão sistólica e diastólica igual ou superior a 140/90 mmHg ou submetidos à terapia anti-hipertensiva, foram considerados hipertensos (ARTERIAL HYPERTENSION WORK GROUPS, 2004). IMC, índice de massa corpórea; HDL, lipoproteína de alta densidade; LDL, lipoproteína de baixa densidade; VLDL, lipoproteína de muito baixa densidade; T4 livre, tiroxina livre; TSH, hormônio tireoestimulante; AST, aspartato-amino-transferase; ALT, alanina-amino-transferase; N.A., não se aplica; GC, grupo controle; 1° IAM com SST, grupo de pacientes com IAM com SST sem infarto prévio; 2° IAM com SST, grupo de pacientes com IAM com SST com infarto prévio

Tabela 3. Características clínicas, variáveis antropométricas, perfil lipídico, bioquímicos e hematológicos dos grupos 1º SCA, 2º SCA e controle para validação biológica.

| | **GC (41)** | **1°SCA (45)** | **2° SCA (39)** | ***p**** |
|---|---|---|---|---|
| Idade (anos) | 40,4 ± 6,9 | **59,2** ± 10,7 | **65,0** ± 11,2 | **<0,01** |
| IMC (kg/m2) | 24,3 ± 3,4 | 27,9 ± 4,9 | 29,3 ± 4,4 | <0,01 |
| Homens nº (%) | 33 (80) | 35 (78) | 22 (76) | 0.89 |
| Diabetes *Mellitus* nº (%) | 0 (0) | 9 (20) | 14 (48) | 0.23 |
| Hipertensão nº (%) | 0 (0) | 27 (60) | 24 (83) | 1.00 |
| LDL-c Alto nº (%) | 22 (45) | 23 (44) | 14 (48) | 0.23 |
| Fumante nº (%) | 3 (7) | 17 (38) | 8 (29) | <0,01 |
| Sedentarismo nº (%) | 1 (2) | 30 (70) | 25 (89) | <0,01 |
| Colesterol Total (mmol/l) | 4,8 ± 0,9 | **5,2** ± 1,5 | **4,3** ± 1,3 | **0.01** |
| Colesterol HDL (mmol/l) | 0,6 ± 0,2 | 0,5 ± 0,3 | 0,4 ± 0,1 | <0,01 |
| Colesterol LDL (mmol/l) | 2,8 ± 0,8 | 3,2 ± 1,3 | 2,8 ± 1,3 | 0.30 |
| Colesterol VLDL (mmol/l) | 0,2 ± 0,2 | **0,4** ± 0,2 | **0,3** ± 0,1 | **<0,01** |
| Triglicerídeos (mmol/l) | 1,1 ± 0,6 | 2,4 ± 2,1 | 2,2 ± 2,5 | <0,01 |
| Glicose (mmol/l) | 5,0 ± 0,6 | 5,9 ± 2,7 | 6,3 ± 1,8 | <0,01 |
| Uréia (mmol/l) | 11,9 ± 2,8 | **14,9** ± 6,1 | **18,2** ± 7,0 | **<0,01** |
| Creatinina (µmol/l ) | 79,6 ± 17,7 | 88,4 ±17,7 | 88,4 ± 8,8 | <0,01 |
| AST (U/L) | 31,2 13,8 | 60,9 ± 111,7 | 43,8 ± 29,4 | 0.43 |
| ALT (U/L) | 34,9 ± 34,4 | 35,1 34,0 | 28,9 ± 14,2 | 0.6 |
| Leucócitos | 6,2 ± 1,7 | 7,8 ± 2,1 | 8,1 ± 2,8 | <0,01 |
| T4 livre (pmol/L) | 17,5 ± 3,1 | 16 ± 2,3 | 15,2 ± 3,1 | 0.05 |
| TSH (mU/L) | 2,0 ± 2,3 | 2,6 ± 2,7 | 2,3 ± 1,7 | 0.06 |
| PCRu (mg/L) | 1,09 ± 0,85 | 2,18 ± 3,96 | 4,07 ± 12,21 | 0.90 |
| Angina instável nº (%) | 0 (0) | 11 (24) | 15 (52) | 0.40 |
| IAM sem SST nº (%) | 0 (0) | **28 (62)** | **13 (45)** | **0.01** |
| IAM com SST nº (%) | 0 (0) | 6 (13) | 1 (3) | 0.15 |

Nota: Número de indivíduos entre parênteses. As variáveis contínuas estão apresentadas como média ± DP, comparadas entre os grupos GCb, 1º SCA e 2º SCA por testes não paramétricos de *Kruskal-Wallis**. Variáveis categóricas foram comparadas pelo teste do Qui-quadrado ($\chi^2$). As variáveis categóricas que apresentam valor zero para GC foram comparadas pelo teste exato de *Fisher* entre os grupos 1º IAM com SST e 2º IAM com SST, resultados com $p < 0,05$ em negrito. Os indivíduos com pressão sistólica e diastólica igual ou superior a 140/90 mmHg ou submetidos à terapia anti-hipertensiva, foram considerados hipertensos (ARTERIAL HYPERTENSION WORK GROUPS, 2004). IMC, índice de massa corpórea; HDL, lipoproteína de alta densidade; LDL, lipoproteína de baixa densidade; VLDL, lipoproteína de muito baixa densidade; T4 livre, tiroxina livre; TSH, hormônio tireoestimulante; AST, aspartato-amino-transferase; ALT, alanina-amino-transferase; N.A., não se aplica; GCb, grupo controle para validação biológica; 1° SCA, grupo de pacientes com Síndrome Coronária Aguda sem infarto prévio; 2° IAM com SST, grupo de pacientes com Síndrome Coronária Aguda com infarto prévio.

### 4.1.6 Marcadores cardíacos e PCRu

Foram mensurados a cada tempo de colheita as concentrações sorológicas dos marcadores de isquemia cardíaca CK, CK-MB e cTnI, bem como as concentrações da PCRu para os pacientes IAM com SST e controle. As concentrações máximas observadas para os pacientes com IAM com SST com e sem infarto prévio se deu aproximadamente 12 h após evento. Já a PCRu apresentou aumento progressivamente ao largo do tempo avaliado, Tabela 4. Não houve diferenças significativas entre os

tempos de colheita de 1º IAM com SST em relação aos tempos de colheita de 2º IAM com SST ($p > 0,05$), exceto para CK nos tempos $T_{36}$ e $T_{48}$. Contudo, concentrações maiores podem ser observadas em1º IAM com SST que em 2º IAM com SST.

As concentrações mensuradas de cTnI, CK, CK-MB e PCRu para os indivíduos do grupo controle estão abaixo dos valores de referência [valores de referência para cTnI até 1,0 ng/mL; CK, homens < 232 U/L; CK-MB (atividade), 0 a 6 U/L; PCRu, até 1,1 mg/dL] (Ferrreira et al. 2005), excluíndo possível resposta isquêmica cardíaca neste grupo, corroborando com o teste ergométrico dentro do padrão de normalidade.

Tabela 4. Concentrações dos marcadores cardíacos cTnI, CK e CK-MB e PC-R observados nos pacientes com IAM com SST com e sem infarto prévio.

| | | cTnI (ng/mL) | CK (U/L) | CK-MB (U/L) | PCRu (mg/dL) |
|---|---|---|---|---|---|
| **1° IAM com SST** | **$T_0$** | 0 (0 – 0) | **257 (137 – 324)** | 3 (3 – 9) | 0,1 (0,0 – 0,8) |
| | **$T_2$** | **1,5 (0,4 - 3,8)** | 195 (74 - 333) | **9 (4 - 23)** | 0,1 (0,1 - 0,6) |
| | **$T_{12}$** | **26,8 (26,3 - 34,0)** | **1.306 (1.201 - 1.771)** | **69 (68 - 86)** | 0,4 (0,3 - 1,0) |
| | **$T_{24}$** | **21,2 (15,6 - 28,9)** | **940 (780 - 1.440)** | **44 (34 - 49)** | **1,2 (0,8 - 1,2)** |
| | **$T_{36}$** | **13,7 (13,5 - 19,8)** | **554 (550 – 746)** | **21 (18 - 25)** | **1,2 (0,7 - 1,2)** |
| | **$T_{48}$** | **9,7 (9,1 - 12,2)** | **449 (411 – 529)** | **9 (8 - 13)** | **1,1 (0,7 - 1,5)** |
| **2° IAM com SST** | **$T_0$** | 0,1 (0,1 - 0,2) | 112 (94 - 117) | 5 (3 - 6) | 0,1 (0,1 - 0,3) |
| | **$T_2$** | 0,8 (0,0 - 42,5) | 136 (72 - 1.046) | 4 (1 - 71) | 0,0 (0,0 - 0,2) |
| | **$T_{12}$** | **30,2 (4,6 - 72,1)** | **381 (288 - 1.912)** | **20 (17 - 126)** | **1,2 (0,4 - 2,0)** |
| | **$T_{24}$** | **7,1 (3,2 - 28,9)** | **269 (233 - 860)** | **12 (7 - 49)** | **1,7 (1,2 - 3,7)** |
| | **$T_{36}$** | **4,2 (3,0 - 24,3)** | 128 (128 – 518)* | 6 (4 - 23) | **2,2 (1,2 - 3,8)** |
| | **$T_{48}$** | **3,3 (2,8 - 16,5)** | 115 (72 – 304)** | **7 (5 - 11)** | **1,3 (0,6 - 4,3)** |

Nota: Variáveis contínuas apresentadas como mediana e intervalo interquartis (25%-75%).
1° IAM com SST, IAM com SST sem infarto prévio; 2° IAM com SST, IAM com SST com infarto prévio; cTnI, troponina I em ng/mL; CK, creatinoquinase em U/L; CK-MB (atividade) - creatinoquinase fração MB em U/L; PCRu – proteína C reativa em mg/dL; $T_0$, primeira colheita; $T_2$, segunda colheita após 2 h; $T_{12}$, terceira colheita após 12 h; $T_{24}$, quarta colheita após 24 h; $T_{36}$, quinta colheita após 36 h; $T_{48}$, sexta colheita após 48 h;
Em negrito, concentrações acima dos valores de referência: cTnI, até 1,0 ng/mL; CK, homens < 232 U/L; CK-MB (atividade), 0 a 6 U/L; PCRu, até 1,1 mg/dL (Ferrreira et al. 2005). *, $p = 0,03$ para teste não paramétrico de *Mann-Whiteny* entre 1º IAM com SST $T_{36}$ e 2º IAM com SST $T_{36}$. ;**, p=0,02 para teste não paramétrico de *Mann-Whiteny* entre os tempos de 1º IAM com SST $T_{48}$ e 2º IAM com SST $T_{48}$.
As demais comparações entre os tempos de 1º IAM com SST e 2º IAM com SST, não foram diferentes significativamente para o teste não paramétrico de *Mann-Whiteny* ($p > 0,05$).

## 4.2 ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA

### 4.2.1 Preparação dos dados de expressão gênica diferencial por microarranjo de DNA

Após extração de RNA total do sangue periférico de 76 amostras dos pacientes dos grupos 1º IAM com SST (cinco pacientes em sete tempos de colheita, totalizando trinta amostras), 2º IAM com SST (cinco pacientes em sete tempos de colheita, totalizando trinta amostras) e grupo controle (seis pacientes em um único tempo de colheita) foram preparadas e avaliadas suas concentrações e integridades para então serem inseridos nos microarranjos *GeneChip® Exon 1.0 ST Array* (*Affymetrix,* Santa Clara, EUA). Entretendo, somente 63 amostras estavam aptas para serem utilizadas para análises de expressão gênica em larga escala.

As distribuições das intensidades das sondas após leitura dos microarranjos de DNA através do equipamento - *GeneChip® Scanner 3000 7G* (*Affymetrix,* Santa Clara, EUA) foram normalizadas pelo método de RMA, através do programa EC. O resultado está apresentado na forma de gráfico de caixa de Box (*BoxPlot*), Figura 10. Nota-se que após a normalização, as intensidades são reduzidas a uma distribuição comum, permitindo uma comparação mais correta e não-tendenciosa. Nesta representação gráfica é possível observar que a amostra HT1 (indicada pela seta) apresenta uma distribuição de intensidade ligeiramente discrepante, em relação às demais amostras, após a normalização.

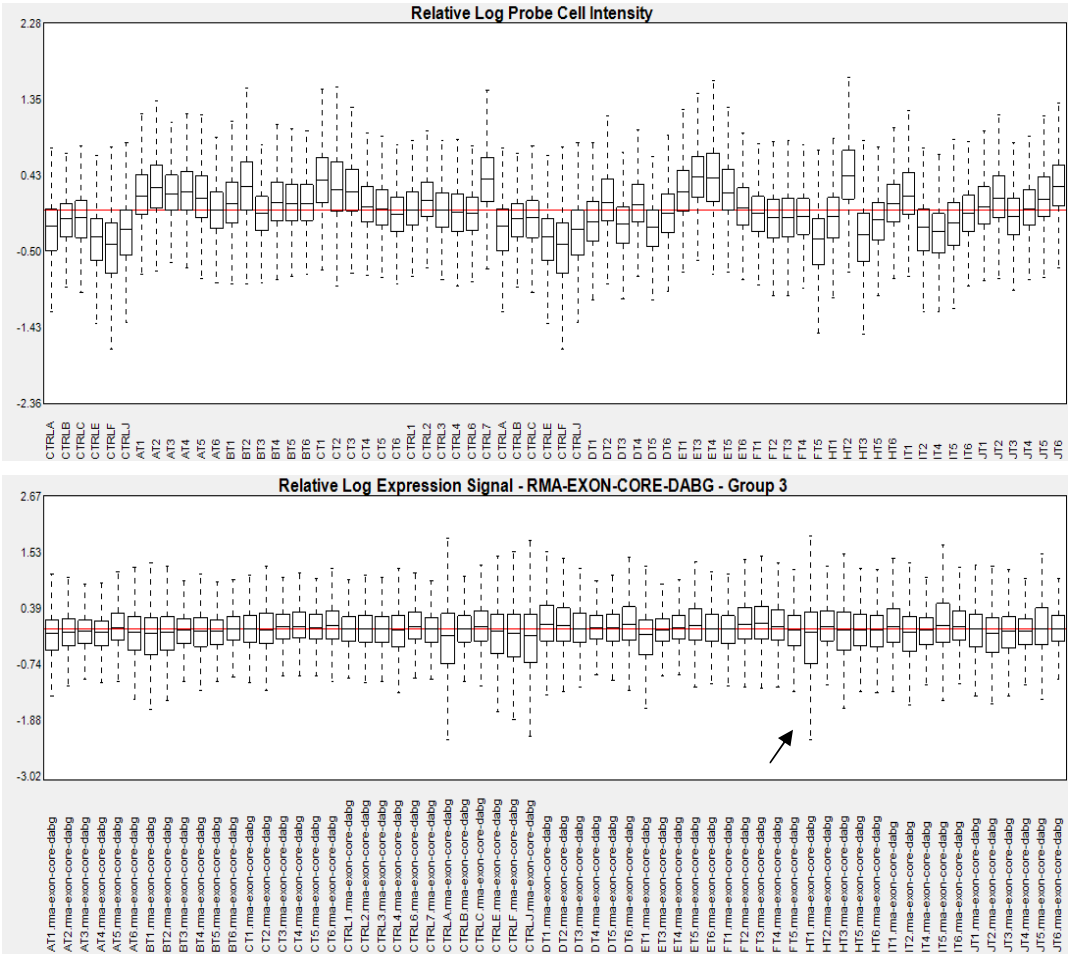



Figura 10. **Distribuição em gráfico *BoxPlot* das intensidades das sondas em escala logarítmica (eixo Y) por amostras (eixo X).** A, corresponde à distribuição antes da normalização pelo método RMA; B, após normalização. A linha vermelha representa a mediana das intensidades antes e após normalização.

Os controles exógenos inseridos antes da hibridização das amostras, controle *Bac spikes,* evidenciam que não houve problemas nas últimas etapas de processamento das amostras, pois mantiveram a concentração das mesmas e as intensidades nas seguintes proporções recomendadas: bioB < bioC < bioD < cre (Figura 11). Já com relação aos controles *Poly spikes*, ainda que as proporcionalidades das intensidades destes, não se mantiveram constantes em todas as amostras: lys ≤ phe < thr < dap, nota-se que há uma homogeneidade da distribuição das mesmas, com exceção da amostra HT1 (indicada pela seta, Figura 12), sugerindo que houve perda do material durante o processamento, resultando na diminuição das intensidades destes controles nesta amostra.

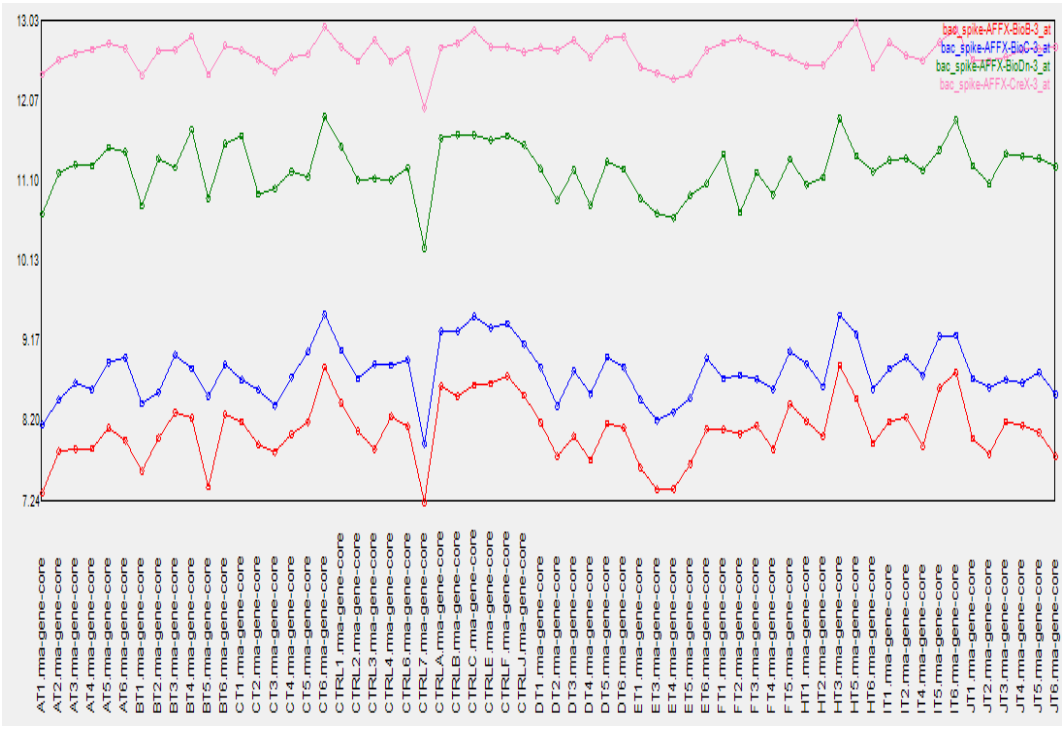



Figura 11. **Distribuição gráfica das intensidades das sondas em escala logarítmica (eixo Y) dos *Bac spikes Controls* por amostras (eixo X).**

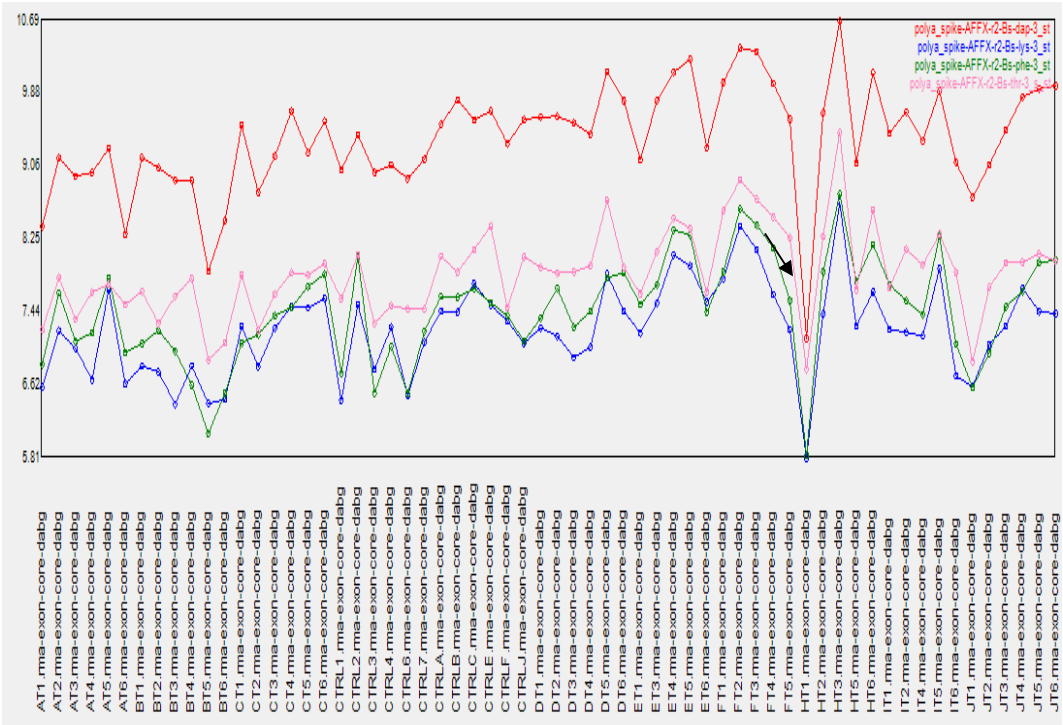



Figura 12. **Distribuição gráfica das intensidades das sondas em escala logarítmica (eixo Y) dos *Poly spikes Controls* por amostras (eixo X).**

Por fim, os dados normalizados e sumarizados pelo método RMA, foram importados para o programa *Partek® GS for Exon Data* (*Partek*, St. Louis, EUA), para análise em PCA-3D, e novamente foi observado que a amostra HT1 (indicada com a seta, Figura 13) está fora da distribuição gráfica do seu grupo 2º IAM com SST. A mesma foi excluída das análises de expressão gênica, totalizando ao final 55 amostras, Tabela 5.

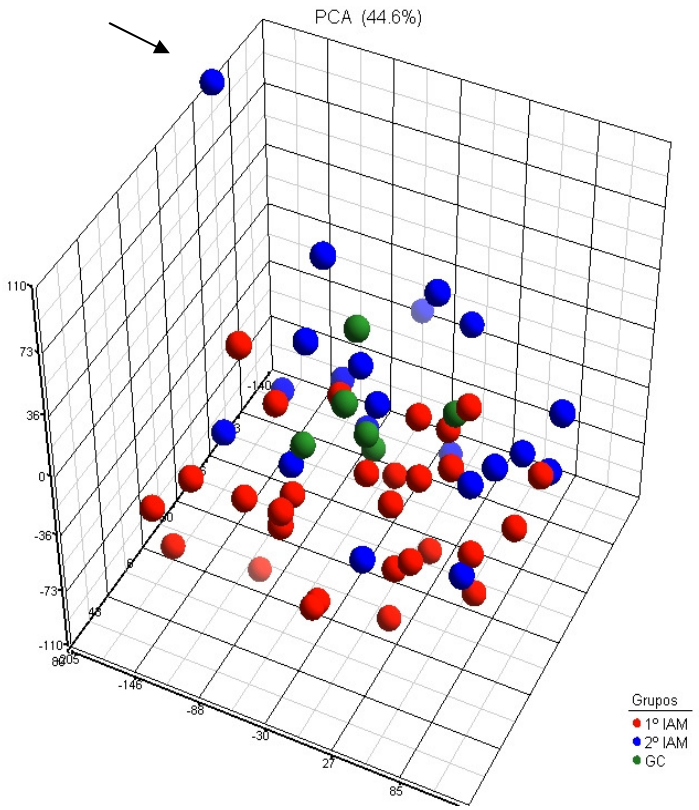



Figura 13. **Análise de componente principal, representado em tridimensão dos dados normalizados pelo método RMA.** Seta aponta a amostra HT1, que se encontra distanciada graficamente das demais amostras. Cada ponto representa uma amostra.
Nota: GC, grupo controle; 1º IAM com SST, grupo de pacientes com IAM com SST sem infarto prévio; 2º IAM com SST, grupo de pacientes com IAM com SST com infarto prévio; $T_0$, primeira colheita; $T_2$, segunda colheita após 2 h; $T_{12}$, terceira colheita após 12 h; $T_{24}$, quarta colheita após 24 h; $T_{36}$, quinta colheita após 36 h; $T_{48}$, sexta colheita após 48 h.

Os dados brutos das 55 amostras restantes foram novamente submetidos à normalização pelo método *Quantile Normalization,* sumarizados pelo algorítmo iterPLIER e sucessivos filtros através do programa APT sob interface gráfica do programa *oneChannelGUI v.1.8.8.* Os filtros aplicados para gene nível foram: *Setting to 0 log2 intensity below 1*; *Filtering by IQR*;*, Filtering on DABG p-value*, sucessivamente (Figura 14). Observa-se que após esta etapa, as intensidades das sondas tendem a uma

distribuição normal, importante para a execução dos testes estatísticos. O total de genes a serem avaliados antes dos filtros, era 22.011, após este processo houve uma redução de 25 %, totalizando 16.417 genes.

Tabela 5. Número absoluto da distribuição de amostras processadas e selecionadas, após avaliação dos controles de qualidade para os grupos 1º IAM com SST, 2º IAM com SST e controle.

| | **1º IAM com SST (5)** | **2º IAM com SST (4)** | **GC (6)** |
|---|---|---|---|
| $T_0$ | 5 | 3 | 6 |
| $T_2$ | 5 | 4 | - |
| $T_{12}$ | 4 | 3 | - |
| $T_{24}$ | 5 | 3 | - |
| $T_{36}$ | 5 | 4 | - |
| $T_{48}$ | 5 | 3 | - |
| 1ANO | 5 | 2 | - |
| **Total** | 34 | 22 | 6 |

Nota: GC, grupo controle; 1º IAM com SST, grupo de pacientes com IAM com SST sem infarto prévio; 2º IAM com SST, grupo de pacientes com IAM com SST com infarto prévio; $T_0$, primeira colheita; $T_2$, segunda colheita após 2 h; $T_{12}$, terceira colheita após 12 h; $T_{24}$, quarta colheita após 24 h; $T_{36}$, quinta colheita após 36 h; $T_{48}$, sexta colheita após 48 h.

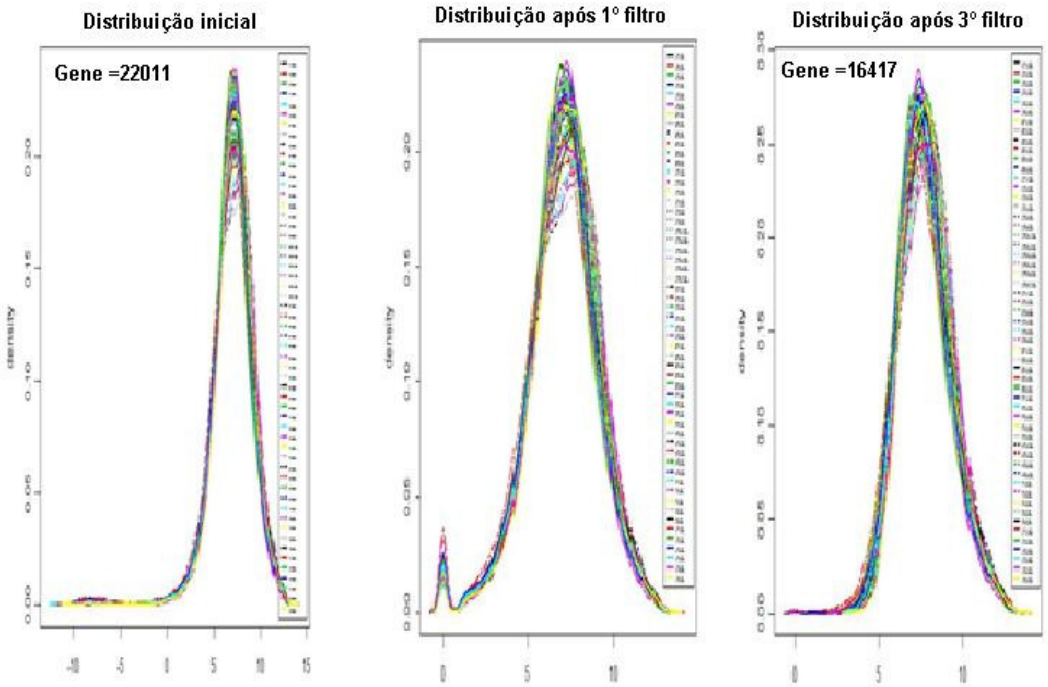



Figura 14. **Histograma das intensidades dos sinais antes (A) e após a aplicação da sequência de filtros:** ***Setting to 0 log2 intensity below, Filtering by IQR*** **e** ***Filtering on DABG p-value.***
Nota: Número de genes avaliados inicialmente era 22.011, após aplicação do conjunto de filtros reduziu para 16.417 genes.

### 4.2.2 Expressão gênica diferencial por microarranjo de DNA

*4.2.2.1 Genes diferentemente expressos em 1º IAM com SST*

Observou-se 29 genes com intensidades estatisticamente diferentes na primeira colheita para 1º IAM com SST em relação aos controles ($p < 0.001$ e *Fold Change* ± 1,0; Tabela 6). Dezesseis genes apresentam expressão aumentada e 13 com expressão diminuída em relação ao controle.

Nos demais tempos de colheita realizados foram observados 410, 111, 6, 33 e 34 genes diferentemente expressos quando comparados com controle, correspondentes respectivamente aos tempos $T_2$, $T_{12}$, $T_{24}$, $T_{36}$ e $T_{48}$ ($p < 0.001$ e *Fold Change* ± 1,0; Tabelas 1 a 5 no anexo D). Considerando todos os tempos de colheitas avaliados, podemos verificar que 513 genes estão diferentemente expressos em relação aos indivíduos não infartados nas primeiras 48 h após IAM nos indivíduos que sofreram o primeiro infarto.

Ao compar os resultados obtidos entre os tempos de colheitas para 1º IAM com SST utilizando os Diagramas de *Venn* (Figura 15), verificou-se que 15 dos 29 genes presentes na primeira colheita para 1º IAM com SST mantiveram-se alterados significativamente em $T_2$. Contudo, somente 2 genes, RNC3 e MYL4, mantiveram-se diferentemente expressos durante aproximadamente 36 h após IAM. A representação destes 29 genes diferentemente expressos, de acordo com as demais as primeiras 48 h avaliadas, pode ser observado na Tabela 8, setas apontadas para cima (↑ em vermelho) indicam genes com expressão significativamente elevadas em relação ao controle e, setas apontadas para baixo (↓ em verde) genes com expressão significativamente reduzidas em relação ao controle. Nota-se que após intervenção coronariana percutânea os genes apresentam maior diferença de intensidade logaritmica de expressão em relação ao controle para a segunda colheita (maior quantidade de setas representadas na coluna $T_2$, Tabela 7).

Tabela 6. Genes diferencialmente expressos no grupo 1º IAM com SST $T_0$.

| ACC | Gene | *CytoBand* | Descrição | *FC* | *p** | FDR |
|---|---|---|---|---|---|---|
| NM_002164 | INDO | 8p12-p11 | *indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase* | -1,57 | 0,00095 | 0.273 |
| NM_001078177 | SLC29A1 | 6p21.2-p21.1 | *solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 1* | -1,42 | 0,00001 | 0.047 |
| NM_018667 | SMPD3 | 16q22.1 | *sphingomyelin phosphodiesterase 3, neutral membrane (neutral sphingomyelinase II)* | -1,33 | 0,00027 | 0.194 |
| NM_005582 | CD180 | 5q12 | *CD180 molecule* | -1,28 | 0,00029 | 0.194 |
| NM_024592 | SRD5A3 | 4q12 | *steroid 5 alpha-reductase 3* | -1,28 | 0,00010 | 0.157 |
| NM_003656 | CAMK1 | 3p25.3 | *calcium/calmodulin-dependent protein kinase I* | -1,26 | 0,00005 | 0.096 |
| NM_138983 | OLIG1 | 21q22.11 | *oligodendrocyte transcription factor 1* | -1,20 | 0,00047 | 0.228 |
| NM_020377 | CYSLTR2 | 13q14.12-q21.1 | *cysteinyl leukotriene receptor 2* | -1,17 | 0,00088 | 0.273 |
| NM_001002841 | MYL4 | 17q21-qter | *myosin, light chain 4, alkali; atrial, embryonic* | -1,12 | 0,00092 | 0.273 |
| NM_000757 | CSF1 | 1p21-p13 | *colony stimulating factor 1 (macrophage)* | -1,11 | 0,00002 | 0.047 |
| NM_015178 | RHOBTB2 | 8p21.3 | *Rho-related BTB domain containing 2* | -1,05 | 0,00019 | 0.194 |
| NM_014042 | C11orf51 | 11q13.4 | *chromosome 11 open reading frame 51* | -1,04 | 0,00039 | 0.219 |
| NM_013402 | FADS1 | 11q12.2-q13.1 | *fatty acid desaturase 1* | -1,01 | 0,00095 | 0.273 |
| NM_002084 | GPX3 | 5q23 | *glutathione peroxidase 3 (plasma)* | 1,03 | 0,00062 | 0.255 |
| NM_006186 | NR4A2 | 2q22-q23 | *nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2* | 1,06 | 0,00067 | 0.263 |
| NM_004444 | EPHB4 | 7q22 | *EPH receptor B4* | 1,07 | 0,00046 | 0.228 |
| NM_001081640 | PRKDC | 8q11 | *protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide* | 1,19 | 0,00095 | 0.273 |
| NM_001432 | EREG | 4q13.3 | *epiregulin* | 1,23 | 0,00024 | 0.194 |
| NM_020650 | RCN3 | 19q13.33 | *reticulocalbin 3, EF-hand calcium binding domain* | 1,30 | 0,00002 | 0.047 |
| NM_003855 | IL18R1 | 2q12 | *interleukin 18 receptor 1* | 1,36 | 0,00031 | 0.194 |
| NM_022136 | SAMSN1 | 21q11 | *SAM domain, SH3 domain and nuclear localization signals 1* | 1,36 | 0,00001 | 0.047 |
| NM_183013 | CREM | 10p11.21 | *cAMP responsive element modulator* | 1,41 | 0,00001 | 0.047 |
| NM_002616 | PER1 | 17p13.1-p12 | *period homolog 1 (Drosophila)* | 1,53 | 0,00026 | 0.194 |
| NM_003749 | IRS2 | 13q34 | *insulin receptor substrate 2* | 1,63 | 0,00030 | 0.194 |
| NM_003246 | THBS1 | 15q15 | *thrombospondin 1* | 1,76 | 0,00048 | 0.228 |
| NM_018728 | MYO5C | 15q21 | *myosin VC* | 1,82 | 0,00056 | 0.236 |
| NM_024693 | ECHDC3 | 10p14 | *enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 3* | 2,13 | 0,00003 | 0.063 |
| NM_001657 | AREG | 4q13-q21 | *amphiregulin (schwannoma-derived growth factor)* | 2,22 | 0,00001 | 0.047 |
| NM_198153 | TREML4 | 6p21.1 | *triggering receptor expressed on myeloid cells-like 4* | 3,57 | 0,00096 | 0.273 |

Nota: Gene, de acordo com a nomenclatura HUGO (*Human Genome Organization*); *CytoBand*, localização cromossômica (*Citogenetic Band*); ACC, número de acesso do gene no banco de dados públicos (www.ncbi.nlm.nih.gov); $p < 0,001$ e FC- *Fold Change* ± 1,0 referente ao teste LIMMA para 1º IAM com STT $T_0$ e controle; FDR, p valor ajustado por *False Discover Rate*.

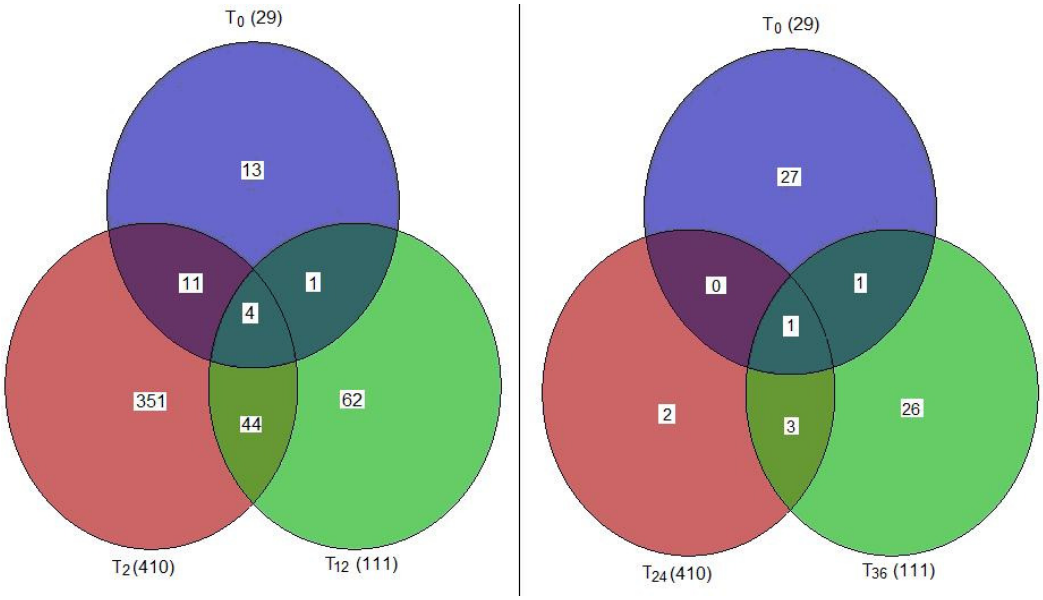
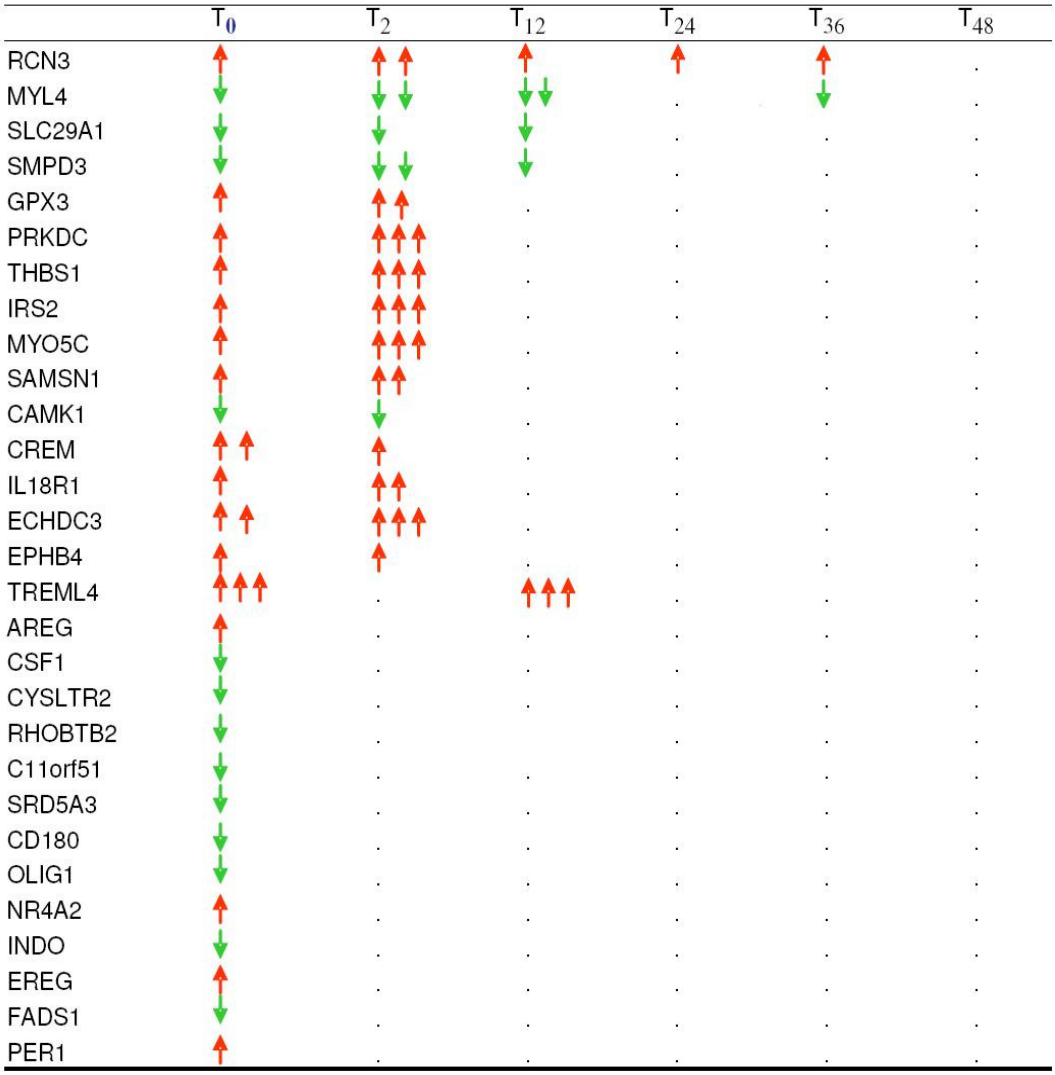



Figura 15. **Diagrama de *Venn* dos genes diferentemente expressos em 1º IAM com SST e os demais tempos de colheita.**
Nota: Número total de genes entre parênteses e representado sob o diagrama; $T_0$, primeira colheita; $T_2$, segunda colheita após 2 h; $T_{12}$, terceira colheita após 12 h; $T_{24}$, quarta colheita após 24 h; $T_{36}$, quinta colheita após 36 h.

Tabela 7. Representação dos 29 genes diferencialmente expressos em 1º IAM com SST $T_0$ em relação às demais 48 h avaliadas após IAM.




Nota: Gene de acordo com a nomenclatura HUGO (*Human Genome Organization*); "↑", gene com diferença de expressão aumentada em relação ao controle; "↓", gene com diferença de expressão diminuída em relação ao controle; Quantidade de setas representa maior diferença de intensidade logarítmica de expressão em relação ao controle; $T_0$, primeira colheita; $T_2$, segunda colheita após 2 h; $T_{12}$, terceira colheita após 12h; $T_{24}$, quarta colheita após 24h; $T_{36}$, quinta colheita após 36h; $T_{48}$, sexta colheita após 48h.

### *4.2.2.2 Genes diferentemente expressos em 2º IAM com SST*

Observou-se 8 genes com intensidades estatisticamente diferentes na primeira colheita para o 2º IAM com SST em relação aos controles ($p < 0.001$ e *Fold Change* ± 1,0; Tabela 8). Cinco genes apresentam expressão aumentada e 3 com expressão diminuída em relação ao controle.

Nos demais tempos de colheita realizados foram observados 13, 50, 17, 22 e 25 genes diferentemente expressos, quando comparados com o controle, correspondentes

respectivamente aos tempos $T_2$, $T_{12}$, $T_{24}$, $T_{36}$ e $T_{48}$ ($p < 0.001$ e *Fold Change* ± 1,0; Tabelas 7 no anexo D). Considerando todos os tempos de colheitas avaliados, pode-se observar que 111 genes estão diferentemente expressos nas primeiras 48 h após IAM, para os indivíduos com infarto prévio em relação aos controles.

Tabela 8. Genes diferencialmente expressos em relação ao grupo 2º IAM com SST $T_0$.

| ACC | Gene | *CytoBand* | Descrição | FC | *p** | FDR |
|---|---|---|---|---|---|---|
| NM_000561 | GSTM1 | 1p13.3 | *glutathione S-transferase M1* | -2,41 | 0,0000 | 0.4646 |
| 3809750 | NA | NA | *NA* | -1,33 | 0,0002 | 0.6513 |
| NM_004987 | LIMS1 | 2q12.3-q13 | *LIM and senescent cell antigen-like domains 1* | -1,13 | 0,0009 | 0.9951 |
| NM_003284 | TNP1 | 2q35-q36 | *transition protein 1 (during histone to protamine replacement)* | -1,11 | 0,0007 | 0.9999 |
| NM_001112724 | STK32A | 5q32 | *serine/threonine kinase 32A* | -1,03 | 0,0001 | 0.9999 |
| NM_000804 | FOLR3 | 11q13 | *folate receptor 3 (gamma)* | 1,59 | 0,0003 | 0.9999 |
| NM_001866 | COX7B | Xq21.1 | *cytochrome c oxidase subunit VIIb* | 1,70 | 0,0006 | 0.9999 |
| NM_002692 | POLE2 | 14q21-q22 | *polymerase (DNA directed), epsilon 2 (p59 subunit)* | 1,88 | 0,0004 | 0.9999 |

Nota: Gene, de acordo com a nomenclatura HUGO (*Human Genome Organization*); *CytoBand*, localização cromossômica (*Citogenetic Band*); ACC, número de acesso do gene no banco de dados públicos (www.ncbi.nlm.nih.gov); FC – *Fold Change* ± 1,0; $p < 0{,}001$ referente ao teste LIMMA para 2º IAM com STT $T_0$ e controle; FDR, p valor ajustado por *False Discover Rate*.

Ao comparar os resultados obtidos entre os tempos de colheitas para 2º IAM com SST utilizando os Diagramas de *Venn,* verificou-se que 5 dos 8 genes presentes na primeira colheita para 1º IAM com SST estiveram presentes nos demais tempos de colheita, sendo dois destes, os genes GSTM1 e FOLR3, que se mantiveram diferentemente expressos durante as 48 h após IAM, Tabela 10. Na Tabela 10, setas apontadas para cima (↑ em vermelho) indicam genes com expressão significativamente elevadas em relação ao controle e, setas apontadas para baixo (↓ em verde) genes com expressão significativamente reduzidas em relação ao controle. Nota-se que *GSTM1* atinge maior diferença de intensidade logaritmica de expressão em relação ao controle aproximadamente após 36 h (maior quantidade de setas representadas na coluna $T_{36}$, Tabela 9).

Tabela 9. Representação dos 8 genes diferencialmente expressos em 2º IAM com SST $T_0$ em relação às demais 48 h avaliadas após IAM.

| Gene | $T_0$ | $T_2$ | $T_{12}$ | $T_{24}$ | $T_{36}$ | $T_{48}$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| GSTM1 | ↓↓ | ↓↓ | ↓↓ | ↓↓ | ↓↓↓ | ↓ |
| FOLR3 | ↑ | ↑↑ | ↑↑ | ↑ | ↑ | ↑ |
| POLE2 | ↑ | ↑ | . | . | ↑ | . |
| COX7B | ↑ | . | ↑ | ↑ | . | . |
| TNP1 | ↓ | . | . | . | . | ↑ |
| 3809750 | ↓ | . | . | . | . | . |
| STK32A | ↓ | . | . | . | . | . |
| LIMS1 | ↓ | . | . | . | . | . |

Nota: Gene de acordo com a nomenclatura HUGO (*Human Genome Organization*); "↑", gene com diferença de expressão aumentada em relação ao controle; "↓", gene com diferença de expressão diminuída em relação ao controle; Quantidade de setas representam maior diferença de intensidade de expressão; $T_0$, primeira colheita; $T_2$, segunda colheita após 2 h; $T_{12}$, terceira colheita após 12h; $T_{24}$, quarta colheita após 24h; $T_{36}$, quinta colheita após 36h; $T_{48}$, sexta colheita após 48h.

### *4.2.2.3 Intersecção entre os resultados de expressão gênica de 1º IAM com SST e 2º IAM com SST.*

Ao comparar os pacientes com 1º IAM com SST com os pacientes com 2º IAM com SST não foram observadas diferenças de expressão de RNAm significativas ($p > 0,05$, dados não apresentados).

Entretanto ao comparar os resultados de cada grupo em relação ao controle (1º IAM com SST, total 513 genes; 2º IAM com SST, total 111 genes), verificou-se que 25 genes são comuns aos pacientes infartados em relação aos indivíduos controle, de acordo com os dados de expressão gênica obtidos através da análise de microarranjo de DNA (Figura 16). Na Tabela 10 são apresentados os 25 genes selecionados.

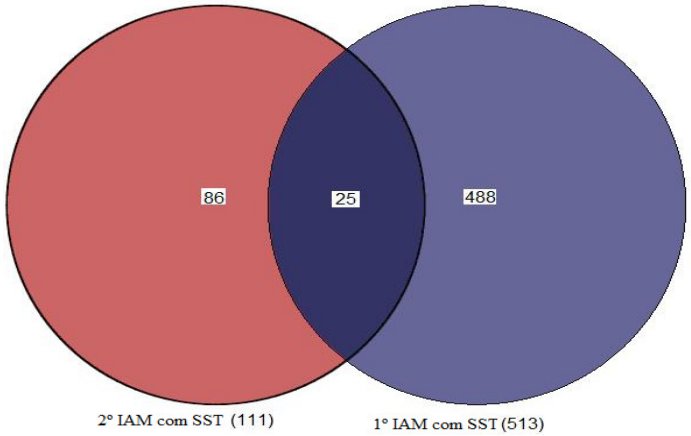



Figura 16. **Diagrama de *Venn* dos genes diferentemente expressos em 1º IAM com SST e 2º IAM com SST.**
Nota: Número total de genes entre parênteses e representados sob o diagrama. 1º IAM com SST, pacientes com IAM com SST sem infarto prévio; 2º IAM com SST, pacientes com IAM com SST com infarto prévio.

Tabela 10. Lista dos 25 genes diferencialmente expressos comuns entre os pacientes dos grupos 1º IAM com SST e 2º IAM com SST.

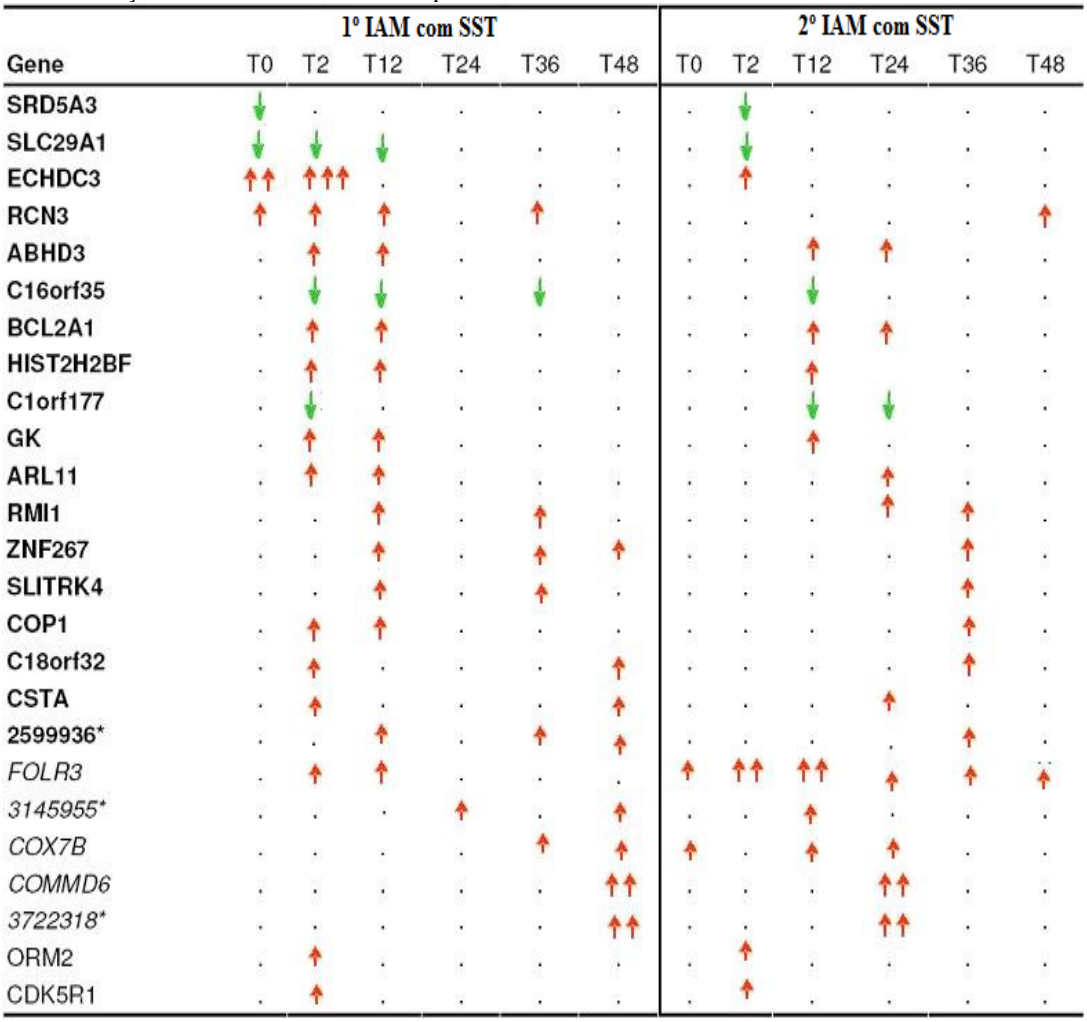
| ACC/ AffyID | Gene | *CytoBand* | Descrição |
|---|---|---|---|
| NM_138340 | ABHD3 | 18q11.2 | *abhydrolase domain containing 3* |
| NM_138450 | ARL11 | 13q14.3 | *ADP-ribosylation factor-like 11* |
| NM_001114735 | BCL2A1 | 15q24.3 | *BCL2-related protein A1* |
| NM_001077350 | C16orf35 | 16p13.3 | *chromosome 16 open reading frame 35* |
| BC093004 | C18orf32 | 18q21.1 | *chromosome 18 open reading frame 32* |
| NM_152607 | C1orf177 | 1p32.3 | *chromosome 1 open reading frame 177* |
| NM_003885 | CDK5R1 | 17q11.2 | *cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35)* |
| NM_203497 | COMMD6 | NA | *COMM domain containing 6* |
| NM_052889 | COP1 | NA | *caspase-1 dominant-negative inhibitor pseudo-ICE* |
| NM_001866 | COX7B | Xq21.1 | *cytochrome c oxidase subunit VIIb* |
| NM_005213 | CSTA | 3q21 | *cystatin A (stefin A)* |
| NM_024693 | ECHDC3 | 10p14 | *enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 3* |
| NM_000804 | FOLR3 | 11q13 | *folate receptor 3 (gamma)* |
| NM_203391 | GK | Xp21.3 | *glycerol kinase* |
| NM_001024599 | HIST2H2BF | 1q21.2 | *histone cluster 2, H2bf* |
| NM_000608 | ORM2 | 9q32 | *orosomucoid 2* |
| NM_020650 | RCN3 | 19q13.33 | *reticulocalbin 3, EF-hand calcium binding domain* |
| NM_024945 | RMI1 | 9q21.32 | *RMI1, RecQ mediated genome instability 1, homolog (S. cerevisiae)* |
| NM_001078177 | SLC29A1 | 6p21.2-p21.1 | *solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 1* |
| NM_173078 | SLITRK4 | Xq27.3 | *SLIT and NTRK-like family, member 4* |
| NM_024592 | SRD5A3 | 4q12 | *steroid 5 alpha-reductase 3* |
| NM_003414 | ZNF267 | 16p11.2 | *zinc finger protein 267* |
| 3722318 | NA | NA | *NA* |
| 2599936 | NA | NA | *NA* |
| 3145955 | NA | NA | *NA* |

Nota: ACC, número de acesso do gene no banco de dados públicos (www.ncbi.nlm.nih.gov); AffyID, código do fabricante para genes ainda não descritos no banco de dados públicos; Gene, de acordo com a nomenclatura HUGO (*Human Genome Organization*); *CytoBand*, localização cromossômica (*Citogenetic Band*).

A representação do perfil destes 25 genes diferentemente expressos pode ser observada na Tabela 11, setas apontadas para cima (↑ em vermelho) indicam genes com expressão significativamente elevadas em relação ao controle e, setas apontadas para baixo (↓ em verde) genes com expressão significativamente reduzidas em relação ao controle. Nota-se ausência dos genes selecionados na primeira colheita de 1º IAM com SST, que fazem parte destes 25 genes, *SRD5A3, SLC29A1, ECHDC3* e *RCN3* (4 dos 29 genes diferentemente expressos, Tabela 7), estiveram presentes no segundo grupo ao mesmo tempo, os três primeiros foram observados em 2º IAM com SST em $T_2$ e o último gene em 2º IAM com SST em $T_{48}$ (Tabela 11). O mesmo para os genes FOLR3 e COX7B presentes na primeira colheita de 2º IAM com SST (2 dos 8 genes diferentemente expressos, Tabela 9), foram diferentemente expressos após intervenção coronária percutânea em 1º IAM com SST e após aproximadamente 36 h. Observa-se

que 76% (19 genes em negrito) são detectados como diferentemente expressos nas primeiras colheitas para 1º IAM com SST e em 2º IAM com SST. Em dezesseis por cento (4 genes em itálico) observaram-se o contrário, ou seja: primeiro nos pacientes com 2º IAM com SST e depois em 1º IAM com SST.

Tabela 11. Representação dos 25 genes diferencialmente expressos em 1º IAM com SST e 2º IAM com SST em relação às demais 48 h avaliadas após IAM.




Nota: Gene de acordo com a nomenclatura HUGO (*Human Genome Organiation*); "↑", gene com diferença de expressão aumentada em relação ao controle; "↓", gene com diferença de expressão diminuída em relação ao controle; Quantidade de setas representa maior diferença de intensidade de expressão; * código AffyID para genes ainda não descritos no banco de dados públicos; em negrito, genes detectados como diferentemente expressos primeiro em 1º IAM com SST que em 2º IAM com SST; em itálico, genes detectados como diferentemente expressos primeiro em 2º IAM com SST que em 1º IAM com SST; 1º IAM com SST, pacientes com IAM com SST sem infarto prévio; 2º IAM com SST, pacientes com IAM com SST com infarto prévio; $T_0$, primeira colheita; $T_2$, segunda colheita após 2 h; $T_{12}$, terceira colheita após 12h; $T_{24}$, quarta colheita após 24h; $T_{36}$, quinta colheita após 36h; $T_{48}$, sexta colheita após 48h.

### 4.2.3 Validação técnica pela PCR em tempo real

*4.2.3.1 Seleção de genes-candidatos para validação técnica*

De acordo com os critérios de seleção apresentados em materiais e métodos, no item "*Seleção de genes-candidatos para validação técnica"* foram selecionados 33 genes diferentemente expressos através das análises dos resultados obtidos por microarranjo de DNA a serem validados tecnicamente pela PCR em tempo real, a partir das mesmas amostras utilizadas anteriormente neste estudo. A lista de genes-candidatos foi previamente apresentada na Tabela 1.

A seguir são comentados os principais motivos pelos quais estes genes foram selecionados, de acordo com a ordem de prioridade esclarecida em materiais e métodos.

Os genes GPX3, CREM, IRS2, THBS1 e PER1 foram selecionados por preencherem as exigências do critério de seleção 1. Estes 5 genes foram diferentemente expressos na primeira colheita para 1º IAM com SST e já foram associados com doença arterial coronariana e/ou com o desenvolvimento cardiovascular em estudos anteriores de acordo com IPA ($p<0,001$ e *Fold Change* ± 1,0).

Os genes RCN3, SLITRK4, SLC29A1, COX7B, BCL2A1, ECHDC3 e FOLR3, foram selecionados por preencherem as exigências do critério de seleção 2. Estes 7 genes fazem parte da lista dos 25 genes diferentemente expressos comuns entre os gruos 1º IAM com SST e 2º IAM com SST (Tabela 11), e já foram associados com doença arterial coronariana e/ou com o desenvolvimento cardiovascular em estudos anteriores de acordo com IPA ($p<0,001$ e *Fold Change* ± 1,0).

Os genes AREG, CSF1, SAMSN1 e TREML4 foram selecionados por preencherem as exigências do critério de seleção 3. Estes 4 genes foram diferentemente expressos na primeira colheita para 1º IAM com SST de acordo com o cálculo de p-valor ajustado por FDR < 0,05, embora não estejam associados com doença arterial coronariana e/ou com o desenvolvimento cardiovascular em estudos anteriores de acordo com IPA.

Os três genes ADORA3, IL5RA e GSTM1 foram diferentemente expressos em mais de um tempo de colheita para 1º IAM com SST ($p$ <0,001 e *Fold Change* ± 1,0) e estão associados com doença arterial coronariana e/ou com o desenvolvimento cardiovascular em estudos anteriores de acordo com IPA e preenchem as exigências do critério de seleção 4.

Já os 4 genes: MYO5C, SMPD3, IL18R1, MYL4 e POLE2, são genes diferentemente expressos na primeira colheita para 1º IAM com SST ou 2º IAM com

SST que não estão associados com doença arterial coronariana e/ou com o desenvolvimento cardiovascular em estudos anteriores de acordo com IPA e p-valor ajustado por FDR > 0,05. Critério de seleção 5.

Finalmente os 9 genes: TLR4, IL1R1, ABCA1, IL1RL1, ALOX15, KCNE1, MMP9, CA1 e BCL2L1 foram selecionados por apresentarem-se diferentemente expressos na segunda ou na terceira colheita para 1º IAM com SST (p<0,001, p-valor ajustado por FDR < 0,05), além de estarem associados com doença arterial coronariana e/ou com o desenvolvimento cardiovascular em estudos anteriores de acordo com IPA.

O gene GAPDHS foi eleito como gene de referência para a quantificação relativa pela PCR em tempo real por apresentar intensidade de expressão (8,33 ± 0,39, média ± DP em escala logarítmica) próxima às intensidades de expressão dos genes-candidatos selecionados (7,34 ± 1,48, média ± DP em escala logarítmica) e coeficiente de variação menor que os demais genes de referência nestas codições. Os resultados desta avaliação encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12. Seleção dos genes de referência para validação técnica pela PCR em tempo, ordenados pela intensidade de expressão logarítimica da população estudada.

| Gene | Descrição | Intensidades (Sanges et al.) | CV |
|---|---|---|---|
| ACTB | *actin, beta* | 12,33 ± 0,20 | 0,04 |
| UBC | *ubiquitin C* | 10,4 ± 0,34 | 0,11 |
| B2M | *beta-2-microglobulin* | 11,87 ± 0,35 | 0,12 |
| **GAPDHS** | ***glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*** | **8,33 ± 0,39** | **0,13** |
| SDHB | *succinate dehydrogenase complex, subunit B* | 8,42 ± 0,39 | 0,13 |
| SDHA | *succinate dehydrogenase complex, subunit A* | 9,37 ± 0,39 | 0,15 |
| CDKN1B | *cyclin-dependent kinase inhibitor 1B* | 9,05 ± 0,42 | 0,18 |
| YWHAZ | *tyrosine 3-monooxygenase* | 10,17 ± 0,45 | 0,20 |
| TBP | *TATA box bunding protein* | 7,19 ± 0,51 | 0,26 |
| PPIA | *peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)* | 7,27 ± 0,61 | 0,37 |
| HPRT1 | *hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1* | 8,08 ± 0,64 | 0,41 |
| HMBS | *hydroxymethylbilane synthase* | 6,89 ± 0,70 | 0,48 |
| HMGB2 | *high-mobility group box 2* | 8,18 ± 0,80 | 0,64 |

Nota: Gene, de acordo com a nomenclatura HUGO (*Human Genome Organization*); Intensidade em escala logarítmica apresentada como média ± DP; CV, coeficiente de variação.

*4.2.3.2 Resultados da validação técnica pela PCR em tempo real*

Os resultados da quantificação relativa dos 33 genes-candidatos pela PCR em tempo real, foram comparados com a média das intensidades logarítmicas dos mesmos, pelas análises de microarranjo de DNA. Os resultados de correlação de *Spearman* são apresentados na Tabela 13.

Dez genes apresentaram alta correlação entre os dados de microarranjo de DNA e PCR em tempo real, que são: CA1, THBS1, MYL4, BCL2L1, COX7B, GSTM1,

POLE2, MMP9, ALOX15 e FOLR3 ($r \geq 0,70$; $p < 0,05$). Treze genes apresentaram correlação moderada: ILIRL1, AREG, PER1, SMPD3, SLC29A1, BCL2A1, KCNE1, TREML4, IRS2, ECHDC3, IL5RA, IL18R1 e ABCA1($r$ entre 0,46 – 0,69; $p < 0,05$). Seis genes apresentaram baixa correlação, SLITRK4, IL1R1, CSF1, SAMSN1, GPX3 e ADORA3 ($r \leq 0,45$; $p < 0,05$).

Não se observou correlação entre os dados de microarranjo de DNA e a PCR em tempo real para três genes: MYOC5, CREM, RCN3 e TLR4 ($p > 0,05$).

Tabela 13. Correlação de *Spearman* para os resultados de expressão gênica obtida pela técnica de microarranjo de DNA e PCR em tempo real.

| **Gene** | ***r*** | ***P*** |
|---|---|---|
| CA1 | 0,90 | 7,67E-19 |
| THBS1 | 0,87 | 2,02E-16 |
| MYL4 | 0,84 | 2,12E-14 |
| BCL2L1 | 0,81 | 6,55E-13 |
| *COX7B* | 0,79 | 1,05E-11 |
| *GSTM1* | 0,78 | 1,46E-11 |
| POLE2 | 0,76 | 9,19E-11 |
| MMP9 | 0,75 | 3,09E-10 |
| *ALOX15* | 0,75 | 3,06E-10 |
| FOLR3 | 0,74 | 6,18E-10 |
| *IL1RL1* | 0,67 | 7,01E-8 |
| AREG | 0,64 | 5,17E-7 |
| PER1 | 0,60 | 4,83E-6 |
| *SMPD3* | 0,58 | 1,00E-5 |
| *SLC29A1* | 0,58 | 1,05E-5 |
| *BCL2A1* | 0,57 | 1,77E-5 |
| *KCNE1* | 0,56 | 1,40E-4 |
| *TREML4* | 0,53 | 7,71E-5 |
| *IRS2* | 0,52 | 9,65E5 |
| *ECHDC3* | 0,51 | 1,3E-4 |
| *IL5RA* | 0,51 | 1,40E-4 |
| *IL18R1* | 0,48 | 3,60E-4 |
| ABCA1 | 0,47 | 4,60E-4 |
| SLITRK4 | 0,42 | 2,30E-3 |
| IL1R1 | 0,41 | 2,80E-3 |
| CSF1 | 0,39 | 5,00E-3 |
| SAMSN1 | 0,37 | 9,00E-3 |
| *GPX3* | 0,30 | 0,03 |
| ADORA3 | 0,29 | 0,04 |
| MYO5C | 0,27 | 0,06 |
| *CREM* | 0,22 | 0,13 |
| RCN3 | 0,18 | 0,19 |
| TLR4 | 0,16 | 0,26 |

Nota: Gene, de acordo com a nomenclatura HUGO (*Human Genome Organization*); *r*, coeficiente de correlação; *p*, teste de correlação não paramétrica por *teste de Rank de Spearman*; em negrito, genes que apresentaram correlação forte entre os dados de expressão obtidos pela PCR em tempo real e microarranjo de DNA; em itálico, genes que apresentaram correlação moderada entre os dados de expressão obtidos pela PCR em tempo real e microarranjo de DNA.

### 4.2.4 Validação biológica pela PCR em tempo real

Foram selecionados 20 genes com correlação positiva moderada a forte ($r > 0,45$ e $p < 0.05$) para a etapa de validação biológica pela PCR em tempo real em uma nova casuística, isto é, pacientes do grupo SCA para validação biológica e grupo controle para validação biológica.

Oito genes, ALOX15, CA1, COX7B, ECHDC3, IL18R1, KCNE1, MMP9 e MYL4 selecionados previamente como genes candidatos a biomarcadores de doença cardiovascular por análise de expressão gênica a partir de microarranjo de DNA, apresentaram expressão gênica diferencial entre os pacientes com SCA e indivíduos do grupo controle, independente de infarto prévio ($p < 0.05$, Tabela 13). Ainda que somente dois destes, COX7B e ECHDC3, haviam sido eleitos por pertencerem à lista dos 25 genes comuns entre os grupos1º IAM com SST e 2º IAM com SST (Tabela 11). Possivelmente por ter apresentado maior sensibilidade à PCR em tempo real do que no microarranjo de DNA.

Nas etapas anteriores, o gene AREG foi selecionado por apresentar-se diferentemente expresso exclusivamente na primeira colheita para 1º IAM com SST (p-valor ajustado por FDR < 0,05). Nesta etapa de validação, curiosamente observou-se que através da PCR em tempo real, o mesmo foi diferentemente expresso, somente quando comparado com o grupo controle e 1º SCA ($p = 0.02$, Tabela 14). Resultado semelhante era esperado para o gene TREML4, contudo, foi diferentemente expresso somente quando comparado com o grupo controle e 2º SCA ($p =0.01$, Tabela 14).

O gene BCL2A1 foi diferentemente expresso pela análise dos dados da PCR em tempo real, somente quando se exclui da análise de pacientes do sexo feminino e indivíduos com idade > 65 anos ($p= 0,03$ teste não paramétrico de *Mann-Whiteny* entre 2º SCA e controle); o gene BCL2L1, ao excluir indivíduos com idade > 65 anos ($p= 0,01$ teste não paramétrico de *Mann-Whiteny* entre 2º SCA e controle), e gene IRS2, ao excluir indivíduos > 65 anos, mulheres e diabéticos ($p= 0,04$, teste não paramétrico de *Mann-Whiteny* entre SCA e controle).

Vale ressaltar que assim como nas análises de microarranjo de DNA não se observaram diferenças significativas quando comparados os resultados de expressão entre os grupos 1º SCA e 2º SCA ($p > 0.05$, dados não apresentados).

A possível justificativa para a não validação dos demais genes-candidatos, pode ser atribuída às características clínicas e antropométricas presentes na casuística selecionada para validação biológica estudada, uma vez que para a análise de expressão

de RNAm por microarranjo de DNA, recrutou-se pacientes com IAM com SST exclusivamente do sexo masculino, idade entre 36 a 65 anos e não diabético.

Tabela 14. Resultados da expressão gênica diferencial, pela PCR em tempo real, dos genes selecionados pela validação biológica a partir dos grupos 1º SCA, 2º SCA e controle.

| Gene | GCb | 1° SCA | *p+* | 2° SCA | *P** |
|---|---|---|---|---|---|
| **ALOX15** | 0,055 (0,026 - 0,074) | 0,021 (0,008 - 0,062) | 0.03 | 0,025 (0,003 - 0,063) | 0.05 |
| AREG | 0,003 (0,001 - 0,016) | 0,008 (0,004 - 0,015) | 0.02* | 0,004 (0,002 - 0,010) | 0.49 |
| BCL2A1† | 1,481 (0,814 - 3,534) | 1,032 (0,621 - 2,682) | 0.28 | 1,006 (0,570 – 1,183) | 0.03** |
| BLC2L1+ | 0,037 (0,028 - 0,065) | 0,033 (0,018 - 0,061) | 0.44 | 0,022 (0,016 - 0,031) | <0,01** |
| **CA1** | 0,006 (0,002 - 0,012) | 0,002 (0,001 - 0,007) | 0.02 | 0,001 (0,001 - 0,003) | <0,01 |
| **COX7B** | 0,202 (0,150 - 0,268) | 0,128 (0,113 - 0,161) | <0,01 | 0,139 (0,116 - 0,221) | <0,01 |
| CREM | 0,001 (0,001 - 0,002) | 0,001 (0,000 - 0,002) | 0.84 | 0,001 (0,001 - 0,001) | 0.15 |
| **ECHDC3** | 0,005 (0,003 - 0,008) | 0,010 (0,006 - 0,028) | <0,01 | 0,012 (0,007 - 0,020) | 0.00 |
| FOLR3 | 0,050 (0,031 - 0,210) | 0,061 (0,032 - 0,259) | 0.61 | 0,061 (0,032 - 0,117) | 0.90 |
| GPX3 | 0,002 (0,001 - 0,003) | 0,002 (0,001 - 0,003) | 0.16 | 0,002 (0,001 - 0,004) | 0.46 |
| GSTM1 | 0,008 (0,001 - 0,017) | 0,007 (0,001 - 0,015) | 0.40 | 0,009 (0,002 - 0,016) | 0.93 |
| **IL18R1** | 0,008 (0,007 - 0,014) | 0,018 (0,008 - 0,036) | <0,01 | 0,017 (0,008 - 0,028) | 0.01 |
| IL1R1 | 0,002 (0,001 - 0,004) | 0,001 (0,001 - 0,003) | 0.31 | 0,002 (0,000 - 0,003) | 0.45 |
| **IRS2#** | 0,186 (0,111 - 0,259) | 0,325 (0,132 - 0,911) | 0.07 | 0,369 (0,213 - 0,747) | 0.186 |
| **KCNE1** | 0,135 (0,105 - 0,395) | 0,048 (0,017 - 0,253) | <0,01 | 0,061 (0,018 - 0,140) | <0,01 |
| **MMP9** | 0,276 (0,223 - 0,532) | 0,505 (0,288 - 1,066) | 0.01 | 0,569 (0,345 - 0,956) | 0.02 |
| **MYL4** | 0,006 (0,002 - 0,013) | 0,003 (0,002 - 0,005) | 0.03 | 0,002 (0,001 - 0,006) | <0,01 |
| PER1 | 0,031 (0,017 - 0,063) | 0,043 (0,029 - 0,088) | 0.11 | 0,034 (0,022 - 0,077) | 0.40 |
| POLE2 | 0,002 (0,002 - 0,004) | 0,003 (0,002 - 0,004) | 0.60 | 0,003 (0,002 - 0,004) | 0.70 |
| SMPD3 | 0,013 (0,007 - 0,020) | 0,009 (0,004 - 0,026) | 0.23 | 0,011 (0,005 - 0,018) | 0.45 |
| THBS1 | 0,075 (0,049 - 0,272) | 0,062 (0,047 - 0,134) | 0.21 | 0,080 (0,059 - 0,182) | 0.71 |
| TREML4 | 0,008 (0,002 - 0,017) | 0,008 (0,001 - 0,019) | 0.99 | 0,028 (0,016 - 0,039) | <0.01** |

Nota: Gene, de acordo com a nomenclatura HUGO (*Human Genome Organization*); expressão relativa apresentada como mediana e intervalo interquartis (25%-75%); GCb, grupo controle para validação biológica; 1° SCA, grupo de pacientes com Síndrome Coronária Aguda sem infarto prévio; 2° IAM com SST, grupo de pacientes com Síndrome Coronária Aguda com infarto prévio; em negrito genes com $p < 0,05$ para comparar os grupos GCb, 1º SCA e 2º SCA por testes não paramétricos de *Kruskal-Wallis;* * teste não paramétrico de *Mann-Whiteny* entre 1º SCA e GCb; ** teste não paramétrico de *Mann-Whiteny* entre 2º SCA e GCb; † foram excluídos da análise os pacientes do sexo feminino e com idade > 65 anos; + foram excluídos da análise pacientes com idade > 65 anos; # valores referentes após exclusão de pacientes com idade > 65 anos, do sexo feminino e diagnosticados com angina instável.

Os perfis de expressão dos genes supracitados obtidos através das análises por microarranjo de DNA e PCR em tempo real, de acordo com o intervalo de tempo investigado, estão representados em formas gráficas na Figura 17. Vale ressaltar que os resultados numéricos de expressão de RNAm estão em escalas distintas, uma vez que o processamento dos dados são específicos para cada metodologia.

Além dos tempos de colheitas referentes às primeiras 48 h da admissão hospitalar, nesta análise foram incluídos os valores de intensidade de expressão quantificados no

tempo de colheita 1 ANO, isto é, momento posterior pelo qual os pacientes do grupo IAM com SST não apresentam evento agudo de isquemia (resultado averiguado através da dosagem sérica de cTnI e CK-MB, e anamnese. Não foram registrados eventos de reinfarto durante este período de um ano – dados não apresentados).

O objetivo principal foi avaliar se os genes diferentemente expressos observados nas primeiras 48 h após IAM, retornaram às concentrações normais após um ano, isto é, com intensidade de expressão semelhante ao grupo controle. Contudo devido ao número amostral reduzido (5 pacientes com 1º IAM com SST, 5 pacientes com 2º IAM com SST e 6 controles), os resultados devem ser observados com cautela.

Através das análises por microarranjo de DNA observa-se que os genes AREG (Figura 17C), BCL2A1 (Figura 17E) e TREML4 (Figura 17W), apresentam-se diferentemente expressos para os pacientes do grupo 1ºIAM com SST no tempo de colheita 1 ANO em relação aos controles ($p < 0,05$). Já na análise pela PCR em tempo real, com as mesmas amostras utilizadas nas análises de microarranjo (durante a validação técnica), observou-se diferenças significativas em 2º IAM com SST no tempo de colheita 1 ANO para os genes CA1 (Figura 17J), COX7B (Figura 17M) e MYL4 (Figura 17X). Estudos futuros devem ser propostos no intuito de esclarecer o real papel destes genes e sua relação com a SCA a longo prazo, bem como sua possível aplicação como marcador de doença cardiovascular.

Já para os demais genes: ALOX15 (Figura 17A e B), BCL2L1(Figura 17G e H), ECHDC3 (Figura 17M e N), IL18RL1 (Figura 17O e P), IRS2 (Figura 17Q e R), KCNE1 (Figura 17S e T) e MMP9 (Figura 17U e V), observa-se que em ambas as técnicas estudadas, as concentrações após um ano não foram diferentes significativamente em relação ao controle, o que sugere que estes genes sejam marcadores de SCA.

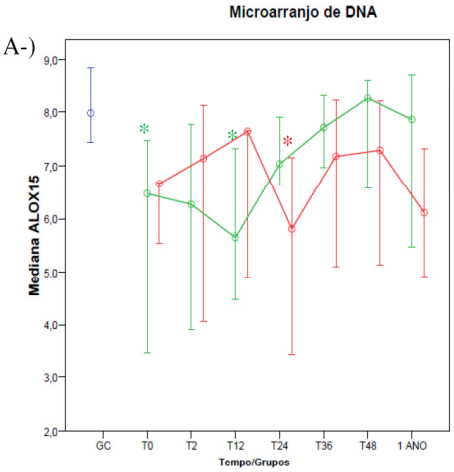
Curiosamente observa-se um padrão de expressão similar entre os genes: ECHDC3 (Figura 17M e N), IL18RL1 (Figura 17O e P), IRS2 (Figura 17Q e R), KCNE1 (Figura 17S e T) e MMP9 (Figura 17U e V), um perfil semelhante a uma curva de Gauss deslocada para a esquerda, com o valor de expressão máxima após intervenção coronariana percutânea em $T_2$. Outros perfis facilmente observados estão entre os genes: ALOX15 (Figura 17A e B), BCL2L1(Figura 17G e H), CA1 (Figura 17J e K), COX7B (Figura 17M e N) e MYL4 (Figura 17X e Y), semelhante à um parábola, com valor de expressão mínimo nas primeiras 12 h.

Por fim, o gene TREML4 se destaca de todos os demais, por apresentar valores para o grupo controle não detectáveis pela PCR em tempo real (83% pacientes com valores negativo), em contrapartida, este gene apresenta valores elevados para os pacientes com IAM com SST (14% pacientes com valores negativos) (Figura 17Y).

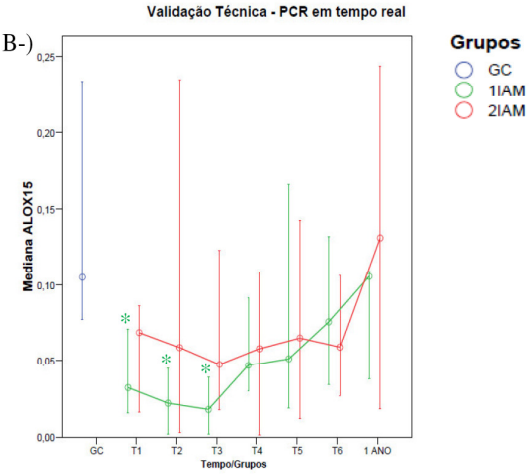
Para averiguar a especificidade diagnóstica dos potenciais biomarcadores validados biologicamente frente a SCA, isto é, no diagnóstico de angina instável, IAM sem SST e IAM com SST, realizou-se análises estatística da quantificação relativa de RNAm entre as entidades supracitadas versus o grupo controle, representadas na Figura 18. Contudo, os resultados devem ser observados com cautela, devido ao número amostral reduzido quando estratificados por critério de diagnóstico, principalmente para os pacientes com diagnóstico de IAM com SST (7 pacientes, conforme apresentado na Tabela 3).

Interessante comentar que para os genes ALOX15 e KCNE1 observa-se expressão de RNAm descrente de acordo com o critério de diagnóstico, valores de mediana para o grupo com angina instável maiores que no grupo IAM sem SST, que por sua vez, foram maiores que no IAM com SST; já para os genes AREG, ECHDC3, IRS2, IL18R1 e MMP9 nota-se valores de medianas de expressão menores para o grupo com angina instável que no grupo IAM sem SST, que por sua vez, foram menores que no IAM com SST, possivelmente indicando uma associação destes genes com a gravidade da síndrome.

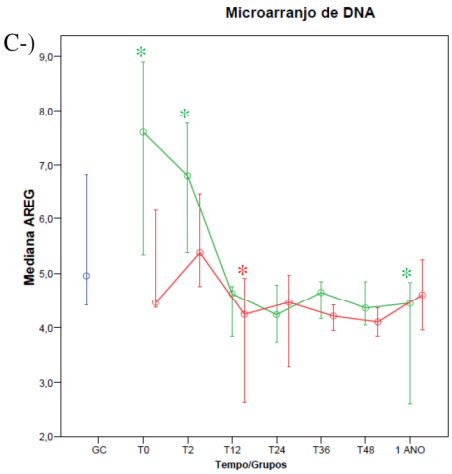
A-)


Microarranjo de DNA
Mediana ALOX15
9,0
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
GC
T0
T2
T12
T24
T36
T48
1 ANO
Tempo/Grupos

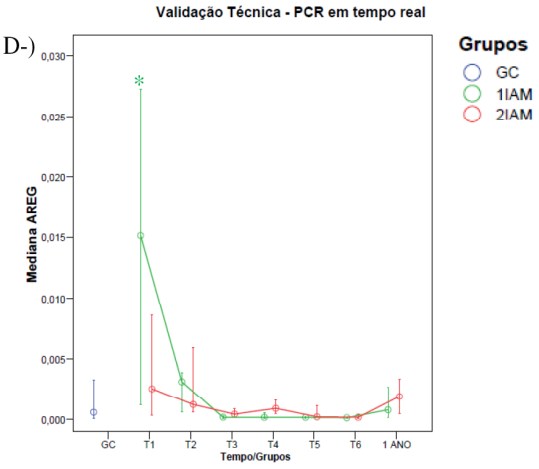
B-)


Validação Técnica - PCR em tempo real
Mediana ALOX15
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
GC
T1
T2
T3
T4
T5
T6
1 ANO
Tempo/Grupos
Grupos
GC
1IAM
2IAM

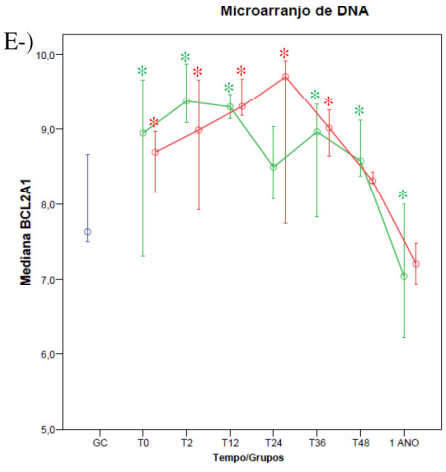
C-)


Microarranjo de DNA
Mediana AREG
9,0
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
GC
T0
T2
T12
T24
T36
T48
1 ANO
Tempo/Grupos

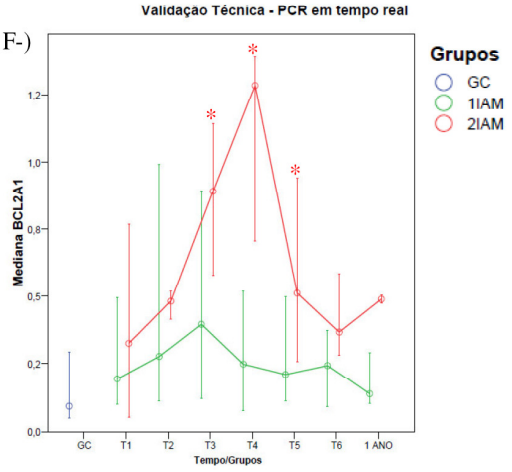
D-)


Validação Técnica - PCR em tempo real
Mediana AREG
0,030
0,025
0,020
0,015
0,010
0,005
0,000
GC
T1
T2
T3
T4
T5
T6
1 ANO
Tempo/Grupos
Grupos
GC
1IAM
2IAM

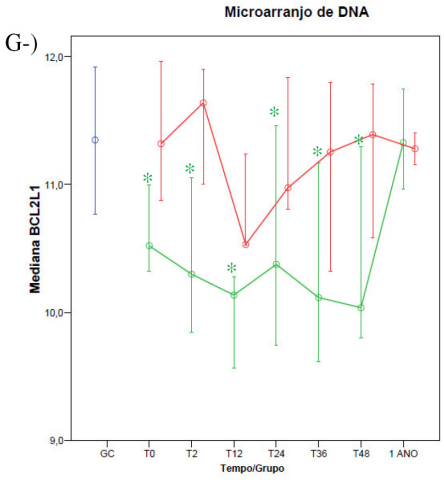
E-)


Microarranjo de DNA
Mediana BCL2A1
10,0
9,0
8,0
7,0
6,0
5,0
GC
T0
T2
T12
T24
T36
T48
1 ANO
Tempo/Grupos

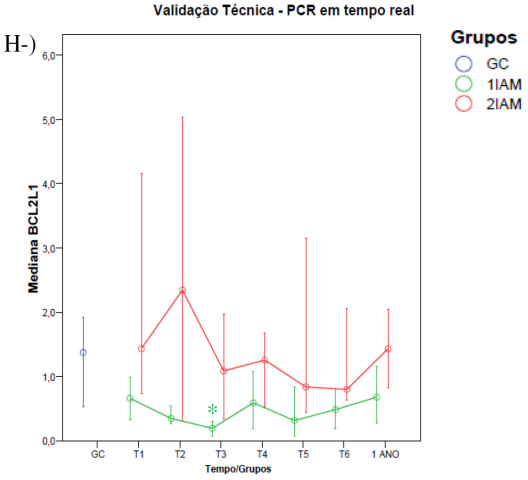
F-)


Validação Técnica - PCR em tempo real
Mediana BCL2A1
1,2
1,0
0,8
0,5
0,2
0,0
GC
T1
T2
T3
T4
T5
T6
1 ANO
Tempo/Grupos
Grupos
GC
1IAM
2IAM

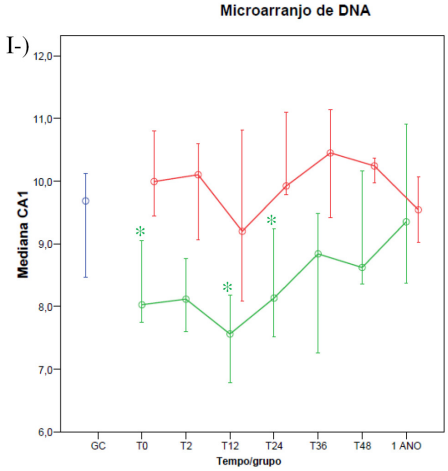
G-)


Microarranjo de DNA
Mediana BCL2L1
12,0
11,0
10,0
9,0
GC
T0
T2
T12
T24
T36
T48
1 ANO
Tempo/Grupo

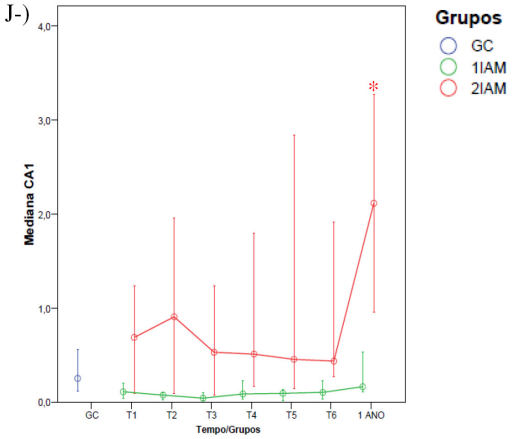
H-)


Validação Técnica - PCR em tempo real
Mediana BCL2L1
6,0
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
GC
T1
T2
T3
T4
T5
T6
1 ANO
Tempo/Grupos
Grupos
GC
1IAM
2IAM

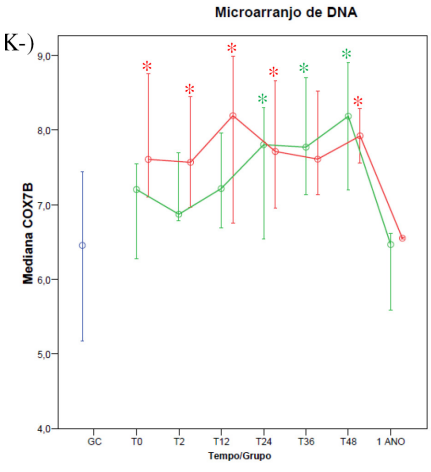
I-)


Microarranjo de DNA
Mediana CA1
12,0
11,0
10,0
9,0
8,0
7,0
6,0
GC
T0
T2
T12
T24
T36
T48
1 ANO
Tempo/grupo

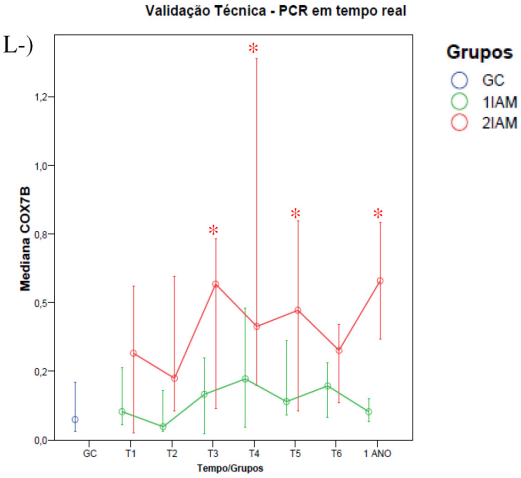
J-)


Validação Técnica - PCR em tempo real
Mediana CA1
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
GC
T1
T2
T3
T4
T5
T6
1 ANO
Tempo/Grupos
Grupos
GC
1IAM
2IAM

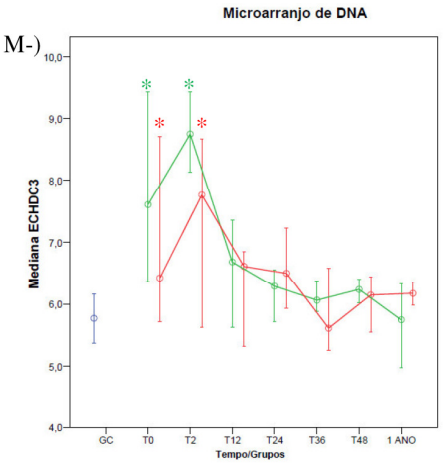
K-)


Microarranjo de DNA
Mediana COX7B
9,0
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
GC
T0
T2
T12
T24
T36
T48
1 ANO
Tempo/Grupo

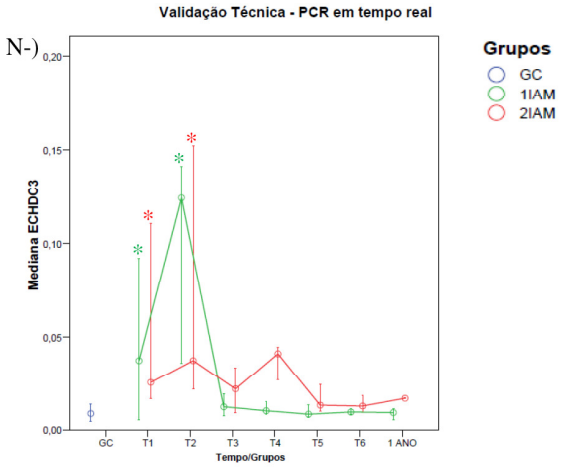
L-)


Validação Técnica - PCR em tempo real
Mediana COX7B
1,2
1,0
0,8
0,5
0,2
0,0
GC
T1
T2
T3
T4
T5
T6
1 ANO
Tempo/Grupos
Grupos
GC
1IAM
2IAM

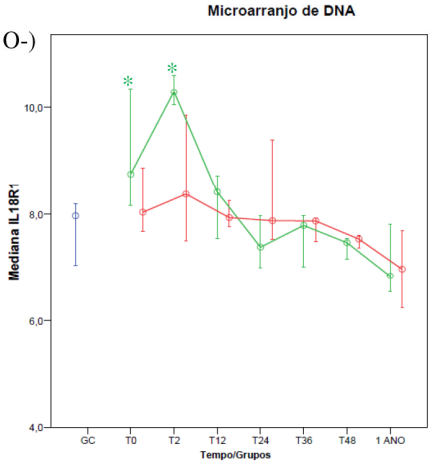
M-)


Microarranjo de DNA
Mediana ECHDC3
10,0
9,0
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
GC
T0
T2
T12
T24
T36
T48
1 ANO
Tempo/Grupos

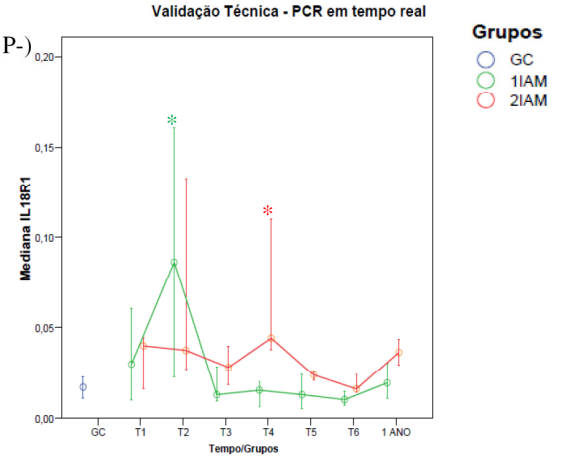
N-)


Validação Técnica - PCR em tempo real
Mediana ECHDC3
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
GC
T1
T2
T3
T4
T5
T6
1 ANO
Tempo/Grupos
Grupos
GC
1IAM
2IAM

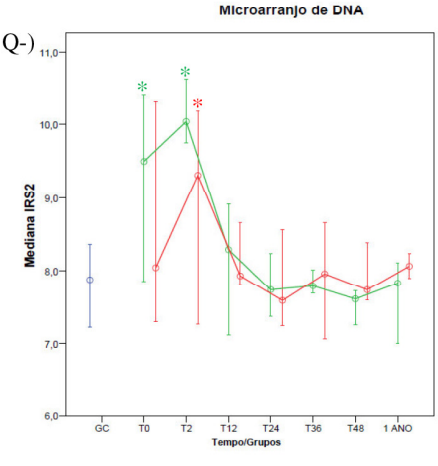
O-)


Microarranjo de DNA
Mediana IL18R1
10,0
8,0
6,0
4,0
GC
T0
T2
T12
T24
T36
T48
1 ANO
Tempo/Grupos

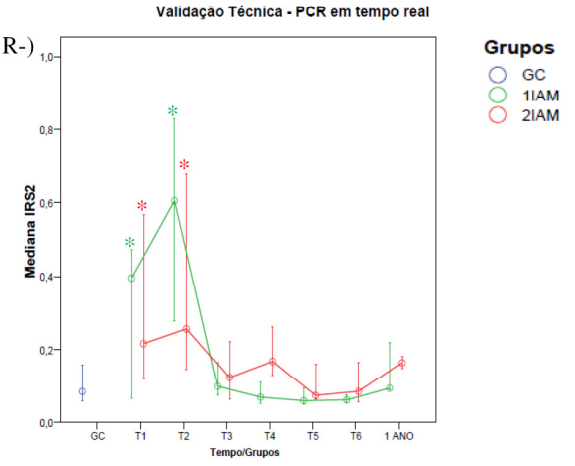
P-)


Validação Técnica - PCR em tempo real
Mediana IL18R1
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
GC
T1
T2
T3
T4
T5
T6
1 ANO
Tempo/Grupos
Grupos
GC
1IAM
2IAM

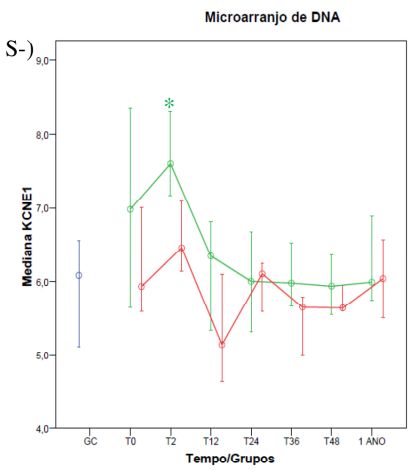
Q-)


Microarranjo de DNA
Mediana IRS2
11,0
10,0
9,0
8,0
7,0
6,0
GC
T0
T2
T12
T24
T36
T48
1 ANO
Tempo/Grupos

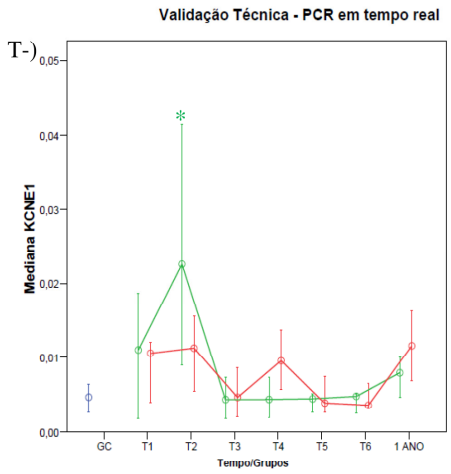
R-)


Validaçao Técnica - PCR em tempo real
Mediana IRS2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
GC
T1
T2
T3
T4
T5
T6
1 ANO
Tempo/Grupos
Grupos
GC
1IAM
2IAM

S-)

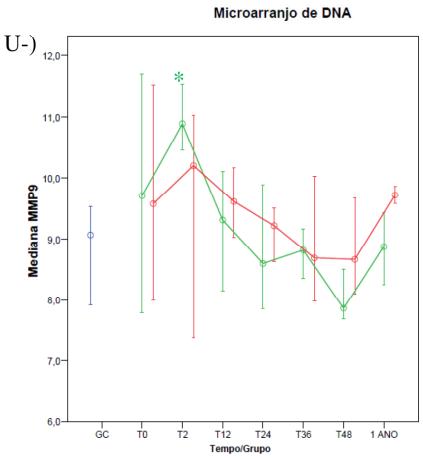

Microarranjo de DNA
Mediana KCNE1
9,0
8,0
7,0
6,0
5,0
4,0
GC
T0
T2
T12
T24
T36
T48
1 ANO
Tempo/Grupos

T-)

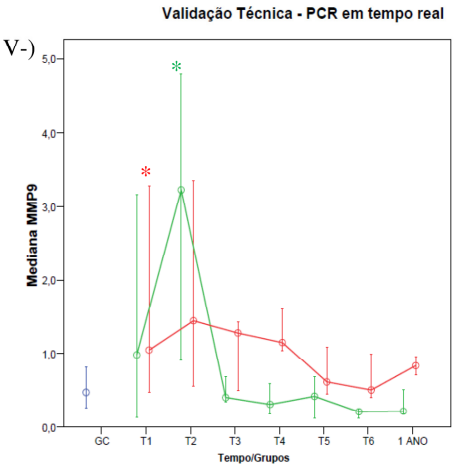

Validação Técnica - PCR em tempo real
Mediana KCNE1
0,05
0,04
0,03
0,02
0,01
0,00
GC
T1
T2
T3
T4
T5
T6
1 ANO
Tempo/Grupos

Grupos
GC
1IAM
2IAM

U-)

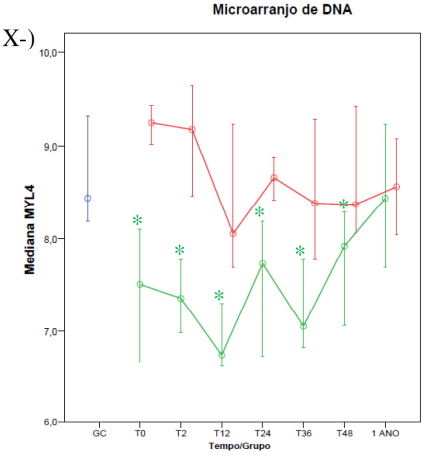

Microarranjo de DNA
Mediana MMP9
12,0
11,0
10,0
9,0
8,0
7,0
6,0
GC
T0
T2
T12
T24
T36
T48
1 ANO
Tempo/Grupo

V-)

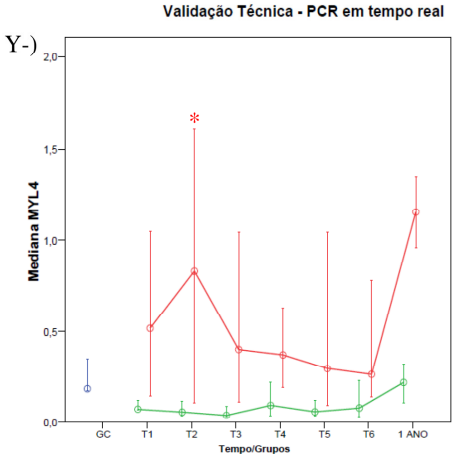

Validação Técnica - PCR em tempo real
Mediana MMP9
5,0
4,0
3,0
2,0
1,0
0,0
GC
T1
T2
T3
T4
T5
T6
1 ANO
Tempo/Grupos

Grupos
GC
1IAM
2IAM

X-)


Microarranjo de DNA
Mediana MYL4
10,0
9,0
8,0
7,0
6,0
GC
T0
T2
T12
T24
T36
T48
1 ANO
Tempo/Grupo

Y-)


Validação Técnica - PCR em tempo real
Mediana MYL4
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
GC
T1
T2
T3
T4
T5
T6
1 ANO
Tempo/Grupos

Grupos
GC
1IAM
2IAM

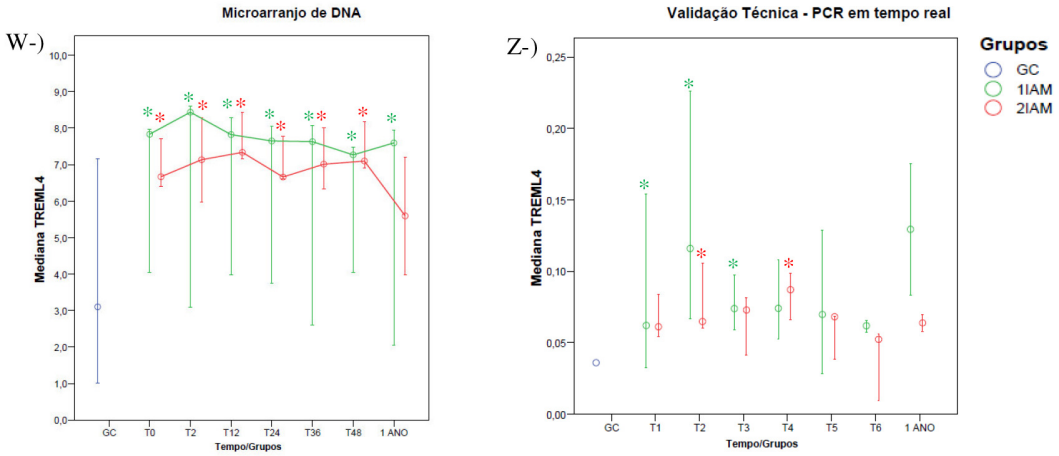
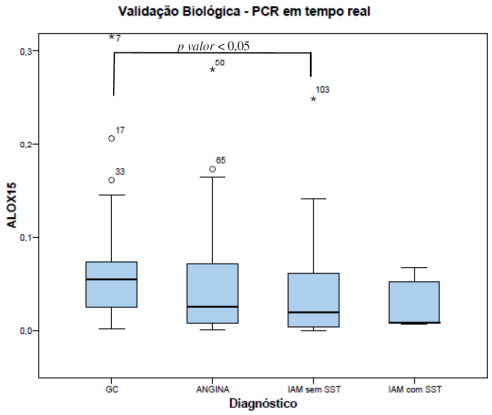
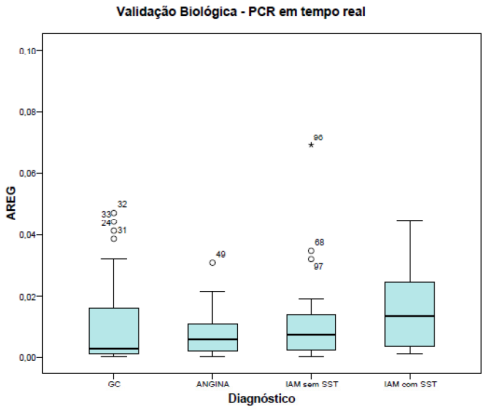
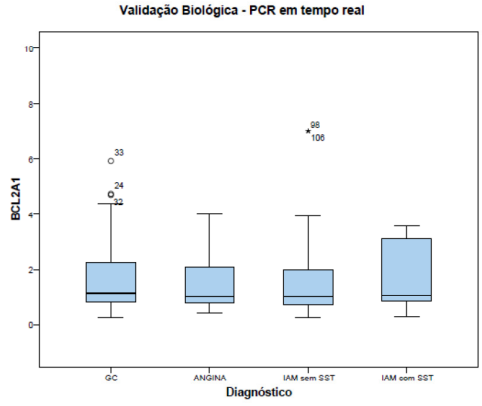
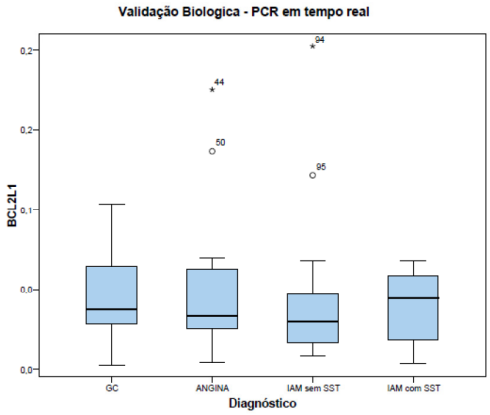


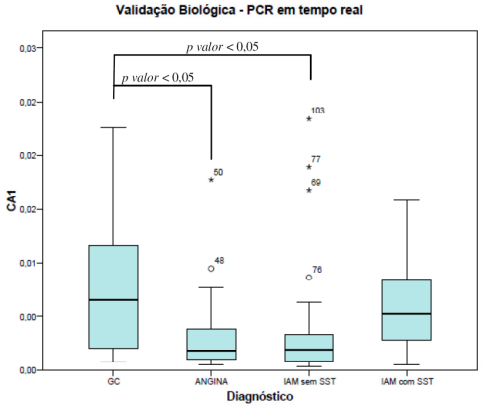

Figura 17. **Perfis de expressão dos genes ALOX15, AREG, BCL2A1, BCL2L1, CA1, COX7B, ECHDC3, IL18R1, IRS2, KCNE1, MMP9, MYL4 e TREML4 do GC e durante os tempos de segmento investigados, nos subgrupos 1° IAM com SST e 2° IAM com SST.** Gráficos à esquerda, medianas, intervalos de máximo e mínimo das intensidades dos genes obtidos pelas análises por microarranjo de DNA. Gráficos a direita, medianas, intervalos de máximo e mínimo das quantificações relativas de expressão dos genes pela PCR em tempo real.
Nota: GC, grupo controle representado em cor azul; 1IAM, subgrupo correspondente a indivíduos sem história prévia de IAM com SST, representado em cor verde; 2IAM, subgrupo de indivíduos com história prévia de IAM com SST, representado em cor bege; $T_0$, primeira colheita; $T_2$, segunda colheita após intervenção coronária percutânea; $T_{12}$, terceira colheita após 12h; $T_{24}$, quarta colheita após 24h; $T_{36}$, quinta colheita após 36h; $T_{48}$, sexta colheita após 48h; 1ANO, sétima colheita correspondente a aproximadamente um ano após IAM; * $p < 0,05$ para teste não paramétrico de *Mann-Whiteny* entre GC e respectivos tempos de colheita de cada subgrupo, 1º IAM com SST e 2º IAMS com SST.

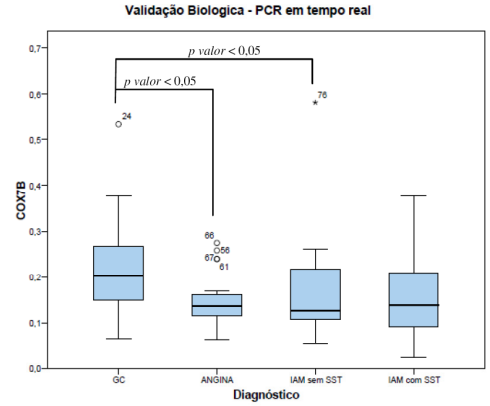

Validação Biológica - PCR em tempo real
p valor < 0,05
ALOX15
Diagnóstico
GC
ANGINA
IAM sem SST
IAM com SST

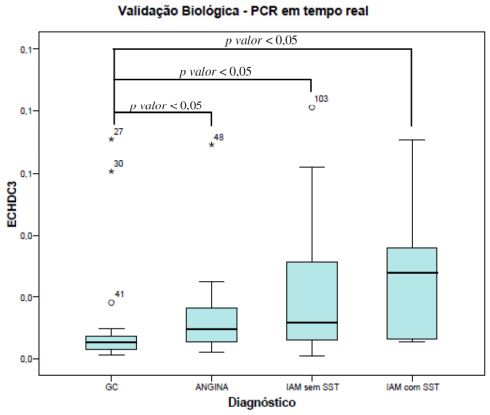

Validação Biológica - PCR em tempo real
AREG
Diagnóstico
GC
ANGINA
IAM sem SST
IAM com SST

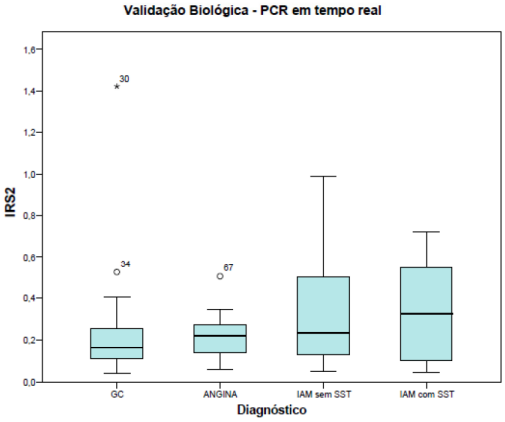

Validação Biológica - PCR em tempo real
BCL2A1
Diagnóstico
GC
ANGINA
IAM sem SST
IAM com SST


Validação Biologica - PCR em tempo real
BCL2L1
Diagnóstico
GC
ANGINA
IAM sem SST
IAM com SST


Validação Biológica - PCR em tempo real
p valor < 0,05
p valor < 0,05
CA1
Diagnóstico
GC
ANGINA
IAM sem SST
IAM com SST


Validação Biologica - PCR em tempo real
p valor < 0,05
p valor < 0,05
COX7B
Diagnóstico
GC
ANGINA
IAM sem SST
IAM com SST


Validação Biológica - PCR em tempo real
p valor < 0,05
p valor < 0,05
p valor < 0,05
ECHDC3
Diagnóstico
GC
ANGINA
IAM sem SST
IAM com SST


Validação Biológica - PCR em tempo real
IRS2
Diagnóstico
GC
ANGINA
IAM sem SST
IAM com SST

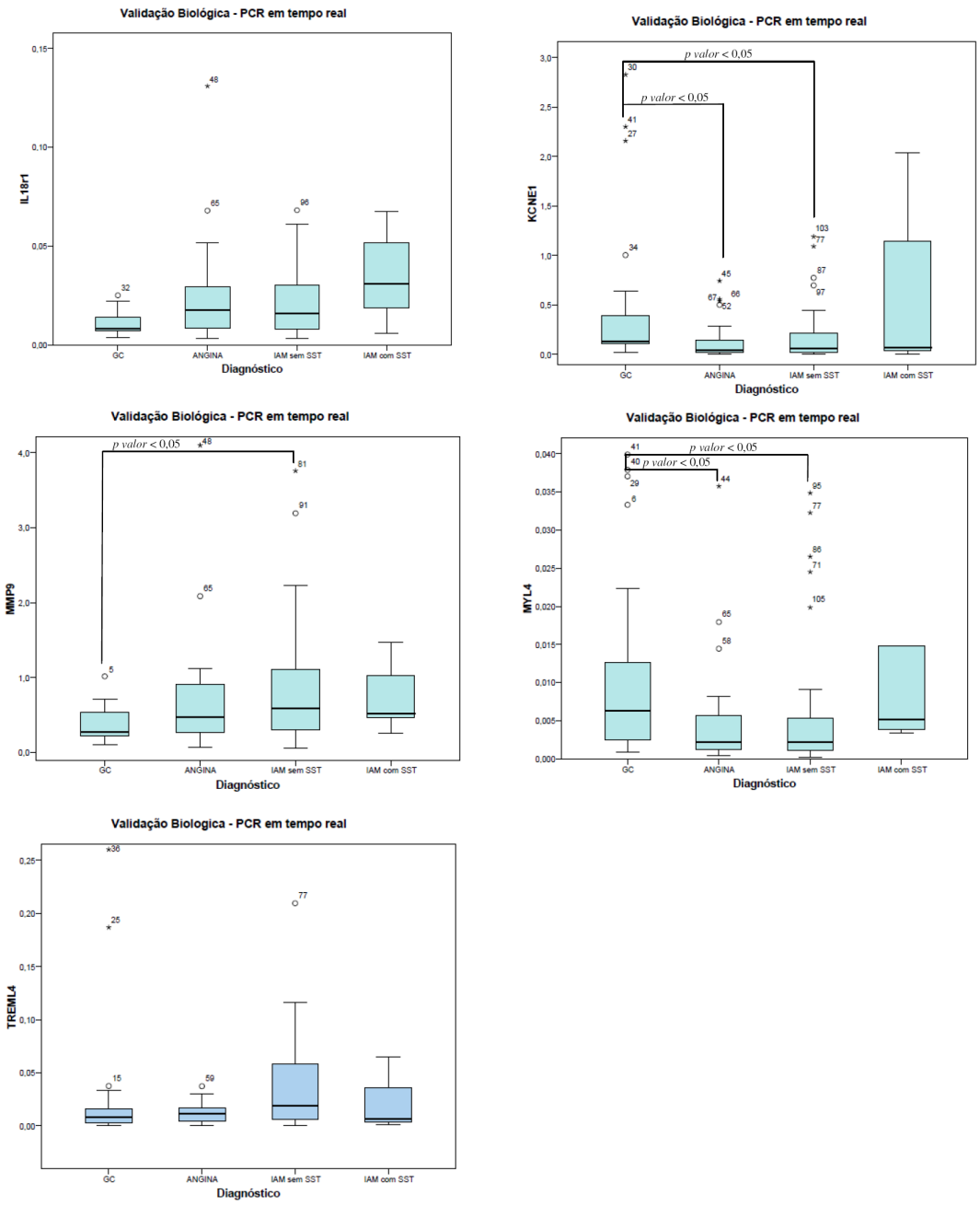



Figura 18. **Representação gráfica na forma de caixa dos valores de expressão dos genes ALOX15, AREG, BCL2A1, BCL2L1, CA1, COX7B, ECHDC3, IL18R1, IRS2, KCNE1, MMP9, MYL4 e TREML4 divididos em GC, Angina instável, IAM sem SST e IAM com SST.**
Nota: *, valores de expressão relativa fora do intervalo inter-quartis; º, valores extremos; GC, grupo controle; ANGINA, angina instável; *p*-valor, teste não paramétrico de *Mann-Whiteny* entre GC e respectivos grupos de angina instável, IAM sem SST e IAM com SST.

## 4.3 ANÁLISE PROTEÔMICA

O estudo proteômico proposto neste estudo, consiste em avaliar o perfil das proteínas plasmáticas em pacientes com IAM com SST durante as 48 h após evento da dor precordial e em indivíduos controles pareados.

Inicialmente foram detectados através da metodologia de SELDI-TOF/MS 11.334 picos correspondentes à possíveis proteínas plasmáticas. Após seleção de proteínas com intensidade logarítmica significativamente acima do valor da intensidade do ruído de fundo ($p < 0,01$ e *Fold Change* ± 1,5), resultando em 3.844 espectros de massa molecular entre 1.127,5 Da e 17.993,5 Da, os dados foram submetidos às análises comparativas entre os grupos IAM com SST e controle.

### 4.3.1 Proteínas diferentemente expressas em 1º IAM com SST

Observou-se 53 espectros de proteínas plasmáticas com intensidades estatisticamente diferentes na primeira colheita para 1º IAM com SST em relação aos controles ($p < 0.05$; Tabela 1, anexo E). Vinte e três destas têm massa molecular entre 2.128 a 6.109 Da, apresentam expressão aumentada e trinta espectros protéicos com massa molecular entre 6.362,5 a 17.807,5 Da, com expressão diminuída em relação ao controle.

Nos demais tempos de colheita realizados, foram observados 91, 329, 84, 88 e 123 espectros de proteínas plasmáticas diferentemente expressas quando comparados com controle, correspondentes respectivamente aos tempos $T_2$, $T_{12}$, $T_{24}$, $T_{36}$ e $T_{48}$ ($p < 0.05$; Tabelas 2 a 6, anexo E). Considerando todos os tempos de colheitas avaliados pode-se dizer que 479 possíveis proteínas estão diferentemente expressas em relação aos indivíduos não infartados nas primeiras 48 h após IAM para os indivíduos sem infarto prévio.

Os perfis de expressão das 53 proteínas observadas em 1ºIAM $T_0$ em relação aos demais tempos de colheita estão representados através do agrupamento hierárquico com base na distância Euclidiana, na Figura 19. Vinte das 23 proteínas com expressão aumentada se apresentaram elevadas após 48 h ($p < 0.05$); contudo somente 3 destas, com massa molecular de 2.128 Da, 2.150 Da e 2.195 Da (p-valor $< 0.05$), mantiveram-se elevadas durante todos os tempos de colheitas avaliados, para este subgrupo de IAM. Sete espectros de proteínas, com massa molecular de 2.135,5 Da, 2.158 Da, 2.180,5 Da, 2.182 Da, 2.183,5 Da, 4.267 Da e 6.109 Da, estiveram com expressão aumentada significativamente apenas na primeira colheita ($p < 0.05$). Dezoito das 30 proteínas com

expressão diminuida também foram observadas elevadas após 48 h ($p < 0.05$); sendo 11, com massa molecular de 9.217 Da, 14.494 Da e entre 17.888 a 17.807,5 Da; $p < 0.05$) mantiveram-se elevadas durante todos os tempos de colheitas avaliados, para este subgrupo de IAM. Dois espectros de proteínas, com massa molecular de 11.842 Da e 15.460 Da, estiveram com expressão reduzida significativamente apenas na primeira colheita ($p < 0.05$).

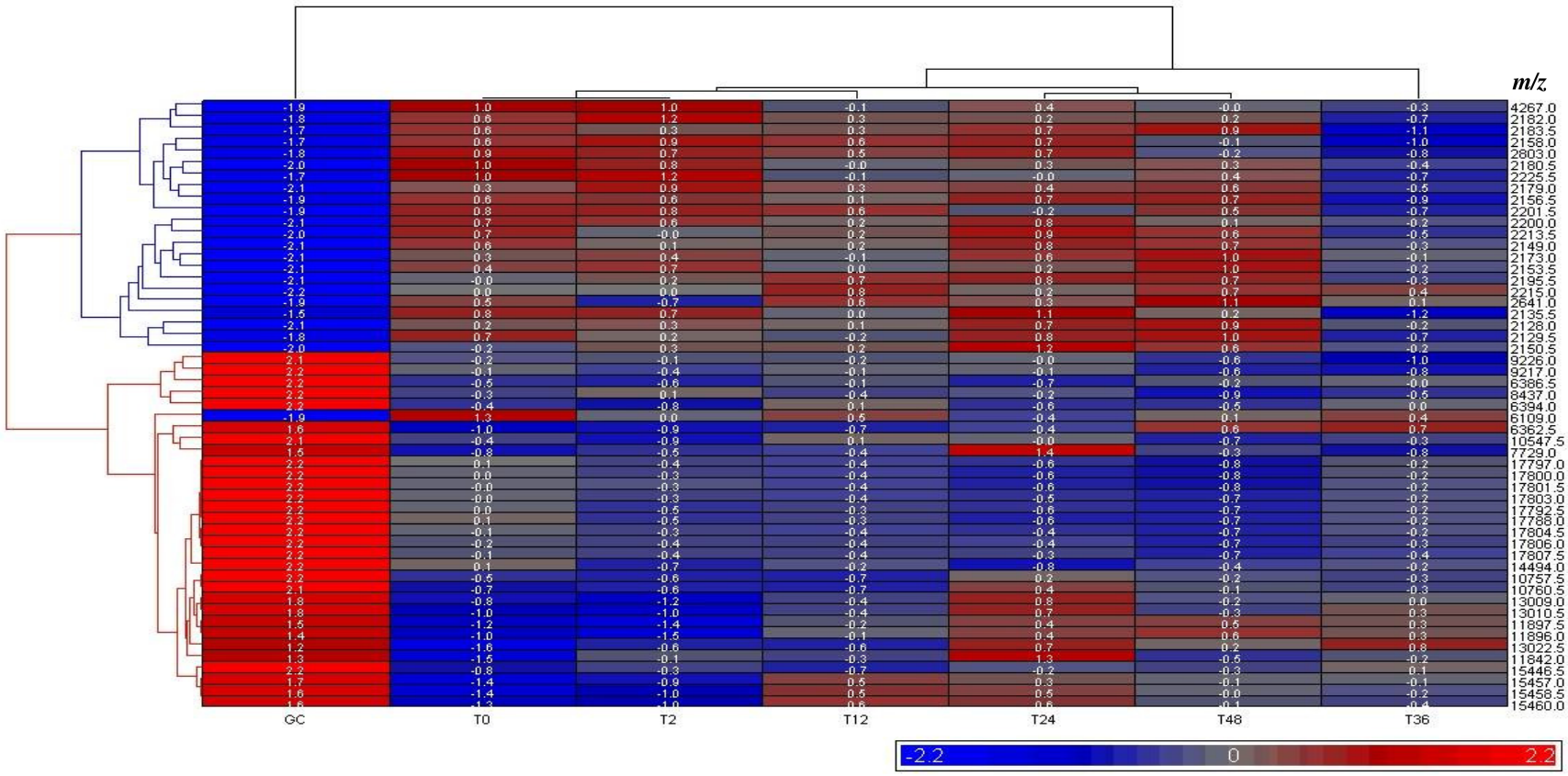



Figura 19**. Agrupamento hierárquico com base na distância Euclidiana das proteínas diferentemente expressas em 1º IAM com SST $T_0$.**
Nota: Escala de cores entre azul e vermelho e valores sobre as células correspondem a *Fold Change.* Proteína com maior diferença de expressão aumentada em relação ao controle, representa coloração vermelha mais intensa, maior diferença de expressão diminuída representa coloração azul mais intensa. *m/z*, relações massas moleculares e cargas das moléculas ionizadas; 1º IAM com SST, pacientes com IAM com SST sem infarto prévio; $T_0$, primeira colheita; $T_2$, segunda colheita após 2 h; $T_{12}$, terceira colheita após 12 h; $T_{24}$, quarta colheita após 24 h; $T_{36}$, quinta colheita após 36 h; $T_{48}$, sexta colheita após 48 h; símbolo negativo (-), proteínas com expressão diminuída; símbolo positivo (+), proteínas com expressão aumentada.

### 4.3.2 Proteínas diferentemente expressas em 2º IAM com SST

Selecionou-se 36 espectros de proteínas plasmáticas com intensidades estatisticamente diferentes na primeira colheita para o grupo 2º IAM com SST ($p < 0.05$; Tabela 7, anexo E). Somente dois espectros de proteínas menores, com massas moleculares de 3.755,5 Da e 5.432 Da, apresentam expressão aumentada em relação ao controle, os demais 24 espectros, com massa molecular entre 6.386,5 Da a 17.825,5 Da, apresentam expressão diminuída em relação ao controle.

Nos demais tempos de colheita avaliados nos pacientes 2º IAM com SST foram observados 27, 23, 4, 13 e 19 espectros de proteínas plasmáticas diferentemente expressas correspondendo aos tempos $T_2$, $T_{12}$, $T_{24}$, $T_{36}$ e $T_{48}$, respectivamente ($p < 0.05$; dados apresentados nas Tabela 7, anexo E). Considerando todos os tempos de colheitas avaliados, podemos dizer que 76 possíveis proteínas estão diferentemente expressas nas primeiras 48 h após IAM nos indivíduos com histórico prévio de IAM.

Os perfis de expressão das 36 proteínas observadas em 2º IAM $T_0$ em relação aos demais tempos de colheita estão representados através do agrupamento hierárquico com base na distância Euclidiana, Figura 20. As duas possíveis proteínas com expressão aumentada, com massa molecular de 3.755,5 Da e 5.432 Da, não se apresentaram diferentemente expressas nos demais tempos estudados ($p > 0,05$). Sete das 34 proteínas com expressão dimuida também foram observadas elevadas após 48 h ($p < 0.05$). Contudo apenas a proteína de massa molecular de 6.482,5 Da manteve-se elevada durante todos os tempos de colheitas avaliados para os pacientes do grupo 2º IAM com SST ($p < 0.05$). Treze espectros de proteínas, com massa molecular de 8.653 Da, 12.686,5 Da, 12.689,5 Da, 14.566 Da, 14.570,5 Da, 15.443,5 Da, 15.446,5 Da, 17.797 Da, 17.803 Da, 17.804,5 Da, 17.806 Da, 17.807,5 Da e 17.825,5 Da, apresentaram expressão reduzida significativamente em relação ao controle, apenas na primeira colheita ($p < 0.05$).

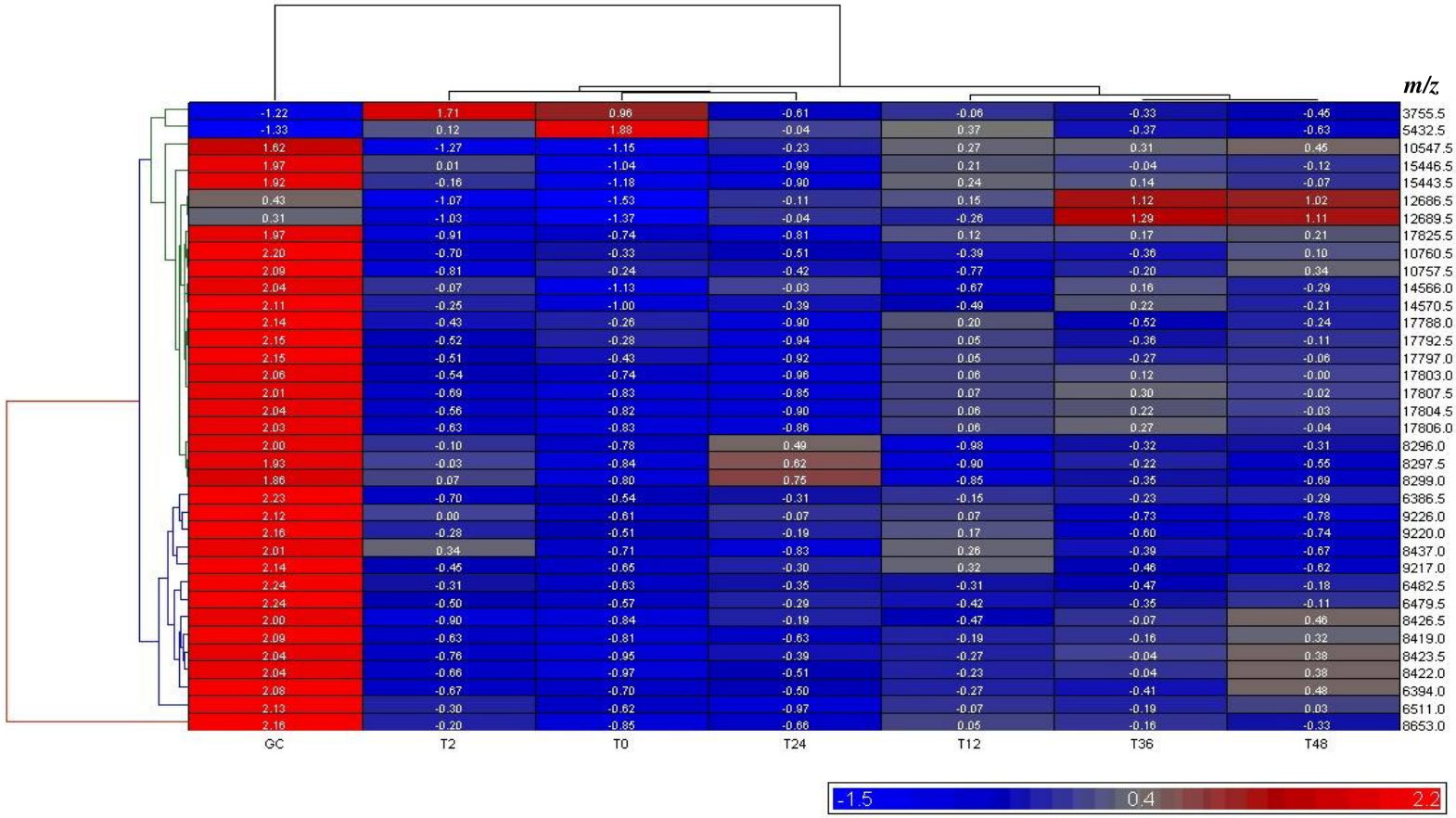



Figura 20**. Agrupamento hierárquico com base na distância Euclidiana das proteínas diferentemente expressas em 2º IAM com SST $T_0$.**
Nota: Escala de cores entre azul e vermelho e valore sobre as células correspondem a *Fold Change*. Proteína com maior diferença de expressão aumentada em relação ao controle representa coloração vermelha mais intensa, maior diferença de expressão diminuída representa coloração azul mais intensa.
*m/z*, relações massas moleculares e cargas das moléculas ionizadas; 2º IAM, pacientes com IAM com SST com infarto prévio; $T_0$, primeira colheita; $T_2$, segunda colheita após 2 h; $T_{12}$, terceira colheita após 12 h; $T_{24}$, quarta colheita após 24 h; $T_{36}$, quinta colheita após 36 h; $T_{48}$, sexta colheita após 48 h; símbolo negativo (-), proteínas com expressão diminuída; símbolo positivo (+), proteínas com expressão aumentada.

### 4.3.3 Intersecção entre os resultados protéicos de 1º IAM com SST e 2º IAM com SST

Ao comparar as listas dos espectros correspondentes às possíveis proteínas diferentemente expressas, de acordo com suas massas moleculares, observa-se que 60 possíveis proteínas plasmáticas são comuns entre 1º IAM com SST e 2º IAM com SST nas primeiras 48 h após evento, Figura 21A.

Vinte e três espectros de proteínas não foram significativamente diferentes na primeira colheita para ambos subgrupos (porção superior do Diagrama de *Venn,* Figura 21B). Vinte espectros observados na primeira colheita para 2º IAM com SST estiveram presentes em outros tempos de colheitas, que não na primeira para 1º IAM com SST, o mesmo pode ser descrito para um único espectro observado na primeira colheita para 1º IAM com SST em relação a 2º IAM com SST (Figura 21B). Já, 36 espectros diferentemente expressos em 1º IAM com SST foram exclusivos à primeira colheita deste grupo (Figura 21B). Por fim, pode-se concluir que 16 espectros de proteínas, com massa molecular entre 6.386,5 Da a 17.807,7 Da, foram comuns entre os grupos 1º IAM com SST e 2º IAM com SST para a primeira colheita realizada no Pronto-Socorro antes do tratamento médico ser instituído (intersecção do Diagrama de *Venn*, Figura 21B).

Ao comparar as listas dos espectros protéicos correspondentes a possíveis proteínas diferentemente expressas, de acordo com suas massas moleculares, observa-se que 60 possíveis proteínas plasmáticas são comuns entre 1º IAM com SST e 2º IAM com SST nas primeiras 48 h após evento, Figura 21A.

Vinte e três espectros de proteínas não foram significativamente diferentes na primeira colheita para ambos subgrupos (porção superior do Diagrama de *Venn,* Figura 19B). Vinte espectros observados na primeira colheita para 2º IAM com SST estiveram presentes em outros tempos de colheitas, que não na primeira para 1º IAM com SST, o mesmo pode ser descrito para um único espectro observado na primeira colheita para 1º IAM com SST em relação a 2º IAM com SST, Figura 18B. Já, os 36 espectros proteícos diferentemente expressos em 1º IAM com SST foram exclusivos à primeira colheita e a este grupo, Figura 18B. Por fim, pode-se concluir que 16 espectros de proteínas, massa molecular entre 6386,5 Da a 17807,7 Da, foram comuns entre os grupos 1º IAM com SST e 2º IAM com SST para a primeira colheita realizada no Pronto-Socorro antes do tratamento médico ser instituído, Figura 21B.

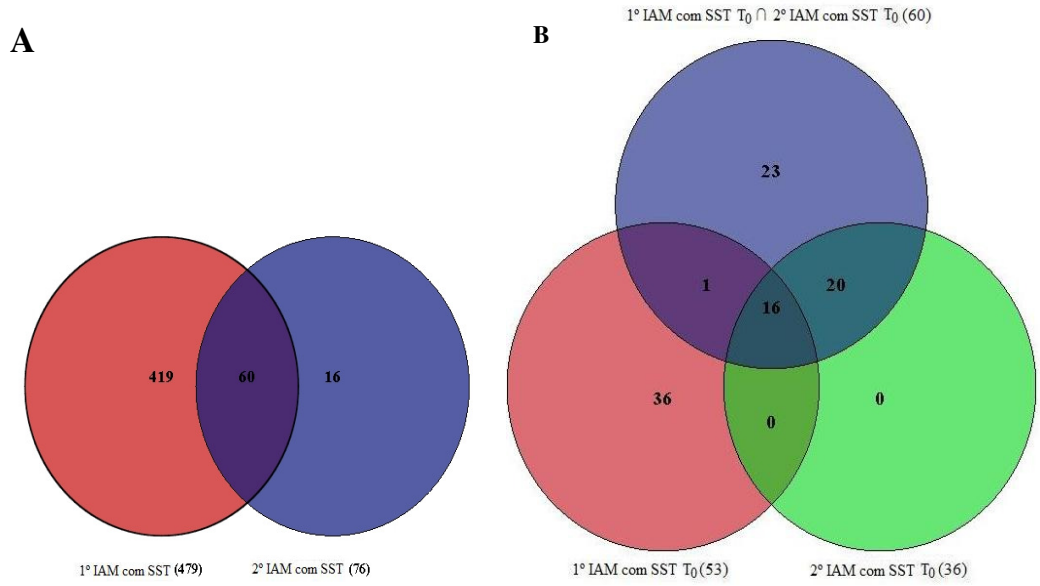



Figura 21. **Diagrama de *Venn* entre os resultados de expressão proteíca de 1º IAM com SST e 2º IAM com SST.**
A. Resultado total obtido durante às 48 h após IAM para 1º IAM com SST (479 proteínas) e 2º IAM com SST (76 proteínas). B. Proteínas comuns entre os grupos durante as 48 h após IAM (Intersecção, 60 proteínas) frente as proteínas no primeiro tempo de colheita para 1º IAM com SST (53 proteínas) e 2º IAM com SST (36 proteínas).
**Not**a: Número total de espectros de proteínas em parênteses e representado sob o diagrama. 1º IAM com SST, pacientes com IAM com SST sem infarto prévio; 2º IAM com SST, pacientes com IAM com SST com infarto prévio; ∩, intersecção entre 1º IAM com SST e 2º IAM com SST; $T_0$, primeira colheita.

Os 16 espectros de proteínas diferentemente expressos nos pacientes com IAM com SST permitem distinguir os indivíduos infartados dos controles através de uma análise gráfica de PCA-3D, Figura 22. A média das intensidades dos 16 espectros em relação a massa molecular e carga da molécula ionizada está expressa na Tabela 15.

Ainda que estas 16 possíveis proteínas estejam presentes em ambos os grupos IAM com SST nas amostras colhidas no primeiro momento após IAM, o perfil destas durante as 48 h evidencia diferenças entre os grupos (Figura 23). Treze das 16 proteínas selecionadas manifestaram-se com expressões significativamente reduzidas após 48 h para 1º IAM com SST ($p < 0.05$), já nos pacientes com 2º IAM com SST apenas três apresentaram perfil semelhante após 48 h, massa molecular de 8.437 Da, 9217 Da e 9.226 Da ($p < 0.05$).

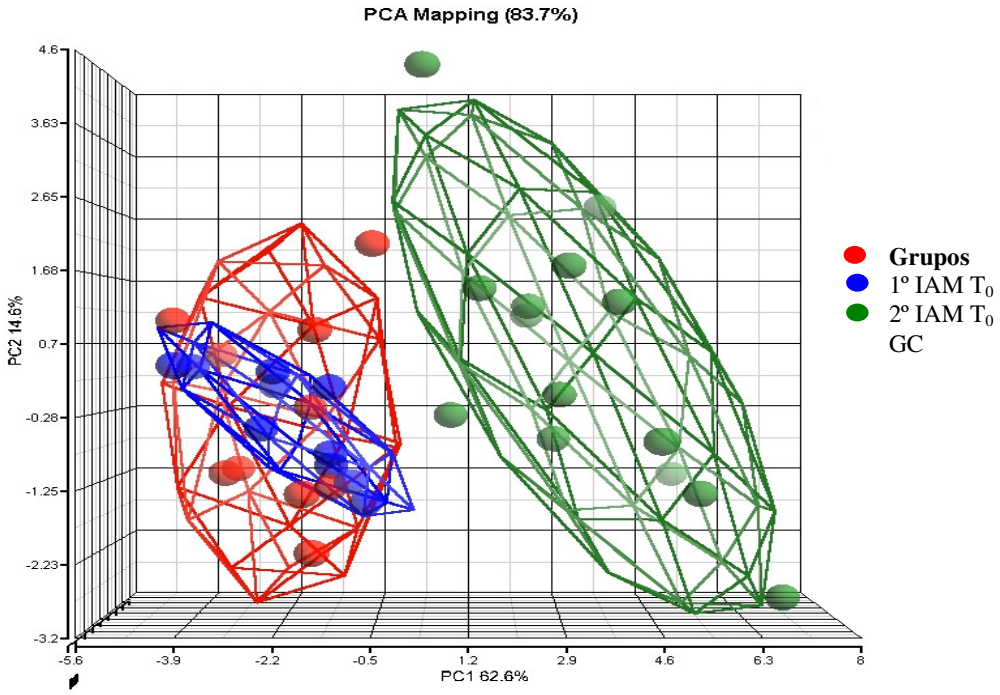



Figura 22. **Análise de componente principal em terceira dimensão das 16 possíveis proteínas em IAM com SST.**
Nota: Cada esfera representa um paciente. GC, grupo controle; 1º IAM, pacientes com IAM com SST sem infarto prévio; 2º IAM, pacientes com IAM com SST com infarto prévio; $T_0$, primeira colheita.

Tabela 15. Espectros de proteínas diferentemente expressas comuns entre a primeira colheita para 1º IAM com SST e 2º IAM com SST.

| | GC | | 1° IAM com SST $T_0$ | | | | 2° IAM com SST $T_0$ | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ***m/z*** | **Media** | **DP** | **Media** | **DP** | ***p**** | ***FC*** | ***Media*** | ***DP*** | ***p+*** | ***FC*** | **ASC** |
| 6386.5 | 1435.86 | 445.43 | 581.33 | 516.57 | 0.04 | -2.47 | 615.8 | 249.42 | 0.01 | -2.33 | 0.93 |
| 6394 | 2013.43 | 629.37 | 837.7 | 567.79 | 0.02 | -2.4 | 785.2 | 297.64 | 0.01 | -2.56 | 0.94 |
| 8437 | 1940.71 | 864.57 | 807.1 | 492.11 | 0.04 | -2.4 | 687.4 | 547.86 | 0.04 | -2.82 | 0.91 |
| 9217 | 1782.86 | 436.69 | 772.51 | 407.53 | 0.01 | -2.31 | 805 | 284.37 | 0 | -2.21 | 0.98 |
| 9226 | 1462.14 | 522.12 | 662.6 | 340.72 | 0.02 | -2.21 | 616.96 | 390.66 | 0.03 | -2.37 | 0.90 |
| 10547.5 | 932.79 | 251.4 | 451.5 | 274.21 | 0.03 | -2.07 | 439.56 | 260.7 | 0.03 | -2.12 | 0.94 |
| 10757.5 | 558.79 | 184.91 | 223.28 | 137.43 | 0.02 | -2.5 | 261.19 | 133.5 | 0.03 | -2.14 | 0.96 |
| 10760.5 | 530.07 | 163.2 | 199.94 | 133.22 | 0.01 | -2.65 | 244.8 | 136.54 | 0.03 | -2.17 | 0.95 |
| 15446.5 | 238.19 | 92.52 | 88.09 | 88.83 | 0.05 | -2.7 | 66.07 | 80.28 | 0.02 | -3.61 | 0.90 |
| 17788 | 547.07 | 179.58 | 254.22 | 154.14 | 0.03 | -2.15 | 283.75 | 133.13 | 0.05 | -1.93 | 0.90 |
| 17792.5 | 565.43 | 198.52 | 238.37 | 149.32 | 0.02 | -2.37 | 280.4 | 134.46 | 0.04 | -2.02 | 0.91 |
| 17797 | 572.93 | 217.82 | 245.81 | 127.66 | 0.02 | -2.33 | 267.36 | 130.8 | 0.04 | -2.14 | 0.91 |
| 17803 | 560.53 | 243.18 | 230.1 | 97.45 | 0.03 | -2.44 | 238.38 | 124.05 | 0.04 | -2.35 | 0.92 |
| 17804.5 | 566.34 | 242.63 | 220.07 | 94.76 | 0.02 | -2.57 | 228.74 | 121.2 | 0.03 | -2.48 | 0.93 |
| 17806 | 569.93 | 240.93 | 213.93 | 86.24 | 0.02 | -2.66 | 226.94 | 114.26 | 0.03 | -2.51 | 0.93 |
| 17807.5 | 561.89 | 236.84 | 215.09 | 77.18 | 0.02 | -2.61 | 225.12 | 109.01 | 0.03 | -2.5 | 0.93 |

Nota: Valores apresentados em média e DP. *m/z*, relações massas moleculares e cargas das moléculas ionizadas; 1º IAM com SST, pacientes com IAM com SST sem infarto prévio; 2º IAM, pacientes com IAM com SST com infarto prévio; $T_0$, primeira colheita; ASC, área sob a curva calculada para IAM com SST (considerando os dois grupos juntos) e controle; símbolo negativo (-), proteínas com expressão diminuída
*, *p* valor para 1º IAM $T_0$ com SST e controle;
+, $p < 0.05$ para 2º IAM $T_0$ com SST e controle.

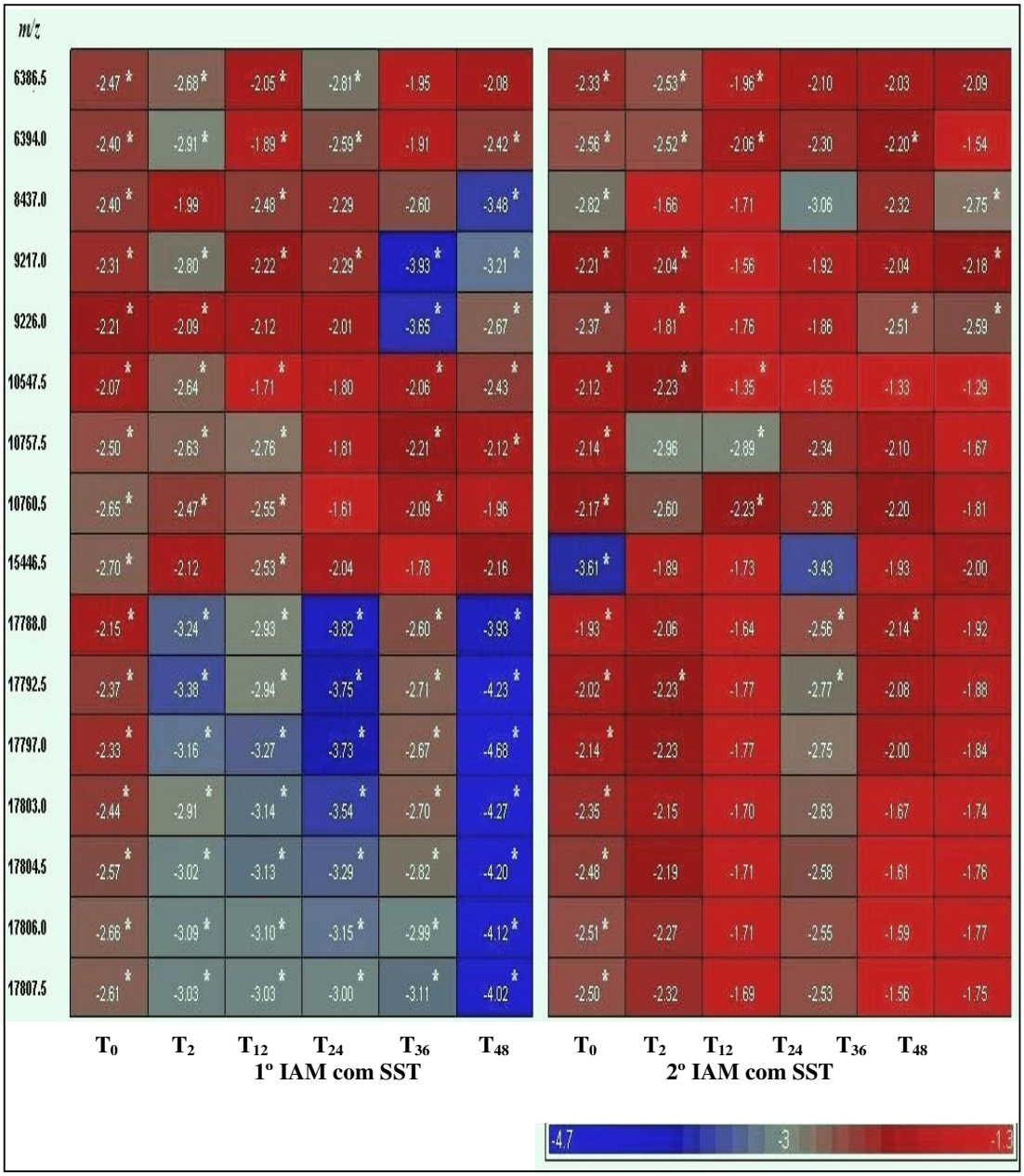



Figura 23**. Perfil por *Fold Change* em relação ao tempo das proteínas diferentemente expressas comuns entre a primeira colheita para 1º IAM com SST e 2º IAM com SST.**

Nota: Proteínas ordenadas por *m/z*. Escala de cores entre azul e vermelho e valor sobre as células correspondentes a *Fold Change*. Proteína com maior diferença de expressão, aumentada em relação ao controle representa coloração vermelha mais intensa, maior diferença de expressão diminuída representa coloração azul mais intensa.

*m/z*, relações massas moleculares e cargas das moléculas ionizadas; 1º IAM com SST, pacientes com IAM com SST sem infarto prévio; 2º IAM, pacientes com IAM com SST com infarto prévio; $T_0$, primeira colheita; $T_2$, segunda colheita após 2; $T_{12}$, terceira colheita após 12 h; $T_{24}$, quarta colheita após 24 h; $T_{36}$, quinta colheita após 36 h; $T_{48}$, sexta colheita após 48 h; símbolo negativo (-), proteínas com expressão diminuída; símbolo positivo (+), proteínas com expressão aumentada.

*, $p < 0.05$ para 1º IAM com SST e controle;

+, $p < 0.05$ para 2º IAM com SST e controle.

# 5
# DISCUSSÃO

A busca por biomarcadores de doenças cardiovasculares potencialmente úteis no diagnóstico precoce do SCA através do sangue periférico, bem como a compreensão dos mecanismos envolvidos na desestabilização da placa aterosclerótica e a resposta do organismo frente à lesão endotelial e do miocárdio são grandes desafios nas pesquisas em cardiologia. Dados do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia registram um total de 36.000 pacientes atendidos em 2003 (média de 3.050/mês), com taxa anual de internação hospitalar de 6,2% (2.287 pacientes/ano). Desta taxa, 860 (37,6%) pacientes tinham o diagnóstico de síndrome coronariana aguda (SCA), sendo o diagnóstico na alta hospitalar de 78 pacientes com IAM com SST e 754 com SCA sem SST (dos Santos et al. 2006).

Nas ultimas duas décadas, nenhum marcador bioquímico foi descrito para melhorarar a sensibilidade e a qualidade de diagnóstico e prognóstico nas doenças cardiovasculares que pudessem contribuir de forma significativa. Isto significa que pouco se tem investido em melhoria no diagnóstico laboratorial destas afecções. Com as informações obtidas pelos projetos genoma, transcriptoma, HapMap realizadas nos grandes centros de pesquisa dos países desenvolvidos, vários marcadores em câncer, Diabetes *Mellitus*, síndrome de Alzheimer e outras doenças de importância epidemiológica foram descritos. Graças aos avanços tecnológicos e da bioinformática através das plataformas de grande alcance e alto desempenho, como as plataformas de microarranjo de DNA e *SELDI-TOF/MS*, contribuem sensivelmente para a melhor compreensão destes eventos e abriram portas a novos questionamentos a serem investigados.

Neste estudo, através da análise transcriptômica por microarranjo de DNA, observou-se 599 genes diferentemente expressos nas primeiras 48 h após IAM com SST em relação ao controle. A partir de uma seleção biológica através do programa *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) (*Ingenuity® Systems*, Califórnia, EUA), 33 genes foram eleitos para validação técnica pela PCR em tempo real, que corresponde a apenas 5% do total. O número limitado de genes eleitos se deve a limitação da quantidade de RNA total restante após utilizá-lo para análises em microarranjo de DNA.

Vinte e nove genes eleitos (88%) apresentaram correlação positiva entre as duas metodologias, sendo que 23 com correlação moderada a alta ($r$ >0,46), assim sendo, é

possível que mais genes não selecionados estejam de fato diferentemente expressos nos pacientes com IAM com SST. Entretanto ao investigar a expressão destes em uma nova casuística (74 pacientes com SCA e 41 controles) verificou-se que 13 genes (65% de 20 genes eleitos para validação biológica), realmente apresentam diferenças de expressão significativas entre os pacientes com SCA e controle.

Alguns autores observaram correlações variadas quando analisam amostras idênticas entre as técnicas de microarranjo de DNA e PCR em tempo real (Barros Filho, 2009). Folgueira e colaboradores (2009) avaliaram o perfil de expressão em amostras de câncer de mama através de microarranjo de DNA e, ao determinar pela PCR em tempo real a expressão de alguns genes selecionados, observaram correlação significativamente positiva em 6/8 genes (75%) entre os ensaios e de 4/6 genes (67%) em uma nova casuística. Dallas e colaboradores (2005) procurando observar a correlação entre as duas técnicas: microarranjo de DNA e PCR em tempo real, em estudo de 48 genes, verificaram que 33 genes (69%) apresentam correlação estatisticamente significativa. O mesmo autor enfatiza a importância em validar os resultados antes da interpretação dos dados de expressão gênica (Dallas et al. 2005).

Certamente o principal motivo de uma maior concordância de expressão quando avaliada por microarranjo de DNA e PCR em tempo real, observada neste estudo, foi a escolha dos oligonucleotídeos iniciadores para a PCR em regiões semelhantes das sondas do microarranjo de DNA, pois iniciadores em regiões distintas pode resultar na quantificação de diferentes transcritos, como por exemplo, produtos de *splicing* alternativo. Esta estratégia foi possível graças ao desenho dos *GeneChip® Human Exon 1.0 ST Array*, em que apresenta 4 sondas em cada exon, gerando uma maior cobertura da expressão de cada gene.

Contudo, o microarranjo de DNA é uma técnica de quantificação de RNAm distinta da PCR em tempo real. O microarranjo avalia a expressão global de milhares de transcritos em um único ensaio, principalmente com a finalidade de buscar genes candidatos e determinar o perfil de expressão; e a PCR em tempo real avalia a expressão de transcritos específicos em pequena escala, sendo usualmente utilizada em validação de microarranjos, laboratórios clínicos e de pesquisa (Barros Filho, 2009). Além disso, apresenta diferentes princípios em relação ao método de detecção. No caso do microarranjo de DNA, é realizada a hibridização direta dos transcritos com sequências complementares (sondas) na lâmina, quantificando a expressão pela leitura de fluorescência de streptavidina-ficoeritrina (SAPE) conjugadas com biotina na amostra

hibridizada. A técnica requer maior cuidado experimental, pois envolve uma série de procedimentos laboratoriais de alta complexidade, que podem introduzir variações adicionais aos resultados obtidos, e refinada análise estatística dos dados, pois milhares de sondas são avaliadas em um único ensaio.

Já a PCR em tempo real, a detecção é feita pela amplificação e aumento da emissão de fluorescência proveniente de um produto específico. Como uma variação de 1 Ct (*Cycle threshold*) ao final do ensaio representa o dobro ou metade de transcritos iniciais, erros operacionais podem ser amplificados (Barros Filho, 2009). Lembrando também os diferentes preceitos seguidos pela normalização dos dados e testes estatísticos aplicados em ambas as técnicas.

É importante destacar, que a segunda casuística recrutada, foi composta por uma maior variabilidade de características biológicas, quando comparada com a primeira casuística utilizada para análises por microarranjo de DNA. Controlar as variáveis biológicas em estudos transcriptomicos, foi de extrema relevância, a fim de obter resultado mais fidedigno e melhor poder estatístico, por outro lado, a expressão diferencial pode não representar o evento fisiopatológico a ser investigado.

No presente estudo, os genes BCL2A1, BCL2L1 e IRS2 foram apenas diferentemente expressos em relação aos grupos SCA e controle para validação biológica, quando se excluiu variáveis divergentes entre a primeira e segunda casuística ($p < 0,05$), como pacientes > 65 anos, mulheres e angina instável. Sendo assim, estudos adicionais são necessários com o intuito de avaliá-los como reais marcadores, ainda que estes estejam intimamente relacionados com os demais genes validados neste estudo, como MMP9, ALOX15 e MYL4.

A habilidade das células detectarem pequenas diferenças na combinação específica, concentração e componentes da matriz, sugere que perturbações na homeostase da matriz possibilitem a remodelagem da parede vascular, após lesão vascular (Coats & Faxon 1997; Uzuelli, 2008). As metaloproteinases são endopeptidades zincos-dependentes que regulam a integridade da matriz extracelular, degradam colágeno, elastina e proteínas proteoglicanas. Estão envolvidas em uma variedade de processos fisiológicos: desenvolvimento embrionário, morfogênese, reprodução, reabsorção e remodelagem tecidual, e patológicos: destruição de cartilagem em artrite, metástase tumoral e degeneração da parede arterial, diretamente implicadas na formação e expansão dos aneurismas, reestenose miocárdica, trombo embolia pulmonar e ruptura de placa aterosclerótica (Corbel et al. 2000; Senior et al. 1991).

As metaloproteinases são produzidas por células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos, além de células mais indiferenciadas como células neoplásicas e fibroblastos transformados (Keeling et al. 2005) quando estimuladas por IL-1β, IL-6 e TNFα (Shah 1997). A maioria é secretada livremente no espaço extracelular, mas algumas são estocadas dentro de células, como o MMP9, que se acumula em grânulos de neutrófilos (Hobeika et al. 2007; Nagase et al. 2006).

Também conhecida como gelatinase B, a MMP9 apresenta como substrato os principais colágenos tipo: I, IV, V, VII e X, fibrinogênio e elastina (Keeling et al. 2005). Foi encontrada em pequenas quantidades no tecido aórtico normal, estando associada à inflamação crônica e a grandes quantidades de macrófagos (Thompson et al. 1995; Roggerio, 2008). Estudos recentes demonstraram associação da MMP9 ao remodelamento cardíaco (Yan et al. 2006), instabilidade (Sluijter et al. 2006) e ruptura da placa aterosclerótica (Leclercq et al. 2007) e em diferentes estágios de desenvolvimento dos aneurismas (Wilson et al. 2006).

O gene IL18R1 (expressão aumentada nos SCA, validado biologicamente, $p < 0,05$) essencial para a transdução do sinal da citocina IL18, responsável pela proliferação e migração de células da musculatura lisa para a parede do vaso arterial, contribui para o desenvolvimento e progressão da aterosclerose (Chandrasekar et al. 2006). A IL18 também foi associada a induzir a transcrição de RNAm do MMP9 via P13K e Akt dependente de AP-1 e NFKB, promovendo ainda mais a migração e hiperplasia das células da musculatura lisa na neoíntima arterial (Chandrasekar et al. 2006).

Sabe-se que células endoteliais progenitoras, exercem papeis importantes na homeostasia vascular (Hill et al. 2003), na neovascularização, na angiogênese (Rabelink et al. 2004) e na regeneração miocárdica, após IAM (Yoon et al. 2005), alterando possivelmente o perfil de transcritos no sangue periférico total. A progressão de lesões e disfunções endoteliais em doença cardiovascular está relacionada com a depleção dessas células, que por sua vez, estão relacionadas com o estresse oxidativo, com a atividade do óxido nítrico e outros processos fisiológicos (Dandona et al. 2005).

Iwakura e colaboradores (2006) sugerem que MMP9 promova a migração de células progenitoras endoteliais para o local da lesão, uma vez que há acentuado aumento de RNAm de MMP9 em ratos após um dia de IAM induzidos com 17β-estradiol, juntamente com o aumento de VEGF, mostrando seu papel benéfico após lesão (Iwakura et al. 2006). Fang e colaboradores (2009) observaram a presença de

MMP9 no plasma e aumento da expressão de RNAm em PBMC 3 dias após IAM (Fang 2009).

Neste estudo, em células do sangue periférico, se observou que o gene MMP9 está com expressão significativamente aumentada nos pacientes com SCA, desde o momento da admissão hospitalar em relação ao controle, que corresponde aproximadamente às primeiras horas do início da dor precordial ou retroestenal, sugestiva de isquemia cardíaca (validados biologicamente, $p < 0,05$); e de acordo com o estudo temporal por microarranjo de DNA, a expressão de RNAm do MMP9 apresenta-se como um perfil semelhante a uma curva de Gauss deslocada para a esquerda, com ápice em $T_2$ e valores próximos ao controle após 24 h e após um ano.

O gene AREG também com expressão de RNAm significativamente aumentada nos pacientes com 1º SCA em relação aos controles ($p < 0,05$), e após um ano para os pacientes com 1ºIAM com SST ($p < 0,05$) é um importante ligante do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR), que regula o crescimento das células epiteliais (Charoenrat et al. 2000). Charoenrat e colaboradores (2000) observaram em modelo celular de câncer de cabeça e pescoço que o aumento de expressão do gene AREG eleva os níveis de RNAm de MMP9 e VEGF, estimulando o processo angiogênico e metastático tumoral.

Já os genes IRS2 e MYL4 (validados biologicamente, $p < 0,05$) fazem parte da sinalização da ILK (do inglês *integrin liked kinase*) juntamente com MMP9. ILK é uma proteína responsável por conectar integrinas com o citoesqueleto célular, fundamental para organização celular pós-lesão cardíaca, de acordo com IPA (2010).

O papel do gene ALOX15 na aterosclerose ainda não está claro, há estudos *in vitro* e em modelos animais que sugerem seu efeito pró-aterosclerótico, como também seu efeito antiaterosclerótico (Wittwer & Hersberger 2007). O ácido araquidônico é um ácido graxo livre que, quando liberado das membranas celulares, pode ser metabolizado por ciclo-oxigenase, citocromo P450 e lipoxigenase (LOX) gerando a forma biologicamente ativa, tais como prostaglandinas, leucotrienos e ácidos hidroxi eicosatetraenóicos (HETEs) (Kudo & Murakami 2002). ALOX15 é membro da família LOX, responsável por metabolizar o ácido araquidônico em 15-HETE (Chen et al. 1994) juntamente com GPX3 (Loscalzo 2001). ALOX15 foi isolado em leucócitos, cérebro, rim e vasos sanguíneos (Wittwer & Hersberger 2007).

O gene ALOX15 aumenta a captação de LDL oxidada por macrófagos via aumento da expressão de receptor *scaverger* CD36 (Huang et al. 1999). O 15-HETE e

metabólito do ácido linoléico pela a enzima LOX12 (13-HODE) se ligam ao receptor do ativador proliferativo de peroxissoma isoforma gama (PPARγ), que atuam como fator de transcrição do gene do receptor *scavenger* CD36, favorecendo a formação de células espumosas, caracterizando seu papel aterogênico. Por outro lado, também se observou que 13-HODE é ligante do receptor do ativador proliferativo de peroxissoma isoforma alfa (PPARα) dos macrófagos, ativando a transcrição do gene ABCA1, favorece o efluxo do colesterol para o extracelular (Hersberger &von Eckardstein 2003).

Em um estudo caso-controle com 498 caucasianos verificou-se que a presença do genótipo -292TT do gene ALOX15 está em menor frequência em pacientes com doença arterial coronariana (Wittwer et al. 2007). Pesquisadores demonstraram que alterações na região promotora deste gene, como o polimorfismo descrito acima, aumenta cerca de 3 vezes mais a sua transcrição e atividade (Wittwer et al. 2007).

Em contraposição do efeito pró-aterosclerótico evidencias mostram que o 15-HETE apresenta efeito antiinflamatório e inibe a produção de espécies reativas de oxigênio (Smith et al. 1993). Estudo com agonistas de PPARγ em células da musculatura esquelética demonstrou aumento da expressão de GPX3, diminuindo os níveis de peróxidos de hidrogênio extracelular (ação antioxidante) (Chung et al. 2009). Alguns autores também observaram que a ativação dos PPARs pelos metabólitos dos genes ALOX15 e LOX12 reduz a expressão de IL-1β, IL-6 e TNFα, reduzindo a expressão de MMP9 (Marx et al. 1998; Ricote et al. 1998; Shu et al. 2000).

No presente estudo, surpreendentemente observou-se que na fase aguda de isquemia cardíaca, os pacientes com SCA apresentam uma diminuição significativa de RNAm do gene ALOX15 juntamente com o aumento significativo de MMP9, quando comparado com indivíduos controles (validados biologicamente, $p < 0,05$); e de acordo com o estudo temporal por microarranjo de DNA, a expressão de RNAm do ALOX15 se apresenta como um perfil próximo a uma parábola (concentração menor em $T_{24}$). Além disso, os resultados sugerem uma possível associação destes genes com a gravidade da síndrome, isto é, nota-se uma maior diferença de expressão nos pacientes com IAM com SST que nos pacientes com IAM sem SST, que por sua vez, naqueles diagnosticados com angina instável. Desta forma, leva-se ao questionamento, se a expressão diminuída do gene ALOX15 nas células do sangue periférico favorece a instabilidade (Sluijter et al. 2006) e ruptura da placa aterosclerótica (Leclercq et al. 2007) via MMP9; ou a expressão aumentada de MMP9 é uma resposta à lesão,

promovendo a migração de células progenitoras endoteliais para o local da lesão (Iwakura et al. 2006) e remodelamento cardíaco (Yan et al. 2006).

Ariel e colaboradores (2005) mostraram que a atividade de ALOX15 também está envolvida no metabolismo do ácido decosaexanoico (DHA). DHA, pertencente à família do ácido graxo de cadeia longa Omega-3, está associado a benefícios na doença cardiovascular, incluindo diminuição da pressão arterial (Hartweg et al. 2007; Morris et al. 1993), reduzindo a agregação plaquetária (Harrison & Abhyankar 2005) e a concentração plasmática de triglicerídeos (Hersberger & von Eckardstein 2003), como também um efeito antiarrítmico (Harris 2007; von Schacky 2007) e inibindo a infiltração de macrófagos e neutrófilos para o local de lesão e inflamação (Singer et al. 2008).

O produto final do metabolismo de DHA via ALOX15 é o NDP1, que reprime a ativação do gene pró-inflamatório Aβ42 e aumenta a expressão dos genes antiapoptóticos Bcl-2, Bcl-xl e Bfl.1(A1), regulando assim, a sinalização de morte celular via caspases em tecido neural de pacientes com Alzheimer (Lukiw et al. 2005). Portanto, a diminuição da expressão de RNAm de ALOX15 pode também estar contribuindo para a baixa expressão de BCL2A1 e BCL2L1 (validados biologicamente, $p < 0,05$).

Trabalho realizado com apêndice atrial direito de pacientes com fibrilação atrial revela que a baixa expressão de BCL2A1 contribua negativamente para preservação destas células (Kharlap et al. 2006). Acredita-se que a diminuição de BCL2A1 favoreça ao processo apoptótico, uma vez que deixa de exercer seu papel de protetor celular (Harb et al. 2008).

Estudo com microarranjo de DNA com células do sangue periférico de mulheres japonesas expostas ao metal pesado cádmio, mostra a expressão de RNAm significativamente reduzida dos genes BCL2A1 e COX7B (validados biologicamente, $p<0,05$), com aumento de GPX3 ($p<0,05$, para análise por microarranjo de DNA) e caspases 9 (Dakeshita et al. 2009). O autor sugere que a presença do metal pesado ative o processo apoptótico celular, envolvendo este grupo gênico mitocondrial; justificativa possível para o quadro gênico observado nos pacientes com SCA.

A diminuição de BCL2L1 aumenta a proliferação celular independente do processo apoptótico (Harb et al. 2008). Curiosamente nota-se que este o gene,

juntamente com MMP9 fazem parte da via de sinalização da IL-8, mediador citoesquelético responsável pela regulação da angiogênese (IPA, 2010).

Em contra partida, em modelo de ratos hipertróficos, verificaram que animais com deficiência de ALOX15 estão mais protegidos a desenvolverem insuficiência cardíaca, uma vez que o aumento de expressão de ALOX15 nos cardiomiócitos aumenta a expressão da proteína-1 quimioatrativa de monócitos (MCP-1), promovendo infiltração de macrófagos, fibrose e disfunção sistólica para o coração, causando a insuficiência cardíaca (Kayama et al. 2009). Assim como a sua deficiência atenua a resposta inflamatória frente às alergias das vias respiratórias de ratos (Andersson. C.K. et al. 2008) e no desenvolvimento de Diabetes *Mellitus* induzido por estreptozotocina (Bleich et al. 1999) e sistema auto-imune (McDuffie et al. 2008).

Alvarez e colaboradores (2007) descreveram a relação entre a anidrase carbônica (CA) e a hipertrofia de cardiomiócitos. Culturas de cardiomiócitos de roedores foram tratadas com PE (fenilefrina) – indutor de hipertrofia, com ou sem metazolamida - inibidor de CA; observaram que cardiomiócitos tratados com PE e inibidores de CA não desenvolvem hipertrofia (Alvarez et al. 2007). Sugerindo assim que os inibidores de CA representam uma aproximação terapêutica para diminuição do fenótipo de hipertrofia, e consequentemente, insuficiência cardíaca. No presente estudo, CA1 apresenta expressão significativamente diminuída no momento de admissão hospitalar dos pacientes com SCA em relação aos controles ($p < 0,05$).

Estudo com ratos submetidos a IAM por oclusão da artéria descendente anterior, mostrou a expressão de RNAm, por microarranjo de DNA, do tecido cardíaco após 1 e 7 dias de isquemia, com total de 135 genes diferentemente expressos; dentre eles, destaca-se os genes ALOX15 e KCNE1 com expressão bastante aumentada somente após 7 dias. O autor sugere que estes genes contribuam para a disfunção da contração muscular, arritmias e insuficiência cardíaca após IAM (Andersson, K.B. et al. 2006). Contudo no presente estudo, KCNE1 apresenta expressão significativamente diminuída no momento de admissão hospitalar dos pacientes com SCA em relação aos controles (validado biologicamente, $p < 0,05$).

Sendo assim, se questiona se a diminuição da expressão de RNAm dos genes ALOX15, CA1, KCNE1 e BCL2L1, em células do sangue periférico, possa ser uma possível resposta sistêmica protetora do organismo frente ao processo isquêmico na SCA.

Neste estudo, também se observou expressão significativamente aumentada do gene TREML4 em pacientes com SCA em relação ao controle (validação biológica, $p <$ 0,05 para 2º SCA versus controle). O gene TREML4 faz parte da família TREM (*Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells*) descoberta em 2000, proteínas desta família foram encontradas em monócitos, macrófagos, células dendríticas mielóide, neutrófilos, osteoclastos e em plaquetas (Ford & McVicar 2009), porém seus papéis fisiopatológicos ainda não são completamente conhecidos, acredita-se que exerçam importante papel na regulação da resposta imune inata, frente a microorganismos intracelulares, juntamente com os receptores *toll-like* (TLR) via LPS (Ford & McVicar 2009). Recentemente, Hemmi e colaboradores (2009) observaram a presença da proteína e do RNAm do gene TREML4 em CD8aplha(+), células do baço e em conjuntos de macrófagos residentes no baço, e viram que a proteína TREML4 é capaz de reconhecer células mortas por diferentes tipos de fagócitos do baço (Hemmi et al. 2009).

É intrigante observar que alguns estudos propõem a possibilidade de uma efetiva participação na aterogenese de algumas bactérias (Oshima et al. 2005; Maggi et al. 2006; Mussa et al. 2006). Sugere-se que a *Chlamydia pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae* são os microrganismos que podem estar envolvidos mais diretamente neste processo inflamatório degenerativo de aterosclerose, seja na iniciação do evento ou no processo agudo que provoque a manifestação clínica do infarto (Eryol et al. 2005; Hoshida et al. 2005). Observou-se que TLRs e CD14 reconhecem os componentes celulares de microorganismos e sinalizam a resposta inflamatória e imune inata (Armant and Fenton 2002; Fernandez-Real et al. 2003). A presença destes agentes infecciosos em alguns pacientes com SCA, pode ser a justificativa pela variabilidade de expressão do gene TREML4 durante as primeiras 48 h e após um ano (14% pacientes com SCA com valores de expressão negativos), bem como, a observação de valores negativos para 83% dos indivíduos controles.

Por último, dentro dos genes diferentemente expressos, validados biologicamente pela PCR em tempo real, com pacientes com SCA e controles, também se observou expressão significativamente elevada do gene ECHDC3 (*enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 3*; validação biológica, $p <$ 0,05), descrito pela primeira vez na literatura em 1996, como um novo inibidor de oxidação de ácidos graxos na mitocôndria (Hashimoto et al. 1996). Porém, até o momento, este gene apresenta uma literatura escassa que auxilie na compreensão da sua associação com o processo

aterosclerótico. Sendo assim, pode-se supor a partir dos resultados transcriptômicos das células do sangue periférico dos pacientes com SCA que o gene recentemente descoberto TREML4, esteja sinalizando a cascata inflamatória do organismo frente à desestabilização da placa aterosclerótica, causada pela possível presença de agentes infecciosos. Frente à diminuição do fluxo sanguíneo nas coronárias, os genes BCL2A1, COX7B e GPX3 estão regulando o processo apoptótico das células cardíacas e endoteliais lesadas. Por outro lado, os genes ALOX15, CA1 e KCNE1 expressam uma resposta sistêmica protetora do desenvolvimento de insuficiência cardíaca frente à oclusão parcial ou total da artéria coronária. E os genes AREG, IL18R1, IRS2, MYL4, BCL2L1 e MMP9 estão sinalizando e/ou promovendo a remodelagem pós-lesão endotelial e cardíaca. Contudo, é possível considerar ainda que os genes ALOX15, IL18R1 e MMP9, tenham ações pró-aterogênicas, envolvidas na progressão e ruptura da placa aterosclerótica, que culmina em SCA. A representação gráfica das interações entre os genes supracitados e eventos biológicos obtidos pelo presente estudo, estabelece uma proposta de caráter mecânico que pode explicar a complexidade envolvida no evento agudo da síndrome coronariana (Figura 22).

Com relação a aproximação é importante destacar que o desenvolvimento da tecnologia baseada na nova geração do sistema de identificação e quantificação como SELDI-TOF/MS, aplicável para uma variedade de amostras clínicas e até mesmo linhas de células (Shiwa et al. 2003), é amplamente utilizado como uma ferramenta para identificar marcadores específicos de doenças e de determinadas condições fisiológicas (Achar et al. 2005). SELDI-TOF/MS também conhecido como *protein profile imprinting* desenvolvido por Hutchens e Yip (Hutchens & Yip 1993), é uma abordagem eficaz que combina cromatografia e espectrometria de massas, oferecendo maior sensibilidade que a separação por eletroforese em gel bidimensional e técnicas tradicionais de imunoensaios para identificação protéica (Xu et al. 2009). Uma grande variedade de proteínas podem ser rapidamente identificadas e quantificadas ao mesmo tempo, fazendo SELDI-TOF/MS um método ideal para a seleção de alto rendimento de biomarcadores, especialmente quando o alvo, a proteína, está presente em baixas concentrações, evitando as limitações da ligação com anticorpos e de analisar apenas proteínas pré-determinadas (de Seny et al. 2005).

Zhang e colaboradores (2009) aplicaram o SELDI-TOF/MS para avaliar o perfil de proteínas do soro de ratos com IAM, induzidos cirurgicamente por obstrução da artéria coronária descendente anterior, durante 5 a 360 minutos após obstrução. Observaram

diferença significativa de expressão em três espectros de proteínas com massa molecular de 7.586 Da, 7.564 Da e 9.583 Da 5 mim após evento, sugerindo estes, como potenciais marcadores precoces de isquemia cardíaca em ratos quando comparados com as enzimas cardíacas CKMB e cTn I, atualmente utilizadas como diagnóstico de IAM (Zhang, G. et al. 2009). O mesmo foi observado no presente estudo através do *ProteinChip H50* seguido por *SELDI-TOF/MS*, que identificou 16 espectros de proteínas diferentemente expressos em pacientes com IAM com SST, antes mesmo da elevação de CK-MB, cTnI e PCRu. Evidenciando a sensibilidade desta tecnologia na busca de biomarcadores precoces.

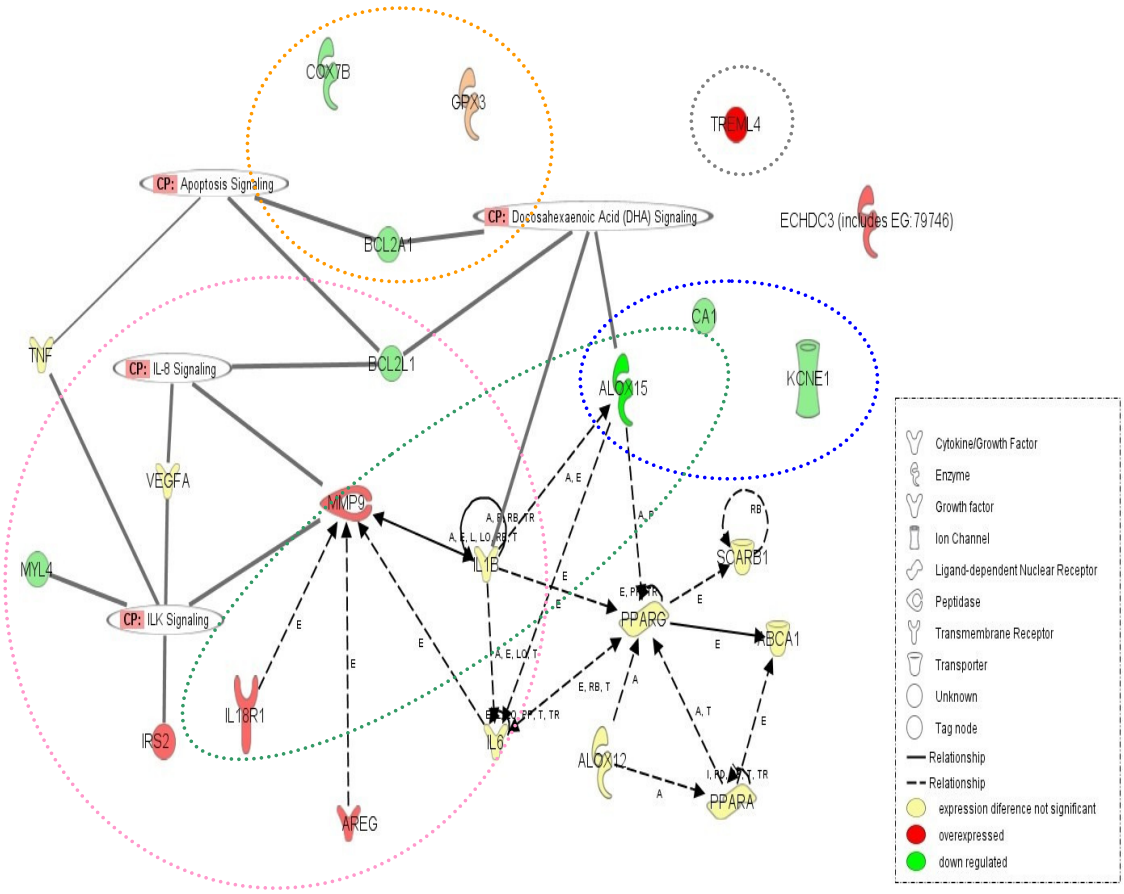



Figura 22. **Figura esquemática das relações diretas e indiretas dos genes diferentemente expressos em pacientes com SCA.** Os círculos representam os processos biológicos propostos neste estudo.
**Nota:** Círculo em cor cinza, corresponde à resposta imune inata e sinalização do processo inflamatório; círculo de cor laranja, regulação da apoptose; círculo de cor rosa, remodelagem pós-lesão; círculo de cor azul, resposta protetora à insuficiência cardíaca; círculo de cor verde, ação pró-aterosclerótica. Os genes estão nomeados de acordo com HUGO (*Human Genome Organization*); em vermelho, representa os genes com expressão significativa aumentada nos pacientes em relação aos controles; em verde, genes com expressão significativa diminuída nos pacientes em relação aos controles; amarelo, genes que participam da rede porém a expressão não foi significativamente diferente; traços contínuos, relação com vias de sinalização; setas contínuas, relação direta entre os genes; setas tracejadas, relação indireta entre os genes.

Florian-Kujawski e colaboradores (2004) identificaram através do *ProteinChip SAX* (cromatografia de afinidade aniônica) seguida por SELDI-TOF/MS um conjunto de espectros de proteínas correspondentes à massa entre 10 e 12k Da, presentes no plasma de um terço do total de 100 pacientes com SCA, quando comparados com o perfil protéico plasmático de 25 indivíduos saudáveis pareados com a idade (Florian-Kujawski et al. 2004). Contudo, não informaram em que momento foi realizada a colheita, bem como se os pacientes com SCA apresentavam angina instável, IAM sem SST ou IAM com SST e histórico de medicações prévias ao evento.

No presente estudo, as amostras de plasma foram processadas utilizando o *ProteinChip H5*0 seguido por SELDI-TOF/MS, a fim de avaliar o perfil de proteínas plasmáticas nas primeiras 48 h após IAM. Amostras seriadas foram obtidas de pacientes com menos de 8 horas de dor torácica sugestiva de isquemia cardíaca, diagnosticados exclusivamente com IAM com SST, sendo a primeira colheita realizada antes do início do tratamento para IAM. Observou-se diferenças significativas na quantidade de espectros de proteínas diferentemente expressos ao longo das 48 h avaliadas após IAM, para cada tempo de colheita e subgrupos estudados. Para 1º IAM com SST, pacientes sem infarto prévio, foram observados de 53 até 329 espectros de proteínas diferentemente expressos em relação ao controle, sendo a quantidade mínima detectada na primeira colheita e o máximo após aproximadamente 12 h de IAM, respectivamente. Já para 2º IAM com SST, pacientes com infarto prévio que faziam uso de medicações anteriores ao evento, a quantidade mínima de proteínas diferentemente expressas observada, aproximadamente 24 h após IAM, foi 4 espectros de proteínas e a quantidade máxima, logo após o diagnóstico, na primeira colheita, com 36 espectros. Portanto, definir o momento após desestabilização da placa aterosclerótica e as variabilidades biológicas presentes, auxiliam na busca de reais proteínas indicadoras de doenças cardiovasculares, assim como, a diferenciação entre proteínas expressas decorrente da lesão endotelial e resposta aos tratamentos farmacológicos.

Considerando que a primeira colheita de amostra para obtenção de plasma dos indivíduos do grupo 1º IAM com SST foi obtida na fase aguda de isquemia cardíaca e que não há interferência medicamentosa, a caracterização dos 53 espectros de proteínas plasmáticas diferentemente expressos em relação à população saudável, é extremamente relevante para compreender melhor a fisiopatologia das doenças cardiovasculares. Além disso, estas apresentaram alta sensibilidade e especificidade para 1º IAM com SST (cálculo de área sob a curva entre 87 a 99%). Curiosamente os espectros de proteínas

com expressão aumentada apresentam menores pesos moleculares (entre 2.128 a 6.109 Da) do que aqueles com expressão diminuída (entre 6.362,5 a 17.825,5 Da), possivelmente estas são as primeiras moléculas lançadas na circulação como resultado do processo isquêmico dos cardiomiócitos, uma vez que as proteínas e/ou peptídeos menores atravessam membranas celulares mais facilmente do que as proteínas maiores (Zhang, G. et al. 2009). Outra hipótese a ser considerada é que estas estejam no plasma via exossomos circulantes, isto é, partículas recentemente descobertas no plasma que podem conter RNAm, microRNA, proteínas e peptídeos que podem ser transferidos para outras células (Simpson et al. 2009); desempenhando importante papel na comunicação intercelular, em resposta à obstrução arterial, lesão miocárdica ou processo de remodelação cardíaca. No entanto, nenhuma das 23 proteínas com expressões aumentadas, observadas em 1º IAM com SST no tempo de colheita $T_0$ foram significativamente elevadas em 2º IAM com SST.

Ao avaliar separadamente os pacientes IAM com SST de acordo com infarto prévio, notou-se uma diferença de cerca de seis vezes menos quantidade de proteínas diferentemente expressos no 2º IAM com SST (76 proteínas) em relação ao 1º IAM com SST (476 proteínas). Corroborando com este resultado, a análise de expressão em larga escala de RNAm das células do sangue periférico por microarranjo de DNA, *GeneChip® Human Exon 1.0 ST Array*, revelou também menor quantidade de genes diferentemente expressos no 2º IAM com SST (111 genes) em relação ao 1º IAM com SST (488 genes). Além disso, dos 25 transcritos comuns entre as análises observadas separadamente (1º IAM com SST versus controle; e 2º IAM com SST versus o controle), 76% foram primeiramente detectados nos pacientes sem infarto prévio.

Assim, propõe-se que a utilização de medicamentos anteriores ao evento, como por exemplo, o uso de antiagregantes (presente em 100% dos indivíduos com infarto prévio), estatinas (80%) e betabloqueadores (80%) e diuréticos (20%), estejam inibindo e/ou retardando a expressão de RNAm e proteínas no grupo 2º IAM com SST, ou ainda, haja um processo adaptativo frente à remodelagem, após evento de isquemia cardíaca presente exclusivamente neste grupo.

Todavia, vale ressaltar que genes determinados como diferentemente expressos, exclusivamente para os pacientes do grupo 1º IAM com SST, nas análises por microarranjo de DNA, como por exemplo, os genes IL18R1 e CA1, quando avaliados em uma nova casuística pela PCR em tempo real (74 pacientes com SCA e 41

controles), esta singularidade deixa de existir. Fato este observado em 82% dos genes validados biologicamente.

Por outro lado, todos os 36 espectros de proteínas plasmáticas diferentemente expressos na primeira colheita de 2º IAM com SST, cuja sensibilidade e especificidade variaram entre 86 a 100%, também estiveram no1º IAM com SST. Vinte destes (55%) foram identificados em outros tempos que não no primeiro momento em 1º IAM com SST, ou seja, após a intervenção farmacológica e coronária percutânea, sendo assim pode-se atribuir a sua expressão diferencial devido à inserção de tratamento e/ou início do processo de remodelagem no 1º IAM com SST.

Contudo na análise transcriptômica por microarranjo de DNA somente o gene: COX7B diferentemente expresso em 2º IAM com SST em $T_0$ esteve presente em outro tempo de colheita nos indivíduos sem infarto e medicações prévias à admissão hospitalar (Tabela 12). Isso pode ser explicado uma vez que, embora tenha se buscado marcadores de doenças cardiovasculares em pacientes com IAM com SST, através de proteínas plasmáticas e expressão de RNAm do sangue periférico, o resultado pode ser o reflexo de diferentes mecanismos frente a um mesmo processo fisiopatológico investigado. Deste modo, as proteínas plasmáticas, não necessariamente correspondem ao processo de tradução do conjunto de células do sangue periférico que transcrevem os genes diferentemente expressos no momento investigado do IAM, ainda que, em ambos os estudos proteômico e transcriptômico é possível observar a diminuição da expressão gênica diferencial nos pacientes com infarto e medicação prévia, e que haja uma regulação gênica entre eles.

Os demais 16 dos 36 espectros diferentemente expressos na primeira colheita de 2º IAM com SST, também foram identificados como diferentemente expressos para o mesmo tempo de colheita que 1º IAM com SST, com sensibilidade e especificidade calculada entre 90 a 98%, quando considerado um único grupo de IAM com SST em relação aos controles. Acredita-se que estes espectros de proteínas, cujo peso molecular estão entre 6.386,5 Da e 17.807,5 Da, são potenciais biomarcadores de diagnóstico precoce de IAM, independente da variabilidade inerente dos pacientes com relação a infarto e medicação prévia ao evento.

Estes 16 espectros de proteínas apresentaram expressão diminuída nos pacientes infartados, quando comparados à média de intensidade de expressão nos indivíduos controles. O mesmo foi observado em estudo a partir do sobrenadante da cultura de carótida, com placas de aterosclerose isoladas por endartectomia de 7 pacientes, em que

foi detectado um espectro correspondente à massa de 18,4 kDa, com expressão significativamente reduzida, quando comparado com cultura de 7 artérias mamárias através do *ProteinChip CM10* (cromatografia de afinidade catiônica), seguida de SELDI-TOF/MS. Posteriormente, pesquisadores através do sequenciamento, verificaram que este espectro correspondeu à proteína sTWEAK (*soluble tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis*) e sua expressão no plasma de 30 pacientes com estenose, 106 pacientes assintomáticos com aterosclerose e 28 indivíduos saudáveis, apresentam uma correlação negativa com a presença de aterosclerose (Blanco-Colio et al. 2007). Sugerindo que esta proteína, e possivelmente as 16 proteínas observadas neste estudo, sejam fatores protetores para o desenvolvimento e/ou desestabilização da placa aterosclerótica.

Não obstante, as demais 44 proteínas diferentemente expressas em ambos os grupos IAM com SST nos tempos de colheita (60 proteínas comuns entre os grupos: 16 na primeira colheita e 44 nos demais tempos) podem ser reflexo tardio da lesão do miocárdio, como ocorrem com os marcadores cardíacos cTnI e CK-MB (Dolci and Panteghini 2006); ou simplesmente a diferença de expressão logo após IAM, que não foi estatisticamente significante devido ao número amostral proposto inicialmente (10 pacientes com IAM com SST e 6 controles), como observado no estudo de microarranjo de DNA com os genes MMP9 e ALOX15.

Os genes MMP9 e ALOX15 atingiram níveis significativamente alterados após intervenção coronária percutânea (em $T_2$) e 12 h seguintes (em $T_{12}$), respectivamente ($p < 0,05$) quando comparados entre 10 pacientes com IAM com SST e 6 controles através das análises de microarranjo de DNA e PCR em tempo real (validação técnica). Contudo, ao trabalhar com uma casuística maior (74 pacientes com SCA e 41 controles) se observou diferença de expressão já no momento de admissão hospitalar (em $T_0$) pela PCR em tempo real (validação biológica).

Entretanto, como indicado por Blanco-Colio e colaboradores, é necessário em uma etapa seguinte aos estudos com *ProteinChip* seguido por SELDI-TOF/MS, isolar as proteínas diferentemente expressas e sequenciá-las por espectrometria de massa, a fim de verificar quais proteínas correspondem aos pesos moleculares obtidos neste estudo de acordo com o banco de dados de peptídeos, *National Center for Biotechnology Information* e *SwissProt databases* (Blanco-Colio et al. 2007).E, uma vez caracterizadas, estas devem ser validadas tecnicamente a partir de outras metodologias, como *Western blot* e ensaios de captura de anitígenos-anticorpos (Blanco-Colio et al.

2007); e biologicamente em uma casuística maior e com maior variabilidade, incluindo pacientes com angina instável, IAM sem SST, diabéticos, mulheres e diferentes faixas etárias.

Desta forma, o atual estudo proteômico foi essencial para definir parâmetros de busca dos 16 potenciais biomarcadores protéicos, isto é, condições de isolamento (remoção das proteínas de alto peso molecular e mais abundantes através do *Multiple Affinity Removal Spin Cartridge System* e cromatografia através de matriz de interação hidrofóbica) e suas respectivas massas moleculares.

Já o estudo transcriptômico, apresenta os genes ALOX15, AREG, BCL2A1, BCL2L1, CA1, COX7B, ECDHC3, GPX3, KCNE1, IL18R1, IRS2, MYL4, MMP9 e TREML4 como potenciais biomarcadores de diagnóstico de SCA, por refletir através das células do sangue periférico a desestabilização da placa aterosclerótica, fatores protetores e de remodelagem cardíaca. Estes genes são capazes de distinguir pacientes com SCA dos controles nas primeiras horas após oclusão das artérias coronárias, desta forma, pode-se considerá-los como marcadores precoces de SCA. Futuros estudos devem ser realizados no intuito de avaliá-los como marcadores de doença arterial coronariana, bem como, na determinação de possíveis interferentes, na avaliação da sensibilidade e especificidade diagnóstica e aplicabilidade prognóstica.

# 6 CONCLUSÕES

No estudo transcriptômico por microarranjo de DNA de células do sangue periférico caracterizou-se 599 genes diferentemente expressos nas primeiras 48 h após IAM. Treze genes foram considerados como biomarcadores precoces de SCA: ALOX15, AREG, BCL2A1, BCL2L1, CA1, COX7B, ECDHC3, KCNE1, IL18R1, IRS2, MYL4, MMP9 e TREML4.

No estudo proteômico foi possível identificar 495 espectros de proteínas diferentemente expressos durante as primeiras 48 h após IAM. Dezesseis destes espectros de proteínas com peso molecular entre 6.386,5 Da a 17.807,5 Da foram selecionados como potenciais marcadores precoce de diagnóstico de IAM com SST.

## REFERÊNCIAS


Achar, S. A., Kundu, S., and Norcross, W. A. (2005), 'Diagnosis of acute coronary syndrome', *Am Fam Physician,* 72 (1), 119-26.

Alvarez, B. V., et al. (2007), 'Carbonic anhydrase inhibition prevents and reverts cardiomyocyte hypertrophy', *J Physiol,* 579 (Pt 1), 127-45.

Andersson, C.K., et al. (2008), 'Mice lacking 12/15-lipoxygenase have attenuated airway allergic inflammation and remodeling', *Am J Respir Cell Mol Biol,* 39 (6), 648-56.

Andersson, K. B., et al. (2006), 'Regulation of neuronal type genes in congestive heart failure rats', *Acta Physiol (Oxf),* 186 (1), 17-27.

Anonymous (1979), 'Nomenclature and criteria for diagnosis of ischemic heart disease. Report of the Joint International Society and Federation of Cardiology/World Health Organization task force on standardization of clinical nomenclature', *Circulation,* 59 (3), 607-9.

Ariel, A., et al. (2005), 'The docosatriene protectin D1 is produced by TH2 skewing and promotes human T cell apoptosis via lipid raft clustering', *J Biol Chem,* 280 (52), 43079-86.

Armant, M. A. and Fenton, M. J. (2002), 'Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals', *Genome Biol,* 3 (8), REVIEWS3011.

Armitage, P. and Berry, G. (1994), *Statistical methods in medical research* (3rd edn.; Oxford ; Boston: Blackwell Scientific Publications) xi, 620 p.

Barros Filho, M.C., (2009), 'Expressão de grupos de genes como marcadores moleculares preditivos de resposta à quimioterapia neoadjuvante como doxorrubicina e ciclosfosfamida em pacientes com câncer de mama', Dissertação (mestrado), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Benjamini, Y. and Hochberg, Y. (1995), 'Controlling the False Discovery Rate - a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing', *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological,* 57 (1), 289-300.

Berhane, B. T., et al. (2005), 'Cardiovascular-related proteins identified in human plasma by the HUPO Plasma Proteome Project pilot phase', *Proteomics,* 5 (13), 3520-30.

Blanco-Colio, L. M., et al. (2007), 'Identification of soluble tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (sTWEAK) as a possible biomarker of subclinical atherosclerosis', *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 27 (4), 916-22.

Bleich, D., et al. (1999), 'Resistance to type 1 diabetes induction in 12-lipoxygenase knockout mice', *J Clin Invest,* 103 (10), 1431-6.

*Cardiovascular Gene Ontology*. Disponível em <http://www.cardiovasculargeneontology.com/>. Acesso em: setembro de 2009.

Cavalli, S. A., et al. (2000), 'Apolipoprotein B gene polymorphisms: prevalence and impact on serum lipid concentrations in hypercholesterolemic individuals from Brazil', *Clin Chim Acta,* 302 (1-2), 189-203.

Chalmers, J., et al. (1999), '1999 World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the management of hypertension. Guidelines sub-committee of the World Health Organization', *Clin Exp Hypertens,* 21 (5-6), 1009-60.

Chandrasekar, B., et al. (2006), 'Interleukin-18-induced human coronary artery smooth muscle cell migration is dependent on NF-kappaB- and AP-1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression and is inhibited by atorvastatin', *J Biol Chem,* 281 (22), 15099-109.

Charakida, M., Tousoulis, D., and Stefanadis, C. (2006), 'Early atherosclerosis in childhood: diagnostic approaches and therapeutic strategies', *Int J Cardiol,* 109 (2), 152-9.

Charoenrat, P.O., et al. (2000), 'Epidermal growth factor-like ligands differentially up-regulate matrix metalloproteinase 9 in head and neck squamous carcinoma cells', *Cancer Res,* 60 (4), 1121-8.

Chatterjee, S. K. and Zetter, B. R. (2005), 'Cancer biomarkers: knowing the present and predicting the future', *Future Oncol,* 1 (1), 37-50.

Chen, X. S., et al. (1994), 'cDNA cloning, expression, mutagenesis of C-terminal isoleucine, genomic structure, and chromosomal localizations of murine 12-lipoxygenases', *J Biol Chem,* 269 (19), 13979-87.

Choe, S. E., et al. (2005), 'Preferred analysis methods for Affymetrix GeneChips revealed by a wholly defined control dataset', *Genome Biol,* 6 (2), R16.

Chung, S. S., et al. (2009), 'Glutathione peroxidase 3 mediates the antioxidant effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human skeletal muscle cells', *Mol Cell Biol,* 29 (1), 20-30.

Coats, W. D., Jr. and Faxon, D. P. (1997), 'The role of the extracellular matrix in arterial remodelling', *Semin Interv Cardiol,* 2 (3), 167-76.

Cook, S. A. and Rosenzweig, A. (2002), 'DNA microarrays: implications for cardiovascular medicine', *Circ Res,* 91 (7), 559-64.

Corbel, M., Boichot, E., and Lagente, V. (2000), 'Role of gelatinases MMP-2 and MMP-9 in tissue remodeling following acute lung injury', *Braz J Med Biol Res,* 33 (7), 749-54.

Dakeshita, S., et al. (2009), 'Gene expression signatures in peripheral blood cells from Japanese women exposed to environmental cadmium', *Toxicology,* 257 (1-2), 25-32.

Dallas, P. B., et al. (2005), 'Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR -- how well do they correlate?', *BMC Genomics,* 6 (1), 59.

Dandona, P., et al. (2005), 'Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation', *Circulation,* 111 (11), 1448-54.

DATASUS - Departamento de Informática do SUS. Disponível em: < http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205>. Acesso em 07 abril de 2010.

de Lemos, J. A., et al. (2001), 'The prognostic value of B-type natriuretic peptide in patients with acute coronary syndromes', *N Engl J Med,* 345 (14), 1014-21.

de Seny, D., et al. (2005), 'Discovery of new rheumatoid arthritis biomarkers using the surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry ProteinChip approach', *Arthritis Rheum,* 52 (12), 3801-12.

Debey, S., et al. (2006), 'A highly standardized, robust, and cost-effective method for genome-wide transcriptome analysis of peripheral blood applicable to large-scale clinical trials', *Genomics,* 87 (5), 653-64.

Dolci, A. and Panteghini, M. (2006), 'The exciting story of cardiac biomarkers: from retrospective detection to gold diagnostic standard for acute myocardial infarction and more', *Clin Chim Acta,* 369 (2), 179-87.

Domon, B. and Aebersold, R. (2006a), 'Challenges and opportunities in proteomics data analysis', *Mol Cell Proteomics,* 5 (10), 1921-6.

--- (2006b), 'Mass spectrometry and protein analysis', *Science,* 312 (5771), 212-7.

dos Santos, E. S., et al. (2006), 'Acute coronary syndrome registry at a cardiology emergency center', *Arq Bras Cardiol,* 87 (5), 597-602.

Eryol, N. K., et al. (2005), 'Are the high levels of cytomegalovirus antibodies a determinant in the development of coronary artery disease?', *Int Heart J,* 46 (2), 205-9.

Fang, L., Du, X.J., Gao, X.M., Dart, A. (2009), 'Acute Myocardial Infarction Enhances Production of MMP-9 by Peripheral Blood Mononuclear Cells.', *Heart, Lung and Circulation,* 18 (3).

Fernandez-Real, J. M., et al. (2003), 'CD14 monocyte receptor, involved in the inflammatory cascade, and insulin sensitivity', *J Clin Endocrinol Metab,* 88 (4), 1780-4.

Florian-Kujawski, M., et al. (2004), 'Biomarker profiling of plasma from acute coronary syndrome patients. Application of ProteinChip Array analysis', *Int Angiol,* 23 (3), 246-54.

Folgueira, M.A.A.K, el al. (2009), 'Gene expression profile of residual breast cancer after dozorubicion and cyclophosphamide neoadjuvant chemotherapy', *Oncology Reports*, 22, 805-813.

Ford, J. W. and McVicar, D. W. (2009), 'TREM and TREM-like receptors in inflammation and disease', *Curr Opin Immunol,* 21 (1), 38-46.

Forti, N., et al. (2003), '[Genetic changes and cholesterolemia: new Brazilian studies]', *Arq Bras Cardiol,* 80 (5), 565-71.

Freedman, J. E. (2003), 'CD40 ligand--assessing risk instead of damage?', *N Engl J Med,* 348 (12), 1163-5.

Friddle, C. J., et al. (2000), 'Expression profiling reveals distinct sets of genes altered during induction and regression of cardiac hypertrophy', *Proc Natl Acad Sci U S A,* 97 (12), 6745-50.

Friedewald, W. T., Levy, R. I., and Fredrickson, D. S. (1972), 'Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge', *Clin Chem,* 18 (6), 499-502.

Gentleman, R. C., et al. (2004), 'Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics', *Genome Biol,* 5 (10), R80.

Gillum, R. F., et al. (1984), 'International diagnostic criteria for acute myocardial infarction and acute stroke', *Am Heart J,* 108 (1), 150-8.

Gondim Lde, G., de Oliveira, W. A., and Grossi, S. A. (2003), '[The difference in acute myocardial infarction pain between diabetic and non diabetic patients]', *Rev Lat Am Enfermagem,* 11 (6), 720-6.

Guzman, E. C., et al. (2000), 'Association of the apolipoprotein B gene polymorphisms with cholesterol levels and response to fluvastatin in Brazilian individuals with high risk for coronary heart disease', *Clin Chem Lab Med,* 38 (8), 731-6.

Harb, J. G., Chyla, B. I., and Huettner, C. S. (2008), 'Loss of Bcl-x in Ph+ B-ALL increases cellular proliferation and does not inhibit leukemogenesis', *Blood,* 111 (7), 3760-9.

Harris, W. S. (2007), 'Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: a case for omega-3 index as a new risk factor', *Pharmacol Res,* 55 (3), 217-23.

Harrison, N. and Abhyankar, B. (2005), 'The mechanism of action of omega-3 fatty acids in secondary prevention post-myocardial infarction', *Curr Med Res Opin,* 21 (1), 95-100.

Hartweg, J., et al. (2007), 'Meta-analysis of the effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on haematological and thrombogenic factors in type 2 diabetes', *Diabetologia,* 50 (2), 250-8.

Hashimoto, T., et al. (1996), 'A new inhibitor of mitochondrial fatty acid oxidation', *J Biochem,* 119 (6), 1196-201.

Hemmi, H., et al. (2009), 'A new triggering receptor expressed on myeloid cells (Trem) family member, Trem-like 4, binds to dead cells and is a DNAX activation protein 12-linked marker for subsets of mouse macrophages and dendritic cells', *J Immunol,* 182 (3), 1278-86.

Hersberger, M. and von Eckardstein, A. (2003), 'Low high-density lipoprotein cholesterol: physiological background, clinical importance and drug treatment', *Drugs,* 63 (18), 1907-45.

Hill, J. M., et al. (2003), 'Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk', *N Engl J Med,* 348 (7), 593-600.

Hirata, R. D., et al. (2002), 'A method to detect the G894T polymorphism of the NOS3 gene. Clinical validation in familial hypercholesterolemia', *Clin Chem Lab Med,* 40 (5), 436-40.

Hobeika, M. J., et al. (2007), 'Matrix metalloproteinases in peripheral vascular disease', *J Vasc Surg,* 45 (4), 849-57.

Hoheisel, J. D. (2006), 'Microarray technology: beyond transcript profiling and genotype analysis', *Nat Rev Genet,* 7 (3), 200-10.

Hortin, G. L. (2006), 'The MALDI-TOF mass spectrometric view of the plasma proteome and peptidome', *Clin Chem,* 52 (7), 1223-37.

Hoshida, S., et al. (2005), 'Acute Chlamydia pneumoniae infection with heat-shock-protein-60-related response in patients with acute coronary syndrome', *Atherosclerosis,* 183 (1), 109-12.

Huang, J. T., et al. (1999), 'Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase', *Nature,* 400 (6742), 378-82.

Hutchens, T. W. and Yip, T. T. (1993), 'New Desorption Strategies for the Mass-Spectrometric Analysis of Macromolecules', *Rapid Communications in Mass Spectrometry,* 7 (7), 576-80.

Hwang, J. J., et al. (2002), 'Microarray gene expression profiles in dilated and hypertrophic cardiomyopathic end-stage heart failure', *Physiological Genomics,* 10 (1), 31-44.

Irizarry, R. A., et al. (2003), 'Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data', *Biostatistics,* 4 (2), 249-64.

Iwakura, A., et al. (2006), 'Estradiol enhances recovery after myocardial infarction by augmenting incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into sites of ischemia-induced neovascularization via endothelial nitric oxide synthase-mediated activation of matrix metalloproteinase-9', *Circulation,* 113 (12), 1605-14.

Jefferson, B. K. and Topol, E. J. (2005), 'Molecular mechanisms of myocardial infarction', *Curr Probl Cardiol,* 30 (7), 333-74.

Jernberg, T., et al. (2004), 'Natriuretic peptides in unstable coronary artery disease', *Eur Heart J,* 25 (17), 1486-93.

Kayama, Y., et al. (2009), 'Cardiac 12/15 lipoxygenase-induced inflammation is involved in heart failure', *J Exp Med,* 206 (7), 1565-74.

Keeling, W. B., et al. (2005), 'An overview of matrix metalloproteinases in the pathogenesis and treatment of abdominal aortic aneurysms', *Vasc Endovascular Surg,* 39 (6), 457-64.

Kharlap, M. S., et al. (2006), 'Atrial appendage transcriptional profile in patients with atrial fibrillation with structural heart diseases', *Ann N Y Acad Sci,* 1091, 205-17.

Koizumi, S. (2004), 'Application of DNA microarrays in occupational health research', *J Occup Health,* 46 (1), 20-5.

Koomen, J. M., et al. (2005), 'Plasma protein profiling for diagnosis of pancreatic cancer reveals the presence of host response proteins', *Clin Cancer Res,* 11 (3), 1110-8.

Kou, V. & Nassisi, D. (2006), 'Unstable angina and non-ST-segment myocardial infarction: an evidence-based approach to management', *Mt Sinai J Med,* 73 (1), 449-68.

Kozak, K. R., et al. (2005), 'Characterization of serum biomarkers for detection of early stage ovarian cancer', *Proteomics,* 5 (17), 4589-96.

Kudo, I. and Murakami, M. (2002), 'Phospholipase A2 enzymes', *Prostaglandins Other Lipid Mediat,* 68-69, 3-58.

Le, L., et al. (2005), 'Identification of serum amyloid A as a biomarker to distinguish prostate cancer patients with bone lesions', *Clin Chem,* 51 (4), 695-707.

Leclercq, A., et al. (2007), 'Involvement of intraplaque hemorrhage in atherothrombosis evolution via neutrophil protease enrichment', *J Leukoc Biol,* 82 (6), 1420-9.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001), 'Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method', *Methods,* 25 (4), 402-8.

Loscalzo, J. (2001), 'Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis', *Circ Res,* 88 (8), 756-62.

Lukiw, W. J., et al. (2005), 'A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease', *J Clin Invest,* 115 (10), 2774-83.

Machado, M. O., et al. (2001), 'Apo B gene haplotype is associated with lipid profile of higher risk for coronary heart disease in Caucasian Brazilian men', *J Clin Lab Anal,* 15 (1), 19-24.

Maggi, P., et al. (2006), 'Role of chlamydia infection in the pathogenesis of atherosclerotic plaques in HIV-1-positive patients', *In Vivo,* 20 (3), 409-13.

Maisel, A. S., Bhalla, V., and Braunwald, E. (2006), 'Cardiac biomarkers: a contemporary status report', *Nat Clin Pract Cardiovasc Med,* 3 (1), 24-34.

Malik, G., et al. (2005), 'Serum levels of an isoform of apolipoprotein A-II as a potential marker for prostate cancer', *Clin Cancer Res,* 11 (3), 1073-85.

Marcotte, E. R., Srivastava, L. K., and Quirion, R. (2003), 'cDNA microarray and proteomic approaches in the study of brain diseases: focus on schizophrenia and Alzheimer's disease', *Pharmacol Ther,* 100 (1), 63-74.

Marshall, J., et al. (2003), 'Processing of serum proteins underlies the mass spectral fingerprinting of myocardial infarction', *J Proteome Res,* 2 (4), 361-72.

Marx, N., et al. (1998), 'Macrophages in human atheroma contain PPARgamma: differentiation-dependent peroxisomal proliferator-activated receptor gamma(PPARgamma) expression and reduction of MMP-9 activity through PPARgamma activation in mononuclear phagocytes in vitro', *Am J Pathol,* 153 (1), 17-23.

Mateos-Caceres, P. J., et al. (2004), 'Proteomic analysis of plasma from patients during an acute coronary syndrome', *J Am Coll Cardiol,* 44 (8), 1578-83.

McDuffie, M., et al. (2008), 'Nonobese diabetic (NOD) mice congenic for a targeted deletion of 12/15-lipoxygenase are protected from autoimmune diabetes', *Diabetes,* 57 (1), 199-208.

Mehta, J. L., Saldeen, T. G., and Rand, K. (1998), 'Interactive role of infection, inflammation and traditional risk factors in atherosclerosis and coronary artery disease', *J Am Coll Cardiol,* 31 (6), 1217-25.

Mion, J.D., et al. (2004), 'IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial', *Arq Bras Cardiol*; 82 (Supl IV), 7-14.

Morris, M. C., Sacks, F., and Rosner, B. (1993), 'Does fish oil lower blood pressure? A meta-analysis of controlled trials', *Circulation,* 88 (2), 523-33.

Mussa, F. F., et al. (2006), 'Chlamydia pneumoniae and vascular disease: an update', *J Vasc Surg,* 43 (6), 1301-7.

Nabel, E. G. (2003), 'Cardiovascular disease', *N Engl J Med,* 349 (1), 60-72.

Nagase, H., Visse, R., and Murphy, G. (2006), 'Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs', *Cardiovasc Res,* 69 (3), 562-73.

Napoli, C., et al. (2003), 'Microarray analysis: a novel research tool for cardiovascular scientists and physicians', *Heart,* 89 (6), 597-604.

Nomura, F., et al. (2004), 'Identification of novel and downregulated biomarkers for alcoholism by surface enhanced laser desorption/ionization-mass spectrometry', *Proteomics,* 4 (4), 1187-94.

Opie, L. H., et al. (2006), 'Controversies in ventricular remodelling', *Lancet,* 367 (9507), 356-67.

Oshima, T., et al. (2005), 'Association of Helicobacter pylori infection with systemic inflammation and endothelial dysfunction in healthy male subjects', *J Am Coll Cardiol,* 45 (8), 1219-22.

Panteghini, M. (2004), 'Role and importance of biochemical markers in clinical cardiology', *Eur Heart J,* 25 (14), 1187-96.

Piegas LS, Feitosa G, Mattos LA, Nicolau JC, Rossi Neto JM, et al. (2009), 'Sociedade Brasileira de Cardiologia. Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Tratamento do Infarto agudo do Miocárdio com Supradesnível do Segmento ST'. *Arq Bras Cardiol*, 93(6 supl.2), e179-e264.

Rabelink, T. J., et al. (2004), 'Endothelial progenitor cells: more than an inflammatory response?', *Arterioscler Thromb Vasc Biol,* 24 (5), 834-8.

Rajappa, M. and Sharma, A. (2005), 'Biomarkers of cardiac injury: an update', *Angiology,* 56 (6), 677-91.

Reeve, J. L., et al. (2005), 'Don't lose heart--therapeutic value of apoptosis prevention in the treatment of cardiovascular disease', *J Cell Mol Med,* 9 (3), 609-22.

Ricote, M., et al. (1998), 'The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation', *Nature,* 391 (6662), 79-82.

Ridker, P. M., et al. (2000), 'C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women', *N Engl J Med,* 342 (12), 836-43.

Rodrigues, A. C., et al. (2005), 'High baseline serum total and LDL cholesterol levels are associated with MDR1 haplotypes in Brazilian hypercholesterolemic individuals of European descent', *Braz J Med Biol Res,* 38 (9), 1389-97.

Roggério, A., (2008), 'Expressão aumentada dos antígenos de MMP-9, PPARα, *Chlamydophila pneumoniae* e *Mycoplasma pneumoniae* em fragmentos ateroscleróticos de aorta com aneurisma', Tese (doutorado), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Rosner, Bernard (2006), *Fundamentals of biostatistics* (6th edn.; Belmont, CA: Thomson-Brooks/Cole) xix, 868.

Sakuma, T., Hirata, R. D., and Hirata, M. H. (2004), 'Five polymorphisms in gene candidates for cardiovascular disease in Afro-Brazilian individuals', *J Clin Lab Anal,* 18 (6), 309-16.

Salazar, L. A., et al. (1999), 'Effects of Ava II and Hinc II polymorphisms at the LDL receptor gene on serum lipid levels of Brazilian individuals with high risk for coronary heart disease', *J Clin Lab Anal,* 13 (6), 251-8.

--- (2002), 'Molecular basis of familial hypercholesterolemia in Brazil: Identification of seven novel LDLR gene mutations', *Hum Mutat,* 19 (4), 462-3.

Sampaio, M. F., et al. (2007), 'AMI is associated with polymorphisms in the NOS3 and FGB but not in PAI-1 genes in young adults', *Clin Chim Acta,* 377 (1-2), 154-62.

Sanges, R., Cordero, F., and Calogero, R. A. (2007), 'oneChannelGUI: a graphical interface to Bioconductor tools, designed for life scientists who are not familiar with R language', *Bioinformatics,* 23 (24), 3406-8.

Senior, R. M., et al. (1991), 'Human 92- and 72-kilodalton type IV collagenases are elastases', *J Biol Chem,* 266 (12), 7870-5.

Shah, P. K. (1997), 'Inflammation, metalloproteinases, and increased proteolysis: an emerging pathophysiological paradigm in aortic aneurysm', *Circulation,* 96 (7), 2115-7.

Shiwa, M., et al. (2003), 'Rapid discovery and identification of a tissue-specific tumor biomarker from 39 human cancer cell lines using the SELDI ProteinChip platform', *Biochem Biophys Res Commun,* 309 (1), 18-25.

Shu, H., et al. (2000), 'Activation of PPARalpha or gamma reduces secretion of matrix metalloproteinase 9 but not interleukin 8 from human monocytic THP-1 cells', *Biochem Biophys Res Commun,* 267 (1), 345-9.

Siegel, Sidney and Castellan, N. John (1988), *Nonparametric statistics for the behavioral sciences* (2nd edn.; New York: McGraw-Hill) xxiii, 399 p.

Silva, M.A.D., Sousa, A.G., Schargodsky, H. (1998), 'Fatores de risco para infarto do miocárdio no Brasil. Estudo FRICAS'. *Arq Bras Cardiol*, 71 (5), 667-75.

Simpson, R. J., et al. (2009), 'Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential', *Expert Review of Proteomics,* 6 (3), 267-83.

Singer, P., et al. (2008), 'Anti-inflammatory properties of omega-3 fatty acids in critical illness: novel mechanisms and an integrative perspective', *Intensive Care Med,* 34 (9), 1580-92.

Sluijter, J. P., et al. (2006), 'Matrix metalloproteinase 2 is associated with stable and matrix metalloproteinases 8 and 9 with vulnerable carotid atherosclerotic lesions: a study in human endarterectomy specimen pointing to a role for different extracellular matrix metalloproteinase inducer glycosylation forms', *Stroke,* 37 (1), 235-9.

Smith, R. J., et al. (1993), 'Transmembrane signaling in human polymorphonuclear neutrophils: 15(S)-hydroxy-(5Z,8Z,11Z,13E)-eicosatetraenoic acid modulates

receptor agonist-triggered cell activation', *Proc Natl Acad Sci U S A,* 90 (15), 7270-4.

Sociedade Brasileira de Diabetes (2008). Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes.

Sorkin, S. C., et al. (2005), 'APOA1 polymorphisms are associated with variations in serum triglyceride concentrations in hypercholesterolemic individuals', *Clin Chem Lab Med,* 43 (12), 1339-45.

Stanton, L. W., et al. (2000), 'Altered patterns of gene expression in response to myocardial infarction', *Circ Res,* 86 (9), 939-45.

Tang, Y., et al. (2003), 'Blood genomic expression profile for neuronal injury', *J Cereb Blood Flow Metab,* 23 (3), 310-9.

Tavares, V., et al. (2005), 'Association between Pro12Ala polymorphism of the PPAR-gamma2 gene and insulin sensitivity in Brazilian patients with type-2 diabetes mellitus', *Diabetes Obes Metab,* 7 (5), 605-11.

Thompson, R. W., et al. (1995), 'Production and localization of 92-kilodalton gelatinase in abdominal aortic aneurysms. An elastolytic metalloproteinase expressed by aneurysm-infiltrating macrophages', *J Clin Invest,* 96 (1), 318-26.

Thygesen, K., et al. (2007), 'Universal definition of myocardial infarction', *Circulation,* 116 (22), 2634-53.

Tolson, J., et al. (2004), 'Serum protein profiling by SELDI mass spectrometry: detection of multiple variants of serum amyloid alpha in renal cancer patients', *Lab Invest,* 84 (7), 845-56.

Tomic, V., et al. (2005), 'Transcriptomic and proteomic patterns of systemic inflammation in on-pump and off-pump coronary artery bypass grafting', *Circulation,* 112 (19), 2912-20.

Tousoulis, D., Charakida, M., and Stefanadis, C. (2006), 'Endothelial function and inflammation in coronary artery disease', *Heart,* 92 (4), 441-4.

Tuomisto, T. T. and Yla-Herttuala, S. (2005), 'What have we learnt about microarray analyses of atherogenesis?', *Curr Opin Lipidol,* 16 (2), 201-5.

Tzouvelekis, A., Patlakas, G., and Bouros, D. (2004), 'Application of microarray technology in pulmonary diseases', *Respir Res,* 5, 26.

Uzuelli, J.A., (2008), 'Alterações das concnetrações plasmáticas de troponina I e de metaloproteinases 2 e 9 da matriz extracelular após embolia aguda em cães', tese (mestrado), Faculdade de Medicina de Riberão Preto da Universidade de São Paulo.

von Schacky, C. (2007), 'Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease', *Curr Opin Clin Nutr Metab Care,* 10 (2), 129-35.

Wang, Q. (2005), 'Molecular genetics of coronary artery disease', *Curr Opin Cardiol,* 20 (3), 182-8.

White, M. Y., et al. (2005), 'Proteomics of ischemia/reperfusion injury in rabbit myocardium reveals alterations to proteins of essential functional systems', *Proteomics,* 5 (5), 1395-410.

Who - World Health organization. (2008). 'The global burden of disease: 2004 update, Suiça: *WHO Press*.

Wilson, W. R., et al. (2006), 'Matrix metalloproteinase-8 and -9 are increased at the site of abdominal aortic aneurysm rupture', *Circulation,* 113 (3), 438-45.

Wittwer, J. and Hersberger, M. (2007), 'The two faces of the 15-lipoxygenase in atherosclerosis', *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids,* 77 (2), 67-77.

Wittwer, J., et al. (2007), 'The c.-292C>T promoter polymorphism increases reticulocyte-type 15-lipoxygenase-1 activity and could be atheroprotective', *Clin Chem Lab Med,* 45 (4), 487-92.

Wojakowski, W., et al. (2004), 'The pro- and anti-inflammatory markers in patients with acute myocardial infarction and chronic stable angina', *International Journal of Molecular Medicine,* 14 (2), 317-22.

Woong-Shick, A., et al. (2005), 'Identification of hemoglobin-alpha and -beta subunits as potential serum biomarkers for the diagnosis and prognosis of ovarian cancer', *Cancer Sci,* 96 (3), 197-201.

Xu, G., et al. (2009), 'Application of SELDI-TOF-MS to identify serum biomarkers for renal cell carcinoma', *Cancer Lett,* 282 (2), 205-13.

Yan, A. T., et al. (2006), 'Plasma matrix metalloproteinase-9 level is correlated with left ventricular volumes and ejection fraction in patients with heart failure', *J Card Fail,* 12 (7), 514-9.

Yoon, Y. S., Lee, N., and Scadova, H. (2005), 'Myocardial regeneration with bone-marrow-derived stem cells', *Biol Cell,* 97 (4), 253-63.

Zhang, G., et al. (2009), 'Time course proteomic profile of rat acute myocardial infarction by SELDI-TOF MS analysis', *Int J Cardiol,* 131 (2), 225-33.

Zhang, Z., et al. (2004), 'Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer', *Cancer Res,* 64 (16), 5882-90.

# APÊNDICES

**APÊNDICE A** – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Secretaria de Estado da Saúde
Coordenadoria de Serviços de Saúde
Instituto "Dante Pazzanese" de Cardiologia

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de pesquisa: 'TRANSCRIPTOMA E PROTEOMA EM SANGUE PERIFÉRICO PARA PESQUISA DE NOVOS MARCADORES DE DOENÇAS CARDIOVASCULARES: ESTUDO EM INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO'.

Dados de identificação do sujeito da pesquisa:

Nome do paciente: _____
Documento de Identidade nº_____
Sexo _____
Data de Nascimento ____/____/_____
Endereço_____Nº_____ Apto_____
Bairro_____ Cidade_____ CEP_____
Telefone_____

Prezado Paciente e/ou Responsável,

Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa acima citado que estamos desenvolvendo com a equipe de médicos do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia. Esse estudo é necessário para identificar novos exames para o diagnóstico e acompanhamento de doenças cardiovasculares.

Para participar desta pesquisa precisarei do seu consentimento e suas amostras de sangue. As coletadas serão realizadas em intervalos de tempos diferentes. O risco a saúde será mínimo, por causa da coleta de sangue que pode formar uma mancha roxa (hematoma) no local da picada da agulha. Além de você outros quinze pacientes também participarão do estudo (6 do grupo controle e 10 pacientes com infarto agudo do miocárdio). Precisarei, ainda, que você responda a algumas perguntas sobre doenças existentes nas pessoas de sua família, hábitos alimentares e uso de medicamentos.

Inicialmente, serão coletadas seis amostras de sangue, onde vai ser medido como seu organismo responde após o enfarto, para isso vamos estudar no seu sangue alguns componentes (produtos de sangue e produtos do DNA). E sua participação no estudo se encerra. A primeira coleta será na Seção do Pronto Socorro do Instituto Dante Pazzanese após sua autorização e confirmação da suspeita clínica de infarto agudo do miocárdio.

As demais coletas serão na Unidade de Terapia Intensiva. A segunda coleta será ao termino do cateterismo, aproximadamente 2 horas depois da primeira coleta. E as outras serão em intervalos de tempo de 12 em 12 horas em relação à segunda coleta. Todas as coletas serão efetuadas sob supervisão dos médicos responsáveis de cada local.

Caso seja de seu interesse, entregarei todos os resultados dos exames laboratoriais necessários sem qualquer custo, que são: concentração de glicose, colesterol total, HDL, VLDL, LDL, triglicérides, apo A, apo B, uréia, creatinina, ácido úrico, T3, T4 livre, TSH, TGO, TGP, P-CR, troponina I, CK, CKMB, BNP e NT-pro-BNP. Você não receberá qualquer pagamento por sua participação. Também disponibilizarei os resultados da análise dos produtos de sangue e produtos de DNA no final da pesquisa.

Os dados e os resultados obtidos durante a investigação serão confidenciais e não serão revelados a terceiros, a menos que sua autorização prévia seja obtida. Sua identidade será mantida em segredo, quando os resultados desse estudo forem publicados em revistas, artigos e serem tema de debate e aulas.

Suas amostras de sangue serão armazenadas e ficarão sob responsabilidade única e exclusivamente do laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêutica – USP. Caso haja interesse de realizarmos futuras pesquisas entraremos em contato com você, e somente com sua autorização e aprovação dos novos projetos no Comitê de Ética em Pesquisa realizaremos os estudos.

Quero também destacar que as análises dos produtos de sangue e produtos de DNA serão realizadas em colaboração estrangeira, com os Estados Unidos e Espanha, pois ainda não disponibilizamos de alguns equipamentos necessários para este projeto.

Sendo assim, estaremos enviando estes produtos para fora do país, com volumes exatos para que não haja sobras (não terá armazenamento dos produtos de sangue e produtos de DNA no exterior). Além disso, elas já estarão processadas de forma que estarão inviáveis de serem utilizado para outras finalidades a não ser para a realização este projeto.

Sua participação neste estudo é voluntária. Você pode retirar-se a qualquer momento do estudo e pegar suas amostras de volta, sem penalidades ou perda dos benefícios a que você tem direito e seu tratamento médico no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia não será afetado.

Caso você tenha alguma dúvida em relação à pesquisa, ou se ocorrer lesão relacionada à investigação você poderá entrar em contato com os pesquisadores: Lídio Gonçalves Lima Neto (telefone: 98978317), André Ducate Luchessi (telefone: 85917333) e Vivian Nogueira Silbiger (telefone: 85844073) a qualquer hora do dia.

Asseguro também que qualquer tipo de dano previsto ou não no termo de consentimento e resultante de sua participação, além do direito à assistência integral, têm direito à indenização, que são seus direitos legais.

Eu, _____ declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, aceito, voluntariamente, em participar do presente Protocolo da Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de 20_____

_____ _____

Assinatura do voluntário da pesquisa Assinatura do pesquisador

_____

Assinatura da Testemunha

**APÊNDICE B** – Ficha para colheita de dados individuais do paciente

DADOS DO PACIENTE

**Registro……**
Nome:……Paciente nº ……
Data:……/……/…

Data de nascimento:……/……/……
Sexo: M-1 ( ) F-2 ( )
Cor: Branca ( ) Parda ( ) Negra ( ) Amarela ( )

HABITOS DE VIDA

Hábito de fumar: Nunca fumou ( ) Parou de fumar ( ) há qto tempo?…….
Fuma ( ) Nº de cigarros/dia……...
Consume bebida alcoólica? Sim ( ) Não ( )
Até 7 doses/sem ( ) Mais de 7 doses/sem ( )
Profissão:…… Há exigência de esforço físico? Sim ( ) Não ( )
Pratica exercício físico? Sim ( ) Não ( )
Com que freqüência?……
É obeso? Sim ( ) Não ( )
Peso (Kg)…… Altura (Chalmers et al.)……..
IMC:…….

DOENÇAS
Possui algum tipo de doença? Não sabe ( ) Sim ( ) Não ( ) Qual(is)?
Diabetes *Mellitus*? Sim ( ) Não ( )
É hipertenso? Sim ( ) Não ( )
Outras doenças: ……
Toma medicamento? Sim ( ) Não ( )
Qual(is)? Em que dosagem?……..

HISTÓRICO FAMILIAR - Possui algum parente com:
Diabetes *Mellitus* ( ) Obesidade ( ) Hipertensão ( )
DC ( ) Hipercolesterolemia ( )
( ) Outras patologias : ……
Quem?…… Não tem ( ) Não sabe ( )

INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO
Já teve infarte antes? Não sabe ( ) Sim ( ) Não ( ) Há qto tempo?……...
Quais foram os sintomas que o fizeram procuar o médico?.....
A que h aproximadamente vocês acha que infartou?.....

# ANEXOS

**ANEXO A** – Cópia do aval da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)

**MINISTÉRIO DA SAÚDE**
**Conselho Nacional de Saúde**
**Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP**

## PARECER Nº 660/2006

**Registro CONEP: 12877** (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

**CAAE – 0012.0.131.018-06** **Processo nº 25000.051450/2006-85**
**Projeto de Pesquisa:** *"Transcriptoma e proteoma em sangue periférico para pesquisa de novos marcadores de doenças cardiovasculares: Estudo em enfarto agudo do miocárdio".*
**Pesquisador Responsável:** Dr. Mario Hiroyuki Hirata
**Instituição:** Instituto Dante Pazanese de Cardiologia /SP
**Área Temática Especial:** Cooperação estrangeira e Genética humana

**Sumário**

Estudar o perfil de expressão de 55 mil genes logo após o infarto do miocárdio e comparar com o perfil de indivíduos supostamente sadios na mesma faixa etária e origem étnica.

Serão estudadas cerca de 20 mil proteínas em arranjos em grupos de indivíduos logo após o infarto do miocárdio e em indivíduos supostamente sadios na mesma faixa etária e origem étnica. Através da tecnologia de *hugh-throughput DNA microarray chip* (*sistema code link*) será analisada a expressão de RNA de 40 mil a 50 mil genes no sangue de pacientes com DAC-doença aterosclerótica coronariana / IM-infarto do miocárdio e paciente controle.

Serão avaliados os principais genes mais expressos no PCR em tempo real para confirmar os dados do *array* nos dois grupos. Realizar estudo proteômico através de tecnologia de eletroforese bidirecional com plasma de pacientes com DAC.

Justifica-se o estudo ao estudar as doenças cardiovasculares, as quais constituem atualmente a principal causa de morte e incapacitação entre as doenças humanas e corresponde a aproximadamente ¼ das mortes da população adulta. Os gastos com doenças isquêmicas levam a um gasto de 20% do total de gastos do SUS.

A identificação de mudanças nos perfis de expressão gênica que sejam preditivos para as doenças arteriais escleróticas coronarianas e os riscos relacionados ao desenvolvimento do enfarte do miocárdio proposta por este estudo parece bastante relevante.

A hipótese dos pesquisadores é que "os resultados da expressão gênica dos leucócitos mononucleares do sangue periférico estejam relacionados com o processo inflamatório vascular endotelial nas doenças cardiovasculares que causam riscos para a população".

Serão incluídos 100 indivíduos no centro em tela e serão utilizados RNAs provenientes de amostras de sangue total de pacientes envolvidos para se proceder a análise de 55 mil genes (transcriptoma) e alíquotas de proteínas provenientes de amostras de plasma para análise de 20 mil indivíduos sadios e com infarto do miocárdio. Deverão ser incluídos indivíduos de ambos os sexos entre 18 e 40 anos de idade e com graus variados de angina.

**Cont. Parecer CONEP 660/2006.**

**Comentários/considerações**

Em resposta às diligencias do CEP sobre o envio de material para o exterior (para atendimento das exigências da resolução 347 CNS/MS), o pesquisador apresenta detalhada justificativa, na qual ressalta que serão enviadas alíquotas com quantidade exata para a realização dos testes.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – foi reformulado para atendimento à diligencia do CEP e é de fácil compreensão para os sujeitos da pesquisa.

Trata-se de um projeto cooperativo internacional que tem o Brasil como país de origem. A cooperação com outros países é detalhada no protocolo e destaca a presença de pesquisadores brasileiros nos centros de colaboração estrangeiros. Os países envolvidos como coordenadores e colaboradores do estudo, além do Brasil, são Espanha e Estados Unidos. Foi apresentado um documento da Universidade de Santiago de Compostela-Espanha certificando que Vivian Silviger foi aceita no doutorado daquela instituição. Nos Estados Unidos serão feitas as análises proteômicas com a participação do pesquisador brasileiro. Segundo o pesquisador, os procedimentos realizados nas instituições estrangeiras possibilitarão transferência de tecnologia para o Brasil.

Quanto à Folha de Rosto, solicita-se informar o cargo (carimbo institucional) do profissional que assinou no campo referente ao Termo de Compromisso da Instituição.

**Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto com a recomendação acima citada, devendo esta ser acompanhada pelo CEP, para posterior início da pesquisa.**

**Situação:** Protocolo aprovado com recomendação.

Brasília, 16 de junho de 2006.

WILLIAM SAAD HOSSNE
**Coordenador da CONEP/CNS/MS**

# ANEXO B– Ficha do Aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

**Universidade de São Paulo**
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**
**Documento sem validade oficial**
**FICHA DO ALUNO**

**9136 - 5765097/1 - Vivian Nogueira Silbiger**

| | |
|---|---|
| **Email:** | viviansilbiger@usp.br |
| **Data de Nascimento:** | 12/10/1983 |
| **Cédula de Identidade:** | RG - 30.060.350-2 - SP |
| **Local de Nascimento:** | Estado de São Paulo |
| **Nacionalidade:** | Brasileira |
| **Graduação:** | Bacharel em Ciências Biológicas - Modalidade: Médica - Universidade de Mogi das Cruzes - São Paulo - Brasil - 2006 |

| | |
|---|---|
| **Curso:** | Doutorado Direto |
| **Programa:** | Farmácia (Análises Clínicas) |
| **Área:** | Análises Clínicas |
| **Data de Matrícula:** | 06/07/2006 |
| **Início da Contagem de Prazo:** | 06/07/2006 |
| **Data Limite:** | 06/07/2010 |
| **Orientador:** | Prof(a). Dr(a). Mario Hiroyuki Hirata - 06/07/2006 até o presente. E.Mail: mhhirata@usp.br |
| **Proficiência em Línguas:** | Inglês, Aprovado em 06/07/2006 |
| **Data de Aprovação no Exame de Qualificação:** | Aprovado em 17/09/2009 |
| **Data do Depósito do Trabalho:** | |
| **Título do Trabalho:** | |
| **Data Máxima para Aprovação da Banca:** | |
| **Data de Aprovação da Banca:** | |
| **Data Máxima para Defesa:** | |
| **Data da Defesa:** | |
| **Resultado da Defesa:** | |
| **Histórico de Ocorrências:** | Ingressou no Doutorado Direto em 06/07/2006<br>Matrícula de Acompanhamento em 08/02/2010 |

**Última ocorrência:** Matrícula de Acompanhamento em 08/02/2010
**Impresso em:** 11/04/10 16:15:09

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

**Universidade de São Paulo**
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**
**Documento sem validade oficial**
**FICHA DO ALUNO**

**9136 - 5765097/1 - Vivian Nogueira Silbiger**

| Sigla | Nome da Disciplina | Início | Término | Carga Horária | Cred. | Freq. | Conc. | Exc. | Situação |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| QBQ5710 - 6/1 | Biologia Molecular do Gene (Instituto de Química - Universidade de São Paulo) | 01/08/2006 | 01/11/2006 | 180 | 12 | 100 | C | N | Concluída |
| FBC5757 - 1/1 | Seminários em Análises Clínicas II | 02/08/2006 | 14/11/2006 | 30 | 0 | 0 | - | N | Matrícula cancelada |
| FBC5709 - 4/1 | Biologia Molecular em Análises Clínicas | 07/08/2006 | 10/09/2006 | 75 | 5 | 80 | A | N | Concluída |
| FBC5749 - 1/2 | Biossegurança em Laboratórios de Ensino e Pesquisa | 31/08/2006 | 05/10/2006 | 30 | 2 | 75 | A | N | Concluída |
| BTC5703 - 4/2 | Biologia Molecular (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo) | 02/10/2006 | 14/01/2007 | 75 | 0 | 0 | - | N | Matrícula cancelada |
| MCM5876 - 1/1 | Biologia Molecular em Clínica Médica (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo) | 02/10/2006 | 22/10/2006 | 60 | 0 | 0 | - | N | Matrícula cancelada |
| Atividade do Programa | Participou do XI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, com apresentação do trabalho, intitulado: "Paraoxonase 1 e 2 como marcador genético de infarto agudo do miocárdio em adultos jovens", publicado em anais, v. 1, p. 186, 2006, São Paulo, Brasil (1) | 16/10/2006 | 20/10/2006 | - | 1 | 0 | - | - | - |
| FBC5757 - 1/2 | Seminários em Análises Clínicas II | 06/08/2007 | 18/11/2007 | 30 | 2 | 75 | A | N | Concluída |
| HEP5732 - 9/8 | Bioestatística I (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo) | 06/08/2007 | 10/09/2007 | 30 | 2 | 100 | A | N | Concluída |
| HEP5732 - 9/7 | Bioestatística I (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo) | 06/08/2007 | 10/09/2007 | 30 | 0 | 0 | - | N | Pré - matrícula indeferida |
| FBC5793 - 9/1 | Tópicos em Análises Clínicas I | 23/03/2009 | 05/07/2009 | 30 | 2 | 80 | A | N | Concluída |
| HEP5750 - 5/3 | Bioestatística II (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo) | 14/04/2009 | 26/05/2009 | 45 | 3 | 90 | B | N | Concluída |

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| FBA5728 2/10 | Aprimoramento Didático | | 21/09/2009 | 18/10/2009 | 60 | 4 | 100 | A | N | Concluída |

| | Créditos mínimos exigidos | | Créditos obtidos |
|---|---|---|---|
| | Para exame de qualificação | Para depósito de tese | |
| **Disciplinas:** | 25 | 25 | 33 |
| **Atividades Programadas:** | | | |
| **Seminários:** | | | |
| **Estágios:** | | | |
| **Total:** | 25 | 25 | 33 |

**Créditos Atribuídos à Tese:** 167

**Observações:**

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto no Artigo 66 do Regimento de Pós-Graduação e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 27/11/2006.

**Conceito a partir de 02/01/1997:**

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

**Última ocorrência:** Matrícula de Acompanhamento em 08/02/2010

**Impresso em:** 11/04/10 16:15:09

**ANEXO C** – Currículo Lattes

## Vivian Nogueira Silbiger

Curriculum Vitae

---

**Dados Pessoais**

**Nome:** Vivian Nogueira Silbiger
**Filiação:** Reynaldo Silbiger e Helcy Lylian Nogueira Silbilger
**Nascimento:** 12/10/1983 - São Paulo/SP - Brasil
**Carteira de Identidade:** 300603502 SSP - SP - 28/08/2001
**CPF:** 32160245801

**Endereço residencial:** R. Bazilio da Silva, 209 Ap. 143E
Jd. Monte Alegre - São Paulo
05545 - 010, SP - Brasil
Telefone: 011 34388243
**Endereço profissional:** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Av. Lineu Prestes,580 . Lab. de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico - Bloco 17 superior
Cidade Universitária - Butantã - São Paulo
05508-000, SP - Brasil
Telefone: 011 30913660
**Endereço eletrônico**
e-mail para contato : viviansilbiger@usp.br
e-mail alternativo : viviansilbiger@hotmail.com

---

**Formação Acadêmica/Titulação**

**2006 -2010** Doutorados em Análises Clínicas.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, FCF-USP, Brasil
Título: Transcriptoma e Proteoma em sangue periférico para pesquisa de novos marcadores de doenças cardiovasculares: Estudo em infarto agudo do miocárdio.
Orientador: Mario Hiroyuki Hirata

**2002 – 2005** Graduações em Ciências Biológicas Modalidade Médica.
Universidade de Mogi das Cruzes, UMC, Moji Das Cruzes, Brasil
Título: Trabalho de conclusão de curso: Prevalência de Mutações que Conferem Resistência aos Inibidores da Transcriptase Reversa e da Protease no Vírus HIV-1
Orientador: Adriana Cruvinel Carloni - CRIESP/SP.
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

---

**Formação complementar**

**2008 - 2008** Curso de curta duração em Partek Genomics Suite. King College London, KCL, Inglaterra

**2008 - 2008** Curso de curta duração em Deseño de investigación e análise de datos SPSS. Universidade de Santiago de Compostela, USC, Espanha

**2008 - 2008** Curso de curta duração em Bioinformatica and Functional Genomics. Centro de Investigación del Cáncer, CIC, Espanha

**2008 - 2008** Curso de curta duração em Data Exon 1.0 ST Arrays analisis course. Associazione per la Ricerca Biomedica e Biotecnologia, AIRBB, Itália

**2006 - 2006** Curso de curta duração em I Curso Teórico de Atualização em Biologia Molécula. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, FCF-USP, Brasil

**2006 - 2006** Curso de curta duração em Bionumerics. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, FCF-USP, Brasil

**2006 - 2006** Curso de curta duração em I Curso de Atualização em Biologia Molecular Aplicada ao diagnóstico. Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil

**2004 - 2004** Curso de curta duração em III Curso de Investigação Criminal. Biosciences Assessoria Científica Laboratorial, BIOSCIENCES, Brasil

**2003 - 2003** Curso de curta duração em III Curso à Liga de Genética. Faculdade de Medicina da Universidade de Mogi das Cruzes, UMC, Brasil

**2002 - 2002** Curso de curta duração em II Curso Introdutório à Liga de Neurologia. Universidade de Mogi das Cruzes, UMC, Moji Das Cruzes, Brasil

**2002 - 2002** Curso de curta duração em II Curso Introdutório à Liga de Genética. Universidade de Mogi das Cruzes, UMC, Moji Das Cruzes, Brasil

**2002 - 2002** Curso de curta duração em Curso de Coletas de Materiais Biológicos. NÚCLEO DE APRIMORAMENTO PROFISSIONAL, NAP, Brasil

**2002 - 2002** Curso de curta duração em I Curso de Investigação Criminal. Biosciences Assessoria Científica Laboratorial, BIOSCIENCES, Brasil

---

**Atuação profissional**

## 1. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - FCF-USP

---

**Vínculo institucional**

**2006 - Atual** Vínculo: Aluno de Doutoramento, Enquadramento funcional: Aluno de Doutoramento , Carga horária: 40, Regime: Integral

**2009 - 2009** Vínculo: Estágio, Enquadramento funcional: Programa de Aperfeiçoamento de Ensino PAE,

**2006 – 2006** Vínculo: Aluno de Aprimoramento, Enquadramento funcional: Aluno do programa de Aprimoramento , Carga horária: 40, Regime: Integral

---

**Atividades**

**07/2006 – Atual** Projetos de pesquisa, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

*Participação em projetos:*

*Título: Transcriptoma e Proteoma em sangue periférico para pesquisa de novos marcadores de doenças cardiovasculares: Estudo em Infarto agudo do miocárdio.*

**01/2006 - 07/2006** Pesquisa e Desenvolvimento, Dep. Análises Clínicas e Toxicológicas - Lab. Biol. Molecular e Toxicológicas

*Linhas de Pesquisa:*

*Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico*

## 2. CRIESP- Central de Radioimunoensaio de São Paulo Ltda. - CRIESP

---

**Vínculo institucional**

**2005 - 2005** Vínculos: Estagiário, Enquadramento funcional: Estagiário, Carga horária: 30, Regime: Parcial.

**2005 - 2006** Vínculos: Celetista, Enquadramento funcional: Laboratorista Júnior, Carga horária: 8, Regime: Dedicação Exclusiva

**Atividades**

**12/2005 - 01/2006** Serviço Técnico Especializado, Laboratório de Análises Clínicas- Biologia Molecular

*Especificação:*

*Sequenciamento do Vírus HIV*

**03/2005 - 12/2005** Estágio, Laboratório de Análises Clínicas- Biologia Molecular

*Estágio:*

*Estágio em diagnóstico molecular do HIV.*

## 3. University of Chicago - U.C.

**Vínculo institucional**

**2009 - 2009** Vínculos: Pesquisador visitante, Enquadramento funcional: Pesquisador visitante, Carga horária: 8, Regime: Parcial

## 4. Centro de Investigación Principe Felipe - CIPF

**Vínculo institucional**

**2008 - 2008** Vínculos: Colaborador, Enquadramento funcional: Aluno de doutoramento , Carga horária: 40, Regime: Integral

## 5. Universidade de Santiago de Compostela - USC

**Vínculo institucional**

**2008 - 2009** Vínculos: Colaborador, Enquadramento funcional: Aluno de doutoramento, Carga horária: 40, Regime: Integral

**2007 - 2007** Vínculos: Aluno de doutoramento, Enquadramento funcional: Aluno de doutoramento, Carga horária: 40, Regime: Integral

**2004 - 2005** Vínculos: Estagiário, Enquadramento funcional: Estagiário, Carga horária: 40, Regime: Integral

## 6. Universidade de Mogi das Cruzes - UMC

**Vínculo institucional**

**2003 – 2004** Vínculo: Estagiário , Enquadramento funcional: Bolsista PIBIC , Carga horária: 20, Regime: Parcial

**Atividades**

**01/2003 - 12/2004** Estágio, Centro de Ciências Biomédicas

*Estágio:*

*Estágio na área de Biofísica Molecular*

## 7. FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA - FMVZ

**Vínculo institucional**

**2003 – 2003** Vínculo: Estagiário , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária: 34, Regime: Parcial

**2002 - 2002** Vínculo: Estagiário , Enquadramento funcional: Estagiário , Carga horária: 30, Regime: Parcial

**Linhas de pesquisa**

**1.** Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico

Objetivos:Desenvolver novos marcadores de diagnóstico utilizando métodos de biologia molecular de alto desempenho, como os microarranjos de DNA, MALDI-TOF e SELDI-TOF

**Projetos**

**2006 - Atual** Título: Transcriptoma e Proteoma em sangue periférico para pesquisa de novos marcadores de doenças cardiovasculares: Estudo em Infarto agudo do miocárdio.
Descrição: Projeto que envolve métodos de análise de mRNA e Proteína em larga escala, para a busca de biomarcadores de infarto agudo do miocárdio.
Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa
Alunos envolvidos: Doutorado (2);
Integrantes: Vivian Nogueira Silbiger (Responsável);
Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES

**Áreas de atuação**

**1.** Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico
**2.** Genética Molecular e de Microorganismos
**3.** Bioinformática

**Idiomas**

**Inglês** Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

**Espanhol** Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

**Português** Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

**Prêmios e títulos**

**2009** Melhor Trabalho de Pós-Graduação (Doutorado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**2004** Melhor Trabalho de Iniciação Científica - PIBIQ/CNPq 2004, Universidade de Mogi das Cruzes

**Produção em C, T& A**

## Produção bibliográfica

**Artigos completos publicados em periódicos**

1. Santos, I.C., **SILBIGER, V.N**., Higuchi, D., Gomes, M.A., Barcelos, L.S, Teixeira, M.M., Lopes, M.T.P., Cardoso V. N., Lima, M.P., Araujo, R.C., Pesquero, J.B., Pesquero, J.L.
Angiostatic activity of human plasminogen fragments is highly dependent on glycosylation. Cancer Science. , v.v, p.1 - 7, 2009.

2. Neto, L.G.L., Hirata, R.D.C., Luchessi, A.D., **SILBIGER, V.N**., Pastorelli, C.P., Sampaio, M. F., Armaganijan, D., Rezende, A. A., Doi, S. Q., Hirata, M.H.

Detection of the TLR4 1196C>T polymorphism by mismatched-PCR using plasmid DNA as internal control in RFLP assays. Genetic Testing. , v.13, p.343 - 347, 2009.

3. Souza, E.M., Hirata, R.D.C., Santos, F.C.P., Picciotti, R., Luchessi, A. D., **SILBIGER, V.N**., Rodrigues, A. C., Sampaio, M. F., Armaganijan, D ., Salem, M.H., Doi, S. Q., Hirata, M. H.
Paraxonase polymorphisms are associated with nitrate levels and vascular response in yong adults with myocardial infarctoin. The International Journal of Atherosclerosis (Online). , v.3, p.156 - 154, 2008.

**Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)**

1. Hirata,M. H., Silva, F.A., Neto, L.G. L., Luchessi, A.D., **SILBIGER, V.N**., Rodrigues, A.C., Bertolami, M.C., Tavares, V., Rezende, A. A., Doi, S.Q., Sampaio, M.F., Armaganijan, D ., Hirata, R.D.C.
IL-6 -174G>C gene polymorphism can be a marker of type 2 diabetes mellitus In: AACC Annal Meeting, 2009, Chicago.
**Clinical Chemistry**. Washington: Clinical Chemistry, 2009. v.55. p.A223 - A223

2. **SILBIGER, V.N**., Luchessi, A.D., Neto, L.G.L., Pastorelli, C.P., Sampaio, M.F., Pereira, M.P., Santos, E.S., Armaganijan, D ., Carracedo, A ., Hirata, R.D. C., Hirata, M. H.
mRNA Splicing variants observed in peripheral blood from patient cith acute myocardial infarction In: Simpósio Anual de Pesquisa em Ciências Farmacêuticas, 2009, São Paulo.
**Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2009. v.45. p.73 - 73

3. **SILBIGER, V.N**., Luchessi, A.D., Hirata, R.D. C., Carracedo, A., Brión, M., Neto, L.G. L., Pastorelli, C.P., Dopazo, J., Montaner, D., Garcia, F., Sampaio, M.F., Pereira, M.P., Santos, E.S., Armaganijan, D ., Hirata, M. H.
Peripheral blood cells transcriptome to study new biomarkers for myocardial infarction follow up In: AACC Annual Meeting, 2009, Chicago.
**Clinical Chemistry**. Washington: Clinical Chemistry, 2009. v.55. p.A71 - A71

4. Neto, L.G.L., Hirata, R.D.C., Luchessi, A.D., **SILBIGER, V.N**., Pastorelli, C.P., Sampaio, M.F., Armaganijan, D., Doi, S.Q., Rezende, A.A., Souza, E.B., Sproviere, E.S., Santos, E.S., Pereira, M.P., Hirata, M.H.
TLR2 transcription levels in peripheral blood cells but not TLR4, IL-6 and TNF-alpha is associated with acute myocardial infarction In: AACC Annual Meeting, 2009, Chicago.
**Clinical Chemistry**. Washington: Clinical Chemistry, 2009. v.55. p.A222 - A222

5. Neto, L.G.L., Hirata, R.D.C., Luchessi, A.D., **SILBIGER, V.N**., Doi, S.Q., Rezende, A.A., Armaganijan, D., Sampaio, M.F., Stephano, M.A., Hirata, M.H.
CD14, TLR 2; TLR 4 and IL-6 Gene Polimorphisms may be associated with acute myocardial infarction in young adult patients In: AACC Annual Meeting, 2008
**Clinical Chemistry**. Washington: Clinical Chemistry, 2008. v.54. p.A166 - A166

6. **SILBIGER, V. N.,** Luchessi, A.D., Neto, L.G. L., Pastorelli, C.P., Hirata, R.D. C., Santos, E.S., Sampaio, M.F., Avezum, A., Piegas, L., Quitela, I., Brión, M., Carracedo, A., Montaner, D ., Garcia, F., Dopazo, J., Hirata, M. H.
Functional profiling of the peripheral blood cells transcriptome to study cardiovascular biomarkers In: International Meeting of the Microarray and Gene Expression DATA, 2008, Riva del Garda.
**MEGED11**. , 2008. p.84 - 84

7. Hirata, M.H., Luchessi, A.D., Nomiyama, I. Y., **SILBIGER, V.N**., Neto, L.G.L., Sampaio, M.F., Armaganijan, D., Hirata, R.D.C.
Detection by Real Time PCR of *Streptococcus mutans* in Peripheral blood of Yong Myocardium Infarction Patients In: AACC Annual Meeting, 2007, San Diego.
**Clinical Chemistry**. Washington: Clinical Chemistry, 2007. v.53. p.A55 - A55

8. Hirata, M.H., Seto, M.Y., Hirata, R.D.C., Nishikawa, A.M., Luchessi, A. D., **SILBIGER, V.N.,** Neto, L.G. L., Tubero, V.A., Marcelino, S.L., de Micheli, G.
Evaluation of red complex in Brazilian population carried out periodontal disease by Real time PCR In: AACC Annual Meeting, 2007, San Diego.
**Clinical Chemistry**. Washington: Clinical Chemistry, 2007. v.53. p.A66 - A66

9. **SILBIGER, V.N**., Carloni, A.C, Pradal, M.G.
Genotype diversity of HIV-1 infected patientes form Brazil and its relationship to drug resistance In: AACC Annual Meeting, 2006, Chicago.
**Clinical Chemistry**. Washington: Clinical Chemistry, 2006. v.52.

10. **SILBIGER, V.N**., Carloni, A.C, Pradal, M.G.
Genotypic diversity of Hepatitis C virus in Brazilian patients In: AACC Annual Meetinh, 2006, Chicago.
**Clinical Chemistry**. Washington: Clinical Chemistry, 2006. v.52.

11. **SILBIGER, V.N**., Souza, E.M., Sampaio, M.F., Armaganijan, D., Santos, F.C.P., Luchessi, A.D., Rodrigues, A.C., Hirata, R.D.C., Hirata, M.H.
Paraxonase 1 e 2 como marcadores genético de infarto agudo do miocardio em adultos jovens In: XI SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA, 2006, São Paulo.
**Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêutcas, 2006. v.42.

12. Neto, L.G. L., Luchessi, A.D., **SILBIGER, V.N**., Sampaio, M. F., Armaganijan, D., Hirata, R.D.C., Hirata, M.H.
Polimorfismo do gene TLR2 e sua associação com o infarto agudo do miocárdio em adultos jovens In: XI SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 2006, São Paulo.
**Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2006. v.42.

13. **SILBIGER, V.N.,** Pesquero, J.L., Araujo, R.C., Higuchi, D.
Estudo da atividade anti-angiogênica da proteína recombinante correspondente ao fragmento K (1-3) do plasminogênio humano In: Semana Nacional da Ciência e Tecnologia, 2004, Mogi das Cruzes.
**Anais do VII Congresso de Iniciação Científica**. Mogi das Cruzes: UMC, 2004. p.51 - 51

## Produção Técnica

### Demais produções técnicas

1. SILBIGER, V. N.
**Curso de Extensão "Planejamento de projetos Genômicos, Transcriptômicos e Proteômicos"**, 2009. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

2. SILBIGER, V. N.
**III Curso de Biologia Molecular**, 2009. (Especialização, Curso de curta duração ministrado)

3. SILBIGER, V. N.
**Programa de Graduação FCF-USP: Diagnóstico molecular: técnicas atual**, 2009. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

4. SILBIGER, V. N.
**Programa de Pós-Graduação USP-IDPC: Programa de buscas e estudos de comparação de sequencias polimórficas**, 2009. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

5. SILBIGER, V. N.
**Programa de Pós-Graduação USP-IDPC: Bancos de Dados de genoma, transcriptoma e proteoma**, 2009. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

6. SILBIGER, V. N.
**I Curso de Biologia Molecular**, 2007. (Especialização, Curso de curta duração ministrado)

7. SILBIGER, V. N.
**I Curso de Atualização em Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico**, 2006. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

8. SILBIGER, V. N.
**V Curso de Investigação Científica Criminal**, 2006. (Especialização, Curso de curta duração ministrado)

## Orientações e Supervisões

### Orientações e Supervisões concluídas

**Iniciação científica**

1. Iara Nomiyama. **Detection by Real Time PCR Streptococcus mutans in Peripheral blood of Yong Myocardium Infarction Patient**. 2007. Iniciação científica (Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

**Orientação de outra natureza**

1. Débora Cavichioli. **Programa de Aprimoramento Profissional em Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico**. 2009. Orientação de outra natureza (Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

## Eventos
**Participação em eventos**

1. Apresentação de Pôster / Painel no(a) **17 Simpósio Internacional de Iniciação Científica**, 2009. (Simpósio)
Expressão da caspase 9 em células THP-1 diferenciadas e infectadas com isolados de *Mycobacterium tuberculosis.*

2. Apresentação de Pôster / Painel no(a) **Simpósio Anual de Pesquisa em Ciências Farmacêuticas**, 2009. (Simpósio)
mRNA Variants observed in periopheral blood cells from patient with acute myocardial infarction.

3. **AACC Annual Meeting 2009**, 2009. (Congresso)

4. **I Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Farmácia Área de Análises Clínicas**, 2009. (Simpósio)

5. **VIII Simpósio de Biossegurança e Descartes de Produtos Químicos Perigosos em Instituição de Ensino e Pesquisa**, 2009. (Simpósio)

6. **Pirosequenciamento uma nova abordagem molecular**, 2009. (Seminário)

7. **Seminários Avançados em Tecnologia de Microarray - Hospital Israelita Albert Einstein**, 2009. (Seminário)

8.**11 International Meeting of the Microarray and Gene Expression DATA**, 2008. (Encontro) **(DOC. IX-2.15)**

9. Seminar Series: “Integrated Genomics Seminar” - PRBB Barcelona, 2008. (Seminário)

10. **I Jornada Gallega de Bioinformática**, 2008. (Outra)

11. **"Lípides e Ativação de Processos Inflamatórios no Desenvolvimento da Doença Renal Crônica**, 2007. (Seminário)

12. Apresentação de Pôster / Painel no(a) **XI Semana Farmacêutica de Ciências e Tecnologia**, 2006. (Encontro)
Polimorfismo do gene TLR2 e sua associação co, o infarto agudo do miocárdio em adultos jovens.

13. Apresentação de Pôster / Painel no(a) **XI Semana Farmacêutica de Ciências e Tecnologia**, 2006. (Encontro)
Paraxonase 1 e 2 como marcadores genético de infarto agudo do miocárdio em adultos jovens.

14. **VI Simpósio de Biossegurança e Descartes de Produtos Químicos Perigosos em Instituição de Ensino e Pesquisa**, 2006. (Simpósio)

15. **"The impossible dream: major discoveries in medicinal and biological chemistry"**, 2006. (Seminário)

16. **"Inflammation as pathogenic cause in cardiovascular diseases"**, 2006. (Seminário)

17. **"Cloning and Gene Expression Techniques: Fundamentals and Applications"**, 2006. (Simpósio)

18. Apresentação de Pôster / Painel no(a) **57º Reunião Anual da SBPC**, 2005. (Encontro)
"Estuda da atividade anti-angiogênica da proteína recombinante correspondente ao fragmento K1-3 do plasminogênio humano".

19. **V Simpósio de Biossegurança e Descartes de Produtos Químicos Perigosos em Instituições de Ensino e Pesquisa**, 2005. (Oficina)

20. Apresentação de Pôster / Painel no(a) **Semana Nacional de Ciência e Tecnologia**, 2004. (Encontro)
Estudo da atividade anti-angiogênica da proteína recombinante correspondente ao fragmento K (1-3) do plasminogênio humano.

21. Apresentação de Pôster / Painel no(a) **XIX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE**, 2004. (Congresso)
Estudo da atividade anti-angiogênica da proteína recombinante correspondente ao fragmento K(1-3) do plasminogênio humano.

21. **38 Congresso Brasileiro de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial**, 2004. (Congresso)

22. **XIX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE**, 2004. (Congresso)

23. **III Jornada de Atualização em Genética**, 2004. (Outra)

24. **II Simpósio Paulista de Doença de Depósitos Lisossômico**, 2004. (Simpósio)

25. **I Jornada de Toxicologia Clínica**, 2003. (Outra)

26. **II Jornada de Atualização em Genética**, 2003. (Outra)

27. **I JORNADA DE ATUALIZAÇÃO EM GENÉTICA**, 2002. (Outra)

**Organização de evento**

1. SILBIGER, V. N.
**XV Congresso Paulista de Farmacêuticos VII Seminário Internacional de Farmacêuticos**, 2007. (Congresso, Organização de evento)

2. SILBIGER, V. N.
**Curso Análise do DNA**, 2002. (Outro, Organização de evento)

3. SILBIGER, V. N.
**Curso Haplótipos e Polimorfismos Genéticos**, 2002. (Outro, Organização de evento)

4. SILBIGER, V. N.
**VII Congresso Acadêmico de Biomedicina e XXI Semana Paulista de Biomedicina**, 2002. (Congresso, Organização de evento)

## ANEXO D

Tabela 1. Genes diferencialmente expressos entre 1º IAM T2 versus GC. Genes ordenados de modo crescente de acordo com *Fold Change*.

| ACC | Gene | CytoBand | Descrição | FC | *p*-valor |
|---|---|---|---|---|---|
| NM_002104 | GZMK | 5q11-q12 | granzyme K (granzyme 3; tryptase II) | -2,04 | 0,00008 |
| NM_001004310 | FCRL6 | 1q23.2 | Fc receptor-like 6 | -1,95 | 0,00003 |
| NM_001335 | CTSW | 11q13.1 | cathepsin W | -1,85 | 0,00001 |
| NM_005601 | NKG7 | 19q13.33 | natural killer cell group 7 sequence | -1,73 | 0,00000 |
| NM_021181 | SLAMF7 | 1q23.1-q24.1 | SLAM family member 7 | -1,73 | 0,00001 |
| NM_001337 | CX3CR1 | 3p21\|3p21.3 | chemokine (C-X3-C motif) receptor 1 | -1,72 | 0,00000 |
| NM_006056 | NMUR1 | 2q37.1 | neuromedin U receptor 1 | -1,61 | 0,00013 |
| NM_005442 | EOMES | 3p21.3-p21.2 | eomesodermin homolog (Xenopus laevis) | -1,61 | 0,00066 |
| NM_018667 | SMPD3 | 16q22.1 | sphingomyelin phosphodiesterase 3, neutral membrane (neutral sphingomyelinase II) | -1,60 | 0,00005 |
| NM_153837 | GPR114 | 16q13 | G protein-coupled receptor 114 | -1,51 | 0,00001 |
| NM_175744 | RHOC | 1p13.1 | ras homolog gene family, member C | -1,49 | 0,00001 |
| NM_024841 | FLJ14213 | 11p13-p12 | protor-2 | -1,47 | 0,00002 |
| NM_052939 | FCRL3 | 1q21-q22 | Fc receptor-like 3 | -1,41 | 0,00028 |
| NM_000878 | IL2RB | 22q13\|22q13.1 | interleukin 2 receptor, beta | -1,41 | 0,00007 |
| NM_000564 | IL5RA | 3p26-p24 | interleukin 5 receptor, alpha | -1,41 | 0,00075 |
| NA | NA | NA | NA | -1,36 | 0,00018 |
| NM_012483 | GNLY | 2p11.2 | granulysin | -1,34 | 0,00058 |
| NM_000713 | BLVRB | 19q13.1-q13.2 | biliverdin reductase B (flavin reductase (NADPH)) | -1,32 | 0,00061 |
| NM_173799 | VSTM3 | 3q13.31 | V-set and transmembrane domain containing 3 | -1,32 | 0,00028 |
| NM_002346 | LY6E | 8q24.3 | lymphocyte antigen 6 complex, locus E | -1,29 | 0,00014 |
| NM_005810 | KLRG1 | 12p12-p13 | killer cell lectin-like receptor subfamily G, member 1 | -1,28 | 0,00021 |
| NM_001002841 | MYL4 | 17q21-qter | myosin, light chain 4, alkali; atrial, embryonic | -1,27 | 0,00044 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| NM_001078177 | SLC29A1 | 6p21.2-p21.1 | solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 1 | -1,27 | 0,00012 |
| NM_175039 | ST6GALNAC4 | 9q34 | ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 4 | -1,27 | 0,00008 |
| NM_004356 | CD81 | 11p15.5 | CD81 molecule | -1,25 | 0,00015 |
| NA | NA | NA | NA | -1,22 | 0,00001 |
| NM_016428 | ABI3 | 17q21.3 | ABI gene family, member 3 | -1,21 | 0,00012 |
| NM_002101 | GYPC | 2q14-q21 | glycophorin C (Gerbich blood group) | -1,21 | 0,00089 |
| NM_002985 | CCL5 | 17q11.2-q12 | chemokine (C-C motif) ligand 5 | -1,20 | 0,00003 |
| NA | NA | NA | NA | -1,18 | 0,00009 |
| NM_004219 | PTTG1 | 5q35.1 | pituitary tumor-transforming 1 | -1,18 | 0,00008 |
| NM_000858 | GUK1 | 1q32-q41 | guanylate kinase 1 | -1,18 | 0,00005 |
| NA | NA | NA | NA | -1,17 | 0,00002 |
| NM_033518 | SLC38A5 | Xp11.23 | solute carrier family 38, member 5 | -1,16 | 0,00003 |
| NM_001077350 | C16orf35 | 16p13.3 | chromosome 16 open reading frame 35 | -1,16 | 0,00020 |
| NA | NA | NA | NA | -1,16 | 0,00002 |
| NA | NA | NA | NA | -1,16 | 0,00004 |
| NM_004957 | FPGS | 9q34.1 | folylpolyglutamate synthase | -1,16 | 0,00033 |
| NM_005628 | SLC1A5 | 19q13.3 | solute carrier family 1 (neutral amino acid transporter), member 5 | -1,15 | 0,00036 |
| NM_003656 | CAMK1 | 3p25.3 | calcium/calmodulin-dependent protein kinase I | -1,14 | 0,00040 |
| NM_005809 | PRDX2 | 19p13.2 | peroxiredoxin 2 | -1,14 | 0,00041 |
| NM_001504 | CXCR3 | Xq13 | chemokine (C-X-C motif) receptor 3 | -1,10 | 0,00023 |
| NM_152607 | C1orf177 | 1p32.3 | chromosome 1 open reading frame 177 | -1,10 | 0,00049 |
| NM_147130 | NCR3 | 6p21.3 | natural cytotoxicity triggering receptor 3 | -1,08 | 0,00054 |
| NM_005608 | PTPRCAP | 11q13.3 | protein tyrosine phosphatase, receptor type, C-associated protein | -1,07 | 0,00068 |
| NM_024070 | PVRIG | 7q22.1 | poliovirus receptor related immunoglobulin domain containing | -1,06 | 0,00077 |
| NM_001400 | S1PR1 | 1p21 | sphingosine-1-phosphate receptor 1 | -1,06 | 0,00083 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| NA | NA | NA | NA | -1,06 | 0,00049 |
| NM_003863 | DPM2 | 9q34.13 | dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 2, regulatory subunit | -1,04 | 0,00053 |
| NM_001031680 | RUNX3 | 1p36 | runt-related transcription factor 3 | -1,04 | 0,00064 |
| NM_003132 | SRM | 1p36-p22 | spermidine synthase | -1,03 | 0,00077 |
| NM_021805 | SIGIRR | 11p15.5 | single immunoglobulin and toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain | -1,03 | 0,00059 |
| NM_012171 | TSPAN17 | 5q35.3 | tetraspanin 17 | -1,02 | 0,00059 |
| NM_001841 | CNR2 | 1p36.11 | cannabinoid receptor 2 (macrophage) | -1,02 | 0,00028 |
| NM_030914 | URM1 | 9q34.11 | ubiquitin related modifier 1 homolog (S. cerevisiae) | -1,02 | 0,00013 |
| NM_015275 | KIAA1033 | 12q24.11 | KIAA1033 | 1,00 | 0,00003 |
| NM_004755 | RPS6KA5 | 14q31-q32.1 | ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 5 | 1,00 | 0,00020 |
| NM_030769 | NPL | 1q25 | N-acetylneuraminate pyruvate lyase (dihydrodipicolinate synthase) | 1,01 | 0,00003 |
| NM_032900 | ARHGAP19 | 10q24.1 | Rho GTPase activating protein 19 | 1,01 | 0,00015 |
| NM_013450 | BAZ2B | 2q23-q24 | bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2B | 1,01 | 0,00001 |
| NM_016143 | NSFL1C | 20p13 | NSFL1 (p97) cofactor (p47) | 1,01 | 0,00032 |
| NM_152624 | DCP2 | 5q22.2 | DCP2 decapping enzyme homolog (S. cerevisiae) | 1,01 | 0,00004 |
| NM_004580 | RAB27A | 15q15-q21.1 | RAB27A, member RAS oncogene family | 1,01 | 0,00014 |
| NM_001511 | CXCL1 | 4q21 | chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha) | 1,02 | 0,00027 |
| NM_175854 | PAN3 | 13q12.2 | PAN3 polyA specific ribonuclease subunit homolog (S. cerevisiae) | 1,02 | 0,00026 |
| NM_004859 | CLTC | 17q11-qter | clathrin, heavy chain (Hc) | 1,02 | 0,00052 |
| NM_017771 | PXK | 3p14.3 | PX domain containing serine/threonine kinase | 1,02 | 0,00008 |
| NM_018643 | TREM1 | 6p21.1 | triggering receptor expressed on myeloid cells 1 | 1,02 | 0,00023 |
| NM_003010 | MAP2K4 | 17p11.2 | mitogen-activated protein kinase kinase 4 | 1,02 | 0,00007 |
| NM_032303 | HSDL2 | 9q32 | hydroxysteroid dehydrogenase like 2 | 1,02 | 0,00041 |
| NM_177924 | ASAH1 | 8p22-p21.3 | N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase) 1 | 1,02 | 0,00003 |
| NM_006469 | IVNS1ABP | 1q25.1-q31.1 | influenza virus NS1A binding protein | 1,03 | 0,00000 |
| NM_001001664 | SPOPL | 2q22.1 | speckle-type POZ protein-like | 1,03 | 0,00058 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| NM_181717 | HCG27 | 6p21.33 | HLA complex group 27 | 1,03 | 0,00008 |
| NM_002923 | RGS2 | 1q31 | regulator of G-protein signaling 2, 24kDa | 1,03 | 0,00021 |
| ENST00000292369 | tcag7.1177 | 7q22.1 | opposite strand transcription unit to STAG3 | 1,03 | 0,00002 |
| NM_006549 | CAMKK2 | 12q24.2 | calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, beta | 1,03 | 0,00040 |
| NM_138782 | FCHO2 | 5q13.2 | FCH domain only 2 | 1,03 | 0,00051 |
| NM_203351 | MAP3K3 | 17q23.3 | mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3 | 1,03 | 0,00007 |
| NM_004330 | BNIP2 | 15q22.2 | BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 2 | 1,04 | 0,00076 |
| NM_031916 | ROPN1L | 5p15.2 | ropporin 1-like | 1,04 | 0,00084 |
| NM_031925 | TMEM120A | 7q11.23 | transmembrane protein 120A | 1,04 | 0,00008 |
| NM_020856 | TSHZ3 | 19q12 | teashirt zinc finger homeobox 3 | 1,04 | 0,00033 |
| NM_145309 | LRRC51 | 11q13.4 | leucine rich repeat containing 51 | 1,04 | 0,00008 |
| NM_178460 | SIRPD | 20p13 | signal-regulatory protein delta | 1,04 | 0,00010 |
| NM_024586 | OSBPL9 | 1p32.3 | oxysterol binding protein-like 9 | 1,04 | 0,00001 |
| NM_014873 | LPGAT1 | 1q32 | lysophosphatidylglycerol acyltransferase 1 | 1,04 | 0,00000 |
| NM_030759 | NRBF2 | 10q21.2 | nuclear receptor binding factor 2 | 1,05 | 0,00083 |
| NM_007296 | BRCA1 | 17q21 | breast cancer 1, early onset | 1,05 | 0,00002 |
| NM_033397 | KIAA1754 | 10q25.1 | KIAA1754 | 1,05 | 0,00024 |
| NM_014912 | CPEB3 | 10q23.32 | cytoplasmic polyadenylation element binding protein 3 | 1,05 | 0,00021 |
| NM_012198 | GCA | 2q24.2 | grancalcin, EF-hand calcium binding protein | 1,06 | 0,00017 |
| NM_024617 | ZCCHC6 | 9q21 | zinc finger, CCHC domain containing 6 | 1,06 | 0,00017 |
| NM_005472 | KCNE3 | 11q13-q14 | potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 3 | 1,06 | 0,00007 |
| NM_182485 | CPEB2 | 4p15.33 | cytoplasmic polyadenylation element binding protein 2 | 1,06 | 0,00003 |
| NM_000256 | MYBPC3 | 11p11.2 | myosin binding protein C, cardiac | 1,06 | 0,00069 |
| NM_024537 | CARS2 | 13q34 | cysteinyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial (putative) | 1,06 | 0,00010 |
| NM_021255 | PELI2 | 14q21 | pellino homolog 2 (Drosophila) | 1,06 | 0,00021 |
| NM_012229 | NT5C2 | 10q24.32-q24.33 | 5'-nucleotidase, cytosolic II | 1,06 | 0,00042 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| NM_178169 | RASSF3 | 12q14.2 | Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 3 | 1,06 | 0,00003 |
| NM_006608 | PHTF1 | 1p13 | putative homeodomain transcription factor 1 | 1,06 | 0,00099 |
| NM_006519 | DYNLT1 | 6q25.2-q25.3 | dynein, light chain, Tctex-type 1 | 1,06 | 0,00001 |
| NM_002296 | LBR | 1q42.1 | lamin B receptor | 1,06 | 0,00002 |
| NA | NA | NA | NA | 1,07 | 0,00078 |
| NM_183013 | CREM | 10p11.21 | cAMP responsive element modulator | 1,07 | 0,00064 |
| NM_015295 | SMCHD1 | 18p11.32 | structural maintenance of chromosomes flexible hinge domain containing 1 | 1,07 | 0,00009 |
| NM_001045556 | SLA | 8q22.3-qter\|8q24 | Src-like-adaptor | 1,07 | 0,00033 |
| NM_024874 | KIAA0319L | 1p34.2 | KIAA0319-like | 1,07 | 0,00044 |
| NM_004664 | LIN7A | 12q21 | lin-7 homolog A (C. elegans) | 1,08 | 0,00026 |
| NM_017917 | PPP2R3C | 14q13.2 | protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B", gamma | 1,08 | 0,00033 |
| NM_022473 | ZFP106 | 15q15.1 | zinc finger protein 106 homolog (mouse) | 1,08 | 0,00011 |
| NM_005802 | TOPORS | 9p21 | topoisomerase I binding, arginine/serine-rich | 1,08 | 0,00089 |
| NM_182914 | SYNE2 | 14q23.2 | spectrin repeat containing, nuclear envelope 2 | 1,08 | 0,00038 |
| NM_001039590 | USP9X | Xp11.4 | ubiquitin specific peptidase 9, X-linked | 1,08 | 0,00015 |
| NM_152581 | MOSPD2 | Xp22.2 | motile sperm domain containing 2 | 1,08 | 0,00007 |
| NM_153810 | C10orf46 | 10q26.11 | chromosome 10 open reading frame 46 | 1,08 | 0,00002 |
| NM_001047605 | KIR3DX1 | 19q13.42 | killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, X1 | 1,09 | 0,00025 |
| NM_016951 | CKLF | 16q21 | chemokine-like factor | 1,09 | 0,00025 |
| NM_005406 | ROCK1 | 18q11.1 | Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1 | 1,09 | 0,00097 |
| NM_138340 | ABHD3 | 18q11.2 | abhydrolase domain containing 3 | 1,09 | 0,00002 |
| NM_023003 | TM6SF1 | 15q24-q26 | transmembrane 6 superfamily member 1 | 1,09 | 0,00034 |
| NM_018169 | C12orf35 | 12p11.21 | chromosome 12 open reading frame 35 | 1,10 | 0,00000 |
| NR_004854 | AMN1 | 12p11.21 | antagonist of mitotic exit network 1 homolog (S. cerevisiae) | 1,10 | 0,00016 |
| NM_032900 | ARHGAP19 | 10q24.1 | Rho GTPase activating protein 19 | 1,10 | 0,00050 |
| NA | NA | NA | NA | 1,10 | 0,00012 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| NM_014089 | NUPL1 | 13q12.13 | nucleoporin like 1 | 1,10 | 0,00014 |
| NM_007166 | PICALM | 11q14 | phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein | 1,10 | 0,00012 |
| NM_173496 | MPP7 | 10p11.23 | membrane protein, palmitoylated 7 (MAGUK p55 subfamily member 7) | 1,10 | 0,00005 |
| NM_017905 | TMCO3 | 13q34 | transmembrane and coiled-coil domains 3 | 1,10 | 0,00021 |
| NM_203301 | FBXO33 | 14q21.1 | F-box protein 33 | 1,10 | 0,00001 |
| NM_013448 | BAZ1A | 14q12-q13 | bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1A | 1,10 | 0,00006 |
| NM_144687 | NLRP12 | 19q13.41 | NLR family, pyrin domain containing 12 | 1,10 | 0,00086 |
| NM_005964 | MYH10 | 17p13 | myosin, heavy chain 10, non-muscle | 1,10 | 0,00012 |
| NM_024669 | ANKRD55 | 5q11.2 | ankyrin repeat domain 55 | 1,11 | 0,00036 |
| NM_000720 | CACNA1D | 3p14.3 | calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1D subunit | 1,11 | 0,00036 |
| NM_003864 | SAP30 | 4q34.1 | Sin3A-associated protein, 30kDa | 1,11 | 0,00026 |
| NM_015473 | HEATR5A | 14q12 | HEAT repeat containing 5A | 1,11 | 0,00073 |
| NM_022977 | ACSL4 | Xq22.3-q23 | acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 | 1,12 | 0,00013 |
| BC008651 | MGC9913 | 19q13.43 | hypothetical protein MGC9913 | 1,12 | 0,00063 |
| NM_023037 | FRY | 13q13.1 | furry homolog (Drosophila) | 1,12 | 0,00036 |
| NM_005573 | LMNB1 | 5q23.3-q31.1 | lamin B1 | 1,12 | 0,00007 |
| NM_003953 | MPZL1 | 1q24.2 | myelin protein zero-like 1 | 1,12 | 0,00036 |
| NM_002294 | LAMP2 | Xq24 | lysosomal-associated membrane protein 2 | 1,12 | 0,00015 |
| NM_052897 | MBD6 | --- | methyl-CpG binding domain protein 6 | 1,12 | 0,00006 |
| NM_002956 | CLIP1 | 12q24.3 | CAP-GLY domain containing linker protein 1 | 1,12 | 0,00006 |
| NA | NA | NA | NA | 1,12 | 0,00026 |
| NM_138799 | MBOAT2 | 2p25.1 | membrane bound O-acyltransferase domain containing 2 | 1,13 | 0,00016 |
| NM_001776 | ENTPD1 | 10q24 | ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 | 1,13 | 0,00018 |
| NM_003621 | PPFIBP2 | 11p15.4 | PTPRF interacting protein, binding protein 2 (liprin beta 2) | 1,13 | 0,00063 |
| NM_020803 | KLHL8 | 4q22.1 | kelch-like 8 (Drosophila) | 1,13 | 0,00015 |
| NM_024677 | NSUN7 | 4p14 | NOL1/NOP2/Sun domain family, member 7 | 1,13 | 0,00030 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| NM_001085386 | NF-E4 | 7q22.1 | transcription factor NF-E4 | 1,13 | 0,00012 |
| NM_052957 | ACRC | Xq13.1 | acidic repeat containing | 1,14 | 0,00060 |
| NM_006256 | PKN2 | 1p22.2 | protein kinase N2 | 1,14 | 0,00000 |
| NA | NA | NA | NA | 1,14 | 0,00082 |
| NM_017851 | PARP16 | 15q22.31 | poly (ADP-ribose) polymerase family, member 16 | 1,14 | 0,00008 |
| NM_033334 | NR6A1 | 9q33-q34.1 | nuclear receptor subfamily 6, group A, member 1 | 1,14 | 0,00004 |
| NM_002392 | MDM2 | 12q14.3-q15 | Mdm2 p53 binding protein homolog (mouse) | 1,14 | 0,00006 |
| NM_017762 | MTMR10 | 15q13.3 | myotubularin related protein 10 | 1,15 | 0,00001 |
| NM_152271 | LONRF1 | 8p23.1 | LON peptidase N-terminal domain and ring finger 1 | 1,15 | 0,00003 |
| NM_144649 | TMEM71 | 8q24.22 | transmembrane protein 71 | 1,15 | 0,00001 |
| NM_020960 | GPR107 | 9q34.11 | G protein-coupled receptor 107 | 1,15 | 0,00017 |
| NM_020531 | C20orf3 | 20p11.22-p11.21 | chromosome 20 open reading frame 3 | 1,15 | 0,00026 |
| NM_012215 | MGEA5 | 10q24.1-q24.3 | meningioma expressed antigen 5 (hyaluronidase) | 1,15 | 0,00001 |
| NM_014465 | SULT1B1 | 4q13.3 | sulfotransferase family, cytosolic, 1B, member 1 | 1,16 | 0,00043 |
| NM_006243 | PPP2R5A | 1q32.2-q32.3 | protein phosphatase 2, regulatory subunit B', alpha isoform | 1,16 | 0,00012 |
| NM_003101 | SOAT1 | 1q25 | sterol O-acyltransferase (acyl-Coenzyme A: cholesterol acyltransferase) 1 | 1,16 | 0,00000 |
| NM_014247 | RAPGEF2 | 4q32.1 | Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2 | 1,16 | 0,00002 |
| NM_018590 | CSGALNACT2 | 10q11.21 | chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 2 | 1,16 | 0,00007 |
| NM_003824 | FADD | 11q13.3 | Fas (TNFRSF6)-associated via death domain | 1,16 | 0,00001 |
| NM_198082 | CCDC57 | 17q25.3 | coiled-coil domain containing 57 | 1,16 | 0,00000 |
| NM_000158 | GBE1 | 3p12.3 | glucan (1,4-alpha-), branching enzyme 1 (glycogen branching enzyme, Andersen disease, glycogen storage disease type IV) | 1,16 | 0,00000 |
| NA | NA | NA | NA | 1,17 | 0,00023 |
| NM_021958 | HLX | 1q41-q42.1 | H2.0-like homeobox | 1,17 | 0,00081 |
| NM_000608 | ORM2 | 9q32 | orosomucoid 2 | 1,17 | 0,00015 |
| NM_006609 | MAP3K2 | 2q14.3 | mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2 | 1,17 | 0,00003 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| NA | NA | NA | NA | 1,17 | 0,00014 |
| NM_012331 | MSRA | 8p23.1 | methionine sulfoxide reductase A | 1,17 | 0,00008 |
| NM_000328 | RPGR | Xp11.4 | retinitis pigmentosa GTPase regulator | 1,18 | 0,00022 |
| BC101349 | C20orf197 | 20q13.33 | chromosome 20 open reading frame 197 | 1,18 | 0,00002 |
| NM_005479 | FRAT1 | 10q24.1 | frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas | 1,18 | 0,00035 |
| NM_138554 | TLR4 | 9q32-q33 | toll-like receptor 4 | 1,18 | 0,00024 |
| NM_024829 | FLJ22662 | 12p13.1 | hypothetical protein FLJ22662 | 1,18 | 0,00005 |
| NM_004685 | MTMR6 | 13q12 | myotubularin related protein 6 | 1,18 | 0,00011 |
| NM_003626 | PPFIA1 | 11q13.3 | protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF), interacting protein (liprin), alpha 1 | 1,18 | 0,00002 |
| NM_006260 | DNAJC3 | 13q32 | DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3 | 1,18 | 0,00040 |
| NM_022457 | RFWD2 | 1q25.1-q25.2 | ring finger and WD repeat domain 2 | 1,19 | 0,00016 |
| NM_025137 | SPG11 | 15q14 | spastic paraplegia 11 (autosomal recessive) | 1,19 | 0,00060 |
| NM_022113 | KIF13A | 6p23 | kinesin family member 13A | 1,19 | 0,00009 |
| NM_016018 | PHF20L1 | 8q24.22 | PHD finger protein 20-like 1 | 1,19 | 0,00000 |
| NM_002863 | PYGL | 14q21-q22 | phosphorylase, glycogen; liver (Hers disease, glycogen storage disease type VI) | 1,19 | 0,00069 |
| NM_001013618 | IGLL3 | 22q11.2\|22q11.23 | immunoglobulin lambda-like polypeptide 3 | 1,19 | 0,00064 |
| NM_021250 | LILRA5 | 19q13.4 | leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 5 | 1,19 | 0,00029 |
| NM_153261 | TMEM188 | 16q12.1 | transmembrane protein 188 | 1,19 | 0,00000 |
| NM_033274 | ADAM19 | 5q32-q33 | ADAM metallopeptidase domain 19 (meltrin beta) | 1,19 | 0,00034 |
| NM_015364 | LY96 | 8q21.11 | lymphocyte antigen 96 | 1,19 | 0,00046 |
| NM_024607 | PPP1R3B | 8p23.1 | protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3B | 1,20 | 0,00023 |
| NM_006939 | SOS2 | 14q21 | son of sevenless homolog 2 (Drosophila) | 1,20 | 0,00013 |
| NM_024940 | DOCK5 | 8p21.2 | dedicator of cytokinesis 5 | 1,20 | 0,00003 |
| NM_000259 | MYO5A | 15q21 | myosin VA (heavy chain 12, myoxin) | 1,21 | 0,00000 |
| NM_006152 | LRMP | 12p12.1 | lymphoid-restricted membrane protein | 1,21 | 0,00000 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| NM_145170 | TTC18 | 10q22.2 | tetratricopeptide repeat domain 18 | 1,21 | 0,00009 |
| NM_139247 | ADCY4 | 14q12 | adenylate cyclase 4 | 1,21 | 0,00008 |
| NM_018349 | MCTP2 | 15q26.2 | multiple C2 domains, transmembrane 2 | 1,21 | 0,00024 |
| NM_144579 | SFXN5 | --- | sideroflexin 5 | 1,21 | 0,00000 |
| NM_004968 | ICA1 | 7p22 | islet cell autoantigen 1, 69kDa | 1,21 | 0,00004 |
| NA | NA | NA | NA | 1,21 | 0,00004 |
| NM_021244 | RRAGD | 6q15-q16 | Ras-related GTP binding D | 1,21 | 0,00011 |
| NM_001433 | ERN1 | 17q24.2 | endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1 | 1,21 | 0,00002 |
| NM_181784 | SPRED2 | 2p14 | sprouty-related, EVH1 domain containing 2 | 1,22 | 0,00004 |
| NM_024717 | MCTP1 | 5q15 | multiple C2 domains, transmembrane 1 | 1,22 | 0,00012 |
| NM_003059 | SLC22A4 | 5q31.1 | solute carrier family 22 (organic cation/ergothioneine transporter), member 4 | 1,22 | 0,00015 |
| NM_004665 | VNN2 | 6q23-q24 | vanin 2 | 1,22 | 0,00000 |
| NM_152230 | IPMK | 10q21.1 | inositol polyphosphate multikinase | 1,22 | 0,00013 |
| NM_181861 | APAF1 | 12q23 | apoptotic peptidase activating factor 1 | 1,23 | 0,00001 |
| NM_000632 | ITGAM | 16p11.2 | integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit) | 1,23 | 0,00064 |
| NM_014982 | PCNX | 14q24.2 | pecanex homolog (Drosophila) | 1,23 | 0,00007 |
| AJ420442 | C9orf164 | 9q22.2 | chromosome 9 open reading frame 164 | 1,23 | 0,00003 |
| NM_002032 | FTH1 | 11q13 | ferritin, heavy polypeptide 1 | 1,23 | 0,00001 |
| NM_019065 | NECAB2 | 16q23.3 | N-terminal EF-hand calcium binding protein 2 | 1,23 | 0,00019 |
| NM_003111 | SP3 | 2q31 | Sp3 transcription factor | 1,23 | 0,00018 |
| NM_005391 | PDK3 | Xp22.11 | pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 3 | 1,23 | 0,00001 |
| NM_030962 | SBF2 | 11p15.4 | SET binding factor 2 | 1,24 | 0,00008 |
| NM_032138 | KBTBD7 | 13q14.11 | kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 7 | 1,24 | 0,00007 |
| NM_005688 | ABCC5 | 3q27 | ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5 | 1,24 | 0,00000 |
| BC093004 | C18orf32 | 18q21.1 | chromosome 18 open reading frame 32 | 1,24 | 0,00003 |
| NM_019053 | EXOC6 | 10q23.33 | exocyst complex component 6 | 1,24 | 0,00007 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| BC017297 | FAM49B | 8q24.21 | family with sequence similarity 49, member B | 1,25 | 0,00001 |
| NM_002759 | EIF2AK2 | 2p22-p21 | eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2 | 1,25 | 0,00040 |
| NM_001037343 | CDKL5 | Xp22 | cyclin-dependent kinase-like 5 | 1,25 | 0,00009 |
| NM_014916 | LMTK2 | 7q21.3 | lemur tyrosine kinase 2 | 1,25 | 0,00006 |
| NM_198507 | TMEM157 | 5q21.1 | transmembrane protein 157 | 1,25 | 0,00003 |
| NM_007246 | KLHL2 | 4q21.2 | kelch-like 2, Mayven (Drosophila) | 1,26 | 0,00060 |
| NM_003933 | BAIAP3 | 16p13.3 | BAI1-associated protein 3 | 1,26 | 0,00088 |
| NM_015054 | UHRF1BP1L | 12q23.1 | UHRF1 (ICBP90) binding protein 1-like | 1,26 | 0,00000 |
| NM_207366 | SEPT14 | 7p11.2 | septin 14 | 1,26 | 0,00000 |
| NM_015087 | SPG20 | 13q13.3 | spastic paraplegia 20 (Troyer syndrome) | 1,26 | 0,00053 |
| NM_006915 | RP2 | Xp11.4-p11.21 | retinitis pigmentosa 2 (X-linked recessive) | 1,27 | 0,00004 |
| NM_000875 | IGF1R | 15q26.3 | insulin-like growth factor 1 receptor | 1,27 | 0,00011 |
| NM_020741 | KIAA1257 | 3q21.3 | KIAA1257 | 1,27 | 0,00001 |
| NM_032831 | ORAI2 | 7q22.1 | ORAI calcium release-activated calcium modulator 2 | 1,28 | 0,00024 |
| NM_003971 | SPAG9 | 17q21.33 | sperm associated antigen 9 | 1,28 | 0,00001 |
| NM_004183 | BEST1 | 11q13 | bestrophin 1 | 1,28 | 0,00013 |
| BC021569 | MGC31957 | 8p21.2 | hypothetical protein MGC31957 | 1,28 | 0,00007 |
| AY139008 | C5orf41 | 5q35.2 | chromosome 5 open reading frame 41 | 1,28 | 0,00003 |
| NA | NA | NA | NA | 1,29 | 0,00009 |
| NM_000876 | IGF2R | 6q26 | insulin-like growth factor 2 receptor | 1,29 | 0,00012 |
| NM_180991 | SLCO4C1 | 5q21.2 | solute carrier organic anion transporter family, member 4C1 | 1,29 | 0,00000 |
| NM_001550 | IFRD1 | 7q22-q31 | interferon-related developmental regulator 1 | 1,30 | 0,00000 |
| NM_005213 | CSTA | 3q21 | cystatin A (stefin A) | 1,30 | 0,00093 |
| NM_203391 | GK | Xp21.3 | glycerol kinase | 1,30 | 0,00006 |
| NM_016006 | ABHD5 | 3p21 | abhydrolase domain containing 5 | 1,30 | 0,00002 |
| NM_002493 | NDUFB6 | 9p21.1 | NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 6, 17kDa | 1,30 | 0,00008 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| NM_006954 | ZNF33A | 10p11.2 | zinc finger protein 33A | 1,31 | 0,00037 |
| BC066975 | C3orf25 | 3q21.3 | chromosome 3 open reading frame 25 | 1,31 | 0,00001 |
| NM_031412 | GABARAPL1 | 12p13.2 | GABA(A) receptor-associated protein like 1 | 1,32 | 0,00002 |
| NM_020762 | SRGAP1 | 12q14.2 | SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 1 | 1,32 | 0,00014 |
| NM_032717 | AGPAT9 | 4q21.23 | 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 9 | 1,32 | 0,00004 |
| NM_130469 | JDP2 | 14q24.3 | Jun dimerization protein 2 | 1,32 | 0,00008 |
| NM_177980 | CDH26 | 20q13.2-q13.33 | cadherin-like 26 | 1,32 | 0,00001 |
| NM_024762 | ZNF552 | 19q13.43 | zinc finger protein 552 | 1,32 | 0,00001 |
| NM_080491 | GAB2 | 11q14.1 | GRB2-associated binding protein 2 | 1,33 | 0,00003 |
| NM_012482 | ZNF281 | 1q32.1 | zinc finger protein 281 | 1,33 | 0,00000 |
| NM_003137 | SRPK1 | 6p21.3-p21.2 | SFRS protein kinase 1 | 1,33 | 0,00013 |
| NA | NA | NA | NA | 1,34 | 0,00023 |
| NM_006459 | ERLIN1 | 10q21-q22 | ER lipid raft associated 1 | 1,34 | 0,00012 |
| NM_000651 | CR1 | 1q32 | complement component (3b/4b) receptor 1 (Knops blood group) | 1,34 | 0,00047 |
| NM_014991 | WDFY3 | 4q21.23 | WD repeat and FYVE domain containing 3 | 1,34 | 0,00025 |
| NM_012413 | QPCT | 2p22.2 | glutaminyl-peptide cyclotransferase (glutaminyl cyclase) | 1,34 | 0,00001 |
| NM_001995 | ACSL1 | 4q34-q35 | acyl-CoA synthetase long-chain family member 1 | 1,35 | 0,00072 |
| NM_032294 | CAMKK1 | 17p13.2 | calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 1, alpha | 1,35 | 0,00001 |
| NM_052889 | COP1 | --- | caspase-1 dominant-negative inhibitor pseudo-ICE | 1,35 | 0,00006 |
| NM_005621 | S100A12 | 1q21 | S100 calcium binding protein A12 | 1,35 | 0,00003 |
| NM_015556 | SIPA1L1 | 14q24.2 | signal-induced proliferation-associated 1 like 1 | 1,35 | 0,00015 |
| NM_016230 | CYB5R4 | 6pter-q22.33 | cytochrome b5 reductase 4 | 1,35 | 0,00000 |
| NM_001924 | GADD45A | 1p31.2-p31.1 | growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha | 1,35 | 0,00017 |
| NM_002243 | KCNJ15 | 21q22.2 | potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 15 | 1,36 | 0,00085 |
| NM_173676 | PNPLA1 | 6p21.31 | patatin-like phospholipase domain containing 1 | 1,36 | 0,00006 |
| NM_014326 | DAPK2 | 15q22.31 | death-associated protein kinase 2 | 1,36 | 0,00015 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| NA | NA | NA | NA | 1,36 | 0,00085 |
| NM_002881 | RALB | 2cen-q13 | v-ral simian leukemia viral oncogene homolog B (ras related; GTP binding protein) | 1,37 | 0,00042 |
| NM_006573 | TNFSF13B | 13q32-q34 | tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b | 1,37 | 0,00001 |
| NM_148894 | FAM44A | 4p16.1 | family with sequence similarity 44, member A | 1,38 | 0,00000 |
| NM_001105251 | ZFYVE16 | 5q14 | zinc finger, FYVE domain containing 16 | 1,38 | 0,00000 |
| NM_194449 | PHLPP | 18q21.33 | PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase | 1,39 | 0,00016 |
| NM_003054 | SLC18A2 | 10q25 | solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 2 | 1,39 | 0,00031 |
| NM_201428 | RTN3 | 11q13 | reticulon 3 | 1,40 | 0,00002 |
| NM_003057 | SLC22A1 | 6q26 | solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 1 | 1,40 | 0,00001 |
| NM_182755 | ZNF438 | 10p11.23 | zinc finger protein 438 | 1,40 | 0,00044 |
| NM_152996 | ST6GALNAC3 | 1p31.1 | ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 3 | 1,40 | 0,00012 |
| NM_198040 | PHC2 | 1p34.3 | polyhomeotic homolog 2 (Drosophila) | 1,40 | 0,00022 |
| NM_006441 | MTHFS | 15q25.1 | 5,10-methenyltetrahydrofolate synthetase (5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase) | 1,40 | 0,00001 |
| NM_207325 | DPY19L3 | 19q13.11 | dpy-19-like 3 (C. elegans) | 1,41 | 0,00011 |
| NM_152313 | SLC36A4 | 11q21 | solute carrier family 36 (proton/amino acid symporter), member 4 | 1,42 | 0,00002 |
| NM_014861 | ATP2C2 | 16q24.1 | ATPase, Ca++ transporting, type 2C, member 2 | 1,42 | 0,00002 |
| NM_006825 | CKAP4 | 12q23.3 | cytoskeleton-associated protein 4 | 1,42 | 0,00011 |
| NM_032523 | OSBPL6 | 2q31-q32.1 | oxysterol binding protein-like 6 | 1,42 | 0,00001 |
| BC035515 | C5orf36 | 5q15 | chromosome 5 open reading frame 36 | 1,43 | 0,00001 |
| NM_138450 | ARL11 | 13q14.3 | ADP-ribosylation factor-like 11 | 1,43 | 0,00000 |
| NM_001440 | EXTL3 | 8p21 | exostoses (multiple)-like 3 | 1,43 | 0,00000 |
| NM_138337 | CLEC12A | 12p13.2 | C-type lectin domain family 12, member A | 1,44 | 0,00068 |
| NM_003245 | TGM3 | 20q11.2 | transglutaminase 3 (E polypeptide, protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase) | 1,44 | 0,00011 |
| NM_007288 | MME | 3q25.1-q25.2 | membrane metallo-endopeptidase | 1,44 | 0,00001 |
| NM_021209 | NLRC4 | 2p22-p21 | NLR family, CARD domain containing 4 | 1,44 | 0,00000 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| NM_024307 | GDPD3 | 16p11.2 | glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 3 | 1,44 | 0,00001 |
| NM_018079 | SRBD1 | 2p21 | S1 RNA binding domain 1 | 1,45 | 0,00000 |
| NM_024558 | C14orf138 | 14q22.1 | chromosome 14 open reading frame 138 | 1,45 | 0,00000 |
| NM_145699 | APOBEC3A | 22q13.1-q13.2 | apolipoprotein B RNAm editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3A | 1,46 | 0,00001 |
| NM_012395 | PFTK1 | 7q21-q22 | PFTAIRE protein kinase 1 | 1,46 | 0,00000 |
| NM_005345 | HSPA1A | 6p21.3 | heat shock 70kDa protein 1A | 1,47 | 0,00002 |
| NA | NA | NA | NA | 1,47 | 0,00029 |
| NM_032796 | SYAP1 | Xp22.2 | synapse associated protein 1, SAP47 homolog (Drosophila) | 1,47 | 0,00000 |
| NM_207113 | SLC37A3 | 7q34 | solute carrier family 37 (glycerol-3-phosphate transporter), member 3 | 1,47 | 0,00001 |
| NM_001079673 | FNDC3A | 13q14.2 | fibronectin type III domain containing 3A | 1,48 | 0,00000 |
| NM_005091 | PGLYRP1 | 19q13.2-q13.3 | peptidoglycan recognition protein 1 | 1,48 | 0,00014 |
| NM_020366 | RPGRIP1 | 14q11 | retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein 1 | 1,48 | 0,00002 |
| NM_001792 | CDH2 | 18q11.2 | cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal) | 1,48 | 0,00003 |
| NM_003885 | CDK5R1 | 17q11.2 | cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35) | 1,49 | 0,00003 |
| NM_025179 | PLXNA2 | 1q32.2 | plexin A2 | 1,49 | 0,00003 |
| NM_004748 | CCPG1 | 15q21.1 | cell cycle progression 1 | 1,49 | 0,00000 |
| NM_080597 | OSBPL1A | 18q11.1 | oxysterol binding protein-like 1A | 1,50 | 0,00017 |
| NM_032839 | DIRC2 | 3q21.1 | disrupted in renal carcinoma 2 | 1,50 | 0,00000 |
| NM_001100879 | ST20 | 15q25.1 | suppressor of tumorigenicity 20 | 1,51 | 0,00010 |
| NM_020698 | TMCC3 | 12q22 | transmembrane and coiled-coil domain family 3 | 1,52 | 0,00007 |
| NM_006576 | AVIL | 12q14.1 | advillin | 1,55 | 0,00002 |
| NM_021202 | TP53INP2 | 20q11.22 | tumor protein p53 inducible nuclear protein 2 | 1,55 | 0,00001 |
| NM_018420 | SLC22A15 | 1p13.1 | solute carrier family 22, member 15 | 1,56 | 0,00001 |
| NM_178539 | FAM19A2 | 12q14.1 | family with sequence similarity 19 (chemokine (C-C motif)-like), member A2 | 1,56 | 0,00000 |
| NM_153046 | TDRD9 | 14q32.33 | tudor domain containing 9 | 1,56 | 0,00010 |
| NA | NA | NA | NA | 1,57 | 0,00007 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| BC115358 | BTF3L1 | 13q22 | basic transcription factor 3, like 1 | 1,57 | 0,00021 |
| NM_001009905 | B3GNTL1 | 17q25.3 | UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase-like 1 | 1,58 | 0,00000 |
| NR_002189 | SUMO1P1 | 20q13.2 | SUMO1 pseudogene 1 | 1,59 | 0,00000 |
| NA | NA | NA | NA | 1,59 | 0,00050 |
| NM_002108 | HAL | 12q22-q24.1 | histidine ammonia-lyase | 1,60 | 0,00005 |
| NM_003830 | SIGLEC5 | 19q13.3 | sialic acid binding Ig-like lectin 5 | 1,60 | 0,00020 |
| NM_000922 | PDE3B | 11p15.1 | phosphodiesterase 3B, cGMP-inhibited | 1,61 | 0,00000 |
| NM_024610 | HSPBAP1 | 3q21.1 | HSPB (heat shock 27kDa) associated protein 1 | 1,61 | 0,00000 |
| NM_031476 | CRISPLD2 | 16q24.1 | cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 2 | 1,61 | 0,00040 |
| NM_018050 | MANSC1 | 12p13.2 | MANSC domain containing 1 | 1,62 | 0,00019 |
| BC128148 | C1orf161 | 1p13.1 | chromosome 1 open reading frame 161 | 1,64 | 0,00038 |
| NM_003235 | TG | 8q24 | thyroglobulin | 1,64 | 0,00005 |
| NM_078625 | VNN3 | 6q23-q24 | vanin 3 | 1,64 | 0,00000 |
| NM_001114735 | BCL2A1 | 15q24.3 | BCL2-related protein A1 | 1,65 | 0,00002 |
| NM_000896 | CYP4F3 | 19p13.2 | cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 3 | 1,65 | 0,00003 |
| NM_052961 | SLC26A8 | 6p21 | solute carrier family 26, member 8 | 1,65 | 0,00012 |
| NM_000219 | KCNE1 | 21q22.1-q22.2\|21q22.12 | potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 1 | 1,65 | 0,00006 |
| NM_025113 | C13orf18 | 13q14.12 | chromosome 13 open reading frame 18 | 1,66 | 0,00000 |
| NM_000222 | KIT | 4q11-q12 | v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog | 1,66 | 0,00000 |
| NM_000804 | FOLR3 | 11q13 | folate receptor 3 (gamma) | 1,67 | 0,00002 |
| NM_005139 | ANXA3 | 4q13-q22 | annexin A3 | 1,67 | 0,00021 |
| NM_021140 | UTX | Xp11.2 | ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome | 1,67 | 0,00014 |
| NM_001817 | CEACAM4 | 19q13.2 | carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 4 | 1,67 | 0,00003 |
| NM_001304 | CPD | 17q11.2 | carboxypeptidase D | 1,68 | 0,00001 |
| NM_001024599 | HIST2H2BF | 1q21.2 | histone cluster 2, H2bf | 1,69 | 0,00001 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| NM_004668 | MGAM | 7q34 | maltase-glucoamylase (alpha-glucosidase) | 1,70 | 0,00005 |
| NM_170776 | GPR97 | 16q13 | G protein-coupled receptor 97 | 1,71 | 0,00007 |
| NM_012387 | PADI4 | 1p36.13 | peptidyl arginine deiminase, type IV | 1,72 | 0,00008 |
| NM_153687 | IKIP | 12q23.1 | IKK interacting protein | 1,72 | 0,00002 |
| NM_016616 | TXNDC3 | 7p14.1 | thioredoxin domain containing 3 (spermatozoa) | 1,72 | 0,00000 |
| NM_001001415 | ZNF429 | 19p13.1 | zinc finger protein 429 | 1,73 | 0,00001 |
| NM_207628 | ABCG1 | 21q22.3 | ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1 | 1,74 | 0,00001 |
| NM_201999 | ELF2 | 4q28 | E74-like factor 2 (ets domain transcription factor) | 1,75 | 0,00000 |
| ENST00000370979 | LOC284757 | 20q13.33 | hypothetical protein LOC284757 | 1,77 | 0,00007 |
| BC031976 | C7orf53 | 7q31.1 | chromosome 7 open reading frame 53 | 1,77 | 0,00000 |
| NM_005384 | NFIL3 | 9q22 | nuclear factor, interleukin 3 regulated | 1,78 | 0,00000 |
| NM_000130 | F5 | 1q23 | coagulation factor V (proaccelerin, labile factor) | 1,79 | 0,00003 |
| NM_002758 | MAP2K6 | 17q24.3 | mitogen-activated protein kinase kinase 6 | 1,79 | 0,00001 |
| NM_020650 | RCN3 | 19q13.33 | reticulocalbin 3, EF-hand calcium binding domain | 1,79 | 0,00000 |
| NM_005502 | ABCA1 | 9q31.1 | ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1 | 1,83 | 0,00000 |
| NM_004633 | IL1R2 | 2q12-q22 | interleukin 1 receptor, type II | 1,83 | 0,00038 |
| NM_006691 | LYVE1 | 11p15 | lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1 | 1,83 | 0,00002 |
| NM_001062 | TCN1 | 11q11-q12 | transcobalamin I (vitamin B12 binding protein, R binder family) | 1,85 | 0,00063 |
| AF314543 | OCR1 | 1q32.1 | ovarian cancer-related protein 1 | 1,85 | 0,00006 |
| NM_014373 | GPR160 | 3q26.2-q27 | G protein-coupled receptor 160 | 1,89 | 0,00000 |
| NM_022746 | MOSC1 | 1q41 | MOCO sulphurase C-terminal domain containing 1 | 1,89 | 0,00000 |
| NM_152792 | ASPRV1 | 2p14 | aspartic peptidase, retroviral-like 1 | 1,90 | 0,00000 |
| NM_145032 | FBXL13 | 7q22.1 | F-box and leucine-rich repeat protein 13 | 1,90 | 0,00000 |
| NM_017576 | KIF27 | 9q21.32 | kinesin family member 27 | 1,91 | 0,00000 |
| NM_002084 | GPX3 | 5q23 | glutathione peroxidase 3 (plasma) | 1,93 | 0,00000 |
| NM_000717 | CA4 | 17q23 | carbonic anhydrase IV | 1,94 | 0,00001 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| NM_004666 | VNN1 | 6q23-q24 | vanin 1 | 1,94 | 0,00003 |
| NM_004444 | EPHB4 | 7q22 | EPH receptor B4 | 1,96 | 0,00000 |
| NM_152751 | C10orf30 | 10p13 | chromosome 10 open reading frame 30 | 1,98 | 0,00093 |
| NM_020808 | SIPA1L2 | 1q42.2 | signal-induced proliferation-associated 1 like 2 | 1,99 | 0,00014 |
| NM_002000 | FCAR | 19q13.2-q13.4 | Fc fragment of IgA, receptor for | 2,01 | 0,00001 |
| NM_004994 | MMP9 | 20q11.2-q13.1 | matrix metallopeptidase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase) | 2,04 | 0,00069 |
| NM_181791 | GPR141 | 7p14.1 | G protein-coupled receptor 141 | 2,04 | 0,00000 |
| NR_003542 | UNQ9368 | 4q35.1 | RTFV9368 | 2,05 | 0,00001 |
| NM_001081640 | PRKDC | 8q11 | protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide | 2,06 | 0,00000 |
| NM_020995 | HPR | 16q22.1 | haptoglobin-related protein | 2,09 | 0,00002 |
| NM_000877 | IL1R1 | 2q12 | interleukin 1 receptor, type I | 2,10 | 0,00000 |
| NM_014358 | CLEC4E | 12p13.31 | C-type lectin domain family 4, member E | 2,10 | 0,00001 |
| NM_139241 | FGD4 | 12p11.21 | FYVE, RhoGEF and PH domain containing 4 | 2,11 | 0,00000 |
| NM_022136 | SAMSN1 | 21q11 | SAM domain, SH3 domain and nuclear localization signals 1 | 2,16 | 0,00000 |
| NM_006212 | PFKFB2 | 1q31 | 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2 | 2,22 | 0,00007 |
| NM_007115 | TNFAIP6 | 2q23.3 | tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6 | 2,22 | 0,00000 |
| AY358263 | UNQ9419 | 2q12.1 | AHPA9419 | 2,28 | 0,00014 |
| NM_003749 | IRS2 | 13q34 | insulin receptor substrate 2 | 2,29 | 0,00001 |
| NM_007199 | IRAK3 | 12q14.3 | interleukin-1 receptor-associated kinase 3 | 2,34 | 0,00001 |
| NM_002129 | HMGB2 | 4q31 | high-mobility group box 2 | 2,36 | 0,00000 |
| NM_003246 | THBS1 | 15q15 | thrombospondin 1 | 2,43 | 0,00001 |
| NM_144590 | ANKRD22 | 10q23.31 | ankyrin repeat domain 22 | 2,45 | 0,00012 |
| NM_003855 | IL18R1 | 2q12 | interleukin 18 receptor 1 | 2,52 | 0,00000 |
| NM_080387 | CLEC4D | 12p13.31 | C-type lectin domain family 4, member D | 2,55 | 0,00000 |
| NM_000045 | ARG1 | 6q23 | arginase, liver | 2,67 | 0,00004 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| NM_018728 | MYO5C | 15q21 | myosin VC | 2,83 | 0,00000 |
| NM_024693 | ECHDC3 | 10p14 | enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 3 | 3,01 | 0,00000 |
| NM_203281 | BMX | Xp22.2 | BMX non-receptor tyrosine kinase | 3,12 | 0,00000 |
| NM_015225 | PRUNE2 | 9q21.13 | prune homolog 2 (Drosophila) | 3,54 | 0,00000 |

Nota: Gene, de acordo com a nomenclatura HUGO (*Human Genome Organization*); CytoBand, localização cromossômica (*Citogenetic Band*); ACC, número de acesso do gene no banco de dados públicos (www.ncbi.nlm.nih.gov); FC – *Fold Change* ± 1,0; p-valor < 0,001.

Tabela 2. Genes diferencialmente expressos entre 1º IAM T12 versus GC. Genes ordenados de modo crescente de acordo com *Fold Change*.

| **ACC** | **Gene** | **Cytobanddd** | **Descrição** | **FC** | ***p*-valor** |
|---|---|---|---|---|---|
| NM_001140 | ALOX15 | 17p13.3 | arachidonate 15-lipoxygenase | -2,15 | 0,00082 |
| NM_001738 | CA1 | 8q13-q22.1 | carbonic anhydrase I | -2,11 | 0,00003 |
| NM_001978 | EPB49 | 8p21.1 | erythrocyte membrane protein band 4.9 (dematin) | -2,10 | 0,00001 |
| NM_016633 | ERAF | 16p11.2 | erythroid associated factor | -2,00 | 0,00013 |
| NM_020476 | ANK1 | 8p11.1 | ankyrin 1, erythrocytic | -1,95 | 0,00002 |
| CR456748 | RUNDC3A | 17q21.31 | RUN domain containing 3A | -1,91 | 0,00057 |
| NM_022648 | TNS1 | 2q35-q36 | tensin 1 | -1,89 | 0,00006 |
| NM_000119 | EPB42 | 15q15-q21 | erythrocyte membrane protein band 4.2 | -1,88 | 0,00029 |
| NM_032385 | C5orf4 | 5q31-q32 | chromosome 5 open reading frame 4 | -1,81 | 0,00023 |
| NM_003944 | SELENBP1 | 1q21-q22 | selenium binding protein 1 | -1,78 | 0,00051 |
| NM_016232 | IL1RL1 | 2q12 | interleukin 1 receptor-like 1 | -1,72 | 0,00018 |
| NM_001002841 | MYL4 | 17q21-qter | myosin, light chain 4, alkali; atrial, embryonic | -1,72 | 0,00000 |
| NM_006563 | KLF1 | 19p13.13-p13.12 | Kruppel-like factor 1 (erythroid) | -1,71 | 0,00007 |
| NA | NA | NA | NA | -1,70 | 0,00000 |
| NM_020683 | ADORA3 | 1p13.2 | adenosine A3 receptor | -1,64 | 0,00001 |
| NM_001024858 | SPTB | 14q23-q24.2 | spectrin, beta, erythrocytic (includes spherocytosis, clinical type I) | -1,64 | 0,00003 |
| NM_002101 | GYPC | 2q14-q21 | glycophorin C (Gerbich blood group) | -1,61 | 0,00001 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| NM_002501 | NFIX | 19p13.3 | nuclear factor I/X (CCAAT-binding transcription factor) | -1,60 | 0,00004 |
| NM_138445 | GPR146 | 7p22.3 | G protein-coupled receptor 146 | -1,59 | 0,00015 |
| NM_001048166 | STIL | 1q32\|1p32 | SCL/TAL1 interrupting locus | -1,58 | 0,00008 |
| NM_001077350 | C16orf35 | 16p13.3 | chromosome 16 open reading frame 35 | -1,56 | 0,00000 |
| NA | NA | NA | NA | -1,52 | 0,00000 |
| NM_017709 | FAM46C | 1p12 | family with sequence similarity 46, member C | -1,52 | 0,00014 |
| NM_006039 | MRC2 | 17q23.2 | mannose receptor, C type 2 | -1,52 | 0,00029 |
| NM_018027 | FRMD4A | 10p13 | FERM domain containing 4A | -1,51 | 0,00004 |
| NA | NA | NA | NA | -1,46 | 0,00000 |
| NM_003275 | TMOD1 | 9q22.3 | tropomodulin 1 | -1,45 | 0,00007 |
| NM_018667 | SMPD3 | 16q22.1 | sphingomyelin phosphodiesterase 3, neutral membrane (neutral sphingomyelinase II) | -1,45 | 0,00009 |
| NM_015431 | TRIM58 | 1q44 | tripartite motif-containing 58 | -1,44 | 0,00030 |
| NM_005723 | TSPAN5 | 4q23 | tetraspanin 5 | -1,43 | 0,00075 |
| NM_005629 | SLC6A8 | Xq28 | solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, creatine), member 8 | -1,43 | 0,00006 |
| NM_017495 | RBM38 | 20q13.31 | RNA binding motif protein 38 | -1,41 | 0,00003 |
| NM_002100 | GYPB | 4q28-q31 | glycophorin B (MNS blood group) | -1,40 | 0,00001 |
| NM_003863 | DPM2 | 9q34.13 | dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 2, regulatory subunit | -1,37 | 0,00000 |
| NM_004091 | E2F2 | 1p36 | E2F transcription factor 2 | -1,36 | 0,00024 |
| NM_000858 | GUK1 | 1q32-q41 | guanylate kinase 1 | -1,36 | 0,00000 |
| NM_012483 | GNLY | 2p11.2 | granulysin | -1,35 | 0,00025 |
| NM_138578 | BCL2L1 | 20q11.21 | BCL2-like 1 | -1,34 | 0,00013 |
| NA | NA | NA | NA | -1,32 | 0,00001 |
| NM_000564 | IL5RA | 3p26-p24 | interleukin 5 receptor, alpha | -1,31 | 0,00083 |
| NA | NA | NA | NA | -1,30 | 0,00037 |
| NM_018388 | MBNL3 | Xq26.2 | muscleblind-like 3 (Drosophila) | -1,30 | 0,00004 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| NA | NA | NA | NA | -1,30 | 0,00000 |
| NM_033518 | SLC38A5 | Xp11.23 | solute carrier family 38, member 5 | -1,30 | 0,00000 |
| NM_003651 | CSDA | 12p13.1 | cold shock domain protein A | -1,29 | 0,00002 |
| NM_016016 | SLC25A39 | 17q12 | solute carrier family 25, member 39 | -1,28 | 0,00008 |
| NM_001078177 | SLC29A1 | 6p21.2-p21.1 | solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 1 | -1,27 | 0,00005 |
| NM_001335 | CTSW | 11q13.1 | cathepsin W | -1,25 | 0,00051 |
| NM_017899 | TESC | 12q24.22 | tescalcin | -1,24 | 0,00012 |
| NM_001002265 | MARCH8 | 10q11.21 | membrane-associated ring finger (C3HC4) 8 | -1,24 | 0,00006 |
| NM_000713 | BLVRB | 19q13.1-q13.2 | biliverdin reductase B (flavin reductase (NADPH)) | -1,24 | 0,00061 |
| NM_012179 | FBXO7 | 22q12-q13 | F-box protein 7 | -1,23 | 0,00001 |
| NM_020850 | RANBP10 | 16q22.1 | RAN binding protein 10 | -1,22 | 0,00004 |
| NM_175039 | ST6GALNAC4 | 9q34 | ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 4 | -1,21 | 0,00006 |
| NA | NA | NA | NA | -1,21 | 0,00000 |
| NM_001724 | BPGM | 7q31-q34 | 2,3-bisphosphoglycerate mutase | -1,18 | 0,00005 |
| NM_203342 | EPB41 | 1p33-p32 | erythrocyte membrane protein band 4.1 (elliptocytosis 1, RH-linked) | -1,15 | 0,00007 |
| NM_173799 | VSTM3 | 3q13.31 | V-set and transmembrane domain containing 3 | -1,14 | 0,00071 |
| NM_025241 | UBXD1 | 19p13 | UBX domain containing 1 | -1,13 | 0,00095 |
| NA | NA | NA | NA | -1,12 | 0,00001 |
| NM_178578 | PSMF1 | 20p13 | proteasome (prosome, macropain) inhibitor subunit 1 (PI31) | -1,11 | 0,00004 |
| NM_004188 | GFI1B | 9q34.13 | growth factor independent 1B transcription repressor | -1,06 | 0,00035 |
| NM_005067 | SIAH2 | 3q25 | seven in absentia homolog 2 (Drosophila) | -1,03 | 0,00002 |
| NM_003486 | SLC7A5 | 16q24.3 | solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5 | -1,03 | 0,00005 |
| NM_031444 | C22orf13 | 22q11.2 | chromosome 22 open reading frame 13 | -1,02 | 0,00011 |
| NM_032272 | MAF1 | 8q24.3 | MAF1 homolog (S. cerevisiae) | -1,02 | 0,00003 |
| NM_001841 | CNR2 | 1p36.11 | cannabinoid receptor 2 (macrophage) | -1,01 | 0,00013 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| NM_004748 | CCPG1 | 15q21.1 | cell cycle progression 1 | 1,00 | 0,00012 |
| NM_003059 | SLC22A4 | 5q31.1 | solute carrier family 22 (organic cation/ergothioneine transporter), member 4 | 1,01 | 0,00064 |
| NM_006441 | MTHFS | 15q25.1 | 5,10-methenyltetrahydrofolate synthetase (5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase) | 1,01 | 0,00027 |
| NM_152271 | LONRF1 | 8p23.1 | LON peptidase N-terminal domain and ring finger 1 | 1,01 | 0,00007 |
| NM_024307 | GDPD3 | 16p11.2 | glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 3 | 1,03 | 0,00051 |
| NM_025184 | EFHC2 | Xp11.3 | EF-hand domain (C-terminal) containing 2 | 1,03 | 0,00008 |
| NM_007166 | PICALM | 11q14 | phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein | 1,04 | 0,00011 |
| NM_024607 | PPP1R3B | 8p23.1 | protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3B | 1,04 | 0,00057 |
| NM_181785 | SLC46A3 | 13q12.3 | solute carrier family 46, member 3 | 1,06 | 0,00024 |
| NM_012215 | MGEA5 | 10q24.1-q24.3 | meningioma expressed antigen 5 (hyaluronidase) | 1,06 | 0,00002 |
| NM_052889 | COP1 | --- | caspase-1 dominant-negative inhibitor pseudo-ICE | 1,06 | 0,00059 |
| NM_019597 | HNRNPH2 | Xq22 | heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 (H') | 1,06 | 0,00034 |
| NM_002032 | FTH1 | 11q13 | ferritin, heavy polypeptide 1 | 1,06 | 0,00003 |
| NA | NA | NA | NA | 1,07 | 0,00028 |
| NM_145170 | TTC18 | 10q22.2 | tetratricopeptide repeat domain 18 | 1,08 | 0,00018 |
| NM_004972 | JAK2 | 9p24 | Janus kinase 2 (a protein tyrosine kinase) | 1,08 | 0,00015 |
| NM_021097 | SLC8A1 | 2p23-p22 | solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), member 1 | 1,09 | 0,00059 |
| NM_005906 | MAK | 6p24 | male germ cell-associated kinase | 1,09 | 0,00091 |
| NM_138340 | ABHD3 | 18q11.2 | abhydrolase domain containing 3 | 1,12 | 0,00000 |
| NM_006576 | AVIL | 12q14.1 | advillin | 1,14 | 0,00044 |
| NM_138450 | ARL11 | 13q14.3 | ADP-ribosylation factor-like 11 | 1,16 | 0,00004 |
| NM_006281 | STK3 | 8q22.2 | serine/threonine kinase 3 (STE20 homolog, yeast) | 1,17 | 0,00003 |
| NM_000804 | FOLR3 | 11q13 | folate receptor 3 (gamma) | 1,17 | 0,00092 |
| NM_003414 | ZNF267 | 16p11.2 | zinc finger protein 267 | 1,17 | 0,00041 |
| NM_024945 | RMI1 | 9q21.32 | RMI1, RecQ mediated genome instability 1, homolog (S. cerevisiae) | 1,20 | 0,00019 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| NM_005384 | NFIL3 | 9q22 | nuclear factor, interleukin 3 regulated | 1,22 | 0,00011 |
| NM_201453 | CBWD3 | 9q13 | COBW domain containing 3 | 1,24 | 0,00092 |
| NM_173078 | SLITRK4 | Xq27.3 | SLIT and NTRK-like family, member 4 | 1,26 | 0,00005 |
| NM_001008394 | EID3 | 12q23-q24.1 | EP300 interacting inhibitor of differentiation 3 | 1,27 | 0,00033 |
| NR_002189 | SUMO1P1 | 20q13.2 | SUMO1 pseudogene 1 | 1,28 | 0,00004 |
| NM_004508 | IDI1 | 10p15.3 | isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1 | 1,33 | 0,00010 |
| NM_203391 | GK | Xp21.3 | glycerol kinase | 1,35 | 0,00001 |
| BC093861 | FLJ34047 | 5p15.1 | hypothetical protein FLJ34047 | 1,35 | 0,00024 |
| NM_001100879 | ST20 | 15q25.1 | suppressor of tumorigenicity 20 | 1,40 | 0,00012 |
| NM_006691 | LYVE1 | 11p15 | lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1 | 1,40 | 0,00030 |
| NM_020650 | RCN3 | 19q13.33 | reticulocalbin 3, EF-hand calcium binding domain | 1,42 | 0,00000 |
| NM_006009 | TUBA1A | 12q12-q14.3 | tubulin, alpha 1a | 1,46 | 0,00007 |
| NM_001114735 | BCL2A1 | 15q24.3 | BCL2-related protein A1 | 1,52 | 0,00002 |
| NM_005323 | HIST1H1T | 6p21.3 | histone cluster 1, H1t | 1,60 | 0,00004 |
| NM_020995 | HPR | 16q22.1 | haptoglobin-related protein | 1,66 | 0,00024 |
| NM_001024599 | HIST2H2BF | 1q21.2 | histone cluster 2, H2bf | 1,66 | 0,00000 |
| NM_005139 | ANXA3 | 4q13-q22 | annexin A3 | 1,89 | 0,00001 |
| NM_015225 | PRUNE2 | 9q21.13 | prune homolog 2 (Drosophila) | 2,09 | 0,00059 |
| NM_198153 | TREML4 | 6p21.1 | triggering receptor expressed on myeloid cells-like 4 | 3,74 | 0,00059 |

Nota: Gene, de acordo com a nomenclatura HUGO (*Human Genome Organization*); CytoBand, localização cromossômica (*Citogenetic Band*); ACC, número de acesso do gene no banco de dados públicos (www.ncbi.nlm.nih.gov); FC – *Fold Change* ± 1,0; p-valor < 0,001.

Tabela 3. Genes diferencialmente expressos entre 1º IAM T24 versus GC. Genes ordenados de modo crescente de acordo com *Fold Change*.

| ACC | Gene | Cytobanddd | Descrição | FC | *p*-valor |
|---|---|---|---|---|---|
| NM_020683 | ADORA3 | 1p13.2 | adenosine A3 receptor | -1,30 | 0,0001 |
| NM_001024858 | SPTB | 14q23-q24.2 | spectrin, beta, erythrocytic (includes spherocytosis, clinical type I) | -1,29 | 0,0007 |
| NA | NA | NA | NA | -1,19 | 0,0004 |
| NM_020650 | RCN3 | 19q13.33 | reticulocalbin 3, EF-hand calcium binding domain | 1,20 | 0,0001 |
| NA | NA | NA | NA | 1,20 | 0,0010 |
| NA | NA | NA | NA | 1,98 | 0,0007 |

Nota: Gene, de acordo com a nomenclatura HUGO (*Human Genome Organization*); CytoBand, localização cromossômica (*Citogenetic Band*); ACC, número de acesso do gene no banco de dados públicos (www.ncbi.nlm.nih.gov); FC – *Fold Change* ± 1,0; p-valor < 0,001.

Tabela 4. Genes diferencialmente expressos entre 1º IAM T36 versus GC. Genes ordenados de modo crescente de acordo com *Fold Change*.

| ACC | Gene | Cytobanddd | Descrição | FC | *p*-valor |
|---|---|---|---|---|---|
| NM_001978 | EPB49 | 8p21.1 | erythrocyte membrane protein band 4.9 (dematin) | -1,58 | 0,0004 |
| NM_020476 | ANK1 | 8p11.1 | ankyrin 1, erythrocytic | -1,53 | 0,0006 |
| NM_001002841 | MYL4 | 17q21-qter | myosin, light chain 4, alkali; atrial, embryonic | -1,47 | 0,0000 |
| NM_138445 | GPR146 | 7p22.3 | G protein-coupled receptor 146 | -1,44 | 0,0005 |
| NM_001024858 | SPTB | 14q23-q24.2 | spectrin, beta, erythrocytic (includes spherocytosis, clinical type I) | -1,36 | 0,0004 |
| NA | NA | NA | NA | -1,35 | 0,0001 |
| NM_016016 | SLC25A39 | 17q12 | solute carrier family 25, member 39 | -1,29 | 0,0001 |
| NM_001077350 | C16orf35 | 16p13.3 | chromosome 16 open reading frame 35 | -1,29 | 0,0000 |
| NM_002101 | GYPC | 2q14-q21 | glycophorin C (Gerbich blood group) | -1,27 | 0,0002 |
| NM_002501 | NFIX | 19p13.3 | nuclear factor I/X (CCAAT-binding transcription factor) | -1,23 | 0,0010 |
| NM_003651 | CSDA | 12p13.1 | cold shock domain protein A | -1,23 | 0,0000 |
| NA | NA | NA | NA | -1,22 | 0,0000 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| NA | NA | NA | NA | -1,21 | 0,0000 |
| NM_005629 | SLC6A8 | Xq28 | solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, creatine), member 8 | -1,2 | 0,0005 |
| NA | NA | NA | NA | -1,18 | 0,0001 |
| NM_000858 | GUK1 | 1q32-q41 | guanylate kinase 1 | -1,13 | 0,0000 |
| NM_004359 | CDC34 | 19p13.3 | cell division cycle 34 homolog (S. cerevisiae) | -1,11 | 0,0001 |
| NM_175039 | ST6GALNAC4 | 9q34 | ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 4 | -1,1 | 0,0002 |
| NM_001002265 | MARCH8 | 10q11.21 | membrane-associated ring finger (C3HC4) 8 | -1,1 | 0,0003 |
| NA | NA | NA | NA | -1,08 | 0,0000 |
| NA | NA | NA | NA | -1,08 | 0,0000 |
| NM_003863 | DPM2 | 9q34.13 | dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 2, regulatory subunit | -1,07 | 0,0002 |
| NA | NA | NA | NA | -1,06 | 0,0002 |
| NM_006100 | ST3GAL6 | 3q12.1 | ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 6 | 1,01 | 0,0004 |
| NM_030667 | PTPRO | 12p13.3-p13.2\|12p13-p12 | protein tyrosine phosphatase, receptor type, O | 1,03 | 0,0001 |
| NM_024945 | RMI1 | 9q21.32 | RMI1, RecQ mediated genome instability 1, homolog (S. cerevisiae) | 1,1 | 0,0006 |
| NM_020650 | RCN3 | 19q13.33 | reticulocalbin 3, EF-hand calcium binding domain | 1,12 | 0,0001 |
| NA | NA | NA | NA | 1,24 | 0,0009 |
| NM_003414 | ZNF267 | 16p11.2 | zinc finger protein 267 | 1,25 | 0,0002 |
| NM_173078 | SLITRK4 | Xq27.3 | SLIT and NTRK-like family, member 4 | 1,4 | 0,0000 |
| NM_001866 | COX7B | Xq21.1 | cytochrome c oxidase subunit VIIb | 1,45 | 0,0004 |
| NA | NA | NA | NA | 1,49 | 0,0000 |
| NA | NA | NA | NA | 1,93 | 0,0009 |

Nota: Gene, de acordo com a nomenclatura HUGO (*Human Genome Organization*); CytoBand, localização cromossômica (*Citogenetic Band*); ACC, número de acesso do gene no banco de dados públicos (www.ncbi.nlm.nih.gov); FC – *Fold Change* ± 1,0; p-valor < 0,001.

Tabela 5. Genes diferencialmente expressos entre 1º IAM T48 versus GC. Genes ordenados de modo crescente de acordo com *Fold Change*.

| ACC | Gene | Cytobanddd | Descrição | FC | *p*-valor |
|---|---|---|---|---|---|
| NM_017709 | FAM46C | 1p12 | family with sequence similarity 46, member C | -1,3 | 0,0009 |
| NM_003651 | CSDA | 12p13.1 | cold shock domain protein A | -1,17 | 0,0001 |
| NM_016016 | SLC25A39 | 17q12 | solute carrier family 25, member 39 | -1,15 | 0,0003 |
| NM_015999 | ADIPOR1 | 1p36.13-q41 | adiponectin receptor 1 | -1,06 | 0,0000 |
| NM_001002265 | MARCH8 | 10q11.21 | membrane-associated ring finger (C3HC4) 8 | -1,05 | 0,0005 |
| NM_006830 | UQCR | 19p13.3 | ubiquinol-cytochrome c reductase, 6.4kDa subunit | 1 | 0,0002 |
| NR_002612 | DLEU2 | 13q14.3 | deleted in lymphocytic leukemia, 2 | 1,01 | 0,0007 |
| NM_003414 | ZNF267 | 16p11.2 | zinc finger protein 267 | 1,08 | 0,0010 |
| BC093004 | C18orf32 | 18q21.1 | chromosome 18 open reading frame 32 | 1,09 | 0,0001 |
| NM_015364 | LY96 | 8q21.11 | lymphocyte antigen 96 | 1,13 | 0,0004 |
| NM_024307 | GDPD3 | 16p11.2 | glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 3 | 1,14 | 0,0001 |
| NM_004894 | C14orf2 | 14q32.33 | chromosome 14 open reading frame 2 | 1,17 | 0,0008 |
| NM_015962 | FCF1 | 14q24.3 | FCF1 small subunit (SSU) processome component homolog (S. cerevisiae) | 1,17 | 0,0008 |
| NM_014402 | UQCRQ | 5q31.1 | ubiquinol-cytochrome c reductase, complex III subunit VII, 9.5kDa | 1,19 | 0,0010 |
| NM_001099670 | C8orf59 | 8q21.2 | chromosome 8 open reading frame 59 | 1,19 | 0,0006 |
| NM_002493 | NDUFB6 | 9p21.1 | NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 6, 17kDa | 1,2 | 0,0001 |
| NA | NA | NA | NA | 1,23 | 0,0000 |
| NA | NA | NA | NA | 1,26 | 0,0003 |
| NM_032231 | FAM96A | 15q22.31 | family with sequence similarity 96, member A | 1,26 | 0,0006 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| NM_005213 | CSTA | 3q21 | cystatin A (stefin A) | 1,27 | 0,0006 |
| NA | NA | NA | NA | 1,59 | 0,0008 |
| NM_001030001 | RPS29 | 14q | ribosomal protein S29 | 1,6 | 0,0001 |
| NA | NA | NA | NA | 1,63 | 0,0000 |
| NA | NA | NA | NA | 1,67 | 0,0006 |
| NA | NA | NA | NA | 1,77 | 0,0001 |
| NA | NA | NA | NA | 1,79 | 0,0008 |
| NM_001866 | COX7B | Xq21.1 | cytochrome c oxidase subunit VIIb | 1,85 | 0,0000 |
| NA | NA | NA | NA | 1,93 | 0,0008 |
| NA | NA | NA | NA | 1,96 | 0,0006 |
| NM_203497 | COMMD6 | --- | COMM domain containing 6 | 2,12 | 0,0006 |
| NA | NA | NA | NA | 2,25 | 0,0007 |
| NM_033022 | RPS24 | 10q22-q23 | ribosomal protein S24 | 2,25 | 0,0007 |
| NA | NA | NA | NA | 2,26 | 0,0000 |
| NA | NA | NA | NA | 2,65 | 0,0000 |

Nota: Gene, de acordo com a nomenclatura HUGO (*Human Genome Organization*); CytoBand, localização cromossômica (*Citogenetic Band*); ACC, número de acesso do gene no banco de dados públicos (www.ncbi.nlm.nih.gov); FC – *Fold Change* ± 1,0; p-valor < 0,001.

Tabela 6. Genes diferencialmente expressos entre 2º IAM versus GC. Genes ordenados de modo crescente de acordo com *Fold Change* para cada tempo de colheita, apartir do $T_2$.

| | ACC/AffyID | Símbolo | Posição | Descrição | FC | *p*-valor |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $T_2$ | NM_000561 | GSTM1 | 1p13.3 | *glutathione S-transferase M1* | -2,36 | 0,0000 |
| | NM_139248 | LIPH | 3q27 | *lipase, member H* | -1,61 | 0,0003 |
| | NM_006610 | MASP2 | 1p36.3-p36.2 | *mannan-binding lectin serine peptidase 2* | -1,46 | 0,0007 |
| | NM_001078177 | SLC29A1 | 6p21.2-p21.1 | *solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 1* | -1,14 | 0,0004 |
| | NM_024592 | SRD5A3 | 4q12 | *steroid 5 alpha-reductase 3* | -1,12 | 0,0009 |
| | NM_002508 | NID1 | 1q43 | *nidogen 1* | -1,08 | 0,0005 |
| | NM_000848 | GSTM2 | 1p13.3 | *glutathione S-transferase M2 (muscle)* | -1,04 | 0,0001 |
| | NM_000608 | ORM2 | 9q32 | *orosomucoid 2* | 1,01 | 0,0008 |
| | NM_003885 | CDK5R1 | 17q11.2 | *cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35)* | 1,14 | 0,0009 |
| | NM_024693 | ECHDC3 | 10p14 | *enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 3* | 1,70 | 0,0010 |
| | NM_002692 | POLE2 | 14q21-q22 | *polymerase (DNA directed), epsilon 2 (p59 subunit)* | 1,86 | 0,0001 |
| | NM_000804 | FOLR3 | 11q13 | *folate receptor 3 (gamma)* | 2,12 | 0,0000 |
| | NM_002112 | HDC | 15q21-q22 | *histidine decarboxylase* | 2,45 | 0,0003 |
| $T_{12}$ | NM_000561 | GSTM1 | 1p13.3 | *glutathione S-transferase M1* | -2,47 | 0,0000 |
| | 2536500 | NA | NA | *NA* | -1,89 | 0,0000 |
| | BC063788 | FLJ37078 | 7q11.23 | *hypothetical protein FLJ37078* | -1,78 | 0,0008 |
| | NM_001079910 | LRRIQ1 | 12q21.31 | *leucine-rich repeats and IQ motif containing 1* | -1,67 | 0,0000 |
| | NM_017950 | CCDC40 | 17q25.3 | *coiled-coil domain containing 40* | -1,61 | 0,0000 |
| | NM_013427 | ARHGAP6 | Xp22.3 | *Rho GTPase activating protein 6* | -1,55 | 0,0000 |
| | NM_152607 | C1orf177 | 1p32.3 | *chromosome 1 open reading frame 177* | -1,52 | 0,0000 |
| | NM_052832 | SLC26A7 | 8q23 | *solute carrier family 26, member 7* | -1,51 | 0,0000 |
| | NM_024103 | SLC25A23 | 19p13.3 | *solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 23* | -1,51 | 0,0008 |
| | NM_004389 | CTNNA2 | 2p12-p11.1 | *catenin (cadherin-associated protein), alpha 2* | -1,45 | 0,0001 |
| | NM_022138 | SMOC2 | 6q27 | *SPARC related modular calcium binding 2* | -1,42 | 0,0007 |
| | 2674261 | NA | NA | *NA* | -1,41 | 0,0005 |
| | NM_181807 | DCDC1 | 11p13 | *doublecortin domain containing 1* | -1,40 | 0,0000 |
| | NM_001037131 | CENTG2 | 2q37 | *centaurin, gamma 2* | -1,38 | 0,0007 |
| | NM_002213 | ITGB5 | 3q21.2 | *integrin, beta 5* | -1,32 | 0,0003 |
| | NM_001992 | F2R | 5q13 | *coagulation factor II (thrombin) receptor* | -1,32 | 0,0004 |
| | NM_004278 | PIGL | 17p12-p11.2 | *phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class L* | -1,30 | 0,0001 |
| | NM_001098213 | HRH1 | 3p25 | *histamine receptor H1* | -1,29 | 0,0001 |
| | NM_021733 | TSKS | 19q13.3 | *testis-specific kinase substrate* | -1,25 | 0,0001 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | NM_033104 | STON2 | 14q31.1 | *stonin 2* | -1,24 | 0,0006 |
| | 3725968 | NA | NA | *NA* | -1,22 | 0,0002 |
| | NM_147127 | EVC2 | 4p16.2-p16.1 | *Ellis van Creveld syndrome 2 (limbin)* | -1,21 | 0,0002 |
| | 2406301 | NA | NA | *NA* | -1,20 | 0,0000 |
| | 2968440 | NA | NA | *NA* | -1,19 | 0,0008 |
| | NM_005263 | GFI1 | 1p22 | *growth factor independent 1 transcription repressor* | -1,17 | 0,0004 |
| | NM_001077350 | C16orf35 | 16p13.3 | *chromosome 16 open reading frame 35* | -1,15 | 0,0010 |
| | NM_001769 | CD9 | 12p13.3 | *CD9 molecule* | -1,12 | 0,0005 |
| | 2436178 | NA | NA | *NA* | -1,12 | 0,0005 |
| | NM_000848 | GSTM2 | 1p13.3 | *glutathione S-transferase M2 (muscle)* | -1,10 | 0,0002 |
| | NM_002075 | GNB3 | 12p13 | *guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 3* | -1,10 | 0,0001 |
| | NM_032013 | NDRG3 | 20q11.21-q11.23 | *NDRG family member 3* | -1,08 | 0,0004 |
| | 3556176 | NA | NA | *NA* | -1,07 | 0,0010 |
| | NM_002584 | PAX7 | 1p36.2-p36.12 | *paired box 7* | -1,07 | 0,0003 |
| | NM_006739 | MCM5 | 22q13.1 | *minichromosome maintenance complex component 5* | -1,07 | 0,0005 |
| | NM_005329 | HAS3 | 16q22.1 | *hyaluronan synthase 3* | -1,05 | 0,0001 |
| | NM_003087 | SNCG | 10q23.2-q23.3 | *synuclein, gamma (breast cancer-specific protein 1)* | -1,05 | 0,0001 |
| | NM_032105 | PPP1R12B | 1q32.1 | *protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12B* | -1,02 | 0,0000 |
| | 4113312 | NA | NA | *NA* | 1,03 | 0,0007 |
| | 3743540 | NA | NA | *NA* | 1,04 | 0,0008 |
| | NM_138340 | ABHD3 | 18q11.2 | *abhydrolase domain containing 3* | 1,17 | 0,0000 |
| | 2325205 | NA | NA | *NA* | 1,18 | 0,0006 |
| | NM_203391 | GK | Xp21.3 | *glycerol kinase* | 1,19 | 0,0009 |
| | NM_005574 | LMO2 | 11p13 | *LIM domain only 2 (rhombotin-like 1)* | 1,38 | 0,0004 |
| | NM_000566 | FCGR1A | 1q21.2-q21.3 | *Fc fragment of IgG, high affinity Ia, receptor (CD64)* | 1,44 | 0,0003 |
| | NM_001024599 | HIST2H2BF | 1q21.2 | *histone cluster 2, H2bf* | 1,48 | 0,0004 |
| | NM_001114735 | BCL2A1 | 15q24.3 | *BCL2-related protein A1* | 1,59 | 0,0002 |
| | 3145955 | NA | NA | *NA* | 1,66 | 0,0002 |
| | NM_001866 | COX7B | Xq21.1 | *cytochrome c oxidase subunit VIIb* | 1,68 | 0,0007 |
| | 3722318 | NA | NA | *NA* | 2,09 | 0,0006 |
| | NM_000804 | FOLR3 | 11q13 | *folate receptor 3 (gamma)* | 2,15 | 0,0000 |
| $T_{24}$ | NM_000561 | GSTM1 | 1p13.3 | *glutathione S-transferase M1* | -2,20 | 0,0001 |
| | NM_152607 | C1orf177 | 1p32.3 | *chromosome 1 open reading frame 177* | -1,31 | 0,0003 |
| | NM_001769 | CD9 | 12p13.3 | *CD9 molecule* | -1,16 | 0,0004 |
| | NM_032859 | ABHD13 | 13q33.3 | *abhydrolase domain containing 13* | 1,02 | 0,0009 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | NM_174887 | IFT20 | 17q11.2 | *intraflagellar transport 20 homolog (Chlamydomonas)* | 1,06 | 0,0008 |
| | NM_025054 | VCPIP1 | 8q13 | *valosin containing protein (p97)/p47 complex interacting protein 1* | 1,06 | 0,0003 |
| | NM_138450 | ARL11 | 13q14.3 | *ADP-ribosylation factor-like 11* | 1,13 | 0,0006 |
| | NM_138340 | ABHD3 | 18q11.2 | *abhydrolase domain containing 3* | 1,15 | 0,0001 |
| | NM_016410 | CHMP5 | 9p13.3 | *chromatin modifying protein 5* | 1,24 | 0,0009 |
| | NM_024945 | RMI1 | 9q21.32 | *RMI1, RecQ mediated genome instability 1, homolog (S. cerevisiae)* | 1,28 | 0,0009 |
| | NM_001539 | DNAJA1 | 9p13-p12 | *DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1* | 1,33 | 0,0006 |
| | NM_002624 | PFDN5 | 12q12 | *prefoldin subunit 5* | 1,45 | 0,0010 |
| | NM_001114735 | BCL2A1 | 15q24.3 | *BCL2-related protein A1* | 1,49 | 0,0004 |
| | NM_005213 | CSTA | 3q21 | *cystatin A (stefin A)* | 1,57 | 0,0005 |
| | NM_000804 | FOLR3 | 11q13 | *folate receptor 3 (gamma)* | 1,61 | 0,0002 |
| | NM_001866 | COX7B | Xq21.1 | *cytochrome c oxidase subunit VIIb* | 1,65 | 0,0008 |
| | NM_203497 | COMMD6 | --- | *COMM domain containing 6* | 2,54 | 0,0007 |
| $T_{36}$ | NM_000561 | GSTM1 | 1p13.3 | *glutathione S-transferase M1* | -3,29 | 0,0000 |
| | BC022250 | C5orf23 | 5p13.3 | *chromosome 5 open reading frame 23* | -1,74 | 0,0002 |
| | NM_001040260 | DCLK2 | 4q31.3 | *doublecortin-like kinase 2* | -1,71 | 0,0007 |
| | NM_001039362 | ATP6V1C2 | --- | *ATPase, H+ transporting, lysosomal 42kDa, V1 subunit C2* | -1,13 | 0,0004 |
| | NM_080429 | AQP10 | 1q21.3 | *aquaporin 10* | -1,03 | 0,0000 |
| | NM_001166 | BIRC2 | 11q22 | *baculoviral IAP repeat-containing 2* | 1,04 | 0,0006 |
| | BC093004 | C18orf32 | 18q21.1 | *chromosome 18 open reading frame 32* | 1,08 | 0,0002 |
| | NM_052889 | COP1 | --- | *caspase-1 dominant-negative inhibitor pseudo-ICE* | 1,09 | 0,0008 |
| | NM_001677 | ATP1B1 | 1q24 | *ATPase, Na+/K+ transporting, beta 1 polypeptide* | 1,11 | 0,0009 |
| | NM_003916 | AP1S2 | Xp22.2 | *adaptor-related protein complex 1, sigma 2 subunit* | 1,12 | 0,0010 |
| | NM_005574 | LMO2 | 11p13 | *LIM domain only 2 (rhombotin-like 1)* | 1,13 | 0,0008 |
| | NM_024945 | RMI1 | 9q21.32 | *RMI1, RecQ mediated genome instability 1, homolog (S. cerevisiae)* | 1,15 | 0,0007 |
| | NM_173078 | SLITRK4 | Xq27.3 | *SLIT and NTRK-like family, member 4* | 1,17 | 0,0003 |
| | 2599936 | NA | NA | *NA* | 1,17 | 0,0002 |
| | NM_032328 | EFCAB2 | 1q44 | *EF-hand calcium binding domain 2* | 1,20 | 0,0006 |
| | 3306593 | NA | NA | *NA* | 1,20 | 0,0008 |
| | NM_003414 | ZNF267 | 16p11.2 | *zinc finger protein 267* | 1,22 | 0,0005 |
| | NM_000804 | FOLR3 | 11q13 | *folate receptor 3 (gamma)* | 1,40 | 0,0002 |
| | 2968444 | NA | NA | *NA* | 1,46 | 0,0006 |
| | NM_001003927 | EVI2A | 17q11.2 | *ecotropic viral integration site 2A* | 1,55 | 0,0006 |
| | NM_001047605 | KIR3DX1 | 19q13.42 | *killer cell immunoglobulin-like receptor, three domains, X1* | 1,62 | 0,0001 |
| | NM_002692 | POLE2 | 14q21-q22 | *polymerase (DNA directed), epsilon 2 (p59 subunit)* | 1,68 | 0,0003 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $T_{48}$ | NR_002781 | TSPYL3 | 20q11.21 | *TSPY-like 3 (pseudogene)* | -2,24 | 0,0003 |
| | NM_001007271 | DUSP13 | 10q22.2 | *dual specificity phosphatase 13* | -1,93 | 0,0010 |
| | NM_000561 | GSTM1 | 1p13.3 | *glutathione S-transferase M1* | -1,84 | 0,0009 |
| | NM_017805 | RASIP1 | 19q13.33 | *Ras interacting protein 1* | -1,59 | 0,0006 |
| | NM_032432 | ABLIM2 | 4p16-p15 | *actin binding LIM protein family, member 2* | -1,34 | 0,0003 |
| | AY358216 | UNQ9374 | 5q35.1 | *VCEW9374* | -1,33 | 0,0009 |
| | NM_152779 | GLIPR1L1 | 12q21.1 | *GLI pathogenesis-related 1 like 1* | -1,29 | 0,0005 |
| | 3570105 | NA | NA | *NA* | -1,22 | 0,0002 |
| | BC048800 | C10orf47 | 10p14 | *chromosome 10 open reading frame 47* | -1,21 | 0,0008 |
| | NM_000848 | GSTM2 | 1p13.3 | *glutathione S-transferase M2 (muscle)* | -1,21 | 0,0001 |
| | NM_017577 | GRAMD1C | 3q13.31 | *GRAM domain containing 1C* | -1,10 | 0,0001 |
| | NM_007031 | HSF2BP | 21q22.3 | *heat shock transcription factor 2 binding protein* | -1,09 | 0,0005 |
| | NM_012315 | KLK9 | 19q13.33 | *kallikrein-related peptidase 9* | -1,09 | 0,0004 |
| | NM_003284 | TNP1 | 2q35-q36 | *transition protein 1 (during histone to protamine replacement)* | -1,07 | 0,0010 |
| | NM_021733 | TSKS | 19q13.3 | *testis-specific kinase substrate* | -1,05 | 0,0007 |
| | NM_006801 | KDELR1 | 19q13.3 | *KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 1* | 1,04 | 0,0004 |
| | NM_012151 | F8A1 | Xq28 | *coagulation factor VIII-associated (intronic transcript) 1* | 1,11 | 0,0004 |
| | 3825163 | NA | NA | *NA* | 1,14 | 0,0000 |
| | NM_014314 | DDX58 | 9p12 | *DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58* | 1,16 | 0,0002 |
| | NM_015492 | C15orf39 | 15q24.2 | *chromosome 15 open reading frame 39* | 1,17 | 0,0005 |
| | NM_030776 | ZBP1 | 20q13.31 | *Z-DNA binding protein 1* | 1,17 | 0,0006 |
| | 3743502 | NA | NA | *NA* | 1,28 | 0,0001 |
| | NM_020650 | RCN3 | 19q13.33 | *reticulocalbin 3, EF-hand calcium binding domain* | 1,32 | 0,0002 |
| | NM_006417 | IFI44 | 1p31.1 | *interferon-induced protein 44* | 1,65 | 0,0006 |
| | NM_000804 | FOLR3 | 11q13 | *folate receptor 3 (gamma)* | 1,89 | 0,0000 |

Nota: Gene, de acordo com a nomenclatura HUGO (*Human Genome Organization*); CytoBand, localização cromossômica (*Citogenetic Band*); ACC, número de acesso do gene no banco de dados públicos (www.ncbi.nlm.nih.gov); FC – *Fold Change* ± 1,0; $T_2$, segunda colheita após angioplastia; $T_{12}$, terceira colheita após 12h; $T_{24}$, quarta colheita após 24h; $T_{36}$, quinta colheita após 36h; $T_{48}$, sexta colheita após 48h; p-valor < 0,001.

Tabela7. Genes validados listados de acordo com Localização cromossômica, celular, tipo e funções e doenças associadas.

| ACC | Gene | CytoBand | Descrição | Localização | Tipo | Funções e Doenças Associadas |
|---|---|---|---|---|---|---|
| NM_001140 | ALOX15 | 17p13.3 | *arachidonate 15-lipoxygenase* | Citoplasma | enzima | Crescimento e Proliferação Celular; Câncer; **DC**; Doença Neurológica; Morte Celular; Morfologia Tecidual; Desenvolvimento do Sistema Hematológico; Doença Hematológica; Resposta Inflamatória; Apresentação de Antígenos; Célula-Célula Sinalização e Interação; Desenvolvimento Celular; Injúria Abdominal; Bioquímica de pequenas moléculas; Doença do Sistema Reprodutor; Resposta Celular mediada pelo Sistema Imune; Transporte molecular; Resposta Imune Humoral; Trânsito de Células do Sistema Imune; Desenvolvimento Muscular e Esquelético; Ciclo Celular; Metabolismo Lipídico; Desenvolvimento de Órgãos; Funcionamento Celular; Desordem do Sistema Endócrino; Doença Metabólica; Organização Celular; Compromisso Celular; Desordem no Desenvolvimento; Desenvolvimento Tecidual; Sinalização Celular; |
| NM_001657 | AREG | 4q13-q21 | *amphiregulin (schwannoma-derived growth factor)* | Espaço Extracelular | fator de crescimento | Desordem Genética; Crescimento e Proliferação Celular; Câncer; **DC;** Morte Celular; Morfologia Tecidual; Doença Imunológica; Célula-Célula Sinalização e Interação; Desenvolvimento Celular; Injúria Abdominal; Desordem Muscular e Esquelética; Doença do Sistema Reprodutor; Desenvolvimento Muscular e Esquelético; Ciclo Celular; Doenças Dermatológicas; Movimentação Celular; Desenvolvimento de Órgãos; Funcionamento Celular; Desenvolvimento Tecidual; Desenvolvimento do Sistema Nervoso; Desordem na Conectividade Tecidual; Desenvolvimento do Sistema Reprodutor; Morfologia Tumoral; |
| NM_001114735 | BCL2A1 | 15q24.3 | *BCL2-related protein A1* | Citoplasma | outros | Crescimento e Proliferação Celular; Câncer; Morte Celular; Morfologia Tecidual; Desenvolvimento do Sistema Hematológico; Doença Imunológica; Doença Hematológica; Apresentação de Antígenos; Célula-Célula Sinalização e Interação; Sobrevivência do Organismo; **Desenvolvimento do Sistema Cardiovascular**; Ciclo Celular; Organização Celular; Compromisso Celular; Infecção; |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| NM_138578 | BCL2L1 | 20q11.21 | *BCL2-like 1* | Citoplasma | outros | Desordem Genética; Crescimento e Proliferação Celular; Câncer; Doença Neurológica; Morte Celular; Morfologia Tecidual; Desenvolvimento do Sistema Hematológico; Doença Imunológica; Doença Hematológica; Resposta Inflamatória; Célula-Célula Sinalização e Interação; Desenvolvimento Celular; Injúria Abdominal; Desordem Muscular e Esquelética; Sobrevivência do Organismo; Bioquímica de pequenas moléculas; Resposta Celular mediada pelo Sistema Imune; **Desenvolvimento do Sistema Cardiovascular;** Transporte molecular; Resposta Imune Humoral; Morfologia de Órgão; Trânsito de Células do Sistema Imune; Ciclo Celular; Metabolismo Lipídico; Desenvolvimento de Órgãos; Funcionamento Celular; Desordem do Sistema Endócrino; Doença Renal e Urológica; Doença Oftalmológica; Organização Celular; Desenvolvimento Tecidual; Hematopoese; Desenvolvimento do Sistema Nervoso; Desordem na Conectividade Tecidual; Morfologia Celular; Doença Hepática; Desenvolvimento do Sistema Endócrino; Remoção de Radicais Livres; ; |
| NM_001738 | CA1 | 8q13-q22.1 | *carbonic anhydrase I* | Citoplasma | enzima | Desordem Genética; **DC;** Doença Neurológica; Desordem Muscular e Esquelética; Bioquímica de pequenas moléculas; Desordem do Sistema Endócrino; Doença Renal e Urológica; Doença Metabólica; Doença Oftalmológica; Desenvolvimento do Sistema Visual; Estrutura e Desenvolvimento do Tecido Linfóide; ; Desenvolvimento do Sistema Digestivo; |
| NM_001866 | COX7B | Xq21.1 | *cytochrome c oxidase subunit VIIb* | Citoplasma | enzima | **DC**; Doença Neurológica; Estrutura e Desenvolvimento do Tecido Linfóide; ; Organismo Funcional; |
| NM_183013 | CREM | 10p11.21 | *cAMP responsive element modulator* | Núcleo | regulador de transcrição | Crescimento e Proliferação Celular; Câncer; Doença Neurológica; Morte Celular; Morfologia Tecidual; Sobrevivência do Organismo; **Desenvolvimento do Sistema Cardiovascular**; Morfologia de Órgão; Ciclo |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | Celular; Desordem do Sistema Endócrino; Doença Metabólica; Compromisso Celular; Desordem no Desenvolvimento; Desenvolvimento do Sistema Nervoso; Morfologia Celular; Desenvolvimento do Sistema Endócrino; |
| NM_024693 | ECHDC3 | 10p14 | *enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 3* | NA | enzima | Desordem Muscular e Esquelética; Resposta Imune Humoral; Doenças Respiratórias; |
| NM_000804 | FOLR3 | 11q13 | *folate receptor 3 (gamma)* | Espaço Extracelular | outros | Metabolismo de drogas; Transpote molecular; Bioquímica de pequenas moléculas; Metabolismo de aminoácidos Metabolismo de Vitaminas e Sais minerais; |
| NM_002084 | GPX3 | 5q23 | *glutathione peroxidase 3 (plasma)* | Espaço Extracelular | enzima | Desordem Genética; Crescimento e Proliferação Celular; Câncer; Sobrevivência do Organismo; Doença do Sistema Reprodutor; Desordem no Desenvolvimento; |
| NM_000561 | GSTM1 | 1p13.3 | *glutathione S-transferase M1* | Citoplasma | enzima | Crescimento e Proliferação Celular; Câncer; Doença Neurológica; Morte Celular; Doença do Sistema Reprodutor; |
| NM_003855 | IL18R1 | 2q12 | *interleukin 18 receptor 1* | Membrana Plasmática | receptor transmembrana | Desordem Genética**; DC**; Doença Neurológica; Desenvolvimento do Sistema Hematológico; Doença Imunológica; Resposta Inflamatória; Apresentação de Antígenos; Célula-Célula Sinalização e Interação; Injúria Abdominal; Sobrevivência do Organismo; Resposta Celular mediada pelo Sistema Imune; Resposta Imune Humoral; Trânsito de Células do Sistema Imune; Doenças Dermatológicas; Movimentação Celular; Doença Oftalmológica; Desenvolvimento do Sistema Renal; |
| NM_016232 | IL1RL1 | 2q12 | *interleukin 1 receptor-like 1* | Membrana Plasmática | receptor transmembrana | Desordem Genética; Crescimento e Proliferação Celular; Câncer; **DC**; Morte Celular; Morfologia Tecidual; Desenvolvimento do Sistema Hematológico; Doença Hematológica; Resposta Inflamatória; Apresentação de Antígenos; Célula-Célula Sinalização e Interação; Desenvolvimento Celular; Injúria Abdominal; Desordem |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | Muscular e Esquelética; Sobrevivência do Organismo; Bioquímica de pequenas moléculas; Resposta Celular mediada pelo Sistema Imune; **Desenvolvimento do Sistema Cardiovascular**; Morfologia de Órgão; Trânsito de Células do Sistema Imune; Doenças Respiratórias; Movimentação Celular; Desordem do Sistema Endócrino; Desordem no Desenvolvimento; Hematopoese; Resposta a Hipersensibilidade; |
| NM_000564 | IL5RA | 3p26-p24 | *interleukin 5 receptor, alpha* | Membrana Plasmática | receptor transmembrana | Crescimento e Proliferação Celular; **DC**; Morte Celular; Doença Imunológica; Doença Hematológica; Desenvolvimento Celular; Resposta Celular mediada pelo Sistema Imune; Doenças Dermatológicas; |
| NM_003749 | IRS2 | 13q34 | *insulin receptor substrate 2* | Citoplasma | outros | Desordem Genética; Crescimento e Proliferação Celular; Câncer; **DC**; Morte Celular; Morfologia Tecidual; Desenvolvimento do Sistema Hematológico; Doença Hematológica; Desenvolvimento Celular; Doença do Sistema Reprodutor; **Desenvolvimento do Sistema Cardiovascular**; Transporte molecular; Morfologia de Órgão; Doenças Respiratórias; Desenvolvimento Muscular e Esquelético; Ciclo Celular; Metabolismo Lipídico; Desenvolvimento de Órgãos; Funcionamento Celular; Desordem do Sistema Endócrino; Doença Metabólica; Morfologia Celular; Metabolismo do Carboidrato; Desenvolvimento do Sistema Reprodutor; Doença Hepática; Desenvolvimento do Sistema Endócrino; |
| NM_000219 | KCNE1 | 21q22.1-q22.2\|21q22.12 | *potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 1* | Membrana Plasmática | canal iônico | Desordem Genética; Câncer; **DC;** Doença Neurológica; Desenvolvimento Celular; Resposta Celular mediada pelo Sistema Imune; Desenvolvimento do Sistema Cardiovascular; Morfologia de Órgão; Trânsito de Células do Sistema Imune; Doenças Respiratórias; Desenvolvimento Muscular e Esquelético; Movimentação Celular; Desenvolvimento do Sistema Nervoso; Doença Auditiva; |
| NM_004994 | MMP9 | 20q11.2-q13.1 | *matrix metallopeptidase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type* | Espaço Extracelular | pepitase | Desordem Genética; Crescimento e Proliferação Celular; Câncer**; DC**; Doença Neurológica; Morte Celular; Morfologia Tecidual; Desenvolvimento do Sistema Hematológico; Doença Imunológica; Doença |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | *IV collagenase)* | | | Hematológica; Apresentação de Antígenos; Célula-Célula Sinalização e Interação; Desenvolvimento Celular; Injúria Abdominal; Sobrevivência do Organismo; Doença do Sistema Reprodutor; ; Desenvolvimento do Sistema Cardiovascular; Resposta Imune Humoral; Morfologia de Órgão ; Desenvolvimento Muscular e Esquelético; Ciclo Celular; Doenças Dermatológicas; Desenvolvimento de Órgãos; Desordem do Sistema Endócrino; Doença Renal e Urológica; Doença Metabólica; Doença Oftalmológica; Desordem no Desenvolvimento; Desenvolvimento Tecidual; Hematopoese; Desordem na Conectividade Tecidual; Morfologia Celular; Doença Hepática; Desenvolvimento do Sistema Endócrino; Morfologia Tumoral; Resposta a Hipersensibilidade; Infecção; Desenvolvimento do Sistema Renal; Desenvolvimento do Sistema Respiratório; Desenvolvimento do Organismo; |
| NM_001002841 | MYL4 | 17q21-qter | *myosin, light chain 4, alkali; atrial, embryonic* | Citoplasma | outros | **DC**; Resposta Inflamatória; Desordem Muscular e Esquelética; |
| NM_002616 | PER1 | 17p13.1-p12 | *period homolog 1 (Drosophila)* | Núcleo | outros | Desordem Genética; Crescimento e Proliferação Celular; Doença Imunológica; Doenças Dermatológicas; Desenvolvimento do Sistema Nervoso; |
| NM_002692 | POLE2 | 14q21-q22 | *polymerase (DNA directed), epsilon 2 (p59 subunit)* | Núcleo | enzima | Desordem Genética; Câncer; **DC;** Doença Neurológica; Doença do Sistema Reprodutor; ; Infecção; |
| NM_001078177 | SLC29A1 | 6p21.2-p21.1 | *solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member* | Membrana Plasmática | transportador | Crescimento e Proliferação Celular; Desenvolvimento do Sistema Hematológico; Resposta Inflamatória; Apresentação de Antígenos; Bioquímica de pequenas |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | *1* | | | moléculas; Transporte molecular; Metabolismo de Ácidos Nucléicos; |
| NM_018667 | SMPD3 | 16q22.1 | *sphingomyelin phosphodiesterase 3, neutral membrane (neutral sphingomyelinase II)* | Citoplasma | enzima | Desordem Genética; Doença Imunológica; Doença Hematológica; Resposta Inflamatória; Desordem Muscular e Esquelética; Bioquímica de pequenas moléculas; Metabolismo Lipídico; Desordem do Sistema Endócrino; Desordem no Desenvolvimento; Desordem na Conectividade Tecidual; Desenvolvimento do Sistema Reprodutor; Doença Gastrointestinal; |
| NM_003246 | THBS1 | 15q15 | *thrombospondin 1* | Espaço Extracelular | outros | Desordem Genética; Crescimento e Proliferação Celular; Câncer; Morte Celular; Morfologia Tecidual; Desenvolvimento do Sistema Hematológico; Doença Imunológica; Doença Hematológica; Resposta Inflamatória; Apresentação de Antígenos; Célula-Célula Sinalização e Interação; Desenvolvimento Celular; Injúria Abdominal; Desordem Muscular e Esquelética; Bioquímica de pequenas moléculas; Doença do Sistema Reprodutor; ; Resposta Celular mediada pelo Sistema Imune; **Desenvolvimento do Sistema Cardiovascular**; Transporte molecular; Resposta Imune Humoral; Trânsito de Células do Sistema Imune; Doenças Respiratórias; Desenvolvimento Muscular e Esquelético; Ciclo Celular; THBS1Metabolismo Lipídico; Movimentação Celular; Desenvolvimento de Órgãos; Funcionamento Celular; Doença Renal e Urológica; Doença Metabólica; Doença Oftalmológica; Organização Celular; Compromisso Celular; Hematopoese; Desenvolvimento do Sistema Nervoso; Desordem na Conectividade Tecidual; Morfologia Celular; Metabolismo do Carboidrato; Morfologia Tumoral; Desenvolvimento do Sistema Renal; Desenvolvimento do Sistema Respiratório; |
| NM_198153 | TREML4 | 6p21.1 | *triggering receptor expressed on myeloid cells-like 4* | NA | outros | Gene sem associações descritas no banco de dados – IPA; |

**ANEXO E**

Tabela 1. Possíveis proteínas diferencialmente expressos entre 1º IAM $T_0$ vs GC, ordenadas de modo crescente de acordo com *Fold Change*.

| m/z | p-valor | FDR | FC |
|---|---|---|---|
| 2179 | 0,000535 | 0,043 | -11,06 |
| 2158 | 0,000117 | 0,022 | -10,34 |
| 2182 | 0,000103 | 0,021 | -10,34 |
| 2180,5 | 0,000290 | 0,033 | -10,25 |
| 2195,5 | 0,000100 | 0,021 | -8,77 |
| 6109 | 0,000082 | 0,021 | -8,6 |
| 2156,5 | 0,000095 | 0,021 | -8,03 |
| 2183,5 | 0,000608 | 0,047 | -7,34 |
| 2225,5 | 0,000403 | 0,037 | -6,8 |
| 2149 | 0,000089 | 0,021 | -5,78 |
| 2201,5 | 0,000547 | 0,043 | -5,66 |
| 2173 | 0,000376 | 0,035 | -5,63 |
| 2200 | 0,000003 | 0,006 | -5,45 |
| 2150,5 | 0,000143 | 0,022 | -4,71 |
| 2135,5 | 0,000345 | 0,034 | -4,29 |
| 2153,5 | 0,000448 | 0,039 | -4,09 |
| 2213,5 | 0,003113 | 0,006 | -3,98 |
| 2128 | 0,000280 | 0,033 | -3,69 |
| 2803 | 0,000025 | 0,014 | -3,4 |
| 4267 | 0,000412 | 0,037 | -3,39 |
| 2215 | 0,000137 | 0,022 | -3,29 |
| 2129,5 | 0,000232 | 0,029 | -3,28 |
| 2641 | 0,000235 | 0,029 | -3,21 |
| 14494 | 0,000472 | 0,040 | 1,95 |
| 10547,5 | 0,000337 | 0,034 | 2,07 |
| 13009 | 0,000177 | 0,025 | 2,09 |
| 17788 | 0,000327 | 0,034 | 2,15 |
| 11896 | 0,000640 | 0,047 | 2,16 |
| 9226 | 0,000165 | 0,024 | 2,21 |
| 13010,5 | 0,000193 | 0,026 | 2,28 |
| 9217 | 0,000010 | 0,013 | 2,31 |
| 17800 | 0,000313 | 0,033 | 2,33 |
| 17797 | 0,000143 | 0,022 | 2,33 |
| 11897,5 | 0,000626 | 0,047 | 2,34 |
| 17801,5 | 0,000358 | 0,034 | 2,34 |
| 7729 | 0,000309 | 0,033 | 2,37 |
| 17792,5 | 0,000139 | 0,022 | 2,37 |
| 6394 | 0,000105 | 0,021 | 2,4 |
| 8437 | 0,000543 | 0,043 | 2,4 |
| 17803 | 0,000220 | 0,029 | 2,44 |
| 6386,5 | 0,000526 | 0,043 | 2,47 |
| 11842 | 0,000246 | 0,029 | 2,49 |
| 10757,5 | 0,000042 | 0,016 | 2,5 |
| 17804,5 | 0,000130 | 0,022 | 2,57 |
| 17807,5 | 0,000093 | 0,021 | 2,61 |
| 10760,5 | 0,000019 | 0,014 | 2,65 |
| 17806 | 0,000086 | 0,021 | 2,66 |
| 15446,5 | 0,000684 | 0,050 | 2,7 |
| 6362,5 | 0,000039 | 0,016 | 3,12 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 13022,5 | 0,000018 | 0,014 | 3,67 |
| 15460 | 0,000052 | 0,018 | 3,99 |
| 15457 | 0,000041 | 0,016 | 4,86 |
| 15458,5 | 0,000023 | 0,014 | 4,9 |

Nota: m/z, relação massa molecular e carga da molécula ionizada; p-valor < 0,001; FDR, *False Discover Rate*; FC – *Fold Change* ± 1,5.

Tabela 2. Possíveis proteínas diferencialmente expressos entre 1º IAM $T_2$ vs GC, ordenadas de modo crescente de acordo com *Fold Change*.

| m/z | p-valor | FDR | FC |
|---|---|---|---|
| 2228,5 | 0,000391 | 0,024 | -37,77 |
| 2203 | 0,000785 | 0,038 | -11,94 |
| 2194 | 0,000889 | 0,040 | -11,25 |
| 2195,5 | 0,000136 | 0,012 | -9,86 |
| 2225,5 | 0,000160 | 0,012 | -7,14 |
| 2722 | 0,000709 | 0,035 | -5,93 |
| 2173 | 0,000105 | 0,010 | -5,79 |
| 4261 | 0,000123 | 0,011 | -4,57 |
| 2153,5 | 0,000206 | 0,014 | -4,47 |
| 3755,5 | 0,000810 | 0,038 | -4,2 |
| 2128 | 0,000910 | 0,040 | -3,81 |
| 4225 | 0,000501 | 0,027 | -3,64 |
| 11338 | 0,000086 | 0,009 | -2,63 |
| 11339,5 | 0,000154 | 0,012 | -2,58 |
| 5168,5 | 0,000255 | 0,017 | -2,18 |
| 5432,5 | 0,000814 | 0,038 | -2,13 |
| 12689,5 | 0,000169 | 0,012 | 1,92 |
| 7729 | 0,000795 | 0,038 | 1,99 |
| 9226 | 0,000124 | 0,011 | 2,09 |
| 12686,5 | 0,000507 | 0,027 | 2,1 |
| 9076 | 0,000164 | 0,012 | 2,16 |
| 8624,5 | 0,000847 | 0,039 | 2,17 |
| 9220 | 0,000040 | 0,007 | 2,18 |
| 8653 | 0,000406 | 0,024 | 2,23 |
| 12803,5 | 0,000029 | 0,007 | 2,24 |
| 6358 | 0,000116 | 0,011 | 2,25 |
| 8623 | 0,000701 | 0,035 | 2,25 |
| 14803 | 0,000421 | 0,024 | 2,25 |
| 12685 | 0,000827 | 0,038 | 2,27 |
| 12781 | 0,000693 | 0,035 | 2,28 |
| 6359,5 | 0,000068 | 0,009 | 2,3 |
| 4474 | 0,000226 | 0,015 | 2,35 |
| 11893 | 0,000614 | 0,032 | 2,35 |
| 17840,5 | 0,000272 | 0,018 | 2,37 |
| 13049,5 | 0,000328 | 0,020 | 2,42 |
| 12683,5 | 0,000790 | 0,038 | 2,42 |
| 10760,5 | 0,000006 | 0,003 | 2,47 |
| 14827 | 0,000677 | 0,035 | 2,51 |
| 6374,5 | 0,000432 | 0,024 | 2,53 |
| 14815 | 0,000091 | 0,010 | 2,58 |
| 11897,5 | 0,000151 | 0,012 | 2,58 |
| 17831,5 | 0,000154 | 0,012 | 2,59 |
| 10757,5 | 0,000028 | 0,007 | 2,63 |
| 6511 | 0,000014 | 0,005 | 2,63 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 10547,5 | 0,000157 | 0,012 | 2,64 |
| 17825,5 | 0,000170 | 0,012 | 2,66 |
| 17833 | 0,000112 | 0,011 | 2,68 |
| 6386,5 | 0,000032 | 0,007 | 2,68 |
| 14816,5 | 0,000069 | 0,009 | 2,69 |
| 11894,5 | 0,000082 | 0,009 | 2,75 |
| 6362,5 | 0,000940 | 0,041 | 2,75 |
| 9217 | 0,000004 | 0,003 | 2,8 |
| 17801,5 | 0,000128 | 0,011 | 2,8 |
| 11896 | 0,000027 | 0,007 | 2,83 |
| 14818 | 0,000070 | 0,009 | 2,85 |
| 17837,5 | 0,000035 | 0,007 | 2,86 |
| 17834,5 | 0,000054 | 0,008 | 2,86 |
| 17800 | 0,000078 | 0,009 | 2,87 |
| 17803 | 0,000084 | 0,009 | 2,91 |
| 6394 | 0,000001 | 0,003 | 2,91 |
| 6382 | 0,000892 | 0,040 | 2,95 |
| 17836 | 0,000037 | 0,007 | 2,95 |
| 14566 | 0,000012 | 0,004 | 3,02 |
| 17804,5 | 0,000056 | 0,008 | 3,02 |
| 17807,5 | 0,000046 | 0,007 | 3,03 |
| 14494 | 0,000007 | 0,003 | 3,05 |
| 17806 | 0,000041 | 0,007 | 3,09 |
| 15460 | 0,000967 | 0,041 | 3,1 |
| 17797 | 0,000010 | 0,004 | 3,16 |
| 15458,5 | 0,000960 | 0,041 | 3,17 |
| 14819,5 | 0,000035 | 0,007 | 3,21 |
| 17788 | 0,000001 | 0,003 | 3,24 |
| 8426,5 | 0,000175 | 0,012 | 3,31 |
| 14462,5 | 0,000006 | 0,003 | 3,33 |
| 6373 | 0,000193 | 0,013 | 3,34 |
| 17792,5 | 0,000002 | 0,003 | 3,38 |
| 14234,5 | 0,000322 | 0,020 | 3,49 |
| 14570,5 | 0,000003 | 0,003 | 3,51 |
| 8423,5 | 0,000093 | 0,010 | 3,56 |
| 17993,5 | 0,000407 | 0,024 | 3,77 |
| 8422 | 0,000081 | 0,009 | 3,82 |
| 17992 | 0,000474 | 0,026 | 3,84 |
| 6482,5 | 0,000027 | 0,007 | 3,85 |
| 8372,5 | 0,000912 | 0,040 | 4,13 |
| 8417,5 | 0,000308 | 0,020 | 4,14 |
| 8416 | 0,000433 | 0,024 | 4,14 |
| 8419 | 0,000097 | 0,010 | 4,26 |
| 8374 | 0,000423 | 0,024 | 4,3 |
| 6479,5 | 0,000079 | 0,009 | 4,47 |
| 6368,5 | 0,000023 | 0,007 | 5,7 |
| 6370 | 0,000005 | 0,003 | 7,46 |

Nota: m/z, relação massa molecular e carga da molécula ionizada; p-valor < 0,001; FDR, *False Discover Rate*; FC – *Fold Change* ± 1,5.

Tabela 3. Possíveis proteínas diferencialmente expressos entre 1º IAM $T_{12}$ vs GC, ordenadas de modo crescente de acordo com *Fold Change* .

| m/z | p-valor | FDR | FC |
|---|---|---|---|
| 2228,5 | 0,002114 | 0,035 | -32,79 |
| 2191 | 0,002485 | 0,039 | -20,99 |
| 2167 | 0,001148 | 0,025 | -12,46 |
| 2189,5 | 0,000958 | 0,023 | -12,02 |
| 2195,5 | 0,002170 | 0,036 | -11,45 |
| 2192,5 | 0,000672 | 0,019 | -7,23 |
| 2722 | 0,000394 | 0,015 | -6,85 |
| 2146 | 0,000969 | 0,023 | -6,48 |
| 2210,5 | 0,003685 | 0,047 | -5,94 |
| 2689 | 0,000787 | 0,020 | -5,62 |
| 2150,5 | 0,000350 | 0,014 | -5,61 |
| 2639,5 | 0,001058 | 0,024 | -5,49 |
| 2201,5 | 0,004183 | 0,049 | -5,26 |
| 2173 | 0,000962 | 0,023 | -4,96 |
| 2170 | 0,001782 | 0,033 | -4,89 |
| 2144,5 | 0,003943 | 0,048 | -4,87 |
| 8005 | 0,003480 | 0,045 | -4,53 |
| 6049 | 0,002959 | 0,042 | -4,45 |
| 2687,5 | 0,001977 | 0,035 | -4,24 |
| 2215 | 0,003268 | 0,044 | -4,04 |
| 2686 | 0,000268 | 0,012 | -4,03 |
| 6169 | 0,002073 | 0,035 | -3,9 |
| 2152 | 0,000606 | 0,019 | -3,83 |
| 5339,5 | 0,000119 | 0,008 | -3,81 |
| 2153,5 | 0,001335 | 0,027 | -3,67 |
| 2128 | 0,002849 | 0,042 | -3,54 |
| 7810 | 0,000110 | 0,007 | -3,46 |
| 2723,5 | 0,000298 | 0,013 | -3,37 |
| 3755,5 | 0,003689 | 0,047 | -3,36 |
| 2641 | 0,003048 | 0,043 | -3,35 |
| 2756,5 | 0,001484 | 0,029 | -3,35 |
| 6134,5 | 0,002696 | 0,041 | -3,28 |
| 5450,5 | 0,001325 | 0,027 | -3,19 |
| 6247 | 0,002746 | 0,041 | -3,11 |
| 2684,5 | 0,000719 | 0,020 | -3,08 |
| 8003,5 | 0,003355 | 0,044 | -3,01 |
| 2701 | 0,002265 | 0,036 | -2,95 |
| 5683 | 0,000455 | 0,016 | -2,88 |
| 2737 | 0,002869 | 0,042 | -2,58 |
| 2729,5 | 0,003120 | 0,044 | -2,57 |
| 4622,5 | 0,004049 | 0,048 | -2,49 |
| 5842 | 0,001551 | 0,030 | -2,49 |
| 7274,5 | 0,000506 | 0,018 | -2,48 |
| 5486,5 | 0,002083 | 0,035 | -2,33 |
| 16498 | 0,002748 | 0,041 | -2,25 |
| 7324 | 0,004129 | 0,049 | -2,11 |
| 11021,5 | 0,000775 | 0,020 | 1,56 |
| 3298 | 0,002749 | 0,041 | 1,63 |
| 15091 | 0,001834 | 0,033 | 1,64 |
| 12803,5 | 0,003843 | 0,047 | 1,68 |
| 15355 | 0,003844 | 0,047 | 1,71 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 10547,5 | 0,002021 | 0,035 | 1,71 |
| 13009 | 0,002255 | 0,036 | 1,74 |
| 15359,5 | 0,004016 | 0,048 | 1,75 |
| 14570,5 | 0,001934 | 0,034 | 1,75 |
| 15166 | 0,003238 | 0,044 | 1,76 |
| 13010,5 | 0,003043 | 0,043 | 1,77 |
| 15353,5 | 0,001400 | 0,028 | 1,77 |
| 9076 | 0,001522 | 0,030 | 1,8 |
| 15092,5 | 0,000714 | 0,020 | 1,8 |
| 15842,5 | 0,002950 | 0,042 | 1,8 |
| 15844 | 0,002154 | 0,036 | 1,82 |
| 15841 | 0,003779 | 0,047 | 1,82 |
| 15167,5 | 0,003285 | 0,044 | 1,85 |
| 15130 | 0,000210 | 0,010 | 1,85 |
| 15845,5 | 0,001359 | 0,027 | 1,85 |
| 15839,5 | 0,003466 | 0,045 | 1,87 |
| 15128,5 | 0,000217 | 0,010 | 1,87 |
| 13022,5 | 0,001290 | 0,027 | 1,87 |
| 11164 | 0,004073 | 0,048 | 1,88 |
| 16063 | 0,002431 | 0,038 | 1,88 |
| 6394 | 0,000175 | 0,009 | 1,89 |
| 15847 | 0,000905 | 0,022 | 1,9 |
| 15157 | 0,002887 | 0,042 | 1,91 |
| 15094 | 0,000424 | 0,016 | 1,92 |
| 15352 | 0,000449 | 0,016 | 1,92 |
| 15095,5 | 0,000447 | 0,016 | 1,92 |
| 12689,5 | 0,001954 | 0,034 | 1,92 |
| 15131,5 | 0,000079 | 0,007 | 1,93 |
| 14566 | 0,000579 | 0,018 | 1,94 |
| 15127 | 0,000210 | 0,010 | 1,95 |
| 15097 | 0,000260 | 0,012 | 1,95 |
| 15304 | 0,001137 | 0,025 | 1,95 |
| 15838 | 0,002619 | 0,040 | 1,95 |
| 15848,5 | 0,000648 | 0,019 | 1,96 |
| 15098,5 | 0,000159 | 0,009 | 1,97 |
| 16039 | 0,003849 | 0,047 | 1,97 |
| 12683,5 | 0,003470 | 0,045 | 1,98 |
| 16064,5 | 0,001285 | 0,027 | 1,99 |
| 15343 | 0,002926 | 0,042 | 2 |
| 15830,5 | 0,003283 | 0,044 | 2 |
| 15125,5 | 0,000233 | 0,011 | 2,01 |
| 16037,5 | 0,003337 | 0,044 | 2,01 |
| 15829 | 0,003644 | 0,047 | 2,01 |
| 15002,5 | 0,003710 | 0,047 | 2,02 |
| 15100 | 0,000095 | 0,007 | 2,02 |
| 15133 | 0,000056 | 0,006 | 2,02 |
| 15850 | 0,000502 | 0,018 | 2,02 |
| 15832 | 0,002520 | 0,039 | 2,03 |
| 15836,5 | 0,001774 | 0,033 | 2,04 |
| 16036 | 0,003370 | 0,044 | 2,04 |
| 16108 | 0,003355 | 0,044 | 2,04 |
| 15155,5 | 0,001278 | 0,027 | 2,04 |
| 16066 | 0,001111 | 0,025 | 2,04 |
| 15833,5 | 0,001937 | 0,034 | 2,04 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 6386,5 | 0,000315 | 0,013 | 2,05 |
| 15851,5 | 0,000541 | 0,018 | 2,05 |
| 12686,5 | 0,000941 | 0,023 | 2,05 |
| 15854,5 | 0,000669 | 0,019 | 2,05 |
| 12685 | 0,001299 | 0,027 | 2,05 |
| 13876 | 0,003542 | 0,046 | 2,05 |
| 15853 | 0,000556 | 0,018 | 2,06 |
| 13877,5 | 0,004027 | 0,048 | 2,06 |
| 15856 | 0,000708 | 0,020 | 2,06 |
| 15835 | 0,001559 | 0,030 | 2,06 |
| 15005,5 | 0,003850 | 0,047 | 2,07 |
| 15350,5 | 0,000219 | 0,010 | 2,07 |
| 15124 | 0,000246 | 0,011 | 2,07 |
| 15857,5 | 0,000724 | 0,020 | 2,08 |
| 15827,5 | 0,002754 | 0,041 | 2,08 |
| 16067,5 | 0,001064 | 0,024 | 2,08 |
| 15122,5 | 0,000343 | 0,014 | 2,09 |
| 8621,5 | 0,003827 | 0,047 | 2,09 |
| 6380,5 | 0,004012 | 0,048 | 2,09 |
| 14803 | 0,001122 | 0,025 | 2,09 |
| 15323,5 | 0,001893 | 0,034 | 2,11 |
| 15004 | 0,002522 | 0,039 | 2,11 |
| 15859 | 0,000724 | 0,020 | 2,12 |
| 17842 | 0,001633 | 0,031 | 2,12 |
| 16034,5 | 0,002043 | 0,035 | 2,12 |
| 8623 | 0,002316 | 0,037 | 2,13 |
| 15134,5 | 0,000032 | 0,005 | 2,14 |
| 8653 | 0,003217 | 0,044 | 2,14 |
| 15101,5 | 0,000053 | 0,006 | 2,15 |
| 8624,5 | 0,001887 | 0,034 | 2,15 |
| 15154 | 0,000610 | 0,019 | 2,15 |
| 15322 | 0,000701 | 0,020 | 2,16 |
| 15121 | 0,000263 | 0,012 | 2,16 |
| 15305,5 | 0,000139 | 0,008 | 2,16 |
| 16069 | 0,000825 | 0,021 | 2,16 |
| 14660,5 | 0,003531 | 0,046 | 2,17 |
| 15826 | 0,002044 | 0,035 | 2,18 |
| 15932,5 | 0,004236 | 0,049 | 2,18 |
| 15320,5 | 0,000280 | 0,012 | 2,19 |
| 15860,5 | 0,000605 | 0,019 | 2,19 |
| 15349 | 0,000218 | 0,010 | 2,19 |
| 15344,5 | 0,001219 | 0,026 | 2,21 |
| 6349 | 0,003241 | 0,044 | 2,22 |
| 14657,5 | 0,001246 | 0,026 | 2,22 |
| 9217 | 0,002106 | 0,035 | 2,22 |
| 15817 | 0,002015 | 0,035 | 2,22 |
| 15136 | 0,000021 | 0,004 | 2,23 |
| 15871 | 0,001121 | 0,025 | 2,23 |
| 15872,5 | 0,001246 | 0,026 | 2,23 |
| 15869,5 | 0,000908 | 0,022 | 2,23 |
| 15152,5 | 0,000376 | 0,015 | 2,24 |
| 15874 | 0,001310 | 0,027 | 2,25 |
| 15862 | 0,000567 | 0,018 | 2,25 |
| 15868 | 0,000778 | 0,020 | 2,25 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 16028,5 | 0,002751 | 0,041 | 2,26 |
| 16109,5 | 0,001416 | 0,028 | 2,26 |
| 15319 | 0,000148 | 0,009 | 2,26 |
| 15899,5 | 0,003746 | 0,047 | 2,26 |
| 16033 | 0,001016 | 0,024 | 2,26 |
| 15551,5 | 0,002257 | 0,036 | 2,27 |
| 15875,5 | 0,001342 | 0,027 | 2,27 |
| 16070,5 | 0,000528 | 0,018 | 2,27 |
| 15866,5 | 0,000659 | 0,019 | 2,28 |
| 16115,5 | 0,002931 | 0,042 | 2,28 |
| 15877 | 0,001419 | 0,028 | 2,29 |
| 15865 | 0,000582 | 0,018 | 2,29 |
| 15346 | 0,000535 | 0,018 | 2,29 |
| 15884,5 | 0,003765 | 0,047 | 2,29 |
| 15347,5 | 0,000235 | 0,011 | 2,29 |
| 15316 | 0,000128 | 0,008 | 2,3 |
| 15317,5 | 0,000110 | 0,007 | 2,3 |
| 15883 | 0,003020 | 0,043 | 2,3 |
| 15863,5 | 0,000524 | 0,018 | 2,3 |
| 16159 | 0,001938 | 0,034 | 2,3 |
| 15881,5 | 0,002516 | 0,039 | 2,3 |
| 15824,5 | 0,001196 | 0,026 | 2,31 |
| 15880 | 0,001875 | 0,034 | 2,31 |
| 15878,5 | 0,001575 | 0,030 | 2,31 |
| 16157,5 | 0,002566 | 0,039 | 2,31 |
| 15886 | 0,003912 | 0,048 | 2,31 |
| 13049,5 | 0,000753 | 0,020 | 2,31 |
| 15119,5 | 0,000095 | 0,007 | 2,31 |
| 15887,5 | 0,004123 | 0,049 | 2,32 |
| 15889 | 0,004136 | 0,049 | 2,32 |
| 14494 | 0,000051 | 0,006 | 2,32 |
| 16082,5 | 0,002647 | 0,040 | 2,33 |
| 16111 | 0,001226 | 0,026 | 2,33 |
| 15898 | 0,002924 | 0,042 | 2,33 |
| 16114 | 0,001581 | 0,030 | 2,33 |
| 15890,5 | 0,003853 | 0,047 | 2,33 |
| 6482,5 | 0,000451 | 0,016 | 2,33 |
| 15896,5 | 0,002746 | 0,041 | 2,34 |
| 15892 | 0,003402 | 0,045 | 2,34 |
| 15895 | 0,002663 | 0,040 | 2,34 |
| 15137,5 | 0,000016 | 0,004 | 2,34 |
| 16112,5 | 0,001228 | 0,026 | 2,35 |
| 17840,5 | 0,000308 | 0,013 | 2,35 |
| 15151 | 0,000199 | 0,010 | 2,36 |
| 15103 | 0,000012 | 0,004 | 2,36 |
| 15893,5 | 0,002954 | 0,042 | 2,36 |
| 15314,5 | 0,000046 | 0,006 | 2,37 |
| 15113,5 | 0,000091 | 0,007 | 2,37 |
| 15818,5 | 0,001049 | 0,024 | 2,38 |
| 16072 | 0,000314 | 0,013 | 2,38 |
| 15563,5 | 0,000200 | 0,010 | 2,38 |
| 15112 | 0,000059 | 0,006 | 2,38 |
| 15307 | 0,000016 | 0,004 | 2,39 |
| 15581,5 | 0,002115 | 0,035 | 2,39 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 15823 | 0,000842 | 0,021 | 2,4 |
| 16031,5 | 0,000627 | 0,019 | 2,4 |
| 15115 | 0,000093 | 0,007 | 2,41 |
| 16030 | 0,000858 | 0,021 | 2,41 |
| 15584,5 | 0,003259 | 0,044 | 2,42 |
| 15583 | 0,002243 | 0,036 | 2,42 |
| 15118 | 0,000064 | 0,006 | 2,42 |
| 15116,5 | 0,000085 | 0,007 | 2,42 |
| 15149,5 | 0,000174 | 0,009 | 2,43 |
| 16073,5 | 0,000262 | 0,012 | 2,43 |
| 15562 | 0,000159 | 0,009 | 2,44 |
| 6379 | 0,000775 | 0,020 | 2,44 |
| 15139 | 0,000013 | 0,004 | 2,44 |
| 15142 | 0,000040 | 0,005 | 2,45 |
| 6362,5 | 0,003340 | 0,044 | 2,45 |
| 15553 | 0,000682 | 0,020 | 2,45 |
| 15143,5 | 0,000071 | 0,006 | 2,46 |
| 13895,5 | 0,003179 | 0,044 | 2,46 |
| 15580 | 0,001635 | 0,031 | 2,46 |
| 15110,5 | 0,000020 | 0,004 | 2,47 |
| 15820 | 0,000700 | 0,020 | 2,47 |
| 8437 | 0,002383 | 0,038 | 2,48 |
| 15821,5 | 0,000618 | 0,019 | 2,48 |
| 13891 | 0,004206 | 0,049 | 2,48 |
| 15145 | 0,000110 | 0,007 | 2,48 |
| 15140,5 | 0,000020 | 0,004 | 2,48 |
| 16081 | 0,001422 | 0,028 | 2,48 |
| 15313 | 0,000015 | 0,004 | 2,48 |
| 15443,5 | 0,003708 | 0,047 | 2,49 |
| 6511 | 0,000027 | 0,005 | 2,49 |
| 16075 | 0,000304 | 0,013 | 2,49 |
| 15565 | 0,000129 | 0,008 | 2,49 |
| 17708,5 | 0,000403 | 0,015 | 2,5 |
| 15104,5 | 0,000003 | 0,003 | 2,51 |
| 11179 | 0,000059 | 0,006 | 2,52 |
| 15109 | 0,000007 | 0,004 | 2,53 |
| 15311,5 | 0,000008 | 0,004 | 2,53 |
| 15446,5 | 0,002545 | 0,039 | 2,53 |
| 15578,5 | 0,001164 | 0,026 | 2,54 |
| 15308,5 | 0,000004 | 0,003 | 2,54 |
| 15310 | 0,000003 | 0,003 | 2,55 |
| 10760,5 | 0,000459 | 0,016 | 2,55 |
| 15146,5 | 0,000100 | 0,007 | 2,55 |
| 15148 | 0,000118 | 0,008 | 2,55 |
| 15107,5 | 0,000003 | 0,003 | 2,55 |
| 15106 | 0,000001 | 0,003 | 2,56 |
| 15559 | 0,000191 | 0,010 | 2,56 |
| 15560,5 | 0,000165 | 0,009 | 2,56 |
| 16076,5 | 0,000511 | 0,018 | 2,56 |
| 16079,5 | 0,000969 | 0,023 | 2,58 |
| 13922,5 | 0,003917 | 0,048 | 2,6 |
| 13892,5 | 0,003088 | 0,043 | 2,61 |
| 15554,5 | 0,000204 | 0,010 | 2,61 |
| 11180,5 | 0,000086 | 0,007 | 2,61 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 15557,5 | 0,000153 | 0,009 | 2,62 |
| 16078 | 0,000713 | 0,020 | 2,62 |
| 17837,5 | 0,000033 | 0,005 | 2,64 |
| 6347,5 | 0,001043 | 0,024 | 2,67 |
| 15556 | 0,000114 | 0,008 | 2,68 |
| 6479,5 | 0,000788 | 0,020 | 2,69 |
| 17836 | 0,000031 | 0,005 | 2,73 |
| 12709 | 0,001738 | 0,033 | 2,74 |
| 17710 | 0,000221 | 0,010 | 2,74 |
| 10757,5 | 0,000077 | 0,007 | 2,76 |
| 16873 | 0,003281 | 0,044 | 2,76 |
| 16519 | 0,002379 | 0,038 | 2,77 |
| 17834,5 | 0,000031 | 0,005 | 2,8 |
| 16874,5 | 0,003354 | 0,044 | 2,89 |
| 17788 | 0,000029 | 0,005 | 2,93 |
| 17792,5 | 0,000033 | 0,005 | 2,94 |
| 16876 | 0,003779 | 0,047 | 2,95 |
| 17722 | 0,002304 | 0,037 | 2,96 |
| 17720,5 | 0,001766 | 0,033 | 2,98 |
| 15568 | 0,000063 | 0,006 | 2,98 |
| 17833 | 0,000023 | 0,004 | 3 |
| 17807,5 | 0,000053 | 0,006 | 3,03 |
| 15574 | 0,000532 | 0,018 | 3,06 |
| 17723,5 | 0,002080 | 0,035 | 3,07 |
| 16525 | 0,001822 | 0,033 | 3,09 |
| 17806 | 0,000048 | 0,006 | 3,1 |
| 17801,5 | 0,000077 | 0,007 | 3,11 |
| 15572,5 | 0,000321 | 0,013 | 3,11 |
| 17726,5 | 0,003325 | 0,044 | 3,12 |
| 14278 | 0,002264 | 0,036 | 3,12 |
| 15569,5 | 0,000106 | 0,007 | 3,13 |
| 17804,5 | 0,000053 | 0,006 | 3,13 |
| 17719 | 0,001190 | 0,026 | 3,13 |
| 17803 | 0,000058 | 0,006 | 3,14 |
| 14234,5 | 0,000537 | 0,018 | 3,15 |
| 14287 | 0,002968 | 0,042 | 3,15 |
| 14291,5 | 0,003960 | 0,048 | 3,18 |
| 17800 | 0,000053 | 0,006 | 3,19 |
| 17725 | 0,002135 | 0,035 | 3,2 |
| 15571 | 0,000158 | 0,009 | 3,21 |
| 8416 | 0,003622 | 0,047 | 3,22 |
| 14282,5 | 0,001794 | 0,033 | 3,22 |
| 17831,5 | 0,000014 | 0,004 | 3,23 |
| 6358 | 0,000093 | 0,007 | 3,24 |
| 14462,5 | 0,000011 | 0,004 | 3,25 |
| 14279,5 | 0,002020 | 0,035 | 3,25 |
| 6359,5 | 0,000401 | 0,015 | 3,26 |
| 16520,5 | 0,001234 | 0,026 | 3,26 |
| 17797 | 0,000017 | 0,004 | 3,27 |
| 14290 | 0,003318 | 0,044 | 3,28 |
| 17825,5 | 0,000017 | 0,004 | 3,31 |
| 17716 | 0,000454 | 0,016 | 3,32 |
| 17717,5 | 0,000620 | 0,019 | 3,35 |
| 16522 | 0,000634 | 0,019 | 3,63 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 13975 | 0,001867 | 0,034 | 3,67 |
| 16523,5 | 0,000467 | 0,016 | 3,86 |
| 13963 | 0,001150 | 0,025 | 4,09 |
| 13970,5 | 0,001134 | 0,025 | 4,61 |
| 13964,5 | 0,000768 | 0,020 | 4,79 |
| 13966 | 0,000749 | 0,020 | 5,02 |
| 13969 | 0,000891 | 0,022 | 5,07 |
| 13967,5 | 0,000750 | 0,020 | 5,15 |

Nota: m/z, relação massa molecular e carga da molécula ionizada; p-valor < 0,001; FDR, *False Discover Rate*; FC – *Fold Change* ± 1,5.

Tabela 4. Possíveis proteínas diferencialmente expressos entre 1º IAM $T_{24}$ vs GC, ordenadas de modo crescente de acordo com *Fold Change*.

| **m/z** | **p-valor** | **FDR** | **FC** |
|---|---|---|---|
| 2189,5 | 0,000108 | 0,018 | -15,94 |
| 2188 | 0,000047 | 0,015 | -12,42 |
| 2195,5 | 0,000057 | 0,015 | -12,05 |
| 2168,5 | 0,000433 | 0,035 | -8,83 |
| 2155 | 0,000557 | 0,037 | -7,79 |
| 2150,5 | 0,000121 | 0,018 | -7,66 |
| 2146 | 0,000543 | 0,037 | -7,39 |
| 2171,5 | 0,000058 | 0,015 | -6,41 |
| 2177,5 | 0,000339 | 0,031 | -6,38 |
| 2173 | 0,000159 | 0,021 | -6,23 |
| 2149 | 0,000122 | 0,018 | -6,11 |
| 2200 | 0,000010 | 0,007 | -5,61 |
| 2152 | 0,000411 | 0,034 | -4,55 |
| 6029,5 | 0,000115 | 0,018 | -4,33 |
| 4265,5 | 0,000348 | 0,031 | -4,21 |
| 4243 | 0,000187 | 0,023 | -3,7 |
| 4279 | 0,000141 | 0,019 | -3,48 |
| 2129,5 | 0,000824 | 0,042 | -3,38 |
| 2666,5 | 0,000672 | 0,038 | -3,2 |
| 5450,5 | 0,000185 | 0,023 | -3,2 |
| 4244,5 | 0,000066 | 0,015 | -3,14 |
| 13417 | 0,000864 | 0,042 | -2,72 |
| 5452 | 0,000580 | 0,037 | -2,67 |
| 7552 | 0,000096 | 0,018 | -2,67 |
| 2731 | 0,000257 | 0,027 | -2,66 |
| 7324 | 0,000476 | 0,036 | -2,62 |
| 2708,5 | 0,000339 | 0,031 | -2,52 |
| 5227 | 0,000123 | 0,018 | -2,5 |
| 5164 | 0,000567 | 0,037 | -2,4 |
| 5225,5 | 0,000127 | 0,018 | -2,37 |
| 15106 | 0,000720 | 0,038 | 1,78 |
| 15113,5 | 0,000952 | 0,044 | 1,79 |
| 15107,5 | 0,000702 | 0,038 | 1,79 |
| 15109 | 0,000663 | 0,038 | 1,8 |
| 15110,5 | 0,000605 | 0,037 | 1,8 |
| 15112 | 0,000515 | 0,037 | 1,83 |
| 14462,5 | 0,000580 | 0,037 | 1,93 |
| 8623 | 0,000948 | 0,044 | 2,06 |
| 8624,5 | 0,000425 | 0,035 | 2,15 |
| 6511 | 0,000044 | 0,015 | 2,15 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 9217 | 0,000576 | 0,037 | 2,29 |
| 15568 | 0,000563 | 0,037 | 2,3 |
| 15569,5 | 0,000716 | 0,038 | 2,32 |
| 15551,5 | 0,000377 | 0,032 | 2,37 |
| 15550 | 0,000609 | 0,037 | 2,38 |
| 15571 | 0,000854 | 0,042 | 2,41 |
| 6482,5 | 0,000233 | 0,027 | 2,42 |
| 15553 | 0,000253 | 0,027 | 2,45 |
| 15548,5 | 0,000813 | 0,042 | 2,47 |
| 4393 | 0,000788 | 0,041 | 2,49 |
| 15554,5 | 0,000263 | 0,027 | 2,5 |
| 15004 | 0,000875 | 0,042 | 2,54 |
| 6394 | 0,000024 | 0,013 | 2,59 |
| 15556 | 0,000300 | 0,029 | 2,6 |
| 15557,5 | 0,000548 | 0,037 | 2,61 |
| 15005,5 | 0,000863 | 0,042 | 2,65 |
| 15007 | 0,000991 | 0,045 | 2,72 |
| 6380,5 | 0,000903 | 0,043 | 2,73 |
| 11284 | 0,000037 | 0,015 | 2,78 |
| 8299 | 0,000648 | 0,038 | 2,79 |
| 6379 | 0,000356 | 0,031 | 2,8 |
| 6386,5 | 0,000037 | 0,015 | 2,81 |
| 17807,5 | 0,000088 | 0,017 | 3 |
| 6358 | 0,000016 | 0,010 | 3,14 |
| 17806 | 0,000075 | 0,016 | 3,15 |
| 14234,5 | 0,000489 | 0,036 | 3,17 |
| 12668,5 | 0,000248 | 0,027 | 3,25 |
| 17804,5 | 0,000080 | 0,016 | 3,29 |
| 14494 | 0,000008 | 0,007 | 3,46 |
| 17803 | 0,000065 | 0,015 | 3,54 |
| 8300,5 | 0,000714 | 0,038 | 3,6 |
| 17801,5 | 0,000063 | 0,015 | 3,65 |
| 17800 | 0,000043 | 0,015 | 3,73 |
| 17797 | 0,000010 | 0,007 | 3,73 |
| 17792,5 | 0,000003 | 0,006 | 3,75 |
| 17788 | 0,000001 | 0,002 | 3,82 |
| 13631,5 | 0,000491 | 0,036 | 3,9 |
| 13630 | 0,000873 | 0,042 | 4,55 |
| 13916,5 | 0,000287 | 0,028 | 5,35 |
| 13909 | 0,000648 | 0,038 | 6,03 |
| 13910,5 | 0,000602 | 0,037 | 6,39 |
| 13915 | 0,000194 | 0,023 | 6,42 |
| 13912 | 0,000449 | 0,035 | 6,84 |
| 13913,5 | 0,000287 | 0,028 | 7,77 |

Nota: m/z, relação massa molecular e carga da molécula ionizada; p-valor < 0,001; FDR, *False Discover Rate*; FC – *Fold Change* ± 1,5.

Tabela 5. Possíveis proteínas diferencialmente expressos entre 1º IAM $T_{36}$ vs GC, ordenadas de modo crescente de acordo com *Fold Change*.

| m/z | p-valor | FDR | FC |
|---|---|---|---|
| 2194 | 0.000341 | 0.025 | -9.96 |
| 2203 | 0.000770 | 0.039 | -8.3 |
| 2195.5 | 0.000803 | 0.040 | -7.87 |
| 3704.5 | 0.000608 | 0.032 | -4.88 |
| 2150.5 | 0.000941 | 0.042 | -4.64 |
| 2200 | 0.000830 | 0.040 | -3.99 |
| 7339 | 0.000298 | 0.023 | -3.47 |
| 2128 | 0.000998 | 0.043 | -3.25 |
| 5863 | 0.000122 | 0.017 | -2.86 |
| 2708.5 | 0.000466 | 0.028 | -2.64 |
| 5987.5 | 0.000329 | 0.024 | -2.51 |
| 5444.5 | 0.000801 | 0.040 | -2.38 |
| 3938.5 | 0.000305 | 0.023 | -2.25 |
| 15364 | 0.000266 | 0.022 | 1.88 |
| 4474 | 0.000832 | 0.040 | 1.96 |
| 14462.5 | 0.000151 | 0.018 | 2.04 |
| 15362.5 | 0.000105 | 0.017 | 2.05 |
| 10547.5 | 0.000550 | 0.031 | 2.06 |
| 10760.5 | 0.000895 | 0.042 | 2.09 |
| 14566 | 0.000526 | 0.030 | 2.1 |
| 15356.5 | 0.000215 | 0.020 | 2.14 |
| 15569.5 | 0.000942 | 0.042 | 2.14 |
| 15353.5 | 0.000189 | 0.020 | 2.15 |
| 15355 | 0.000204 | 0.020 | 2.16 |
| 15361 | 0.000076 | 0.017 | 2.16 |
| 15553 | 0.000721 | 0.038 | 2.16 |
| 15359.5 | 0.000051 | 0.017 | 2.2 |
| 14570.5 | 0.000372 | 0.025 | 2.2 |
| 17837.5 | 0.000208 | 0.020 | 2.21 |
| 15358 | 0.000079 | 0.017 | 2.21 |
| 10757.5 | 0.000116 | 0.017 | 2.21 |
| 15352 | 0.000160 | 0.018 | 2.23 |
| 15350.5 | 0.000221 | 0.020 | 2.26 |
| 14494 | 0.000092 | 0.017 | 2.26 |
| 15349 | 0.000517 | 0.030 | 2.27 |
| 15568 | 0.000278 | 0.022 | 2.27 |
| 15554.5 | 0.000242 | 0.021 | 2.3 |
| 15563.5 | 0.000228 | 0.020 | 2.31 |
| 6511 | 0.000052 | 0.017 | 2.31 |
| 17836 | 0.000148 | 0.018 | 2.31 |
| 7729 | 0.000724 | 0.038 | 2.31 |
| 15560.5 | 0.000406 | 0.027 | 2.32 |
| 15562 | 0.000249 | 0.021 | 2.32 |
| 15565 | 0.000143 | 0.018 | 2.34 |
| 15559 | 0.000420 | 0.027 | 2.35 |
| 17834.5 | 0.000148 | 0.018 | 2.35 |
| 15556 | 0.000202 | 0.020 | 2.36 |
| 15557.5 | 0.000294 | 0.023 | 2.37 |
| 14803 | 0.000064 | 0.017 | 2.39 |
| 17833 | 0.000138 | 0.018 | 2.41 |
| 17831.5 | 0.000095 | 0.017 | 2.49 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 8653 | 0.000433 | 0.027 | 2.55 |
| 12689.5 | 0.000207 | 0.020 | 2.56 |
| 12686.5 | 0.000211 | 0.020 | 2.59 |
| 17788 | 0.000005 | 0.005 | 2.6 |
| 17801.5 | 0.000152 | 0.018 | 2.62 |
| 17800 | 0.000111 | 0.017 | 2.63 |
| 12685 | 0.000346 | 0.025 | 2.65 |
| 14657.5 | 0.000943 | 0.042 | 2.67 |
| 17797 | 0.000026 | 0.013 | 2.67 |
| 17803 | 0.000113 | 0.017 | 2.7 |
| 12683.5 | 0.000368 | 0.025 | 2.71 |
| 17792.5 | 0.000009 | 0.007 | 2.71 |
| 11179 | 0.000074 | 0.017 | 2.75 |
| 17804.5 | 0.000078 | 0.017 | 2.82 |
| 11180.5 | 0.000203 | 0.020 | 2.86 |
| 6482.5 | 0.000092 | 0.017 | 2.91 |
| 17806 | 0.000047 | 0.017 | 2.99 |
| 17825.5 | 0.000022 | 0.012 | 3 |
| 8402.5 | 0.000950 | 0.042 | 3.04 |
| 17807.5 | 0.000036 | 0.015 | 3.11 |
| 17717.5 | 0.000505 | 0.029 | 3.25 |
| 14234.5 | 0.000454 | 0.028 | 3.27 |
| 17719 | 0.000489 | 0.029 | 3.32 |
| 17723.5 | 0.000588 | 0.032 | 3.33 |
| 17722 | 0.000500 | 0.029 | 3.37 |
| 17720.5 | 0.000432 | 0.027 | 3.38 |
| 17716 | 0.000357 | 0.025 | 3.4 |
| 17710 | 0.000102 | 0.017 | 3.47 |
| 17708.5 | 0.000100 | 0.017 | 3.52 |
| 9220 | 0.000002 | 0.002 | 3.65 |
| 9226 | 0.000014 | 0.009 | 3.65 |
| 14279.5 | 0.000919 | 0.042 | 3.74 |
| 14278 | 0.000755 | 0.039 | 3.81 |
| 3427 | 0.000000 | 0.001 | 3.82 |
| 8401 | 0.000557 | 0.031 | 3.91 |
| 9217 | 0.000000 | 0.001 | 3.93 |
| 8399.5 | 0.000931 | 0.042 | 4.37 |

Nota: m/z, relação massa molecular e carga da molécula ionizada; p-valor < 0,001; FDR, *False Discover Rate*; FC – *Fold Change* ± 1.5.

Tabela 6. Possíveis proteínas diferencialmente expressos entre 1º IAM $T_{48}$ vs GC, ordenadas de modo crescente de acordo com *Fold Change*.

| m/z | p-valor | FDR | FC |
|---|---|---|---|
| 2191 | 0,000126 | 0,011 | -22,05 |
| 2194 | 0,000145 | 0,012 | -12,5 |
| 2195,5 | 0,000435 | 0,020 | -11,68 |
| 2159,5 | 0,000264 | 0,016 | -11,12 |
| 2168,5 | 0,000651 | 0,025 | -9,71 |
| 2192,5 | 0,000072 | 0,009 | -9,22 |
| 2164 | 0,000823 | 0,029 | -9,2 |
| 2146 | 0,000255 | 0,016 | -8,21 |
| 2231,5 | 0,000306 | 0,017 | -7,82 |
| 2173 | 0,000061 | 0,008 | -6,94 |
| 2155 | 0,000879 | 0,029 | -6,9 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 2177,5 | 0,000317 | 0,017 | -6,47 |
| 2171,5 | 0,000196 | 0,013 | -6,47 |
| 2639,5 | 0,000480 | 0,021 | -6,45 |
| 2150,5 | 0,000653 | 0,025 | -6,42 |
| 2894,5 | 0,000152 | 0,012 | -6,24 |
| 2149 | 0,000346 | 0,018 | -5,91 |
| 6049 | 0,000191 | 0,013 | -5,84 |
| 2206 | 0,000329 | 0,017 | -5,79 |
| 2695 | 0,000588 | 0,024 | -5,7 |
| 2170 | 0,000023 | 0,004 | -5,62 |
| 2123,5 | 0,000781 | 0,028 | -5,24 |
| 3665,5 | 0,000844 | 0,029 | -5,07 |
| 2153,5 | 0,000252 | 0,016 | -4,86 |
| 3734,5 | 0,000075 | 0,009 | -4,54 |
| 2128 | 0,000060 | 0,008 | -4,47 |
| 2215 | 0,000064 | 0,008 | -3,92 |
| 2743 | 0,000413 | 0,019 | -3,91 |
| 2641 | 0,000350 | 0,018 | -3,8 |
| 4253,5 | 0,000529 | 0,023 | -3,77 |
| 2129,5 | 0,000331 | 0,017 | -3,49 |
| 2635 | 0,000132 | 0,012 | -3,47 |
| 5339,5 | 0,000266 | 0,016 | -3,4 |
| 11594,5 | 0,000263 | 0,016 | -3,37 |
| 4264 | 0,000891 | 0,030 | -3,34 |
| 11596 | 0,000054 | 0,008 | -3,23 |
| 5330,5 | 0,000178 | 0,013 | -3,06 |
| 11597,5 | 0,000041 | 0,007 | -3,03 |
| 11599 | 0,000136 | 0,012 | -2,88 |
| 4283,5 | 0,000912 | 0,030 | -2,87 |
| 5326 | 0,000583 | 0,024 | -2,7 |
| 4277,5 | 0,000941 | 0,030 | -2,56 |
| 2783,5 | 0,000984 | 0,031 | -2,04 |
| 14803 | 0,000787 | 0,028 | 1,99 |
| 14633,5 | 0,000909 | 0,030 | 2 |
| 14462,5 | 0,000274 | 0,016 | 2,01 |
| 6341,5 | 0,000643 | 0,025 | 2,06 |
| 10757,5 | 0,000386 | 0,019 | 2,12 |
| 15557,5 | 0,000924 | 0,030 | 2,14 |
| 4474 | 0,000252 | 0,016 | 2,15 |
| 14566 | 0,000719 | 0,027 | 2,28 |
| 15550 | 0,000777 | 0,028 | 2,31 |
| 15556 | 0,000553 | 0,024 | 2,34 |
| 14570,5 | 0,000075 | 0,009 | 2,35 |
| 6394 | 0,000165 | 0,012 | 2,42 |
| 10547,5 | 0,000051 | 0,008 | 2,43 |
| 15551,5 | 0,000404 | 0,019 | 2,45 |
| 6479,5 | 0,000995 | 0,031 | 2,46 |
| 15554,5 | 0,000379 | 0,018 | 2,51 |
| 15553 | 0,000354 | 0,018 | 2,54 |
| 14494 | 0,000028 | 0,005 | 2,6 |
| 6511 | 0,000055 | 0,008 | 2,61 |
| 9226 | 0,000107 | 0,010 | 2,67 |
| 8296 | 0,000680 | 0,025 | 2,72 |
| 8426,5 | 0,000253 | 0,016 | 2,73 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 11180,5 | 0,000215 | 0,014 | 2,85 |
| 11179 | 0,000143 | 0,012 | 2,86 |
| 6482,5 | 0,000101 | 0,010 | 2,92 |
| 8653 | 0,000103 | 0,010 | 2,94 |
| 8422 | 0,000155 | 0,012 | 3,01 |
| 16831 | 0,000922 | 0,030 | 3,03 |
| 8297,5 | 0,000214 | 0,014 | 3,06 |
| 9220 | 0,000008 | 0,003 | 3,1 |
| 11384,5 | 0,000680 | 0,025 | 3,14 |
| 9217 | 0,000001 | 0,002 | 3,21 |
| 8423,5 | 0,000052 | 0,008 | 3,23 |
| 14234,5 | 0,000456 | 0,021 | 3,25 |
| 16832,5 | 0,000624 | 0,025 | 3,37 |
| 8437 | 0,000042 | 0,007 | 3,48 |
| 17848 | 0,000797 | 0,028 | 3,51 |
| 8438,5 | 0,000107 | 0,010 | 3,51 |
| 15593,5 | 0,000846 | 0,029 | 3,53 |
| 17846,5 | 0,000787 | 0,028 | 3,54 |
| 16834 | 0,000607 | 0,025 | 3,54 |
| 17845 | 0,000734 | 0,027 | 3,57 |
| 16841,5 | 0,000861 | 0,029 | 3,62 |
| 17725 | 0,000573 | 0,024 | 3,71 |
| 16835,5 | 0,000619 | 0,025 | 3,74 |
| 16837 | 0,000665 | 0,025 | 3,8 |
| 16840 | 0,000513 | 0,022 | 3,85 |
| 17825,5 | 0,000013 | 0,003 | 3,87 |
| 16838,5 | 0,000456 | 0,021 | 3,87 |
| 17842 | 0,000285 | 0,016 | 3,89 |
| 17788 | 0,000002 | 0,002 | 3,93 |
| 17708,5 | 0,000017 | 0,003 | 3,93 |
| 17723,5 | 0,000314 | 0,017 | 3,97 |
| 17840,5 | 0,000105 | 0,010 | 3,99 |
| 17834,5 | 0,000013 | 0,003 | 4 |
| 17993,5 | 0,000508 | 0,022 | 4,01 |
| 17807,5 | 0,000010 | 0,003 | 4,02 |
| 15595 | 0,000359 | 0,018 | 4,03 |
| 17992 | 0,000567 | 0,024 | 4,05 |
| 17710 | 0,000017 | 0,003 | 4,07 |
| 17836 | 0,000011 | 0,003 | 4,09 |
| 17833 | 0,000012 | 0,003 | 4,09 |
| 17831,5 | 0,000009 | 0,003 | 4,09 |
| 17837,5 | 0,000013 | 0,003 | 4,1 |
| 17806 | 0,000010 | 0,003 | 4,12 |
| 17722 | 0,000235 | 0,015 | 4,15 |
| 17804,5 | 0,000011 | 0,003 | 4,2 |
| 17792,5 | 0,000001 | 0,002 | 4,23 |
| 17719 | 0,000155 | 0,012 | 4,26 |
| 17803 | 0,000012 | 0,003 | 4,27 |
| 17720,5 | 0,000165 | 0,012 | 4,32 |
| 17717,5 | 0,000117 | 0,011 | 4,33 |
| 17801,5 | 0,000013 | 0,003 | 4,38 |
| 17716 | 0,000086 | 0,010 | 4,39 |
| 15598 | 0,000123 | 0,011 | 4,41 |
| 15599,5 | 0,000095 | 0,010 | 4,41 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 15601 | 0,000291 | 0,016 | 4,42 |
| 15596,5 | 0,000193 | 0,013 | 4,46 |
| 17800 | 0,000009 | 0,003 | 4,47 |
| 17797 | 0,000001 | 0,002 | 4,68 |

Nota: m/z, relação massa molecular e carga da molécula ionizada; p-valor < 0,001; FDR, *False Discover Rate*; FC – *Fold Change* ± 1,5.

Tabela 7. Possíveis proteínas diferencialmente expressos entre 2º IAM versus GC., ordenados de modo crescente de acordo com *Fold Change* para cada tempo de colheita, apartir do $T_0$.

| 2º IAM | **m/z** | **p-valor** | **FDR** | **FC** |
|---|---|---|---|---|
| $T_0$ | 3755.5 | 0.000175 | 0.026 | -3.96 |
| | 5432.5 | 0.000043 | 0.019 | -2.72 |
| | 17788 | 0.000447 | 0.048 | 1.93 |
| | 17792.5 | 0.000378 | 0.044 | 2.02 |
| | 10547.5 | 0.000177 | 0.026 | 2.12 |
| | 10757.5 | 0.000147 | 0.026 | 2.14 |
| | 17797 | 0.000318 | 0.038 | 2.14 |
| | 14570.5 | 0.000290 | 0.036 | 2.15 |
| | 10760.5 | 0.000133 | 0.026 | 2.17 |
| | 17825.5 | 0.000449 | 0.048 | 2.2 |
| | 9217 | 0.000001 | 0.004 | 2.21 |
| | 9220 | 0.000062 | 0.022 | 2.22 |
| | 6386.5 | 0.000011 | 0.010 | 2.33 |
| | 17803 | 0.000387 | 0.044 | 2.35 |
| | 12689.5 | 0.000146 | 0.026 | 2.37 |
| | 9226 | 0.000165 | 0.026 | 2.37 |
| | 17804.5 | 0.000225 | 0.031 | 2.48 |
| | 17807.5 | 0.000158 | 0.026 | 2.5 |
| | 17806 | 0.000163 | 0.026 | 2.51 |
| | 6394 | 0.000004 | 0.007 | 2.56 |
| | 12686.5 | 0.000281 | 0.036 | 2.58 |
| | 14566 | 0.000085 | 0.022 | 2.6 |
| | 8653 | 0.000080 | 0.022 | 2.62 |
| | 6511 | 0.000007 | 0.009 | 2.67 |
| | 8437 | 0.000268 | 0.036 | 2.82 |
| | 8426.5 | 0.000068 | 0.022 | 3.51 |
| | 15446.5 | 0.000084 | 0.022 | 3.61 |
| | 15443.5 | 0.000055 | 0.021 | 3.75 |
| | 8296 | 0.000183 | 0.026 | 3.8 |
| | 6479.5 | 0.000140 | 0.026 | 3.81 |
| | 8423.5 | 0.000020 | 0.015 | 3.91 |
| | 8299 | 0.000127 | 0.026 | 4.11 |
| | 8419 | 0.000091 | 0.022 | 4.17 |
| | 8422 | 0.000032 | 0.017 | 4.23 |
| | 6482.5 | 0.000025 | 0.016 | 4.29 |
| | 8297.5 | 0.000044 | 0.019 | 4.47 |
| $T_2$ | 6965.5 | 0.000216 | 0.037 | -3.74 |
| | 5567.5 | 0.000284 | 0.043 | -2.89 |
| | 6112 | 0.000219 | 0.037 | -2.83 |
| | 9220 | 0.000162 | 0.037 | 2.01 |
| | 9217 | 0.000009 | 0.022 | 2.04 |
| | 12803.5 | 0.000172 | 0.037 | 2.07 |
| | 10547.5 | 0.000116 | 0.037 | 2.23 |
| | 17792.5 | 0.000201 | 0.037 | 2.23 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 6511 | 0.000124 | 0.037 | 2.24 |
| | 17837.5 | 0.000341 | 0.049 | 2.29 |
| | 17836 | 0.000229 | 0.037 | 2.38 |
| | 14494 | 0.000041 | 0.022 | 2.39 |
| | 17834.5 | 0.000182 | 0.037 | 2.47 |
| | 6394 | 0.000108 | 0.037 | 2.52 |
| | 6386.5 | 0.000015 | 0.022 | 2.53 |
| | 17833 | 0.000195 | 0.037 | 2.54 |
| | 10760.5 | 0.000052 | 0.022 | 2.6 |
| | 13049.5 | 0.000292 | 0.043 | 2.61 |
| | 17831.5 | 0.000219 | 0.037 | 2.65 |
| | 10757.5 | 0.000024 | 0.022 | 2.96 |
| | 4474 | 0.000024 | 0.022 | 2.99 |
| | 6482.5 | 0.000039 | 0.022 | 3.16 |
| | 8422 | 0.000108 | 0.037 | 3.17 |
| | 8423.5 | 0.000046 | 0.022 | 3.3 |
| | 8419 | 0.000177 | 0.037 | 3.46 |
| | 6479.5 | 0.000175 | 0.037 | 3.55 |
| | 8426.5 | 0.000052 | 0.022 | 3.73 |
| $T_{12}$ | 6220 | 0.000226 | 0.045 | 4.06 |
| | 6386.5 | 0.000165 | 0.040 | 1.96 |
| | 6394 | 0.000228 | 0.045 | 2.06 |
| | 6479.5 | 0.000238 | 0.045 | 3.3 |
| | 6482.5 | 0.000052 | 0.025 | 3.16 |
| | 6511 | 0.000123 | 0.033 | 2 |
| | 8294.5 | 0.000272 | 0.045 | 3.89 |
| | 8296 | 0.000051 | 0.025 | 4.77 |
| | 8297.5 | 0.000042 | 0.025 | 4.81 |
| | 8299 | 0.000221 | 0.045 | 4.4 |
| | 8426.5 | 0.000262 | 0.045 | 2.65 |
| | 10757.5 | 0.000011 | 0.022 | 2.89 |
| | 10760.5 | 0.000014 | 0.022 | 2.23 |
| | 11021.5 | 0.000059 | 0.025 | 1.94 |
| | 11326 | 0.000254 | 0.045 | 4.92 |
| | 15554.5 | 0.000066 | 0.025 | 2.12 |
| | 15556 | 0.000020 | 0.022 | 2.25 |
| | 15557.5 | 0.000023 | 0.022 | 2.33 |
| | 15559 | 0.000049 | 0.025 | 2.32 |
| | 15560.5 | 0.000127 | 0.033 | 2.21 |
| | 15562 | 0.000120 | 0.033 | 2.25 |
| | 15563.5 | 0.000109 | 0.033 | 2.34 |
| | 15565 | 0.000088 | 0.031 | 2.41 |
| $T_{24}$ | 17788 | 0.000019 | 0.037 | 2.56 |
| | 17792.5 | 0.000039 | 0.037 | 2.77 |
| | 6482.5 | 0.000036 | 0.037 | 3.24 |
| | 6511 | 0.000007 | 0.028 | 3.39 |
| $T_{36}$ | 6511 | 0.000057 | 0.022 | 2.12 |
| | 17788 | 0.000158 | 0.047 | 2.14 |
| | 6394 | 0.000023 | 0.015 | 2.2 |
| | 9220 | 0.000073 | 0.026 | 2.31 |
| | 9226 | 0.000096 | 0.031 | 2.51 |
| | 4493.5 | 0.000022 | 0.015 | 2.72 |
| | 11179 | 0.000058 | 0.022 | 2.76 |
| | 11180.5 | 0.000031 | 0.015 | 2.97 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 11200 | 0.000030 | 0.015 | 3.28 |
| | 13874.5 | 0.000015 | 0.015 | 3.32 |
| | 13876 | 0.000002 | 0.007 | 3.51 |
| | 13877.5 | 0.000004 | 0.007 | 3.56 |
| | 6482.5 | 0.000023 | 0.015 | 3.63 |
| $T_{48}$ | 2708.5 | 0.000125 | 0.036 | -2.08 |
| | 14462.5 | 0.000185 | 0.044 | 2.14 |
| | 9217 | 0.000006 | 0.006 | 2.18 |
| | 14641 | 0.000226 | 0.046 | 2.31 |
| | 9220 | 0.000016 | 0.012 | 2.47 |
| | 11179 | 0.000201 | 0.044 | 2.49 |
| | 9226 | 0.000025 | 0.016 | 2.59 |
| | 11021.5 | 0.000079 | 0.032 | 2.73 |
| | 8437 | 0.000128 | 0.036 | 2.75 |
| | 6325 | 0.000176 | 0.044 | 2.81 |
| | 6482.5 | 0.000083 | 0.032 | 2.83 |
| | 11200 | 0.000032 | 0.018 | 2.99 |
| | 8297.5 | 0.000109 | 0.036 | 3.27 |
| | 8299 | 0.000133 | 0.036 | 3.66 |
| | 11207.5 | 0.000004 | 0.006 | 3.83 |
| | 11204.5 | 0.000001 | 0.005 | 3.98 |
| | 11215 | 0.000204 | 0.044 | 4.01 |
| | 11210.5 | 0.000074 | 0.032 | 4.38 |
| | 11209 | 0.000005 | 0.006 | 4.39 |

Nota: m/z, relação massa molecular e carga da molécula ionizada; p-valor < 0,001; FDR, *False Discover Rate*; FC – *Fold Change* ± 1,5.; $T_0$, primeira colheita; $T_2$, segunda colheita após angioplastia; $T_{12}$, terceira colheita após 12h; $T_{24}$, quarta colheita após 24h; $T_{36}$, quinta colheita após 36h; $T_{48}$, sexta colheita após 48h.

**ANEXO F**

International Meeting of the Microarray and Gene Expression DATA, 2008, Riva del Garda. **MEGED11**. , p.84 – 84, 2008.

Poster 53

## FUNCTIONAL PROFILING OF THE PERIPHERAL BLOOD CELLS TRANSCRIPTOME TO STUDY CARDIOVASCULAR BIOMARKERS .

**Vivian N. Silbiger**
Faculdade de Ciências Farmacêutica, Universidade De São Paulo, Brazil.
*viviansilbiger@hotmail.com*

A.D. Luchessi[1], L.G.L. Neto[1], C.P. Pastorelli[1], R.D.C. Hirata[1], E.S. dos Santos[2], M.F. Sampaio[2], A. Avezum[2], L.S. Piegas[2], I. Quintela[3], M. Bríón[3], A. Carracedo[3], D. Montaner[4], F. Garcia[4], J. Dopazo[4], M.H. Hirata[1]

1 Faculdade de Ciências Farmacêutica, Universidade de São Paulo, Brazil.

2 Instituto Dante Pazzanese do Estado de São Paulo, Brazil.

3 Centro Nacional de Genotipado (CEGEN), Instituto de Medicina Legal, Universidad de Santiago de Compostela, Spain.

4 Bioinformatics Department- Centro de Investigacion Principe Felipe, Valencia, Spain.

A transcriptomic experiment was carried out to study the global gene expression in peripheral blood cells (PBC) to study surrogate biomarkers for the early diagnosis of myocardial infarction (MI). We selected 9 MI patients within 8h after MI event, 5 without prior treatment (1MI) and 4 treated (2MI), and 7 healthy controls (GC). Blood samples were obtained for RNA extraction by PAXgene system (Qiagen). PBC mRNA expression profiles were assessed by Affymetrix GeneChip Human Exon 1.0 ST array. Signals were normalized using iterPLIER algorithm and limma model from oneChannelGUI package was applied to evaluate the differential gene expression. Comparisons of interest where 1MI versus GC and 2MI versus GC. The functional interpretation of this comparisons in terms Gene Ontology (biological process) were performed using FatiScan methodology implemented in Babelomics. The functional modulest over-expressed in both classes were exploed to get gene signatures that generally identified MI. In this study it was possible to select 14 GO biological processes with adjusted pvalue $< 0.05$ that were common in both comparisons. The total number of genes selected by functional profiling was 1373. Functional evaluation of the PBC is a useful tool to investigate cardiovascular biomarkers that may be involved in the early stages of MI.

Poster 54

## A COMPUTATIONAL APPROACH TO IDENTIFY WHOLE GENOME HOMOZYGOSITY MAPPING ACROSS MULTIPLE SNP MAPPING EXPERIMENTS

**Roberta Spinelli**
Institute of Biomedical Technologies, Segrate, Milan (ITB-CNR)
*roberta.spinelli@itb.cnr.it*

A. Gessi[2], M.C. Proverbio[2], E. Mangano[2], F. Ferrari[3], I. Cifola[1], M. Bardini[4], G. Cazzaniga[4], A. Salvatoni[5], C. Battaglia[2]

1 Institute of Biomedical Technologies, Segrate, Milan (ITB-CNR)

2 Department of Science and Biomedical Technologies (DiSTeB) and PhD' School of molecular medicine, University of Milan;

3 Department of Biology, University of

**ANEXO G**

Annual Meeting, 2009, Chicago. **Clinical Chemistry**. Washington: Clinical Chemistryv.55. p.A71 - A71, 2009.

Tuesday, July 21, 2:00 pm - 4:30 pm

**B-66**

**Peripheral blood cells transcriptome to study new biomarkers for myocardial infarction follow up**

V. N. Silbiger[1], A. D. Luchessi[1], R. D. Hirata[1], A. Carracedo[2], M. Bríon[3], L. G. Lima-Neto[1], C. P. Pastorelli[1], J. Dopazo[4], D. Montaner[4], F. Garcia[4], M. P. Sampaio[5], M. P. Pereira[5], E. S. Santos[5], D. Armaganijan[5], M. H. Hirata[1]. *[1]Faculdade de Ciências Farmacêutica - Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, [2]Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain, [3]Complexo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain, [4]Bioinformatics Department- Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia, Spain, [5]Instituto Dante Pazzanese do Estado de São Paulo, São Paulo, Brazil*

**Introduction:** The main clinical manifestation of atherosclerosis is the acute myocardial infarction (MI), which is a medical emergency that requires a prompt diagnosis and efficient therapy. New markers to predict MI have been scarcely described in the last decade.

**Objectives:** A transcriptomic experiment was carried out to study the global gene expression in peripheral blood cells (PBC) to study surrogate biomarkers for the early diagnosis of myocardial infarction.

**Methods:** 5 MI patients and 6 healthy individuals were selected in a coronary emergency facility. MI patients were followed up 8h after MI (T1), after angioplasty (T2) and each 12 h during 48 h (T3 to T6). The control group (GC) was compose by healthy individuals and this 5 MI after one year past of the event. RNA was extracted by PAXgene system (Qiagen). PBC mRNA expression profiles were assessed by Affymetrix GeneChip Human Exon 1.0 ST array. Signals were quantile-normalized using iterPLIER algorithm, filtering (IQR, DABG and CROSS HYBR) and bayesian adjusted t-statistics from the linear models for Microarray data (limma) package interfaced on oneChannelGUI was applied to evaluate the differential gene expression. The comparisons of interest where each time of MI versus GC, and the evolution of the genes selected in the first moment during the time investigated. The functional interpretation in terms of biological process, molecular interaction and disease processes were performed using Ingenuity Systems program.

**Results:** After normalization and filtering were available 16869 genes. 25 genes were differently expressed between MI T1 and GC with Benjamini & Hochberg adjusted p-value < 0.05 and fold change 1.5, follow by 596, 138, 24 and 6 in T2, T3, T5 and T6, respectively. No differences were found after 24 hours (T4).

Only 13 genes were common of the first comparison when T2 (after angioplasty) was compared with CG and 3 genes after 12 h of MI (T3), which were involved in cellular growth/proliferation and lipid metabolism. Nine genes involved with cell-mediated immune response were selected only in T1.

**Conclusion:** The PBC transcriptome of MI follow up displayed significant variations on expression of genes involved in immune-mediated response, growth/proliferation and lipid metabolism. Immune response-related genes selected in this study may predict the initial response to the MI lesion.

**ANEXO H**

Simpósio Anual de Pesquisa em Ciências Farmacêuticas, 2009, São Paulo. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2009

FCF142

**mRNA SPLICING VARIANTS OBSERVED IN PERIPHERAL BLOOD CELLS FROM PATIENT WITH ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION**

VIVIAN NOGUEIRA SILBIGER (PG), ANDRÉ DUCATI LUCHESSI (PG), LIDIO LIMA NETO (PG), CARLA PASTORELLI (PG), *MARCELO SAMPAIO (PD), *MARCOS PAULO PEREIRA, *ELIZABETHE DOS SANTOS, *DIKRAN ARMAGANIJAN, **ANGEL MARIA ALVAREZ CARRACEDO, ROSARIO DOMINGUES CRESPO HIRATA, MARIO HIROYUKI HIRATA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, *Instituto Dante Pazzanese do Estado de São Paulo, São Paulo, Brazil, ** University of Santiago de Compostela, Galicia, Spain.

**Introduction and Objectives:** The latest generation of Affymetrix microarrays allows the analysis of alternative splicing genome-wide in peripheral blood cells (PBC) to study surrogate biomarkers for early diagnosis of acute myocardial infarction (AMI).
**Material and Methods:** Nine AMI patients and 6 healthy individuals were recruited at the IDPC Clinical Center. Individuals with primary (AMI1, n=5) and secondary coronary event (AMI2, n=4) were followed up during 48 h. PBC mRNA expression profiles were assessed by GeneChip Human Exon 1.0 ST array. Signals were quantile-normalized using PLIER algorithm and filtered using ENSEMBLE, MIDAS form oneChannelGUI software was used to evaluate the expression of splicing variants (exon level). The gene expression (gene level) was available through linear models for microarray data (limma) package for selection of significant mRNA isoforms.
**Results and Conclusions:** In AMI1 group, 436 and 513 AffyID were observed by exon and gene level, respectively. In AMI2, 654 and 111 AffyID were selected by exon and gene level, respectively. Twenty-five genes were selected in both AMI groups at gene level, as ECL2AI, SORL3 and SLC29AI. Interestingly, 2 of the selected genes, C1orf177 and SLITRK4, expressed different mRNA isoforms. The PBC transcriptome is a useful tool to investigate cardiovascular biomarkers in mRNA splicing variant that may be involved in the early stages of MI.

**Financing:** FAPESP; CAPES

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

**XIV SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA**

***XLIV Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica***

***Simpósio Anual de Pesquisas em Ciências Farmacêuticas***

# Melhor Trabalho de Pós-Graduação

*Certificamos que o trabalho "mRNA SPLICING VARIANTS OBSERVED IN PERIPHERAL BLOOD CELLS FROM PATIENT WITH ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION" (FCF142), de autoria de VIVIAN NOGUEIRA SILBIGER, ANDRÉ DUCATI LUCHESSI, LIDIO LIMA NETO, CARLA PASTORELLI, MARCELO SAMPAIO, MARCOS PAULO PEREIRA, ELIZABETHE DOS SANTOS, DIKRAN ARMAGANIJAN, ANGEL MARIA ALVAREZ CARRACEDO, ROSARIO DOMINGUES CRESPO HIRATA e MARIO HIROYUKI HIRATA, foi indicado como "**Melhor Trabalho de Pós-Graduação (Doutorado)**" exposto no Simpósio Anual de Pesquisas em Ciências Farmacêuticas, realizado no período de 13 a 16 de outubro de 2009, durante a XIV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia.*

*São Paulo, 16 outubro de 2009.*

*Profa. Sandra Helena Poliselli Farsky*
*Presidente da Comissão*
*Organizadora*

*Prof. Sandro Rogério de Almeida*
*Presidente da Comissão*
*de Avaliação de Posteres*

**ANEXO J**

AACC ANNUAL MEETING 2010
July 25-29 • Anaheim, California

Print this Page for Your Records  Close Window

**Control/Tracking Number:** 10-A-1076-2010
**Activity:** Abstract
**Current Date/Time:** 4/11/2010 5:51:44 PM

**Time course proteomic profiling of human myocardial infarction plasma samples as approach to biomarkers discovers**

**Author Block:** V. N. Silbiger[1], A. D. Luchessi[1], R. D. C. Hirata[1], L. G. Lima-Neto[1], C. P. Pastorelli[1], E. S. dos Santos[2], M. P. Pereira[2], R. Ramos[2], M. F. Sampaio[2], D. Armaganijan[2], S. H. Paik[3], Y. Murata[3], G. O. Oi[3], M. H. Hirata[1]. *[1]Faculdade de Ciências Farmacêutica - Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, [2]Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, São Paulo, Brazil, [3]Sun BioMedical Technologies, Ridgecrest, CA,*

*Abstract:*
**Background:** Cardiovascular diseases (CVD) continue to be a very important cause of morbidity, mortality rising health care costs far into this new century. However, acute myocardial infarction (AMI) symptoms are frequently atypical or absent and alterations in the ECG can be unspecific or absent. Furthermore, serum markers, such as CK-MB and cTnI, can have low sensitivity (35%) and specificity (86%) for diagnosis of the coronary heart arrest. To investigate plasma proteomic profile of patients with AMI who underwent angioplasty using the SELDI-TOF-MS technology and to analyze the relationship of this profile with clinical and biochemical markers within 48 h after cardiac ischemia.
**Methods:** Ten individuals with ST-segment elevation AMI (STEMI) were selected at the Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, São Paulo, Brazil, all patients with acute ischemic-type chest pain (< 8 h duration). Patients were classified according to the first (1STEMI; n=5) or second (2STEMI; n=5) cardiac event, which took place within one year after the first episode. The blood was drawn from an antecubital vein six times (stages) after the STEMI diagnose. The first stage ($T_0$) was in Emergency Unity before receiving any medication, the second ($T_2$) was in a Hemodynamic Unity just after the primary angioplasty within 2 h after $T_0$ and next four stages took place at the Coronary Unit by each 12 h, the third ($T_{12}$) was at 12 h, the fourth ($T_{24}$) at 24 h, the fifth ($T_{36}$). Individuals without AMI with similar risk factors for CVD and normal ergometric test were selected as control group (CG) and the blood was collected just one time. Biochemical analyses were carried out by routine laboratory methods. Plasma Proteomic profiling analysis was performed using the top-down (*i.e.* intact proteins) SELDI-TOF-MS, after process in Multiple Affinity Removal Spin Cartridge System (Agilent, USA). Background-adjusted and normalized data was analyzed using the R-statistics based BRB Array Tools v.3.7.
**Results:** Compared with CG individuals, 1STEMI group presented 91, 329, 84, 88 and 123 protein peaks differentially expressed at $T_2$, $T_{12}$, $T_{24}$, $T_{36}$ and $T_{48}$ ($p<0.05$), respectively. 2STEMI group presented 27, 23, 4, 13 and 19 protein peaks differentially expressed at $T_2$, $T_{12}$, $T_{24}$, $T_{36}$ and $T_{48}$ ($p<0.05$), respectively, in comparison with CG individuals. In 1STEMI, nine proteins (MW 9217Da, 17788Da, 17792.5Da, 17797Da, 17803Da, 17804.5Da, 17806Da, 17807.5Da and 17825.5Da) were down-regulated at 48 h past-AMI ($p<0.05$). In 2STEMI, five of these proteins were down-regulated (17797Da, 17803Da, 1784.5Da, 1780 Da and 17807.5Da).
**Conclusion:** Proteomic analysis by SELDI-TOF-MS ProteinChip technology combined with bioinformatics tools demonstrates differential protein profile in AMI patients with one or two coronary ischemic events. Differential expression during 48 h course time suggests a potential role of some these proteins as biomarkers for AMI follow up in the most critical period of cardiac ischemic recovery.
*:*

**Topic (Complete)**: Proteins/Enzymes
**Keyword (Complete)**: proteomic ; infarction ; biomarkers
**Additional Information (Complete)**:
**Check to be considered for the Student Awards Program** : True