

2º CICLO

MESTRADO EM FISIOPATOLOGIA CARDIOVASCULAR

**PERFIL DA EXPRESSÃO PROTEICA NA
DOENÇA ARTERIAL CORONÁRIA E
FATORES DE RISCO QUANDO ASSOCIADA
À ESTENOSE AÓRTICA**

**JÉSSICA MICHELLE DA SILVEIRA
DALSUCO**

M

2019

ORIENTADOR: PROF. DR. ANTÓNIO DE SOUSA BARROS

COORIENTADOR: PROF. DR. RUI MIGUEL PINHEIRO VITORINO



"Há verdadeiramente duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe. A ciência consiste em saber, em crer que se sabe reside a ignorância"

Hipócrates

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Adelino Leite Moreira, Coordenador do Mestrado em Fisiopatologia Cardiovascular e Diretor do Departamento de Cirurgia e Fisiologia do Centro de Investigação Médica da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, pela oportunidade que me foi concedida em ingressar neste mestrado e na realização desta dissertação.

Ao meu orientador, Professor Doutor António Barros e, coorientador, Professor Doutor Rui Vitorino, pelo acompanhamento, disponibilidade, ensinamentos e apoio moral durante a realização da presente dissertação.

À Professora Doutora Rita Ferreira pela disponibilidade no auxílio da parte experimental.

À Doutora Francisca Saraiva e a sua equipe, pela paciência e apoio incondicional, desde o meu ingresso no mestrado até a realização da dissertação.

Aos meus pais, Nasser e Sónia, a minha irmã, Yara e avó Rosa, a quem eu homenageio esta dissertação pois apesar da distância, mantiveram-se sempre presentes com o seu amor, carinho e motivação incondicional.

Ao meu namorado, Michel Tamele, pelo companheirismo, paciência, moral e todo o amor concedido durante estes anos.

As minhas amigas, Jéssica Marina, Jéssica Paloma, Patrícia e Lousane, que sempre fizeram questão de estar presente em todas as fases, mesmo longe, e deram-me forças para chegar até aqui.

Resumo

A doença arterial coronária constitui uma das principais doenças cardiovasculares e a principal causa de morte no mundo. É muito frequente a sua associação a estenose da válvula aórtica, uma vez que partilham os mesmos fatores de risco como a hipertensão arterial, tabagismo, diabetes, obesidade, sedentarismo, bem como a idade, o sexo e os antecedentes familiares. Os estudos do perfil de proteínas na urina, como meio de diagnóstico precoce na patologia em causa ainda são escassos, e a descoberta de biomarcadores constitui um desafio para muito investigadores. O objetivo do presente trabalho é analisar o perfil da expressão proteica da urina e avaliar o impacto dos fatores de risco, na doença arterial coronária e na estenose da válvula aórtica. Foram selecionados 151 pacientes, no Departamento de Cirurgia Torácica, do Hospital de São João, 60 com doença arterial coronária, 54 com estenose aórtica, 26 com estenose aórtica + doença arterial coronária entre os meses de abril à novembro, no ano de 2018, e 11 controlos do estudo NETDIAMOND. A análise do proteoma foi realizada em amostras de urina de 6 indivíduos com doença arterial coronária, 6 com estenose aórtica e 6 controlos usando a espectrometria de massa. Os dados foram analisados por avaliação dos fatores de risco através do teste estatístico de qui-quadrado ($p < 0.05$) e modelo de regressão logística binomial. No proteoma foram identificados 11 biomarcadores urinários significativamente expressos: LRG1, PGLYRP2, GM2A, ANXA2, UMOD, SECTM1, CPN2, PGK1, ACPP, AMY2A e HP. A avaliação dos fatores de risco mostrou uma associação estatisticamente significativa da doença arterial coronária, estenose aórtica e estenose aórtica + doença arterial coronária com a idade, o sexo masculino, a dislipidemia e a diabetes *mellitus*. As principais proteínas existentes na urina destes pacientes foram principalmente, pró-inflamatórias e do metabolismo lipídico e as que se destacaram como potenciais biomarcadores foram o LRG1, GM2A, ANXA2, CPN2 e HP.

Palavras-chave: doença arterial coronária, estenose aórtica, expressão proteica, proteómica, urina, fatores de risco, doenças cardiovasculares.

Abstract

Coronary artery disease is one of the leading cardiovascular diseases and the main cause of death globally. Its association with aortic valve stenosis is widespread, as they share the same risk factors as arterial hypertension, smoking, diabetes, obesity, sedentary lifestyle, age, sex, and family history. Studies of the protein profile in urine as a means of early diagnosis in the pathology in question are still scarce, and biomarkers discovery is a challenge for many researchers. The present study aims to analyze the profile of protein expression in urine and evaluate the impact of risk factors on coronary artery disease and aortic valve stenosis. A total of 151 patients were selected at the Department of Thoracic Surgery at Hospital de São João, 60 with coronary artery disease, 54 with aortic stenosis, 26 with aortic stenosis+coronary artery disease, between months from april to november of 2018, and 11 controls from NETDIAMOND study. The proteome analysis was performed on urine samples from 6 individuals with coronary artery disease, 6 with aortic stenosis, and 6 controls using mass spectrometry. Data were analyzed by assessing risk factors using the chi-square statistical test ($p < 0,05$) and a binary logistic regression model. A total of 11 significantly expressed urinary biomarkers were identified: LRG1, PGLYRP2, GM2A, ANXA2, UMOD, SECTM1, CPN2, PGK1, ACPP, AMY2A and HP. The statistical results of assessing risk factors showed a statistically significant association between coronary artery disease, aortic stenosis, and aortic stenosis+coronary artery disease with age, male gender, dyslipidemia, and diabetes *mellitus*. The main proteins in the urine of these patients were pro-inflammatory and from the lipid metabolism and those that stood out as a potential biomarker were LRG1, GM2A, ANXA2, CPN2 and HP.

Keywords: coronary artery disease, aortic stenosis, protein expression, proteomics, urine, risk factors, cardiovascular diseases.

Índice

1	Introdução.....	20
2	Definição	20
3	Epidemiologia	21
4	Fatores de risco.....	21
4.1	Fatores de risco modificáveis.....	21
4.1.1	Hipertensão arterial	21
4.1.2	Dislipidemia	22
4.1.3	Tabagismo	23
4.1.4	Diabetes.....	23
4.1.5	Obesidade.....	24
4.1.6	Sedentarismo/inatividade física.....	25
4.1.7	<i>Stress</i>	25
4.2	Fatores de risco não modificáveis	26
4.2.1	Idade.....	26
4.2.2	Sexo.....	27
4.2.3	História familiar	27
4.2.4	Raça/Etnia	28
5	Anatomia das artérias coronárias	29
6	Fisiopatologia.....	30
6.1	Rotura assintomática da placa.....	31
6.2	Placa hemorrágica	31
6.3	Oclusão coronária sintomática	32
7	Doença Arterial Coronária e Estenose da Válvula Aórtica.....	32
8	Biomarcadores urinários e plasmáticos na DAC.....	33
8.1	Proteína C-Reativa (PCR).....	33
8.2	Apolipoproteína C-II (APOC2).....	34
8.3	Dedicador da Citocinese 2 (DOCK2).....	34
8.4	Apolipoproteína E (APOE).....	35

8.5	Citocinas.....	35
8.6	CD40 solúvel (sCD40).....	37
8.7	Amilóide Sérico A (SAA).....	37
8.8	Moléculas de adesão.....	37
8.9	Mieloperoxidase (MPO).....	38
8.10	Metaloproteinases de Matriz (MMP).....	38
8.11	Fator de Crescimento Placentário (PIGF).....	38
8.12	Fosfolipase A2 Associada à Lipoproteína (Lp-PLA2).....	39
8.13	Complexo de Proteína 8/14 Mielóide (MRP8/14).....	39
9	Abordagens multi-ômicas orientadas para o estudo de doenças cardiovasculares .	39
10	Objetivos	45
10.1	Objetivo Geral.....	45
10.2	Objetivos Específicos.....	45
11	Material e Métodos.....	46
11.1	Seleção da amostra.....	46
11.2	Critérios de inclusão.....	46
11.3	Critérios de exclusão	46
11.4	Preparação da amostra.....	46
11.5	Análise LC-MS/MS.....	47
11.6	Análise de dados.....	48
11.7	Análise de dados de expressão proteica e de dados clínicos	49
11.7.1	Análise de dados da expressão proteica	49
11.7.2	Análise estatística.....	49
12	Resultados	52
12.1	Análise sistemática dos dados da expressão proteica.....	52
12.2	Resultados da análise dos dados clínicos	54
12.3	Proteínas identificadas na análise por LC-MS/MS	59
12.4	Análise de interação proteína-proteína.....	62
13	Discussão.....	64

14	Conclusão.....	69
15	Perspetivas Futuras.....	70
16	Referências Bibliográficas	71
17	Anexos.....	93

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Resumo dos biomarcadores plasmáticos e urinários na doença arterial coronária (DAC)	41
Tabela 2 - Características Básicas da População estudada	55
Tabela 3 - Regressão logística das características básicas da população estudada em relação a DAC vs EAo	58
Tabela 4 - Regressão logística das características básicas da população estudada em relação a DAC vs EAo+DAC	58
Tabela 5 - Regressão logística das características básicas da população estudada em relação a DAC vs CONT	58
Tabela 6 - Regressão logística das características básicas da população estudada em relação a EAo vs EAo+DAC	58
Tabela 7 - Regressão logística das características básicas da população estudada em relação a EAo vs CONT	59

Índice de Figuras

Figura 1 - Estrutura da parede da artéria coronária. Fonte: Blausen.com staff (2014). "Medical gallery of Blausen Medical 2014". WikiJournal of medicine 1 (2). DOI:10.15347/wjm/2014.010. ISSN 2002-4436.	30
Figura 2 - Desenvolvimento supervisionado de um modelo molecular multi-ômico integrativo em DAC. Fonte: Fernandes M, Patel A, Husi H. C/VDdb: A multi-omics expression profiling database for a knowledge-driven approach in cardiovascular disease (CVD). PLoS One. 2018;13(11):e0207371-e.....	Erro! Marcador não definido.
Figura 3 - Esquema resumo das 3 abordagens efetuadas na dissertação.....	51
Figura 4 – Matriz de associação dos estudos da expressão proteica da DAC. Fonte: Pathan M, Keerthikumar S, Chisanga D, Alessandro R, Ang CS, Askenase P, et al. A novel community driven software for functional enrichment analysis of extracellular vesicles.	53
Figura 5 - Diagrama de Venn mostrando o número de proteínas em pacientes com Doença Arterial Coronária (DAC, n=60), Estenose Aórtica (EA, n=54) e controlos (CONT, n=11). Os nomes e a identificação (ID) de todas as proteínas estão contidos na Tabela Suplementar 2.	60
Figura 6 - Volcano plot das proteínas dos pacientes com Estenose Aórtica (EA, n=54) e Doença Arterial Coronária (DAC, n=60). Os pontos vermelhos indicam proteínas com significância estatística entre os grupos testados. Os valores de p e a alteração da dobra (FC) para cada proteína estão incluídos na Tabela Suplementar 2.....	60
Figura 7 - Volcano plot das proteínas dos pacientes com Doença Arterial Coronária (DAC, n=60) e Controlos (CONT, n=11). Os pontos vermelhos indicam proteínas com significância estatística entre os grupos testados. Os valores de p e a alteração da dobra (FC) para cada proteína estão incluídos na Tabela Suplementar 2.....	61
Figura 8 - Volcano plot das proteínas de pacientes com Estenose Aórtica (EA, n=54) e Controlos (CONT, n=11). Os pontos vermelhos indicam proteínas com significância estatística entre os grupos testados. Os valores de p e a alteração da dobra (FC) para cada proteína estão incluídos na Tabela Suplementar 2.	62
Figura 9 - Interação Proteína-Proteína na Estenose Aórtica, Doença Arterial Coronária e Controlos. ACP – Fosfatase Ácida Prostática, ITIH4 – Inibidor de Inter-Alfa-Tripsina de Cadeia Pesada H4, SERPINA1 – Alfa-1-Antitripsina, RBP4 – Proteína 4 de Ligação ao Retinol, CUBN – Cubilina, GC – Proteína de Ligação à Vitamina D, PGLYRP2 – N-acetilmuramoil-L-alanina Amidas, HAVCR2 – Recetor Celular 2 do Vírus da Hepatite	

A, APOH – Beta-2-glicoproteína 1, FLNA – Filamina-A, C4B – Complemento C4-B, MASP2 – Lectina Serina Protease 2 de Ligação a Manana, ENDOD1 – Domínio de Endonuclease contendo 1 proteína, C7 – componente do Complemento 7, CDH1 – Caderina-1, SOD3 – Superóxido Dismutase Extracelular, LTF – Lactoferrina, AGT – Angiotensinogénio, KRT16 – Queratina Citoesqueleto 16 Tipo I, KRT14 – Queratina Citoesqueleto 14 Tipo I, KRT5 – Queratina Citoesqueleto 5 tipo II, KRT6C – Queratina Citoesqueleto 6C Tipo II. 🟡 - Transporte mediado por vesículas; 🟣 - Regulação positiva de resposta ao estímulo; 🟡 - Resposta ao estímulo externo; 🟢 - Resposta ao stress; 🟢 - Processo multi-organismo; 🟡 - Transporte; 🟠 - Localização; 🟢 - Regulação negativa do processo celular; 🟡 - resposta ao estímulo (267)..... 63

Abreviaturas

ACN – Acetonitrila

ACPP – Fosfatase Ácida Prostática

APCO3 – Apolipoproteína C-III

ApoB – Apolipoproteína B

APOC2 – Apolipoproteína C-II

APOE – Apolipoproteína E

ATP – Adenosina Trifosfato

AVC – Acidente Vascular Cerebral

CCL2 – C-C *motif* 2

CE – Células Endoteliais

CMLV – Células Musculares Lisas Vasculares

CONT – Controlos

CPN2 – Carboxipeptidase N Subunidade 2

DAC – Doença Arterial Coronária

DAP – Doença Arterial Periférica

DCI – Doença Cardíaca Isquémica

DCV – Doenças Cardiovasculares

DM – *Diabetes Mellitus*

DOCK2 – Dedicador da Citocinese 2

DOCK-A – Dedicador da Citocinese A

DOCNET - *Diabetes and Obesity at the Crossroads between oncological and cardiovascular disease – a system analysis NETWORK towards precision medicine*

EAM – Enfarte Agudo do Miocárdio

EAO – Estenose da Válvula Aórtica

ECA – Enzima Conversora de Angiotensina

EPIC-Norfolk – *European Prospective Investigation into Cancer in Norfolk*

esRAGE – Recetor Secretor Endógeno para produtos finais de Glicação Avançada

FC – Frequência Cardíaca

FRS – *Framingham Risk Score*

GM2A – Ativador Gangliosídeo

GO – Ontologia de Genes

GPI – Glicosilfosfatidilinositol

GWAS – *Genome-Wide Association Study*

Hb – Hemoglobina

HDL-c – colesterol de Lipoproteína de Alta Densidade

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HP – Haptoglobina

HTA – Hipertensão Arterial

ICAM-1 – Molécula de Adesão Intercelular-1

IL-1 – Interleucina-1

IL-10 – Interleucina-10

IL-6 – Interleucina-6

IMC – Índice de Massa Corporal

IMT – Espessura Médio-Intimal

KEEG – *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

LC-MS/MS – Espectrometria de Massa em Tandem e Cromatografia

LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade

LDL-c – colesterol de Lipoproteína de Baixa Densidade

LDLR – recetor de LDL

LPL – Lipoproteína Lipase

Lp-PLA2 – Fosfolipase A2 Associada à Lipoproteína

LRG1 – Alfa-2-glicoproteína rica em Leucina

LRR – Proteínas de Repetição rica em Leucina

MCP-1 – Proteína Quimioatraente de Monócitos-1

MEC – Matriz Extracelular

MET – Metabolito

miRNA – microRNA

MMP – Metaloproteinases de Matriz

MMP-2 – Metaloproteinase de Matriz 2

MMP-3 – Metaloproteinase de Matriz 3

MMP-9 – Metaloproteinase de Matriz 9

MPO – Mieloperoxidase

MRP8/14 – Complexo de Proteína 8714 Mielóide

NETDIAMOND – *New Targets in Diastolic Heart Failure: From Comorbidities to Personalized Medicine*

NO – Óxido Nítrico

NSTEMI – Enfarte Agudo do Miocárdio Sem Elevação do segmento ST

OMS – Organização Mundial da Saúde

OR – *Odds Ratio*

PA – Pressão Arterial

PAD – Pressão Arterial Diastólica

PAI-1 – Inibidor do Ativador do Plasminogénio-1

PAS – Pressão Arterial Sistólica

PC – Componente Principal

PCA – Análise em Componentes Principais

PCR – Proteína C-Reativa

PCSK9 – Convertase Subtilisina/Kexina tipo 9

PGK1 – Fosfoglicerato Quinase 1

PGN – Peptidoglicano

PIGF – Fator de Crescimento Placentário

PP – Pressão de Pulso

PPI – Interação Proteína-Proteína

PRO – Proteínas

PROCAM – *Munster Prospective Cardiovascular Study*

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

RVAS – *Rare Variant Association Studies*

SAA – Amilóide Sérico A

SCA – Síndrome Coronária Aguda

sCD40 – CD40 solúvel

SCORE – *Systemic Coronary Risk Assessment*

SDS – Dodecilsulfato de Sódio

SECTM1 – Proteína 1 Secretada e Transmembranar

SERPINA1 – Alfa-1-Antitripsina

SOD – Superóxido Dismutase Extracelular

SODs – Superóxido Dismutases

STEMI – Enfarte Agudo do Miocárdio Com Elevação do segmento ST

TEAB – Bicarbonato de Trietilamônio

TF – Fatores de Transição

TFA – Ácido Trifluoroacético

TG – Triglicéridos

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral-Alfa

UE – União Europeia

UMOD – Uromodulina

VCAM-1 – Adesão Celular Vascular-1

VLDL – Lipoproteína de Muito Baixa Densidade

WISE – *Women's Ischemia Syndrome Evaluation*

1 Introdução

A doença arterial coronária (DAC) é a principal causa de morbi-mortalidade em todo o mundo, principalmente nos países desenvolvidos(1). É caracterizada por um espessamento da camada interna que reveste as artérias coronárias, devido ao processo de aterosclerose, que consiste num processo inflamatório de baixo grau(2). Diversos fatores de risco estão implicados na gênese da DAC, sendo estes divididos em fatores de risco modificáveis, nos quais destacam-se a hipertensão arterial (HTA), dislipidemia, tabagismo, *diabetes mellitus* (DM), obesidade, sedentarismo, *stress*, e fatores de risco não modificáveis como a idade, o sexo, a história familiar e raça/etnia. A agressão dos fatores de risco, por meio de níveis elevados de lipoproteína de baixa densidade (LDL), espécies reativas de oxigênio como radicais livres (ROS), variações genéticas, tensão de cisalhamento em áreas de fluxo sanguíneo turbulento e sinais inflamatórios endógenos como citocinas, levam a disfunção endotelial, principal mecanismo fisiopatológico pelo qual se inicia a aterosclerose(2, 3). Verificou-se que um grande número de marcadores sorológicos estão associados à DAC e que estes podem avaliar o prognóstico em pacientes com esta patologia cardíaca, bem como outras doenças cardiovasculares (DCV)(4). Mas muitos desafios têm sido enfrentados no diagnóstico da DAC especialmente no que concerne a sua alta prevalência em idosos, sendo que os recursos para uma análise mais detalhada e invasiva de cada paciente são limitados. Os modelos de risco atualmente disponíveis preveem com precisão o risco numa base populacional, orientando as decisões diagnósticas e terapêuticas em indivíduos, mas não podem ser usados como teste de diagnóstico. O desenvolvimento das DCV é um processo dinâmico, existindo, por conseguinte, uma tendência natural à sua progressão(4). Como forma de tentar mitigar alguns destes desafios, o perfil de proteínas a urina emergiu como um método não-invasivo, de modo a melhorar o diagnóstico, prognóstico e tratamento da DAC. A urina contém polipeptídeos originários de praticamente todos os órgãos do corpo(4). A atividade proteolítica na urina é baixa, de modo que o proteoma urinário é mais estável, o que não acontece no sangue(4). Sendo assim, o presente trabalho dedica-se ao estudo do perfil de proteínas na urina na doença arterial coronária e fatores de risco quando associado à estenose da válvula aórtica.

2 Definição

A “Doença Arterial Coronária”, conhecida como doença cardíaca aterosclerótica, doença cardiovascular aterosclerótica ou doença cardíaca isquémica (DCI)(5, 6), é

definida como um estreitamento das artérias coronárias, devido ao espessamento da sua camada mais interna, causado por um processo inflamatório e fibroproliferativo(7), na qual mecanismos imunológicos interagem com os fatores de risco metabólicos para iniciar, propagar e ativar lesões na árvore arterial coronária, constituindo este processo a aterosclerose(8-10).

3 Epidemiologia

As DCV constituem a principal causa de morte no mundo(11) e na maioria dos países da União Europeia (UE), totalizando cerca de 40% de todas as mortes verificadas nos países europeus(12). As doenças do sistema circulatório são uma das principais causas de mortalidade, com cerca de 1,9 milhões de mortes, em cada um dos Estados Membros da União Europeia. As mulheres apresentam uma maior proporção de mortalidade (39,5%) em comparação com os homens (33,9%)(13). As principais formas de DCV são a DCI e o enfarte. A DCI é a principal causa de mortalidade na Europa, responsável por mais de 14% de todas as mortes nos homens e 12% nas mulheres(14).

Na Europa as DCV são a principal causa de morte em menores de 65 anos, representando 29% de todas as mortes (31% de mortes em homens e 26% em mulheres), comparativamente aos menores de 75 anos, são a segunda causa de morte, resultando em mais de 26% das mortes (27% das mortes nos homens e 23% das mortes em mulheres)(14). Portugal tem vindo a apresentar uma evolução positiva da taxa de mortalidade associada à DCI, integrando o grupo de países com melhores resultados neste indicador de saúde, havendo por isso um número crescente de sobreviventes a longo prazo aos eventos agudos(12, 14).

4 Fatores de risco

4.1 Fatores de risco modificáveis

4.1.1 Hipertensão arterial

É um importante, e um dos mais significativos(15), fator de risco modificável para todas as manifestações clínicas da DAC(16), que em conjunto com os demais fatores de risco, responde por 90% do risco atribuível à população por enfarte agudo do miocárdio (EAM) em homens e por 94% em mulheres(15). A HTA agrava a aterosclerose(17), e está frequentemente associada a distúrbios metabólicos, como DM e dislipidemia, que são fatores de risco adicionais para a aterosclerose(18). O aumento da pressão arterial (PA) contribui para a deposição de lípidos(19), no desenvolvimento da placa aterosclerótica e influencia na relação entre hemodinâmica pulsátil/rigidez arterial,

umentando a pressão transmural nos vasos arteriais(19), bem como a perfusão coronária(16), diminuindo a reserva coronária, devido a remodelagem das artérias coronárias e aumento da resistência da microvasculatura(19).

Segundo Rapsomaniki et al., pressões arteriais sistólica (PAS) e diastólica (PAD) baixas, 90-114mmHg e 60-74mmHg, respectivamente, menor é o risco de desenvolver DCV, e PAS aumentada isoladamente, maior é o efeito sobre a angina, EAM e doença arterial periférica (DAP)(20). Franklin et al., constataram que nos indivíduos menores de 50 anos, a PAD é um forte preditor de risco de DAC em comparação com a PAS, nos indivíduos entre os 50 a 59 anos de idade, os riscos foram comparáveis para a PAS, PAD e pressão de pulso (PP), e na faixa etária mais avançada, o mais forte preditor de risco de DAC foi a PP(21).

De um modo geral, a PA elevada, seja ela sistólica ou diastólica, influencia no surgimento da DAC, e suas complicações, independentemente da faixa etária, aumentando a incidência da DAC em 2 a 3 vezes(22).

4.1.2 Dislipidemia

A dislipidemia é amplamente estabelecida como um importante fator de risco independente, e até mesmo um pré-requisito, para a DAC, ocorrendo antes de outros fatores de risco importantes(23). Níveis baixos do colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL-c) e as altas concentrações de triglicéridos (TG) têm sido implicados como possíveis preditores independentes de DCV(24-27) e uma associação destes é denominada de dislipidemia aterogénica(28). O aumento das concentrações de TG está associado ao metabolismo anormal das lipoproteínas, bem como a outros fatores de risco para DAC, como a obesidade, resistência à insulina, DM e níveis diminuídos de colesterol HDL-c(26). O colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL-c), está diretamente associado com DAC(29-31) e no adulto jovem predizem o desenvolvimento de DAC na vida adulta(31).

Num estudo realizado por Mahelle et al., com o objetivo de avaliar os perfis lipídicos e sua associação com fatores de risco tradicionais e não tradicionais em indivíduos com DAC conhecida, verificou-se que 41,3% dos pacientes apresentavam dislipidemia aterogénica, e que nestes mesmos pacientes a HTA era mais comum(32). Kabakci et al., realizaram um estudo semelhante e avaliaram o impacto da dislipidemia na estratificação de risco de pacientes hipertensos e a associação do perfil lipídico com

outros fatores de risco cardiovasculares, e verificaram a existência de uma associação entre os valores elevados do colesterol LDL-c e a elevada PA relativamente a DCV(33).

4.1.3 Tabagismo

O tabagismo aumenta o risco de morbi-mortalidade por DCI, e o mesmo está relacionado com a duração e a quantidade de cigarros fumados por dia(34, 35). Alguns estudos referem que o tabagismo possui uma potenciação aguda significativa da ativação plaquetária ocorrendo logo após fumar 1 cigarro, e uma dessensibilização crónica da célula aos agentes ativadores(36).

Acredita-se que o tabagismo atua a nível lipídico, levando ao aumento do colesterol total à custa do LDL-c e TG e diminuição dos níveis séricos do HDL-c, conduzindo a um estado pró-aterogénico, uma vez que reúne todas as condições para aterosclerose(37-40). Além disso, os oxidantes que se encontram no fumo do cigarro, causam um ambiente pró-oxidativo, que juntamente com os oxidantes e radicais livres produzidos pelo nosso organismo, levam a oxidação lipídica e inativação de diversas biomoléculas(41). A inflamação, que é um dos principais processos que ocorre durante a aterosclerose, é afetada pelos componentes tóxicos do tabaco, sendo que este ativa o sistema imunológico sistémico e localmente, a nível da parede vascular, desenvolvendo a placa aterosclerótica, e aumentando a expressão de metaloproteinases da matriz (MMP)(42).

Há evidências de que em pacientes com DAC, a cessação do tabagismo reduz o risco de mortalidade por todas as causas de enfarte do miocárdio não fatal(43).

4.1.4 Diabetes

A DM está amplamente associada a muitos outros fatores de risco de DAC. A obesidade é muito comum em pacientes com DM, especialmente a DM tipo 2, e está relacionada as DCV, neste caso a DAC, devido a um estado de inflamação de baixo grau(44), caracterizado pela sobre expressão de diversas citocinas pelo tecido adiposo, como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), leptina, resistina, proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1), inibidor do ativador do plasminogénio-1 (PAI-1), fibrinogénio e angiotensina(45), aumento dos níveis de proteína c-reativa (PCR), que vários estudos revelam ser prejudicial para a produção endotelial de óxido nítrico (NO) e prostaciclina, imprescindíveis para a complacência vascular, contribuindo para a disfunção endotelial e desenvolvimento de placas ateroscleróticas(46-50). A adiponectina é uma hormona secretada pelo tecido

adiposo, que limita a disfunção endotelial, aumentando a produção de NO, diminuindo a expressão de moléculas de adesão e inibindo a oxidação da LDL-c. A sua produção encontra-se diminuída nos casos de DM agravando ainda mais a disfunção endotelial(45, 51).

A dislipidemia, outro fator de risco, que os indivíduos com DM apresentam maior risco de desenvolver(52), ocorre devido ao aumento da libertação de ácidos gordos livres presentes nas células adiposas resistentes à insulina, promovendo a produção de triglicéridos e, com conseqüente, estimulação da secreção da apolipoproteína B (ApoB) e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) (53-56). Associado a este fator está a diminuição do colesterol HDL-c, e aumento da glicosilação e oxidação das lipoproteínas (LDL e HDL), diminuindo a complacência vascular e facilitando o desenvolvimento de aterosclerose progressiva(57), aumentando o risco de eventos coronários agudos.

4.1.5 Obesidade

A obesidade, um índice de massa corporal (IMC) maior ou igual a 30kg/m²(58), está associada ao aumento do risco de HTA, DM tipo 2 e dislipidemia, todas estas correspondendo aos fatores de risco para DAC(59).

A relação entre a obesidade e a HTA foi muito bem descrita em diversos estudos, um deles é o estudo de coorte de *Framingham*, que demonstrou que 34% e 62%, dos homens e mulheres hipertensas, respetivamente, com idades compreendidas entre 35-75 anos, era atribuída ao excesso de peso(60). E a diminuição do peso, por outro lado, leva ao decréscimo do risco de HTA. No mesmo estudo verificou-se que a perda de 1,8kg ou mais estava associada, a longo prazo, com a diminuição do risco de HTA, em cerca de 22% nos pacientes de meia-idade e 26% nos pacientes idosos(61).

O mecanismo exato que relaciona a obesidade com a resistência a insulina e outros fatores que influenciam o risco de DM e DAC ainda não estão bem estabelecidos(62). Alguns estudos revelaram que o facto de o tecido adiposo possuir uma atividade endócrina levaria a um estado de pró-inflamação, com aumento de fatores de coagulação e citocinas pró-inflamatórias. Outro fator é a disfunção endotelial com alteração dos mediadores de insulina conduzindo ao aumento da reabsorção renal de sódio, diminuição da vasodilatação e aumento da vasoconstrição relacionada com os ácidos gordos livres circulantes(63-65).

O aumento do IMC também está associado ao aumento de risco de dislipidemia, devido a níveis mais baixos de HDL-c, altos níveis de triglicerídeos e colesterol LDL-c, potenciando o risco de DAC(66-69).

4.1.6 Sedentarismo/inatividade física

Um estilo de vida sedentário é definido como “um tipo de estilo de vida com pouca ou nenhuma atividade física”(70). Já a inatividade física é definida como sendo “níveis de atividade física menores do que os requeridos para uma ótima saúde e prevenção da morte prematura”(71). De certa forma estes dois termos estão associados, uma vez que a inatividade física acaba levando ao sedentarismo e vice-versa.

A inatividade física é um fator de risco independente para aterosclerose, DCV e diabetes(72-74). E estima-se que o sedentarismo seja responsável por aproximadamente um terço das mortes devido a DAC, cancro do cólon e DM tipo 2(75). Diversos estudos têm sido apresentados, desde o ano 2000, para avaliar quais as alterações relacionadas com a inatividade física e o sedentarismo. Verificou-se que vários distúrbios estão intimamente relacionados, como o distúrbio metabólico, que engloba o metabolismo da glucose diminuído(76), com maiores níveis de glucose e insulina pós-prandial(77), diminuição da atividade da lipoproteína lipase, captação de triglicerídeos no músculo esquelético e aumento da concentração de colesterol(78), os distúrbios vasculares, como a rigidez arterial do conduto e redução da dilatação dependente do endotélio(79). Num estudo de 17013 adultos canadenses, seguidos em média por 12 anos, que visava abordar de forma abrangente a associação entre o sedentarismo e a mortalidade por causas cardiovasculares relatou uma associação significativa dose-resposta entre o tempo sentado e a mortalidade por todas as causas e de DCV(80). Na mesma sequência, um outro estudo que avaliou a relação entre o tempo sentado para assistir a televisão e a mortalidade entre 8800 adultos australianos seguidos durante 6,6 anos (valor mediano), verificou-se que os indivíduos que relataram assistir à televisão <2 horas por dia, e os que assistiam ≥ 4 horas por dia, tiveram um aumento de 45% e 80% no risco de mortalidade por todas as causas e DCV, respetivamente(81).

4.1.7 Stress

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou o *stress* como “epidemia de saúde do século XXI”, tendo um impacto significativo na sociedade(82).

Alguns estudos observacionais prospetivos constataram que certos fatores psicossociais, como o isolamento social e solidão, estavam associados a um aumento de

50% no risco de DCV e o *stress* relacionado com o trabalho apresentou um risco de 40% de novos eventos cardiovasculares(83).

O principal mecanismo envolvido no *stress* é o neuro endócrino, onde hormonas como o cortisol, adrenalina e noradrenalina são libertadas fornecendo mudanças a curto e longo prazo no comportamento, funções cardiovasculares, sinais endócrinos e metabólicos, permitindo que o indivíduo enfrente diversas situações que lhe são colocadas, desde lesões físicas até tarefas psicossociais(84). Estas alterações podem exercer efeito negativo sobre o sistema cardiovascular, levando à formação de placa aterosclerótica, HTA, resistência à insulina, dislipidemia e adiposidade central, que se correlacionam com aumento de marcadores inflamatórios e ativação endotelial com estado de hipercoagulabilidade e aumento do risco de eventos trombóticos(85).

Estudos revelam que o *stress* psicológico crónico, está intimamente relacionado com o nível aumentado de cortisol sérico, associado à patogénese da aterosclerose e aumentando o risco de DCI e mortalidade cardiovascular (86, 87).

4.2 Fatores de risco não modificáveis

4.2.1 Idade

O envelhecimento está associado ao aumento do risco de patologias cardiovasculares, constituindo a idade por si só um fator de risco independente, sendo que diversos modelos são utilizados atualmente para avaliar o risco individual de DCV e todas incluem a idade como um preditor(88), como por exemplo, o *Framingham Risk Score* (FRS), amplamente usado nos Estados Unidos(89), o *Assing Score*(90), QRISK1 e QRISK2(91, 92), *Munster Prospective Cardiovascular Study* (PROCAM)(93), CUORE(94), Globorisk(95), Arriba(96) e *Systemic Coronary Risk Assessment* (SCORE)(97).

Desde 2003, as Diretrizes Europeias para a prevenção de DCV na prática clínica recomendam o uso do modelo SCORE, porque ele é baseado em grandes conjuntos de dados de coorte europeus representativos(98). O SCORE estima o risco de 10 anos de um primeiro evento aterosclerótico fatal, numa faixa etária entre os 40 e 65 anos de idade.

A associação da idade ajustada a outros fatores de risco com o objetivo de avaliar o risco de surgimento de DCV, revelou que a idade continua sendo um preditor fundamental de risco de DCV(88). No entanto diversos estudos foram feitos para avaliar até que ponto a contribuição da idade seria um reflexo da intensidade e da duração da

exposição a outro risco tradicional de DCV. Um dos estudos foi o *Framingham Heart Study*, que relatou que a ausência de cada um desses fatores de risco tradicionais está associada a uma redução no risco de DCV mesmo em idade avançada(99). Utilizando a coorte de *Framingham*, os investigadores verificaram que uma diminuição dos níveis da PA e colesterol total, ausência de intolerância à glucose, abstinência tabágica, educação superior e sexo feminino previam aumento da sobrevivência até aos 85 anos(100). Num outro estudo, usando a coorte de *Framingham*, com o objetivo de avaliar quem chegaria aos 75 anos de idade, após excluir indivíduos com cancro, DCV e diabetes antes dos 50 anos de idade, concluiu-se que diminuir os hábitos tabágicos (menos cigarros por dia), menor PAS e aumento da capacidade vital forçada foram associados à longevidade em ambos sexos(101). Contudo, pode-se observar que uma alteração no estilo de vida, principalmente nos fatores de risco associados a DCV, conduz a uma diminuição de risco de DCV associado à idade, quer nos casos mais jovens ou mesmo em idade mais avançada(88).

4.2.2 Sexo

A DCV se desenvolve 7 a 10 anos mais tarde nas mulheres do que nos homens, sendo a principal causa de morte em mulheres com mais de 65 anos(102). O mesmo acontece com a DAC, as mulheres tendem a apresentar DAC mais tardiamente relativamente aos homens(103). Acredita-se que as mulheres são “protegidas” contra DCV, devido a exposição a estrógenos endógenos durante o período fértil da vida, atrasando desta forma a manifestação da doença aterosclerótica, mas ainda nada foi comprovado(102). Mulheres com menopausa precoce (<40 anos) têm uma expectativa de vida de 2 anos menor em comparação com mulheres com menopausa normal ou tardia(104). No estudo *Women’s Ischemia Syndrome Evaluation* (WISE), foi demonstrado que mulheres jovens com deficiência de estrogênio endógeno têm um aumento de mais de 7 vezes no risco de doenças da artéria coronária(105). As hormonas femininas, especificamente o estrogênio endógeno, possuem efeitos diretos na regulação do metabolismo, como no tecido adiposo, por meio dos lípidos, bem como nos marcadores inflamatórios e sistema de coagulação, que afetam a vasorreatividade sistémica(106).

4.2.3 História familiar

A DAC possui uma etiologia complexa, sendo uma combinação de fatores de risco comumente conhecidos como tradicionais e a predisposição genética(107). Muitas vezes

alguns indivíduos assintomáticos, que não se enquadram nos fatores de risco, apresentam um elevado risco para a DAC, aparentemente sem explicação que a justifique. Cerca de 40% a 50% dos casos de DAC têm influência hereditária na suscetibilidade à DAC(108). Desde 1938, estudos têm sido feitos com o objetivo de revelar um padrão hereditário de DAC, através de famílias com uma predisposição para DAC precoce, avaliando-se a possibilidade desta doença ser uma mutação na sequência de DNA de um único gene. A hipercolesterolemia familiar, um padrão hereditário de colesterol, nessa mesma época, foi descrita pela primeira vez entre 6 pacientes com xantomias (nódulos cutâneos devido a deposição de excesso de colesterol)(109). A primeira demonstração de um efeito molecular num único gene que pode levar ao risco de DAC, foi em 1985, num estudo onde houve uma deleção, perda de um segmento do cromossoma, 5 kb no recetor da LDL, o gene que codificar a LDL, foi identificado num paciente com hipercolesterolemia familiar e sua progenitora(110).

Além de estudos de padrões familiares, a sequenciação do genoma tem sido desenvolvido em estudos, como o *Genome-Wide Association Study* (GWAS), uma vez que variantes comuns ocorrem com frequência, sendo importante avaliar cada variante individualmente(111). O primeiro estudo foi publicado em 2007, quando 3 grupos independentes relataram variantes comuns no *locus*, local fixo num cromossoma onde se encontra localizado determinado marcador genético, 9p21 associado a um risco aumentado de 30% de DAC por cópia do alelo de risco(112). Desde então, estudos com tamanhos de amostra progressivamente maiores têm sido realizados para avaliar o perfil genético da DAC, tendo como resultado a identificação de quase 60 *locus* genéticos distintos para DAC(113-118). O *Rare Variant Association Studies* (RVAS) também vêm sendo desenvolvidos por meio do sequenciamento genético em larga escala, apesar destes casos não ocorrerem com muita frequência, de modo a permitir testes de associação de variantes individuais(119). Como resultado, as variantes raras de um dado gene são agrupadas, permitindo uma comparação da frequência agregada entre os estratos da doença(120). Até então, foram identificados pelo menos 9 genes para os quais uma agregação de mutações raras altera o risco de DAC(119).

4.2.4 Raça/Etnia

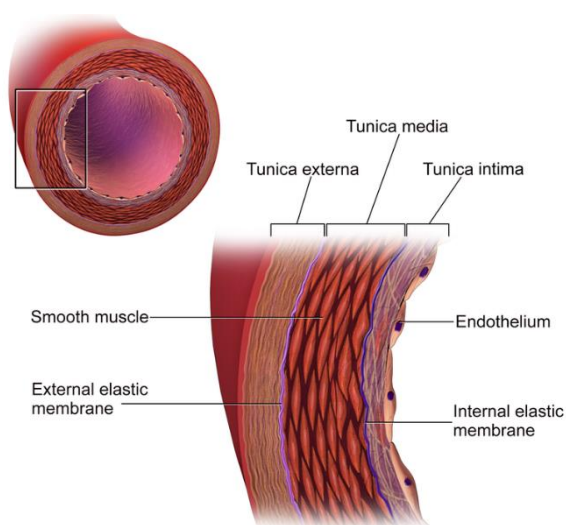
As diferenças raciais e étnicas são diretamente afetadas no que diz respeito as doenças cardíacas, especialmente na DAC. Apesar de se ter verificado uma redução na taxa de mortalidade por DAC, o mesmo não se pode dizer entre grupos raciais e étnicos,

verificando-se uma taxa de mortalidade mais alta entre os negros não-hispânicos comparados com qualquer outro grupo racial/étnico(121-123). A posição socioeconômica foi identificada como o principal fator das diferenças raciais e étnicas nos casos de DAC, incluindo mortalidade e complicações pós EAM e revascularização do miocárdio(124). Associado ao fator socioeconômico encontra-se o acesso aos cuidados de saúde após a reforma(125).

Além dos fatores acima mencionados, estão também associados os fatores de risco para DAC, comorbidades e o estilo de vida nas diferentes etnias. Sabe-se que a prevalência de HTA e a DM é maior em negros em comparação com os brancos(121-124, 126-129).

5 Anatomia das artérias coronárias

As artérias coronárias são constituídas por 3 camadas: a túnica íntima, média e a adventícia(130, 131). A camada íntima é a mais interna(130, 131), é formada por uma única camada de células endoteliais que se apoia sobre a membrana basal e depois na lâmina elástica interna(7). Atua como a interface entre a artéria e o sangue, e a camada subendotelial do tecido conjuntivo(130, 131). A camada média situa-se abaixo da camada externa e é composto pelas células musculares lisas vasculares (CMLV) rodeadas por membrana basal e envolvido na matriz extracelular (MEC) intersticial(7). As CMLV permitem a complacência do vaso arterial(130, 131). A camada adventícia é composta principalmente de fibras de colagénio, entrelaçadas com bandas de fibras elásticas, formando uma bainha rígida a volta da artéria e restringindo o volume do vaso(130, 131).



6 Fisiopatologia

O evento primordial para o desencadear da DAC é o processo de aterosclerose, que se desenvolve e progride durante décadas antes do evento agudo(2).

A aterosclerose deriva do grego *atero*, que significa caldo ou pasta, e *esclerose*, que corresponde a endurecimento(132, 133), e pode ser descrita como um estado inflamatório de baixo grau do revestimento interno das artérias que é acelerado pelos fatores de risco como a HTA, hipercolesterolemia, tabagismo, diabetes e genético(2).

A aterosclerose coronária, um processo crônico(134, 135) e progressivo, caracterizada pela acumulação de lípidos, elementos fibrosos e inflamatórios, como resposta ao insulto endotelial vascular, que pode resultar de perturbações metabólicas e nutricionais (hiperlipidemias), HTA, toxinas exógenas como aquelas encontradas no tabaco, proteínas anormalmente glicosiladas associadas com a DM, lípidos ou proteínas modificadas oxidativamente (133, 136-138), resulta em síndrome coronária aguda (SCA)(2, 139), e tem uma predileção pelos segmentos proximais das artérias coronárias, próxima a pontos de ramificação(2, 139), levando a alterações do fluxo sanguíneo na artéria.

Os diversos fatores de risco associados à DAC, desenvolvem lesão no endotélio vascular(140, 141), permitindo a entrada de lípidos e células inflamatórias(7), como monócitos/macrófagos, células endoteliais (CE), linfócitos T, plaquetas e CMLV(140, 141), na parede arterial.

Quando os monócitos se encontram dentro da artéria eles diferenciam-se em macrófagos que absorvem os lípidos transformando-se em macrófagos de células espumosas, lesões denominadas “estrias gordurosas”, o marco do início da aterosclerose(7).

As lesões iniciais ocorrem especialmente em locais onde existe uma turbulência no escoamento sanguíneo, condicionando as características normais do endotélio(141, 142).

Essas estrias gordurosas podem regredir ou os macrófagos de células espumosas que as compõem podem ingurgitar junto com os lípidos e morrerem, formando uma lesão mais complexa, um núcleo necrótico, e liberando os seus conteúdos, levando à

acumulação de lípidos extracelulares e fatores de crescimento que induzem a inflamação, com aumento de CMLV(7).

A migração e proliferação das CMLV resulta na formação de uma capa fibrosa, que pode aumentar de tamanho e condicionar o fluxo sanguíneo por meio de uma obstrução, ou romper e levar a formação de microtrombos. O aumento da capa fibrosa é devido a migração das CMLV para a túnica íntima, onde se proliferam e depositam a MEC, nutrindo as mesmas CMLV, causando o aumento do volume da placa, e a formação de uma placa avançada estável, que se projeta para dentro do lúmen arterial(7).

6.1 Rotura assintomática da placa

As placas de fibroateromas que são compostas por células inflamatórias, restos celulares musculares lisos e quantidades variadas de colesterol e éster de colesterol, alguns dos quais estão na forma de cristais de colesterol(2, 143), possuem um núcleo necrótico grande(7), que se forma em algumas placas sob uma capa fibrosa composta de colagénio, CMLV e elastina. Quando as células espumosas migram para a parede arterial, podem enfraquecer a capa, podendo resultar numa placa instável, e consequente rutura da capa, expondo o núcleo lipídico trombogénico ao lúmen arterial, levando à formação de um trombo coronário intraluminal(2, 143).

Dependendo de vários fatores, como a composição da placa, o volume da placa, grau de estreitamento luminal, o tamanho da camada protetora e o meio trombótico, o trombo que se forma pode romper espontaneamente, permanecer e, subsequentemente, ser incorporado na parede da artéria (estreitando ainda mais o lúmen)(2, 143), ou crescer e progredir para oclusão total ou próxima da coronária e um evento coronariano agudo sintomático(2, 143).

6.2 Placa hemorrágica

À medida que ocorre um espessamento da camada íntima, a necessidade de aporte sanguíneo aumenta, crescendo assim a *vasa vasorum* da túnica adventícia ou da íntima. Esses vasos sanguíneos têm paredes finas tornando-os frágeis. Caso ocorra o rompimento dos mesmos, o tamanho da placa aumenta subitamente pelo aumento de grande conteúdo de células inflamatórias e lipídicas, oriundas da membrana eritrocitária, e também pela deposição de sangue(2, 144). No entanto, à medida que a placa cresce, o lúmen da artéria não se estreita imediatamente, pois ocorre remodelagem da parede arterial e só ocorre estreitamento quando o volume da placa se aproxima de 40%(145), chamado de remodelagem Glagoviano ou positivo, traduzindo-se no achado angiográfico de que as

placas responsáveis por eventos coronarianos agudos são frequentemente não-obstrutivas (<50% de estenose de diâmetro) nas semanas até o mês anterior ao evento(2, 146).

6.3 Oclusão coronária sintomática

A oclusão coronária sintomática ocorre quando há formação de um trombo coronário intraluminal, que em muitos casos é mais antigo que a apresentação clínica do EAM podendo ser com ou sem supradesnivelamento do segmento ST. O enfarte agudo do miocárdio com elevação do segmento ST (STEMI), em geral, quase sempre apresenta oclusão coronária total, e o grau de necrose miocárdica (ou o miocárdio em risco de necrose) é maior do que no enfarte agudo do miocárdio sem elevação do segmento ST (NSTEMI). O NSTEMI tem uma maior incidência de oclusão coronariana total, mas se a luz arterial não está totalmente obstruída, geralmente demonstra um bloqueio grave (>70% de estenose de diâmetro) em uma ou mais artérias mais frequentemente com um trombo coronário intraluminal(2, 147).

7 Doença Arterial Coronária e Estenose da Válvula Aórtica

A Estenose da Válvula Aórtica (EAo) não-reumática é o tipo mais frequente de doença cardíaca valvular na Europa e nos países Ocidentais(148). É uma doença degenerativa e progressiva, caracterizada por um estreitamento da abertura da válvula aórtica, que permanece caracteristicamente assintomática por décadas, mas quando os sintomas ocorrem, a sobrevida é severamente comprometida(149). A DAC está presente em cerca de 50% dos pacientes com EAo(150) e partilham alguns fatores de risco com esta doença cardiovascular aterosclerótica, incluindo a idade, o tabagismo, os níveis de colesterol, lipoproteína (a) e DM(151, 152). A sobreposição nos fatores de risco associados a estas patologias sugere um processo similar da doença(153), mas a patogênese e as vias causais não são totalmente compreendidas(151). Durante muito tempo estipulou-se que a calcificação da válvula aórtica tricúspide, resultando em EAo, fosse secundária a um efeito de desgaste na válvula devido ao processo de envelhecimento, mas nos últimos anos, evidências acumuladas sugeriram que a inflamação, deposição de lípidos e calcificação, relacionados à patogênese da aterosclerose, são também responsáveis pela calcificação valvar e desenvolvimento da estenose aórtica calcificada(154-156).

8 Biomarcadores urinários e plasmáticos na DAC

Os biomarcadores são indicadores mensuráveis de um estado biológico, seja normal ou anormal e, portanto, podem ser usados num ambiente clínico no diagnóstico e tratamento de doenças. As proteínas são de particular interesse, pois são diretamente responsáveis pela função celular sendo que a expressão anormal da proteína é uma indicação de rotura celular devido a uma condição patológica (157). Os biomarcadores podem ser encontrados em diferentes amostras biológicas. O sangue tem sido a fonte de biomarcadores mais amplamente estudada do corpo. No entanto, a análise proteômica de amostras de sangue apresenta certas desvantagens. Durante a recolha de amostras, as proteases são frequentemente ativadas, o que gera uma gama de produtos proteolíticos, introduzindo variabilidade na amostra(158). Além disso, o sangue contém 20 proteínas de alta abundância que correspondem a 99% das proteínas da amostra que mascaram outras proteínas menos abundantes e potencialmente interessantes(159). Por isso a urina despertou grande interesse nos últimos 10 anos. A urina é uma ultrafiltração do sangue no corpo e é muito estável em comparação com o sangue(160). É de fácil processamento em laboratório, podem ser obtidas grandes quantidades, e sua coleta é simples e não invasiva causando mínimo *stress* aos pacientes(161).

Usando os biomarcadores como meio de deteção de patologias principalmente cardiovasculares contribuindo para o diagnóstico precoce como a DAC, onde a triagem pode fornecer informações sobre as populações de risco, oferecendo a oportunidade de iniciar um estilo de vida preventivo, tratamentos farmacológicos e até medidas profiláticas como o implante de *stent*, visando reduzir o risco de desenvolver isquemia cardíaca e enfarte do miocárdio(162).

Na tabela 1 estão listados alguns biomarcadores que foram identificados para possível diagnóstico ou mesmo previsibilidade da DAC. Entretanto, irei abordar outros biomarcadores que foram e têm sido estudados no contexto da DAC devido as suas participações no processo de aterosclerose, como:

8.1 Proteína C-Reativa (PCR)

É uma proteína de fase aguda, marcador de inflamação sistémica(163), que é muito sensível à infeção e dano tecidual(164). Apesar de ser um marcador inflamatório inespecífico, é um forte preditor independente para risco e eventos de DAC(165, 166), e está associado a outras patologias como o acidente vascular cerebral (AVC)(167) e

DAP(168). Além disso, verificou-se que níveis circulantes de PCR estão relacionados a vários fatores de risco cardiovascular bem conhecidos, como obesidade, tabagismo, PA, TG, ApoB, glicemia de jejum, frequência cardíaca (FC), fibrinogênio sérico e inversamente relacionado aos níveis de colesterol HDL, tanto em crianças como em adultos(169, 170).

Existem cerca de 25 estudos observacionais publicados desde o final dos anos 90 que confirmam a capacidade preditiva independente de PCR na estimativa de risco para DAC(164). Também está relacionado ao processo inflamatório da aterogênese(171, 172) e no prognóstico da DAC(173).

8.2 Apolipoproteína C-II (APOC2)

A APOC2 é um ativador essencial da atividade dos complexos de lipoproteína lipase (LPL) e desempenha um papel crucial na hidrólise de TG endógenos e exógenos mediada por LPL(174). Esta proteína foi identificada em lesões ateroscleróticas, onde se junta com macrófagos e forma fibrilas amilóides(175), que exercem ações pró-inflamatórias, possivelmente favorecendo a aterogênese(176). A concentração de APOC2 afeta a concentração de TG e a distribuição de partículas de HDL(177). Uma associação independente foi encontrada entre os níveis de TG e a concentração de APOC2 num modelo incluindo idade, circunferência da cintura, apolipoproteína C-III (APOC3), apolipoproteína E (APOE), glicose, insulina e tamanho médio de LDL em pacientes hiperglicêmicos(178), que como foi mencionado anteriormente constituem fatores de risco para a DAC.

8.3 Dedicador da Citocinese 2 (DOCK2)

A DOCK2 pertence a subfamília dedicador da citocinese A (DOCK-A) e enquanto os outros membros desta subfamília são expressos em vários tecidos, a expressão de DOCK2 é restrita às células hematopoiéticas(179). Estudos recentes indicaram que esta proteína regula os processos celulares associados à adesão, proliferação, apoptose celular e, especialmente, a migração e ativação de linfócitos, quimiotaxia de neutrófilos e o desenvolvimento de células imunes inatas(177). A sua associação à aterosclerose foi estabelecida devido à sua participação na diferenciação ou não diferenciação de CMLV, que estão na origem da progressão da placa aterosclerótica em todos os estágios, que incluem pré-aterosclerose, aterosclerose precoce e aterosclerose tardia(180).

8.4 Apolipoproteína E (APOE)

É uma glicoproteína onde a sua isoforma mais comum é a E3, que facilita a eliminação de certas lipoproteínas da circulação, enquanto as isoformas E2 e E4 têm afinidades diferentes para o recetor de LDL, afetando as concentrações de lipídeos circulantes. De um modo geral os polimorfismos associados a esta proteína estão associados à regulação e ao metabolismo lipídico(181). A influência dos polimorfismos APOE na DAC pode ser amplamente atribuída aos seus efeitos no perfil lipídico do sangue(182). A isoforma 2 da APOE foi associada DM tipo 2, fator de risco associado a DAC(183).

8.5 Citocinas

Constituem um grupo de proteínas envolvidas na emissão de sinais entre células implicadas no processo de inflamação. Dentre elas, destacam-se a IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α e MCP-1(184-186).

A IL-1 é um mediador pró-inflamatório apical na inflamação aguda e crónica e um crucial indutor da resposta imune inata(187, 188). Em placas ateroscleróticas humanas, a expressão de IL-1 α e IL-1 β parece associar-se com a progressão de placas ateroscleróticas, com expressão mínima em artérias coronárias saudáveis, expressão aumentada em placas ateroscleróticas simples e alta expressão em placas complicadas(189). Alguns estudos que mediram os níveis de IL-1 β mostraram que os seus níveis estavam aumentados em pacientes com maior carga aterosclerótica(190-192), e em pacientes com hipercolesterolemia(193). No entanto, mais dados de estudos clínicos são necessários para a avaliação da relação entre a IL-1 β e os eventos clínicos ateroscleróticos(165).

A IL-6 é uma citocina pleiotrópica única que apresenta propriedades pró e anti-inflamatórias, dependendo do tipo de célula-alvo. Os pacientes com coronariopatias apresentam níveis aumentados de IL-6 e pode ser um marcador de inflamação relacionado ao risco cardiovascular(194-196). Wainstein et al., constataram que a presença da DAC estava associada a maiores níveis médios de IL-6 e, um nível sérico acima de 1 pg/mL é preditivo de DAC significativa(197). Estudos imuno-histoquímicos mostram alta expressão de IL-6 em artérias ateroscleróticas humanas em áreas ricas em macrófagos, em regiões de placas coronárias(198). Como já foi referido anteriormente, os indivíduos com DM tipo 2 apresentam risco elevado de aterosclerose(199). Os mecanismos de *stress* oxidativo aumentam a IL-6 na DM tipo 2 e a IL-6 circulante está associada com a

resistência à insulina(200), e é um preditor independente de eventos cardiovasculares(201-204).

A IL-10 é uma citocina capaz de atuar sobre diversos tipos celulares e é produzida por uma variedade de células imunológicas, incluindo células T, B e macrófagos, sendo mais amplamente reconhecida como uma citocina anti-inflamatória(205, 206). Esta interleucina medeia as vias anti-aterogênicas(165). Conseqüentemente, pode-se supor que a IL-10 circulante esteja inversamente associada às DCV(207). Em humanos, placas ateroscleróticas instáveis têm aparentemente maior expressão de IL-10 localizada em espécimes de aterectomia imunocoradas do que placas estáveis(208). Em pequenos estudos clínicos, os níveis de IL-10 foram relatados inalterados(209, 210), aumentados(211, 212) ou diminuídos(213, 214) em pacientes com angina instável em relação aos controles(207). No entanto, relatou-se que a elevação da IL-10 circulante está associada à melhora(215, 216) e agravou(217) o prognóstico em pacientes com síndromes coronárias agudas(207).

O TNF- α é também conhecido como uma citocina pleiotrópica que funciona dentro de uma complexa e firmemente regulada rede de citocinas(218). Tem sido implicado na disfunção e remodelagem arterial após eventos coronários agudos(219). A sua sobre expressão está associada a patogênese de condições severas como a disfunção miocárdica e DAC(220, 221).

O MCP-1 é uma quimiocina que induz o recrutamento de leucócitos periféricos em tecidos(222), no caso da DAC, ela ajuda a recrutar monócitos para a íntima arterial e ativa essas células para promover a aterosclerose(184, 223). Há provas contundentes de que a MCP-1 desempenha um papel crítico no desenvolvimento de DCV. No entanto, os mecanismos moleculares subjacentes ao papel da MCP-1 no desenvolvimento e progressão da doença permanecem pouco compreendidos(222). Num estudo caso-controle, desenvolvido por Diederik et al., *European Prospective Investigation into Cancer in Norfolk (EPIC-Norfolk)*, com o objetivo de investigar a relação entre os polimorfismos de nucleotídeo único de ligante de quimiocina C-C motif 2 (CCL2), concentrações de MCP-1 e o risco de DAC futura, não se encontraram evidências de associação entre os níveis séricos de MCP-1 e o risco de DAC(224). Mas no estudo desenvolvido por Ding Ding et al., com o objetivo de relacionar os níveis séricos de MCP-1 e de todas as causas e mortalidade cardiovascular em pacientes com DAC, verificou-se que níveis mais baixos e mais altos de MCP-1 estão associados a um risco aumentado de

mortalidade por todas as causas de DCV entre os pacientes com DAC. Mas são necessárias mais estudos para confirmar sua relevância clínica(225).

8.6 CD40 solúvel (sCD40)

É uma molécula com um duplo papel pró-trombótico e pró-inflamatório(226) que tem demonstrado promover aterosclerose e instabilidade da placa(227) e parece ter um papel prognóstico não apenas em indivíduos com aterosclerose avançada, mas também na população geral(226). No *Women's Health Study*, níveis plasmáticos elevados de sCD40 foram associados a um maior risco de eventos cardiovasculares(228).

8.7 Amilóide Sérico A (SAA)

São uma família de proteínas que formam um importante componente da resposta inflamatória da fase aguda(229) e crônica (230). A função dessas proteínas ainda é desconhecida, mas algumas evidências sugerem que podem desempenhar um papel fisiopatológico na aterosclerose(231), entre elas destaca-se o fato de SAA funcionar como uma apolipoproteína nas partículas de HDL e pode desempenhar um papel na modificação aguda do transporte de colesterol durante o *stress* fisiológico. A transição da DAC aterosclerótica estável crônica para uma SCA está associada a um aumento na atividade inflamatória dentro da placa(232), refletida num aumento nos níveis de PCR e SAA(233). Num estudo realizado por Alistair et al., com o objetivo de avaliar a associação entre as SAA e a DAC, verificou-se que os níveis de SAA estavam elevados em pacientes com DAC aterosclerótica em comparação com pacientes não afetados, evidenciando uma possível ligação fisiopatológica entre a inflamação, o metabolismo das lipoproteínas e o desenvolvimento da aterosclerose(231).

8.8 Moléculas de adesão

As moléculas de adesão são conhecidas por regular a formação de trombos, facilitando a infiltração de leucócitos, mediando a migração e proliferação de células musculares lisas e possibilitando a deposição de tecido fibrótico, por meio de interações adesivas, estando portanto envolvidas na patogênese da DCV(234). A expressão focal da proteína de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e E-selectina foi demonstrada em placas ateroscleróticas humanas(235) e têm sido estudadas no diagnóstico precoce da SCA e na estratificação de risco na DAC(165). Mas níveis elevados de ICAM-1 e E-selectina foram associados a eventos cardiovasculares futuros em indivíduos aparentemente saudáveis(236, 237). Blankenberg et al., estudaram a relação entre moléculas de adesão celular circulante e a morte em

pacientes com DAC, e constataram que a VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina foram significativamente relacionadas com futuros óbitos por causas cardiovasculares entre pacientes com DAC documentada, especialmente a VCAM-1 adicionado ao valor preditivo dos fatores de risco clássicos(238).

8.9 Mieloperoxidase (MPO)

É uma proteína produzida por neutrófilos, monócitos e certos macrófagos teciduais ativados (como em placas ateroscleróticas). Promove dano oxidativo de tecidos do hospedeiro em locais de inflamação, incluindo lesões ateroscleróticas(239-241). Zhang et al., estudaram a associação entre os níveis de MPO e o risco de DAC, e constataram que níveis séricos elevados de MPO estão associados com a presença de DAC, suportando assim o papel da MPO como marcador inflamatório na DAC e sua implicação no diagnóstico de aterosclerose e avaliação de risco(241). Já Hasanpour et al., avaliaram a associação entre os níveis séricos de MPO e a DAC em pacientes com DAC, sem diabetes, hipertensão, obesidade e hiperlipidemia, e constataram que embora a concentração de MPO seja maior em pacientes com aterosclerose, esta proteína não é um preditor de DAC em pacientes sem diabetes, hipertensão, obesidade e hiperlipidemia(242).

8.10 Metaloproteinases de Matriz (MMP)

Também denominadas matrixinas, consistem em endopeptidases que participam da degradação da matriz extracelular(243) de placas coronárias(244), contribuindo para a desestabilização da placa(243) e remodelagem das artérias coronárias(244). Vasos humanos ateroscleróticos exibem níveis aumentados de MMP-2, MMP-3 e MMP-9, especialmente em pacientes com SCA(245) em comparação com vasos humanos saudáveis(243). Não há muitos dados para a associação entre as MMP e o prognóstico das DCV(245).

8.11 Fator de Crescimento Placentário (PIGF)

É uma citocina funcional que estimula a angiogênese e a migração aterogénica de monócitos/macrófagos na parede arterial(246). Cassidy et al., estudaram o potencial papel do PIGF na predição do risco de DAC em mulheres, através do coorte do *Nurses Health Study*, e verificaram que os níveis pré-diagnóstico elevados de PIGF foram modestamente associados com o risco subsequente de eventos coronários e os resultados foram atenuados após o controlo do HDL-c(247).

8.12 Fosfolipase A2 Associada à Lipoproteína (Lp-PLA2)

É uma enzima sintetizada por células inflamatórias e plaquetas ativadas em placas ateroscleróticas(248). Participa da modificação oxidativa da LDL(249).

Li et al., investigaram as associações entre a Lp-PLA2 e os riscos de DAC e AVC na população geral, e verificaram que a maior atividade de Lp-PLA2 foi associada a um risco aumentado de DAC e AVC(250). Mallat et al., avaliaram a associação entre a atividade da Lp-PLA2 e DAC em indivíduos saudáveis, e relataram que a atividade desta enzima fornece valor prognóstico adicional aos fatores de risco tradicionais e identifica um subgrupo de indivíduos com alto risco de DAC incidente(251).

8.13 Complexo de Proteína 8/14 Mieloide (MRP8/14)

Também chamado de calprotectina é um heterodímero de 2 proteínas de ligação ao cálcio envolvidas em sinalização dependente de cálcio, diferenciação celular, progressão do ciclo celular e interações com membranas do citoesqueleto(252).

Altwegg et al., investigaram a possibilidade de o MRP8/14 expresso por monócitos e granulócitos infiltrados representar um mediador e um biomarcador precoce de SCA. Verificaram que na SCA, o MRP8/14 é marcado expressamente no local da oclusão coronária por fagócitos invasores. E que a ocorrência de níveis elevados de MRP8/14 na circulação sistêmica, antes dos marcadores de necrose miocárdica, faz deste complexo um dos principais métodos para detecção de placas instáveis(252). Peng et al., avaliaram a associação entre os níveis séricos de MRP8/14, PCR, recetor secretor endógeno para produtos finais de glicação avançada (esRAGE) e a ocorrência de DAC ou espessura médio-intimal da coronária (IMT) quando a DAC ainda não foi desenvolvida em pacientes diabéticos. Constataram que os pacientes diabéticos com DAC tinham níveis plasmáticos elevados de MRP8/14 que também estavam positivamente associados com a gravidade da DAC e IMT da carótida em pacientes sem DAC clinicamente evidente(253).

9 Abordagens multi-ômicas orientadas para o estudo de doenças cardiovasculares

A integração simultânea de abordagens multi-ômicas, incluindo, mas não limitado à genômica, epigenômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica, representa uma abordagem com um grande impacto para entender os mecanismos que conectam as diversas causas identificadas da DCV e onde muitas fontes de variabilidade são integradas

em modelos estatísticos para identificar as principais vias que têm maior contribuição para a doença(254). O surgimento de plataformas ômicas de elevado desempenho abriu a possibilidade de entender com mais precisão os estádios de doenças ao nível molecular. Essas tecnologias analíticas são capazes de uma detecção confiável, robusta e rápida de biomarcadores candidatos para o início e progressão da doença(255). Sendo assim, foi desenvolvido um modelo molecular em DAC, envolvendo recolha de dados, construção de uma base de dados de variáveis clínicas complementada com toda a informação relativa a proteômica adquirida através de uma meta-análise(256). Na figura 2 está representado um modelo multi-ômico interativo em DAC. Conjuntos de dados multi-ômicos da DAC recuperados de Doenças Cardiovasculares (CVD) em relação ao tipo de entidade molecular, como por exemplo, metabolito (MET), proteínas (PRO) e microRNA (miRNA). As entidades moleculares dos estudos foram classificadas inicialmente por meta-análise usando uma abordagem de votos (avaliação de frequência), na qual figuras de mérito estatísticos (por exemplo: valores de p) foram combinados pela implementação do método de *Fisher* e a expressão diferencial de moléculas (*fold-change*) através de uma abordagem consensual. Após a meta-análise, uma integração combinatória no nível de sistemas de todas as entidades moleculares relativa à modulação da atividade transcricional via avaliação de fatores de transição (TF), regulação pós-transcricional determinada por interações microRNA-gene (computacionalmente previsto e experimentalmente validado), interações proteína-proteína (PPI), avaliação do fluxo metabólico e regulação via associação de genes-enzima-reação-composto e análise de super-representação dos termos de GO e vias *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG)(256).

Tabela 1 - Resumo dos biomarcadores plasmáticos e urinários na doença arterial coronária (DAC)

Biomarcador	Variação			Técnica de detecção/validação	Grupos analisados		Amostra	Aplicação Clínica	Ref
	S/N	S/M	M/N		Casos (n)	Controlos (n)			
APOC2	↑	↑	↓	LC-MS/MRM	65	163	Plasma	Previsibilidade	(177)
C4A	↑	↑	↑	LC-MS/MRM	65	163	Plasma	Previsibilidade	(177)
CXCL7	↓	↓	↑	LC-MS/MRM	65	163	Plasma	Previsibilidade	(177)
DOCK2	↑	↑	↓	LC-MS/MRM	65	163	Plasma	Previsibilidade	(177)
LBP	↓	↓	↑	LC-MS/MRM	65	163	Plasma	Previsibilidade	(177)
VTDB	↓	↓	↑	LC-MS/MRM	65	163	Plasma	Previsibilidade	(177)
LAMB1	↑	↓	↑	LC-MS/MRM	65	163	Plasma	Previsibilidade	(177)
	iTRAQ	MRM	AUC						
BODG	0.48	0.87	0.61	iTRAQ/LC-MS/MS/MRM	22	22	Urina	Diagnóstico	(257)
AL1A1	0.64	0.83	0.65	iTRAQ/LC-MS/MS/MRM	22	22	Urina	Diagnóstico	(257)
APOE	0.65	0.74	0.57	iTRAQ/LC-MS/MS/MRM	22	22	Urina	Diagnóstico	(257)

A1AG1	1.76	1.74	0.62	iTRAQ/LC-MS/MS/MRM	22	22	Urina	Diagnóstico	(257)
TFF1	0.66	0.19	0.93	iTRAQ/LC-MS/MS/MRM	22	22	Urina	Diagnóstico	(257)
APOD	0.65	0.14	0.89	iTRAQ/LC-MS/MS/MRM	22	22	Urina	Diagnóstico	(257)
KLK2	0.61	0.68	0.65	iTRAQ/LC-MS/MS/MRM	22	22	Urina	Diagnóstico	(257)
KLK3	1.80	1.35	0.50	iTRAQ/LC-MS/MS/MRM	22	22	Urina	Diagnóstico	(257)
GSTA1	0.55	0.51	0.54	iTRAQ/LC-MS/MS/MRM	22	22	Urina	Diagnóstico	(257)
K1C19	0.61	0.82	0.53	iTRAQ/LC-MS/MS/MRM	22	22	Urina	Diagnóstico	(257)
ANXA5	1.63	1.75	0.49	iTRAQ/LC-MS/MS/MRM	22	22	Urina	Diagnóstico	(257)
K1C13	2.00	2.15	0.52	iTRAQ/LC-MS/MS/MRM	22	22	Urina	Diagnóstico	(257)
A1AG2	1.60	1.36	0.59	iTRAQ/LC-MS/MS/MRM	22	22	Urina	Diagnóstico	(257)
DNAS1	0.64	0.51	0.41	iTRAQ/LC-MS/MS/MRM	22	22	Urina	Diagnóstico	(257)
SDC4	1.69	1.55	0.57	iTRAQ/LC-MS/MS/MRM	22	22	Urina	Diagnóstico	(257)
AMPE	1.53	2.03	0.82	iTRAQ/LC-MS/MS/MRM	22	22	Urina	Diagnóstico	(257)
CD166	1.46	1.61	0.69	iTRAQ/LC-MS/MS/MRM	22	22	Urina	Diagnóstico	(257)
LYNX1	0.60	0.68	0.73	iTRAQ/LC-MS/MS/MRM	22	22	Urina	Diagnóstico	(257)

NTM	0.58	0.70	0.70	iTRAQ/LC-MS/MS/MRM	22	22	Urina	Diagnóstico	(257)
	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)							
AS	94	96		ELISA	160	20	Plasma	Diagnóstico/Prognóstico	(258)
PCR-as	94	93		ELISA	160	20	Plasma	Diagnóstico/Prognóstico	(258)
PAI-1	92	90		ELISA	160	20	Plasma	Diagnóstico/Prognóstico	(258)
VN	70	83		ELISA	160	20	Plasma	Diagnóstico/Prognóstico	(258)
OX-LDL	70	75		ELISA	160	20	Plasma	Diagnóstico/Prognóstico	(258)
MDA	74	77		ELISA	160	20	Plasma	Diagnóstico/Prognóstico	(258)

S/N – grupo com estenose coronária severa *versus* grupo com artéria coronária normal, S/M – grupo com estenose coronária severa *versus* grupo com estenose coronária leve a moderada, M/N – grupo com estenose coronária leve a moderada *versus* grupo com artéria coronária normal, APOC2 – Apolipoproteína C-II, C4A – Componente 4A do Complemento, CXCL7 – Ligando 7 de Quimiocina (*motif* C-X-C), DOCK2 – Dedicador da Citocinese 2, LAMB1 – Subunidade β 1 da Laminina, LBP – Proteína de Ligação de Lipopolissacarídeo Humano, VTDB – Proteína de Ligação à Vitamina D, LC-MS/MRM - Espectrometria de Massa e Cromatografia, BODG – Dioxigenase de Gama-butirotetina, AL1A1 – Desidrogenase Retinal, APOE – Apolipoproteína E, A1AG1 – Alfa-1-glicoproteína Ácida 1, TFF1 – Fator de Trevo 1, APOD – Apolipoproteína D, KLK2 – Kalikreína-2, KLK3 – Antígeno Específico da Próstata, GSTA1 – Glutathione S-transferase A1, K1C19 – Queratina, Citoesquelético Tipo I 19, ANXA5 – Anexina A5, K1C13 – Queratina, Citoesquelético Tipo I 13, A1AG2 – Alfa-1-glicoproteína Ácida 2, DNAS1 – Desoxirribonuclease-1, SDC4 – Sydecina-4, AMPE – Glutamil Aminopeptidase, CD166 – Antígeno CD166, LYNX1 – Ly-6, proteína semelhante a Neurotoxina 1, NTM – cDNA FLJ57258, altamente semelhante a Neurotrimin, OX-LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade Oxidativa, MDA – Malondialdeído, PAI-1 – Inibidor do Ativador do Plasminogénio, VN – Vitronectina, AS – Ácido Siálico, PCR-as – Proteína C-reativa de alta sensibilidade, iTRAQ – *tags* Isobáricas para Quantificação Relativa e Absoluta, MRM – Monitoramento de Reações Múltiplas, AUC – Área Sob a Curva.

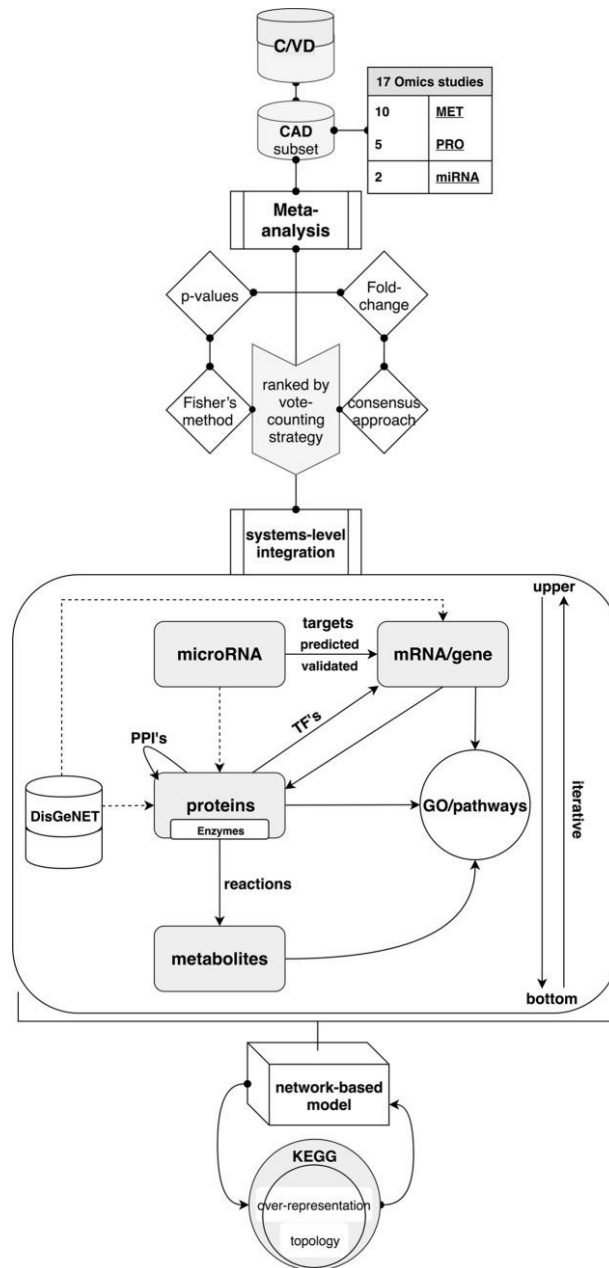


Figura 2 - Desenvolvimento supervisionado de um modelo molecular multi-ômico integrativo em DAC. Fonte: Fernandes M, Patel A, Husi H. C/VDdb: A multi-omics expression profiling database for a knowledge-driven approach in cardiovascular disease (CVD). PLoS One. 2018;13(11):e0207371-e.

10 Objetivos

10.1 Objetivo Geral

Pretendeu-se com este estudo identificar potenciais alvos proteicos na doença arterial coronária, em amostras de urina, investigar os diversos fatores de risco associados às doenças cardiovasculares e avaliar o seu impacto na doença arterial coronária, estenose aórtica e estenose aórtica + doença arterial coronária, mediante o levantamento de dados clínicos.

10.2 Objetivos Específicos

Apresentam-se como objetivos específicos:

1. Identificar as proteínas existentes na urina de pacientes com DAC;
2. Identificar as proteínas existentes na urina de pacientes com EAo;
3. Identificar os principais fatores de risco associados a DAC;
4. Avaliar a relação dos principais fatores de risco com a população em estudo.

11 Material e Métodos

11.1 Seleção da amostra

O protocolo deste estudo está incluído no projeto *Diabetes and Obesity at the Crossroads between oncological and cardiovascular disease – a system analysis NETWORK towards precision medicine* (DOCNET), autorizado pela comissão de ética do Hospital de São João (código número 07-17). Foram respeitadas as recomendações constantes da Declaração de Helsínquia II e da Organização Mundial da Saúde (OMS) no que se refere a experimentação que envolva seres humanos. Foi explicado aos pacientes de forma adequada o estudo e os procedimentos necessários para a participação no mesmo e, após a aceitação, foi assinado um consentimento informado (Anexo I) e entregue uma informação do estudo em curso por escrito (Anexo II). Foram selecionadas 151 pacientes, sendo: 60 com diagnóstico de DAC, 54 com EAo, 26 com EAo+DAC, confirmados por ecocardiograma e cateterismo, respetivamente, recrutados no Departamento de Cirurgia Torácica, do Hospital de São João, antes da realização da cirurgia (pré-operatório), entre os meses de abril à novembro, no ano de 2018 e 11 controlos de um outro estudo, o *New Targets in Diastolic Heart Failure: From Comorbidities to Personalized Medicine* (NETDIAMOND). Todas as amostras foram selecionadas aleatoriamente.

11.2 Critérios de inclusão

Foram incluídos pacientes do género masculino e feminino, com idades compreendidas entre os 39 e os 87 anos com DAC, EAo, DAC+EAo.

11.3 Critérios de exclusão

Foram excluídos recém-nascidos, crianças, adolescentes, mulheres grávidas, pacientes com infeções ativas do trato urinário, com infeção por HIV, algaliados, pacientes que se recusaram a participar no estudo (não assinando o consentimento informado) e pacientes com insuficiência mitral ou tricúspide severa.

11.4 Preparação da amostra

As amostras de urina foram coletadas antes das intervenções cirúrgicas ou outras intervenções terapêuticas, foram armazenadas a -80°C, centrifugadas a 10.000xg por 10 minutos a 10°C e as proteínas foram concentradas usando um dispositivo de filtro com peso molecular cortado de 10kDa (*Vivaspin 500-10kDa, Sartorius Biotech*). O retentato proteico foi ressuspenso em 100µL de dodecilsulfato de sódio (SDS) 4% e Tris 50 mmol pH 6,8 e a concentração de proteína foi medida usando um *kit* comercial RC/DC (Bio-Rad). Isolaram-se 30µg de cada amostra e ajustou-se o volume 300µL com SDS a 4% em

Tris 50 mmol, pH 6,8. Um total de 17 amostras foi preparado para análise por cromatografia seguida de espectrometria em massa tandem (LC-MS/MS) com o protocolo de digestão *S-TrapTM Micro Spin Column (Protifi) (259)* de acordo com as instruções do fabricante, com pequenas modificações. Resumidamente, todas as amostras foram centrifugadas por 8 minutos a 13.000xg e as proteínas no sobrenadante foram reduzidas pela adição de DTT 20mM e incubação por 10 minutos a 95°C e depois alquiladas pela adição de iodoacetamida 40mM e incubação por 30 minutos a temperatura ambiente no escuro. A matéria não dissolvida foi removida por centrifugação por 8 minutos a 13.000xg. Em seguida, após adição de 12% de ácido fosfórico a 1/10 (v/v) ao sobrenadante, foi adicionado tampão *S-trap* (90% de MeOH em 100mM de bicarbonato de trietilamônio – TEAB, pH 7,1) (6/1, v/v) e a mistura foi aplicada a uma coluna de centrifugação *S-TrapTM*. A micro coluna foi centrifugada a 4.000xg até que a amostra completa fosse passada e 3 lavagens com tampão *S-Trap* foram realizadas a 4.000xg. As proteínas foram digeridas com tripsina (*Promega*) (1/25, p/p) adicionando tripsina em solução de TEAB 50mM à micro coluna por 1 hora a 47°C. Os peptídeos foram eluídos de acordo com as instruções do fabricante.

11.5 Análise LC-MS/MS

Os peptídeos purificados foram secos, redissolvidos no solvente A (ácido trifluoroacético – TFA a 0,1% em água / acetonitrilo - ACN (98: 2, v/v)) e aproximadamente 2µg de cada amostra foram injetados para análise por LC-MS/MS em *Ultimate 3000 RSLC nanoLC (Thermo Scientific, Bremen, Alemanha)* em linha conectado a um *LTQ-Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemanha)* equipado com uma fonte de íon duplo *pneu-Nimbus (Phoenix S&T)*. A captura foi realizada a 10µL/min por 4 minutos em solvente A em uma coluna de captura de 20mm (fabricada internamente, 100µm de diâmetro interno – ID, contas de 5µm, C18 Repronil-HD, Dr. Maisch, Alemanha) e a amostra foi carregada numa coluna de micropilares de 200 cm de comprimento (*PharmaFluidics*) com funcionalidade com tampa C18 montada no forno de coluna do *Ultimate 3000* a 50°C. Para uma ionização adequada, um emissor *PicoTip* de sílica fundida (10µm de diâmetro interno) (*New Objective*) foi conectado à união de saída *µPACTM* e uma conexão aterrada foi fornecida a essa união. Os peptídeos foram eluídos por um aumento não linear de 1 a 55% do solvente MS B (0,1% TFA em água/ACN (2:8, v/v)) durante 115 minutos, primeiro a uma razão de 750 nL/min, depois a 300 nL/min, seguido de uma lavagem de 15 minutos atingindo 99% do solvente MS B

e reequilibrando com o solvente MS A 80,1% TFA em água). O espectrômetro de massa foi operado no modo de ionização positiva, dependente dos dados, alternando automaticamente entre a aquisição de MS e MS/MS para os picos mais abundantes em um determinado espectro de MS. A voltagem da fonte foi ajustada em 2,7 kV e a temperatura capilar foi de 275°C. No *LTQ-Orbitrap* Elite, os espectros de MS foram adquiridos no Orbitrap (m/z 300-2.000, alvo AGC 3 x 10⁶ iões, tempo máximo de injeção de iões 100ms) com uma resolução de 60.000 (a 400 m/z). os 20 iões mais intensos que atendem aos critérios de seleção predefinidos (meta de AGC 5 x 10³, tempo máximo de injeção de iões 20 ms, tipo de dados espectrais: centroide, exclusão de 1 precursor não atribuído e 1 carregado positivamente, tempo de exclusão dinâmico 20s) foram isolados na trapa de iões linear e fragmentada na célula de alta pressão da armadilha de iões. A energia de colisão do CID foi ajustada em 35V e o ião de fundo polidimetilciclossiloxano em 445,120028 Da foi usado para calibração interna (massa de trava).

11.6 Análise de dados

A análise dos dados foi realizada com o *MaxQuant* (versão 1.6.9.0), usando o mecanismo de pesquisa *Andromeda* com configurações de pesquisa padrão, incluindo uma FDR definida em 1% no nível do PSM, peptídeo e proteína. Os espectros foram pesquisados em relação às sequências de proteínas humanas no banco de dados *Uniprot* (versão junho de 2019), contendo 20.960 sequências (www.uniprot.org). A tolerância de massa para iões precursores e fragmentos foi fixada em 4,5 e 20 ppm, respectivamente, durante a pesquisa principal. A especificidade da enzima foi definida com C-terminal para arginina e lisina, permitindo também a clivagem nas ligações prolina com um máximo de duas clivagens perdidas. Modificações variadas foram definidas para oxidação dos resíduos de metionina e acetilação da proteína N-terminais, enquanto a carbamidometilação dos resíduos de cisteína foi definida como uma modificação fixa. A correspondência entre execuções foi ativada com uma janela de tempo correspondente de 0,7 minutos e uma janela de tempo de alinhamento de 20 minutos. Somente proteínas com pelo menos um peptídeo único ou de lâmina foram mantidas, levando à identificação de 964 proteínas. As proteínas foram quantificadas pelo algoritmo *MaxLFQ* integrado no *software MaxQuant*. Foi necessária uma contagem de razão mínima de dois peptídeos ou específicos para a quantificação. Uma análise de dados adicional foi realizada com o *software Perseus* (versão 1.6.2.1) após o carregamento do arquivo *ProteinGroups* do *MaxQuant*. Os resultados da base de dados e as proteínas identificadas com um valor de

Q abaixo de 0,01 foram removidos e as amostras replicadas foram agrupadas. As proteínas com menos de três valores válidos em pelo menos um grupo foram removidas e os valores ausentes foram imputados a partir de uma distribuição normal em torno do limite de detecção, levando a uma lista de 450 proteínas quantificadas que foram usadas para análises de dados adicionais.

Foi utilizado o *STRING* para a análise das principais vias envolvidas na EAo e DAC simultaneamente.

11.7 Análise de dados de expressão proteica e de dados clínicos

11.7.1 Análise de dados da expressão proteica

Na análise dos dados da expressão proteica, foi utilizado o repositório *Pubmed*, e os programas *Microsoft Excel Office*® e o *FunRich*®(260).

Inicialmente foi feita uma análise sistemática à base dados da *Pubmed*, usando as palavras-chave “*coronary artery disease, proteomics*”, “*coronary artery, proteomics*”, “*coronary artery disease, proteomics, urine*”, “*coronary disease, proteomics, urine*”, “*coronary artery, proteomics, urine*” e os resultados obtidos dos artigos que melhor se adequavam ao estudo foram inseridos no *Excel*. Posteriormente foi feita uma relação entre todos os artigos selecionados, para avaliar se existiam semelhanças entre os estudos e, por fim, foi feita uma análise de interação entre genes e proteínas dos artigos, mediante o uso da ferramenta *FunRich*.

11.7.2 Análise estatística

11.7.2.1 Análise de dados clínicos

Os programas utilizados na análise dos dados estatísticos foram o *Microsoft Excel Office*® e o *Statistical Package for the Social Sciences*® (SPSS), versão 25.0 for *Windows*.

Inicialmente foi feito um estudo exploratório, analítico e descritivo, com o objetivo de avaliar o conjunto de dados recolhidos. O nível de significância utilizado foi de 5% ($p < 0,05$).

A figura 3 explica quais os processos envolvidos no desenvolvimento do presente estudo. Foram realizadas 4 fases de estudo e análise para que se obtivesse uma informação ampla e deste modo tornar o trabalho mais abrangente. Inicialmente foi feita uma revisão bibliográfica como forma de identificar os biomarcadores urinários e plasmáticos já conhecido na DAC e EAo. De seguida foi realizada uma análise sistemática, através da

recolha de informação na plataforma *Pubmed* usando as palavras chave: “*coronary artery disease, proteomics*”, “*coronary artery, proteomics*”, “*coronary artery disease, proteomics, urine*”, “*coronary disease, proteomics, urine*”, “*coronary artery, proteomics, urine*”, a extração de publicações científicas mais relevantes de onde foram identificadas 1937 proteínas e inseridas, posteriormente, no Excel, contendo todas informações relativas as proteínas dos estudos mais relevantes, e no *FunRich*, onde foram identificados os processos biológicos, vias biológicas, componentes celulares e feita uma matriz de associação com as proteínas comuns nos estudos selecionados. Foi feita uma análise dos dados clínicos, relativamente ao sexo, a idade, HTA, dislipidemia, DM, obesidade e o IMC, uma vez que estes constituem os fatores de risco cardiovasculares que dão início ao processo de aterosclerose, envolvido no início da DAC e EAo. Por fim foi feito o estudo da proteómica da urina através da seleção aleatória de amostra de 6 urinas dos doentes com DAC, EAo e controlos (Anexo VI). Estes processos são essenciais para que se obtenha uma informação completa sobre o perfil do proteoma destas duas doenças e no fundo cada uma delas se complementa, uma vez que a informação necessária sobre as patologias e as diversas proteínas foi feita no processo de revisão bibliográfica e selecionada na análise sistemática dos estudos científicos. Os dados clínicos obtidos dos doentes vão-se refletir no proteoma urinário, com a identificação de proteínas associadas aos fatores de risco cardiovasculares.

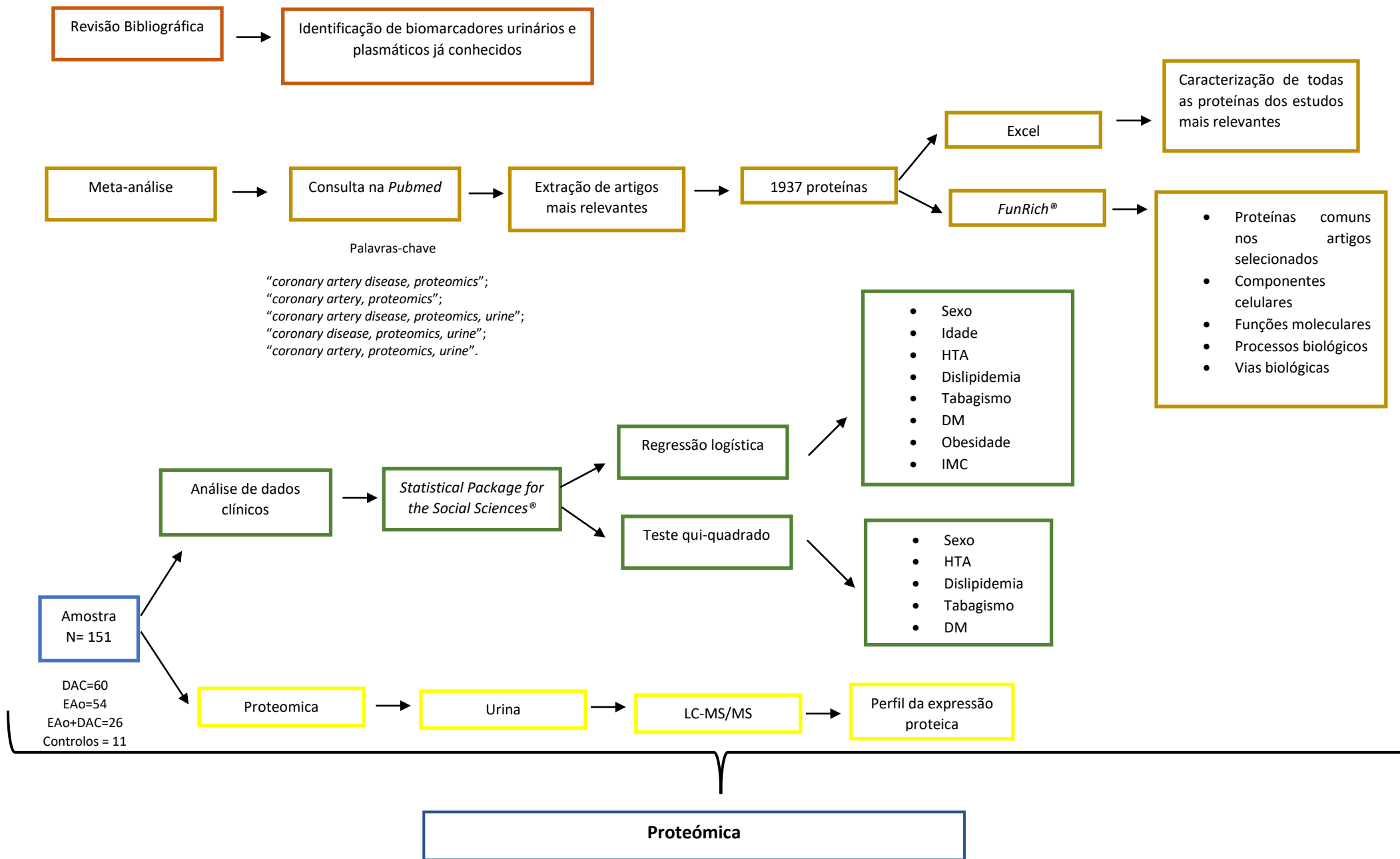


Figura 3 - Esquema resumo das 3 abordagens efetuadas na dissertação

12 Resultados

12.1 Análise sistemática dos dados da expressão proteica

Com o objetivo de recolher e analisar todos os estudos moleculares sobre a doença arterial coronária, foi realizada uma extensa pesquisa bibliográfica. Mais de 1000 resumos foram revisados e três níveis de critérios de exclusão foram seguidos, obtendo-se um total de 10 artigos para a análise, com um total de 1937 proteínas. Os dados dos artigos foram selecionados e organizados manualmente para extrair todas as entidades moleculares (por exemplo, proteína, gene, sequência, massa molecular, magnitude) que poderiam ser identificadas (Tabela Suplementar 1). Para avaliar a homogeneidade e procurar identificar proteínas comuns entre os 10 artigos validados foi criada uma matriz (Figura 4), onde os tons mais escuros refletem as maiores percentagens e uma maior associação entre as proteínas e os estudos em causa. Pela análise da literatura, verificou-se que a proteína da família do colágeno principalmente a tipo I alfa 1 e colágeno tipo III alfa 1 estavam presentes em cerca de 47% dos artigos. As proteínas colágeno tipo I alfa 2, colágeno tipo II alfa 1, colágeno tipo V alfa 1, colágeno tipo XVI alfa 1, colágeno tipo XVII alfa 1, subunidade beta de hemoglobina, uromodulina e recetor de progesterona associada a membrana 1 estavam presentes em aproximadamente 22% dos artigos. Desta análise constatou-se que 3 estudos se correlacionavam melhor com o nosso estudo, nomeadamente o estudo de Mohammad A. Anwar et al.(261), Michiel J. Bom et al(262), e Nay M. Htun et al.(263) identificados como estudo 1, 2 e 3, respetivamente.

Min-Yi Lee et al 2015										
Nay M. Hunt et al 2017	1 (0,8%)									
von zur Muhlen et al 2008	0 (0,0%)	2 (8,0%)								
Lukas U. Zimmerli et al 2008	1 (0,9%)	3 (10,0%)	2 (25,0%)							
Michiel J. Bom et al 2018	13 (2,9%)	2 (0,5%)	1 (0,3%)	2 (0,5%)						
Madankumar Ghatge et al 2017	0 (0,0%)	1 (2,5%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	5 (1,4%)					
Trayambak Basak et al 2016	24 (6,6%)	5 (1,7%)	0 (0,0%)	2 (0,7%)	28 (4,6%)	2 (0,7%)				
Catriona E. Brown et al 2015	5 (4,1%)	9 (22,0%)	2 (8,0%)	4 (13,8%)	4 (1,1%)	0 (0,0%)	6 (2,0%)			
Verónica M. Dardé et al 2010	8 (6,3%)	2 (3,6%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (0,3%)	1 (2,1%)	30 (10,6%)	3 (5,6%)		
Mohammad A. Anwar et al 2019	7 (4,3%)	3 (3,4%)	0 (0,0%)	2 (2,7%)	12 (2,9%)	1 (1,2%)	53 (17,9%)	2 (2,2%)	14 (16,5%)	
	Min-Yi Lee et al 2015	Nay M. Hunt et al 2017	von zur Muhlen et al 2008	Lukas U. Zimmerli et al 2008	Michiel J. Bom et al 2018	Madankumar Ghatge et al 2017	Trayambak Basak et al 2016	Catriona E. Brown et al 2015	Verónica M. Dardé et al 2010	Mohammad A. Anwar et al 2019

Figura 4 – Matriz de associação dos estudos da expressão proteica da DAC. Fonte: *Pathan M, Keerthikumar S, Chisanga D, Alessandro R, Ang CS, Askenase P, et al. A novel community driven software for functional enrichment analysis of extracellular vesicles.*

Analisou-se, posteriormente, o componente celular, a função molecular, os processos biológicos e vias biológicas das proteínas envolvidas nos artigos selecionados. Verificou-se que relativamente aos componentes celulares envolvidos o extracelular, região extracelular e os exossomas foram as principais vias biológicas comuns nos 3 estudos. No que concerne aos outros fatores envolvidos no processo de expressão das proteínas nos 3 estudos, estes foram distintos sendo que o estudo 1 (Anexo III) as funções moleculares foram atividade transportadora (30,2%; $p < 0,001$), atividade inibidora da protease (17,5%; $p < 0,001$), atividade da peptidase (7,9%; $p < 0,001$) e atividade do complemento (6,3%; $p < 0,001$). Os processos biológicos relacionados foram o metabolismo de proteínas (42,9%; $p < 0,001$) e transporte (30,2%; $p < 0,001$). No estudo 2 (Anexo IV) as funções moleculares desenvolvidas pelas proteínas do estudo foram a atividade recetora (12,6%; $p < 0,001$), atividade de citocina (9,3%; $p < 0,001$), atividade da quimiocina (7,9%; $p < 0,001$), atividade da molécula de adesão celular (7,9%; $p < 0,001$), atividade do fator de crescimento (7,3%; $p < 0,001$), constituinte estrutural da matriz extracelular (5,6%; $p < 0,001$), atividade do recetor transmembrana (4,8%; $p < 0,001$), ligação ao recetor (4,5%; $p < 0,001$), atividade da proteína tirosina quinase do recetor transmembrana (2,5%; $p < 0,001$), atividade da metalopeptidase (3,1%; $p = 0,001$), atividade da peptidase do tipo serina (2,5%; $p = 0,03$), atividade inibitória da protease (2,8%; $p = 0,004$), atividade da proteína de defesa/imunitária (2%; $p = 0,042$). Os processos biológicos encontrados foram a transdução de sinal (42,7%; $p < 0,001$), comunicação celular (41%; $p < 0,001$), resposta imune (23,3%; $p < 0,001$) e o metabolismo de proteína (13,5%; $p = 0,005$). No estudo 3 (Anexo V) a função molecular foi o constituinte estrutural da matriz extracelular (47,6%; $p < 0,001$) e o principal processo biológico foi o crescimento e/ou manutenção de células (57,1%; $p < 0,001$).

12.2 Resultados da análise dos dados clínicos

Para complementar o estudo da expressão proteica, avaliamos os fatores de risco associados a doença arterial coronária, estenose aórtica e doença arterial coronária + estenose aórtica. Inicialmente foi feita uma descrição das características básicas da população estudada. Utilizou-se o teste estatístico qui-quadrado para avaliar a associação das variáveis categóricas e, o modelo de regressão logística binomial para avaliar a associação das variáveis clínicas com as patologias estudadas, como ilustra a Tabela 2.

Tabela 2 - Características Básicas da População estudada

Características ¹	Total (n=151)	Controlo (n=11)	DAC (n=60)	E Ao (n=54)	E Ao + DAC (n=26)	p-value ²
Sexo						0,001
Feminino	49 (32%)	4 (36%)	9 (15%)	26 (48%)	10 (38%)	
Masculino	102 (68%)	7 (64%)	51 (85%)	28 (52%)	16 (62%)	
Idade	70 (63,75)	66 (63,74)	67 (59, 72)	72 (66,79)	73 (66,77)	0,004
HTA (omisso n=1)						0,3
Não	18 (12%)	0 (0%)	6 (10%)	10 (19%)	2 (7,7%)	
Sim	132 (88%)	11 (100%)	54 (90%)	43 (81%)	24 (92%)	
Dislipidemia (omisso n=1)						0,078
Não	37 (25%)	1 (9,1%)	11 (18%)	14 (26%)	11 (42%)	
Sim	113 (75%)	10 (91%)	49 (82%)	39 (74%)	15 (58%)	
Tabagismo (omisso n=1)						0,020
Não	76 (51%)	6 (55%)	22 (37%)	35 (66%)	13 (50%)	
Sim	74 (49%)	5 (45%)	38 (63%)	18 (34%)	13 (50%)	
Diabetes (omisso n=1)						0,070
Não	75 (50%)	4 (36%)	27 (45%)	34 (64%)	10 (38%)	
Sim	75 (50%)	7 (64%)	33 (55%)	19 (36%)	16 (62%)	

¹ Estatísticas apresentadas: n (%); mediana (Intervalo Interquartil – IQR)

² Testes estatísticos realizados: teste exato de *Fisher*; teste de *Kruskal-Wallis*; teste de independência qui-quadrado

IMC (kg/m²)	28,4	(25,1, 30,1	(28,0, 32,7)	28,5	(24,9, 28,1	(25,4, 28,0	(24,1, 32,0)	0,5
	31,5)			30,8)	31,6)			

EAo – Estenose Aórtica, DAC – Doença Arterial Coronária, EAo + DAC – Estenose Aórtica + Doença Arterial Coronária, HTA – Hipertensão Arterial, ADO – Antidiabéticos Orais, IMC – Índice de Massa Corporal.

Dos 151 pacientes que participaram no estudo o sexo masculino teve maior predominância, representando 85%, 64%, 62% e 52%, na DAC, controles, EAo+DAC e EAo, respetivamente. A média de idades é de 70 anos, apresentando a EAo+DAC uma média de idade mais avançada, 73 anos, relativamente a EAo, DAC e os controlos, com médias de 72,67 e 66, respetivamente. Relativamente a HTA, a maior parte dos pacientes eram hipertensos, representando cerca de 100% nos controlos, 92% na EAo+DAC, 90% na DAC e 81% na EAo. Na análise da dislipidemia, os controlos apresentaram maior percentagem de alteração do perfil lipídico, cerca de 91%, seguido da DAC com 82%, EAo com 74% e EAo+DAC com 58%. No que concerne ao tabagismo, os indivíduos com DAC e EAo+DAC apresentaram maior percentagem de hábitos tabágicos, cerca de 63%, e 50%, respetivamente, em comparação com os controlos com 45% e EAo com a percentagem mais baixa de 34%. Na análise da diabetes, o grupo dos controlos, EAo+DAC e DAC apresentaram maior número de pacientes diabéticos, cerca de 64%, 62% e 55%, respetivamente, e a EAo com 36%. O IMC, apresentou uma média de 28,4, verificando-se nos controlos a média mais alta de 30 comparativamente a DAC com 28,5, EAo com 28,1 e na EAo e EAo+DAC a média foi de 28. O sexo, a idade e o tabagismo apresentaram valores de p muito baixos, 0,001, 0,004 e 0,020, respetivamente, pelo modelo estatístico de qui-quadrado (Tabela 2).

Na avaliação dos fatores de risco pelo modelo de regressão logística binomial da DAC vs EAo (Tabela 3), verificou-se que o sexo masculino, a idade e a DM apresentaram valores de $p < 0,05$, de 0,02, ambos, assim como a DM, 0,004, sendo que a idade apresentou um *odds ratios* (OR) mais elevado, de 1,11 comparativamente a DM, com 0,32 e o sexo, com 0,29. Na DAC vs EAo+DAC (Tabela 4), o sexo, a idade e a dislipidemia apresentaram valores de p mais baixos, de 0,02. Destes a idade apresentou um OR de 1,12, a dislipidemia 0,20 e o sexo 0,19. A HTA apesar de não ter apresentado um valor de $p < 0,05$, teve um OR de 5,53, o mais alto neste grupo. Na DAC vs CONT (Tabela 5) nenhum dos fatores de risco avaliados neste grupo teve um valor de $p < 0,05$, mas o sexo masculino apresentou um OR elevado de 4,32. Na EAo vs EAo+DAC (Tabela 6) também não se observou nenhum fator de risco com valores de $p < 0,05$, mas a DM, o tabagismo e a HTA apresentaram OR altos de 2,49, 2,15 e 2,11, respetivamente. Na EAo vs CONT (Tabela 7) não se verificou nenhum fator de risco com $p < 0,05$ apesar de a DM apresentar um $p = 0,05$. A idade e o sexo apresentaram OR com valores elevados, de 1,12 e 1,01, respetivamente.

Tabela 3 - Regressão logística das características básicas da população estudada em relação a DAC vs EAo

		B	OR	p-value
Sexo	Masculino	-1,236	0,291	0,023
Idade		0,103	1,108	0,0004
HTA	Sim	-0,908	0,403	0,229
Dislipidemia	Sim	- 0,565	0,568	0,329
Tabagismo	Sim	-0,791	0,453	0,102
DM	Sim	-1,146	0,318	0,023
IMC		0,064	1,066	0,249

R²=0,380. OR – Odds Ratio, HTA – Hipertensão Arterial, DM – Diabetes Mellitus, IMC – Índice de Massa Corporal.

Tabela 4 - Regressão logística das características básicas da população estudada em relação a DAC vs EAo+DAC

		B	OR	p-value
Sexo	Masculino	-1,671	0,188	0,024
Idade		0,110	1,116	0,010
HTA	Sim	1,710	5,529	0,202
Dislipidemia	Sim	-1,658	0,191	0,015
Tabagismo	Sim	0,452	1,571	0,488
DM	Sim	-0,006	0,994	0,992
IMC		0,057	1,059	0,373

R²=0,327. OR – Odds Ratio, HTA – Hipertensão Arterial, DM – Diabetes Mellitus, IMC – Índice de Massa Corporal.

Tabela 5 - Regressão logística das características básicas da população estudada em relação a DAC vs CONT

		B	OR	p-value
Sexo	Masculino	1,467	4,336	0,093
Idade		-0,055	0,946	0,327
HTA	Sim	-6,118	0,002	0,761
Dislipidemia	Sim	0,128	1,137	0,917
Tabagismo	Sim	0,204	1,123	0,781
DM	Sim	-0,058	0,944	0,944
IMC		0,099	1,104	0,244

R²=0,186. OR – Odds Ratio, HTA – Hipertensão Arterial, DM – Diabetes Mellitus, IMC – Índice de Massa Corporal.

Tabela 6 - Regressão logística das características básicas da população estudada em relação a EAo vs EAo+DAC

		B	OR	p-value
Sexo	Masculino	-0,077	0,926	0,903
Idade		0,009	1,010	0,780
HTA	Sim	0,747	2,110	0,402
Dislipidemia	Sim	-0,852	0,427	0,123
Tabagismo	Sim	0,763	2,145	0,222

DM	Sim	0,910	2,484	0,063
IMC		0,023	1,023	0,642

R²=0,167. OR – Odds Ratio, HTA – Hipertensão Arterial, DM – *Diabetes Mellitus*, IMC – Índice de Massa Corporal.

Tabela 7 - Regressão logística das características básicas da população estudada em relação a EAo vs CONT

		B	OR	p-value
Sexo	Masculino	0,006	1,006	0,995
Idade		0,109	1,115	0,066
HTA	Sim	-7,248	0,001	0,749
Dislipidemia	Sim	-1,390	0,249	0,266
Tabagismo	Sim	-0,910	0,403	0,321
DM	Sim	-1,689	0,185	0,051
IMC		-0,046	0,955	0,621

R²=0,309. OR – Odds Ratio, HTA – Hipertensão Arterial, DM – *Diabetes Mellitus*, IMC – Índice de Massa Corporal.

12.3 Proteínas identificadas na análise por LC-MS/MS

Os resultados apresentados neste estudo mostram que o proteoma dos pacientes com DAC (n=60) e EAo (n=54) apresenta um perfil diferente dos controlos (n=11). Os dados obtidos na nossa análise proteómica da urina permitiram-nos identificar e determinar semi-quantitativamente a expressão de 419 proteínas, das quais 256 foram encontradas em doentes com DAC e EAo assim como nos controlos, 45 foram encontradas em doentes com DAC e controlos, 11 nos doentes com EAo e nos controlos e 12 nos doentes com DAC e EAo (Figura 5).

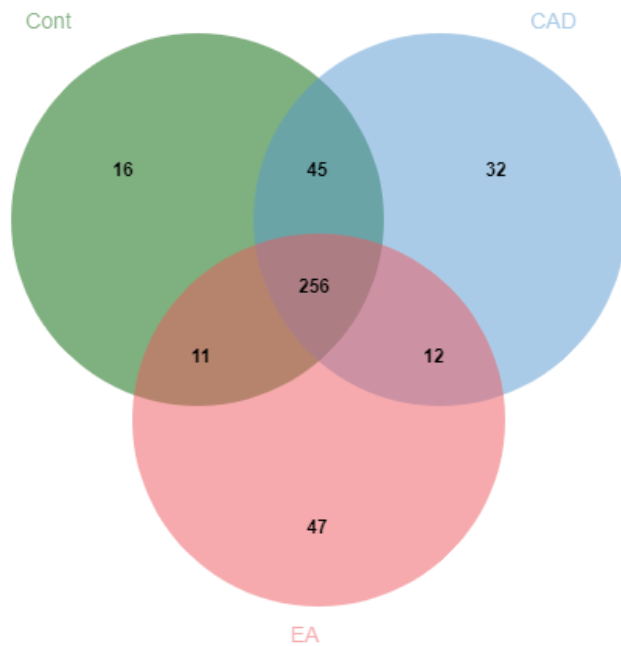


Figura 5 - Diagrama de Venn mostrando o número de proteínas em pacientes com Doença Arterial Coronária (DAC, n=60), Estenose Aórtica (EA, n=54) e controles (CONT, n=11). Os nomes e a identificação (ID) de todas as proteínas estão contidos na Tabela Suplementar 2.

A avaliação pelo *volcano plot*, exibindo diferentes proteínas significativamente alteradas nos doentes com EAo e DAC, mostrou que a Alfa-2-glicoproteína rica em Leucina (LRG1), Proteína 2 de Reconhecimento de Peptidoglicano (PGLYRP2), Ativador Gangliosídeo GM2 (GM2A) e Anexina A2 (ANXA2) foram significativas nos doentes com EAo e a Alfa-1-Antitripsina (SERPINA1), o Superóxido Dismutase Extracelular (SOD3) e a Fosfatase Ácida Prostática (ACPP) apresentaram uma associação estatisticamente significativa nos doentes com DAC (Figura 6).

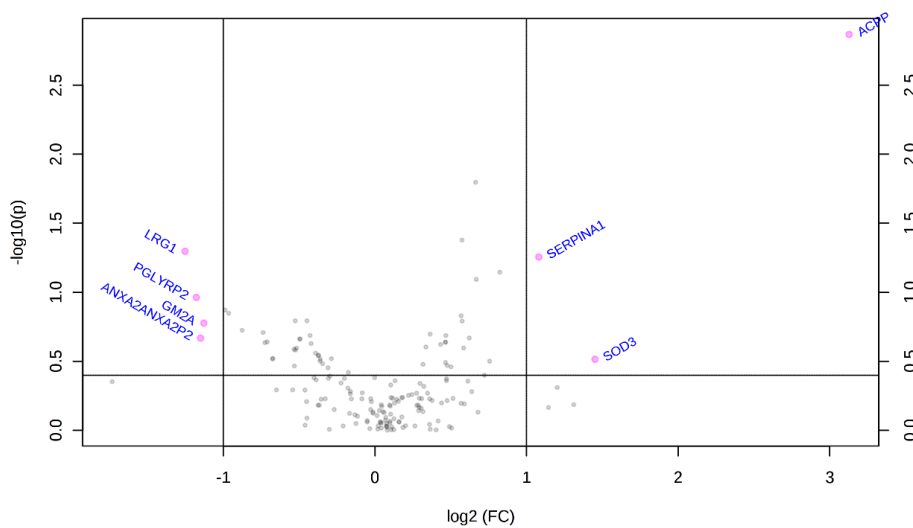


Figura 6 - Volcano plot das proteínas dos pacientes com Estenose Aórtica (EA, n=54) e Doença Arterial Coronária (DAC, n=60). Os pontos vermelhos indicam proteínas com significância estatística entre os grupos testados. Os valores de p e a alteração da dobra (FC) para cada proteína estão incluídos na Tabela Suplementar 2.

No que diz respeito as proteínas do grupo dos pacientes com DAC *versus* CONT, através da avaliação do *volcano plot*, verificou-se que a Uromodulina (UMOD), Proteína 1 Secretada e Transmembranar (SECTM1), Carboxipeptidase N Subunidade 2 (CPN2) e o Fosfoglicerato Quinase 1 (PGK1) e ANXA2 apresentaram uma associação significativa nos pacientes com DAC e nos CONT a ACPP, a Lactotransferrina (LTF) e o Angiotensinogénio (AGT) mostraram-se significativas (Figura 7).

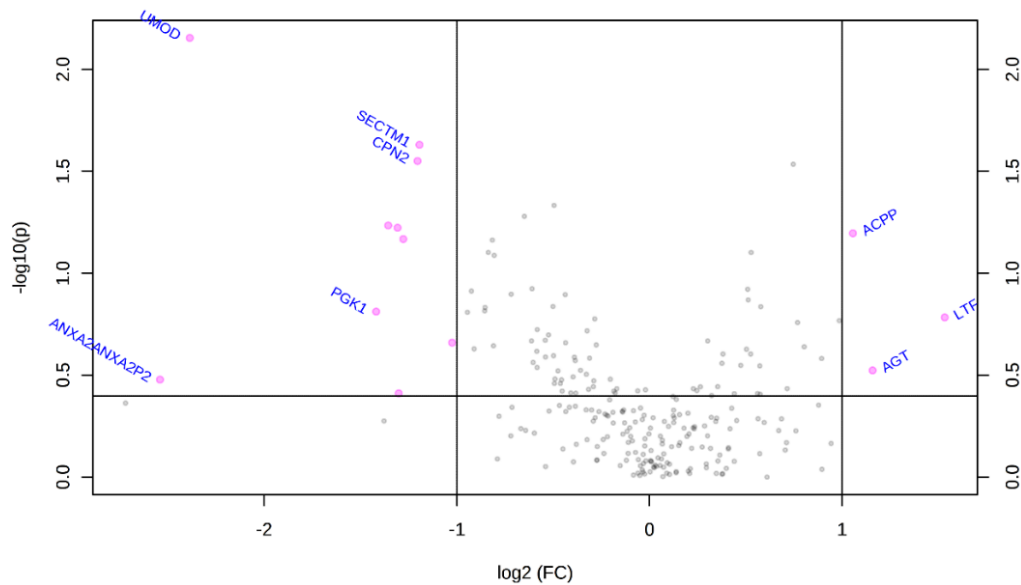


Figura 7 - Volcano plot das proteínas dos pacientes com Doença Arterial Coronária (DAC, n=60) e Controlos (CONT, n=11). Os pontos vermelhos indicam proteínas com significância estatística entre os grupos testados. Os valores de p e a alteração da dobra (FC) para cada proteína estão incluídos na Tabela Suplementar 2.

No *volcano plot* do grupo da EAo *versus* CONT, observou-se que a ACPP, Alfa-amilase Pancreática (AMY2A), CPN2, UMOD e Haptoglobina (HP) mostraram uma associação estatisticamente significativa nos doentes com EAo e a LTF, Queratina 16, citoesqueleto tipo I (KRT16), Queratina 14, citoesqueleto tipo I (KRT14), Queratina 5, citoesqueleto tipo II (KRT5) e Queratina 6C, citoesqueleto tipo II (KRT6C) mostraram-se significativas nos CONT (Figura 8).

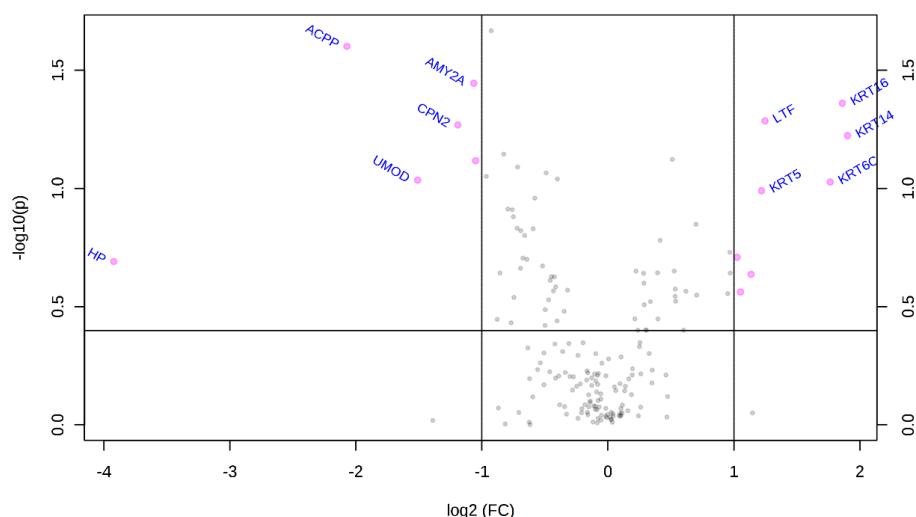


Figura 8 - Volcano plot das proteínas de pacientes com Estenose Aórtica (EA, n=54) e Controlos (CONT, n=11). Os pontos vermelhos indicam proteínas com significância estatística entre os grupos testados. Os valores de p e a alteração da dobra (FC) para cada proteína estão incluídos na Tabela Suplementar 2.

12.4 Análise de interação proteína-proteína

Para abordar a interação proteína-proteína e seus processos biológicos envolvidos nas patologias EAo, DAC e nos controlos, foi usado o programa *STRING*. Um total de 22 nós, 31 bordas, 2,82 bordas de nó médio, coeficiente de agrupamento médio de 0,72, número de borda esperado de 3 e valor de enriquecimento de interação proteína-proteína $<1,0e-16$ foram observados e mostrados que a rede interagiu significativamente do que o esperado. No presente estudo, identificamos 77 GO para o processo biológico, 13 GO para a função molecular, 13 GO para o componente celular, 3 vias, 9 vias de reatoma, 22 palavras-chave *UniProt*, 6 domínios de proteína Pfam, 16 domínios de proteína InterPro e 5 domínios de proteína Smart. O GO é um recurso disponível gratuitamente que descreve como e onde os produtos génicos funcionam em sistemas biológicos (processo biológico, componente celular e função molecular)(Figura 9)(264).

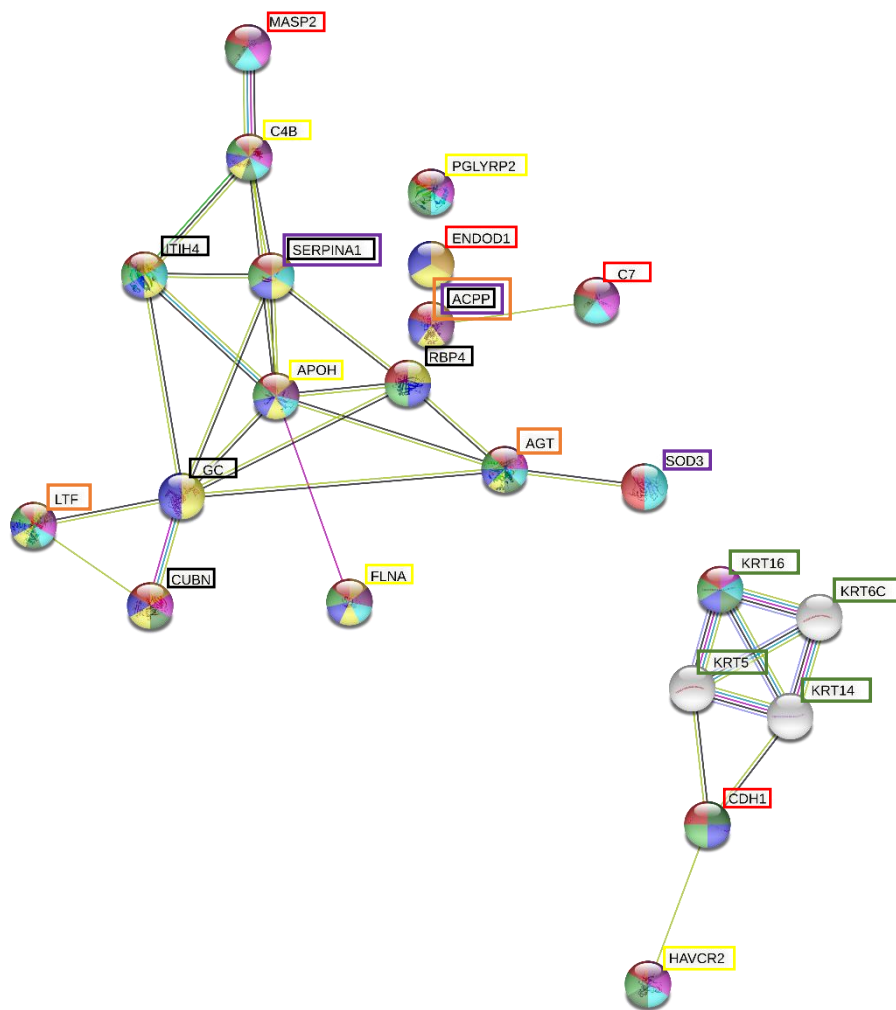


Figura 9 - Interação Proteína-Proteína na Estenose Aórtica, Doença Arterial Coronária e Controlos. ACPP – Fosfatase Ácida Prostática, ITIH4 – Inibidor de Inter-Alfa-Tripsina de Cadeia Pesada H4, SERPINA1 – Alfa-1-Antitripsina, RBP4 – Proteína 4 de Ligação ao Retinol, CUBN – Cubilina, GC – Proteína de Ligação à Vitamina D, PGLYRP2 – N-acetilmuramoil-L-alanina Amidas, HAVCR2 – Recetor Celular 2 do Vírus da Hepatite A, APOH – Beta-2-glicoproteína 1, FLNA – Filamina-A, C4B – Complemento C4-B, MASP2 – Lectina Serina Protease 2 de Ligação a Manana, ENDOD1 – Domínio de Endonuclease contendo 1 proteína, C7 – componente do Complemento 7, CDH1 – Caderina-1, SOD3 – Superóxido Dismutase Extracelular, LTF – Lactoferrina, AGT – Angiotensinogénio, KRT16 – Queratina Citoesqueleto 16 Tipo I, KRT14 – Queratina Citoesqueleto 14 Tipo I, KRT5 – Queratina Citoesqueleto 5 tipo II, KRT6C – Queratina Citoesqueleto 6C Tipo II. ● - Transporte mediado por vesículas; ● - Regulação positiva de resposta ao estímulo; ● - Resposta ao estímulo externo; ● - Resposta ao stress; ● - Processo multi-organismo; ● - Transporte; ● - Localização; ● - Regulação negativa do processo celular; ● - resposta ao estímulo, - Doença Arterial Coronária, Controlos - , Estenose Aórtica - , Estenose Aórtica vs Doença Arterial Coronária - , Doença Arterial vs Controlos - , Estenose Aórtica vs Controlos - .(265)

13 Discussão

A avaliação do perfil de expressão de proteínas na urina no âmbito das doenças cardiovasculares ainda permanece uma dificuldade, não só como meio de diagnóstico e prognóstico, mas na descoberta de novos alvos terapêuticos. No presente trabalho, analisamos diversas proteínas identificadas na urina e no plasma na DAC e EAo.

A identificação de potenciais proteínas urinárias, neste estudo, surge no contexto de avaliação do perfil de expressão proteica na DAC e EAo, a partir de um método não-invasivo e capaz de fornecer toda a informação essencial acerca do funcionamento vascular e cardíaco através da urina, de uma forma rápida e precisa.

A aterosclerose coronária, constitui o marco inicial para o desenvolvimento da DAC, associada a progressão deste processo temos a inflamação, a formação de placas fibroateromatosas e com a evolução da patologia a ocorrência de eventos isquêmicos. Mas para que tal fato aconteça diversos fatores de risco, que vão desde os modificáveis até os não modificáveis, estão implicados na gênese da aterosclerose. No nosso estudo, o sexo masculino, a idade, dislipidemia e DM foram os fatores de risco que mais sobressaíram relativamente a associação com a DAC e EAo. A deposição de placas de ateroma nas bifurcações arteriais ocorre com maior probabilidade em idade avançada, que pode ser um fato isolado ou associado a outros fatores de risco. A dislipidemia constitui fator independente para a predisposição a DAC, e atua promovendo a inflamação e alterações lipídicas. Por outro lado, na EAo, as lesões valvulares são caracterizadas por dano endotelial, deposição de lípidos, infiltrados inflamatórios, tal como na DAC, e microcalcificação, sendo que o evento inicial acredita-se que seja uma lesão ao endotélio valvar devido ao *stress* mecânico ou outros fatores de risco, o que permite infiltração, retenção de lipoproteínas e recrutamento de células inflamatórias(266). Com a idade as válvulas já se tornam mais frágeis e com predisposição a EAo seja por calcificação ou por fatores de risco cardiovasculares. Sendo assim, seria de se esperar que as proteínas urinárias identificados na DAC e EAo envolvessem o componente inflamatório e lipídico.

De acordo com a revisão feita, através de três estudos validados, dois pelo plasma e um pela urina, verificamos que as proteínas identificadas nos estudos validados são diferentes mas os principais processos biológicos são semelhantes, como é o caso do estudo 1 (261) e estudo 2(262), onde predominaram o processo de inflamação e trombose com a formação de coágulos. Por outro lado, o estudo 3(263), identificou proteínas

principalmente da sequência de aminoácidos predominantemente da família do colágeno, e os principais processos biológicos incluíam a formação de placas ateroscleróticas, secreção de macrófagos e retenção de lípidos.

Através da análise pelo *volcano plot*, na EAo vs DAC a LRG1 e PGLYRP2, foram significativas na EAo e o SOD3 e a SERPINA1 apresentaram uma associação estatisticamente significativa na DAC. A LRG1 é um membro da família de proteínas de repetição rica em leucina (LRR), muitas das quais estão envolvidas em interações proteína-proteína, sinalização e adesão celular(267). Esta proteína pode desempenhar um papel na angiogênese patológica e está associada à disfunção endotelial vascular, rigidez arterial e doença arterial obstrutiva periférica em pacientes com DM tipo 2(268). Não foi relatada nenhuma associação direta da LRG1 com a EAo. A PGLYRP2 faz parte das proteínas de reconhecimento de peptidoglicanos (PGN) que são um grupo altamente conservado de proteínas de defesa do hospedeiro em insetos e mamíferos que detetam a PGN da parede celular bacteriana e atuam como bactericidas ou clivam a PGN pela função da amidase(269). Também não mostrou nenhuma relação com a EAo. A GM2A é um produto do gene GM2A e atua como uma proteína de transferência de lípidios. A sua regulação positiva por LDL oxidado aumenta o acúmulo de gangliosídeos na aorta, que pode estar fortemente associado à aterosclerose(270) mas não mostrou nenhuma relação direta com a EAo. Relativamente a DAC, a SOD3 é a principal eliminadora extracelular de aniões superóxido e regula níveis de aniões superóxido vascular catalisando a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. É secretada principalmente pelas células do músculo liso vascular e apresenta uma alta afinidade para proteoglicanos de sulfato de heparano, outros proteoglicanos sulfatados, bem como colágeno tipo I e, portanto, é amplamente ligado às superfícies celulares e componentes da matriz extracelular nas paredes dos vasos sanguíneos. A SOD3 desempenha um papel importante na proteção contra o *stress* oxidativo(271). O *stress* oxidativo está envolvido na patogênese da aterosclerose. O aumento da produção de ROS prejudica a função endotelial e a vasodilatação dependente do endotélio em humanos, pela inativação subsequente de NO. Além disso também induz a proliferação celular, hipertrofia, remodelagem cardíaca, apoptose e inflamação nas células endoteliais e lisas da parede vascular e nas células do miocárdio. Os fatores de risco cardiovasculares mencionados neste trabalho bem como a síndrome metabólica têm uma associação com o *stress* oxidativo. Sendo assim, as enzimas antioxidantes como os Superóxido

Dismutases (SODs) eliminam as ROS e inibem a degradação do NO na parede vascular(272). Segundo Mohammedi et al., em pacientes com diabetes (tipo 1 e 2) a SOD3 desempenhou um papel importante nos mecanismos de proteção vascular contra o *stress* oxidativo(272). A SERPINA1 é uma glicoproteína e uma proteína de fase aguda que é membro da família de inibidores de serina proteinases. A inibição da ação de enzimas proteolíticas (especialmente elastase de neutrófilos) é a principal função da SERPINA1 em todos os tecidos (273) mas o seu papel protetor contra danos vasculares principalmente a aterosclerose, bem como, se os seus níveis de concentração se correlacionam com a progressão da doença vascular ainda não foram totalmente elucidadas(274). A enzima alvo da SERPINA1 e elastase neutrofílica, é expressa por macrófagos em placas ateroscleróticas humanas, particularmente em lesões ateroscleróticas avançadas. A SERPINA1 pode facilitar a proteção contra a quebra da matriz por elastase neutrofílica e eliminação de depósitos de lipoproteínas(274). Podendo funcionar como marcador de prognóstico, uma vez que é expressa em lesões ateroscleróticas avançadas e auxilia na eliminação de depósitos de lipoproteínas, o que ajuda na regressão do processo inflamatório e na formação de placas fibroateromas com possível evolução para oclusão coronária. Na DAC vs CONT, a SECTM1 e PGK1 foram estatisticamente significativas nos pacientes com DAC. A SECTM1 é uma glicoproteína transmembrana tipo I que está localizada no aparelho de Golgi e existe como uma forma transmembrana e solúvel. É expresso em células epiteliais tímica e fibroblastos, cancro de mama e linhas de células de leucemia e neutrófilos, mas não em linfócitos periféricos(275). O PGK1 é a primeira enzima geradora de adenosina trifosfato (ATP) na via glicolítica. A sua expressão é regulada positivamente no cancro da mama, adenocarcinoma ductal pancreático, astrocitomas radiorresistentes e células do cancro de ovário multirresistentes, bem como em células de cancro gástrico metastático, cancro do colo e carcinoma hepatocelular(276). Não foi relatada nenhuma relação direta da SECTM1 e PGK1 com a DAC. Na EAo vs CONT, a AMY2A e a HP apresentaram uma associação significativa nos doentes com EAo. A AMY2A é um gene que codifica a alfa-amilase pancreática que são responsáveis pela hidrólise do amido(277). A HP é a principal proteína de ligação da hemoglobina (Hb), além de ser uma proteína de fase aguda, cuja expressão é aumentada durante a inflamação. A função primária da HP é a ligação da Hb livre extracorporal, que atenua os efeitos oxidativos e inflamatórios da Hb. Também exerce efeitos antioxidantes inibindo diretamente a oxidação da LDL(278). No entanto nem a AMY2A e a HP desempenham algum papel na EAo.

A ACPP, um antígeno de diferenciação específico do epitélio da próstata encontrado em grandes quantidades inicialmente no líquido seminal(279), que além de funcionar como marcador de diferenciação epitelial da próstata(280, 281), serve como uma medida para elucidar o mecanismo molecular de conversação cruzada entre androgénios e sinalização de fosforilação da tirosina envolvida na regulação do crescimento celular de cancro da próstata(282-284) apresentou uma associação significativa na EAo vs CONT. Este aparecimento, provavelmente, seja pelo fato de que a amostra dos doentes serem maioritariamente do sexo masculino, que apesar de não ter sido elucidado o seu papel na EAo, foi relatada a associação com a DAC, em que o risco de doentes com cancro da próstata desenvolverem DAC aumenta durante os primeiros 6 meses após o diagnóstico de cancro da próstata e a metástase está associada a um risco aumentado de DAC(285). A DAC e o cancro possuem fatores de risco em comum, o hábito tabágico mostrou um risco aumentado de cancro em sobreviventes de EAM(286) e a resistência à insulina desempenhou um papel fundamental na fisiopatologia do cancro da próstata devido a diminuição do NO(286).

A ANXA2, também apresentou uma associação significativa no grupo EAo vs DAC e DAC vs CONT. Esta é uma proteína de ligação de fosfolipídios dependente de cálcio, para inibir a degradação do recetor do LDL (LDLR) de convertase subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9), acelerando o metabolismo do colesterol de LDL-c. Segundo Zixiang et al., a ANXA2 está significativamente aumentada no soro de pacientes com DAC e é mais evidente em pacientes com SCA, o que pode ser usado como um preditor de eventos clínicos instáveis(287). Relativamente a EAo, Weisell et al., detetaram uma regulação negativa da ANXA2 nos pacientes com EAo(288). O envolvimento da ANXA2 no metabolismo lipídico influencia no mecanismo de aterosclerose, funcionando como uma potente proteína na predição de DAC e EAo.

A UMOD (proteína *Tamm-Horsfall*) apresentou uma associação significativa no grupo DAC vs CONT e EAo vs CONT. É uma glicoproteína ancorada por glicosilfosfatidilinositol (GPI) específica do rim, produzida exclusivamente pelas células epiteliais que revestem o ramo ascendente espesso da alça de Henle. É normal o seu aparecimento na urina e, por isso, é cada vez mais considerada um biomarcador potencial relevante para a função renal e hipertensão(289). Não foi relatada nenhuma atuação desta proteína no mecanismo da DAC e/ou EAo.

A CPN2 é a subunidade da enzima carboxipeptidase N que ativa a bradicinina e complementa a anafilotoxina. Foi sugerido que a CPN2 inibe a fibrinólise e pode ser regulado positivamente no EAM durante a formação e coágulo sobre uma placa rompida. A expressão elevada observada de CPN2 no EAM pode ser uma tentativa de limitar a ativação do complemento e restringir a inflamação(290).

Outra componente estudada foram os processos biológicos envolvidos na EAo e DAC, onde o processo de resposta ao estímulo, mostrou-se mais significativo e está também associado a resposta ao *stress* e a uma regulação positiva ao estímulo. A disfunção endotelial afetada pelos fatores de risco já mencionados, levam a uma alteração da tensão de cisalhamento em áreas de fluxo sanguíneo turbulento, principalmente em áreas de ramificação ou próxima a estas levando a ativação de diversos mecanossensores dentre elas a adesão plaquetária e de diversas citocinas bem como dos seus precursores(291), levando uma sensibilização a estes componentes. O processo de localização e transporte também estiveram associados as duas patologias, o que já era esperado, uma vez que na aterosclerose há uma resposta inflamatória excessiva(292) com sinalização e recrutamento de diversas citocinas inflamatórias. A regulação negativa do processo celular provavelmente ocorra como resposta a contenção através de maior atividade fagocítica, envolvido o processo de transporte mediado por vesículas, com formação de coágulos de fibrina e atividade das interleucinas, com deposição de MEC(7), mantendo a integridade do tecido da membrana basal restante e induzido a nova síntese de novas proteínas de modo a manter a homeostase do tecido da membrana basal. O processo multi-organismo, engloba todos os elementos envolvidos nesta condição que é a aterosclerose, alguns dos quais estão fora do sistema vascular e provém de outros locais como é o caso da família da queratina (KRT16).

14 Conclusão

Muitos esforços têm sido feitos com o intuito de descobrir marcadores urinários no contexto das doenças cardiovasculares, uma vez que a mortalidade associada a mesma permanece alta. A DAC é uma das principais causas de mortalidade por doenças cardiovasculares e está fortemente associada a fatores de risco como a hipertensão arterial, diabetes, dislipidemia, tabagismo assim como a idade, obesidade e o gênero. A aterosclerose é o marco inicial para a DAC, associada a disfunção endotelial envolvida como desencadeante do processo inflamatório com recrutamento de todos os componentes molecular e celulares. Com o objetivo de analisar o perfil da expressão proteica da urina e os fatores de risco associados, na DAC, EAo e EAo+DAC pudemos concluir que as principais proteínas existentes na urina destes pacientes com DAC foram principalmente as pró-inflamatórias e do metabolismo lipídico, e associado a este resultado verificamos que na avaliação dos fatores de risco, através do através da análise estatística, constatamos que o sexo masculino, a idade avançada, a dislipidemia e a DM, apresentaram uma associação significativa na EAo, DAC e EAo + DAC, corroborando anteriormente os perfis da expressão proteica encontrados. As proteínas que podem ser potenciais marcadores promovem a aterosclerose, como é o caso da LRG1, GM2A, HP, ANXA2, que atuam a nível da inflamação e do metabolismo lipídico. Por outro lado, o SOD3, SERPINA1 e CPN2 funcionam como proteínas protetoras contra os danos causados pela lesão endotelial. Sendo assim, estas proteínas podem ajudar tanto no diagnóstico como no prognóstico e até tratamento da DAC e EAo e também das doenças cardiovasculares. Os processos biológicos estão envolvidos com o processo de *stress*, devido a disfunção endotelial, localização e transporte com recrutamento de todas citocinas inflamatórias para a contenção da lesão.

O perfil da expressão proteica da urina nas doenças cardiovasculares pode ser um potencial meio de diagnóstico não-invasivo e prático para o diagnóstico e tratamento das mesmas. Contudo, mais estudos serão necessários para que se obtenha uma abrangente diversidade de proteínas capazes de serem identificadas usando para o efeito um número maior de amostras de urina.

15 Perspetivas Futuras

A urina, um filtrado de sangue, que contém componentes proteicos semelhantes aos encontrados no sangue(4), tinha sido inicialmente considerada inadequada para estudos de expressão proteica devido à sua alegada instabilidade e baixa quantidade de informações. Mas resultados publicados recentemente na área mostraram que apresentava alguma viabilidade(293-296). Além do proteoma urinário ser muito estável, a informação contida é extensa, sendo que, aproximadamente 30% das proteínas/peptídeos na urina tem origem na circulação sanguínea(4). Um adulto humano saudável excreta 20 a 130mg de proteína e 20 a 30mg de peptídeos por dia na urina(297, 298). Porém, a urina que fica “armazenada” na bexiga por um período alargado de tempo, até várias horas, sendo este suficiente para o processo de degradação de proteínas por enzimas (protéases), produzidas pelo nosso próprio organismo (endógenas)(162), evitando assim a excreção de proteínas que podem confundir os estudos proteómicos.

A análise da expressão proteica tem como objetivo principal a melhoria dos métodos de diagnóstico clínico, a partir da identificação de proteínas(162) que são expressas mediante mudanças significativas associadas à doença(1, 162). O diagnóstico precoce da doença, especialmente das patologias cardiovasculares, neste contexto a DAC, na sua fase pré-sintomática, permitiria uma prevenção primária melhor, resposta ao tratamento mais efetiva, direcionada(1) e consequente diminuição da ocorrência de complicações, como por exemplo das SCA, o EAM e angina do peito(162, 299).

O estudo apresentado neste trabalho representa o início de um posterior aprofundamento da expressão proteica da urina das doenças cardiovasculares, especificamente na DAC, EAo e EAo+DAC. O uso de controlos saudáveis, para evitar viés, bem como a utilização de todas as 151 urinas, seria muito útil para a melhor compreensão destas patologias.

16 Referências Bibliográficas

1. Zimmerli LU, Schiffer E, Zürbig P, Good DM, Kellmann M, Mouis L, et al. Urinary Proteomic Biomarkers in Coronary Artery Disease. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2008;7(2):290-8.
2. Ambrose JA, Singh M. Pathophysiology of coronary artery disease leading to acute coronary syndromes. *F1000prime reports*. 2015;7:08-.
3. Simionescu N, Mora R, Vasile E, Lupu F, Filip DA, Simionescu M. Prelesional modifications of the vessel wall in hyperlipidemic atherogenesis. Extracellular accumulation of modified and reassembled lipoproteins. *Ann N Y Acad Sci*. 1990;598:1-16.
4. Delles C, Diez J, Dominiczak AF. Urinary proteomics in cardiovascular disease: Achievements, limits and hopes. *Proteomics Clin Appl*. 2011;5(5-6):222-32.
5. Eagle K. Coronary artery disease in India: challenges and opportunities. *The Lancet*. 2008;371(9622):1394-5.
6. Mageed L. Coronary Artery Disease: Pathogenesis, Progression of Atherosclerosis and Risk Factors. *Open Journal of Cardiology and Heart Diseases*. 2018;2(4).
7. George J, Johnson J. Atherosclerosis - Molecular and Celular Mechanisms. 2010:5-44.
8. Parmet S, Glass T, Glass R. Coronary Artery Disease. *The Journal of the American Medical Association*. 2004;292:2540-.
9. Alves A, Marques IR. Fatores Relacionados ao Risco de Doença Arterial Coronariana entre estudantes de enfermagem. *Revista Brasileira de Enfermagem*. 2009;62:883-8.
10. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352(16):1685-95.
11. Rocha R, Martins W. Manual de Prevenção Cardiovascular Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro. 2017:10-2.
12. República Dd. Gabinete do Secretário de Estado Adjunto e da Saúde: Despacho n.º 4583/2018. In: Saúde GdSdEAed, editor. 10 de Maio de 2018. p. 12998-9.
13. Eurostat. Cardiovascular Diseases Statistics, Statistics Explained 2018.
14. Wilkins E, Wilson L, Wickramasinghe K, Bhatnagar P, Leal J, Luengo-Fernandez R, et al. European Cardiovascular Disease Statistics. *European Heart Network*. 2017:9-13.
15. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*. 2004;364(9438):937-52.
16. Weber T, Lang I, Zweiker R, Horn S, Wenzel RR, Watschinger B, et al. Hypertension and coronary artery disease: epidemiology, physiology, effects of treatment, and

recommendations : A joint scientific statement from the Austrian Society of Cardiology and the Austrian Society of Hypertension. *Wien Klin Wochenschr.* 2016;128(13-14):467-79.

17. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet.* 1994;344(8934):1383-9.

18. DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care.* 1991;14(3):173-94.

19. Strauer BE. The concept of coronary flow reserve. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1992;19 Suppl 5:S67-80.

20. Rapsomaniki E, Timmis A, George J, Pujades-Rodriguez M, Shah AD, Denaxas S, et al. Blood pressure and incidence of twelve cardiovascular diseases: lifetime risks, healthy life-years lost, and age-specific associations in 1.25 million people. *Lancet.* 2014;383(9932):1899-911.

21. Franklin SS, Larson MG, Khan SA, Wong ND, Leip EP, Kannel WB, et al. Does the relation of blood pressure to coronary heart disease risk change with aging? The Framingham Heart Study. *Circulation.* 2001;103(9):1245-9.

22. Hajar R. Risk Factors for Coronary Artery Disease: Historical Perspectives. *Heart Views.* 2017;18(3):109-14.

23. Genest JG, Jr. Dyslipidemia and coronary artery disease. *Can J Cardiol.* 2000;16 Suppl A:3a-4a.

24. Labreuche J, Touboul PJ, Amarenco P. Plasma triglyceride levels and risk of stroke and carotid atherosclerosis: a systematic review of the epidemiological studies. *Atherosclerosis.* 2009;203(2):331-45.

25. Amarenco P, Labreuche J, Touboul PJ. High-density lipoprotein-cholesterol and risk of stroke and carotid atherosclerosis: a systematic review. *Atherosclerosis.* 2008;196(2):489-96.

26. McBride PE. Triglycerides and risk for coronary heart disease. *Jama.* 2007;298(3):336-8.

27. Rizos E, Mikhailidis DP. Are high density lipoprotein (HDL) and triglyceride levels relevant in stroke prevention? *Cardiovasc Res.* 2001;52(2):199-207.

28. Fruchart JC, Sacks F, Hermans MP, Assmann G, Brown WV, Ceska R, et al. The Residual Risk Reduction Initiative: a call to action to reduce residual vascular risk in patients with dyslipidemia. *Am J Cardiol.* 2008;102(10 Suppl):1k-34k.

29. Gofman JW, Young W, Tandy R. Ischemic heart disease, atherosclerosis, and longevity. *Circulation.* 1966;34(4):679-97.

30. Kannel WB, Castelli WP, Gordon T. Cholesterol in the prediction of atherosclerotic disease. New perspectives based on the Framingham study. *Ann Intern Med.* 1979;90(1):85-91.

31. Klag MJ, Ford DE, Mead LA, He J, Whelton PK, Liang KY, et al. Serum cholesterol in young men and subsequent cardiovascular disease. *N Engl J Med.* 1993;328(5):313-8.

32. Mahalle N, Garg MK, Naik SS, Kulkarni MV. Study of pattern of dyslipidemia and its correlation with cardiovascular risk factors in patients with proven coronary artery disease. *Indian journal of endocrinology and metabolism*. 2014;18(1):48-55.
33. Kabakci G, Koylan N, Ilerigelen B, Kozan O, Buyukozturk K. Impact of dyslipidemia on cardiovascular risk stratification of hypertensive patients and association of lipid profile with other cardiovascular risk factors: results from the ICEBERG study. *Integrated blood pressure control*. 2008;1:5-13.
34. Campbell NC, Thain J, Deans HG, Ritchie LD, Rawles JM. Secondary prevention in coronary heart disease: baseline survey of provision in general practice. *BMJ*. 1998;316(7142):1430-4.
35. Cook DG, Shaper AG, Pocock SJ, Kussick SJ. Giving up smoking and the risk of heart attacks. A report from The British Regional Heart Study. *Lancet*. 1986;2(8520):1376-80.
36. Inoue T. Cigarette Smoking as a Risk Factor of Coronary Artery Disease and its Effects on Platelet Function. *Tobacco Induced Diseases*. 2004;2(1):2-.
37. Craig WY, Palomaki GE, Haddow JE. Cigarette smoking and serum lipid and lipoprotein concentrations: an analysis of published data. *British Medical Journal*. 1989;298(6676):784-8.
38. CLARKE WR, SRINIVASAN SR, SHEAR CL, HUNTER SM, CROFT JB, WEBBER LS, et al. CIGARETTE SMOKING INITIATION AND LONGITUDINAL CHANGES IN SERUM LIPIDS AND LIPOPROTEINS IN EARLY ADULTHOOD THE BOGALUSA HEART STUDY. *American Journal of Epidemiology*. 1986;124(2):207-19.
39. Nakamura K, Barzi F, Huxley R, Lam T-H, Suh I, Woo J, et al. Does cigarette smoking exacerbate the effect of total cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol on the risk of cardiovascular diseases? *Heart*. 2009;95(11):909-16.
40. Gepner AD, Piper ME, Johnson HM, Fiore MC, Baker TB, Stein JH. Effects of smoking and smoking cessation on lipids and lipoproteins: outcomes from a randomized clinical trial. *Am Heart J*. 2011;161(1):145-51.
41. Garbin U, Fratta Pasini A, Stranieri C, Cominacini M, Pasini A, Manfro S, et al. Cigarette smoking blocks the protective expression of Nrf2/ARE pathway in peripheral mononuclear cells of young heavy smokers favouring inflammation. *PLoS One*. 2009;4(12):e8225.
42. Kangavari S, Matetzky S, Shah PK, Yano J, Chyu KY, Fishbein MC, et al. Smoking increases inflammation and metalloproteinase expression in human carotid atherosclerotic plaques. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2004;9(4):291-8.
43. Critchley JA, Capewell S. Mortality risk reduction associated with smoking cessation in patients with coronary heart disease: a systematic review. *Jama*. 2003;290(1):86-97.
44. Duncan BB, Schmidt MI, Pankow JS, Ballantyne CM, Couper D, Vigo A, et al. Low-grade systemic inflammation and the development of type 2 diabetes: the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes*. 2003;52(7):1799-805.

45. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006;116(7):1793-801.
46. Matheus AS, Tannus LR, Cobas RA, Palma CC, Negrato CA, Gomes MB. Impact of diabetes on cardiovascular disease: an update. *Int J Hypertens.* 2013;2013:653789.
47. Vicenova B, Vopalensky V, Burysek L, Pospisek M. Emerging role of interleukin-1 in cardiovascular diseases. *Physiol Res.* 2009;58(4):481-98.
48. Barouch LA, Berkowitz DE, Harrison RW, O'Donnell CP, Hare JM. Disruption of leptin signaling contributes to cardiac hypertrophy independently of body weight in mice. *Circulation.* 2003;108(6):754-9.
49. Kim M, Oh JK, Sakata S, Liang I, Park W, Hajjar RJ, et al. Role of resistin in cardiac contractility and hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;45(2):270-80.
50. Chait A, Han CY, Oram JF, Heinecke JW. Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Lipoprotein-associated inflammatory proteins: markers or mediators of cardiovascular disease? *J Lipid Res.* 2005;46(3):389-403.
51. Ferrarezi DA, Cheurfa N, Reis AF, Fumeron F, Velho G. Adiponectin gene and cardiovascular risk in type 2 diabetic patients: a review of evidences. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2007;51(2):153-9.
52. Kannel WB. Lipids, diabetes, and coronary heart disease: insights from the Framingham Study. *Am Heart J.* 1985;110(5):1100-7.
53. Taskinen MR. Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice. *Diabetologia.* 2003;46(6):733-49.
54. Krauss RM, Siri PW. Dyslipidemia in type 2 diabetes. *Med Clin North Am.* 2004;88(4):897-909, x.
55. Solano MP, Goldberg RB. Management of dyslipidemia in diabetes. *Cardiol Rev.* 2006;14(3):125-35.
56. Chahil TJ, Ginsberg HN. Diabetic dyslipidemia. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2006;35(3):491-510, vii-viii.
57. Hamilton SJ, Watts GF. Endothelial dysfunction in diabetes: pathogenesis, significance, and treatment. *Rev Diabet Stud.* 2013;10(2-3):133-56.
58. Lavie CJ, Milani RV, Ventura HO. Obesity and Cardiovascular Disease: Risk Factor, Paradox, and Impact of Weight Loss. *Journal of the American College of Cardiology.* 2009;53(21):1925-32.
59. Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Heart Study. *Circulation.* 1983;67(5):968-77.

60. Wilson PWF, D'Agostino RB, Sullivan L, Parise H, Kannel WB. Overweight and Obesity as Determinants of Cardiovascular Risk: The Framingham Experience. *JAMA Internal Medicine*. 2002;162(16):1867-72.
61. Moore LL, Vioni AJ, Qureshi MM, Bradlee ML, Ellison RC, D'Agostino R. Weight Loss in Overweight Adults and the Long-term Risk of Hypertension: The Framingham Study. *JAMA Internal Medicine*. 2005;165(11):1298-303.
62. Todd Miller M, Lavie CJ, White CJ. Impact of Obesity on the Pathogenesis and Prognosis of Coronary Heart Disease. *Journal of the CardioMetabolic Syndrome*. 2008;3(3):162-7.
63. Rader DJ. Effect of Insulin Resistance, Dyslipidemia, and Intra-abdominal Adiposity on the Development of Cardiovascular Disease and Diabetes Mellitus. *The American Journal of Medicine*. 2007;120(3, Supplement 1):S12-S8.
64. Lee YH, Pratley RE. Abdominal obesity and cardiovascular disease risk: the emerging role of the adipocyte. *J Cardiopulm Rehabil Prev*. 2007;27(1):2-10.
65. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *The Lancet*. 2005;365(9468):1415-28.
66. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002;106(25):3143-421.
67. Grundy SM, Brewer HB, Cleeman JI, Smith SC, Lenfant C. Definition of Metabolic Syndrome. *Circulation*. 2004;109(3):433-8.
68. Krauss RM, Winston M, Fletcher BJ, Grundy SM. Obesity. *Circulation*. 1998;98(14):1472-6.
69. Menuet R, Lavie CJ, Milani RV. Importance and Management of Dyslipidemia in the Metabolic Syndrome. *The American Journal of the Medical Sciences*. 2005;330(6):295-302.
70. González K, Fuentes J, Márquez JL. Physical Inactivity, Sedentary Behavior and Chronic Diseases. *Korean journal of family medicine*. 2017;38(3):111-5.
71. Booth FW, Roberts CK, Laye MJ. Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. *Comprehensive Physiology*. 2012;2(2):1143-211.
72. Blair SN, Kohl HW, 3rd, Barlow CE, Paffenbarger RS, Jr., Gibbons LW, Macera CA. Changes in physical fitness and all-cause mortality. A prospective study of healthy and unhealthy men. *Jama*. 1995;273(14):1093-8.
73. LaMonte MJ, Blair SN, Church TS. Physical activity and diabetes prevention. *J Appl Physiol (1985)*. 2005;99(3):1205-13.
74. Manson JE, Hu FB, Rich-Edwards JW, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, et al. A prospective study of walking as compared with vigorous exercise in the prevention of coronary heart disease in women. *N Engl J Med*. 1999;341(9):650-8.

75. Powell KE, Blair SN. The public health burdens of sedentary living habits: theoretical but realistic estimates. *Med Sci Sports Exerc.* 1994;26(7):851-6.
76. Mayer-Davis EJ, Dabelea D, Lawrence JM. Incidence Trends of Type 1 and Type 2 Diabetes among Youths, 2002-2012. *N Engl J Med.* 2017;377(3):301.
77. Pulsford RM, Blackwell J, Hillsdon M, Kos K. Intermittent walking, but not standing, improves postprandial insulin and glucose relative to sustained sitting: A randomised cross-over study in inactive middle-aged men. *J Sci Med Sport.* 2017;20(3):278-83.
78. Bey L, Hamilton MT. Suppression of skeletal muscle lipoprotein lipase activity during physical inactivity: a molecular reason to maintain daily low-intensity activity. *J Physiol.* 2003;551(Pt 2):673-82.
79. Santos-Parker JR, LaRocca TJ, Seals DR. Aerobic exercise and other healthy lifestyle factors that influence vascular aging. *Adv Physiol Educ.* 2014;38(4):296-307.
80. Katzmarzyk PT, Church TS, Craig CL, Bouchard C. Sitting time and mortality from all causes, cardiovascular disease, and cancer. *Med Sci Sports Exerc.* 2009;41(5):998-1005.
81. Dunstan DW, Barr ELM, Healy GN, Salmon J, Shaw JE, Balkau B, et al. Television Viewing Time and Mortality. *Circulation.* 2010;121(3):384-91.
82. Stewart GN. *The healing garden: A place for peace.* Canada: Nyhus Steward Publishing; 2004.
83. Steptoe A, Kivimaki M. Stress and cardiovascular disease: an update on current knowledge. *Annu Rev Public Health.* 2013;34:337-54.
84. Fink G. *Stress: Neuroendocrinology and Neurobiology: Handbook of Stress Series:* Academic Press; 2016.
85. Le-Ha C, Herbison CE, Beilin LJ, Burrows S, Henley DE, Lye SJ, et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity under resting conditions and cardiovascular risk factors in adolescents. *Psychoneuroendocrinology.* 2016;66:118-24.
86. Reynolds RM, Labad J, Strachan MW, Braun A, Fowkes FG, Lee AJ, et al. Elevated fasting plasma cortisol is associated with ischemic heart disease and its risk factors in people with type 2 diabetes: the Edinburgh type 2 diabetes study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(4):1602-8.
87. Vogelzangs N, Beekman AT, Milaneschi Y, Bandinelli S, Ferrucci L, Penninx BW. Urinary cortisol and six-year risk of all-cause and cardiovascular mortality. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(11):4959-64.
88. Dhingra R, Vasan RS. Age as a risk factor. *The Medical clinics of North America.* 2012;96(1):87-91.
89. D'Agostino RB, Sr., Vasan RS, Pencina MJ, Wolf PA, Cobain M, Massaro JM, et al. General cardiovascular risk profile for use in primary care: the Framingham Heart Study. *Circulation.* 2008;117(6):743-53.

90. Woodward M, Brindle P, Tunstall-Pedoe H. Adding social deprivation and family history to cardiovascular risk assessment: the ASSIGN score from the Scottish Heart Health Extended Cohort (SHHEC). *Heart*. 2007;93(2):172-6.
91. Hippisley-Cox J, Coupland C, Vinogradova Y, Robson J, May M, Brindle P. Derivation and validation of QRISK, a new cardiovascular disease risk score for the United Kingdom: prospective open cohort study. *Bmj*. 2007;335(7611):136.
92. Hippisley-Cox J, Coupland C, Vinogradova Y, Robson J, Minhas R, Sheikh A, et al. Predicting cardiovascular risk in England and Wales: prospective derivation and validation of QRISK2. *Bmj*. 2008;336(7659):1475-82.
93. Assmann G, Cullen P, Schulte H. Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Munster (PROCAM) study. *Circulation*. 2002;105(3):310-5.
94. Giampaoli S. CUORE: a sustainable cardiovascular disease prevention strategy. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2007;14(2):161-2.
95. Hajifathalian K, Ueda P, Lu Y, Woodward M, Ahmadvand A, Aguilar-Salinas CA, et al. A novel risk score to predict cardiovascular disease risk in national populations (Globorisk): a pooled analysis of prospective cohorts and health examination surveys. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2015;3(5):339-55.
96. Kronen T, Keller H, Sonnichsen A, Sadowski EM, Baum E, Wegscheider K, et al. Absolute cardiovascular disease risk and shared decision making in primary care: a randomized controlled trial. *Ann Fam Med*. 2008;6(3):218-27.
97. Conroy RM, Pyorala K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De Backer G, et al. Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J*. 2003;24(11):987-1003.
98. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL, et al. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *European heart journal*. 2016;37(29):2315-81.
99. Lloyd-Jones DM, Leip EP, Larson MG, D'Agostino RB, Beiser A, Wilson PW, et al. Prediction of lifetime risk for cardiovascular disease by risk factor burden at 50 years of age. *Circulation*. 2006;113(6):791-8.
100. Terry DF, Pencina MJ, Vasan RS, Murabito JM, Wolf PA, Hayes MK, et al. Cardiovascular risk factors predictive for survival and morbidity-free survival in the oldest-old Framingham Heart Study participants. *J Am Geriatr Soc*. 2005;53(11):1944-50.

101. Goldberg RJ, Larson M, Levy D. Factors associated with survival to 75 years of age in middle-aged men and women. The Framingham Study. *Arch Intern Med.* 1996;156(5):505-9.
102. Maas AHEM, Appelman YEA. Gender differences in coronary heart disease. *Netherlands heart journal : monthly journal of the Netherlands Society of Cardiology and the Netherlands Heart Foundation.* 2010;18(12):598-602.
103. Davis M, Diamond J, Montgomery D, Krishnan S, Eagle K, Jackson E. Acute coronary syndrome in young women under 55 years of age: clinical characteristics, treatment, and outcomes. *Clin Res Cardiol.* 2015;104(8):648-55.
104. Ossewaarde ME, Bots ML, Verbeek AL, Peeters PH, van der Graaf Y, Grobbee DE, et al. Age at menopause, cause-specific mortality and total life expectancy. *Epidemiology.* 2005;16(4):556-62.
105. Bairey Merz CN, Johnson BD, Sharaf BL, Bittner V, Berga SL, Braunstein GD, et al. Hypoestrogenemia of hypothalamic origin and coronary artery disease in premenopausal women: a report from the NHLBI-sponsored WISE study. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41(3):413-9.
106. Sutton-Tyrrell K, Lassila HC, Meilahn E, Bunker C, Matthews KA, Kuller LH. Carotid atherosclerosis in premenopausal and postmenopausal women and its association with risk factors measured after menopause. *Stroke.* 1998;29(6):1116-21.
107. Martinez PF, Okoshi MP. Genetic Risk in Coronary Artery Disease. *Arq Bras Cardiol.* 2018;111(1):62-3.
108. Myers RH, Kiely DK, Cupples LA, Kannel WB. Parental history is an independent risk factor for coronary artery disease: the Framingham Study. *Am Heart J.* 1990;120(4):963-9.
109. Müller C. Xanthomata, Hypercholesterolemia, Angina Pectoris. *Acta Medica Scandinavica.* 1938;95(S89):75-84.
110. Lehrman MA, Schneider WJ, Sudhof TC, Brown MS, Goldstein JL, Russell DW. Mutation in LDL receptor: Alu-Alu recombination deletes exons encoding transmembrane and cytoplasmic domains. *Science.* 1985;227(4683):140-6.
111. Altshuler D, Daly MJ, Lander ES. Genetic mapping in human disease. *Science.* 2008;322(5903):881-8.
112. Samani NJ, Erdmann J, Hall AS, Hengstenberg C, Mangino M, Mayer B, et al. Genomewide association analysis of coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2007;357(5):443-53.
113. Kathiresan S, Voight BF, Purcell S, Musunuru K, Ardissino D, Mannucci PM, et al. Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants. *Nat Genet.* 2009;41(3):334-41.
114. Erdmann J, Grosshennig A, Braund PS, König IR, Hengstenberg C, Hall AS, et al. New susceptibility locus for coronary artery disease on chromosome 3q22.3. *Nat Genet.* 2009;41(3):280-2.

115. A genome-wide association study in Europeans and South Asians identifies five new loci for coronary artery disease. *Nat Genet.* 2011;43(4):339-44.
116. Large-scale gene-centric analysis identifies novel variants for coronary artery disease. *PLoS Genet.* 2011;7(9):e1002260.
117. Deloukas P, Kanoni S, Willenborg C, Farrall M, Assimes TL, Thompson JR, et al. Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. *Nat Genet.* 2013;45(1):25-33.
118. Nikpay M, Goel A, Won HH, Hall LM, Willenborg C, Kanoni S, et al. A comprehensive 1,000 Genomes-based genome-wide association meta-analysis of coronary artery disease. *Nat Genet.* 2015;47(10):1121-30.
119. Khera AV, Kathiresan S. Genetics of coronary artery disease: discovery, biology and clinical translation. *Nature reviews Genetics.* 2017;18(6):331-44.
120. Lee S, Abecasis GR, Boehnke M, Lin X. Rare-variant association analysis: study designs and statistical tests. *Am J Hum Genet.* 2014;95(1):5-23.
121. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Blaha MJ, et al. Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2014;129(3):e28-e292.
122. Kulshreshtha A, Goyal A, Dabhadkar K, Veledar E, Vaccarino V. Urban-rural differences in coronary heart disease mortality in the United States: 1999-2009. *Public Health Rep.* 2014;129(1):19-29.
123. Chen J, Normand SL, Wang Y, Drye EE, Schreiner GC, Krumholz HM. Recent declines in hospitalizations for acute myocardial infarction for Medicare fee-for-service beneficiaries: progress and continuing challenges. *Circulation.* 2010;121(11):1322-8.
124. Koch CG, Li L, Kaplan GA, Wachterman J, Shishehbor MH, Sabik J, et al. Socioeconomic position, not race, is linked to death after cardiac surgery. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes.* 2010;3(3):267-76.
125. Mochari-Greenberger H, Mosca L. Differential outcomes by race and ethnicity in patients with coronary heart disease: a contemporary review. *Current cardiovascular risk reports.* 2015;9(5):20.
126. Control CfD, Prevention. CDC health disparities and inequalities report: United States. <http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/other/su6001.pdf>. 2011.
127. Rodriguez F, Joynt KE, Lopez L, Saldana F, Jha AK. Readmission rates for Hispanic Medicare beneficiaries with heart failure and acute myocardial infarction. *Am Heart J.* 2011;162(2):254-61.e3.
128. Arnold SV, Chan PS, Jones PG, Decker C, Buchanan DM, Krumholz HM, et al. Translational Research Investigating Underlying Disparities in Acute Myocardial Infarction

Patients' Health Status (TRIUMPH): design and rationale of a prospective multicenter registry. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*. 2011;4(4):467-76.

129. Phelan JC, Link BG, Tehranifar P. Social conditions as fundamental causes of health inequalities: theory, evidence, and policy implications. *J Health Soc Behav*. 2010;51 Suppl:S28-40.

130. Humphrey J, McCulloch A. *The Cardiovascular System -Anatomy,Physiology and Cell Biology*.2003.

131. Themistocleous I, Stefanakis M, Douda H. Coronary Heart Disease Part I: Pathophysiology and Risk Factors. *Journal of Physical Activity, Nutrition and Rehabilitation*. 2017:1-9.

132. Hackam DG, Anand SS. Emerging risk factors for atherosclerotic vascular disease: a critical review of the evidence. *Jama*. 2003;290(7):932-40.

133. Gottlieb MG, Bonardi G, Moriguchi E. Fisiopatologia e aspectos inflamatórios da aterosclerose. *Scientia Medica* 2005;15(3):203-7.

134. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis--an update. *N Engl J Med*. 1986;314(8):488-500.

135. Luz P, Favarato D. Doença Coronária Crônica. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*. 1999;72.

136. Stein O, Thiery J, Stein Y. Is there a genetic basis for resistance to atherosclerosis? *Atherosclerosis*. 2002;160(1):1-10.

137. Hulthe J, Fagerberg B. Circulating oxidized LDL is associated with subclinical atherosclerosis development and inflammatory cytokines (AIR Study). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(7):1162-7.

138. Braunwald E. *Atlas de doenças cardiovasculares*1998.

139. Wang JC, Normand SL, Mauri L, Kuntz RE. Coronary artery spatial distribution of acute myocardial infarction occlusions. *Circulation*. 2004;110(3):278-84.

140. Da Luz P, Laurindo F, Chagas A. *Endotélio: Doenças Cardiovasculares*. 1ª ed2004.

141. Ferreira J, Chagas A. *Disfunção Endotelial*. Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo. 2013;23.

142. Libby P, Ridker PM. Inflammation and Atherothrombosis: From Population Biology and Bench Research to Clinical Practice. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;48(9, Supplement):A33-A46.

143. Srikanth S, Ambrose JA. Pathophysiology of coronary thrombus formation and adverse consequences of thrombus during PCI. *Curr Cardiol Rev*. 2012;8(3):168-76.

144. Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP, Fowler DR, Kruth HS, Weber DK, et al. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med*. 2003;349(24):2316-25.

145. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med.* 1987;316(22):1371-5.
146. Ambrose JA, Tannenbaum MA, Alexopoulos D, Hjerdahl-Monsen CE, Leavy J, Weiss M, et al. Angiographic progression of coronary artery disease and the development of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 1988;12(1):56-62.
147. Jia H, Abtahian F, Aguirre AD, Lee S, Chia S, Lowe H, et al. In vivo diagnosis of plaque erosion and calcified nodule in patients with acute coronary syndrome by intravascular optical coherence tomography. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62(19):1748-58.
148. Gulino S, Landro A, Indelicato A. Aortic Stenosis: Epidemiology and Pathogenesis. 2018. p. 245-52.
149. Spitzer E, Hahn RT, Pibarot P, de Vries T, Bax JJ, Leon MB, et al. Aortic Stenosis and Heart Failure: Disease Ascertainment and Statistical Considerations for Clinical Trials. *Cardiac failure review.* 2019;5(2):99-105.
150. de Oliveira Sa MPB, Cavalcanti LRP, Perazzo AM, Gomes RAF, Clavel MA, Pibarot P, et al. Calcific Aortic Valve Stenosis and Atherosclerotic Calcification. *Curr Atheroscler Rep.* 2020;22(2):2.
151. Kaltoft M, Langsted A, Nordestgaard BG. Obesity as a Causal Risk Factor for Aortic Valve Stenosis. *Journal of the American College of Cardiology.* 2020;75(2):163.
152. Wiegman A, Gidding SS, Watts GF, Chapman MJ, Ginsberg HN, Cuchel M, et al. Familial hypercholesterolaemia in children and adolescents: gaining decades of life by optimizing detection and treatment. *European Heart Journal.* 2015;36(36):2425-37.
153. Fukumoto R, Kawai M, Minai K, Ogawa K, Yoshida J, Inoue Y, et al. Conflicting relationship between age-dependent disorders, valvular heart disease and coronary artery disease by covariance structure analysis: Possible contribution of natriuretic peptide. *PloS one.* 2017;12(7):e0181206-e.
154. Boudoulas KD, Triposkiadis F, Boudoulas H. The Aortic Stenosis Complex. *Cardiology.* 2018;140(3):194-8.
155. Ten Kate GR, Bos S, Dedic A, Neefjes LA, Kurata A, Langendonk JG, et al. Increased Aortic Valve Calcification in Familial Hypercholesterolemia: Prevalence, Extent, and Associated Risk Factors. *J Am Coll Cardiol.* 2015;66(24):2687-95.
156. Demer LL, Tintut Y. Inflammatory, metabolic, and genetic mechanisms of vascular calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34(4):715-23.
157. Xiao Z, Prieto D, Conrads TP, Veenstra TD, Issaq HJ. Proteomic patterns: their potential for disease diagnosis. *Mol Cell Endocrinol.* 2005;230(1-2):95-106.
158. Veenstra TD, Conrads TP, Hood BL, Avellino AM, Ellenbogen RG, Morrison RS. Biomarkers: mining the biofluid proteome. *Mol Cell Proteomics.* 2005;4(4):409-18.

159. Million R, Tolin S, Puricelli L, Sbrignadello S, Fadini GP, Tessari P, et al. High abundance proteins depletion vs low abundance proteins enrichment: comparison of methods to reduce the plasma proteome complexity. *PLoS One*. 2011;6(5):e19603.
160. Schaub S, Wilkins J, Weiler T, Sangster K, Rush D, Nickerson P. Urine protein profiling with surface-enhanced laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Kidney Int*. 2004;65(1):323-32.
161. González-Buitrago JM, Ferreira L, Lorenzo I. Urinary proteomics. *Clin Chim Acta*. 2007;375(1-2):49-56.
162. Albalat A, Mischak H, Mullen W. Clinical application of urinary proteomics/peptidomics. *Expert Rev Proteomics*. 2011;8(5):615-29.
163. Deodhar SD. C-reactive protein: the best laboratory indicator available for monitoring disease activity. *Cleve Clin J Med*. 1989;56(2):126-30.
164. Davis F, Vidyasagar S, Maiya GA. C-reactive protein and coronary heart disease-risk marker or risk factor. *J Clin Sci Res*. 2012;1:178-86.
165. Zakynthinos E, Pappa N. Inflammatory biomarkers in coronary artery disease. *Journal of Cardiology*. 2009;53(3):317-33.
166. Shrivastava AK, Singh HV, Raizada A, Singh SK. C-reactive protein, inflammation and coronary heart disease. *The Egyptian Heart Journal*. 2015;67(2):89-97.
167. Rost NS, Wolf PA, Kase CS, Kelly-Hayes M, Silbershatz H, Massaro JM, et al. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of ischemic stroke and transient ischemic attack: the Framingham study. *Stroke*. 2001;32(11):2575-9.
168. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of developing peripheral vascular disease. *Circulation*. 1998;97(5):425-8.
169. Cook DG, Mendall MA, Whincup PH, Carey IM, Ballam L, Morris JE, et al. C-reactive protein concentration in children: relationship to adiposity and other cardiovascular risk factors. *Atherosclerosis*. 2000;149(1):139-50.
170. Mendall MA, Patel P, Ballam L, Strachan D, Northfield TC. C reactive protein and its relation to cardiovascular risk factors: a population based cross sectional study. *Bmj*. 1996;312(7038):1061-5.
171. Ishikawa T, Hatakeyama K, Imamura T, Date H, Shibata Y, Hikichi Y, et al. Involvement of C-reactive protein obtained by directional coronary atherectomy in plaque instability and developing restenosis in patients with stable or unstable angina pectoris. *Am J Cardiol*. 2003;91(3):287-92.
172. Inoue T, Kato T, Uchida T, Sakuma M, Nakajima A, Shibasaki M, et al. Local release of C-reactive protein from vulnerable plaque or coronary arterial wall injured by stenting. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46(2):239-45.

173. LaFramboise WA, Dhir R, Kelly LA, Petrosko P, Krill-Burger JM, Sciulli CM, et al. Serum protein profiles predict coronary artery disease in symptomatic patients referred for coronary angiography. *BMC Med.* 2012;10:157.
174. Yang C, Tian W, Ma S, Guo M, Lin X, Gao F, et al. AAV-Mediated ApoC2 Gene Therapy: Reversal of Severe Hypertriglyceridemia and Rescue of Neonatal Death in ApoC2-Deficient Hamsters. *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development.* 2020;18:692-701.
175. Stewart CR, Haw A, 3rd, Lopez R, McDonald TO, Callaghan JM, McConville MJ, et al. Serum amyloid P colocalizes with apolipoproteins in human atheroma: functional implications. *J Lipid Res.* 2007;48(10):2162-71.
176. Howlett GJ, Moore KJ. Untangling the role of amyloid in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2006;17(5):541-7.
177. Ku EJ, Cho K-C, Lim C, Kang JW, Oh JW, Choi YR, et al. Discovery of plasma biomarkers for predicting the severity of coronary artery atherosclerosis by quantitative proteomics. *BMJ Open Diabetes Research & Care.* 2020;8(1):e001152.
178. Miller M, Cannon CP, Murphy SA, Qin J, Ray KK, Braunwald E. Impact of triglyceride levels beyond low-density lipoprotein cholesterol after acute coronary syndrome in the PROVE IT-TIMI 22 trial. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51(7):724-30.
179. Kunimura K, Uruno T, Fukui Y. DOCK family proteins: key players in immune surveillance mechanisms. *International Immunology.* 2019;32(1):5-15.
180. Zhuge Y, Zhang J, Qian F, Wen Z, Niu C, Xu K, et al. Role of smooth muscle cells in Cardiovascular Disease. *International Journal of Biological Sciences.* 2020;16(14):2741-51.
181. Hou J, Deng Q, Guo X, Deng X, Zhong W, Zhong Z. Association between apolipoprotein E gene polymorphism and the risk of coronary artery disease in Hakka postmenopausal women in southern China. *Lipids Health Dis.* 2020;19(1):139-.
182. Ward H, Mitrou PN, Bowman R, Luben R, Wareham NJ, Khaw KT, et al. APOE genotype, lipids, and coronary heart disease risk: a prospective population study. *Arch Intern Med.* 2009;169(15):1424-9.
183. Lumsden AL, Mulugeta A, Zhou A, Hyppönen E. Apolipoprotein E (APOE) genotype-associated disease risks: a phenome-wide, registry-based, case-control study utilising the UK Biobank. *EBioMedicine.* 2020;59.
184. Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, et al. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell.* 1998;2(2):275-81.
185. Mantovani A, Bussolino F, Dejana E. Cytokine regulation of endothelial cell function. *FASEB J.* 1992;6(8):2591-9.
186. Rus HG, Vlaicu R, Niculescu F. Interleukin-6 and interleukin-8 protein and gene expression in human arterial atherosclerotic wall. *Atherosclerosis.* 1996;127(2):263-71.

187. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*. 2011;117(14):3720-32.
188. Dinarello CA, Simon A, van der Meer JW. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11(8):633-52.
189. Dewberry R, Holden H, Crossman D, Francis S. Interleukin-1 receptor antagonist expression in human endothelial cells and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(11):2394-400.
190. Ikonomidis I, Andreotti F, Economou E, Stefanadis C, Toutouzas P, Nihoyannopoulos P. Increased proinflammatory cytokines in patients with chronic stable angina and their reduction by aspirin. *Circulation*. 1999;100(8):793-8.
191. Ikonomidis I, Lekakis J, Revela I, Andreotti F, Nihoyannopoulos P. Increased circulating C-reactive protein and macrophage-colony stimulating factor are complementary predictors of long-term outcome in patients with chronic coronary artery disease. *Eur Heart J*. 2005;26(16):1618-24.
192. Saitoh T, Kishida H, Tsukada Y, Fukuma Y, Sano J, Yasutake M, et al. Clinical significance of increased plasma concentration of macrophage colony-stimulating factor in patients with angina pectoris. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35(3):655-65.
193. Ferroni P, Basili S, Vieri M, Martini F, Labbadia G, Bellomo A, et al. Soluble P-selectin and proinflammatory cytokines in patients with polygenic type IIa hypercholesterolemia. *Haemostasis*. 1999;29(5):277-85.
194. Mendall M, Patel P, Asante M, Ballam L, Morris J, Strachan D, et al. Relation of serum cytokine concentrations to cardiovascular risk factors and coronary heart disease. *Heart*. 1997;78(3):273-7.
195. Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation*. 2000;101(15):1767-72.
196. Zakai N, Katz R, Jenny N, Psaty B, Reiner A, Schwartz S, et al. Inflammation and hemostasis biomarkers and cardiovascular risk in the elderly: the Cardiovascular Health Study. *Journal of thrombosis and haemostasis*. 2007;5(6):1128-35.
197. Wainstein MV, Mossmann M, Araujo GN, Goncalves SC, Gravina GL, Sangalli M, et al. Elevated serum interleukin-6 is predictive of coronary artery disease in intermediate risk overweight patients referred for coronary angiography. *Diabetol Metab Syndr*. 2017;9:67.
198. Schieffer B, Schieffer E, Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Kovanen PT, Kaartinen M, et al. Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability. *Circulation*. 2000;101(12):1372-8.

199. Haffner SM, Lehto S, Rönnemaa T, Pyörälä K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *New England journal of medicine*. 1998;339(4):229-34.
200. Fernández-Real JM, Ricart W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocrine reviews*. 2003;24(3):278-301.
201. Kado S, Nagase T, Nagata N. Circulating levels of interleukin-6, its soluble receptor and interleukin-6/interleukin-6 receptor complexes in patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta diabetologica*. 1999;36(1-2):67-72.
202. Pickup JC, Chusney GD, Thomas SM, Burt D. Plasma interleukin-6, tumour necrosis factor α and blood cytokine production in type 2 diabetes. *Life sciences*. 2000;67(3):291-300.
203. Pedersen M, Bruunsgaard H, Weis N, Hendel HW, Andreassen BU, Eldrup E, et al. Circulating levels of TNF-alpha and IL-6-relation to truncal fat mass and muscle mass in healthy elderly individuals and in patients with type-2 diabetes. *Mechanisms of ageing and development*. 2003;124(4):495-502.
204. Lowe G, Woodward M, Hillis G, Rumley A, Li Q, Harrap S, et al. Circulating inflammatory markers and the risk of vascular complications and mortality in people with type 2 diabetes and cardiovascular disease or risk factors: the ADVANCE study. *Diabetes*. 2014;63(3):1115-23.
205. Kleemann R, Zadelaar S, Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res*. 2008;79(3):360-76.
206. Sabat R, Grutz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, et al. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21(5):331-44.
207. Welsh P, Murray HM, Ford I, Trompet S, de Craen AJ, Jukema JW, et al. Circulating interleukin-10 and risk of cardiovascular events: a prospective study in the elderly at risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(10):2338-44.
208. Nishihira K, Imamura T, Yamashita A, Hatakeyama K, Shibata Y, Nagatomo Y, et al. Increased expression of interleukin-10 in unstable plaque obtained by directional coronary atherectomy. *Eur Heart J*. 2006;27(14):1685-9.
209. Nijm J, Wikby A, Tompa A, Olsson AG, Jonasson L. Circulating levels of proinflammatory cytokines and neutrophil-platelet aggregates in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 2005;95(4):452-6.
210. Waehre T, Halvorsen B, Damas JK, Yndestad A, Brosstad F, Gullestad L, et al. Inflammatory imbalance between IL-10 and TNFalpha in unstable angina potential plaque stabilizing effects of IL-10. *Eur J Clin Invest*. 2002;32(11):803-10.
211. Mizia-Steć K, Gasiór Z, Zahorska-Markiewicz B, Janowska J, Szulc A, Jastrzebska-Maj E, et al. Serum tumour necrosis factor-alpha, interleukin-2 and interleukin-10 activation in stable angina and acute coronary syndromes. *Coron Artery Dis*. 2003;14(6):431-8.

212. Rajappa M, Sen SK, Sharma A. Role of pro-/anti-inflammatory cytokines and their correlation with established risk factors in South Indians with coronary artery disease. *Angiology*. 2009;60(4):419-26.
213. Hong M, Wei W, Hu Y, Yang R, Yang Y. Plasma levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 and inflammatory cytokine IL-6 in patients with unstable angina. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2005;25(6):639-41.
214. Yamashita H, Shimada K, Seki E, Mokuno H, Daida H. Concentrations of interleukins, interferon, and C-reactive protein in stable and unstable angina pectoris. *Am J Cardiol*. 2003;91(2):133-6.
215. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, Fichtlscherer S, Boersma E, Simoons ML, et al. Serum level of the antiinflammatory cytokine interleukin-10 is an important prognostic determinant in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*. 2003;107(16):2109-14.
216. Anguera I, Miranda-Guardiola F, Bosch X, Filella X, Sitges M, Marin JL, et al. Elevation of serum levels of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 and decreased risk of coronary events in patients with unstable angina. *Am Heart J*. 2002;144(5):811-7.
217. Malarstig A, Eriksson P, Hamsten A, Lindahl B, Wallentin L, Siegbahn A. Raised interleukin-10 is an indicator of poor outcome and enhanced systemic inflammation in patients with acute coronary syndrome. *Heart*. 2008;94(6):724-9.
218. Azzawi M, Hasleton P. Tumour necrosis factor alpha and the cardiovascular system: its role in cardiac allograft rejection and heart disease. *Cardiovascular Research*. 1999;43(4):850-9.
219. Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res*. 2004;94(12):1543-53.
220. Elahi M, Matata B. Genetic Diversity of Tumour Necrosis Factor: Implications on Cardiovascular Complications of Polymorphisms at Position -308 In The Promoter Region. *The Cardiology*. 2005.
221. Brinkman BM, Zuijdeest D, Kaijzel EL, Breedveld FC, Verweij CL. Relevance of the tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) -308 promoter polymorphism in TNF alpha gene regulation. *J Inflamm*. 1995;46(1):32-41.
222. Niu J, Kolattukudy PE. Role of MCP-1 in cardiovascular disease: molecular mechanisms and clinical implications. *Clin Sci (Lond)*. 2009;117(3):95-109.
223. Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res*. 2004;95(9):858-66.
224. van Wijk Diederik F, van Leuven Sander I, Sandhu Manjinder S, Tanck Michael W, Hutten Barbara A, Wareham Nicholas J, et al. Chemokine Ligand 2 Genetic Variants, Serum Monocyte Chemoattractant Protein-1 Levels, and the Risk of Coronary Artery Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2010;30(7):1460-6.

225. Ding D, Su D, Li X, Li Z, Wang Y, Qiu J, et al. Serum levels of monocyte chemoattractant protein-1 and all-cause and cardiovascular mortality among patients with coronary artery disease. *PLoS One*. 2015;10(3):e0120633.
226. Antoniadou C, Bakogiannis C, Tousoulis D, Antonopoulos AS, Stefanadis C. The CD40/CD40 Ligand System: Linking Inflammation With Atherothrombosis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009;54(8):669-77.
227. Schonbeck U, Libby P. CD40 signaling and plaque instability. *Circ Res*. 2001;89(12):1092-103.
228. Schönbeck U, Varo N, Libby P, Buring J, Ridker PM. Soluble CD40L and cardiovascular risk in women. *Circulation*. 2001;104(19):2266-8.
229. Correction: Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. *N Engl J Med*. 1999;340(17):1376.
230. Malle E, Steinmetz A, Raynes JG. Serum amyloid A (SAA): an acute phase protein and apolipoprotein. *Atherosclerosis*. 1993;102(2):131-46.
231. Fyfe Alistair I, Rothenberg LS, DeBeer Frederick C, Cantor Rita M, Rotter Jerome I, Lusis Aldons J. Association Between Serum Amyloid A Proteins and Coronary Artery Disease. *Circulation*. 1997;96(9):2914-9.
232. van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation*. 1994;89(1):36-44.
233. Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, Grillo RL, Rebuffi AG, Pepys MB, et al. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *N Engl J Med*. 1994;331(7):417-24.
234. Hillis GS, Flapan AD. Cell adhesion molecules in cardiovascular disease: a clinical perspective. *Heart (British Cardiac Society)*. 1998;79(5):429-31.
235. Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, Pigott R, Woolf N, Katz D, et al. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol*. 1993;171(3):223-9.
236. Ridker PM, Hennekens CH, Roitman-Johnson B, Stampfer MJ, Allen J. Plasma concentration of soluble intercellular adhesion molecule 1 and risks of future myocardial infarction in apparently healthy men. *Lancet*. 1998;351(9096):88-92.
237. Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AM, Jr., et al. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Circulation*. 1997;96(12):4219-25.

238. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Peetz D, Hafner G, Tiret L, et al. Circulating Cell Adhesion Molecules and Death in Patients With Coronary Artery Disease. *Circulation*. 2001;104(12):1336-42.
239. Heinecke JW. Mass spectrometric quantification of amino acid oxidation products in proteins: insights into pathways that promote LDL oxidation in the human artery wall. *The FASEB journal*. 1999;13(10):1113-20.
240. Podrez EA, Abu-Soud HM, Hazen SL. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radical Biology and Medicine*. 2000;28(12):1717-25.
241. Zhang R, Brennan M-L, Fu X, Aviles RJ, Pearce GL, Penn MS, et al. Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *Jama*. 2001;286(17):2136-42.
242. Hasanpour Z, Javanmard SH, Gharaaty M, Sadeghi M. Association between serum myeloperoxidase levels and coronary artery disease in patients without diabetes, hypertension, obesity, and hyperlipidemia. *Advanced biomedical research*. 2016;5:103-.
243. Azevedo A, Prado AF, Antonio RC, Issa JP, Gerlach RF. Matrix metalloproteinases are involved in cardiovascular diseases. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2014;115(4):301-14.
244. Mittal B, Mishra A, Srivastava A, Kumar S, Garg N. Matrix metalloproteinases in coronary artery disease. *Adv Clin Chem*. 2014;64:1-72.
245. Eckart RE, Uyehara CF, Shry EA, Furgerson JL, Krasuski RA. Matrix metalloproteinases in patients with myocardial infarction and percutaneous revascularization. *J Interv Cardiol*. 2004;17(1):27-31.
246. Khurana R, Moons L, Shafi S, Luttun A, Collen D, Martin JF, et al. Placental growth factor promotes atherosclerotic intimal thickening and macrophage accumulation. *Circulation*. 2005;111(21):2828-36.
247. Cassidy A, Chiuve SE, Manson JE, Rexrode KM, Girman CJ, Rimm EB. Potential role for plasma placental growth factor in predicting coronary heart disease risk in women. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2009;29(1):134-9.
248. Zalewski A, Macphee C. Role of Lipoprotein-Associated Phospholipase A₂ in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2005;25(5):923-31.
249. Caslake MJ, Packard CJ, Suckling KE, Holmes SD, Chamberlain P, Macphee CH. Lipoprotein-associated phospholipase A₂, platelet-activating factor acetylhydrolase: a potential new risk factor for coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2000;150(2):413-9.
250. Li D, Wei W, Ran X, Yu J, Li H, Zhao L, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A₂ and risks of coronary heart disease and ischemic stroke in the general population: A systematic review and meta-analysis. *Clinica Chimica Acta*. 2017;471:38-45.
251. Mallat Z, Benessiano J, Simon T, Ederhy S, Sebella-Arguelles C, Cohen A, et al. Circulating Secretory Phospholipase A₂ Activity and Risk of Incident Coronary Events in

- Healthy Men and Women. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2007;27(5):1177-83.
252. Altwegg LA, Neidhart M, Hersberger M, Müller S, Eberli FR, Corti R, et al. Myeloid-related protein 8/14 complex is released by monocytes and granulocytes at the site of coronary occlusion: a novel, early, and sensitive marker of acute coronary syndromes. *European Heart Journal*. 2007;28(8):941-8.
253. Peng WH, Jian WX, Li HL, Hou L, Wei YD, Li WM, et al. Increased serum myeloid-related protein 8/14 level is associated with atherosclerosis in type 2 diabetic patients. *Cardiovasc Diabetol*. 2011;10(1):41.
254. Arneson D, Shu L, Tsai B, Barrere-Cain R, Sun C, Yang X. Multidimensional Integrative Genomics Approaches to Dissecting Cardiovascular Disease. *Front Cardiovasc Med*. 2017;4:8.
255. Zeller T, Blankenberg S. Blood-based gene expression tests: promises and limitations. *Circ Cardiovasc Genet*. 2013;6(2):139-40.
256. Fernandes M, Patel A, Husi H. C/VDdb: A multi-omics expression profiling database for a knowledge-driven approach in cardiovascular disease (CVD). *PloS one*. 2018;13(11):e0207371-e.
257. Sun H, Wang D, Liu D, Guo Z, Shao C, Sun W, et al. Differential urinary proteins to diagnose coronary heart disease based on iTRAQ quantitative proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2019;411(11):2273-82.
258. Abolhasani S, Shahbazloo SV, Saadati HM, Mahmoodi N, Khanbabaei N. Evaluation of Serum Levels of Inflammation, Fibrinolysis and Oxidative Stress Markers in Coronary Artery Disease Prediction: A Cross-Sectional Study. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 2019;113:667-74.
259. Zougman A, Selby PJ, Banks RE. Suspension trapping (STrap) sample preparation method for bottom-up proteomics analysis. *Proteomics*. 2014;14(9):1006-0.
260. Pathan M, Keerthikumar S, Chisanga D, Alessandro R, Ang CS, Askenase P, et al. A novel community driven software for functional enrichment analysis of extracellular vesicles data. *J Extracell Vesicles*. 2017;6(1):1321455.
261. Anwar MA, Dai DL, Wilson-McManus J, Smith D, Francis GA, Borchers CH, et al. Multiplexed LC-ESI-MRM-MS-based Assay for Identification of Coronary Artery Disease Biomarkers in Human Plasma. *PROTEOMICS – Clinical Applications*. 2019;13(4):1700111.
262. Bom MJ, Levin E, Driessen RS, Danad I, Van Kuijk CC, van Rossum AC, et al. Predictive value of targeted proteomics for coronary plaque morphology in patients with suspected coronary artery disease. *EBioMedicine*. 2019;39:109-17.
263. Htun NM, Magliano DJ, Zhang Z-Y, Lyons J, Petit T, Nkuipou-Kenfack E, et al. Prediction of acute coronary syndromes by urinary proteome analysis. *PLOS ONE*. 2017;12(3):e0172036.

264. Denny P, Feuermann M, Hill DP, Lovering RC, Plun-Favreau H, Roncaglia P. Exploring autophagy with Gene Ontology. *Autophagy*. 2018;14(3):419-36.
265. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(D1):D607-d13.
266. Zheng KH, Tzolos E, Dweck MR. Pathophysiology of Aortic Stenosis and Future Perspectives for Medical Therapy. *Cardiol Clin*. 2020;38(1):1-12.
267. Song W, Wang X. The role of TGF β 1 and LRG1 in cardiac remodelling and heart failure. *Biophys Rev*. 2015;7(1):91-104.
268. Yang F-J, Hsieh C-Y, Shu K-H, Chen IY, Pan S-Y, Chuang Y-F, et al. Plasma Leucine-Rich α -2-Glycoprotein 1 Predicts Cardiovascular Disease Risk in End-Stage Renal Disease. *Scientific Reports*. 2020;10(1):5988.
269. Dabrowski AN, Conrad C, Behrendt U, Shrivastav A, Baal N, Wienhold SM, et al. Peptidoglycan Recognition Protein 2 Regulates Neutrophil Recruitment Into the Lungs After *Streptococcus pneumoniae* Infection. *Frontiers in Microbiology*. 2019;10(199).
270. Wang H, Liu D, Zhang H. Investigation of the Underlying Genes and Mechanism of Macrophage-Enriched Ruptured Atherosclerotic Plaques Using Bioinformatics Method. *J Atheroscler Thromb*. 2019;26(7):636-58.
271. Kobylecki CJ, Afzal S, Nordestgaard BG. Genetically Low Antioxidant Protection and Risk of Cardiovascular Disease and Heart Failure in Diabetic Subjects. *EBioMedicine*. 2015;2(12):2010-5.
272. Mohammedi K, Bellili-Muñoz N, Marklund SL, Driss F, Le Nagard H, Patente TA, et al. Plasma extracellular superoxide dismutase concentration, allelic variations in the SOD3 gene and risk of myocardial infarction and all-cause mortality in people with type 1 and type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 2015;14:845-.
273. Turhan Caglar FN, Ksanski V, Polat V, Ungan I, Kural A, Ciftci S, et al. The Association Between α 1-Antitrypsin and Coronary Artery Ectasia. *Angiology*. 2016;67(10):927-31.
274. Malik R, Dau T, Gonik M, Sivakumar A, Deredge DJ, Edeleva EV, et al. Common coding variant in SERPINA1 increases the risk for large artery stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(14):3613-8.
275. Wang T, Huang C, Lopez-Coral A, Slentz-Kesler KA, Xiao M, Wherry EJ, et al. K12/SECTM1, an interferon- γ regulated molecule, synergizes with CD28 to costimulate human T cell proliferation. *J Leukoc Biol*. 2012;91(3):449-59.
276. Li X, Jiang Y, Meisenhelder J, Yang W, Hawke DH, Zheng Y, et al. Mitochondria-Translocated PGK1 Functions as a Protein Kinase to Coordinate Glycolysis and the TCA Cycle in Tumorigenesis. *Mol Cell*. 2016;61(5):705-19.

277. Bonnefond A, Yengo L, Dechaume A, Canouil M, Castelain M, Roger E, et al. Relationship between salivary/pancreatic amylase and body mass index: a systems biology approach. *BMC Med.* 2017;15(1):37-.
278. Lee C-W, Cheng T-M, Lin C-P, Pan J-P. Plasma haptoglobin concentrations are elevated in patients with coronary artery disease. *PLoS One.* 2013;8(10):e76817-e.
279. Muniyan S, Chaturvedi NK, Dwyer JG, Lagrange CA, Chaney WG, Lin M-F. Human prostatic acid phosphatase: structure, function and regulation. *International journal of molecular sciences.* 2013;14(5):10438-64.
280. Gyorkey F. Some aspects of cancer of the prostate gland. *Methods Cancer Res.* 1973;10:279-368.
281. Yam LT. Clinical significance of the human acid phosphatases: a review. *Am J Med.* 1974;56(5):604-16.
282. Meng TC, Lin MF. Tyrosine phosphorylation of c-ErbB-2 is regulated by the cellular form of prostatic acid phosphatase in human prostate cancer cells. *J Biol Chem.* 1998;273(34):22096-104.
283. Veeramani S, Yuan TC, Chen SJ, Lin FF, Petersen JE, Shaheduzzaman S, et al. Cellular prostatic acid phosphatase: a protein tyrosine phosphatase involved in androgen-independent proliferation of prostate cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2005;12(4):805-22.
284. Chuang T-D, Chen S-J, Lin F-F, Veeramani S, Kumar S, Batra SK, et al. Human prostatic acid phosphatase, an authentic tyrosine phosphatase, dephosphorylates ErbB-2 and regulates prostate cancer cell growth. *Journal of Biological Chemistry.* 2010;285(31):23598-606.
285. Zöller B, Ji J, Sundquist J, Sundquist K. Risk of coronary heart disease in patients with cancer: a nationwide follow-up study from Sweden. *Eur J Cancer.* 2012;48(1):121-8.
286. Ray U, Bank S, Jayawardana MW, Bhowmik J, Redwig F, Jana P, et al. Insulin resistance in prostate cancer patients and predisposing them to acute ischemic heart disease. *Bioscience reports.* 2019;39(7):BSR20182313.
287. Lin Z, Liu D, Xue Y, Wu T, Zeng X, Guo Z, et al. Serum annexin A2 level is significantly elevated in patients with coronary heart disease. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2020;40(3):382-7.
288. Weisell J, Ohukainen P, Näpänkangas J, Ohlmeier S, Bergmann U, Peltonen T, et al. Heat shock protein 90 is downregulated in calcific aortic valve disease. *BMC Cardiovasc Disord.* 2019;19(1):306-.
289. Devuyst O, Bochud M. Uromodulin, kidney function, cardiovascular disease, and mortality. *Kidney International.* 2015;88(5):944-6.
290. Cheow ESH, Cheng WC, Yap T, Dutta B, Lee CN, Kleijn DPV, et al. Myocardial Injury Is Distinguished from Stable Angina by a Set of Candidate Plasma Biomarkers Identified Using iTRAQ/MRM-Based Approach. *J Proteome Res.* 2018;17(1):499-515.

291. Tzima E, Irani-Tehrani M, Kiosses WB, Dejana E, Schultz DA, Engelhardt B, et al. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature*. 2005;437(7057):426-31.
292. Fioranelli M, Bottaccioli AG, Bottaccioli F, Bianchi M, Rovesti M, Rocchia MG. Stress and Inflammation in Coronary Artery Disease: A Review Psychoneuroendocrineimmunology-Based. *Frontiers in immunology*. 2018;9:2031-.
293. Fliser D, Novak J, Thongboonkerd V, Argiles A, Jankowski V, Girolami MA, et al. Advances in urinary proteome analysis and biomarker discovery. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(4):1057-71.
294. Mischak H, Delles C, Klein J, Schanstra JP. Urinary proteomics based on capillary electrophoresis-coupled mass spectrometry in kidney disease: discovery and validation of biomarkers, and clinical application. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2010;17(6):493-506.
295. Rossing K, Mischak H, Dakna M, Zurbig P, Novak J, Julian BA, et al. Urinary proteomics in diabetes and CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(7):1283-90.
296. Theodorescu D, Schiffer E, Bauer HW, Douwes F, Eichhorn F, Polley R, et al. Discovery and validation of urinary biomarkers for prostate cancer. *Proteomics Clinical applications*. 2008;2(4):556-70.
297. Strong KJ, Osicka TM, Comper WD. Urinary-peptide excretion by patients with and volunteers without diabetes. *J Lab Clin Med*. 2005;145(5):239-46.
298. Brenner BM, Rector F, Levine S. *The Kidney*. 7th ed. USA2004.
299. Grodos D, Tonglet R. Scandinavian simvastatin study (4S). *Lancet*. 1994;344(8939-8940):1768.


17 Anexos

Anexo I. Folha de consentimento informado para a investigação clínica

CONSENTIMENTO INFORMADO, ESCLARECIDO E LIVRE

PARA INVESTIGAÇÃO CLÍNICA

Considerando a "Declaração de Helsíngua" da Associação Médica Mundial (Helsíngua 1964; Tóquio 1975; Veneza 1983; Hong Kong 1989; Somerset West 1996; Edimburgo 2000; Seul 2008, Fortaleza 2013)


SÃO JOÃO

Designação do Estudo *(em português)*

A diabetes e a obesidade como fatores de risco para as doenças oncológicas e cardiovasculares - um sistema de análise para uma medicina personalizada (DOCnet).

Confirmo que expliquei ao participante/representante legal, de forma adequada e compreensível, a investigação referida, os benefícios, os riscos e possíveis complicações associadas à sua realização.

Informação escrita em anexo: Não Sim (Nº de páginas 1)

O Investigador responsável
Nome: Professor Doutor Adelino Leite Moreira
legível assinatura

Identificação do participante
Nome: _____
BI/ CC n.º: _____

Participante/ Representante legal

- Compreendi a explicação que me foi facultada acerca do estudo que se tenciona realizar: os objetivos, os métodos, os benefícios previstos, os riscos potenciais e o eventual desconforto.
- Solicitei todas as informações de que necessitei, sabendo que o esclarecimento é fundamental para uma boa decisão.
- Fui informado da possibilidade de livremente recusar ou abandonar a todo o tempo a participação no estudo, sem que isso possa ter como efeito qualquer prejuízo na assistência que é prestada.
- Declaro não ter sido incluído em nenhum outro projeto de investigação nos últimos três meses.

Concordo com a participação neste estudo, de acordo com os esclarecimentos que me foram prestados, como consta neste documento, do qual me foi entregue uma cópia.

Data: / / _____
assinatura

Nome (Pais/Representante legal): _____
BI/ CC n.º: _____ Grau de parentesco: _____

Data: / / _____
assinatura

△ N.º CES-IM04-0

Anexo II. Folha de Informação ao Paciente

Informação ao Participante

Por favor, leia com atenção todo o conteúdo deste documento. Não hesite em solicitar mais informações se não estiver completamente esclarecido/a.

Título do estudo: A diabetes e a obesidade como fatores de risco para as doenças oncológicas e cardiovasculares - um sistema de análise para uma medicina personalizada (DOCnet)

Diabetes & obesity at the crossroads between Oncological and Cardiovascular diseases - a system analysis NETWORK towards precision medicine (DOCnet)

Explicação do estudo: A disfunção metabólica, a obesidade, a diabetes *mellitus* constituem os principais fatores de risco das doenças cardiovasculares e oncológicas. Espera-se que o número de casos destas doenças e dos fatores de risco que favoreçam o seu desenvolvimento aumentem exponencialmente num futuro próximo, representando uma ameaça a um envelhecimento saudável e ao bom funcionamento dos sistemas de saúde.

Neste sentido, esta investigação irá permitir uma melhor compreensão da importância da obesidade e da diabetes *mellitus* nas doenças cardiovasculares e oncológicas. Os objetivos finais serão uma melhor compreensão do desenvolvimento destas doenças e encontrar novas intervenções terapêuticas que poderão contribuir para uma melhoria da qualidade de vida dos doentes.

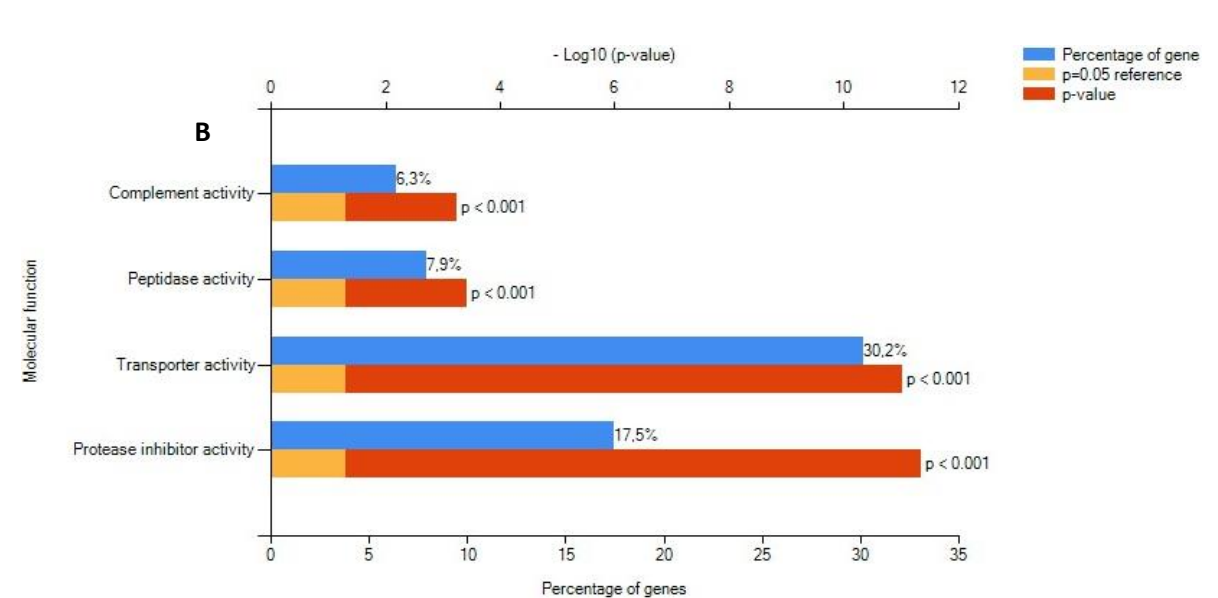
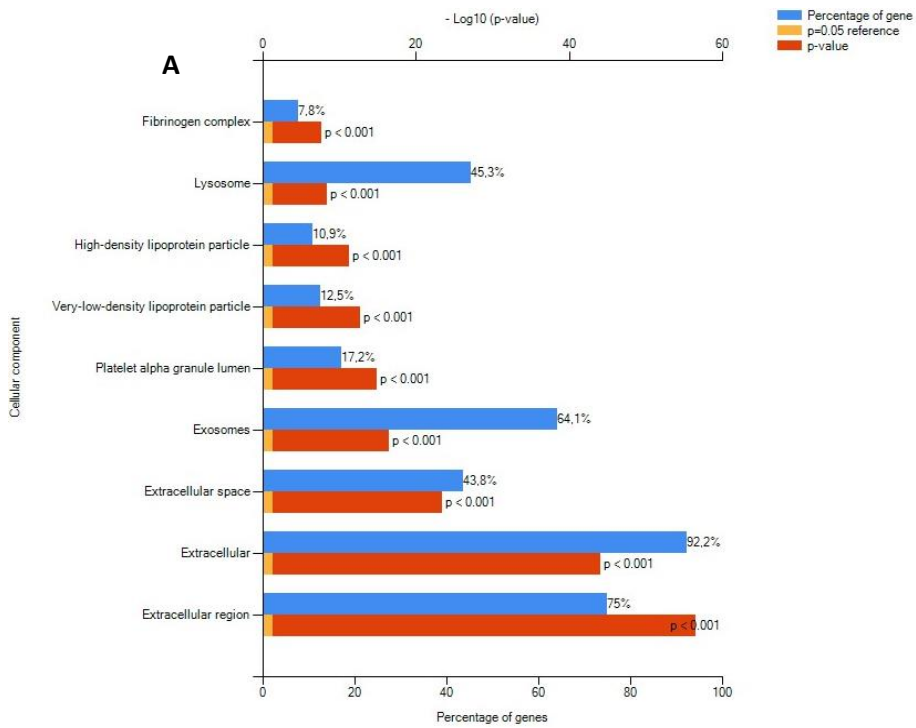
Durante a cirurgia cardíaca, serão colhidas amostras de plasma, músculo esquelético, válvula aórtica, miocárdio e tecido adiposo. Estes procedimentos, ou são habituais neste tipo de cirurgia, ou não causam qualquer perigo para a saúde do participante uma vez que não será perturbada a função de qualquer órgão e que as colheitas serão efetuadas por profissionais competentes e no ambiente médico adequado.

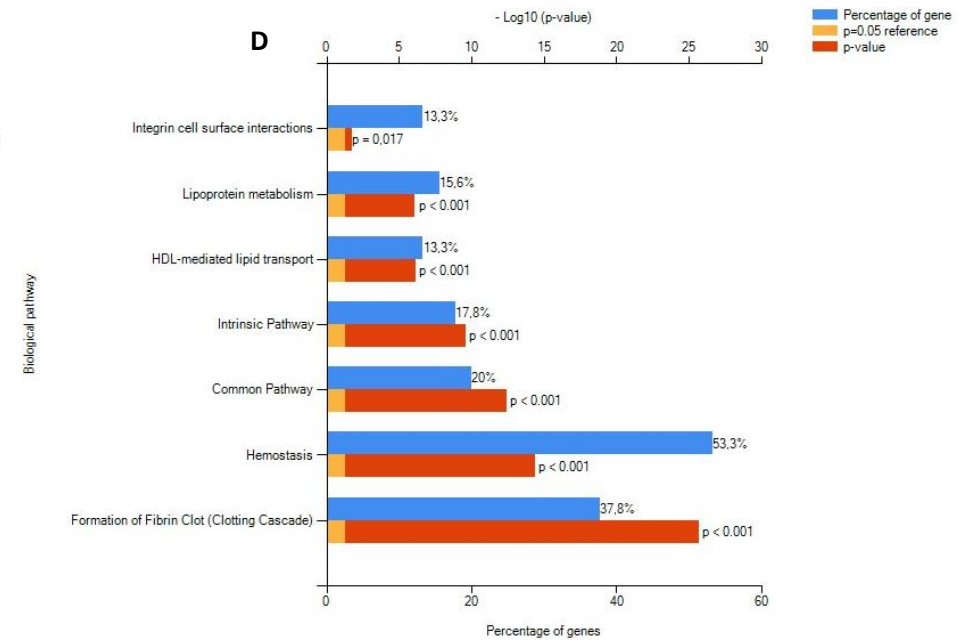
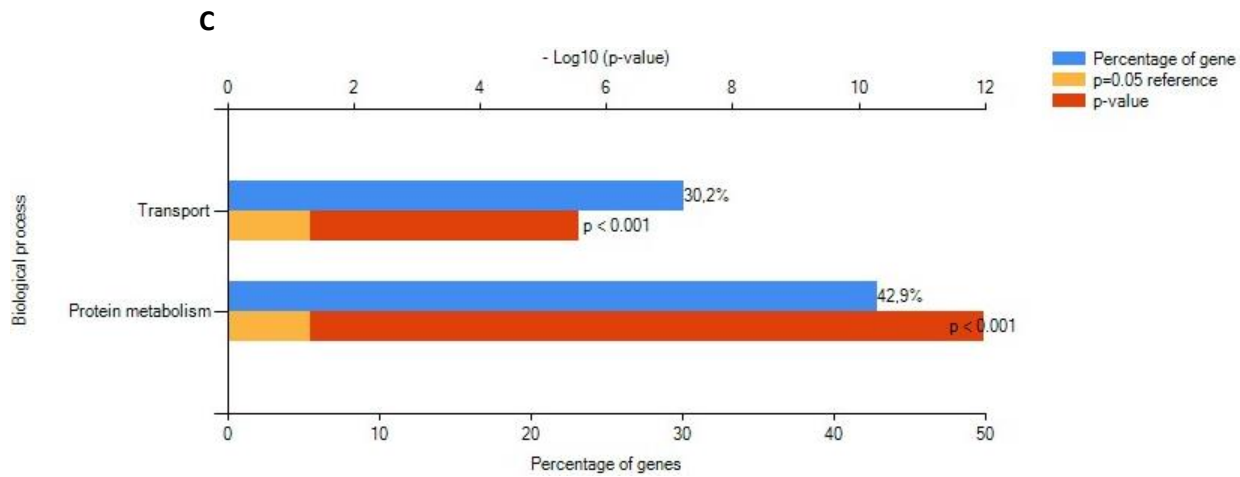
Este estudo é de participação voluntária, sendo garantida a confidencialidade e privacidade dos participantes. Em qualquer momento é possível desistir da participação no estudo sem que isso traga qualquer consequência para o participante.

O estudo mereceu parecer favorável da comissão de ética para a saúde do Centro Hospitalar São João.

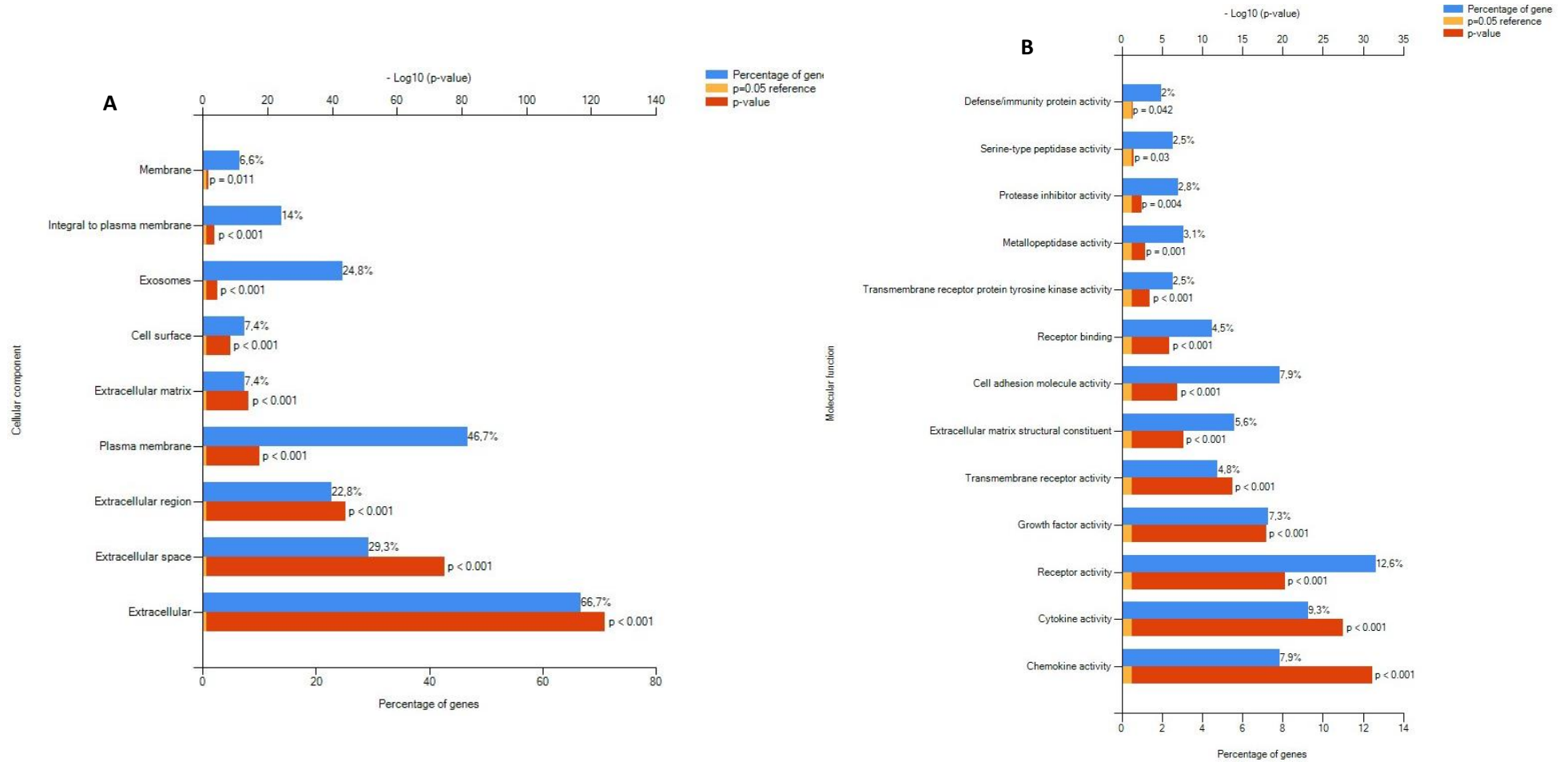
Contacto do investigador responsável:
Prof. Doutor Adelino Leite Moreira
unic@med.up.pt

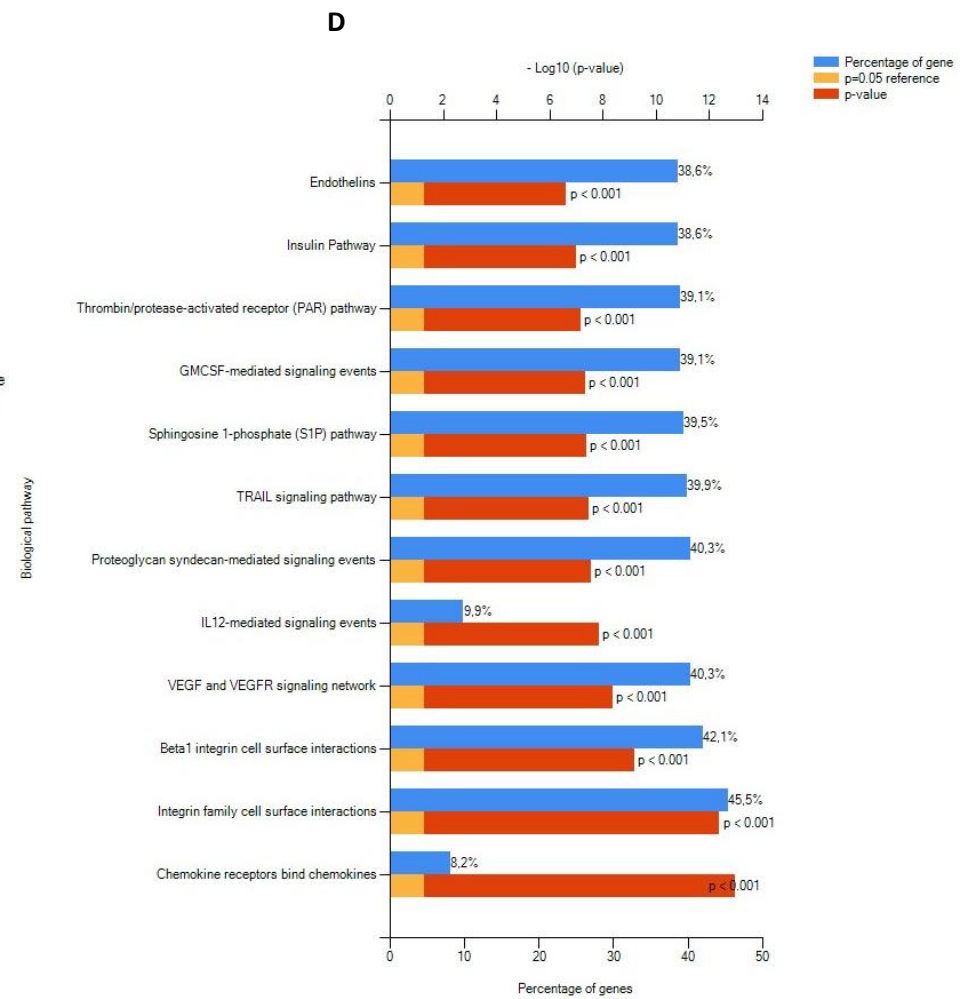
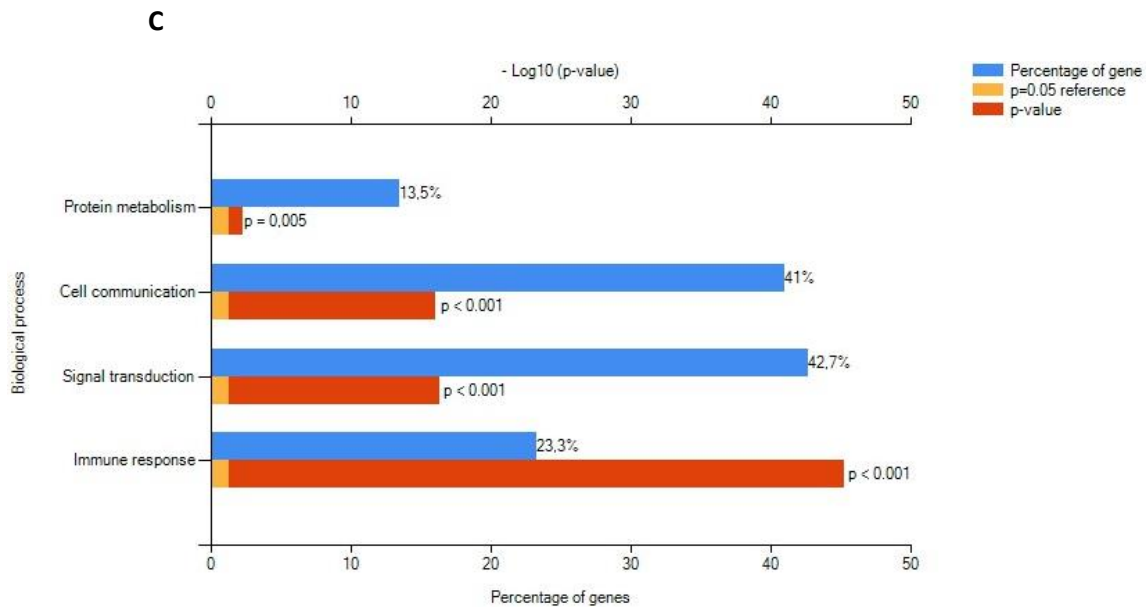
Anexo III. Estudo de Mohammad A. Anwar et al 2019. (A) Análise de enriquecimento dos componentes celulares. (B) Análise de enriquecimento das funções moleculares. (C) Análise de enriquecimento dos processos biológicos. (D) Análise de enriquecimento das vias biológicas. São mostrados gráficos de barras de termos enriquecidos nas listas de proteínas de entrada, onde a barra de cor azul demonstra a porcentagem da proteína envolvida no processo biológico correspondente, a barra de cor amarela corresponde o valor de p de referência ($p=0.05$) e a barra vermelha corresponde ao valor de p da proteína.



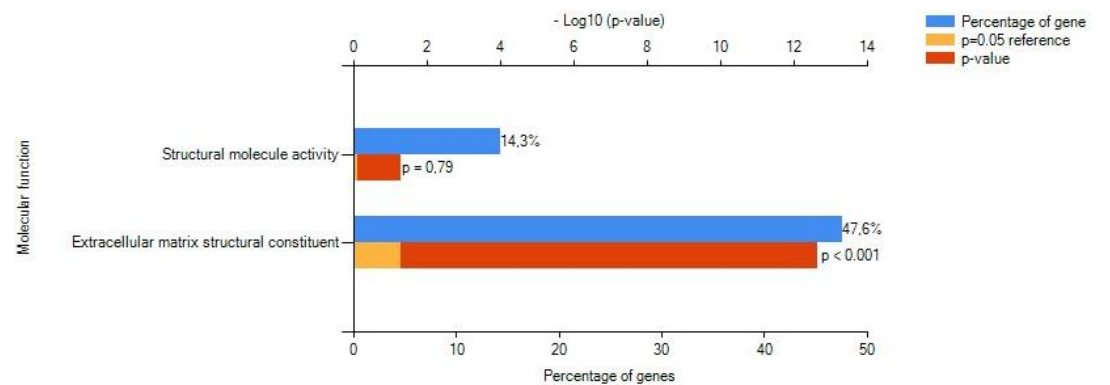
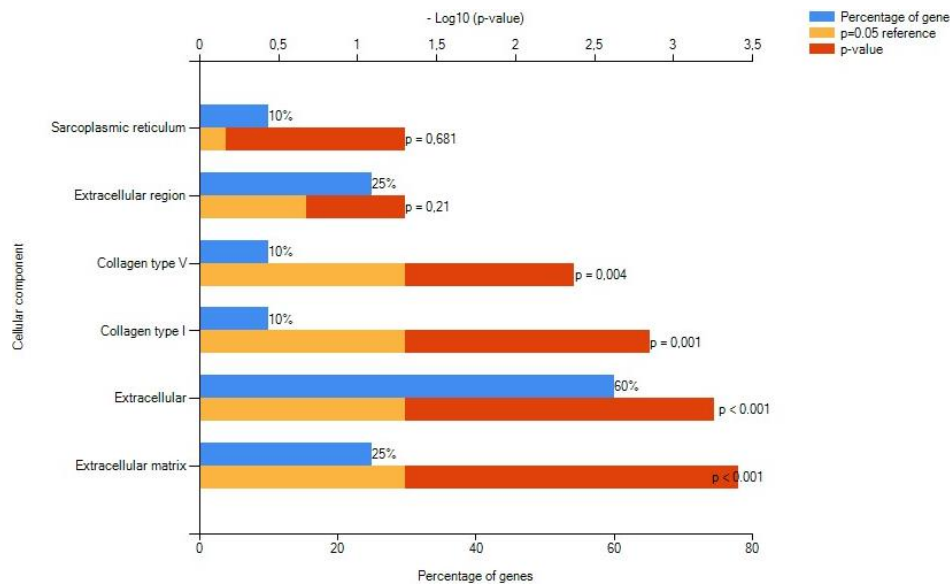


Anexo IV. Estudo de Michiel J. Bom et al 2018. (A) Análise de enriquecimento dos componentes celulares. (B) Análise de enriquecimento das funções moleculares. (C) Análise de enriquecimento dos processos biológicos. (D) Análise de enriquecimento das vias biológicas São mostrados gráficos de barras de termos enriquecidos nas listas de proteínas de entrada, onde a barra de cor azul demonstra a porcentagem da proteína envolvida no processo biológico correspondente, a barra de cor amarela corresponde o valor de p de referência (p=0.05) e a barra vermelha corresponde ao valor de p da proteína.

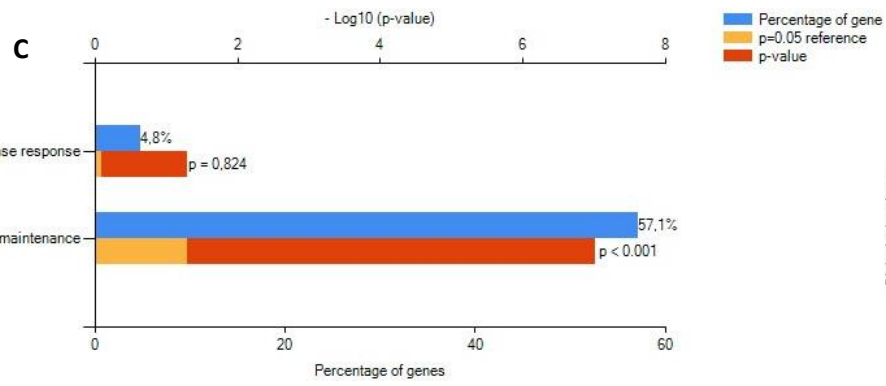




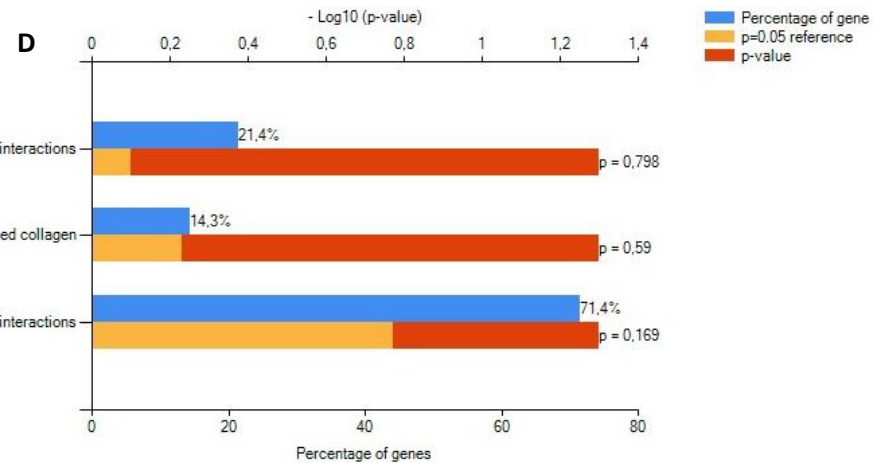
Anexo V. Estudo de Nay M. Htun et al 2017. (A) Análise de enriquecimento dos componentes celulares. (B) Análise de enriquecimento das funções moleculares. (C) Análise de enriquecimento dos processos biológicos. (D) Análise de enriquecimento das vias biológicas. São mostrados gráficos de barras de termos enriquecidos nas listas de proteínas de entrada, onde a barra de cor azul demonstra a porcentagem da proteína envolvida no processo biológico correspondente, a barra de cor amarela corresponde o valor de p de referência ($p=0.05$) e a barra vermelha corresponde ao valor de p da proteína.



Biological process



Biological pathway



Anexo VI. Características clínicas das amostras de urina usadas no estudo

ID	Idade	Género	Peso (kg)	Altura (m)	IMC (kg/m ²)	Tabagismo	Diabetes	Hipertensão	Dislipidemia
DAC_2	79	Masculino	80	1,66	29,03 (pré-obesidade)	Nunca_fumou	Não	Sim_tratado	Sim
DAC_6	59	Masculino	90	1,78	28,41 (pré-obesidade)	Ex-fumador>6 meses	Não	Sim_tratado	Sim
DAC_4	48	Masculino	71	1,73	23,72 (normal)	Nunca_fumou	Não	Sim_tratado	Sim
DAC_1	66	Masculino	52	1,54	21,93 (normal)	Ex-fumador>6 meses	Sim_ADO	Sim_tratado	Sim
DAC_3	71	Masculino	80	1,63	30,11 (obesidade_classe_I)	Ex-fumador>6 meses	Não	Sim_tratado	Sim
DAC_14	52	Masculino	100	1,75	32,65 (obesidade_classe_I)	Nunca_fumou	Não	Sim_tratado	Não
EAO_2	75	Masculino	112	1,67	40,16 (obesidade_classe_III)	Nunca_fumou	Não	Sim_tratado	Sim
EAO_3	70	Feminino	67	1,62	25,53 (pré-obesidade)	Nunca_fumou	Sim_ADO	Sim_tratado	Sim
EAO_5	77	Feminino	76	1,51	33,33 (obesidade_classe_I)	Nunca_fumou	Não	Sim_tratado	Sim
EAO_9	70	Feminino	69	1,65	25,34 (pré-obesidade)	Nunca_fumou	Não	Sim_tratado	Sim
EAO_11	69	Masculino	98	1,68	30 (obesidade_classe_I)	Nunca_fumou	Sim	Sim_tratado	Sim
EAO_13	70	Masculino	90	1,70	26 (pré-obesidade)	Nunca_fumou	Sim	Sim_tratado	Sim
CONT_28	57	Feminino	78,60	1,49	35,40 (obesidade_classe_I)	Nunca_fumou	Não	Sim_tratado	Sim
CONT_29	66	Masculino	78	1,59	30,85 (pré-obesidade)	Ex-fumador>6 meses	Não	Sim_tratado	Sim
CONT_31	63	Feminino	92	1,58	36,93 (obesidade_classe_I)	Ex-fumador>6 meses	Não	Sim_tratado	Sim
CONT_49	76	Masculino	71,30	1,60	27,85 (normal)	Nunca_fumou	Sim_ADO	Sim_tratado	Sim
CONT_52	76	Masculino	62	1,61	23,92 (baixo_peso)	Ex-fumador>6 meses	Sim_ADO	Sim_tratado	Sim
CONT_55	78	Masculino	64	1,60	20 (normal)	Nunca_fumou	Sim_ADO	Sim_tratado	Sim

Anexo VII. 3 principais estudos selecionados para a meta-análise (Tabela Suplementar 1)

Protein	Gene	Code	Percursor	Product	Frag	CE	ion	Pathology	System/Organ Affected or Disease Type	Subject	Sample	Cases	Controls	Age	Reference
Albumin	ALB GIG20 GIG42 PRO0903 PRO1708 PRO2044 PRO2619 PRO2675 UNQ696/PRO1341	P02768	575,3218	937,4832	100	13	y8	Coronary artery disease	Cardiovascular	Adults	Blood	70	45	mean 61.96 ± 3.21	Mohammad A. Anwar et al 2019
Apolipoprotein A-II precursor	APOA2	P02652	486,7641	443,2481	125	13	y8++	Coronary artery disease	Cardiovascular	Adults	Blood	70	45	mean 61.96 ± 3.27	Mohammad A. Anwar et al 2019
Apolipoprotein A-I	APOA1	P02647	405,886	572,8065	75	5	y10++	Coronary artery disease	Cardiovascular	Adults	Blood	70	45	mean 61.96 ± 3.33	Mohammad A. Anwar et al 2019
Haptoglobin beta chain	HBB	P68871	490,7617	562,2939	100	9	y5	Coronary artery disease	Cardiovascular	Adults	Blood	70	45	mean 61.96 ± 3.39	Mohammad A. Anwar et al 2019
Apolipoprotein C-II lipoprotein	APOC1	P02654	516,7746	466,2508	175	13	y9++	Coronary artery disease	Cardiovascular	Adults	Blood	70	45	mean 61.96 ± 3.45	Mohammad A. Anwar et al 2019
Transthyretin	TTR PALB	P02766	697,8254	606,3453	175	21	y6	Coronary artery disease	Cardiovascular	Adults	Blood	70	45	mean 61.96 ± 3.51	Mohammad A. Anwar et al 2019
Hemopexin	HPX	P02790	610,8172	480,2615	150	9	y9++	Coronary artery disease	Cardiovascular	Adults	Blood	70	45	mean 61.96 ± 3.57	Mohammad A. Anwar et al 2019
Fibrinogen gamma chain	FGG PRO2061	P02679	409,558	505,7957	75	5	y9++	Coronary artery disease	Cardiovascular	Adults	Blood	70	45	mean 61.96 ± 3.63	Mohammad A. Anwar et al 2019
Fibrinogen alpha chain	FGA	P02671	570,7908	610,3402	75	13	y5	Coronary artery disease	Cardiovascular	Adults	Blood	70	45	mean 61.96 ± 3.69	Mohammad A. Anwar et al 2019

Protein	Gene	Code	Pathology	System/Organ Affected or Disease Type	Subject	Sample	Cases	Controls	Age	Reference
2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial	DECR1 DECR SDR18C1	Q16698	Coronary artery disease	Cardiovascular	Adults	Blood	170	26	mean 58 ± 8 years	<i>Michiel J. Bom et al 2018</i>
A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 13	ADAMTS13 C9orf8 UNQ6102/PRO20085	Q76LX8	Coronary artery disease	Cardiovascular	Adults	Blood	170	26	mean 58 ± 8 years	<i>Michiel J. Bom et al 2018</i>
Adenosine Deaminase	ADA ADA1	P00813	Coronary artery disease	Cardiovascular	Adults	Blood	170	26	mean 58 ± 8 years	<i>Michiel J. Bom et al 2018</i>
ADM	ADM AM	P35318	Coronary artery disease	Cardiovascular	Adults	Blood	170	26	mean 58 ± 8 years	<i>Michiel J. Bom et al 2018</i>
Agouti-related protein	AGRP AGRT ART	O00253	Coronary artery disease	Cardiovascular	Adults	Blood	170	26	mean 58 ± 8 years	<i>Michiel J. Bom et al 2018</i>
Alpha-L-iduronidase	IDUA	P35475	Coronary artery disease	Cardiovascular	Adults	Blood	170	26	mean 58 ± 8 years	<i>Michiel J. Bom et al 2018</i>
Aminopeptidase N	ANPEP APN CD13 PEPN	P15144	Coronary artery disease	Cardiovascular	Adults	Blood	170	26	mean 58 ± 8 years	<i>Michiel J. Bom et al 2018</i>
Angiogenin	ANG RNASE5	P03950	Coronary artery disease	Cardiovascular	Adults	Blood	170	26	mean 58 ± 8 years	<i>Michiel J. Bom et al 2018</i>
Angiopoietin-1	ANGPT1 KIAA0003	Q15389	Coronary artery disease	Cardiovascular	Adults	Blood	170	26	mean 58 ± 8 years	<i>Michiel J. Bom et al 2018</i>
Angiopoietin-1 receptor	TEK TIE2 VMCM VMCM1	Q02763	Coronary artery disease	Cardiovascular	Adults	Blood	170	26	mean 58 ± 8 years	<i>Michiel J. Bom et al 2018</i>

Protein	Gene	Code	CAD 238	DE1	Pathology	System/Organ Affected or Disease Type	Subject	Sample	Cases	Controls	Age	Reference
Complement C3	C3 CPAMD1	P01024		1,23	Acute coronary syndrome	Cardiovascular	Adults	Urine	84	84	mean age 64 \pm 12 years	<i>Nay M. Htun et al 2017</i>
Fibrillin-1	FBN1	H0YND0	y	-1,06	Acute coronary syndrome	Cardiovascular	Adults	Urine	84	84	mean age 64 \pm 12 years	<i>Nay M. Htun et al 2017</i>
Forkhead box protein O1	FOXO1 FKHR FOXO1A	Q12778	y		Acute coronary syndrome	Cardiovascular	Adults	Urine	84	84	mean age 64 \pm 12 years	<i>Nay M. Htun et al 2017</i>
Hemoglobin subunit beta	HBB	P68871		1,14	Acute coronary syndrome	Cardiovascular	Adults	Urine	84	84	mean age 64 \pm 12 years	<i>Nay M. Htun et al 2017</i>
Keratin; type II cytoskeletal 1	KRT1 KRTA	P04264		-1,41	Acute coronary syndrome	Cardiovascular	Adults	Urine	84	84	mean age 64 \pm 12 years	<i>Nay M. Htun et al 2017</i>
Mucin-1 subunit alpha	MUC1 PUM	P15941		-1,09	Acute coronary syndrome	Cardiovascular	Adults	Urine	84	84	mean age 64 \pm 12 years	<i>Nay M. Htun et al 2017</i>
Mucin-3A	MUC3A MUC3	Q02505	y	1,19	Acute coronary syndrome	Cardiovascular	Adults	Urine	84	84	mean age 64 \pm 12 years	<i>Nay M. Htun et al 2017</i>
Protocadherin-12	PCDH12 UNQ395/PRO731	Q9NPG4		1,23	Acute coronary syndrome	Cardiovascular	Adults	Urine	84	84	mean age 64 \pm 12 years	<i>Nay M. Htun et al 2017</i>
Rhox homeobox family member 1	RHOXF1 OTEX PEPP1	Q8NHV9		1,16	Acute coronary syndrome	Cardiovascular	Adults	Urine	84	84	mean age 64 \pm 12 years	<i>Nay M. Htun et al 2017</i>
Sarcalumenin	SRL	Q86TD4		-1,19	Acute coronary syndrome	Cardiovascular	Adults	Urine	84	84	mean age 64 \pm 12 years	<i>Nay M. Htun et al 2017</i>

Anexo VIII. Resultado da análise proteômica urinária (Tabela Suplementar 2)

-LOG(P-value)	Protein IDs	Protein names	Gene names	Razor + unique peptides	Unique peptides	Sequence coverage [%]	Mol. weight [kDa]	Score	MS/MS count
0,15	O95497;Q9NY84	Pantetheinase	VNN1	10	10	29,6	57,011	136,48	43
0,31	I3L4J1;Q9UN37;Q6PIW4	Vacuolar protein sorting-associated protein 4A	VPS4A	7	3	14	48,07	13,982	19
0,01	P04004;H0YJW9	Vitronectin;Vitronectin V65 subunit;Vitronectin V10 subunit;Somatomedin-B	VTN	15	12	31,6	54,305	110,25	272
0,18	Q14508	WAP four-disulfide core domain protein 2	WFDC2	9	9	74,2	12,993	323,31	812
0,51	O76076	WNT1-inducible-signaling pathway protein 2	WISP2	5	5	29,2	26,825	62,201	15
0,34	Q96DA0	Zymogen granule protein 16 homolog B	ZG16B	6	6	44,2	22,739	155,34	178
0,30	P01594;P01593	Ig kappa chain V-I region AU;Ig kappa chain V-I region AG	P01594;P01593	2	2	34,2	12,848	55,614	117