UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas Programa de Pós-Graduação em Farmácia – Fisiopatologia e Toxicologia

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE microRNAs EXOSSOMAIS EM PORTADORES DE HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAL

Renata Caroline Costa de Freitas

Tese para obtenção do título de DOUTOR

Orientador: Prof. Titular Mario Hiroyuki Hirata

São Paulo 2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas Programa de Pós-Graduação em Farmácia – Fisiopatologia e Toxicologia

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE microRNAs EXOSSOMAIS EM PORTADORES DE HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAL

Renata Caroline Costa de Freitas

Versão Original

Tese para obtenção do título de DOUTOR

Orientador: Prof. Titular Mario Hiroyuki Hirata

São Paulo 2022 Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletronico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

> Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação: Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

F862a	Freitas, Renata Caroline Costa de Avaliação do perfil de microRNAs exossomais em portadores de hipercolesterolemia familial / Renata Caroline Costa de Freitas São Paulo, 2022. 144 p.
	Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia). Orientador: Hirata, Mario Hiroyuki
	 Hipercolesterolemia Familial. 2. exossomos. miRNAs. 4. proteínas. I. T. II. Hirata, Mario Hiroyuki , orientador.

Renata Caroline Costa de Freitas

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE microRNAs EXOSSOMAIS EM PORTADORES DE HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAL

Comissão Julgadora da Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata

Orientador/ Presidente

1° examinador

 2° examinador

3° examinador

4° examinador

São Paulo, _____de _____de 2022.

EPÍGRAFE

"Você nunca sabe a força que tem. Até que a sua única alternativa é ser forte."

Johnny Depp

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho primeiramente a **Deus** que é o autor da minha vida e por ter permitido que eu chegasse até aqui, sempre cuidando de mim e me protegendo como filha. Somente nEle por muitas vezes encontrei forças para vencer os desafios dessa jornada.

Aos meus pais, **Cristina e Carlos**, por sempre acreditarem e incentivarem os meus sonhos e escolhas. Sou grata a Deus pela vida deles. Eles são responsáveis pela pessoa que eu me tornei e eu sei que onde eu estiver, posso contar com eles. É sempre bom ter a certeza que não importa aonde eu vá, sempre tenho amor e aconchego quando volto para casa. Não tem sido um caminho fácil, mas meus pais estão sempre prontos para me encorajar. Eu amo vocês de todo meu coração!

Aos meus irmãos (**Leonardo e Eduardo**) e madrasta (**Cristhiane**) que se orgulham com as minhas conquistas e estiveram sempre juntos comigo durante essa jornada. Amo vocês!

Aos meus avós (*in memorian*) – **Vovô Gonçalo, Vovó Noemia, Vovô Antônio e Vovó Alzenir** – são a base da minha família e levamos os seus ensinamos por toda a vida e são responsáveis pelo que somos hoje. Agradeço a Deus por ter tido a honra de ter tido avós presentes e que cuidaram tão bem de mim.

Aos meus tios maternos (Fátima, Consuelo, Aurineide, Auricéia, Hugo, Eilson, Nadja) e meus primos maternos (Lara, Munique, Marilia, Cecília) e aos meus tios paternos (Wellington, Luziete) e meus primos paternos (Wallyson, Valéria, Patrícia, Priscila), que apesar da distância estão sempre presentes enviando amor e carinho. Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Prof. Mario Hiroyuki Hirata**, primeiro por ter aceitado o desafio de me orientar vindo de um outro centro de pesquisa. Agradeço a confiança que o senhor depositou em mim. Agradeço por todos os ensinamentos e conselhos que o senhor me deu durante esses anos juntos e principalmente pelo incentivo. O senhor é um grande incentivador dos seus alunos. Aprendi muito com o senhor durante todo esse tempo. Te admiro muito como profissional e como pessoa. Eu agradeço a Deus pela sua vida e por ter tido a sorte do senhor fazer parte da minha vida profissional e pessoal. Obrigada por tudo!

À **Prof. Rosario Dominguez Crespo Hirata** que tem sido importante e essencial para minha formação acadêmica, desde o mestrado e agora no doutorado. Além de todos os ensinamentos científicos, a senhora sempre esteve presente em todos os momentos dessa jornada, sempre dando conselhos e ajudando em tudo que fosse necessário. Sou grata a Deus por ter a senhora na minha vida. Muito obrigada por ter contribuído positivamente para o meu crescimento profissional e pessoal.

Aos meu orientador do mestrado **Prof. André Luchessi** e a **Profa Vivian Silbiger** por terem acreditado em mim e me incentivado a seguir na vida acadêmica, me enviando para um doutorado em outra região. Também gostaria de agradecer ao Prof. André pela ajuda com as análises de resultados indispensáveis para a finalização desse trabalho.

Ao **Raul Bortolin**, que esteve presente em todos os momentos dessa jornada e é um grande incentivador da minha carreira. Muito obrigada por todo apoio e por toda ajuda que você me deu durante todo esse período, tenho certeza de que foram essenciais para eu ter chegado aonde estou hoje. Agradeço a Deus pela sua vida. Gostaria ainda de agradecer a sua família (**Ricardo, Livia, Dona Pina, Pedro, Antônio e Ruan**) que me acolheram, cuidaram de mim e foram essenciais nessa jornada.

À equipe **Laboratório de Biologia Molecular Aplicado ao Diagnóstico (LBMAD)**, especialmente nossa técnica querida Cristina Fajardo, que sempre esteve disponível para ajudar quando precisei e me deu um enorme suporte e vários ensinamentos para o desenvolvimento dos experimentos desse estudo. Também gostaria de agradecer aos meus companheiros de laboratório que dividiram esses momentos comigo e tiveram muita importância nessa jornada: Bruna, Akira, Aécio, Carolina, Gláucio, Elisangela, Victor, Vanessa. À equipe que fazia parte do **Laboratório de Investigação Molecular em Cardiologia** (**LIMC**) do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC) durante a realização desse estudo, Gisele Medeiros Bastos, Jéssica Bassani Borges, Hui-Tzu Lin Wang, Adriana Regina Garófalo e Ana Cristina Fernandes Lopes, pela disponibilidade em ajudar e pelos ensinamentos durante esse período.

À equipe da Seção Médica de Dislipidemia do IDPC, Dr. André Arpad Faludi, Dr. Rodrigo Marques Gonçalves, Dra. Adriana Bertolami, Dr. Henri Zatz, Dr. Daniel Branco de Araujo, Lúcia, Maria e todos que ajudaram a nossa equipe no desenvolvimento desse projeto. Sem vocês não teria sido possível. Muito obrigada!

À **equipe da Farmácia** do IDPC, Dr. Ailton, Dra. Sandra, Dr. Thiago, que nos ajudaram com os medicamentos para o projeto wash-out e foram essenciais para que a execução desse projeto fosse possível. Muito obrigada!

Aos **voluntários da pesquisa**, pacientes e controles, que foram indispensáveis para a realização desse trabalho.

À equipe do "*Center for Interdisciplinary Cardiovascular Sciences* (CICS)", laboratório que realizei meu estágio BEPE. Agradeço especialmente aos coordenadores: Dra. Elena Aikawa, Dr. Masanori Aikawa, Dra. Sasha Singh. Agradeço a *Japanese Pharmaceutical Company Kowa*. Agradeço a todos que contribuíram para a realização do meu trabalho e que se tornaram amigos: Shio, Katie, Andrew, Tan, Sarvesh, Francesca, Jonas, Yoshikazu, Samantha, Johanna, Anna, Max, Mark, Takeshi, Takashi, Yoshihiro, Takehito, Mary, Jenny, Diego, Abhijeet, Raoni, Guilherme, Mandy, Casey.

Aos **meus amigos** por segurarem a minha mão com tanta força. Meus amigos de faculdade que estão comigo até hoje em todos os momentos (Geovana, Iago, Neto, Luciana, Kimênia e Elaine), meus amigos de longas conversas (Rachel e Thiago), meus amigos de Boston (Aldne, Ricardo, Cindy, Cirlene, Rafael e Tiago).

Ao **Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia) - USP** pela contribuição na minha formação profissional.

Este trabalho foi apoiado pelas seguintes agências de pesquisa brasileira: **FAPESP**, **CNPq** e a **CAPES**. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento

001". A autora foi financiada pela bolsa #2017/19043-2 e # 2019/22147-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

A todos estiveram na minha vida durante esses 4 anos e meio de doutorado. Todos contribuíram para a minha formação pessoal e profissional.

RESUMO

FREITAS, R. C. C. Avaliação do perfil de microRNAs exossomais em portadores de hipercolesterolemia familial. 2022. 144f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

A Hipercolesterolemia Familial (HF) é uma doença hereditária do metabolismo lipídico que causa aos portadores alta incidência de aterosclerose prematura. A HF pode ser diagnosticada clínica e geneticamente, entretanto, apenas cerca de 40% podem ter confirmados pelo diagnostico molecular. Assim, outros sistemas de diagnóstico devem ser avaliados. Ultimamente devido a estabilidade em fluidos biológicos, os exossomos circulantes apresentam grande potencial, pois carreiam um número variado de compostos e são considerados veículos de intercomunicação entre os tecidos. Sabe-se que vários RNAs são carreados nos exossomos, incluindo miRNAs, lncRNA e uma variedade de proteínas. Estes componentes podem ser marcadores de diagnóstico para várias doenças inclusive a HF e suas complicações cardiovasculares. Foram utilizadas amostras de exossomos plasmáticos provenientes de 54 pacientes HF sem uso de estatina por, no mínimo, seis semanas, e 38 indivíduos normolipidêmicos para sequenciamento de miRNAs e estudo da proteômica. Os exossomos foram isolados utilizando dois métodos – precipitação química e cromatográfica de exclusão de tamanho e caraterizados utilizando: dispersão de luz dinâmica, Western blotting, rastreamento de nanopartículas (NanoSight), imunomarcação e microscopia eletrônica de transmissão. Os miRNAs e proteínas foram extraídos dos exossomos e analisados por sequenciamento de nova geração e espectrometria de massa, respectivamente. Os dados clínicos, biodemográficos e laboratoriais dos pacientes HF e controles indicaram diferenças significativas esperadas entre os grupos, indicando que foram selecionados adequadamente. A caracterização físico-química dos exossomos mostrou resultados com tamanho de ~90nm e imunorreação positiva para tetraspaninas. O resultado do sequenciamento identificou acima 2000 miRNAs. Os miR-122-5p e miR-21-5p apresentaram expressão aumentada no grupo HF (log2FC=1,79 e log2FC=1,27, respectivamente), e o miR-122-5p pós normalização em relação ao controle manteve significativo comparados ao controle (p=0,034). A análise comparativa entre exossomos e plasma total mostrou diferença significativa, pois foram identificadas 239 proteínas (p <0,05) diferentes entre exossomos e plasma. Em exossomos, 17 proteínas foram aumentadas e 21 diminuídas em pacientes com HF em comparação com o controle (p <0,05). Destas, seis proteínas foram mais abundantes em HF e sete proteínas foram menos abundantes em exossomos de pacientes com HF em comparação com o controle. A análise de enriquecimento por bioinformática mostrou que a maior parte dessas moléculas (miRNAs e proteínas) foram relacionadas com metabolismo lipídico, dislipidemia, aterosclerose, doença arterial coronariana, adipogênese. Assim, na busca de novos alvos como potenciais biomarcadores de diagnóstico da HF, nossos resultados da análise integrativa entre os miRNAs e as proteínas exossomais abre novas frentes de pesquisa mais bem direcionadas, para a validação desses miRNAs e proteínas exossomais.

Palavras-chave: Hipercolesterolemia Familial, exossomos, miRNAs, proteínas, sequenciamento de nova geração, espectrometria de massa.

ABSTRACT

FREITAS, R. C. C. Evaluation of the profile of exosomal microRNAs in patients with familial hypercholesterolemia. 2022. 144f. Thesis (PhD) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2022.

Familial Hypercholesterolemia (FH) is an inherited disease of lipid metabolism that causes a high incidence of premature atherosclerosis in patients. FH can be diagnosed clinically and genetically, however, only about 40% can be confirmed by molecular diagnosis. Thus, other diagnostic systems should be evaluated. Lately, due to stability in biological fluids, circulating exosomes have great potential, as they carry a varied number of compounds and are considered vehicles of intercommunication between tissues. Several RNAs are known to be carried on exosomes, including miRNAs, lncRNA, and a variety of proteins. These components can be diagnostic markers for several diseases including FH and its cardiovascular complications. Plasma exosome samples from 54 FH patients without statin use for at least six weeks and 38 normolipidemic individuals were used for miRNA sequencing and proteomics studies. Exosomes were isolated using two methods - chemical precipitation and size exclusion chromatography and characterized using: dynamic light scattering, Western blotting, nanoparticle tracking (NanoSight), immunostaining and transmission electron microscopy. MiRNAs and proteins were extracted from exosomes and analyzed by next-generation sequencing and mass spectrometry, respectively. Clinical, biodemographic and laboratory data of FH patients and controls indicated significant expected differences between the groups, indicating that they were appropriately selected. The physicochemical characterization of exosomes showed results with a size of ~90nm and positive immunoreaction for tetraspanins. The sequencing result identified above 2000 miRNAs. miR-122-5p and miR-21-5p showed increased expression in the FH group (log2FC=1.79 and log2FC=1.27, respectively), and miR-122-5p after normalization in relation to the control remained significant compared to the control (p=0.034). The comparative analysis between exosomes and total plasma showed a significant difference, as 239 different proteins (p < 0.05) were identified between exosome and plasma. In exosomes, 17 proteins were increased and 21 decreased in FH patients compared to control (p < 0.05). Of these, six proteins were more abundant in FH and seven proteins were less abundant in exosomes from patients with FH compared to the control. Bioinformatics enrichment analysis showed that most of these molecules (miRNAs and proteins) were related

to lipid metabolism, dyslipidemia, atherosclerosis, coronary artery disease, adipogenesis. Thus, in the search for new targets as potential diagnostic biomarkers of FH, our results of the integrative analysis between miRNAs and exosomal proteins opens new and better-directed research fronts for the validation of these miRNAs and exosomal proteins.

Keywords: Familial hypercholesterolemia, exosomes, miRNAs, proteins, next-generation sequencing, mass spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição do tamanho dos exossomos plasmáticos por método de dispersão de luz
dinâmica55
Figura 2. Caracterização de exossomos plasmáticos por Western blotting
Figura 3. Distribuição do tamanho de exossomos plasmáticos por método de análise de
rastreamento de nanopartículas
Figura 4. Imagens representativas de exossomos obtidas usando a plataforma ExoView R100.
Figura 5. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) de exossomos com coloração negativa.
Figura 6. Perfil de uma biblioteca obtida por eletroforese capilar (Agilent 2200 TapeStation®)
Figura 7. Perfil de expressão de miRNAs de exossomos62
Figura 8. Perfil de expressão de miRNAs de exossomos entre pacientes HF+ e HF- comparado
ao controle
Figura 9. Caracterização de exossomos plasmáticos isolados por cromatografia de exclusão de
tamanho (SEC)
Figura 10. Análise proteômica comparando os exossomos e plasma total
Figura 11. Análise de enriquecimento diferencial de proteínas do plasma e exossomos em HF
versus controle
Figura 12. Proteínas (n = 18) em maior quantidade nos exossomos do que no plasma e
significativamente diferentes em quantidade entre pacientes com HF e controle71
Figura 13. Análise de enriquecimento usando as proteínas mais abundantes em exossomos e
correlacionadas com o perfil lipídico74
Figura 14. Análise integrativa do miR-122-5p e miR-21-5p e proteínas (MBL2, MASP1, CLU,
Apo F e Apo D) identificados em exossomos e analisados neste estudo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios diagnósticos de hipercolesterolemia familial (HF) segundo Dutch Lipid
Clinic Network (Dutch MEDPED) e adaptado da atualização da Diretriz Brasileira de
Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose
Tabela 2. Dados clínicos, biodemográficos e laboratoriais de pacientes HF e controles com
resultado do perfil de miRNA de exossomos51
Tabela 3. Variantes conhecidas em genes relacionados à HF considerados patogênicas ou
provavelmente patogênicas de acordo com a ACMG (n=13 pacientes)
Tabela 4. Dados clínicos, biodemográficos e laboratoriais dos pacientes com HF+ e HF53
Tabela 5. Dados demográficos, clínicos e laboratoriais dos pacientes com HF e controle
utilizados na análise proteômica54
Tabela 6. Quantificação de bibliotecas confeccionadas com as amostras de pacientes HF e
controles utilizadas no sequenciamento de miRNAs de exossomos58
Tabela 7. Parâmetros de qualidade da reação de sequenciamento. 60
Tabela 8. Análise de correlação de Spearman dos miRNAs diferentemente expressos nos
exossomos e o perfil lipídico63
Tabela 9. Análise de correlação de Spearman das proteínas com maior quantidade nos
exossomos e o perfil lipídico71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 3'UTR Região 3' Não Traduzida
- $\mu L Microlitro$
- AAT Aneurisma da aorta torácico
- ABC Cassete ligante de ATP
- ABCA1 Transportador de Cassete Ligante de ATP Subfamília A Membro 1
- ABCG5 Transportador de Cassete Ligante de ATP Subfamília G Membro 5
- ABCG8 Transportador de Cassete Ligante de ATP Subfamília G Membro 8
- ALT -Alanina Aminotransferase
- apoA1 Apolipoproteína A1 (forma proteica)
- APOB Apolipoproteína B (gene)
- Apo B Apolipoproteina B (forma proteica)
- Apo M Apolipoproteina M (forma proteica)
- ApN Hormônio adiponectina
- AR Artrite reumatoide
- AST Aspartato Aminotransferase
- CK Creatinocinase
- Coll1 colágeno 1
- CT Colesterol Sérico Total
- DAA Dissecção aguda da aorta
- DAC Doença Arterial Coronariana
- DAP Doença Arterial Periférica
- DCV Doenças Cardiovasculares
- DM Diabetes Melito

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

Dutch MEDPED - Dutch Lipid Clinic Network - Make Early Diagnosis to Prevent Early Deaths

- EDTA Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético EGF
- eNOS Óxido nítrico sintetase endotelial
- FCF Faculdade de Ciências Farmacêuticas
- HAS Hipertensão Arterial Sistêmica
- HbA1c- Hemoglobina Glicada
- HDL Lipoproteína de Alta Densidade
- HDL-c Colesterol da Lipoproteína de Alta Densidade
- HF Hipercolesterolemia Familial
- HIV Vírus da Imunodeficiência Humana
- HMGCR 3-hidroxi-3-methilglutaril-CoA Redutase
- HT1 Tampão de hibridização
- HUVECs Células endoteliais primárias da veia umbilical humana
- IAM Infarto Agudo do Miocárdio
- IDPC Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia
- kDa kiloDalton
- LDL Lipoproteína de Baixa Densidade
- LDL-c Colesterol da Lipoproteína de Baixa Densidade
- *LDLR* gene do Receptor de LDL
- LDLRAP1 -gene da Proteína Adaptadora do Receptor de LDL 1
- mg/dL miligrama por decilitro
- miRNAs microRNAs

mM - Milimolar

mRNA - RNA Mensageiro

N-Normal

- n Número
- NaOH Hidróxido de Sódio
- NCBI- Centro Nacional de Informação em Biotecnologia
- NGS Sequenciamento de nova geração
- nM-Nanomolar
- nm nanômetro
- NSTEMI Infarto do miocárdio sem alteração do segmento ST
- OMS Organização Mundial da Saúde
- p Valor de p
- pb Pares de Bases
- PCR Reação em Cadeia pela Polimerase
- PCRus -Proteína C Reativa Ultrassensível
- PCSK9 gene da Proteína Convertase Subtilisina/Kexina Tipo 9
- pH Potencial Hidrogeniônico
- pré-miRNA miRNA precursores
- pri-miRNAs Transcritos Primários dos miRNAs
- RNA Ácidos Ribonucleicos
- SAT Tecido adiposo subcutâneo
- SNP Polimorfismo de nucleotídeo único (Single Nucleotide Polymorphism)
- T4 livre Tiroxina Livre
- TG Triacilgliceróis

- TLR4 receptor-Toll-like 4
- Tris-HCl Tampão Tris-aminometano Ácido Clorídrico
- TSH -Hormônio Estimulador da Tireoide
- USP Universidade de São Paulo
- VLDL Lipoproteína de Muita Baixa Densidade

SUMÁRIO

1.	INT	roi	DUÇÃO	. 23
	1.1.	Hip	ercolesterolemia familial: epidemiologia e parâmetros clínicos	. 23
	1.2.	miF	RNA na hipercolesterolemia familial	. 26
	1.3.	miF	RNAs exossomais como potenciais biomarcadores	. 29
	1.4.	Pro	teínas em exossomos como potenciais biomarcadores	. 30
2.	OB.	JETI	IVOS	. 34
	2.1.	Obj	etivo Geral	. 34
	2.2.	Obj	etivos Específicos	. 34
3.	CA	SUÍS	TICA, MATERIAIS E MÉTODOS	. 36
	3.1.	Cas	uística	. 36
	3.2.	Asp	ectos éticos	. 38
	3.3.	Am	ostras biológicas e determinações laboratoriais	. 38
	3.4.	Seq	uenciamento de DNA - diagnóstico molecular de HF	. 39
	3.5.	Det	erminação do perfil de expressão global de miRNAs (miRNoma) de exossomos	. 40
	3.5.	1.	Isolamento de exossomos plasmáticos	. 40
	3.5.	2.	Caracterização de exossomos	. 40
	3.5.	3.	Extração de miRNAs de exossomos plasmáticos	. 43
	3.5.	4.	Sequenciamento de miRNAs de exossomos plasmáticos	. 43
	3.5.	5.	Análise dos dados de sequenciamento	. 45
	3.6.	Aná	ílise global das proteínas (proteômica)	. 45
	3.6.	1.	Isolamento de exossomos plasmáticos para análise de proteínas	. 45
	3.6.	2.	Caracterização de exossomos isolados por SEC	. 46
	3.6.	3.	Proteólise	. 46
	3.6.	4.	Espectrometria de massa	. 46
	3.6.	5.	Análise de dados proteômicos	. 47
	3.6.	6.	Análise de dados proteômicos	. 48
	3.7.	Aná	ílise Estatística	. 48
4.	RE	SUL	ΓΑΟΟ	. 51
	4.1.	Dac	los clínicos, biodemográficos e laboratoriais – Pacientes com estudo do miRNom	a51
	4.2.	Dia	gnóstico Molecular de HF	. 52
4.3. Dados clínicos, biodemográficos e laboratoriais de Pacientes que tiveram as amostras determinadas o perfil proteômico				
	4.4.	Per	fil de expressão global de miRNAs (miRNoma) em exossomos	. 55

4.4.2.	Sequenciamento de miRNAs de exossomos	58
4.4.3.	Perfil de expressão dos miRNA de exossomos em pacientes HF e controles	61
4.5. Pro	oteômica	64
4.5.1.	Caracterização de exossomos isolados por SEC	64
4.5.2.	Análise Proteômica	65
4.6. An	álise integrativa entre miRNAs e proteínas exossomais	75
5. DISCUS	SSÃO	78
REFERÊNC	IAS	87
DADOS SUI	PLEMENTARES	101
ANEXOS		117

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Hipercolesterolemia familial: epidemiologia e parâmetros clínicos

As dislipidemias são alterações funcionais que ocorrem em qualquer etapa do metabolismo lipídico, originando anormalidades nas concentrações de lipídios plasmático que incluem o aumento da concentração de colesterol total (CT), de colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-c) e de triacilgliceróis (TG) ou a diminuição do colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL-c) (FALUDI et al., 2017; MUTHUSAMY, 2016). As dislipidemias são um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de aterosclerose e, consequentemente, doenças cardiovasculares (DCV), as quais representam um sério problema de saúde pública global (FALUDI et al., 2017; MURPHY et al., 2017; WENGROFSKY; LEE; N. MAKARYUS, 2019).

As DCV no Brasil e no mundo são causadora de alta taxa de morbidade e mortalidade, atingindo cerca de 17,9 milhões de vidas a cada ano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022). Além disso, são responsáveis por uma notável redução na expectativa e qualidade de vida, com enormes custos pessoais e em alguns países aos sistemas de saúde (AMINI; ZAYERI; SALEHI, 2021; MALLINSON et al., 2021). Neste cenário, a detecção precoce e o tratamento adequado das dislipidemias são fundamentais para a prevenção correta e controle da progressão das DCV (MANSUR; FAVARATO, 2016; RAAL; HOVINGH; CATAPANO, 2018).

A Hipercolesterolemia Familial (HF) é uma dislipidemia primária considerada como problema de saúde mundial reconhecido pela Organização Mundial de Saúde desde 1997 (OMS, 1997). Caracterizada pelo aumento isolado de lipoproteína de baixa densidade (LDL), sendo associada com risco de desenvolvimento de eventos cardiovasculares prematuros (AKIOYAMEN et al., 2019; WILEMON et al., 2020). A prevalência geral da HF é atualmente desconhecida e geralmente é pouco diagnosticada e consequentemente pouco tratada em todo mundo (AMERIZADEH et al., 2021). Essa prevalência tem sido tradicionalmente estimada em 1:500 na forma heterozigota e 1:1.000.000 na forma homozigota, contudo, dados sugerem que a frequência global pode ser maior de 1:200 e 1:160.000, respectivamente, resultando em mais de 30 milhões de indivíduos afetados em todo mundo (AMERIZADEH et al., 2021; BRUNHAM; HEGELE, 2021; FUTEMA et al., 2017; NORDESTGAARD; BENN, 2017). No Brasil, menos de 1% destes foram diagnosticados e tratados adequadamente (JANNES et al., 2015; SILVA et al., 2022).

A alta incidência de aterosclerose prematura é uma característica da HF e o início dos sintomas coronários pode ocorrer na infância (no homozigotos) ou no início da idade adulta (no

heterozigotos), o que reduz a expectativa de vida de portadores de HF (PEDERIVA et al., 2021). A HF não tratada aumenta 13 vezes o risco de aterosclerose precoce (BIANCONI; BANACH; PIRRO, 2021). O risco de um indivíduo com HF na forma heterozigótica sem tratamento de desenvolver doença arterial coronariana (DAC) ou ir a óbito chega a 50% nos homens e 12% nas mulheres aos 50 anos de idade. Em relação a forma homozigota, quando não tratados, geralmente a sobrevivência não ultrapassa 30 anos de idade (SANTOS et al., 2012; SHARIFI et al., 2019; VALLEJO-VAZ et al., 2015).

A HF pode ser diagnosticada fenotipicamente pelos dados clínicos e laboratoriais, e geneticamente nos países onde se estabelece como diretriz. No diagnóstico fenotípico de HF é considerado a concentração elevada de LDL-c (≥ 190 mg/dL em adultos), a história familiar de dislipidemias ou DAC precoces, além da presença de sinais clínicos, como xantomas tendinosos e arco córneo (AMERIZADEH et al., 2021; SANTOS et al., 2012). No entanto, nem todos os pacientes com HF apresenta suspeita clínica, que possa indicar necessidade de consulta médica, dificultando o diagnóstico e tratamento precoce da HF (MYTILINAIOU et al., 2018).

O diagnóstico fenotípico de HF pode ser confirmado por testes genéticos. Nesse contexto, duas formas de heranças foram relatadas: autossômica dominante e autossômica recessiva. A grande maioria dos casos tem o padrão de herança autossômica dominante com 90% de penetrância (MEHTA et al., 2016; SINGH; BITTNER, 2015). O diagnóstico genético é muito importante na HF, pois pacientes com antecedentes genéticos para HF apresentam risco consideravelmente maior de DAC, em comparação com aqueles com causa idiopática ou secundária para HF, e podem ser tratados de forma mais rigorosa (KHERA et al., 2016; ZUURBIER; DEFESCHE; WIEGMAN, 2021).

A HF autossômica dominante geralmente resulta de uma mutação no gene do receptor de LDL (*LDLR*) que leva a perda de função da proteína ou, menos comum, pelas mutações no gene *APOB*, que resultam em perda de função por reduzir a ligação de lipoproteínas contendo Apo B ao receptor de LDL ou uma mutação no gene que codifica a proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9 (*PCSK9*) que leva ganho de função da proteína PCSK9 (SARRAJU; KNOWLES, 2019).

As variantes que podem ocorrer no *LDLR* afetam em diferentes etapas da captação da LDL e, portanto, se classificam segundo o fenótipo como: classe 1 - síntese nula de proteína; classe 2 – retenção parcial ou total do receptor no retículo endoplasmático; classe 3 - defeito de ligação a Apo B; classe 4 - endocitose prejudicada; classe 5 - afetam o mecanismo de reciclagem

do receptor. Variantes no gene da *APOB* patogênicas comprometem a ligação com o LDLR, resultando no aumento de LDL circulante. As variantes no gene da *PCSK9* podem levar a perda de função proteica ou ganho de função. As variantes de ganho de função estão associadas ao aumento plasmático do LDL-c, em consequência do aumento da degradação do LDLR extracelularmente, por aumento da afinidade da PCSK9 ao receptor ou intracelularmente, enquanto é transportado para a membrana, levando a uma redução da expressão de LDLR resultando no acúmulo de LDL no plasma (BENITO-VICENTE et al., 2018).

As formas autossômicas recessivas de HF são mais raras, podem ser causadas por mutações no gene que codifica a proteína adaptadora do receptor da LDL Tipo 1 (*LDLRAP1*) (NAJAM; RAY, 2015). A proteína adaptadora é responsável pela associação de receptores de LDL nas depressões revestidas com clatrinas, sendo necessária para a endocitose eficiente do LDLR nas células (como hepatócitos e linfócitos). Variantes no gene da *LDLRAP1* levam a produção de proteína com a perda de função causando o aumento do LDL-c (BRAUTBAR et al., 2015; FALUDI et al., 2017). Além disso, mutações nos genes *ABCG5* e *ABCG8* que codificam proteínas transportadoras da família ABC (*ATP binding cassete*) causam sitosterolemia, uma outra forma de HF recessiva, caracterizada pelo aumento plasmático das concentrações de esteróis de plantas, como sitosterol e campesterol, provenientes da dieta (LAMIQUIZ-MONEO et al., 2017; ZUURBIER; DEFESCHE; WIEGMAN, 2021).

É importante destacar que as variantes genéticas explicam somente cerca de 60% da herdabilidade da dislipidemia e da doença cardiovascular (DCV). Nesse contexto, estudos sugerem que modificações epigenéticas podem contribuir para explicar os demais 40% da herdabilidade (BERBERICH; HEGELE, 2019; FRAHNOW et al., 2017; GUAY et al., 2014, 2015; MOMTAZI et al., 2018; TADA; KAWASHIRI; YAMAGISHI, 2017).

As modificações epigenéticas têm um papel crucial na regulação da expressão gênica, integridade genômica e desenvolvimento evolutivo. Consistem em alterações herdáveis e reversíveis que ocorrem através de mecanismos moleculares independentes da sequência de DNA, como a metilação do DNA e os RNAs não codificantes (microRNAs, RNAS longos não codificantes e RNAs circulares) (HULSHOFF et al., 2018; LOWDON; JANG; WANG, 2016; ZHANG; LU; CHANG, 2020).

Os microRNAs (miRNAs) tem emergido como potenciais moléculas que interferem no processo pós transcricional que podem contribuir na elucidação dos mecanismos fisiopatológicos da HF e de suas complicações.

1.2. miRNA na hipercolesterolemia familial

A concentração do colesterol celular e plasmático são mantidos através de mecanismos bem controlados, que regulam a expressão e atividade de principais genes envolvidos no seu metabolismo tanto a nível transcricional como pós-transcricional. O fato da sequência de genes envolvidos diretamente na homeostase do colesterol explicar somente parte do mecanismo molecular, tem que observado que o mecanismo de controle tem grande importância, na expressão final da proteína, o que também não se pode explicar pela expressão genica. Atualmente, o mecanismo pós-transcricional tem mostrado um fator importante na síntese final das proteínas. Os principais mecanismos controladores desta etapa molecular estão envolvidos os RNAs não codificantes, incluindo miRNA, lcnRNA e RNA circulares. Portanto, torna importante o conhecimento mais aprofundado destes reguladores e assim associar com as alterações no metabolismo do colesterol e da homeostase lipídica (CITRIN; FERNÁNDEZ-HERNANDO; SUÁREZ, 2021; PRICE; FERNÁNDEZ-HERNANDO, 2017).

Os miRNAs têm sido considerado importantes reguladores de genes que codificam as proteínas da homeostase do colesterol, tais como *SREBP1 e 2, ABCA1, LDLR, HMGCR e Apo A1*, e sua expressão alterada está altamente associada a distúrbios metabólicos, como a dislipidemia (JEON; OSBORNE, 2016; ROTTIERS; NÄÄR, 2012). Além disso, tem sido discutido seu papel como importantes reguladores da concentração das lipoproteínas circulantes, controlando o LDL-c através da regulação pós-transcricional de genes envolvidos na secreção de VLDL, biossíntese do colesterol e expressão do LDLR hepático (GOEDEKE et al., 2016). Há evidências que mostram que os miRNAs podem regular a expressão pós-transcricional de genes envolvidos na patogênese da HF, incluindo *LDLR, APOB, PCSK9* e *LDLRAP1*. Além disso, alguns miRNAs foram associados com concentrações anormais de lipídeos e lipoproteínas no plasma de humano (MOMTAZI et al., 2018).

Os miRNAs constituem uma família de pequenos RNAs não-codificadores, os quais são compostas por cerca de 22 nucleotídeos, que foram descobertos pela primeira vez em *Caenorhabditis elegans* no início da década de 1990 (LEE; FEINBAUM; AMBROS, 1993). Os miRNAs interagem principalmente com sequências complementares nas regiões 3' não traduzidas (3' UTR – 3' *untranslated region*) dos RNAs mensageiros (mRNAs) alvo e alteram a expressão de genes a nível pós-transcricional através da inibição da tradução ou induzindo a degradação do mRNA. Na última década, baseado no fato de mais de 90% do genoma humano

conter RNAs não-codificantes, que podem afetar outras sequências codificadoras do genoma, os miRNAs tem ainda sido mostrados como potenciais biomarcadores para o diagnóstico, terapia e monitoramento (GEBERT; MACRAE, 2019; VOSSEN et al., 2017; ZHOU et al., 2018).

A transcrição de miRNAs das suas sequências genômicas é controlada pelo complexo de RNA polimerase II e por fatores de transcrição presentes no núcleo (LUO; YANG; NATTEL, 2015). Os nucleotídeos dos transcritos primários dos miRNAs (pri-miRNAs) formam estruturas secundárias como as regiões "*stem*", em que dois segmentos de RNA com bases complementares são pareados, e as regiões "*loop*", nas quais os pares de bases não são complementares, constituindo, assim, alças circulares (*stem-loop*). Três tipos de miRNAs podem ser identificados de acordo com a localização genômica das suas sequências primárias de codificação: miRNAs intergênicos, miRNAs intrônicos e miRNAs exônicos. Os miRNAs intergênicos tem seus próprios promotores para a transcrição direta das suas sequências de primiRNA, a transcrição de miRNAs intrônicos e exônicos é regulada pelos promotores dos seus genes hospedeiros (BEREZIKOV, 2011; LUO; YANG; NATTEL, 2015).

No núcleo, os pri-miRNAs são processados por clivagem endonucleolítica gerando estruturas designadas como miRNA precursores (pré-miRNA). O processamento dos prémiRNAs para sequências de miRNAs intergênica é mediado pela ribonuclease 3 (uma RNase tipo III, chamada de Drosha), já o processamento de miRNAs intrônicos e exônicos geralmente requer a modulação adicional por *splicing*. Um subtipo de miRNAs intrônicos, chamado 'mirtron', produz seus pré-miRNAs de uma maneira independente de *Drosha* usando apenas o *splicing* (BEREZIKOV, 2011). O pré-miRNA gerado é exportado para o citoplasma por meio da proteína transportadora exportina-5 (BRONZE-DA-ROCHA, 2014; DANGWAL; THUM, 2012; LUO; YANG; NATTEL, 2015).

No citoplasma, os pré-miRNAs são processados pelo complexo enzimático Dicer (RNase tipo III), que remove a alça na estrutura *stem-loop*, resultando na formação de um duplex de miRNA. Este dúplex de miRNA é incorporado ao Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (RISC), no qual as duas fitas de miRNA são separadas. Uma destas fitas permanece associada ao RISC e constitui o miRNA maduro, ao passo que a fita complementar pode sofrer degradação (BRONZE-DA-ROCHA, 2014; DANGWAL; THUM, 2012; LUO; YANG; NATTEL, 2015).

Os miRNAs maduros são críticos para o desenvolvimento normal dos animais e atuam regulando uma variedade de processos biológicos, como apoptose, proliferação e diferenciação. A desregulação da expressão do miRNA geralmente resulta em comprometimento da função celular e na progressão da doença (GEBERT; MACRAE, 2019; O'BRIEN et al., 2018). miRNAs reconhecem e direcionam múltiplos mRNAs; portanto, investigar a desregulação do miRNA é uma estratégia indispensável para entender as condições patológicas e identificar novos alvos terapêuticos (GHANBARIAN; YILDIZ; TUTAR, 2022).

Na hipercolesterolemia observou-se que as concentrações plasmáticas do miR-33a, miR-33b e miR-200c em crianças portadoras da doença apresentavam maiores em comparação com crianças saudáveis (D'AGOSTINO et al., 2017; MARTINO et al., 2015). Recentemente, o miR-200c também foi descrito como significantemente aumentado, juntamente com outros oito miRNAs (miR-130b, miR-133a, miR-142-3p, miR-324-5p, miR-339-3p, miR-425-5p, miR-660 e miR-744), no plasma de pacientes heterozigotos com HF que tiveram um evento cardiovascular dentro de 8 anos de acompanhamento em comparação com seus parentes não-FH sem evento cardiovascular. Outro estudo mostrou a associação do SNP *LDLR* c.*52G>A, localizado na região de interação com miRNAs reguladores, com hipercolesterolemia na população brasileira (ZAMBRANO et al., 2015).

Apesar de alguns estudos já terem relacionado os miRNAs com a regulação da hipercolesterolemia familial e das doenças cardiovasculares, muitos mecanismos ainda não foram esclarecidos.

A associação de miRNAs com doenças cardiovasculares foi descrita recentemente em uma revisão que mostrou os miRNAs como potenciais biomarcadores para diagnóstico e prognóstico e como potenciais alvos terapêuticos, pois estão envolvidos no desenvolvimento de DCV em várias etapas, como aterogênese, angiogênese, inflamação, ativação e agregação plaquetária, metabolismo lipídico (DOROBANTU; SIMIONESCU; POPA-FOTEA, 2021). O miR-214 tem surgido como um potencial biomarcador diagnóstico de DAC (AMIN; TREVELYAN; TURNER, 2021). O miR-29 tem demonstrado relação com DCV pois está envolvido na regulação da aterosclerose, sendo um potencial alvo terapêutico (LIU et al., 2021).

Os miRNAs extracelulares são transportados no plasma de diferentes formas, incluindo os exossomos, micropartículas, corpos apoptóticos, proteínas de ligação a RNA, LDL e HDL (BOON; VICKERS, 2013; XU; YANG; AI, 2013). Na HF, apesar do perfil de expressão de miRNAs na HDL (VICKERS et al., 2011), bem como em exossomos (DE GONZALO-CALVO

et al., 2017) terem sido mostrado, evidências têm sugerido que o perfil de expressão de miRNA de exossomos, da HDL e da LDL são distintos (BOON; VICKERS, 2013; VICKERS et al., 2011), emergindo a necessidade de novos estudos para uma melhor esclarecer as possíveis influências dos miRNAs e os mecanismos envolvidos. Sendo assim, é possível que os miRNAs possam ser potenciais biomarcadores de HF e doenças cardiovasculares, bem como serem alvos para o desenvolvimento de novos de fármacos ao se conhecer sua atividade funcional.

1.3. miRNAs exossomais como potenciais biomarcadores

Exossomos são vesículas membranosas que possuem em torno de 30 a 150 nm de diâmetro de origem endocítica, liberadas por uma variedade de células para o espaço extracelular (SANZ-RUBIO et al., 2018), sendo encontrado também em diferentes fluidos corporais como, plasma sanguíneo, urina, saliva, leite materno, lavado bronquial, fluido cerebral, fluido amniótico (KALLURI; LEBLEU, 2020). Nos últimos anos, os exossomos emergiram como estruturas importantes para a comunicação intercelular fisiologicamente e também importantes conexões na fisiopatologia de várias doenças, como na HF (DE GONZALO-CALVO et al., 2017), nas DCV (CHEN et al., 2020; LIANG et al., 2020), na resposta imune (WANG; CAO; YANG, 2020), na função neuronal (JANAS et al., 2016), no desenvolvimento e progressão de doenças hepáticas (SHEN et al., 2020), em doenças neurodegenerativas (HOWITT; HILL, 2016) e no câncer (KOK; YU, 2020).

Sabe-se que os exossomos transportam diferentes ácidos nucléicos, incluindo miRNAs, que regulam o crescimento celular e o metabolismo pela inibição pós-transcricional da expressão gênica, pois atuam como "mensageiros intercelulares", transferindo informação e sinais entre células (PEGTEL; GOULD, 2019).

Os miRNAs são incorporados seletivamente em corpos multivesiculares (exossomos), que se fundem com a membrana plasmática, sendo secretado como vesículas para o meio extracelular. Assim, os exossomos secretados podem atuar por três mecanismos para comunicação celular: internalização pelas células, fusão direta com a membrana plasmática e interação receptor-ligante. Todas as vias resultam no influxo do miRNA exossomal ao citoplasma da célula alvo onde irá associar-se e silenciar um mRNA alvo (HENNING, 2021; HESSVIK; LLORENTE, 2018). Os miRNAs incorporados nestas vesículas estão bem protegidos contra a degradação, realçando assim, o potencial papel dos miRNAs exossomais como biomarcadores (SATO et al., 2016). Os miRNAs exossomais têm sido associados a promoção do silenciamento gênico similar aos miRNAs celulares e ainda intensificam evidências de que o envelopamento do miRNA exossomal ocorre de forma não randômica, baseado na expressão diferencial do miRNA exossomal comparado ao de células doadoras (VALADI et al., 2007; ZHANG et al., 2015).

Os exossomos de células cardíacas transportam proteínas, mRNA e microRNAs para outras células durante o processo fisiológico e patológico. Os miRNAs de exossomos cardíacos específicos podem regular a expressão de genes sarcoméricos, genes de canais iônicos, autofagia, atividade antiapoptótica e antifibrótica e angiogênese (HENNING, 2021). Recentemente, um estudo associou alguns miRNAs exossomais com DAC usando o sequenciamento. Eles identificaram oito miRNAs exossomais com expressão alterada em pacientes com DAC, destes quatro estavam aumentados (miR-382-3p, miR-432-5p, miR-200a-3p e miR-3613-3p) e quatro diminuídos (miR-125a-5p, miR-185-5p, miR-151a-3p e miRNA-328-3p) nesses pacientes quando comparado com pacientes sem DAC (CHANG et al., 2021).

Na HF, poucos estudos têm se atentando em avaliar o perfil de expressão de miRNAs exossomais. No entanto, apesar de poucas evidências, os miRNAs exossomais tem sido descrito como potenciais biomarcadores de diagnóstico de aterosclerose coronariana decorrente da HF. Dentre os miRNAs estudados, o miR-24-3p e miR-130a-3p foram mostrados ser pouco expressos em exossomos derivados de células da musculatura lisa de artéria coronárias após exposição a lipoproteínas aterogênicas e em exossomos circulantes de pacientes com HF. Assim sugerindo que a carga de miRNA transmitida em microvesículas é alterada após a exposição a lipoproteínas aterogênicas e essas alterações são refletidas em pacientes com HF (DE GONZALO-CALVO et al., 2017).

A detecção quantitativa desses miRNAs pode ser feita utilizando abordagem da PCR em tempo real, microarranjo ou sequenciamento de nova geração (NGS). Essa última, tem sido considerada o padrão-ouro para identificação do perfil de ácido nucleico, incluindo miRNAs, pois tem a capacidade de identificar moléculas com maior sensibilidade, especificidade e capazes de detectar doenças. Assim, o NGS tem sido aplicado na identificação de biomarcadores em várias doenças (POTLA; ALI; KAPOOR, 2021)

1.4. Proteínas em exossomos como potenciais biomarcadores

Particularmente, muitos estudos vêm destacando a importância e as vantagens da proteômica, pois um dos mecanismos pelos quais o miRNA regula a expressão gênica é pela repressão da tradução sem degradação do mRNA (CHOI et al., 2019; EIRIN et al., 2017; SAMOIL et al., 2018). Além disso, a discordância entre meias-vidas de mRNAs e proteínas adiciona outro nível de complexidade para tirar conclusões sobre o proteoma a partir da análise do transcriptoma. Este problema pode ser resolvido usando abordagens proteômicas baseadas em espectrometria de massa em vesículas extracelulares que permitem estudar o complemento protéico das células de forma mais direta (HUANG; PINTO; PANDEY, 2013). A análise proteômica por espectrometria de massa permite avaliar um espectro bem amplo de proteínas aumentando a possibilidade de descoberta de proteínas diferencialmente expressos em situações fisiopatológicas especificas, e favorecer descrição de novos biomarcadores diagnósticos em doenças metabólicas e cardiovasculares (FIGUEIREDO et al., 2015; ITOU et al., 2014).

A ligação entre proteínas exossomais e HF com aterosclerose associada foi descrita em um estudo, que mostrou que pacientes com HF com placas ateroscleróticas ricas em lipídios têm maior abundância de CD45/CD3 provenientes de exossomos do que aqueles em pacientes com placas fibrosas (SUADES et al., 2014)

A proteômica baseada em espectrometria de massa permitiu a identificação de vários componentes centrais da via canônica de processamento de miRNA e suas modificações póstraducionais que são fundamentais nos mecanismos regulatórios de miRNA. O uso de estratégias proteômicas quantitativas também surgiu como uma técnica chave para identificação experimental de miRNAs alvos, permitindo a determinação direta de proteínas cujas concentrações são alteradas devido à supressão da tradução. A grande maioria dos experimentos proteômicos na pesquisa de miRNA empregaram abordagens proteômicas quantitativas baseadas em espectrometria de massa. A proteômica quantitativa surgiu como uma ferramenta promissora para identificar proteínas diferencialmente expressas em vários processos biológicos. (HUANG; PINTO; PANDEY, 2013).

Com já citado, os exossomos também podem carregar proteínas e transferir essas moléculas entre as células (DE FREITAS et al., 2021). A importância do estudo da composição dos exossomos em várias doenças está relacionada a seu papel na fisiopatologia das mesmas e o seu conteúdo poder revelar sua função e consequentemente representar um biomarcador específico que podem refletir especificamente o fenótipo das células-mãe. Atualmente,

proteínas, miRNAs, mRNAs e metabólitos (ácidos orgânicos e seus derivados, nucleotídeos, açúcares e derivados, carnitinas, vitamina B/metabólitos relacionados e aminas) já foram identificados em exossomos purificados de diferentes tipos celulares e fluidos biológicos. Assim, exossomos e seus componentes podem ser investigados para fins de diagnóstico, pois são secretados na corrente sanguínea (SMOLARZ et al., 2019). Portanto, considerando que proteínas de exossomos de origem diferente incluem um conjunto comum de proteínas de membrana e citossólicas, e subconjuntos específicos de proteínas, provavelmente correlacionadas a funções de cada tipo de célula, e podem estar envolvidos em diversas doenças humanas.

As abordagens multiômicas e a construção de redes a partir desses dados podem ajudar no enriquecimento das análises dos resultados obtidos (JOSHI et al., 2021). Assim, as alterações no perfil de miRNAs analisados por sequenciamento e na abundância de proteínas identificadas por espectrometria de massas entre pacientes HF e indivíduos normolipidêmicos pode auxiliar não apenas na compreensão de seus papéis biológicos, mas também no fornecimento de novos biomarcadores e alvos moleculares na busca de novas abordagens terapêuticas.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Identificar novos alvos moleculares baseado no perfil de expressão global de miRNAs (miRNoma) e abundância de proteínas (proteômica) em exossomos plasmáticos de pacientes com hipercolesterolemia familial.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o perfil de miRNAs em exossomos plasmáticos de pacientes com HF e indivíduos normolipidêmicos por sequenciamento;
- Avaliar a abundância de proteínas em exossomos plasmáticos de pacientes com HF e indivíduos normolipidêmicos por espectroscopia de massa;
- Realizar uma análise integrativa dos miRNAs diferentemente expressos e as proteínas mais abundantes em pacientes com HF;
- Buscar nos alvos com potencialidade de utilização como biomarcadores moleculares da HF e suas complicações cardiovasculares.

CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

3. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Casuística

O presente estudo faz parte do projeto temático intitulado "Caracterização genética, epigenética e farmacogenética de pacientes portadores de hipercolesterolemia familial na população brasileira", sob a coordenação do Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata, concedido pela FAPESP em 1º de março de 2018 (processo nº 2016/12899-6).

Todos os pacientes requeridos no estudo foram recrutados, com diagnóstico fenotípico de HF, segundo o critério Dutch Lipid Clinic Network (Dutch-MEDPED) (Tabela 1), definidos na I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar (HF) (SANTOS et al., 2012) e na Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (FALUDI et al., 2017). Os pacientes foram provenientes da Seção Médica de Dislipidemia do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC), do Programa Hipercol Brasil do Instituto do Coração (INCOR) da Faculdade de Medicina da USP (FM-USP) e da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

Tabela 1. Critérios diagnósticos de hipercolesterolemia familial (HF) segundo Dutch Lipid Clinic Network (Dutch MEDPED) e adaptado da atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose.

Parâmetros	Critérios	Pontos
História familiar de HF	Parente de primeiro grau com doença vascular ou	1
	coronariana precoce (homem <55 anos, mulher <60	
	anos); OU	
	Parente adulto com colesterol total >290 mg/dL;	1
	Parente de 1º grau portador de xantoma tendinoso e/ou	2
	arco corneano; OU	
	Parente de 1º grau com menos de 16 anos e colesterol	2
	total >260 mg/dL	
História clínica	Paciente portador de doença coronária prematura	2
	(homem <55 anos, mulher <60 anos)	
	Paciente portador de doença arterial cerebral ou	1
	periférica prematura (homem <55 anos, mulher <60	
	anos)	
Exame físico	Xantoma tendíneo	6
-------------------	--	-----
	Arco corneano antes dos 45 anos.	4
LDL-c, mg/dL	≥ 330	8
	250-329	5
	190-249	3
	155-189	1
Análise do DNA	Presença de mutação funcional nos genes LDLR, APOB	8
	ou PCSK9	
Diagnóstico de HF	Certeza	>8
	Provável	6-8
	Possível	3-5

Fonte: Retirado e adaptado da atualização da diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose (FALUDI et al., 2017).

Destes pacientes HF recrutados, 240 tiveram suas amostras de DNA sequenciadas utilizando a plataforma *MiSeq System* (Illumina, Inc. San Diego, EUA) disponível no Laboratório de Investigação Molecular em Cardiologia do IDPC e na Centro de Tecnologias OMICAS da FCF-USP <u>http://www.fcf.usp.br/arquivos/Facilities.php</u>.

Os dados de sequenciamento categorizaram os pacientes em portadores de variantes funcionais e/ou descritas na literatura como patogênicas nos três principais genes (*LDLR*, *APOB* e *PCSK9*) relacionados com a fisiopatologia da HF (pacientes com diagnóstico molecular) e aqueles que não possuem essas variantes (sem diagnóstico molecular).

Destes pacientes genotipicamente conhecidos selecionou-se 54 pacientes, de ambos os gêneros. Esses pacientes não estavam em uso de estatina por no mínimo seis semanas ou foram voluntários ao protocolo no qual o uso deste medicamento foi interrompido por um período mínimo de seis semanas (*wash-out*). Para participação no *wash-out*, além dos critérios acima citados, os pacientes incluídos são de prevenção primária, maiores de 18 anos e selecionados juntamente com um cardiologista do IDPC. Além disso, também foram recrutados 38 indivíduos normolipêmicos (NL, sem diagnóstico clínico de dislipidemia) para comporem o grupo controle deste estudo.

Em função de serem selecionadas previamente amostras por características fenotípica e pelo desconhecimento do perfil epigenético dos hipercolesterolêmicos nas diversas populações, optou-se neste estudo pela obtenção de amostragem de conveniência, ou seja, foram incluídos todos os pacientes que atenderem aos critérios aqui descritos e que aceitaram participar, dentro do período de inclusão do projeto.

Para a análise proteômica, foram selecionados 13 pacientes HF e 7 controles que também foram utilizados na análise de miRNAs.

Não foram incluídos indivíduos que se recusaram a participar do estudo, que desistiram de participar em qualquer momento do estudo, e/ou apresentaram condições que poderia interferir nos resultados, sendo elas, insuficiência hepática, insuficiência renal (*clearance* de creatinina < 30 ml/min) e/ou síndrome nefrótica, neoplasias clinicamente não controladas; pacientes com sorologia positiva para HIV; hipotireoidismo não controlado; Síndrome de Cushing e mulheres grávidas. Para o protocolo *wash-out*, além desses critérios, também não foram incluídos pacientes com doença arterial coronariana (DAC) e diabetes tipo 2 (com dois exames de glicemia em jejum superiores a 126 mg/dL).

3.2. Aspectos éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IDPC, sob parecer 2.587.235 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, sob parecer 1.744.753. O protocolo *wash-out* foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IDPC, sob parecer 3.179.465. Os pacientes e controles selecionados foram informados sobre o protocolo do estudo e somente participam aqueles que assinam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.3. Amostras biológicas e determinações laboratoriais

As amostras de sangue foram coletadas em 2 tubos de 3 mL sem anticoagulante para as dosagens de glicose, colesterol total, HDL-c, LDL-c, triacilgliceróis, uréia, creatinina, apolipoproteína AI (apoAI) e B (apoB), proteína C reativa ultrassensível, ácido úrico, hormônio estimulante da tireoide (TSH), tetraiodotironina livre (T4 livre) e insulina e atividades enzimáticas da creatinocinase (CK), aspartato transaminase (AST), e alanina transaminase (ALT), que foram realizados pelo laboratório clínico do IDPC. Além disso, 5 tubos de 4 mL contendo anticoagulante EDTA, para análise de hemograma completo com contagem de plaquetas, hemoglobina glicada (HbA1c), e miRNAs e proteínas exossomais. Todos os tubos de coleta de procedência da VacutainerTM (Becton Dickinson Company, Plymouth, Reino Unido). As coletas foram realizadas no Setor de Protocolo e Coleta do IDPC.

As determinações de glicose, triacilgliceróis, colesterol total e HDL-c foram realizadas pelo método enzimático colorimétrico. As concentrações séricas de colesterol da LDL-c foram calculadas segundo a fórmula de Friedewald (BAIRAKTARI; SEFERIADIS; ELISAF, 2005). As concentrações séricas de uréia, creatinina foram realizadas pelo método enzimáticocolorimetrico e pelo método de Jaffe modificado respectivamente. A determinação enzimática da creatinocinase (CK), aspartato transaminase (AST), e alanina transaminase (ALT), foram realizadas pelo método cinético no UV. Apo AI, Apo B e Proteína C Reativa ultrassensível por imunoturbidimetria. As dosagens de ácido úrico são realizadas pelo método de Bulger e Johns modificado. A concentração total de hemoglobina (Hb) e percentual de hemoglobina glicada (HbA1c) foram determinadas pelo método colorimétrico e imunoturbidimetria, respectivamente. A relação entre as duas concentrações representa o resultado percentual da HbA1c final [HbA1c (%)]. Todas estas determinações foram realizadas seguindo orientações do produto (Siemens, Munique, Alemanha) em um analisador automático - Dimension RXL. As determinações de hormônio estimulante da tireoide (TSH), tetraiodotironina livre (T4 livre) e insulina estão sendo realizadas por imunoensaio enzimático do tipo "sanduiche", utilizandose kits da Siemens (Siemens, Munique, Alemanha) em um analisador automático -CENTAURO - Siemens, com sistema de detecção por eletroquimioluminescência. O controle de qualidade externo foi o da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica.

3.4. Sequenciamento de DNA - diagnóstico molecular de HF

O DNA genômico foi extraído e analisado conforme descrito por Borges et al. (2020) (BORGES et al., 2021). Resumidamente, o DNA foi extraído de amostras de sangue total usando o *QIAamp*® *DNA Blood Maxi Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do produto. A quantificação, pureza (razão A260/A280) e integridade do DNA foram realizadas usando o método fluorimétrico (QUBIT® 2.0, Life Technologies, Forest City, EUA), o método espectrofotômetro usando o NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EUA), e sistema 2200 TapeStation® (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA), respectivamente.

Para o sequenciamento, a biblioteca foi preparada utilizando o kit *Nextera Rapid Capture Enrichment* (Illumina, SanDiego, E.U.A) customizada, com base em um painel de 84 genes relacionados com HF, hipercolesterolemia poligência (HP), farmacogenômica e doença arterial coronariana (DAC). A reação de sequenciamento foi realizada no equipamento MiSeq utilizando *kit MiSeq Reagent V2* (300 cycles; Illumina). PhiX (1%) foi usado como agrupamento de bibliotecas e controles de diversidade.

O *pipeline* de descoberta de variantes foi descrito por Borges et al. (2020) (BORGES et al., 2021). As variantes genéticas relacionados à HF (*LDLR*, *APOB*, *PCSK9* e *LDLRAP1*), foram classificadas de acordo com os padrões e critérios das diretrizes do American College Medical Genetics (ACMG) para a interpretação de sua patogenicidade (RICHARDS et al., 2015), considerando as variantes patogênicas e/ou provavelmente patogênicas. Os pacientes portadores dessas variantes foram classificados como grupo HF+ e os não portadores como grupo HF-.

3.5. Determinação do perfil de expressão global de miRNAs (miRNoma) de exossomos3.5.1. Isolamento de exossomos plasmáticos

Para o isolamento de exossomos plasmáticos foi utilizado um método de precipitação química, utilizando o conjunto de reagentes *miRCURY Exosome Serum/Plasma* (Cat. No. 76603; Qiagen, Hilden, Nordrhein-Westfalen, Alemanha), seguindo o protocolo do produto. Resumidamente, o método consiste em uma centrifugação inicial do plasma a 10.000 x G por 5 minutos a 4°C, seguido por filtração do sobrenadante em coluna de 0.22 µm (Merck Millipore, Massachusetts, EUA). Após, foi adicionado ao plasma filtrado 6 µL de trombina (500 U/mL), incubado por 5 minutos a temperatura ambiente e seguido por centrifugação a 10.000 x G por 5 minutos. O sobrenadante purificado foi usado para obtenção dos exossomos através da incubação com o reagente de precipitação (*Precipitation Buffer* A) durante 1 hora a 4°C. Posteriormente a solução foi centrifugada a 500 x G por 5 minutos a temperatura ambiente para precipitação de exossomos. O precipitado obtido foi ressuspendido em 270 µL de tampão de ressuspensão (fornecido pelo kit).

Os métodos de isolamento de exossomos por precipitação química, não requerem etapa de precipitação por ultracentrifugação e tem menor tempo procedimento experimental e custo similar (LI et al., 2017; TANG et al., 2017).

3.5.2. Caracterização de exossomos

3.5.2.1. Caracterização de exossomos por dispersão de luz dinâmica

A distribuição do tamanho dos exossomos isolados foi avaliada por dispersão de luz dinâmica (DLS). Esse método se baseia no movimento Browniano (movimento aleatório das partículas suspensas em um fluido, nesse caso, em meio líquido) que faz com a luz laser que incide na solução seja espalhada com intensidades diferentes, criando o que é chamado de flutuações de intensidade da luz espalhada. A análise dessas flutuações resulta na velocidade do movimento das partículas. Pela relação entre a velocidade de movimentação das partículas e a intensidade e a mudança de frequência da luz espalhada, é possível mensurar tanto o tamanho quanto a distribuição do tamanho das partículas (SZATANEK et al., 2017).

Resumidamente, os exossomos purificados foram diluídos 1:20 em 1 mL de tampão PBS, previamente filtrado em membrana 0,22 μ M. Posteriormente foram transferidos para uma cubeta ótica e submetidos à análise de medição do tamanho das partículas, utilizando o equipamento *Malvern Zetasizer Nano ZS90* (Malvern Panalytical Ltd, Malvern, UK) (LANE et al., 2015; SANZ-RUBIO et al., 2018).

3.5.2.2. Caracterização de exossomos por Western blotting

Para extração de proteínas totais, 100 μ L de exossomos isolados ressuspendidos foram homogeneizados em 100 μ L de tampão de lise gelado contendo NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 nM (pH 8.0), SDS 0.1% Nonidet P-40 1%, desoxicolato de sódio 0,5% e inibidor de protease mix M (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Alemanha). Após homogeneização, as amostras foram deixadas no gelo por 15 minutos e, posteriormente, centrifugadas (10 minutos, 12.000 rpm a 4°C). O sobrenadante (extrato proteico) foi coletado e armazenado em novo tubo a -30°C. O conteúdo de proteínas do extrato proteico foi quantificado utilizando o reagente Bio-Rad Protein Assay (Cat. #500-0006, Bio-Rad, Califórnia, EUA) seguindo as especificações do fabricante. De maneira resumida, adicionou-se 200 μ L do reagente diluído (1:5 em água destilada) e 2 μ L do extrato protéico (ou padrão) por poço em uma placa de 96 poços estéril. A leitura foi feita no comprimento de onda de 595 nm no espectrofotômetro (SpectraMax M5, Molecular Devices, San Jose, CA).

O extrato proteico foi diluído em tampão de amostra contendo 9 partes de 4 x tampão de amostra segundo Laemmli (Cat. #161-0747, Bio-Rad) e 1 parte de 2-Mercaptoetanol (Cat. #M3148, Sigma-Aldrich®, Missouri, EUA) com ajuste na concentração de proteínas (concentração final de 3,32 µg/uL) e incubado a 95°C por 5 minutos para então ser submetido à eletroforese em condições desnaturantes em gel de gradiente (4–20% Mini-PROTEAN[®] TGXTM Precast Protein Gels, 15-well, 15 µl, Cat. #4561096) por 3 horas a 80 volts (4°C). As amostras aplicadas no gel foram normalizadas para a concentração de 50 µg. As proteínas fracionadas em gel foram transferidas por eletroforese para membrana de nitrocelulose utilizando o equipamento Trans-Blot® TurboTM Transfer System (100 Volts, 350 mA por 1

hora, Bio-Rad) com tampão Tris-glicina (Tris base 25mM, glicina 192mM, 20% metanol). A eficiência da transferência foi avaliada por coloração da membrana de nitrocelulose em Ponceau S (Cat. #P3504, Sigma-Aldrich®) a 0,1% (p/v) em 5% ácido acético por 10 minutos.

O procedimento para a detecção das proteínas de interesse iniciou-se com bloqueio da membrana de nitrocelulose do blot por uma hora a temperatura ambiente, com leite desnatado a 5% em TBS-T [Tris-base 20mM, NaCl 150 mM e 0,1% Tween 20 (pH 7,5)] para minimizar as ligações inespecíficas, sob agitação. Após o bloqueio, as quatro membranas foram lavadas e cada uma foi incubada, sob agitação com um anticorpo primário produzido em coelho anti-humano CD63, CD9, CD81 e HSP70 (ExoAb Antibody Kit; System Biosciences – SBI, EUA, CA) diluídos na concentração 1:1000 em 5% de leite desnatado em tampão TBS-T overnight a 4°C. Após três lavagens de 10 minutos com TBS-T, as membras foram incubadas, sob agitação, com anticorpo secundário de cabra anti-coelho marcado com HRP (ExoAb Antibody Kit; System Biosciences – SBI, EUA, CA) diluídos na concentração 1:20.000 em 5% de leite desnatado em tampão TBS-T por 60 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação as membranas foram lavadas três vezes por 10 minutos cada, com TBS-T.

As bandas marcadas foram visualizadas por quimioluminescência usando Clarity[™] Western ECL Substrate (Cat. #1705061, Bio-Rad), no equipamento C-Digit (LI-COR Biosciences, Nebraska, EUA).

3.5.2.3. Caracterização de exossomos por rastreamento de nanopartículas

O diâmetro da vesícula e a abundância de partículas foram determinados por análise de rastreamento de nanopartículas usando o equipamento NanoSight LM10 (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). Resumidamente, as amostras de exossomos foram diluídas 1:400 em solução salina tamponada com fosfato (PBS - pH 7.4) filtrada e injetadas continuamente por meio de uma bomba através de uma seringa, com cinco replicatas calculando a média e o erro padrão para cada amostra. O ganho da câmera NanoSight foi definido como um valor constante de 9 e o valor limite para detecção de vesículas foi definido como 2. O tamanho e a concentração dos dados coletados foram calculados para obter a distribuição em cada amostra.

3.5.2.4. Caracterização de exossomos por imunomarcação

Para a caracterização de exossomos também foi utilizada a imunomarcação utilizando uma metodologia de maior sensibilidade, o ExoView. Os microarranjos foram impressos com anticorpos anti-tetraspanina validados (CD9, CD63 e CD81), incubados com as amostras de exossomos isolados conforme previamente descrito (Item 3.5.1) e incubados com anticorpos de detecção de tetraspanina. As imagens foram obtidas usando plataforma ExoView R100 (NanoView Biosciences, Brighton, MA). O controle de imunoglobulina G (IgG) foi usado para demonstrar a especificidade do sinal.

3.5.2.5. Caracterização de exossomos por microscopia eletrônica de transmissão

Realizou-se também a caracterização de exossomos por microscopia eletrônica de transmissão com o objetivo de avaliar a integridade das microvesículas (tamanho e morfologia). Foram adicionados 5 μ L desta solução contendo exossomos fixados com paraformaldeído em grades de cobre com filme de carbono (CF300-CU), previamente expostas a técnica de Glow Discharge (2 min, 2.4 MA) para aumentar a absorção dos exossomos. Após 1 minuto do gotejamento das amostras na grade de carbono, o excesso foi retirado com auxílio de papel filtro e coradas com 2% de acetato de uranila por 20 segundos à temperatura ambiente para intensificar o contraste e permitir a visualização dos exossomos. A leitura das lâminas contendo o material fixado foi realizada em MET JEOL JEM 2100 de 200 kV (ThermoFisher, Waltham, MA, USA).

3.5.3. Extração de miRNAs de exossomos plasmáticos

A extração de RNA total (incluindo miRNAs) de exossomos plasmáticos foi realizada utilizando o conjunto de reagentes *miRNeasy Mini Kit* (Qiagen), de acordo com o protocolo do produto.

A quantificação e pureza do RNA total extraído de exossomos foram realizadas por espectrofotometria utilizando Nanodrop ND-1000 (ThermoFisher). Entretanto o método não se mostrou sensível o suficiente para quantificação das amostras de RNA, e a quantidade de amostra utilizada foi baseada em volume, conforme recomendação do produto comercial utilizado no preparo de biblioteca, descrita no item 3.5.4.

3.5.4. Sequenciamento de miRNAs de exossomos plasmáticos

As bibliotecas de sequenciamento de miRNA foram preparadas usando o QIAseq miRNA Library Kit (Qiagen), seguindo o protocolo fornecido com o produto. Resumidamente, adaptadores foram ligados às extremidades 3' e 5' do miRNA, partindo de um volume total de 5 uL de amostra, e então o produto de ligação foi convertido em cDNA, que por sua vez foi

amplificado pela PCR. O tamanho dos amplicons componentes da biblioteca obtida foi determinado usando a plataforma Agilent 2200 TapeStation® (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA) com gel de separação High Sensitivity D1000 ScreenTape (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, EUA), a biblioteca de miRNA foi caracterizada com fragmentos de 180 bp. A quantificação da biblioteca foi realizada através de método fluorimétrico utilizando o equipamento QUBIT® (Life Technologies, Forest City, EUA) com o produto QUBIT® dsDNA High-Sensitivity Assay (Life Technologies, Forest City, EUA), o valor da concentração serviu de base para diluição da biblioteca para aproximadamente 4 nM.

Para o sequenciamento a biblioteca foi diluída e desnaturada de acordo com o protocolo *Denature and Dilute Libraries Guide* (Illumina, Inc.San Diego, EUA). A reação de sequenciamento por síntese foi realizada utilizando o MiSeq® Reagent Kit v3 (150 cycles) e o equipamento MiSeq (Illumina, Inc. San Diego, EUA), disponíveis no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. O controle do processo químico foi realizado com o produto comercial PhiXControl Kit v3 (Illumina, SanDiego, E.U.A.) a 1% do material sequenciado, que é o DNA controle para as etapas de geração de cluster e sequenciamento.

Para iniciar o sequenciamento, 5 µL da biblioteca a 4 nM foram incubados com igual volume de solução de hidróxido de sódio 0,2 N para desnaturação de cDNA. Em seguida, a biblioteca, agora a 2 nM, foi diluída para 20 pM em tampão de hibridização (HT1) pré-refrigerado, fornecido no kit MiSeq® Reagent Kit v3 (150 cycles) (Illumina Inc., San Diego, EUA), e novamente diluída com tampão HT1 para 12 pM, concentração inicial utilizada no sequenciamento.

A solução estoque da biblioteca Phix (2 μ L de PhiX 10 nM) foi inicialmente diluído em 3 μ L de tampão Tris-Tween (Tris-HCl 10mM, pH 8.5 com 0,1% de Tween 20) resultando em uma solução de 5 μ L à 4 nM, seguido de desnaturação com igual volume de NaOH 0,2 N, obtendo-se 10 μ L uma solução a 2 nM. Após a desnaturação, a biblioteca (10 μ L) foi diluída com o tampão HT1 (990 μ L), para a concentração de 20 pM. A seguir rediluída para se obter a concentração final de 12,5 pM para o sequenciamento utilizando 375 μ L da biblioteca de PhiX diluída em 225 μ L de HT1.

Para a reação de sequenciamento, realizou-se uma combinação da biblioteca das amostras com o controle Phix na proporção de 1% do volume do material sequenciado. Sendo recomendado para o sequenciamento o volume inicial de 600µL, foi utilizado 594 µL das

bibliotecas de DNA à 12 pM (preparado com a mistura de 6 amostras) e 6 μ L da biblioteca de PhiX a 12,5 pM.

3.5.5. Análise dos dados de sequenciamento

A análise das métricas de sequenciamento foram avaliadas em todos os sequenciamentos seguindo as recomendações do produto para verificar a qualidade dos dados obtidos antes da realização das análises. Foram avaliados parâmetros como: Q30 (chance de erro de 1 em 1.000 de uma base ter sido inserida errada), Densidade (K/mm2), Clusters Pass Filter (%) e quantidade de reads por sequenciamento.

A análise primária e secundária dos dados gerados em formato fasta, durante o sequenciamento na plataforma MiSeq foram realizadas utilizando o pipeline miARma-Seq, disponível em (http://miarmaseq.cbbio.es/installation) (ANDRÉS-LEÓN; NÚÑEZ-TORRES; ROJAS, 2016). Inicialmente, todos os arquivos fasta foram submetidos a avaliação de utilizando software FastOC qualidade 0 (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/) e as sequências foram filtradas para contaminação do adaptador usando o Cutadapt37 e Reaper27. Após esse préprocessamento, foi realizado uma nova análise de qualidade das sequências com o FastQC. O alinhamento das sequências de miRNA foi realizado usando o Bowtie and Bowtie2. A quantificação das sequências de miRNA foi realizada usando o FeatureCounts e novos miRNAs foram quantificados usando o mirDeep2. A análise de expressão diferencial foi realizada utilizando a combinação de duas ferramentas: edgeR e Noiseq.

3.6. Análise global das proteínas (proteômica)

Para essa análise global das proteínas, foram realizadas extração de proteínas provenientes de exososmos plasmáticos e do plasma total de 13 pacientes HF e 7 controles.

3.6.1. Isolamento de exossomos plasmáticos para análise de proteínas

Exossomos plasmáticos foram isoladas por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) usando coluna qEVoriginal/35 nm (Izon Science, Cambridge, MA, EUA), seguindo o protocolo do produto. Resumidamente, o plasma foi centrifugado a 10.000 x g por 5 min a 4°C, e o sobrenadante foi filtrado em filtro de 0,22 μ m para eliminação das partículas maiores (Merck Millipore, MA, EUA). Em seguida, a coluna qEVoriginal/35 nm foi lavada com PBS e 500 μ L

de plasma filtrado foram aplicados no topo desta coluna de resina e as frações de 500 µL foram coletadas. Três frações ricas em exossomos (8-10) foram agrupadas e analisadas diretamente.

Para processar 20 amostras de exossomos (n=13 HF e n=7 controles), quatro preparações de exossomos foram processadas por dia, durante cinco dias (com randomização de cada grupo de pacientes). O conteúdo total de proteína dos exossomos foi medido utilizando o produto Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific, MA, EUA).

3.6.2. Caracterização de exossomos isolados por SEC

Para confirmar a purificação de exossomos das amostras, os exossomos purificados por SEC foram quantificados e visualizados usando NanoSight, ExoView, Western blotting e microscopia eletrônica de transmissão já descritas nos itens 3.5.2.3; 3.5.2.2; 3.5.2.5. respectivamente.

3.6.3. Proteólise

Proteólise (digestão com tripsina) de amostras de exossomos plasmáticos e amostras de plasma total (para os mesmos n=13 HF e n=7 controles para ambos os tipos de amostra) foram realizadas utilizando o produto comercial de preparação de amostra iST-BCT (PreOmics GmbH, Martinsried, Alemanha) automatizado na plataforma PreON (PreOmics). Foram utilizadas entradas de 5 μ g de proteína por amostra (correspondendo a 1 uL para plasma). Os peptídeos eluídos foram secos a vácuo e ressuspensos em 40 μ L de 5% de acetonitrila (OptimaTM LC-MS grade, Thermo Fisher Scientific, EUA) e 5% de ácido fórmico (Sigma-Aldrich, EUA) preparados em OptimaTM LC-MS grade (Thermo Fisher Scientific) para análise subsequente.

3.6.4. Espectrometria de massa

Aquisição dependente de dados (DDA, amostragem imparcial de peptídeo) - para plasma total e exossomos, os peptídeos foram diluídos 2X e analisados usando o espectrômetro de massa Orbitrap Fusion Lumos Tribrid (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) diante de uma fonte de íons Easy-Spray e acoplado a um Easy - Bomba HPLC nLC1000 (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). Os peptídeos foram separados usando uma configuração de coluna

dupla: Acclaim PepMap RSLC C18 trap, 75 µm X 20 mm; e uma coluna aquecida (45°C) EASY-Spray LC, 75 µm X 250 mm (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA). A taxa de fluxo do gradiente foi de 300 nL/min de 5 a 21% de Solvente B (acetonitrila/0,1% de ácido fórmico) por 75 minutos, 21 a 30% de Solvente B por 15 minutos, seguido por dez minutos de uma 'lavagem de quebra-cabeça', alternando entre 5 e 95% de Solvente B. O Solvente A utilizado foi 0,1% de ácido fórmico. O instrumento foi ajustado para resolução de 120 K, e os principais íons precursores N em um tempo de ciclo de 3 segundos (dentro de uma faixa de varredura de 400-1500 m/z; janela de isolamento, 1,6 m/z; taxa de varredura de armadilha de íons, normal) foram submetidos a dissociação induzida por colisão (energia de colisão 30%) para sequenciamento de peptídeos (ou MS/MS). A exclusão dinâmica foi ativada (60 segundos).

3.6.5. Análise de dados proteômicos

Ambos os espectros de exossomos plasmáticos e plasma total MS/MS foram consultados contra o banco de dados UniProt humano (baixado em 01 de agosto de 2020) usando o algoritmo de pesquisa HT-SEQUEST, por meio do Pacote Proteome Discoverer (PD) (versão 2.2, Thermo Fisher Scientific, MA, EUA).

A oxidação da metionina e a acetilação n-terminal foram definidas como uma modificação variável, e a carbamidometilação da cisteína foi definida como uma modificação fixa. A enzima foi ajustada para tripsina, com um máximo de 4 clivagens perdidas, usando uma janela de tolerância de precursor de 10 ppm e uma janela de tolerância de fragmento de 0,06 Da. Para quantificar os precursores peptídicos detectados no MS1, mas não sequenciados de amostra para amostra, ativamos o 'Mapeador de recursos'. O alinhamento cromatográfico foi feito com um deslocamento máximo do tempo de retenção (RT) de 10 minutos e uma tolerância de massa de 10 ppm. As configurações de vinculação e mapeamento de recursos foram tolerância de RT mínima de 0 minutos, tolerância de massa de 10 ppm e sinal-ruído mínimo de cinco.

As abundâncias de peptídeos precursores foram baseadas em suas intensidades cromatográficas e a quantidade total de peptídeos foi usada para normalização. Peptídeos atribuídos a um determinado grupo de proteínas, e não presentes em nenhum outro grupo de proteínas, foram considerados únicos. Consequentemente, cada grupo de proteína é representado por uma única proteína mestre. Usamos peptídeos únicos por proteína para quantificação. Os peptídeos trípticos foram filtrados com base em uma taxa de falsa descoberta de 1% (FDR) com base na estratégia de pesquisa de banco de dados (ELIAS; GYGI, 2007;

47

KÄLL et al., 2008). Para as comparações de abundância de classificação relativa entre as proteínas EV e plasmáticas, um único arquivo de consenso mesclando ambos os proteomas foi gerado para normalizar e dimensionar os dados para comparações entre conjuntos de dados.

3.6.6. Análise de dados proteômicos

Para PCAs e mapas de calor, filtrou-se os genes ou proteínas por seu valor q de comparações de dois grupos. O valor q é a proporção das hipóteses nulas rejeitadas que são erroneamente rejeitadas e é um tipo de taxa de descoberta falsa (YOAV BENJAMINI, 1995). O valor q foi calculado usando Qlucore Omics Explorer e os limites são indicados nas legendas das figuras.

Proteínas com ≥2 peptídeos únicos foram incluídos na análise. A análise de dois grupos comparou proteínas de duas fontes diferentes (exossomos e plasma total) com um valor q ≤0,3. As variações devido a efeitos de lote de processamento de amostra (consultar, Isolamento de exossomos plasmáticos para análise de proteínas) foram contabilizadas na comparação de dois grupos (Qlucore Omics Explorer). Para representar graficamente as abundâncias relativas de proteínas individuais, foram utilizadas as abundâncias de proteínas PD2.2 normalizadas.

3.7. Análise Estatística

Os testes estatísticos foram realizados utilizando o programa SPSS versão 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA) e o GraphPad Prism versão 9.0 (GraphPad Software Inc., CA, USA). O teste Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar a distribuição dos dados das variáveis contínuas.

As variáveis categóricas foram apresentadas em porcentagem e comparadas pelo teste qui-quadrado ou Fisher. As variáveis contínuas são apresentadas como mediana e intervalo interquatil (ou média e SEM) e foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis e teste post hoc de Dunn para comparações múltiplas ou teste de Mann-Whitney para comparação pareada.

A análise de correlação entre as variáveis contínuas foi avaliada por meio dos testes de correlação de Spearman.

Para todas as análises estatísticas realizadas, foram considerados estatisticamente significativos os resultados cujos níveis descritivos (valores de p) foram inferiores a 0,05.

A análise de enriquecimento foi realizada usando STRING (SZKLARCZYK et al., 2019) (disponível online em <u>https://string-db.org/</u>) e ENRICHR (CHEN et al., 2013;

KULESHOV et al., 2016; XIE et al., 2021) (disponível online em <u>https://maayanlab.cloud/Enrichr/</u>). Para o STRING, os resultados foram analisados de acordo com a pontuação de confiança: baixa confiança - 0,150; confiança média - 0,400; alta confiança - 0,700; maior confiança - 0,900.

A análise integrativa entre miRNAs diferentemente expressos e as proteínas mais abundantes em exossomos foram realizadas utilizando o Metacore (disponível online em <u>https://portal.genego.com/</u>).

RESULTADOS 50

4. **RESULTADOS**

4.1. Dados clínicos, biodemográficos e laboratoriais - Pacientes com estudo do miRNoma

Os dados clínicos, biodemográficos e laboratoriais dos pacientes e controles que tiveram as amostras de RNA sequenciado para o perfil de miRNA de exossomos estão apresentados na **Tabela 2**. Está casuística estava sem uso de estatinas com idade e gênero pareados. Comparando os grupos HF e controle, o resultado da análise estatística mostraram os seguintes resultados: o índice de massa corpórea (p=0,005), xantelomas (p=0,020), arco córneo (p=0,005), hipertensão (p<0,001), diabetes (p=0,020), infarto agudo do miocárdio (IAM) (p=0,049), angina (p<0,001), doença arterial coronariana (DAC) (p=0,007), doença arterial periférica (DAP) (p=0,010) e histórico familiar de HF (p<0,001) e histórico de DAC (p=0,001). Os dados de etnia e tabagismo não foram encontrados diferenças significativas entre os grupos.

Resultados das determinações de glicemia (p<0,001), hemoglobina glicada (p<0,001) e insulina (p<0,001) mostraram valores menores no grupo controle. No perfil lipídico, os pacientes HF apresentaram alteração em comparação com os controles, como já esperado: colesterol total (p<0,001), LDL-c (p<0,001), HDL-c (p=0,010), VLDL-c (p<0,001), triacilgliceróis (p<0,001) e Apo B (p<0,001).

Tabela 2. Dados clínicos, biodemográficos e laboratoriais de pacientes HF e controles com resultado do perfil de miRNA de exossomos.

Variánsia	Grupos				
variaveis	HF (54)	Controle (38)	— þ		
Idade, anos	50 (33-60)	36 (31-45)	0,055		
Gênero, feminino	75,9 (41)	73,7 (28)	0,807		
Etnia, caucasiano	50,0 (27)	68,4 (26)	0,052		
IMC, kg/m ²	27,80 (25,10-31,20)	24,20 (22,80-29,00)	0,005		
Xantomas	5,6 (3)	0 (0)	0,140		
Xantelomas	13,2 (7)	0 (0)	0,020		
Arco córneo	18,9 (10)	0 (0)	0,005		
Tabagismo	9,4 (5)	5,3 (2)	0,307		
Hipertensão	53,7 (29)	0 (0)	<0,001		
Diabetes tipo 2	13,2 (7)	0 (0)	0,020		
Infarto agudo do miocárdio	11,3 (6)	0 (0)	0,049		
Angina	35,8 (19)	0 (0)	<0,001		
Doença arterial coronariana	12,3 (7)	0 (0)	0,007		
Doença arterial periférica	20,8 (11)	0 (0)	0,010		
Histórico familiar de HF	64,8 (35)	0 (0)	<0,001		
Histórico familiar de DAC	66,0 (35)	26,3 (10)	0,001		
Glicemia, mg/dL	92 (85-98)	82 (79-86)	<0,001		
Hb1Ac, %	5,8 (5,3-6,1)	5,4 (5,0-5,5)	<0,001		
Colesterol total, mg/dL	290 (271-325)	179 (152-191)	<0,001		
HDL-c, mg/dL	50 (44-57)	62 (49-69)	0,010		
LDL-c, mg/dL	200 (178-232)	94 (78-110)	<0,001		

32 (25-43)	16 (10-23)	<0,001
161 (126-215)	79 (48-117)	< 0,001
0,5 (0,5-0,6)	0,5 (0,5-0,6)	0,780
155,5 (138,5-170,5)	158 (136-179)	0,613
159,0 (139,0-188,5)	78,8 (64,7-87,2)	< 0,001
8,0 (5,4-11,1)	5,0 (3,9-7,8)	< 0,001
	32 (25-43) 161 (126-215) 0,5 (0,5-0,6) 155,5 (138,5-170,5) 159,0 (139,0-188,5) 8,0 (5,4-11,1)	$\begin{array}{ccccccc} 32 \ (25{\text -}43) & 16 \ (10{\text -}23) \\ 161 \ (126{\text -}215) & 79 \ (48{\text -}117) \\ 0,5 \ (0,5{\text -}0,6) & 0,5 \ (0,5{\text -}0,6) \\ 155,5 \ (138,5{\text -}170,5) & 158 \ (136{\text -}179) \\ 159,0 \ (139,0{\text -}188,5) & 78,8 \ (64,7{\text -}87,2) \\ 8,0 \ (5,4{\text -}11,1) & 5,0 \ (3,9{\text -}7,8) \end{array}$

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Variáveis contínuas são apresentadas como mediana e intervalo interquartil e foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney. Variáveis categóricas foram comparadas por qui-quadrado. p<0,05 foi considerado significante. HF, Hipercolesterolemia Familial; IMC, Indice de Massa Corporal; DAC, Doença Arterial Coronariana; Hb1AC, Hemoglobina glicada, HDL-c: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-c: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; PCRus, proteína C reativa ultrassensível; Apo AI: Apolipoproteína AI; Apo B: Apolipoproteína B.

4.2. Diagnóstico Molecular de HF

Os pacientes identificados fenotipicamente como HF foram classificados de acordo com a presença (HF+) ou ausência (HF-) de variantes patogênicas e/ou provavelmente patogênicas em 4 genes relacionados à HF. Na **Tabela 3** está apresentada a descrição das variantes que foram identificadas em 13 dos 54 pacientes analisados neste estudo.

Foram identificadas dez variantes, rs121908026, rs137929307, rs879254913, rs28942079, rs28942078, rs753707206, rs28941776, rs387906307, rs121908031 e rs752596535. Todas essas variantes identificadas foram no gene *LDLR*, sete destas são do tipo missense, uma na região 5'UTR e duas do tipo *stop-gain*. Seis variantes foram classificadas como patogênicas e quatro como provavelmente patogênicas. Todos os pacientes foram identificados como heterozigotos.

Tabela	3. V	ariantes	conhecidas	em	genes	relaciona	ados à	à HF	considerados	patogênicas	ou
provave	lmen	te patog	ênicas de ac	ordo	com a	ACMG	(n=13	pacie	entes).		

Gene	dbSNP	Variante	Alteração de	Тіро	Classificação	Número de casos
	Código		aminoácidos		ACMG	(zigosidade)
LDLR	rs121908026	c.530C>T	p.Ser177Leu	Missense	Р	2 (hetero)
LDLR	rs137929307	c.1775G>A	p.Gly592Glu	Missense	LP	2 (hetero)
LDLR	rs879254913	c.1463T>C	p.Ile488Thr	Missense	LP	1 (hetero)
LDLR	rs28942079	c.1291G>A	p.Ala431Thr	Missense	Р	1 (hetero)
LDLR	rs28942078	c.1285G>A	p.Val429Met	Missense	Р	1 (hetero)
LDLR	rs753707206	c.1801G>C	p.Asp601His	Missense	LP	1 (hetero)
LDLR	rs28941776	c.1646G>A	p.Gly549Asp	Missense	Р	1 (hetero)
LDLR	rs387906307	c138del-T	-	5'UTR	LP	1 (hetero)
LDLR	rs121908031	c.2043C>A	p.Cys681*	Stop-gain	Р	2 (hetero)
LDLR	rs752596535	c.501C>G	p.Cys167*	Stop-gain	Р	1 (hetero)

Nota: P, Patogênica; LP, provavelmente patogênica

Os dados clínicos, biodemográficos e laboratoriais dos pacientes HF com e sem diagnóstico molecular estão apresentados na **Tabela 4**.

Os dois grupos estão pareados com relação a idade, gênero e etnia. Não foram observadas diferenças entre os grupos para parâmetros como IMC, xantomas, xantelomas, arco córneo, tabagismo. O grupo HF+ apresentou maior frequência de DAP, comparado com os HF- (p=0,004), e para hipertensão, diabetes tipo 2, IAM, angina, DAC, não foram observadas diferenças entre os grupos HF+ e HF-.

A análise dos resultados do perfil lipídico mostrou que os valores médios foram mais elevados no grupo HF+ em relação ao HF- para colesterol total (p=0,003), LDL-c (p<0,001) e Apo B (p=0,003). As demais determinações avaliadas, não se observou diferenças significativas.

	(
Variaveis	HF+ (13)	HF- (41)	— р
Idade (anos)	46 (38-59)	53 (37-62)	0,460
Gênero, feminino	84,6 (11)	73,2 (30)	0,400
Etnia, caucasiano	61,5 (8)	46,3 (19)	0,566
IMC, kg/m^2	28,70 (25,80-29,40)	27,80 (24,90-31,65)	0,772
Xantomas	0 (0)	7,3 (3)	0,316
Xantelomas	15,4 (2)	12,5 (5)	0,790
Arco córneo	30,8 (4)	15,0 (6)	0,207
Tabagismo	15,4 (2)	7,5 (3)	0,451
Hipertensão	61,5 (8)	51,2 (21)	0,516
Diabetes tipo 2	23,1 (3)	10,0 (4)	0,226
Infarto agudo do miocárdio	15,4 (2)	10,0 (4)	0,595
Angina	53,8 (7)	30,0 (12)	0,239
Doença arterial coronariana	15,4 (2)	12,5 (5)	0,406
Doença arterial periférica	46,2 (6)	12,5 (5)	0,004
Histórico familiar de HF	84,6 (11)	58,5 (24)	0,214
Histórico familiar de DAC	61,5 (8)	67,5 (27)	0,579
Glicemia, mg/dL	93 (88-98)	91 (85-97)	0,671
Hb1Ac, %	5,9 (5,5-6,1)	5,8 (5,3-6,1)	0,401
Colesterol total, mg/dL	325 (289-457)	284 (263-306)	0,003
HDL-c, mg/dL	50 (49-55)	49 (44-57)	0,911
LDL-c, mg/dL	245 (211-374)	192 (171-215)	<0,001
VLDL-c, mg/dL	28 (21-31)	36 (28-45)	0,079
Triacilgliceróis, mg/dL	139 (105-155)	178 (140-223)	0,078
PCRus, mg/dL	0,5 (0,5-0,9)	0,5 (0,5-0,5)	0,154
Apo AI, mg/dL	145,0 (136,5-160,0)	157,5 (140,5-177,5)	0,161
Apo B, mg/dL	186,5 (160,5-229,0)	151,5 (135,5-170,5)	0,003
Insulina, IU/mL	9,05 (7,55-10,60)	7,50 (5,4-11,70)	0,640

Tabela 4. Dados clínicos, biodemográficos e laboratoriais dos pacientes com HF+ e HF-.

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Variáveis contínuas são apresentadas como mediana e intervalo interquartil e foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney. Variáveis categóricas foram comparadas por qui-quadrado. p<0,05 foi considerado significante. HF, Hipercolesterolemia Familial; IMC, Índice de Massa Corporal; DAC, Doença Arterial Coronariana; Hb1AC, Hemoglobina glicada, HDL-c: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c: colesterol da

lipoproteína de baixa densidade; VLDL-c: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; PCRus, proteína C reativa ultrassensível; Apo AI: Apolipoproteína AI; Apo B: Apolipoproteína B.

4.3. Dados clínicos, biodemográficos e laboratoriais de Pacientes que tiveram as amostras determinadas o perfil proteômico

Os dados demográficos, clínicos e laboratoriais dos pacientes com HF pareados por idade e gênero, e indivíduos de controle são mostrados na **Tabela 5**. Esses dados são referentes apenas aos pacientes analisados no estudo da análise proteômica de exossomos plasmáticos.

Os dados clínicos do grupo HF comparados com o grupo controle mostraram aumento de hipertensos (p=0,003), com história familiar de HF (p=0,027) As comparações da etnia, índice de massa corporal, a frequência de diabetes tipo 2, a presença de arco córneo, xantoma, ou xantelasma, assim com ocorrência de IAM, angina, DAC, DAP, e número de tabagistas e história familiar de DAC tiveram resultados sem significância estatística entre os grupos.

O grupo HF apresentou aumento da glicemia em relação ao grupo controle (p=0,021) Assim como os valores de colesterol total (p<0,001), LDL-c(p<0,001), VLDL-c (p=0,010), triacilgliceróis (p=0,010) e Apo B (p=0,001) mostraram mais elevados no grupo HF em comparação com o grupo controle.

Variáncia			
variaveis	HF (13)	Controle (7)	— p
Idade, anos	53 (45-60)	36 (32-45)	0,068
Gênero, feminino	76,9 (10)	100 (7)	0,168
Etnia, caucasiano	30,8 (4)	71,4 (5)	0,087
IMC, kg/m ²	27,8 (25,1-28,4)	22,80 (19,1-34,3)	0,165
Hipertensão	69,2 (9)	0 (0)	0,003
Diabetes tipo 2	15,4 (2)	0 (0)	0,274
Arco córneo	23,1 (3)	0 (0)	0,168
Xantomas	0 (0)	0 (0)	-
Xantelomas	15,4 (2)	0 (0)	0,274
Infarto agudo do miocárdio	7,7 (1)	0 (0)	0,452
Angina	30,8 (4)	0 (0)	0,166
Doença arterial coronariana	7,7 (1)	0 (0)	0,452
Doença arterial periférica	23,1 (3)	0 (0)	0,166
Tabagismo	15,4 (2)	0 (0)	0,260
Histórico familiar de HF	69,2 (9)	0 (0)	0,027
Histórico familiar de DAC	61,5 (8)	14,3 (1)	0,063
Glicemia, mg/dL	91 (86-101)	82 (80-88)	0,021
Hb1Ac, %	5,8 (5,5-5,9)	5,5 (5,2-5,8)	0,264
Colesterol total, mg/dL	291 (271-304)	180 (152-190)	<0,001
LDL-c, mg/dL	192 (171-209)	91 (77-122)	<0,001

Tabela 5. Dados demográficos, clínicos e laboratoriais dos pacientes com HF e controle utilizados na análise proteômica.

HDL-c, mg/dL	49 (46-55)	62 (49-67)	0,267
VLDL-c, mg/dL	29 (25-43)	17 (15-23)	0,010
Triacilgliceróis, mg/dL	147 (123-215)	85 (74-116)	0,010
Apo AI, mg/dL	150,0 (144,0-162,0)	166,5 (155,0-183,0)	0,203
Apo B, mg/dL	151,0 (138,0-166,0)	86,8 (78,8-90,2)	0,001
Insulina, IU/mL	7,7 (5,4-9,3)	5,8 (3,7-8,4)	0,362

Nota: Número de indivíduos em parênteses. Variáveis contínuas são apresentadas como mediana e intervalo interquartil e foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney. Variáveis categóricas foram comparadas por χ -quadrado. p<0,05 foi considerado significante. HF, Hipercolesterolemia Familial; IMC, Índice de Massa Corporal; DAC, Doença Arterial Coronariana; Hb1AC, Hemoglobina glicada, HDL-c: colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL-c: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; VLDL-c: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; PCR us, proteína C reativa ultrassensível; Apo AI: Apolipoproteína AI; Apo B: Apolipoproteína B.

4.4. Perfil de expressão global de miRNAs (miRNoma) em exossomos

4.4.1. Caracterização de exossomos

4.4.1.1. Dispersão de Luz Dinâmica

Na **Figura 1**, é mostrado o gráfico com resultados da análise DLS de exossomos isolados pelo produto *miRCURY Exosome Serum/Plasma*. O eixo Y indica a intensidade ou número de moléculas (%) e o eixo X indica o tamanho das partículas na amostra (nm). Os exossomos ressuspensos foram diluídos em PBS (1:20).



Figura 1. Distribuição do tamanho dos exossomos plasmáticos por método de dispersão de luz dinâmica. Eixo Y: intensidade ou número de partículas em %. Eixo x: tamanho das partículas em nm. Equipamento Nanosizer ZS90 (Malvern Panalytical Ltd, Malvern, UK).

4.4.1.2. Western blotting

Detectou-se a presença das proteínas CD63 (50kDa), CD81 (25kDa) e HSP70 (70kDa) por *Western blotting* das vesículas isolados do plasma (**Figura 2A**). Os resultados obtidos foram semelhantes àqueles apresentados pelo fabricante (controle de reação) dos anticorpos utilizados (**Figura 2B**; ExoAb Antibody Kit; System Biosciences – SBI), indicando a presença das microvesículas de interesse em nossa amostra de estudo.



Figura 2. Caracterização de exossomos plasmáticos por Western blotting.

A: Imunomarcação das amostras de EVs plasmático obtidos no estudo. B: Imunomarcação dos exosomos séricos fornecida pelo fabricante dos anticorpos utilizados (ExoAb Antibody Kit; System Biosciences – SBI).

4.4.1.3. Rastreamento de nanopartículas

Na **Figura 3** está apresentado o gráfico de resultados da caracterização de exossomos usando o NanoSight LM10. O eixo Y indica a concentração das partículas e o eixo X indica o tamanho das partículas na amostra (nm). Observa-se que a distribuição do tamanho das partículas é homogênea na amostra e o tamanho delas foi em média 95 nm, que está dentro do esperado (50-150 nm).



Figura 3. Distribuição do tamanho de exossomos plasmáticos por método de análise de rastreamento de nanopartículas.

Eixo Y: concentração das partículas. Eixo x: tamanho das partículas em nm. Barras de erro vermelhas indicam \pm erro padrão da média. Equipamento NanoSight LM10 (Malvern Panalytical Ltd, Malvern, UK).

4.4.1.4. Imunomarcação - ExoView

Os resultados da avaliação da amostra para tetraspaninas usando o ExoView demonstrou que o método utilizado para o isolamento de exossomos é adequado pois resultou em vesículas positivas para os marcadores como CD63, CD9 e CD81 (**Figura 4**).



Figura 4. Imagens representativas de exossomos obtidas usando a plataforma ExoView R100. Os painéis mostram captura de: A) CD63 +; B) CD9 +; C) CD81 + e D) IgG (controle negativo), respectivamente.

4.4.1.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão

As vesículas tiveram a integridade e o tamanho esperados (50-150 nm) na análise de microscopia eletrônica de transmissão (**Figura 5**).



Figura 5. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) de exossomos com coloração negativa. Ampliação: 30000x (barra de escala = 100 nm).

4.4.2. Sequenciamento de miRNAs de exossomos

4.4.2.1. Controle de qualidade do preparo de biblioteca

Todas as bibliotecas preparadas apresentaram quantificação (**Tabela 6; Figura 6**), integridade e métricas adequadas (**Tabela 7**), garantindo a qualidade do sequenciamento dos miRNAs.

Tabela 6. Quantificação de bibliotecas confeccionadas com as amostras de pacientes HF e controles utilizadas no sequenciamento de miRNAs de exossomos.

Amagtra	Quantificação	Amostro	Quantificação	Amostro	Quantificação
Amostra	(ng/µL)	Amostra	(ng/µL)	Amostra	(ng/µL)
HF01C	4,7	HF55C	13,7	HFW20	10,6
HF03C	12,9	HF57C	0,352	HFW21	14,6
HF05C	5,82	HF58C	10,1	HFW22	13
HF06C	14,3	HF59C	13,8	HFW23	14,9
HF109	13,2	HF65C	11,4	HFW24	13,3
HF10C	4,7	HF66C	13,5	HFW25	12,8
HF11C	9,86	HF67C	17,1	HFW26	16
HF12C	14.4	HF67R	4,42	HFW27	2,9
HF13C	3,84	HF68C	18,9	HFW28	6,42
HF144	6,04	HF69C	19,6	HFW30	11,2
HF157	15,9	HF70C	13,2	HFW31	10,9
		1			

HF158	22,6	HF72C	20	HFW32	13,4
HF159	27	HF73C	11,9	HFW34	13,1
HF177	15,9	HF9C	8,6	HFW35	17,6
HF22C	4,54	HFW01	7,5	HFW36	10,5
HF23C	8,4	HFW02	5,6	HFW37	12,9
HF24C	8,1	HFW03	12	HFW38	12
HF26C	8,7	HFW04	14,9	HFW39	7,68
HF27C	6,1	HFW05	11,1	HFW40	9,6
HF28C	20,6	HFW06	14,7	HFW41	8,46
HF30C	13,7	HFW07	15,4	HFW42	15,2
HF31C	20,4	HFW08	15,8	HFW43	16,4
HF33C	22,4	HFW09	2,7	HFW44	11
HF34C	17,7	HFW10	17,7	HFW45	11,5
HF35C	13,5	HFW11	17,8	HFW46	13,9
HF36C	11,5	HFW12	16	HFW48	13,5
HF40	3,9	HFW14	16,9	HFW49	10,5
HF46C	7,34	HFW15	1,63	HFW50	17,9
HF49C	8,74	HFW16	3,26	HFW51	7,38
HF50C	18,2	HFW17	18,6	HFW52	14,9
HF52C	10,2	HFW18	3,66	HFW53	16,5
HF53C	14,1	HFW19	23,8		

Nota: Quantificação das bibliotecas concluídas e utilizadas para o sequenciamento. Realizou-se a quantificação utilizando o conjunto de reagentes QUBIT® dsDNA High-Sensitivity Assay (Life Technologies, Forest City, EUA). Os valores serviram de base para diluição da biblioteca para aproximadamente 4 nM.



Figura 6. Perfil de uma biblioteca obtida por eletroforese capilar (Agilent 2200 TapeStation®) bp: pares de bases; A0 (L): padrão de peso molecular; A1: amostra de biblioteca de miRNA com a maioria dos fragmentos entre 173 pb e 181 pb.

Biblioteca	Q30 (%)	Densidade	Clusters PF	Reads (M)	<i>Reads</i> PF
		(K/mm2)	(%)		(M)
1	96,48	1,082 ±32	$86,92 \pm 1.54$	25,0	21,7
2	97,01	1,131 ±111	87,67 ±3.20	26,7	23,4
3	97,00	1,001 ±33	$90,79 \pm 0.69$	23,8	21,6
4	96,68	1,177 ±44	89,37 ±0.79	27,6	24,7
5	97,30	836 ±34	91,93 ±0.76	20,2	18,5
6	96,44	1,328 ±45	$86,53 \pm 1.41$	30,3	26,2
7	96,13	1,379 ±47	$85,88 \pm 1.52$	31,4	26,9
8	95,79	1,331±52	85,12±1.82	29,9	25,5
9	96,55	$1,105\pm44$	89,18±1.13	25,6	22,8
10	97,18	860±36	91,85±1.05	20,5	18,8
11	96,89	1,130±41	89,16±1.07	26,5	23,6
12	96,49	1,075±34	88,55±1.13	25,0	22,1
13	96,19	1,399±42	86,61±1.36	31,8	27,5
14	96,51	1,157±37	88,29±1.58	26,9	23,7

Tabela 7. Parâmetros de qualidade da reação de sequenciamento.

15	96,45	$1,213\pm40$	87,72±1.09	27,5	24,2
16	95,86	1,318±50	85,41±1.29	29,6	25,3

Q30: chance de erro de 1 em 1000 de uma base ter sido inserida errada; M: Milhões; PF: Pass Filter.

4.4.3. Perfil de expressão dos miRNA de exossomos em pacientes HF e controles

A análise do sequenciamento de miRNAs identificou mais de 2000 miRNAs nas amostras de pacientes HF e controles.

Comparou-se o perfil do sequenciamento de miRNA entre o grupo controle e HF. Nessa análise, o miR-122-5p (p=0,003) e o miR-16-5p (p=0,04) (**Figura 7A**) foram diferentemente expressos. Ambos os miRNAs foram regulados positivamente nos pacientes HF em relação ao controle (log2 FC=1,79 e log2 FC=0,42, respectivamente). Salienta-se que o miR-122-5p continuou significativo (p=0,034) após o ajuste do valor de p (**Figura 7B**).

A segunda comparação realizada foi entre o grupo HF+ e HF-. Na **Figura 7C** estão apresentados os *top* 10 miRNAs identificados nesta análise. O miR-21-5p apresentou expressão aumentada no grupo HF+ em relação ao grupo HF- (p=0,044; log2 FC=1,27) (**Figura 7D**). Esse miRNA não continuou significativo após o ajuste do valor de p, porém isso pode ser devido ao número amostral.



Figura 7. Perfil de expressão de miRNAs de exossomos.

A) Análise de agrupamento hierárquica mostrando os 10 miRNAs exossomais mais variáveis entre os grupos HF e controle; B) Perfil de expressão diferencial do hsa-miR-122-5p; C) Análise de agrupamento hierárquica mostrando os 10 miRNAs exossomais mais variáveis entre os grupos HF+ e HF-; D) Perfil de expressão diferencial do hsa-miR-21-5p.

Realizou-se a comparação entre pacientes HF+ e HF- em relação ao controle (**Figura 8**). Na **Figura 8A**, está apresentada a análise hierárquica entre o grupo HF+ e o grupo controle. Novamente o hsa-miR-21-5p apresentou expressão aumentada no grupo HF+ (p=0,033; log2 FC=1,37) (**Figura 8B**), indicando que este miRNA pode ser um potencial biomarcador de diagnóstico molecular positivo para HF. Na **Figura 8C**, está apresentada o heatmap indicando os top 10 miRNA mais variáveis na comparação entre o grupo HF- e o grupo controle. Nessa análise, o hsa-miR-122-5p foi significantemente aumentado (log2 FC=1,87) no HF- (p=0,002), continuando significativo após o ajuste do valor de p (p=0,029) (**Figura 8D**), indicando que este miRNA em exossomos pode ser um importante biomarcador para o diagnóstico de HF, inclusive em pacientes com diagnóstico molecular negativo.



Figura 8. Perfil de expressão de miRNAs de exossomos entre pacientes HF+ e HF- comparado ao controle. A) Análise de agrupamento hierárquica mostrando os 10 miRNAs exossomais mais variáveis entre os grupos HF+ e controle; B) Perfil de expressão diferencial do hsa-miR-21-5p; C) Análise de agrupamento hierárquica mostrando os 10 miRNAs exossomais mais variáveis entre os grupos HF- e controle; D) Perfil de expressão diferencial do hsa-miR-21-5p; C) Análise de agrupamento hierárquica mostrando hsa-miR-122-5p.

A análise de correlação foi realizada utilizando miRNAs diferentemente expressos nos exossomos e o perfil lipídico de pacientes HF e controles (**Tabela 8**).

Tabela 8. Análise de correlação de Spearman dos miRNAs diferentemente expressos nos exossomos e o perfil lipídico.

miRNAs	Correlação	Colesterol	LDL-c	HDL-c	VLDL-c	Triacilg	Apo AI	Apo B
		total				liceróis		
hsa-miR-	r	0,217	0,180	-0,239	0,396	0,406	-0082	0,280
122-5p	p-valor	0,079	0,122	0,059	0,004	0,003	0,300	0,035
	r	0,452	0,507	-0,405	0,336	0,332	-0,307	0,441

hsa-miR-	p-valor	0,002	<0,001	0,004	0,016	0,017	0,029	0,002
21-5p								

Nota: LDL-c: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-c: colesterol da lipoproteína de alta densidade; VLDL-c: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; Apo AI: Apolipoproteína AI; Apo B: Apolipoproteína B.

O hsa-miR-122-5p foi positivamente correlacionado com VLDL-c (r = 0,396; p = 0,004), triacilgliceróis (r = 0,406; p = 0,003) e Apo B (r = 0,280; p = 0,035).

O hsa-miR-21-5p foi positivamente correlacionado com o colesterol total (r = 0,452; p = 0,002), LDL-c (r = 0,507; p <0,001), VLDL-c (r = 0,336; p = 0,016), triacilgliceróis (r = 0,332; p = 0,017) e Apo B (r = 0,441; p = 0,002) e foi negativamente correlacionado com HDL-c (r = -0,405; p = 0,004) e Apo AI (r = -0,307; p = 0,029).

4.5. Proteômica

4.5.1. Caracterização de exossomos isolados por SEC

A caracterização de exososmos isoladas por SEC mostrou que estes possuem tamanho esperado (50-150nm) e os marcadores de exossomos (CD9, CD63 e CD81) foram identificados nas amostras isoladas por esse método. Além disso, a análise de microscopia também mostrou que as partículas possuem tamanho e integridade dentro da qualidade adequados (**Figura 9**).



Figura 9. Caracterização de exossomos plasmáticos isolados por cromatografia de exclusão de tamanho (SEC).

A) Análise de rastreamento de nanopartículas de tamanho (nm) e concentração de exossomos humanos em amostras de plasma usadas para proteômica. Barras de erro vermelhas indicam ± erro padrão da média. B) Western blotting. C) Microscopia eletrônica de transmissão; barra de erro: 100 nm. D) Imagens representativas de exossomos obtidas usando a plataforma ExoView R100. Os painéis mostram captura de CD63 +, CD9 +, CD81 + e IgG-, respectivamente.

4.5.2. Análise Proteômica

A análise proteômica identificou 300 proteínas nas amostras analisadas de ambos, pacientes HF e controles. Destas 300 proteínas identificadas, um montante de 284 estão presentes tanto em exossomos isolados, quanto no plasma total. Adicionalmente, deste montante de 284 proteínas, 11 proteínas foram exclusivamente identificadas no plasma e 5 em exossomos (**Figura 10A**). Porém, a quantidade observada, de grande parte das 284 proteínas identificada, foi diferente entre as amostras de plasma e exossomos (**Figura 10B**). Além disso, através de uma análise do perfil quantitativo entre amostras de plasma e de exossomos, foram identificadas 239 proteínas significantemente diferentes entre estas amostras (p<0,05 e q \leq 0,061) (**Figura 10C**). A lista de todas as proteínas desta análise está apresentada na **Tabela suplementar 1**.





A) Diagrama de Venn comparando proteômica de plasma e exossomos dos mesmos pacientes. n = 300 proteínas com 2 ou mais peptídeos únicos. B) Gráficos de PCA usando todas as 300 proteínas coloridas com base na amostra (plasma ou exossomos) ou grupo de estudo (HF ou controle). C) Análise de agrupamento hierárquico usando uma comparação de dois grupos: exossomos plasmáticos versus proteína plasmática total (n = 239 proteínas com p <0,05 e q≤0,061 que diferenciam os dois grupos). Inserido, é uma visão ampliada de proteínas que são frequentemente identificadas em exossomos de acordo com a Vesiclepedia.

Uma vez que o perfil quantitativo entre plasma e exossomos foi identificado, foi realizada a análise diferencial das proteínas, tanto em plasma e quanto em exossomos, entre os grupos HF e controle (**Figura 11**).

Em exossomos, foram identificadas 38 proteínas com um perfil quantitativo significativamente diferente entre os pacientes HF e o grupo controle (p<0,05 e q \leq 0,048). No plasma total, um total de 31 proteínas apresentaram um perfil quantitativo significativamente diferente entre os pacientes HF e o grupo controle (p<0,05 e q \leq 0,461) (**Figura 11A**; **Tabela suplementar 1 e 2**).

Essas proteínas com perfil quantitativo e significantemente diferentes entre os grupos HF e controle foram comparadas com o objetivo de identificar a presença mútua ou exclusiva em exossomos e/ou plasma, com base no criterio estabelecido anteriormente (p<0,05; q \leq 0,048 e q \leq 0,461, respectivamente). Assim, observamos que, 22 proteínas atenderam o critério apenas no plasma, 9 proteínas simultaneamente no plasma e nos exossomos e um total de 29 atenderam os critérios apenas nos exossomos (**Figura 11B**).

Na **Figura 11C**, estão apresentados dois gráficos, um para pacientes HF e outro para controles, onde foram mostradas análises comparativas entre a quantidade de proteínas no plasma total e exossomos para os grupos estudados, respectivamente.



Figura 11. Análise de enriquecimento diferencial de proteínas do plasma e exossomos em HF versus controle.

A) Análise de agrupamento hierárquico usando uma comparação de dois grupos do estudo: HF e controle. 1-Exossomos: n = 38 proteínas; p < 0.05 e q ≤ 0.048 . 2- Plasma: n = 31 proteínas; p < 0.05 e q ≤ 0.461 . B) Diagrama de Venn comparando as proteínas mostradas em A. C) Gráficos comparando as quantidades de proteínas no plasma total e em exossomos mostradas em B para os grupos HF e controle.

Das 38 proteínas dos exossomos com perfil quantitativo diferente entre HF e controle (p<0,05; $q\le0,048$; 22 em exossomos; 9 em exossomos e plasma), dezoito proteínas apresentaram maior quantidade nos exossomos em comparação com o plasma (**Figura 12**), indicando que essas proteínas são transportadas por exossomos e não são contaminantes do plasma. Destas, oito proteínas (SAA2-SAA4, P4HB, CFHR4, PCYOX1, Apo D, Apo F, APMAP, CLU) apresentam maior quantidade e dez proteínas (MBL2, IGHM, CD5L, IGHV3-73, IGKV2D-24, PTGDS, COLEC10, FGL1, TUBA1C, MASP1) apresentaram menor quantidade em pacientes com HF em comparação com o controle.



Figura 12. Proteínas (n = 18) em maior quantidade nos exossomos do que no plasma e significativamente diferentes em quantidade entre pacientes com HF e controle.

* p <0,05 comparando HF e controle; #p <0,05 comparando exossomos e plasma; ## p <0,01 comparando exossomos e plasma. SAA2-SAA4: *SAA2-SAA4 Readthrough*; P4HB: Subunidade Beta da Prolil 4-Hidroxilase; CFHR4: Proteína 4 relacionada ao Fator H; PCYOX1: Prenilcisteína Oxidase 1; Apo D: Apolipoproteína D; Apo F: Apolipoproteína F; APMAP: Proteína Associada à Membrana do Plasma Adipócito; CLU: Clusterin; MBL2: Lectina 2 de ligação à manose; IGHM: Immunoglobulin Heavy Constant Mu; CD5L: semelhante à molécula de CD5; IGHV3-73: Variável pesada de imunoglobulina 3-73; IGKV2D-24: Variável de imunoglobulina Kappa 2D-24; PTGDS: Prostaglandina D2 Sintase; COLEC10: Membro da subfamília Collectin-10; FGL1: Proteína 1 semelhante ao fibrinogênio; TUBA1C: Cadeia alfa-1C da tubulina; MASP1: Serina protease 1 associada à manose.

A análise de correlação foi realizada utilizando as proteínas com maior quantidade nos exossomos (apresentadas na Figura 12) e as concentrações de colesterol em lipoproteínas e triacilgliceróis em amostras de pacientes HF e controles (**Tabela 9**).

Tabela 9. Análise de correlação de Spearman das proteínas com maior quantidade nos exossomos e o perfil lipídico.

Proteínas	Correlação	Colesterol	LDLc-	HDL-c	VLDL-c	Triacilg	Apo AI	Apo B
		total				liceróis		
SAA2-	r	0,737	0,716	-0,141	0,583	0,590	-0,167	0,765
SAA4	p-valor	<0,001	<0,001	0,554	0,007	0,006	0,495	<0,00
								1
P4HB	r	0,364	0,312	-0,261	0,435	0,434	-0,144	0,414
	p-valor	0,115	0,181	0,266	0,055	0,056	0,557	0,078
CFHR4	r	0,533	0,573	-0,425	0,598	0,599	-0,448	0,617
	p-valor	0,016	0,008	0,062	0,005	0,005	0,054	0,005
PCYOX1	r	0,501	0,399	-0,081	0,628	0,630	-0,089	0,477
	p-valor	0,024	0,082	0,733	0,003	0,003	0,718	0,039
APOD	r	0,721	0,721	-0,213	0,498	0,503	-0,310	0,783
	p-valor	<0,001	<0,001	0,367	0,025	0,024	0,197	<0,00
								1
APOF	r	0,621	0,674	0,072	0,257	0,254	-0,211	0,581
	p-valor	0,004	0,001	0,762	0,275	0,279	0,385	0,009
APMAP	r	0,679	0,626	-0,249	0,464	0,467	-0,348	0,594
	p-valor	0,001	0,003	0,289	0,039	0,038	0,144	0,007
CLU	r	0,229	0,152	0,056	0,339	0,339	0,063	0,120
	p-valor	0,331	0,522	0,816	0,144	0,143	0,797	0,624

MBL2	r	-0,657	-0,619	-0,221	-0,054	-0,056	-0,032	-0,353
	p-valor	0,002	0,004	0,350	0,821	0,813	0,898	0,138
IGHM	r	-0,426	-0,372	-0,001	-0,279	-0,278	0,285	-0,343
	p-valor	0,061	0,106	0,997	0,233	0,236	0,237	0,150
CD5L	r	-0,106	-0,140	0,252	-0,206	-0,199	0,338	-0,148
	p-valor	0,656	0,556	0,283	0,383	0,400	0,157	0,545
IGHV3-	r	-0,263	-0,245	-0,092	-0,150	-0,147	0,226	-0,381
73	p-valor	0,262	0,297	0,700	0,527	0,535	0,353	0,108
IGKV2D	r	-0,548	-0,553	-0,103	-0,221	-0,226	0,139	-0,403
-24	p-valor	0,012	0,011	0,665	0,349	0,339	0,571	0,087
PTGDS	r	-0,569	-0,530	0,132	-0,338	-0,329	0,376	-0,421
	p-valor	0,009	0,016	0,578	0,145	0,156	0,112	0,072
COLEC1	r	-0,458	-0,579	0,065	-0,226	-0,221	0,252	-0,441
0	p-valor	0,042	0,007	0,786	0,337	0,349	0,298	0,058
FGL1	r	-0,564	-0,639	0,253	-0,340	-0,344	0,300	-0,672
	p-valor	0,023	0,008	0,344	0,198	0,192	0,277	0,006
TUBA1C	r	-0,545	-0,554	0,115	-0,558	-0,550	0,192	-0,537
	p-valor	0,013	0,011	0,629	0,011	0,012	0,431	0,018
MASP1	r	-0,420	-0,462	-0,040	-0,267	-0,263	0,082	-0,326
	p-valor	0,065	0,040	0,867	0,255	0,264	0,740	0,173

Nota: LDL-c: colesterol da lipoproteína de baixa densidade; HDL-c: colesterol da lipoproteína de alta densidade; VLDL-c: colesterol da lipoproteína de muito baixa densidade; Apo AI: Apolipoproteína AI; Apo B: Apolipoproteína B; SAA2-SAA4: *SAA2-SAA4 Readthrough*; P4HB: Subunidade Beta da Prolil 4-Hidroxilase; CFHR4: Proteína 4 relacionada ao Fator H; PCYOX1: Prenilcisteína Oxidase 1; APOD: Apolipoproteína D; APO F: Apolipoproteína F; APMAP: Proteína Associada à Membrana do Plasma Adipócito; CLU: Clusterin; MBL2: Lectina 2 de ligação à manose; IGHM: Immunoglobulin Heavy Constant Mu; CD5L: semelhante à molécula de CD5; IGHV3-73: Variável pesada de imunoglobulina 3-73; IGKV2D-24: Variável de imunoglobulina Kappa 2D-24; PTGDS: Prostaglandina D2 Sintase; COLEC10: Membro da subfamília Collectin-10; FGL1: Proteína 1 semelhante ao fibrinogênio; TUBA1C: Cadeia alfa-1C da tubulina; MASP1: Serina protease 1 associada à manose.

SAA2-SAA4 (do inglês *SAA2-SAA4 Readthrough*) foi positivamente correlacionado com o valor de colesterol total (r = 0,737, p <0,001), LDL-c (r = 0,716, p <0,001), VLDL-c (r = 0,583, p = 0,007), triacilgliceróis (r = 0,590, p = 0,006) e Apo B (r = 0,765, p <0,001). CFHR4 foi positivamente correlacionado com valor de colesterol total (r = 0,533, p = 0,016), LDL-c (r = 0,573, p = 0,008), VLDL-c (r = 0,598, p = 0,005), triacilgliceróis (r = 0,599, p = 0,005) e Apo B (r = 0,617, p = 0,004). PCYOX1 foi positivamente correlacionado com colesterol total (r = 0,501, p = 0,024), VLDL-c (r = 0,628, p = 0,003), triacilgliceróis (r = 0,630, p = 0,003) e Apo B (r = 0,477, p = 0,039). Apo D foi positivamente correlacionado com o valor de colesterol
total (r = 0,721, p <0,001), LDL-c (r = 0,722, p <0,001), VLDL-c (r = 0,498, p = 0,025), triacilglicerol (r = 0,503, p = 0,024), Apo B (r = 0,783, p <0,001). Apo F foi positivamente correlacionado com colesterol total (r = 0,621, p = 0,004), LDL-c (r = 0,674, p = 0,001), Apo B (r = 0,581, p = 0,009). APMAP foi positivamente correlacionado com colesterol total (r = 0,679, p = 0,001), LDL-c (r = 0,626, p = 0,003), VLDL-c (r = 0,464, p = 0,039), triacilglicerol (r = 0,467, p = 0,038) e Apo B (r = 0,594, p = 0,007).

MBL2 (Lectina 2 de ligação à manose) foi negativamente correlacionado com valor de colesterol total (r = -0,657, p = 0,002) e LDL-c (r = -0,619, p = 0,004). IGKV2D-24 foi negativamente correlacionada com valor de colesterol total (r = -0,548, p = 0,012) e LDL-c (r = -0,553, p = 0,011). PTGDS foi negativamente correlacionado com o valor de colesterol total (r = -0,569, p = 0,009) e LDL-c (r = -0,530, p = 0,016). COLEC10 foi negativamente correlacionado com valor de colesterol total (r = -0,569, p = 0,009) e LDL-c (r = -0,530, p = 0,016). COLEC10 foi negativamente correlacionado com valor de colesterol total (r = -0,458, p = 0,042) e LDL-c (r = -0,579, p = 0,007). FGL1 foi negativamente correlacionado com valor de colesterol total (r = -0,672, p = 0,006). TUBA1C foi negativamente correlacionado com o valor de colesterol total (r = -0,545, p = 0,013), LDL-c (r = -0,554, p = 0,011), VLDL-c (r = -0,558, p = 0,011), triacilglicerol (r = -0,550, p = 0,012) e Apo B (r = -0,537, p = 0,018). MASP1 foi negativamente correlacionado com LDL-c (r = -0,462, p = 0,040).

A análise de enriquecimento por bioinformática utilizando as proteínas com maior quantidade em exossomos, significantemente diferentes entre os grupos HF e controle e significativamente correlacionadas com o perfil lipídico foi mostrada na **Figura 13**. Essas proteínas são as proteínas de entrada (*input*) no STRING (n=13). A associação dessas proteínas e a pontuação de confiança foram mostradas na **Figura 13A**. Todas as pontuações variam de 0 a 1, sendo 1 a de maior confiança possível.

A rede de predição construída pelo STRING utilizando as proteínas de entrada identificadas neste estudo foi expandida com mais 10 proteínas (C4A, C4B, CRP, C3, FCN2, FCN3, PTX3, CETP, TUBA1B, MASP) que possuíram associação com alta pontuação de confiança (0,700) (**Figura 13B**). Com isso, um maior número de associações proteína-proteína foi identificado e que contribuiu para interpretar as funções moleculares das proteínas identificadas neste estudo.

Interessantemente, essas proteínas, de acordo com análise do ENRICHR, foram associadas com algumas funções moleculares relacionadas ao metabolismo do colesterol, tais

como: ligação ao colesterol, LDL e esterol, atividade de arilesterase e atividade de transferência de colesterol (**Figura 13C**).



Ligação de GTP (GO: 0005525)

Atividade de transferência de colesterol (GO: 0120020)

Figura 13. Análise de enriquecimento usando as proteínas mais abundantes em exossomos e correlacionadas com o perfil lipídico.

A) Uma rede em STRING para mostrar associações proteína-proteína e a pontuação de confiança usando as proteínas identificadas neste estudo. B) A rede expandida pelo STRING por um adicional de 10 proteínas relacionadas com as proteínas identificadas neste estudo e com alta confiança (0,700). Linha verde – evidência de

proximidade; Linha azul - evidência de ocorrência simultânea; Linha roxa - evidência experimental de associação; Linha azul clara – predição em banco de dados; Linha preta - evidência de co-expressão. Pontuação de confiança: baixa confiança - 0,150; confiança média - 0,400; alta confiança - 0,700; maior confiança - 0,900. C) Funções metabólicas das proteínas estudadas. SAA2-SAA4: SAA2-SAA4 Readthrough; P4HB: Subunidade Beta da Prolil 4-Hidroxilase; CFHR4: Proteína 4 relacionada ao Fator H; PCYOX1: Prenilcisteína Oxidase 1; APOD: Apolipoproteína D; APO F: Apolipoproteína F; APMAP: Proteína Associada à Membrana do Plasma Adipócito; CLU: Clusterin; MBL2: Lectina 2 de ligação à manose; IGHM: Immunoglobulin Heavy Constant Mu; CD5L: semelhante à molécula de CD5; IGHV3-73: Variável pesada de imunoglobulina 3-73; IGKV2D-24: Variável de imunoglobulina Kappa 2D-24; PTGDS: Prostaglandina D2 Sintase; COLEC10: Membro da subfamília Collectin-10; FGL1: Proteína 1 semelhante ao fibrinogênio; TUBA1C: Cadeia alfa-1C da tubulina; MASP1: Serina protease 1 associada à manose.

4.6. Análise integrativa entre miRNAs e proteínas exossomais

A análise integrativa entre os miRNAs e as proteínas exossomais identificou algumas vias comuns relacionadas ao metabolismo do colesterol, conforme observado na **Figura 14**. Os miRNAs e proteínas dessa via metabólica foram analisados quanto aos processos em que estão envolvidos utilizando o programa MetaCore. Estas moléculas foram relacionadas com a homeostase do colesterol, regulação da atividade da lipoproteína lipase, regulação do processo metabólico dos ácidos graxos e regulação do transporte de colesterol.



Figura 14. Análise integrativa do miR-122-5p e miR-21-5p e proteínas (MBL2, MASP1, CLU, Apo F e Apo D) identificados em exossomos e analisados neste estudo.

Os miRNAs e proteínas, provenientes de exossomos, significativamente identificadas neste estudo foram analisadas no programa MetaCore e resultou nesta rota de interação relacionada com o metabolismo do colesterol. APOD: Apolipoproteína D; APO F: Apolipoproteína F; CLU: Clusterin; MBL2: Lectina 2 de ligação à manose; MASP1: Serina protease 1 associada à manose.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Os resultados referentes aos dados clínicos, biodemográficos e laboratoriais (bioquímicos) dos pacientes HF e controles indicaram variabilidade, como esperado, significativa entre os grupos de pacientes com hipercolesterolemia não caracterizada genotipicamente e controles. Os valores de IMC, do perfil lipídico e glicídico, bem como o número de hipertensos e indivíduos com histórico familiar de HF foi maior no grupo HF total (pacientes com e sem diagnóstico molecular) quando comparado ao grupo de indivíduos normolipidêmicos. Além disso, ambos os grupos foram pareados pela idade, gênero e não uso de estatinas, estabelecendo critérios para menor erro entre os parâmetros, que possam interferir no perfil de miRNAs e proteínas exossomais, para a maior especificidade e confiabilidade dos resultados encontrados. Resultados semelhantes foram observados em estudos que também utilizaram pacientes com HF e controles como casuística, sugerindo uma alta probabilidade de reprodutibilidade dos dados, frente a consistência da casuística avaliada (BATAIS et al., 2019; SUN et al., 2018).

O grupo fenotipicamente caracterizado como HF foi subdividido em dois subgrupos de acordo com a presença (HF+) ou ausência (HF-) de variantes genotípicas relacionadas com o diagnóstico molecular da HF. Variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas presentes em genes do grupo sub classificado como HF+ expressam proteínas que afetam a funcionalidade dos genes, ou seja, interferem nas interações do LDLR com APOB, PCSK9 ou LDLRAP1 (CHORA et al., 2018). O subgrupo classificado como HF- carreia variantes benignas, provavelmente benignas ou variantes de significado incerto, que embora tenham formas menos graves de HF, podem conferir risco, pois podem estar envolvidas no processo regulatório que altera a função ou estrutura das proteínas (SUN; YU, 2019). Assim, a análise das diferenças entre esses dois grupos pode contribuir numa melhor interpretação e no entendimento dos mecanismos relacionados com a HF.

Nesse estudo, os grupos HF+ e HF- mostraram similaridade em relação aos dados clínicos e biodemográficos, corroborando com um estudo anterior que também utilizou pacientes brasileiros como casuística (LORENZO et al., 2017). Em relação aos dados laboratoriais, observa-se que as concentrações de colesterol total, LDL-c e Apo B foram significativamente maiores em pacientes HF+, sugerindo maior risco aterogênico. Resultados semelhantes foram mostrados em um estudo anterior com indivíduos do leste da Ásia (CHAN et al., 2019).

Com o objetivo contribuir na melhoria do diagnóstico e na elucidação dos mecanismos moleculares da HF, propomos avaliar por ultrasequenciamento os miRNAs exossomais de pacientes fenotipicamente definidos com HF, assim como estudar o perfil proteico dessas vesículas circulantes isolados a partir de plasma de pacientes HF e normolipidêmicos (controles).

A escolha dos exossomos se justifica devido ser estas vesículas ser constituídas de uma membrana externa metabolicamente ativa, que protege o conteúdo interno e funcionam como mediadores integrais da comunicação célula a célula presentes em vários tecidos e/ou fluidos corporais e participam de processos fisiológicos e patológicos, tornando-os potenciais carreadores de biomarcadores com valor diagnóstico (HUTCHESON; AIKAWA, 2018; NEW; AIKAWA, 2013).

Para o isolamento das vesículas extracelulares, foram utilizadas duas metodologias diferentes – precipitação química e cromatografia por exclusão de tamanho - sendo ambas recomendadas na literatura (CHEN et al., 2022; YANG et al., 2020). Os dois métodos apresentaram resultados de caracterização similares, observou-se que a distribuição do tamanho das partículas foi homogênea nas amostras (~95 nm), a presença de marcadores como CD63, CD9 e CD81 e as vesículas estavam íntegras na análise de microscopia eletrônica. Essas caracterizações confirmaram que as vesículas isoladas eram exossomos, pois de acordo com a literatura, exossomos são partículas liberadas naturalmente das células que são delimitadas por uma bicamada lipídica que possuem de 50-150 nm de tamanho e são positivas para tetraspaninas (CD63, CD9, CD81) (DE FREITAS et al., 2021; SANZ-RUBIO et al., 2018; THÉRY et al., 2018).

A avaliação do perfil de expressão dos miRNAs exossomais em amostras de plasma de pacientes com HF e controles foi realizada através do NGS. A tecnologia de sequenciamento de alto rendimento está sendo utilizadas cada vez mais para identificação de mecanismo de controle por miRNAs em biofluidos ou tecidos, em diversas condições patológicas (CHEN et al., 2019). Neste estudo, identificamos dois miRNAs (hsa-miR-122-5p e hsa-miR-21-5p) que podem representar importantes reguladores relacionados com a HF e suas complicações cardiovasculares.

O miR-122-5p apresentou elevado valor nos exossomos dos pacientes HF em relação ao controle e no grupo HF- em relação ao controle. O miR-122 tem sido amplamente associado como mediador do metabolismo da lipoproteína, e sua expressão é aumentada no fígado (HAYES; CHAYAMA, 2016; WEN; FRIEDMAN, 2012). Estudos *in vivo* identificaram o miR-122 como um regulador crucial da síntese de colesterol e ácidos graxos e, portanto, da homeostase de lipoproteínas. Notavelmente, a função miR-122 parece ser amplamente necessário para a expressão de genes específicos do hepatócito, ao invés do direcionamento específico das vias do metabolismo lipídico (FEINBERG; MOORE, 2016).

Neste contexto, ele foi descrito como importante participante no metabolismo do colesterol e TG no fígado, regulando direta ou indiretamente a biossíntese e excreção destes. A diminuição do miR-122 no fígado foi relacionada com a diminuição das concentrações séricas de colesterol total, LDL-c, HDL-c e TG (WEN; FRIEDMAN, 2012). Na HF, ocorre um acúmulo ou aumento de LDL-c no plasma que promove o desenvolvimento de aterosclerose prematura (BENITO-VICENTE et al., 2018). Esses achados corroboram com nossos resultados, pois mostramos que o miR-122 está aumentado nos exossomos plasmáticos de pacientes com HF total em comparação com o controle, o que é sugestivo de uma expressão aumentada também nos hepatócitos, que potencialmente resultou na maior secreção desse miRNA através dos exossomos, porém mais estudos funcionais in vitro ou in vivo devem ser realizados para melhor elucidação desta hipótese. No entanto, nossa hipótese relacionada a associação do perfil de expressão tecidual vs. circulante corrobora com estudo anterior indicando que a desregulação no tecido (fígado) reflete na circulação (MJELLE et al., 2019).

Outro estudo prévio usando modelo animal (camundongos) mostrou que a inibição temporária do miR-122 reduziu o colesterol sérico através da regulação negativa de genes relacionados com o metabolismo do colesterol, como a HMG-CoA redutase (ESAU et al., 2006). Interessantemente, em um estudo com humanos, camundongos e hepatócitos murinos primários, as concentrações séricas de miR-122 também foram correlacionadas positivamente com o colesterol total, LDL-c, e diminuem substancialmente com a terapia com estatinas utilizada no tratamento da HF (atorvastatina 10 mg) (WILLEIT et al., 2017), reforçando a importância do *wash-out* realizado nesse estudo. Assim, o aumento desse miR-122 em exossomos em pacientes HF (com e sem diagnóstico molecular de HF) deste estudo, pode estar associado com o aumento do LDL-c na circulação. A correlação positiva encontrada entre LDL-c e o miR-122 fortalece nossa hipótese do papel do miRNA no metabolismo de lipídios na HF.

Na HF, o miR-122 tem sido estudado como potencial alvo terapêutico e atingiu a fase 2 de desenvolvimento de ensaio clínico (MOMTAZI et al., 2018). Interessantemente, o tratamento de camundongos com três doses intravenosas de 80 mg/kg de antagonista de miR-122 resultou na diminuição de alvos diretos do miR-122 no fígado com consequente redução

de 40% da concentração sérica de colesterol (KRÜTZFELDT et al., 2005; ROOIJ; KAUPPINEN, 2014).

O miR-122-5p também foi relacionado com complicações cardiovasculares. Recente estudo mostrou que o miR-122-5p em exossomos do soro pode ser útil como biomarcador para diagnóstico de infarto agudo do miocárdio e angina instável, e o aumento desse miRNA sérico pode ser usado para prever a gravidade das lesões coronarianas (LING et al., 2020).

Assim, miR-122-5p pode representar um potencial biomarcador que pode contribuir com diagnóstico precoce da HF, bem como suas complicações cardiovasculares associadas ao perfil lipídico da HF, contribuindo para a melhor compreensão das bases moleculares da doença e potencialmente indicando novos mecanismos moleculares que explicam as diversas manifestações fenotípicas da hipercolesterolemia. Além disso, o miR-122 tem surgido como um potencial alvo terapêutico para a HF (MOMTAZI et al., 2018).

O miR-21-5p mostrou-se aumentado em pacientes com diagnóstico molecular de HF (HF+) comparado tanto com os pacientes sem diagnóstico molecular de HF (HF-) e com controles. O grupo HF+ apresentam o fenótipo mais severo da doença e consequentemente, maior risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, particularmente aquelas associadas a formação de placas ateroscleróticas (SUN; YU, 2019).

O aumento do miR-21 tem sido relacionado com condições inflamatórias crônicas e várias doenças cardiovasculares, incluindo aterosclerose (SHEEDY, 2015). Um estudo prévio observou que o miR-21 pode ser exportado do tecido para a circulação através de exossomos com uma correlação positiva consistente entre as duas origens da amostra (MJELLE et al., 2019).

A expressão aumentada do miR-21-5p foi também identificado em um modelo senescente induzido por ox-LDL de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) e em ratos hiperlipidêmicos. A disfunção endotelial na hiperlipidemia é um fator importante que está relacionado com muitas doenças cardiovasculares, como por exemplo, aterosclerose, acidente vascular cerebral e doença coronariana. Além disso, foi observada uma inibição da expressão do miR-21-5p após tratamento com atorvastatina (ZHANG et al., 2018).

A expressão do miR-21 foi reportada como aumentada em camundongos $ApoE^{-}/^{-}$, um modelo de estudo para hipercolesterolemia e aterosclerose. Os autores observaram que a inibição do miR-21 protegeu parcialmente contra o desenvolvimento precoce de aterosclerose, eles sugeriram que o miR-21 inibiria o influxo de macrófagos derivados de monócitos na lesão em formação e limitaria o a apoptose de macrófagos, protegendo assim contra a formação

precoce de aterosclerose (CHIPONT et al., 2019). Nossos achados associados a aqueles publicados previamente, podem sugerir que o miR-21 também teria potencial para ser estudado como um alvo terapêutico.

Os exossomos também carreiam proteínas que podem estar envolvidas em várias doenças, incluindo HF (DE FREITAS et al., 2021; ROGERS et al., 2020; ZHANG et al., 2016). A proteômica quantitativa surgiu como uma ferramenta promissora para identificar proteínas diferencialmente expressas em vários processos biológicos. O conhecimento da proteômica de exossomos pode contribuir não só na sua função fisiológica, mas também serem novos biomarcadores, ou potenciais alvo molecular em novas abordagens terapêutica. Identificamos potenciais proteínas em exossomos que podem estar relacionadas ao HF neste estudo, pois foram correlacionadas com o perfil lipídico e funções moleculares relacionadas ao metabolismo lipídico (Figura 13).

A proteína SAA2-SAA4 (do inglês: *SAA2-SAA4 Readthrough*) mostrou-se elevada nos exossomos dos pacientes com HF em comparação com o controle e teve uma correlação positiva com CT, LDL-c, VLDL-c, TG e Apo B (Tabela 9), sugerindo um possível envolvimento dessa proteína no metabolismo do colesterol. O SAA2-SAA4 foi previamente identificado em VLDL / LDL / HDL de humanos, porém sua função permanece desconhecida (LIN et al., 2021).

A proteína CFHR4 (proteína 4 relacionada ao fator de complemento H) foi quantitativamente maior em exossomos de pacientes com HF em comparação com o controle e foi correlacionada positivamente com CT, LDL-c, VLDL-c, TG e Apo B (Tabela 9), o que pode indicar associação com HF. Estudos anteriores corroboram nosso achado, uma vez que mostraram que CFHR4 é associada com lipoproteínas como quilomícrons, LDL e VLDL, e pode desempenhar um papel no metabolismo lipídico, porém sua relevância neste contexto é ainda desconhecida (JÓZSI; MERI, 2014; JÓZSI; ZIPFEL, 2008; SKERKA; ZIPFEL, 2008).

A proteína PCYOX1 (prenilcisteína oxidase 1) mostrou-se aumentada em exossomos plasmáticos dos pacientes HF em comparação com o controle e correlacionada positivamente com o CT, VLDL-c, TG e Apo B. Dois estudos recentes sugeriram o papel da PCYOX1 como um componente emergente na aterosclerose (BANFI et al., 2021a, 2021b), eles forneceram evidências de que a enzima pró-oxidante PCYOX1 nas lesões ateroscleróticas humanas, é sintetizada localmente e transportada dentro do espaço subintimal por acúmulo de lipoproteínas pró-aterogênicas na parede arterial durante a aterogênese. A PCYOX1 apresentou maior

quantidade em exossomos de pacientes com HF em relação ao controle, sugerindo que essa proteína em exossomos poderia ser potencialmente um biomarcador de aterosclerose nesses pacientes. Adicionalmente, neste estudo 12% dos pacientes HF, até o momento da coleta dos dados, tiveram DAC, sendo este um dado significativo quando comparado ao grupo controle. Apesar de futuros estudos de reanalises serem necessários, para comprovar essa hipótese, esses resultados encontrados representam um dado promissor na buscar de novos biomarcadores em doenças cardiometabólicas.

A apolipoproteina D (Apo D) ocorre no complexo macromolecular com lecitinacolesterol aciltransferase, enzima chave no transporte reverso do colesterol pela HDL. Provavelmente está envolvido no transporte e ligação da bilina (RASSART et al., 2000). A quantidade de Apo D também foi aumentada em exossomos de pacientes com HF em comparação com o controle e teve correlação positiva com o perfil lipídico (CT, LDL-c, VLDLc, TG, Apo B). Um estudo revisou a implicação funcional do Apo D na aterosclerose e descreveu que o aumento da deposição de Apo D é detectável em lesões ateroscleróticas de humanos com doença cardiovascular estabelecida (PERDOMO; DONG, 2008). Em indivíduos que sofrem de infarto do miocárdio, foi identificada a presença de Apo D em vesículas extracelulares circulantes e sugeriram que esta apolipoproteína poderia ser um potencial biomarcador de dano miocárdico (CHEOW et al., 2016; FEMMINÒ et al., 2020). Assim, Apo D transportado por exossomos, dependendo da origem, pode ser um marcador de complicações clínicas relacionadas à HF, como a doença arterial coronariana (DAC).

A apolipoproteina F (Apo F) é uma apolipoproteína secundária que se associa com a LDL, inibe a atividade da proteína de transferência de éster de colesterol (CETP) e pode ser um importante regulador do transporte de colesterol (LIU; MORTON, 2020). A função do Apo F está de acordo com nossos achados pois mostramos que essa Apolipoproteína apresentou maior quantidade em exossomos de pacientes com HF em comparação com o controle e mostrou correlação positiva com concentração de CT, LDL-c, Apo B.

A proteína APMAP (proteína associada à membrana plasmática dos adipócitos) apresentou maior quantidade em exossomos de pacientes com HF em comparação com o controle e foi positivamente correlacionada com o perfil lipídico (CT, LDL-c, VLDL-c, TG e Apo B). A APMAP é uma espécie de proteína transmembrana que aumenta gradualmente conforme o processo de adipogênese e altamente expressa no tecido adiposo maduro (PESSENTHEINER et al., 2017; ZHONG et al., 2020). O adipócito desempenha um papel

essencial no desenvolvimento da resistência à insulina e a resistência à insulina está associada à hipertensão, hipercolesterolemia, dislipidemia (ALI et al., 2013). Portanto, o APMAP pode estar contribuindo para o desenvolvimento da HF nesses pacientes. Além disso, considerando que os pacientes com HF deste estudo apresentaram significativamente maior IMC, maior concentração de triacilgliceróis e maior número de diabéticos tipo 2, essa proteína poderia estar contribuindo mais efetivamente com esses resultados e não só com a HF.

A proteína MBL2 (lectina 2 de ligação à manose) foi negativamente correlacionada com CT e LDL-c e apresentou-se em menor quantidade nos exossomos do grupo HF em comparação com o grupo controle. A MBL é um importante fator de ativação da via da lectina do sistema complemento (ALIPOUR et al., 2011) e as concentrações séricas da MBL2 têm sido associadas ao aumento e redução do risco de aterosclerose e doença arterial coronariana em diferentes populações (KELLER et al., 2006; VENGEN et al., 2012).

A proteína IGKV2D-24 (Variável de imunoglobulina Kappa 2D-24) foi negativamente correlacionada com CT e LDL-c e foi diminuído em exossomos de pacientes com HF em comparação com o controle. Esta é a primeira vez que IGK2D-24 foi correlacionado com CT e LDL-c e não há relato na literatura sobre a associação dessa proteína com HF, portanto, mais estudos precisam ser desenvolvidos para melhor entendimento da função desta proteína. A literatura mostra que esta proteína está envolvida com a resposta imune e sua função pode ser afetada pela deficiência de cistationina β -sintase (CBS), um erro inato do metabolismo que está associada com o tromboembolismo vascular e pode auxiliar a explicar doenças cardiovasculares e neurológicas (SIKORA et al., 2019).

A proteína PTGDS (Prostaglandina D2 sintase) foi negativamente correlacionado com o colesterol total e LDL-c e foi reduzido em pacientes com HF em comparação com o controle. Esses achados estão de acordo com a literatura porque PTGDS é uma enzima responsável pela biossíntese de prostaglandina D2 (PGD2), e a produção de PGD2 mediada por PTGDS promove a sobrevivência dos cardiomiócitos e contribui para prevenir doenças cardíacas (OAKLEY et al., 2013).

A proteína COLEC10 (Membro da subfamília Collectin-10) foi negativamente correlacionado com colesterol total e LDL-c. A COLEC10 é uma glicoproteína que pode ligar galactose e manose. A COLEC10 tem potencial para o diagnóstico de doenças, uma vez que é secretado no sangue e sua concentração média é de cerca de 280–340 ng/mL no corpo humano saudável. A variação de sua concentração no soro pode ser útil para o diagnóstico de doenças

cardíacas (YANG et al., 2015). No presente estudo, a COLEC10 foi quantitativamente maior em exossomos do grupo controle em comparação com HF. Portanto, mais estudos precisam ser realizados utilizando essa proteína para identificar seu papel na HF.

A proteína FGL1 (Proteína 1 semelhante ao fibrinogênio) foi negativamente correlacionado com colesterol total, LDL-c e Apo B. A quantidade de FGL1 foi menor em exossomos de pacientes com HF do que o controle, no entanto, um estudo anterior identificou um aumento desta proteína em modelo de ratos hiperlipidêmicos em comparação com o controle, sugerindo um papel importante da FGL1 na regulação do metabolismo lipídico (LI et al., 2016). Mais estudos devem ser realizados utilizando essa proteína para identificar seu papel no metabolismo lipídico.

A proteína TUBA1C (Cadeia alfa-1C da tubulina) foi negativamente correlacionado com o perfil lipídico e diminuiu em pacientes com HF em comparação com o grupo controle. Estudos anteriores identificaram o TUBA1C em exossomos derivados do tecido adiposo e relacionaram o TUBA1C a distúrbios do sistema endócrino, doenças metabólicas e diabetes tipo 2 (HARTWIG et al., 2019; ŻBIKOWSKI et al., 2021). Este é o primeiro estudo a vincular TUBA1C a HF, portanto, mais estudos precisam ser realizados para elucidar o papel desta proteína na dislipidemia e doenças cardiovasculares.

A proteína MASP1 (Serina protease 1 associada à manose) foi negativamente correlacionado com LDL-c e em menor quantidade em exossomos de pacientes com HF do que o controle. MASP1 é a protease mais abundante da via da lectina do complemento e inicia a ativação da via da lectina clivando a MASP2 (DOBÓ et al., 2014). A interação entre MASP1 e coagulação parece agravar os processos fisiopatológicos, promover o desenvolvimento de aterosclerose e aterotrombose e levar a complicações mais graves (DUEHRKOP; RIEBEN, 2014; FRAUENKNECHT; SCHROEDER, 2012). Apesar de nossos achados não corroborarem com a hipótese do risco associado ao aumento da MASP1 e riscos de DAC, estudos clínicos, com foco em pacientes com DAC versus controles poderiam ser mais elucidativos para descrever o papel desta proteína.

A análise das proteínas e suas interações funcionais são importantes na pesquisa dos mecanismos moleculares relacionados às doenças. A rede de conectividade de proteínas precisa ser considerada para o completo entendimento do processo biológico (SZKLARCZYK et al., 2019). Como no presente estudo, a análise da rede de interações de proteínas foi relacionada

com diversas funções moleculares importantes que podem auxiliar no entendimento da fisiopatologia da HF.

Apesar de nossos relevantes achados, a maior limitação do estudo foi o n amostral, principalmente na análise da proteômica. Um casuística maior poderia aumentar a significância dos resultados estatísticos já encontrados. Além disso, os métodos de isolamento de exossomos foram diferentes para a análise de miRNAs e proteínas, porém, para minimizar essa limitação, realizamos várias caracterizações dos exossomos em ambos os protocolos, de formar a garantir a reprodutibilidade de ambos resultados.

Assim, nossos dados revelaram que o miR-122-5p apresenta uma expressão aumentada em pacientes HF e o miR-21-5p apresentou uma expressão diferencial em pacientes HF+ em relação aos HF-, sugerindo dois potenciais biomarcadores que pode estar envolvido com a fisiopatologia da HF e com a severidade desta. Além disso, identificamos 13 proteínas potencialmente associadas com o metabolismo do colesterol e com o risco de doenças cardiovasculares, um dos principais agravantes da HF. Adicionalmente, as proteínas MBL2, MASP1, CLU, Apo F e Apo D foram integradas as vias dos miRNAs identificados neste estudo, sugerindo uma forte interação funcional das moléculas nas vias do metabolismo do colesterol. Assim, na busca de novos alvos como potenciais biomarcadores de diagnóstico da HF, nossos resultados da análise integrativa entre os miRNAs e as proteínas exossomais, além de colaborarem aos estudos anteriores, com maior riqueza, abre novas frentes de pesquisa mais bem direcionadas, para a validação desses miRNAs e proteínas exossomais.

REFERÊNCIAS

AKIOYAMEN, L. E. et al. Risk factors for cardiovascular disease in heterozygous familial hypercholesterolemia: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 13, n. 1, p. 15–30, 1 jan. 2019.

ALI, A. T. et al. Adipocyte and adipogenesis. **European Journal of Cell Biology**, v. 92, n. 6–7, p. 229–236, 1 jun. 2013.

ALIPOUR, A. et al. Mannose binding lectin 2 haplotypes do not affect the progression of coronary atherosclerosis in men with proven coronary artery disease treated with pravastatin. **Atherosclerosis**, v. 215, n. 1, p. 125–129, 1 mar. 2011.

AMERIZADEH, A. et al. Familial Hypercholesterolemia (FH) Registry Worldwide: A Systematic Review. **Current Problems in Cardiology**, p. 100999, 24 set. 2021.

AMIN, M. M. J.; TREVELYAN, C. J.; TURNER, N. A. MicroRNA-214 in Health and Disease. **Cells**, v. 10, n. 12, p. 3274, 23 nov. 2021.

AMINI, M.; ZAYERI, F.; SALEHI, M. Trend analysis of cardiovascular disease mortality, incidence, and mortality-to-incidence ratio: results from global burden of disease study 2017. **BMC Public Health**, v. 21, n. 1, p. 401, 25 dez. 2021.

ANDRÉS-LEÓN, E.; NÚÑEZ-TORRES, R.; ROJAS, A. M. miARma-Seq: a comprehensive tool for miRNA, mRNA and circRNA analysis. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 25749, 27 maio 2016.

BAIRAKTARI, E. T.; SEFERIADIS, K. I.; ELISAF, M. S. Evaluation of Methods for the Measurement of Low-Density Lipoprotein Cholesterol. Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics, v. 10, n. 1, p. 45–54, 29 jan. 2005.

BANFI, C. et al. Prenylcysteine oxidase 1, A novel player in atherosclerosis. Atherosclerosis, v. 331, p. e18, 1 ago. 2021a.

BANFI, C. et al. Prenylcysteine oxidase 1, an emerging player in atherosclerosis. **Communications Biology**, v. 4, n. 1, p. 1109, 21 dez. 2021b.

BATAIS, M. A. et al. Screening of common genetic variants in the APOB gene related to familial hypercholesterolemia in a Saudi population. **Medicine**, v. 98, n. 4, p. e14247, 1 jan. 2019.

BENITO-VICENTE, A. et al. Familial Hypercholesterolemia: The Most Frequent Cholesterol Metabolism Disorder Caused Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, p. 3426, 1 nov. 2018.

BERBERICH, A. J.; HEGELE, R. A. The complex molecular genetics of familial hypercholesterolaemia. **Nature Reviews Cardiology**, v. 16, n. 1, p. 9–20, 4 jan. 2019.

BEREZIKOV, E. Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 12, p. 846–860, 18 dez. 2011.

BIANCONI, V.; BANACH, M.; PIRRO, M. Why patients with familial hypercholesterolemia are at high cardiovascular risk? Beyond LDL-C levels. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 31, n. 4, p. 205–215, 1 maio 2021.

BOON, R. A.; VICKERS, K. C. Intercellular Transport of MicroRNAs. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, v. 33, n. 2, p. 186–192, 1 fev. 2013.

BORGES, J. B. et al. Genomics, epigenomics and pharmacogenomics of familial hypercholesterolemia (FHBGEP): A study protocol. **Research in Social and Administrative Pharmacy**, v. 17, n. 7, p. 1347–1355, jul. 2021.

BRAUTBAR, A. et al. Genetics of Familial Hypercholesterolemia. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 17, n. 4, p. 20, 25 abr. 2015.

BRONZE-DA-ROCHA, E. MicroRNAs Expression Profiles in Cardiovascular Diseases. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–23, jan. 2014.

BRUNHAM, L. R.; HEGELE, R. A. What Is the Prevalence of Familial Hypercholesterolemia? Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, v. 41, n. 10, p. 2629–2631, out. 2021.

CHAN, M. L.-Y. et al. Genetic variations in familial hypercholesterolemia and cascade screening in East Asians. **Molecular Genetics & Genomic Medicine**, v. 7, n. 2, p. e00520, 1 fev. 2019.

CHANG, S.-N. et al. Association between Exosomal miRNAs and Coronary Artery Disease by Next-Generation Sequencing. **Cells**, v. 11, n. 1, p. 98, 29 dez. 2021.

CHEN, E. Y. et al. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. **BMC Bioinformatics**, v. 14, n. 1, p. 128, 15 dez. 2013.

CHEN, J. et al. Review on Strategies and Technologies for Exosome Isolation and Purification.

Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, v. 9, n. January, p. 1–18, 5 jan. 2022.

CHEN, L. et al. Trends in the development of miRNA bioinformatics tools. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20, n. 5, p. 1836–1852, 27 set. 2019.

CHEN, Y.-T. et al. Microparticles (Exosomes) and Atherosclerosis. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 22, n. 6, p. 23, 28 jun. 2020.

CHEOW, E. S. H. et al. Plasma-derived Extracellular Vesicles Contain Predictive Biomarkers and Potential Therapeutic Targets for Myocardial Ischemic (MI) Injury. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 15, n. 8, p. 2628–2640, 1 ago. 2016.

CHIPONT, A. et al. MicroRNA-21 Deficiency Alters the Survival of Ly-6C lo Monocytes in ApoE –/– Mice and Reduces Early-Stage Atherosclerosis—Brief Report. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, v. 39, n. 2, p. 170–177, 1 fev. 2019.

CHOI, H. et al. Plasma Protein and MicroRNA Biomarkers of Insulin Resistance: A Network-Based Integrative -Omics Analysis. **Frontiers in Physiology**, v. 10, n. APR, 5 abr. 2019.

CHORA, J. R. et al. Analysis of publicly available LDLR, APOB, and PCSK9 variants associated with familial hypercholesterolemia: application of ACMG guidelines and implications for familial hypercholesterolemia diagnosis. **Genetics in Medicine**, v. 20, n. 6, p. 591–598, 26 jun. 2018.

CITRIN, K. M.; FERNÁNDEZ-HERNANDO, C.; SUÁREZ, Y. MicroRNA regulation of cholesterol metabolism. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1495, n. 1, p. 55–77, 31 jul. 2021.

D'AGOSTINO, M. et al. Circulating miR-200c is up-regulated in paediatric patients with familial hypercholesterolaemia and correlates with miR-33a/b levels: implication of a ZEB1-dependent mechanism. **Clinical Science**, v. 131, n. 18, p. 2397–2408, 15 set. 2017.

DANGWAL, S.; THUM, T. MicroRNAs in platelet biogenesis and function. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 108, n. 10, p. 599–604, 29 nov. 2012.

DE FREITAS, R. C. C. et al. Circulating Extracellular Vesicles As Biomarkers and Drug Delivery Vehicles in Cardiovascular Diseases. **Biomolecules**, v. 11, n. 3, p. 388, 5 mar. 2021.

DE GONZALO-CALVO, D. et al. Translating the microRNA signature of microvesicles derived from human coronary artery smooth muscle cells in patients with familial

hypercholesterolemia and coronary artery disease. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, v. 106, p. 55–67, maio 2017.

DOBÓ, J. et al. Multiple roles of complement MASP-1 at the interface of innate immune response and coagulation. **Molecular Immunology**, v. 61, n. 2, p. 69–78, 1 out. 2014.

DOROBANTU, M.; SIMIONESCU, M.; POPA-FOTEA, N.-M. Molecular Research in Cardiovascular Disease. International Journal of Molecular Sciences, v. 22, n. 13, p. 7199, 4 jul. 2021.

DUEHRKOP, C.; RIEBEN, R. Ischemia/reperfusion injury: Effect of simultaneous inhibition of plasma cascade systems versus specific complement inhibition. **Biochemical Pharmacology**, v. 88, n. 1, p. 12–22, 1 mar. 2014.

EIRIN, A. et al. Integrated transcriptomic and proteomic analysis of the molecular cargo of extracellular vesicles derived from porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. **PLOS ONE**, v. 12, n. 3, p. e0174303, 23 mar. 2017.

ELIAS, J. E.; GYGI, S. P. Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. **Nature Methods**, v. 4, n. 3, p. 207–214, 27 mar. 2007.

ESAU, C. et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. **Cell Metabolism**, v. 3, n. 2, p. 87–98, fev. 2006.

FALUDI, A. et al. ATUALIZAÇÃO DA DIRETRIZ BRASILEIRA DE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE - 2017. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 109, n. 1, 2017.

FEINBERG, M. W.; MOORE, K. J. MicroRNA Regulation of Atherosclerosis. Circulation Research, v. 118, n. 4, p. 703–720, 19 fev. 2016.

FEMMINÒ, S. et al. Extracellular vesicles and cardiovascular system: Biomarkers and Cardioprotective Effectors. **Vascular Pharmacology**, v. 135, p. 106790, 1 dez. 2020.

FIGUEIREDO, J.-L. et al. Selective Cathepsin S Inhibition Attenuates Atherosclerosis in Apolipoprotein E–Deficient Mice with Chronic Renal Disease. **The American Journal of Pathology**, v. 185, n. 4, p. 1156–1166, 1 abr. 2015.

FRAHNOW, T. et al. Heritability and responses to high fat diet of plasma lipidomics in a twin

study. Scientific Reports, v. 7, n. 1, p. 3750, 16 dez. 2017.

FRAUENKNECHT, V.; SCHROEDER, V. Das Komplementsystem. **Hämostaseologie**, v. 32, n. 04, p. 276–285, 28 dez. 2012.

FUTEMA, M. et al. Screening for familial hypercholesterolaemia in childhood: Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC). **Atherosclerosis**, v. 260, p. 47–55, maio 2017.

GEBERT, L. F. R.; MACRAE, I. J. Regulation of microRNA function in animals. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 1, p. 21–37, 14 jan. 2019.

GHANBARIAN, H.; YILDIZ, M. T.; TUTAR, Y. MicroRNA Targeting. In: Methods in Molecular Biology. [s.l.] Methods Mol Biol, 2022. v. 2257p. 105–130.

GOEDEKE, L. et al. miRNA regulation of LDL-cholesterol metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1861, n. 12, p. 2047–2052, dez. 2016.

GUAY, S.-P. et al. Epipolymorphisms within lipoprotein genes contribute independently to plasma lipid levels in familial hypercholesterolemia. **Epigenetics**, v. 9, n. 5, p. 718–729, 6 maio 2014.

GUAY, S.-P. et al. A study in familial hypercholesterolemia suggests reduced methylomic plasticity in men with coronary artery disease. **Epigenomics**, v. 7, n. 1, p. 17–34, fev. 2015.

HARTWIG, S. et al. Exosomal proteins constitute an essential part of the human adipose tissue secretome. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1867, n. 12, p. 140172, 1 dez. 2019.

HAYES, C.; CHAYAMA, K. MicroRNAs as Biomarkers for Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 280, 24 fev. 2016.

HENNING, R. J. Cardiovascular Exosomes and MicroRNAs in Cardiovascular Physiology and Pathophysiology. Journal of Cardiovascular Translational Research, v. 14, n. 2, p. 195–212, 25 abr. 2021.

HESSVIK, N. P.; LLORENTE, A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, n. 2, p. 193–208, 21 jan. 2018.

HOWITT, J.; HILL, A. F. Exosomes in the Pathology of Neurodegenerative Diseases. Journal

of Biological Chemistry, v. 291, n. 52, p. 26589–26597, 23 dez. 2016.

HUANG, T.-C.; PINTO, S. M.; PANDEY, A. Proteomics for understanding miRNA biology. **PROTEOMICS**, v. 13, n. 3–4, p. 558–567, fev. 2013.

HULSHOFF, M. S. et al. Epigenetic Regulation of Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Chronic Heart Disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 38, n. 9, p. 1986–1996, set. 2018.

HUTCHESON, J. D.; AIKAWA, E. Extracellular vesicles in cardiovascular homeostasis and disease. **Current Opinion in Cardiology**, v. 33, n. 3, p. 290–297, 1 maio 2018.

ITOU, T. et al. Cystathionine γ-lyase Accelerates Osteoclast Differentiation. **Arteriosclerosis**, **Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 34, n. 3, p. 626–634, mar. 2014.

JANAS, A. M. et al. Exosomes and other extracellular vesicles in neural cells and neurodegenerative diseases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1858, n. 6, p. 1139–1151, jun. 2016.

JANNES, C. E. et al. Familial hypercholesterolemia in Brazil: Cascade screening program, clinical and genetic aspects. **Atherosclerosis**, v. 238, n. 1, p. 101–107, 1 jan. 2015.

JEON, T.-I.; OSBORNE, T. F. miRNA and cholesterol homeostasis. **Biochimica et Biophysica** Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, v. 1861, n. 12, p. 2041–2046, dez. 2016.

JOSHI, A. et al. Systems biology in cardiovascular disease: a multiomics approach. **Nature Reviews Cardiology**, v. 18, n. 5, p. 313–330, 18 maio 2021.

JÓZSI, M.; MERI, S. Factor H-Related Proteins. In: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.] Humana Press, Totowa, NJ, 2014. v. 1100p. 225–236.

JÓZSI, M.; ZIPFEL, P. F. Factor H family proteins and human diseases. **Trends in Immunology**, v. 29, n. 8, p. 380–387, 1 ago. 2008.

KÄLL, L. et al. Assigning Significance to Peptides Identified by Tandem Mass Spectrometry Using Decoy Databases. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 1, p. 29–34, jan. 2008.

KALLURI, R.; LEBLEU, V. S. **The biology, function, and biomedical applications of exosomesScience**NIH Public Access, , 7 fev. 2020. Disponível em: KELLER, T. T. et al. Serum Levels of Mannose-Binding Lectin and the Risk of Future Coronary Artery Disease in Apparently Healthy Men and Women. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, v. 26, n. 10, p. 2345–2350, 1 out. 2006.

KHERA, A. V. et al. Diagnostic Yield and Clinical Utility of Sequencing Familial Hypercholesterolemia Genes in Patients With Severe Hypercholesterolemia. Journal of the American College of Cardiology, v. 67, n. 22, p. 2578–2589, 7 jun. 2016.

KOK, V. C.; YU, C.-C. Cancer-Derived Exosomes: Their Role in Cancer Biology and Biomarker Development. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 15, p. 8019–8036, out. 2020.

KRÜTZFELDT, J. et al. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. **Nature**, v. 438, n. 7068, p. 685–689, 30 dez. 2005.

KULESHOV, M. V. et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. Nucleic Acids Research, v. 44, n. W1, p. W90–W97, 8 jul. 2016.

LAMIQUIZ-MONEO, I. et al. ABCG5/G8 gene is associated with hypercholesterolemias without mutation in candidate genes and noncholesterol sterols. **Journal of Clinical Lipidology**, v. 11, n. 6, p. 1432- 1440.e4, 1 nov. 2017.

LANE, R. E. et al. Analysis of exosome purification methods using a model liposome system and tunable-resistive pulse sensing. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 7639, 6 jul. 2015.

LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843–854, 3 dez. 1993.

LI, P. et al. Progress in Exosome Isolation Techniques. **Theranostics**, v. 7, n. 3, p. 789–804, 2017.

LI, R. et al. Proteomic analysis allows for identifying targets of Yinchenwuling Powder in hyperlipidemic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 185, p. 60–67, 5 jun. 2016.

LIANG, B. et al. Advances in Exosomes Derived from Different Cell Sources and Cardiovascular Diseases. **BioMed Research International**, v. 2020, p. 1–11, 7 jul. 2020.

LIN, M. et al. Lipoprotein proteome profile: novel insight into hyperlipidemia. **Clinical and Translational Medicine**, v. 11, n. 4, 8 abr. 2021.

LING, H. et al. Serum exosomal miR-122-5p is a new biomarker for both acute coronary

syndrome and underlying coronary artery stenosis. **Biomarkers**, v. 25, n. 7, p. 539–547, 2 out. 2020.

LIU, M.-N. et al. miR-29 family: A potential therapeutic target for cardiovascular disease. **Pharmacological Research**, v. 166, p. 105510, 1 abr. 2021.

LIU, Y.; MORTON, R. E. Apolipoprotein F: a natural inhibitor of cholesteryl ester transfer protein and a key regulator of lipoprotein metabolism. **Current Opinion in Lipidology**, v. 31, n. 4, p. 194–199, 1 ago. 2020.

LORENZO, A. DE et al. Clinical, Anthropometric and Biochemical Characteristics of Patients with or without Genetically Confirmed Familial Hypercholesterolemia. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 110, n. 2, p. 119–123, fev. 2017.

LOWDON, R. F.; JANG, H. S.; WANG, T. Evolution of Epigenetic Regulation in Vertebrate Genomes. **Trends in Genetics**, v. 32, n. 5, p. 269–283, maio 2016.

LUO, X.; YANG, B.; NATTEL, S. MicroRNAs and atrial fibrillation: mechanisms and translational potential. **Nature Reviews Cardiology**, v. 12, n. 2, p. 80–90, 25 fev. 2015.

MALLINSON, P. A. C. et al. Socioeconomic position and cardiovascular mortality in 63 million adults from Brazil. **Heart**, v. 107, n. 10, p. 822–827, maio 2021.

MANSUR, A. DE P.; FAVARATO, D. Trends in Mortality Rate from Cardiovascular Disease in Brazil, 1980-2012. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, p. PP. 0-0, 2016.

MARTINO, F. et al. Circulating miR-33a and miR-33b are up-regulated in familial hypercholesterolaemia in paediatric age. **Clinical Science**, v. 129, n. 11, p. 963–972, 1 dez. 2015.

MEHTA, R. et al. The panorama of familial hypercholesterolemia in Latin America: a systematic review. **Journal of Lipid Research**, v. 57, n. 12, p. 2115–2129, dez. 2016.

MJELLE, R. et al. Comprehensive transcriptomic analyses of tissue, serum, and serum exosomes from hepatocellular carcinoma patients. **BMC Cancer**, v. 19, n. 1, p. 1–13, 28 out. 2019.

MOMTAZI, A. A. et al. MicroRNAs: New Therapeutic Targets for Familial Hypercholesterolemia? **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 54, n. 2, p. 224–233, 22 abr. 2018.

MURPHY, A. et al. World Heart Federation Cholesterol Roadmap. **Global Heart**, v. 12, n. 3, p. 179, 1 set. 2017.

MUTHUSAMY, V. V. BR 08-3 MANAGEMENT OF DYSLIPIDEMIA IN HYPERTENSION. Journal of Hypertension, v. 34, n. Supplement 1, p. e545, set. 2016.

MYTILINAIOU, M. et al. Familial Hypercholesterolemia: New Horizons for Diagnosis and Effective Management. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. JUN, 12 jul. 2018.

NAJAM, O.; RAY, K. K. Familial Hypercholesterolemia: a Review of the Natural History, Diagnosis, and Management. **Cardiology and Therapy**, v. 4, n. 1, p. 25–38, 14 jun. 2015.

NEW, S. E. P.; AIKAWA, E. Role of Extracellular Vesicles in De Novo Mineralization. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, v. 33, n. 8, p. 1753–1758, ago. 2013.

NORDESTGAARD, B. G.; BENN, M. Genetic testing for familial hypercholesterolaemia is essential in individuals with high LDL cholesterol: who does it in the world? **European Heart Journal**, v. 38, n. 20, p. 1580–1583, 21 maio 2017.

O'BRIEN, J. et al. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, n. AUG, 3 ago. 2018.

OAKLEY, R. H. et al. Essential role of stress hormone signaling in cardiomyocytes for the prevention of heart disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 42, p. 17035–17040, 2013.

PEDERIVA, C. et al. Early Prevention of Atherosclerosis: Detection and Management of Hypercholesterolaemia in Children and Adolescents. **Life**, v. 11, n. 4, p. 345, 14 abr. 2021.

PEGTEL, D. M.; GOULD, S. J. Exosomes. Annual Review of Biochemistry, v. 88, p. 487– 514, 20 jun. 2019.

PERDOMO, G.; DONG, H. H. Apolipoprotein D in lipid metabolism and its functional implication in atherosclerosis and aging. **Aging**, v. 1, n. 1, p. 17–27, 12 dez. 2008.

PESSENTHEINER, A. R. et al. APMAP interacts with lysyl oxidase–like proteins, and disruption of Apmap leads to beneficial visceral adipose tissue expansion. **The FASEB Journal**, v. 31, n. 9, p. 4088–4103, 19 set. 2017.

POTLA, P.; ALI, S. A.; KAPOOR, M. A bioinformatics approach to microRNA-sequencing analysis. **Osteoarthritis and Cartilage Open**, v. 3, n. 1, p. 100131, 1 mar. 2021.

PRICE, N. L.; FERNÁNDEZ-HERNANDO, C. Noncoding RNAs in Cholesterol Metabolism and Atherosclerosis. In: [s.l: s.n.]. p. 21–37.

RAAL, F. J.; HOVINGH, G. K.; CATAPANO, A. L. Familial hypercholesterolemia treatments: Guidelines and new therapies. **Atherosclerosis**, v. 277, p. 483–492, 1 out. 2018.

RASSART, E. et al. Apolipoprotein D. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, v. 1482, n. 1–2, p. 185–198, 18 out. 2000.

RICHARDS, S. et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genetics in Medicine**, v. 17, n. 5, p. 405–424, 5 maio 2015.

ROGERS, M. A. et al. Annexin A1–dependent tethering promotes extracellular vesicle aggregation revealed with single–extracellular vesicle analysis. **Science Advances**, v. 6, n. 38, p. eabb1244, 18 set. 2020.

ROOIJ, E.; KAUPPINEN, S. Development of micro <scp>RNA</scp> therapeutics is coming of age. **EMBO Molecular Medicine**, v. 6, n. 7, p. 851–864, 16 jul. 2014.

ROTTIERS, V.; NÄÄR, A. M. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 4, p. 239–250, 22 abr. 2012.

SAMOIL, V. et al. Vesicle-based secretion in schistosomes: Analysis of protein and microRNA (miRNA) content of exosome-like vesicles derived from Schistosoma mansoni. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 3286, 19 dez. 2018.

SANTOS, R. et al. I Diretriz Brasileira de Hipercolesterolemia Familiar (HF). Arquivos Brasileiros de Cardiologia, v. 99, n. 2, p. 1–28, 2012.

SANZ-RUBIO, D. et al. Stability of Circulating Exosomal miRNAs in Healthy Subjects. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 10306, 9 dez. 2018.

SARRAJU, A.; KNOWLES, J. W. Genetic Testing and Risk Scores: Impact on Familial Hypercholesterolemia. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 6, n. January, p. 1–7, 29 jan. 2019.

SATO, K. et al. Exosomes in liver pathology. **Journal of Hepatology**, v. 65, n. 1, p. 213–221, jul. 2016.

SHARIFI, M. et al. Polygenic Hypercholesterolemia and Cardiovascular Disease Risk. **Current Cardiology Reports**, v. 21, n. 6, p. 43, 22 jun. 2019.

SHEEDY, F. J. Turning 21: Induction of miR-21 as a Key Switch in the Inflammatory Response. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. JAN, 2015.

SHEN, M. et al. Roles of Macrophages and Exosomes in Liver Diseases. Frontiers in Medicine, v. 7, p. 583691, 24 set. 2020.

SIKORA, M. et al. Serum Proteome Alterations in Human Cystathionine β-Synthase Deficiency and Ischemic Stroke Subtypes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 12, p. 3096, 2 jun. 2019.

SILVA, P. R. DE S. et al. Pharmacological treatment with lipid-lowering agents after molecular identification of familial hypercholesterolemia: results from the Hipercol Brasil cohort. **Journal of Clinical Lipidology**, 19 jan. 2022.

SINGH, S.; BITTNER, V. Familial Hypercholesterolemia—Epidemiology, Diagnosis, and Screening. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 17, n. 2, p. 3, 23 fev. 2015.

SKERKA, C.; ZIPFEL, P. F. Complement factor H related proteins in immune diseases. **Vaccine**, v. 26, n. SUPPL. 8, p. I9–I14, 30 dez. 2008.

SMOLARZ, M. et al. Proteome Profiling of Exosomes Purified from a Small Amount of Human Serum: The Problem of Co-Purified Serum Components. **Proteomes**, v. 7, n. 2, p. 18, 28 abr. 2019.

SUADES, R. et al. Circulating CD45+/CD3+ lymphocyte-derived microparticles map lipidrich atherosclerotic plaques in familial hypercholesterolaemia patients. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 111, n. 01, p. 111–121, 29 nov. 2014.

SUN, D. et al. Association between lipoprotein (a) and proprotein convertase substilisin/kexin type 9 in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia: A case-control study. **Metabolism**, v. 79, p. 33–41, fev. 2018.

SUN, H.; YU, G. New insights into the pathogenicity of non-synonymous variants through multi-level analysis. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1667, 7 dez. 2019.

SZATANEK, R. et al. The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1153, 29 maio

2017.

SZKLARCZYK, D. et al. STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D607–D613, 8 jan. 2019.

TADA, H.; KAWASHIRI, M.; YAMAGISHI, M. Clinical Perspectives of Genetic Analyses on Dyslipidemia and Coronary Artery Disease. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 24, n. 5, p. 452–461, 1 maio 2017.

TANG, Y.-T. et al. Comparison of isolation methods of exosomes and exosomal RNA from cell culture medium and serum. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 40, n. 3, p. 834–844, set. 2017.

THÉRY, C. et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 7, n. 1, p. 1535750, 1 dez. 2018.

VALADI, H. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nature Cell Biology**, v. 9, n. 6, p. 654–659, 7 jun. 2007.

VALLEJO-VAZ, A. J. et al. Familial hypercholesterolaemia: A global call to arms. **Atherosclerosis**, v. 243, n. 1, p. 257–259, nov. 2015.

VENGEN, I. T. et al. Mannose-binding lectin deficiency is associated with myocardial infarction: The HUNT2 study in Norway. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e42113, 27 jul. 2012.

VICKERS, K. C. et al. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. **Nature Cell Biology**, v. 13, n. 4, p. 423–433, 20 abr. 2011.

VOSSEN, C. Y. et al. Identification of coagulation gene 3'UTR variants that are potentially regulated by microRNAs. **British Journal of Haematology**, v. 177, n. 5, p. 782–790, 1 jun. 2017.

WANG, J.; CAO, D.; YANG, J. Exosomes in Hepatitis B Virus Transmission and Related Immune Response. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 252, n. 4, p. 309–320, 2020.

WEN, J.; FRIEDMAN, J. R. miR-122 regulates hepatic lipid metabolism and tumor

suppression. Journal of Clinical Investigation, v. 122, n. 8, p. 2773–2776, 1 ago. 2012.

WENGROFSKY, P.; LEE, J.; N. MAKARYUS, A. Dyslipidemia and Its Role in the Pathogenesis of Atherosclerotic Cardiovascular Disease: Implications for Evaluation and Targets for Treatment of Dyslipidemia Based on Recent Guidelines. In: **Dyslipidemia**. [s.l.] IntechOpen, 2019.

WILEMON, K. A. et al. Reducing the Clinical and Public Health Burden of Familial Hypercholesterolemia: A Global Call to Action. **JAMA Cardiology**, v. 5, n. 2, p. 217–229, 1 fev. 2020.

WILLEIT, P. et al. Circulating MicroRNA-122 Is Associated With the Risk of New-Onset Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes. **Diabetes**, v. 66, n. 2, p. 347–357, 1 fev. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cardiovascular diseases.** Disponível em: ">https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases#tab=tab_1>. Acesso em: 4 mar. 2022.

XIE, Z. et al. Gene Set Knowledge Discovery with Enrichr. **Current Protocols**, v. 1, n. 3, p. e90, 1 mar. 2021.

XU, L.; YANG, B.; AI, J. MicroRNA transport: A new way in cell communication. **Journal of Cellular Physiology**, v. 228, n. 8, p. 1713–1719, ago. 2013.

YANG, D. et al. Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation - efforts for efficient exosome-based theranostics. **Theranostics**, v. 10, n. 8, p. 3684, 2020.

YANG, S. et al. Glycoproteins identified from heart failure and treatment models. **PROTEOMICS**, v. 15, n. 2–3, p. 567–579, 1 jan. 2015.

YOAV BENJAMINI, Y. H. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological), v. 57, n. 1, p. 289–300, 1995.

ZAMBRANO, T. et al. Impact of 3'UTR genetic variants in PCSK9 and LDLR genes on plasma lipid traits and response to atorvastatin in Brazilian subjects: a pilot study. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 8, n. 4, p. 5978–88, 2015.

ŻBIKOWSKI, A. et al. Adipose-Derived Exosomes as Possible Players in the Development of Insulin Resistance. International Journal of Molecular Sciences 2021, Vol. 22, Page 7427,

v. 22, n. 14, p. 7427, 11 jul. 2021.

ZHANG, J. et al. Exosome and Exosomal MicroRNA: Trafficking, Sorting, and Function. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, v. 13, n. 1, p. 17–24, fev. 2015.

ZHANG, J. J. et al. Atorvastatin exerts inhibitory effect on endothelial senescence in hyperlipidemic rats through a mechanism involving down-regulation of miR-21-5p/203a-3p. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 169, p. 10–18, 1 jan. 2018.

ZHANG, L.; LU, Q.; CHANG, C. Epigenetics in Health and Disease. Advances in experimental medicine and biology, v. 1253, p. 3–55, 2020.

ZHANG, Y. N. et al. Extracellular vesicle proteins associated with systemic vascular events correlate with heart failure: An observational study in a dyspnoea cohort. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, 1 jan. 2016.

ZHONG, W. et al. Adipose specific aptamer adipo-8 recognizes and interacts with APMAP to ameliorates fat deposition in vitro and in vivo. **Life Sciences**, v. 251, p. 117609, 15 jun. 2020.

ZHOU, S. et al. miRNAS in cardiovascular diseases: potential biomarkers, therapeutic targets and challenges. Acta Pharmacologica Sinica, v. 39, n. 7, p. 1073–1084, 7 jul. 2018.

ZUURBIER, L. C.; DEFESCHE, J. C.; WIEGMAN, A. Successful genetic screening and creating awareness of familial hypercholesterolemia and other heritable Dyslipidemias in the Netherlands. **Genes**, v. 12, n. 8, p. 1168, 1 ago. 2021.

DADOS SUPLEMENTARES

Tabela suplementar 1. Lista de proteínas significativas (N=239 proteínas com 2 ou mais peptídeos únicos) entre exossomos e plasma (comparação de dois grupos; p<0,05 e $q \le 0,061$).

Gene	Descrição	#	UniP	p-valor	q-valor
		Peptíd	rot		
		eos			
		únicos			
PIGR	Polymeric immunoglobulin receptor OS=Homo	7	P0183	1,49E-01	1,04E+00
TOA	sapiens OX=9606 GN=PIGR PE=1 SV=4	10	3	5 405 00	0.10E.00
LGA	Galectin-3-binding protein OS=Homo sapiens	13	Q083	5,48E+02	2,13E+03
LS3B D	OX=9606 GN=LGALS3BP PE=1 SV=1		80		
			D4100	4.445.00	1.025.00
PIG	Prostagiandin-H2 D-isomerase OS=Homo sapiens	2	P4122	4,44E+08	1,02E+09
$\frac{DS}{C10C}$	Complement C1a subcomponent subunit C OS-Home		 D0274	2.62E+04	8 72E 102
CIQU	sapiens OX=9606 GN=C1OC PE=1 SV=3	4	7 7	2,02E+04	6,72E+02
C10B	Complement C1g subcomponent subunit B OS=Homo	3	P0274	5,18E+04	1,65E+04
	sapiens OX=9606 GN=C1QB PE=1 SV=3		6	,	,
FCG	IgGFc-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606	24	Q9Y6	1,91E+05	5,78E+04
BP	GN=FCGBP PE=1 SV=3		R7		
MYL	Myosin light polypeptide 6 OS=Homo sapiens	4	B7Z6	1,79E+04	6,31E+03
6	OX=9606 GN=MYL6 PE=1 SV=1		Z4	a a - -	
JCHA	Immunoglobulin J chain OS=Homo sapiens OX=9606	2	P0159	3,06E+04	1,01E+05
	GN=JCHAIN PE=1 SV=4	10	l	2.025.05	C 00E - 04
IGH M	Immunoglobulin heavy constant mu $OS=Homo$ sapiens OX=0606 CN=IGHM PE=1 SV=4	16	P018/	2,03E+05	6,09E+04
CD5I	CD5 antigen-like OS-Homo saniens OX-9606	1	0/38	2 /6F±03	8 /2F±01
CD3L	GN=CD5L PE=1 SV=1	-	66	2,401103	0,721101
IGHV	Immunoglobulin heavy variable 3-15 OS=Homo	3	A0A0	1.45E+05	4.42E+04
3-15	sapiens OX=9606 GN=IGHV3-15 PE=3 SV=1	-	B4J1	_,	.,
	1		V 0		
IGHV	Immunoglobulin heavy variable 5-51 OS=Homo	2	A0A0	2,08E+05	6,17E+04
5-51	sapiens OX=9606 GN=IGHV5-51 PE=3 SV=1		C4D		
			H38		
IGKV	Probable non-functional immunoglobulin kappa	2	A0A0	1,46E+07	3,85E+07
2D-24	variable 2D-24 OS=Homo sapiens OX=9606		75B6		
MAG	GN=IGKV2D-24 PE=5 SV=1		<u>R9</u>	1.007	2 205 . 07
MAS	Mannan-binding lectin serine protease 2 US=Homo	5	0001	1,26E+07	3,38E+07
$\frac{\mathbf{F}_{2}}{\mathbf{C}_{1}\mathbf{O}_{1}}$	Sapiens OA=9000 ON=MASP2 PE=1 SV=4	5	0/ D0274	7.54E+06	1.87E+08
UIQA	sapiens OX=9606 GN=C1OA PE=1 SV=2	5	5	7,54E+00	1,0712+00
F5	Coagulation factor V OS=Homo sapiens OX=9606	34	A0A0	6,43E+02	2,44E+04
	GN=F5 PE=1 SV=1		A0M	,	,
			RJ7		
FN1	Isoform 1 of Fibronectin OS=Homo sapiens OX=9606	59	P0275	2,21E+02	1,05E+03
	GN=FN1		1-1		
PLTP	Phospholipid transfer protein OS=Homo sapiens	9	P5505	1,39E+06	3,98E+05
DCC	OX=9606 GN=PLTP PE=1 SV=1		8	1.075.01	0.717.01
FGG	Fibrinogen gamma chain OS=Homo sapiens OX=9606	21	C9JC	1,62E-04	2,71E-04
FCP	UN=FUU PE=1 SV=1 Fibringgon bata abain OS-Home serions OV-0606	77	04 D0267	5 50E 05	1 20E 02
ГGĎ	FIOLING STREET SV-2 $CA=9000$	21	P0207	3,39E-03	1,29E-03
L R P1	Prolow-density linoprotein recentor related protein 1	7	0070	7 72E 02	4 63E 01
	OS=Homo sapiens OX=9606 GN=L RP1 PE=1 SV=2	7	54	1,120-02	т,05Ľ-01
A2M	Alpha-2-macroglobulin OS=Homo sapiens OX=9606	63	P0102	1.67E+03	5.97E+03
	GN=A2M PE=1 SV=3		3	,	. ,

F13A	Coagulation factor XIII A chain OS=Homo sapiens	18	P0048	1,29E-04	2,42E-03
FGA	Fibrinogen alpha chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FGA PE=1 SV=2	32	P0267	1,41E-02	1,21E-01
F13B	Coagulation factor XIII B chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=F13B PE=1 SV=3	6	P0516 0	5,63E+05	1,55E+07
NID1	Nidogen-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NID1 PE=1 SV=3	2	P1454 3	7,54E+03	2,33E+05
LAM B1	Laminin subunit beta-1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LAMB1 PE=1 SV=1	5	G3X AI2	2,88E-02	2,33E-01
FCN2	Ficolin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FCN2 PE=1 SV=2	4	Q154 85	6,23E-01	3,34E+00
HEG1	Protein HEG homolog 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HEG1 PE=1 SV=3	3	Q9UL I3	6,03E+03	1,90E+05
ANG PTL6	Angiopoietin-related protein 6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANGPTL6 PE=1 SV=1	4	Q8NI 99	4,16E-03	3,20E-02
COL EC11	Isoform 10 of Collectin-11 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COLEC11	3	Q9B WP8- 10	4,90E+00	2,45E+02
MAS P1	Isoform 2 of Mannan-binding lectin serine protease 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MASP1	2	P4874 0-2	1,10E+03	4,50E+02
COL6 A1	Collagen alpha-1(VI) chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COL6A1 PE=1 SV=3	3	P1210 9	1,44E-01	8,31E-01
COL6 A3	Collagen alpha-3(VI) chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COL6A3 PE=1 SV=5	21	P1211 1	2,72E+01	1,38E+02
COL EC10	Collectin-10 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COLEC10 PE=1 SV=2	4	Q9Y6 Z7	1,48E-02	1,23E-02
FCN3	Ficolin-3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FCN3	5	O756 36	1,52E+06	4,30E+05
	1 L-1 S V-2		00		
PCY OX1	Prenylcysteine oxidase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCYOX1 PE=1 SV=3	14	Q9U HG3	6,61E+02	2,48E+04
PCY OX1 APO B	Prenylcysteine oxidase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCYOX1 PE=1 SV=3 Apolipoprotein B-100 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOB PE=1 SV=2	14 228	Q9U HG3 P0411 4	6,61E+02 4,07E+01	2,48E+04 1,79E+03
PCY OX1 APO B C4BP A	Prenylcysteine oxidase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCYOX1 PE=1 SV=3 Apolipoprotein B-100 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOB PE=1 SV=2 C4b-binding protein alpha chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C4BPA PE=1 SV=2	14 228 8	Q9U HG3 P0411 4 P0400 3	6,61E+02 4,07E+01 6,89E+00	2,48E+04 1,79E+03 3,39E+02
PCY OX1 APO B C4BP A PROS 1	Prenylcysteine oxidase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCYOX1 PE=1 SV=3 Apolipoprotein B-100 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOB PE=1 SV=2 C4b-binding protein alpha chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C4BPA PE=1 SV=2 Vitamin K-dependent protein S (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PROS1 PE=1 SV=1	14 228 8 11	Q9U HG3 P0411 4 P0400 3 A0A0 S2Z4 L3	6,61E+02 4,07E+01 6,89E+00 2,93E-04	2,48E+04 1,79E+03 3,39E+02 2,84E-03
PCY OX1 APO B C4BP A PROS 1 APO D	Prenylcysteine oxidase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCYOX1 PE=1 SV=3 Apolipoprotein B-100 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOB PE=1 SV=2 C4b-binding protein alpha chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C4BPA PE=1 SV=2 Vitamin K-dependent protein S (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PROS1 PE=1 SV=1 Apolipoprotein D (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOD PE=1 SV=1	14 228 8 11 6	Q9U HG3 P0411 4 P0400 3 A0A0 S2Z4 L3 C9JF 17	6,61E+02 4,07E+01 6,89E+00 2,93E-04 2,60E+08	2,48E+04 1,79E+03 3,39E+02 2,84E-03 5,78E+08
PCY OX1 APO B C4BP A PROS 1 APO D CFH R4	Prenylcysteine oxidase 1 OS=Homo sapiens OX=9606GN=PCYOX1 PE=1 SV=3Apolipoprotein B-100 OS=Homo sapiens OX=9606GN=APOB PE=1 SV=2C4b-binding protein alpha chain OS=Homo sapiensOX=9606 GN=C4BPA PE=1 SV=2Vitamin K-dependent protein S (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PROS1 PE=1 SV=1Apolipoprotein D (Fragment) OS=Homo sapiensOX=9606 GN=APOD PE=1 SV=1Complement factor H-related protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CFHR4 PE=1 SV=3	14 228 8 11 6 2	Q9U HG3 P0411 4 P0400 3 A0A0 S2Z4 L3 C9JF 17 Q924 96	6,61E+02 4,07E+01 6,89E+00 2,93E-04 2,60E+08 6,02E+09	2,48E+04 1,79E+03 3,39E+02 2,84E-03 5,78E+08 1,21E+10
PCY OX1 APO B C4BP A PROS 1 APO D CFH R4 C1R	Prenylcysteine oxidase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCYOX1 PE=1 SV=3 Apolipoprotein B-100 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOB PE=1 SV=2 C4b-binding protein alpha chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C4BPA PE=1 SV=2 Vitamin K-dependent protein S (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PROS1 PE=1 SV=1 Apolipoprotein D (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOD PE=1 SV=1 Complement factor H-related protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CFHR4 PE=1 SV=3 Complement subcomponent C1r OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C1R PE=1 SV=1	14 228 8 11 6 2 8	Q9U HG3 P0411 4 P0400 3 A0A0 S2Z4 L3 C9JF 17 Q924 96 B4DP Q0	6,61E+02 4,07E+01 6,89E+00 2,93E-04 2,60E+08 6,02E+09 1,25E+06	2,48E+04 1,79E+03 3,39E+02 2,84E-03 5,78E+08 1,21E+10 3,60E+05
PCY OX1 APO B C4BP A PROS 1 APO D CFH R4 C1R APO M	Prenylcysteine oxidase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCYOX1 PE=1 SV=3 Apolipoprotein B-100 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOB PE=1 SV=2 C4b-binding protein alpha chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C4BPA PE=1 SV=2 Vitamin K-dependent protein S (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PROS1 PE=1 SV=1 Apolipoprotein D (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOD PE=1 SV=1 Complement factor H-related protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CFHR4 PE=1 SV=3 Complement subcomponent C1r OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C1R PE=1 SV=1 Apolipoprotein M OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOM PE=1 SV=2	14 228 8 11 6 2 8 8 3	Q9U HG3 P0411 4 P0400 3 A0A0 S2Z4 L3 C9JF 17 Q924 96 B4DP Q0 Q0 O954 45	6,61E+02 4,07E+01 6,89E+00 2,93E-04 2,60E+08 6,02E+09 1,25E+06 3,91E+09	2,48E+04 1,79E+03 3,39E+02 2,84E-03 5,78E+08 1,21E+10 3,60E+05 8,08E+09
PCY OX1 APO B C4BP A PROS 1 APO D CFH R4 C1R APO M CAM P	Prenylcysteine oxidase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCYOX1 PE=1 SV=3 Apolipoprotein B-100 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOB PE=1 SV=2 C4b-binding protein alpha chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C4BPA PE=1 SV=2 Vitamin K-dependent protein S (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PROS1 PE=1 SV=1 Apolipoprotein D (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOD PE=1 SV=1 Complement factor H-related protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CFHR4 PE=1 SV=3 Complement subcomponent C1r OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C1R PE=1 SV=1 Apolipoprotein M OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOM PE=1 SV=2 Antibacterial peptide FALL-39 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAMP PE=1 SV=1	14 228 8 11 6 2 8 3 3 2	Q9U HG3 P0411 4 P0400 3 A0A0 S2Z4 L3 C9JF 17 Q924 96 B4DP Q0 Q954 45 J3KN B4	6,61E+02 4,07E+01 6,89E+00 2,93E-04 2,60E+08 6,02E+09 1,25E+06 3,91E+09 2,51E+06	2,48E+04 1,79E+03 3,39E+02 2,84E-03 5,78E+08 1,21E+10 3,60E+05 8,08E+09 7,03E+05
PCY OX1 APO B C4BP A PROS 1 APO D CFH R4 C1R APO M CAM P APO E	Prenylcysteine oxidase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCYOX1 PE=1 SV=3 Apolipoprotein B-100 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOB PE=1 SV=2 C4b-binding protein alpha chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C4BPA PE=1 SV=2 Vitamin K-dependent protein S (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PROS1 PE=1 SV=1 Apolipoprotein D (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOD PE=1 SV=1 Complement factor H-related protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CFHR4 PE=1 SV=3 Complement subcomponent C1r OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C1R PE=1 SV=1 Apolipoprotein M OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOM PE=1 SV=2 Antibacterial peptide FALL-39 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAMP PE=1 SV=1 Apolipoprotein E OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOE PE=1 SV=1	14 228 8 11 6 2 8 3 2 20	Q9U HG3 P0411 4 P0400 3 A0A0 S2Z4 L3 C9JF 17 Q924 96 B4DP Q0 O954 45 J3KN B4 P0264 9	6,61E+02 4,07E+01 6,89E+00 2,93E-04 2,60E+08 6,02E+09 1,25E+06 3,91E+09 2,51E+06 2,54E+07	2,48E+04 1,79E+03 3,39E+02 2,84E-03 5,78E+08 1,21E+10 3,60E+05 8,08E+09 7,03E+05 6,51E+04
PCY OX1 APO B C4BP A PROS 1 APO D CFH R4 C1R APO M CAM P APO E APO C4	Prenylcysteine oxidase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCYOX1 PE=1 SV=3 Apolipoprotein B-100 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOB PE=1 SV=2 C4b-binding protein alpha chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C4BPA PE=1 SV=2 Vitamin K-dependent protein S (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PROS1 PE=1 SV=1 Apolipoprotein D (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOD PE=1 SV=1 Complement factor H-related protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CFHR4 PE=1 SV=3 Complement subcomponent C1r OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C1R PE=1 SV=1 Apolipoprotein M OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOM PE=1 SV=2 Antibacterial peptide FALL-39 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAMP PE=1 SV=1 Apolipoprotein E OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOE PE=1 SV=1 Apolipoprotein C-IV OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOC4 PE=1 SV=1	14 228 8 11 6 2 8 3 2 20 2 20 2 20 2	Q9U HG3 P0411 4 P0400 3 A0A0 S2Z4 L3 C9JF 17 Q924 96 B4DP Q0 O954 45 J3KN B4 P0264 9 P5505 6	6,61E+02 4,07E+01 6,89E+00 2,93E-04 2,60E+08 6,02E+09 1,25E+06 3,91E+09 2,51E+06 2,54E+07 1,68E+10	2,48E+04 1,79E+03 3,39E+02 2,84E-03 5,78E+08 1,21E+10 3,60E+05 8,08E+09 7,03E+05 6,51E+04 3,54E+10
PCY OX1 APO B C4BP A PROS 1 APO D CFH R4 C1R APO M CAM P APO E APO C4 PRG4	Prenylcysteine oxidase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCYOX1 PE=1 SV=3 Apolipoprotein B-100 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOB PE=1 SV=2 C4b-binding protein alpha chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C4BPA PE=1 SV=2 Vitamin K-dependent protein S (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PROS1 PE=1 SV=1 Apolipoprotein D (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOD PE=1 SV=1 Complement factor H-related protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CFHR4 PE=1 SV=3 Complement subcomponent C1r OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C1R PE=1 SV=1 Apolipoprotein M OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOM PE=1 SV=2 Antibacterial peptide FALL-39 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAMP PE=1 SV=1 Apolipoprotein E OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOE PE=1 SV=1 Apolipoprotein C-IV OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOC4 PE=1 SV=1 Isoform F of Proteoglycan 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRG4	14 228 8 11 6 2 8 3 2 20 2 10	Q9U HG3 P0411 4 P0400 3 A0A0 S2Z4 L3 C9JF 17 Q924 96 B4DP Q0 O954 45 J3KN B4 P0264 9 P5505 6 Q929 54-6	6,61E+02 4,07E+01 6,89E+00 2,93E-04 2,60E+08 6,02E+09 1,25E+06 3,91E+09 2,51E+06 2,54E+07 1,68E+10 1,74E+10	2,48E+04 1,79E+03 3,39E+02 2,84E-03 5,78E+08 1,21E+10 3,60E+05 8,08E+09 7,03E+05 6,51E+04 3,54E+10 3,66E+09
PCY OX1 APO B C4BP A PROS 1 APO D CFH R4 C1R APO M CAM P APO E APO C4 PRG4 APO C3	Prenylcysteine oxidase 1 OS=Homo sapiens OX=9606GN=PCYOX1 PE=1 SV=3Apolipoprotein B-100 OS=Homo sapiens OX=9606GN=APOB PE=1 SV=2C4b-binding protein alpha chain OS=Homo sapiensOX=9606 GN=C4BPA PE=1 SV=2Vitamin K-dependent protein S (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PROS1 PE=1 SV=1Apolipoprotein D (Fragment) OS=Homo sapiensOX=9606 GN=APOD PE=1 SV=1Complement factor H-related protein 4 OS=Homo sapiensOX=9606 GN=CFHR4 PE=1 SV=3Complement subcomponent C1r OS=Homo sapiensOX=9606 GN=C1R PE=1 SV=1Apolipoprotein M OS=Homo sapiens OX=9606GN=APOM PE=1 SV=2Antibacterial peptide FALL-39 OS=Homo sapiensOX=9606 GN=CAMP PE=1 SV=1Apolipoprotein E OS=Homo sapiens OX=9606GN=APOE PE=1 SV=1Apolipoprotein C-IV OS=Homo sapiens OX=9606GN=APOC4 PE=1 SV=1Isoform F of Proteoglycan 4 OS=Homo sapiensOX=9606 GN=PRG4Apolipoprotein C-III OS=Homo sapiens OX=9606GN=APOC3 PE=1 SV=1	14 228 8 11 6 2 8 3 2 20 2 10 4	Q9U HG3 P0411 4 P0400 3 A0A0 S2Z4 L3 C9JF 17 Q924 96 B4DP Q0 O954 45 J3KN B4 P0264 9 P5505 6 Q929 54-6 B0YI W2	6,61E+02 4,07E+01 6,89E+00 2,93E-04 2,60E+08 6,02E+09 1,25E+06 3,91E+09 2,51E+06 2,54E+07 1,68E+10 1,74E+10 0.000367 55942497	2,48E+04 1,79E+03 3,39E+02 2,84E-03 5,78E+08 1,21E+10 3,60E+05 8,08E+09 7,03E+05 6,51E+04 3,54E+10 3,66E+09 0.000612 59904163
PCY OX1 APO B C4BP A PROS 1 APO D CFH R4 C1R APO M CAM P APO E APO C4 PRG4 APO C3 APO C4-	Prenylcysteine oxidase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCYOX1 PE=1 SV=3 Apolipoprotein B-100 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOB PE=1 SV=2 C4b-binding protein alpha chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C4BPA PE=1 SV=2 Vitamin K-dependent protein S (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PROS1 PE=1 SV=1 Apolipoprotein D (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOD PE=1 SV=1 Complement factor H-related protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CFHR4 PE=1 SV=3 Complement subcomponent C1r OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C1R PE=1 SV=1 Apolipoprotein M OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOM PE=1 SV=2 Antibacterial peptide FALL-39 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CAMP PE=1 SV=1 Apolipoprotein E OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOE PE=1 SV=1 Apolipoprotein C-IV OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOC4 PE=1 SV=1 Isoform F of Proteoglycan 4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PRG4 Apolipoprotein C-III OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOC3 PE=1 SV=1 Apolipoprotein C-III OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOC3 PE=1 SV=1	14 228 8 11 6 2 8 3 2 20 2 10 4 5	Q9U HG3 P0411 4 P0400 3 A0A0 S2Z4 L3 C9JF 17 Q924 96 B4DP Q0 O954 45 J3KN B4 P0264 9 P5505 6 Q929 54-6 B0YI W2 K7ER 74	6,61E+02 4,07E+01 6,89E+00 2,93E-04 2,60E+08 6,02E+09 1,25E+06 3,91E+09 2,51E+06 2,54E+07 1,68E+10 1,74E+10 0.000367 55942497 0.000291 04811213	2,48E+04 1,79E+03 3,39E+02 2,84E-03 5,78E+08 1,21E+10 3,60E+05 8,08E+09 7,03E+05 6,51E+04 3,54E+10 3,66E+09 0.000612 59904163 0.000496 10473659

APO C2					
<u> </u>	Soluble scavenger receptor cysteine-rich domain-	3		3 68E±08	8 63E±07
D	containing protein SSC5D OS=Homo sapiens	5	H1	3,00L100	0,05E+07
_	OX=9606 GN=SSC5D PE=1 SV=30				
VWF	von Willebrand factor OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VWF PE=1 SV=4	32	P0427 5	1,39E+11	2,70E+10
TNC	Tenascin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TNC PE=1 SV=3	24	P2482 1	2,46E+04	7,23E+04
OIT3	Oncoprotein-induced transcript 3 protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=OIT3 PE=1 SV=2	2	Q8W WZ8	6,47E+09	1,29E+11
SLC4	Band 3 anion transport protein OS=Homo sapiens	3	P0273	0.000478	0.000789
<u>A1</u>	OX=9606 GN=SLC4A1 PE=1 SV=3		0	87055073	34706164
СОМ _Р	Cartilage oligomeric matrix protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=COMP PE=1 SV=2	5	P4974 7	5,59E+08	1,20E+10
TNX B	Tenascin-X OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TNXB PE=1 SV=1	11	A0A3 B3IS X9	1,58E+11	3,01E+11
APO L1	Isoform 2 of Apolipoprotein L1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOL1	13	O147 91-2	5,74E+05	1,56E+07
HPR	Isoform 2 of Haptoglobin-related protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HPR	5	P0073 9-2	6,57E+08	1,40E+10
PCSK 9	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PCSK9 PE=1 SV=3	4	Q8N BP7	1,47E+11	2,81E+11
SVEP	Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and	6	Q4LD	5,15E+07	1,11E+10
1	pentraxin domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SVEP1 PE=1 SV=3		E5		
PLA2 G7	Platelet-activating factor acetylhydrolase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLA2G7 PE=1 SV=1	4	Q130 93	1,16E+07	3,13E+07
DCD	Isoform 2 of Dermcidin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DCD	2	P8160 5-2	7,31E+06	1,83E+08
APOF	Apolipoprotein F OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOF PE=1 SV=2	2	Q137 90	2,89E+11	5,36E+09
APM	Adipocyte plasma membrane-associated protein	4	Q9H	0.003798	0.005613
AP	OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APMAP PE=1 SV=2		DC9	56810489	64744566
PON1	Serum paraoxonase/arylesterase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PON1 PE=1 SV=3	11	P2716 9	0.004731 18289583	0.006957 62190563
ADIP OQ	Adiponectin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ADIPOQ PE=1 SV=1	4	Q158 48	1,90E+11	3,59E+10
SERP	Isoform 3 of Plasma protease C1 inhibitor OS=Homo	17	P0515	0.000522	0.000857
ING1	sapiens OX=9606 GN=SERPING1		5-3	88188348	18341555
H4C1	Histone H4 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=H4C1 PE=1 SV=2	2	P6280 5	1,42E+11	2,73E+10
ACT B	Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ACTB PE=1 SV=1	5	P6070 9	0.013407 30811439	0.018795 29174914
HSPA 5	Endoplasmic reticulum chaperone BiP OS=Homo	11	P1102	9,58E+07	2,18E+09
P4HR	Protein disulfide-isomerase OS=Homo saniens	5	P0723	0.000354	0.000598
	OX=9606 GN=P4HB PE=1 SV=3	5	7	86344163	08445218
SAA2	SAA2-SAA4 readthrough OS=Homo sapiens	3	A0A0	0.009275	0.013188
-	OX=9606 GN=SAA2-SAA4 PE=3 SV=1		96LP	72642032	23661657
SAA4			E2	3928	4305
LPA	Apolipoprotein(a) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LPA PE=1 SV=1	14	P0851 9	0.001686 39842252	0.002581 22207528
IGLV	Immunoglobulin lambda variable 8-61 OS=Homo	2	A0A0	9,46E+10	0.000167
8-61	sapiens OX=9606 GN=IGLV8-61 PE=3 SV=7		75B6I 0		99997390

MBL 2	Mannose-binding protein C OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MBL2 PE=1 SV=2	6	P1122 6	1,14E+11	2,23E+11
HBB	Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens OX=9606	6	P6887	0.001025	0.001602
	GN=HBB PE=1 SV=2	7	1 D(000	60503492	50786706
HBAI	Hemoglobin subunit alpha $OS=Homo$ sapiens OX=0606 GN=HBA1 PE=1 SV=2	/	P0990	0.038349	0.049377
HBD	Hemoglobin subunit delta OS=Homo sapiens	5	 P0204	3 51E+09	7.64E+08
прр	OX=9606 GN=HBD PE=1 SV=2	5	2	5,512+05	7,012100
IGHA	Immunoglobulin heavy constant alpha 2 (Fragment)	4	A0A2	0.034044	0.044213
2	OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGHA2 PE=1 SV=1		86YE	50251966	63963592
			Y5	578	9586
IGKV	Immunoglobulin kappa variable 1-33 OS=Homo	2	A0A2	0.000875	0.001375
1D-33	sapiens OX=9606 GN=IGKV1D-33 PE=1 SV=1		Q211 70	61444600	31064817
ICKV	Immunoglobulin kanna variable 2D-29 OS-Homo	3		0.001062	0.001651
2D-29	sapiens OX=9606 GN=IGKV2D-29 PE=1 SV=1	5	H1ZR	33745680	30174633
			S 9		
IGKV	Immunoglobulin kappa variable 1-8 OS=Homo sapiens	2	A0A0	0.045963	0.058018
1-8	OX=9606 GN=IGKV1-8 PE=3 SV=1		C4D	01458083	23671098
			H67		
IGKV	Immunoglobulin kappa variable 4-1 OS=Homo sapiens	2	P0631	2,03E+11	3,78E+10
ICHV	OA=9000 GN=IGK v4-1 PE=1 S v=1	2	2 P0178	7 /0F±09	1.46E±10
3-7	OX=9606 GN=IGHV3-7 PE=1 SV=2	2	0	7,401107	1,402+10
IGHV	Immunoglobulin heavy variable 3-72 OS=Homo	2	A0A4	8,42E+09	1,65E+09
3-72	sapiens OX=9606 GN=IGHV3-72 PE=1 SV=1		W8Z		
ІСНУ	Immunoglobulin hogyy variable 3 73 OS-Homo	2	<u>XM2</u>	0.000553	0.000808
3-73	sapiens OX=9606 GN=IGHV3-73 PE=3 SV=1	2	B4I1	91749603	24458816
0 10			V6	,11,1,000	21100010
IGHV	Immunoglobulin heavy variable 6-1 OS=Homo sapiens	2	A0A0	1,92E+11	3,60E+10
6-1	OX=9606 GN=IGHV6-1 PE=3 SV=1		B4J1		
			<u>U7</u>	0.00000	0.040450
IGLC	Immunoglobulin lambda constant 2 OS=Homo sapiens	3	P0D0 V2	0.033099	0.043173
	Laminin subunit alpha-2 OS-Homo saniens OX-9606	4	$\frac{12}{P2404}$	0.037859	0.048956
A2	GN=LAMA2 PE=1 SV=4	-	3	6408667	43215523
LAM	Laminin subunit gamma-1 OS=Homo sapiens	8	P1104	1,19E+09	2,68E+09
C1	OX=9606 GN=LAMC1 PE=1 SV=3		7		
KRT9	Keratin, type I cytoskeletal 9 OS=Homo sapiens	20	P3552	0.019809	0.027013
	OX=9606 GN=KR19 PE=1 SV=3		7	59/30621	08723575
ANPE P	Aminopeptidase N $OS=Homo$ sapiens $OX=9606$ GN= Δ NPEP PE-1 SV- A	6	P1514	0.000871 38372264	0.001375
HMC	Hemicentin-1 OS=Homo sapiens OX=9606	2		4 37E+09	8 98E+09
N1	GN=HMCN1 PE=1 SV=2	2	W7	1,5711105	0,001100
FLG2	Filaggrin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FLG2	2	Q5D8	0.003594	0.005338
	PE=1 SV=1		62	75412848	74375518
KRT2	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal OS=Homo	18	P3590	2,68E+08	6,43E+07
	sapiens OX=9606 GN=KRT2 PE=1 SV=2		8	0.002517	0.005240
	Keratin, type II cytoskeletal /8 US=Homo sapiens	2	Q8N1 N4	0.003517	0.005249
KRT5	Keratin type II cytoskeletal 5 OS=Homo sapiens	6	P1364	0.028714	0.038286
	OX=9606 GN=KRT5 PE=1 SV=3	0	7	83136489	44181986
KRT1	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens	18	P0426	0.029097	0.038625
	OX=9606 GN=KRT1 PE=1 SV=6		4	59558288	12687994
				8734	0797
PTPR	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma	2	P2347	2,97E+10	5,47E+10
G	US=Homo sapiens UX=9606 GN=PTPRG PE=1 SV=4		0		

GP1B	Platelet glycoprotein Ib alpha chain OS=Homo sapiens	3	P0735	3,15E+09	6,95E+08
	Dratain AMDR OS-Home conions OX-0606	6	9	0.015619	0.021602
ANID D	Protein AMDP $OS=Holio sapiens OA=9000$ CN_AMDD DE_1 SV_1	0	P0270	0.013018	0.021092
FCI 1	$\frac{\text{ON-AWDF FE-I SV-I}}{\text{Ethring contains 1 OS-Home contains OX-0606}}$	2	0000	0.002442	0.005164
rgli	FIOTHOGEN-like protein 1 OS=nomo sapiens OA=9000 CN=ECL1 $DE=1 SN=2$	Z	20	0.005442	0.003104
VCA	UN=FOLT PE=T SV=5	2	<u> </u>	85201245	24891803
VCA M1	V ascular cell adhesion protein 1 $OS=Homo$ sapiens	3	P1952	0.000120	0.000211
	$\frac{\text{OX}=9000 \text{ GN}=\text{VCAMIT PE=1 SV=1}}{\text{SPAPC I'I}}$	2	0	09582229	93380404
SPAK	SPARC-like protein 1 US=Homo sapiens UX=9606	3	Q145	0.000172	0.000300
	GN=SPARCLI PE=1 SV=2	1.7	15	21088187	36/81/22
CFH	Complement factor H OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CFH PF=1 SV=4	15	P0860	0.000227	0.000392 40519487
CPN2	Carboxypeptidase N subunit 2 OS=Homo sapiens	5	P2279	0.007845	0.011261
01112	OX=9606 GN=CPN2 PE=1 SV=3	U	2	59436852	61871079
НР	Haptoglobin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HP	10	 P0073	0.001281	0.001971
	PF=1 SV=1	10	8	51295108	55838629
LMN	Prelamin-A/C OS=Homo sapiens OX=9606	2	P0254	0.002579	0.003888
A	GN=LMNA PE=1 SV=1	-	5	21001329	25630145
TUB	Tubulin alpha chain OS=Homo sapiens OX=9606	3	F5H5	0.007325	0.010565
AIC	GN=TUBA1C PE=1 SV=1	-	D3	15554084	12818390
ANX	Annexin A5 OS=Homo sapiens OX=9606	2	P0875	0.000174	0.000302
A5	GN=ANXA5 PE=1 SV=2	_	8	19868609	07864640
VIM	Vimentin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VIM	16	P0867	0.005950	0.008708
	PE=1 SV=4		0	78891661	47158529
ANX	Annexin A1 OS=Homo sapiens OX=9606	3	P0408	0.000549	0.000896
A1	GN=ANXA1 PE=1 SV=2		3	91628554	60263948
MMR	Multimerin-1 OS=Homo sapiens OX=9606	4	0132	0.046027	0.058018
N1	GN=MMRN1 PE=1 SV=3		01	80112404	23671098
CLU	Isoform 2 of Clusterin OS=Homo sapiens OX=9606	13	P1090	0.000561	0.000904
	GN=CLU		9-2	06357190	94124500
PRD	Peroxiredoxin-2 OS=Homo sapiens OX=9606	3	P3211	0.019254	0.026376
X2	GN=PRDX2 PE=1 SV=5		9	7178920	32587949
COL1	Collagen alpha-1(XVIII) chain OS=Homo sapiens	2	P3906	0.000843	0.001339
8A1	OX=9606 GN=COL18A1 PE=1 SV=5		0	74622988	27972996
SPTA	Spectrin alpha chain, erythrocytic 1 OS=Homo sapiens	2	P0254	0.011348	0.015983
1	OX=9606 GN=SPTA1 PE=1 SV=5		9	10781398	25044223
ACT	Actin, aortic smooth muscle OS=Homo sapiens	4	P6273	0.048942	0.061433
A2	OX=9606 GN=ACTA2 PE=1 SV=1		6	13527152	64260024
TPI1	Triosephosphate isomerase OS=Homo sapiens	2	P6017	0.023235	0.031258
	OX=9606 GN=TPI1 PE=1 SV=3		4	78918972	90922385
HSPD	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo	3	P1080	0.020064	0.027236
1	sapiens OX=9606 GN=HSPD1 PE=1 SV=2		9	15295433	40672533
CPS1	Isoform 3 of Carbamoyl-phosphate synthase	22	P3132	0.014467	0.020187
	[ammonia], mitochondrial OS=Homo sapiens		7-3	89212481	75645322
	OX=9606 GN=CPS1			0653	4164
ATP5	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial OS=Homo	3	P2570	0.018470	0.025418
<u>FIA</u>	sapiens OX=9606 GN=ATP5F1A PE=1 SV=1		5	736/1825	44502512
GLU D1	Glutamate dehydrogenase I, mitochondrial US=Homo	6	P0036	0.016628	0.022988
	sapiens UX=9606 GN=GLUDI PE=1 SV=2	2	/	32243081	46419007
GS1 M5	Glutathione S-transferase Mu 5 OS=Homo sapiens	2	P4643	0.031801	0.041661
	VA = 7000 UN = US INIS PE=1 S V=3	2	9 0750	0.021002	/01301/1
ALU U1T 1	dehudrogenese OS-Home seriese OX 0606	2	01.2	0.031093 42005155	0.040912 42000000
HILI	CN-ALDH11 1		91-3	43993133	42098888
DOM	DIN-ALDRILI Deguadain OS-Home coniene OV- 0000 CNL DON	2	0154	1314	0.057071
KGN	Regucaicin OS=HOMO sapiens OX=9000 GN=RGN DE=1 SV=1	2	Q154 03	0.043323	0.05/8/1
вни	Bataina homocysteina S mathyltransforasa 1	2	<u>75</u>	0 030221	0.050/04
рциі Т	OS-Homo samions $OY-0606$ CN-PUMT DE-1 SV-2	Z	88 88	0.037331 56/3510/	0.030423
1	O_{O} -HOINO SAPIONS O_{A} -2000 O_{A} -DRIVEL FE-1 SV=2		00	50455194	00230249

AHC	Adenosylhomocysteinase OS=Homo sapiens OX=9606	4	P2352	0.009831	0.013912
<u>Y</u>	GN=AHCY PE=1 SV=4		6	81260237	94236185
GAP	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	3	P0440	0.030873	0.040802
DH	OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GAPDH PE=1		6	76980325	33894703
Tarre	SV=3			9177	856
IGKV	Immunoglobulin kappa variable 2D-28 OS=Homo	2	A0A5	3,33E+10	6,10E+10
2D-28	sapiens OX=9606 GN=IGKV2D-28 PE=1 SV=1		HIZR		
			S2		
TFRC	Transferrin receptor protein 1 OS=Homo sapiens	3	P0278	4,42E+10	7,99E+10
Tarre	OX=9606 GN=TFRC PE=1 SV=2		6	0.000 (00	0.000011
IGHV	Immunoglobulin heavy variable 1-69-2 OS=Homo	2	A0A0	0.022430	0.030311
1-69-2	sapiens OX=9606 GN=IGHV1-69-2 PE=3 SV=2		G2JM	29841463	2140/383
			13	5456	1697
CRT	Cartilage acidic protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606	1	Q9N	0.042475	0.054224
ACI	GN=CRTACT PE=T SV=2		<u>Q/9</u>	98868719	66640917
CPNI	Carboxypeptidase N catalytic chain OS=Homo sapiens	9	P1516	0.000709	0.001131
	UX=9606 GN=CPN1 PE=1 SV=1	20	9 D1002	20977495	/1//2599 C 02E+10
1111111	seriors OX-0606 CN-ITIH1 PE-1 SV-3	20	P1982	2,90E+10	0,03E+10
ATP	$\frac{1}{2} \frac{1}{2} \frac{1}$	2	0758	0.000297	0.000504
N	PE-1 SV-2	2	82	55783/07	33531198
14	1L-15V-2		02	27738	77521
F2	Prothrombin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=F?	7	P0073	1.24E-11	3.72E-09
	PE=1 SV=2	,	4	1,21211	3,72E 07
GSN	Gelsolin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GSN PE=1	22	P0639	2,00E-09	2,00E-07
	SV=1		6	*	,
C3	Complement C3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C3	85	P0102	3,15E-09	1,68E-07
	PE=1 SV=2		4		
ITIH4	ITIH4 protein OS=Homo sapiens OX=9606	41	B7ZK	1,85E-06	7,95E-06
	GN=ITIH4 PE=1 SV=1		J8		
SERP	Thyroxine-binding globulin OS=Homo sapiens	13	P0554	3,43E-05	3,98E-05
INA7	OX=9606 GN=SERPINA7 PE=1 SV=2		3		
GPX3	Glutathione peroxidase 3 OS=Homo sapiens OX=9606	3	P2235	4,91E-07	1,64E-05
	GN=GPX3 PE=1 SV=2	20	2	1.075.04	0.14E.04
Iľ	Serotransferrin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=1F	30	P0278	1,07E-04	2,14E-04
TTAD	PE=1 SV=5	5	/	1.950.04	2.79E.05
nad D2	$OY_{-0.606} CN_{-0.40} PD2 DE_{-1} SV_{-1}$	5	20	1,63E-04	2,78E-03
HPY	Hemoneyin OS-Homo seniens OY-9606 GN-HPY	12	20 P0270	8 9/F 05	0 25E 05
шл	PF=1 SV=2	12	0	8,94L-05	9,2512-05
SERP	Antithrombin-III OS=Homo sapiens OX=9606	20	P0100	2 39E-09	1 68E-07
INC1	GN=SERPINC1 PE=1 SV=1	20	8	2,372 07	1,001 07
ALB	Albumin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALB	46	P0276	2.50E-06	9.36E-06
	PE=1 SV=2		8	_,	,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,
SERP	Alpha-2-antiplasmin OS=Homo sapiens OX=9606	12	P0869	4,86E-05	5,40E-04
INF2	GN=SERPINF2 PE=1 SV=3		7		·
PLG	Plasminogen OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PLG	7	P0074	2,75E-05	6,88E-05
	PE=1 SV=2		7		
C7	Complement component C7 OS=Homo sapiens	9	P1064	2,64E-05	3,61E-03
	OX=9606 GN=C7 PE=1 SV=2		3		
SERP	Alpha-1-antitrypsin OS=Homo sapiens OX=9606	4	P0100	1,82E-05	2,78E-05
INA1	GN=SERPINA1 PE=1 SV=3		9		
PRO	Isoform 2 of Vitamin K-dependent protein C	3	P0407	7,25E-05	7,76E-04
	US=Homo sapiens UX=9606 GN=PROC		0-2	0.015.01	1.005.01
квр4	Retinol-binding protein 4 OS=Homo sapiens OX=9606	4	P0275	2,21E-01	1,20E+01
170	UN=KBP4 PE=1 SV=3		3	2.025.02	1.150.01
ALG D1	Zinc-aipna-2-giycoprotein US=Homo sapiens	8	P2551	2,03E-02	1,15E+01
11	OA = 2000 OII = ALOI I I L = I S V = 2		1		

TTR	Transthyretin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TTR PE=1 SV=1	9	P0276 6	5,28E-03	3,96E-01
F10	Coagulation factor X OS=Homo sapiens OX=9606 GN=F10 PE=1 SV=2	5	P0074 2	3,51E-04	3,29E-02
A1BG	Alpha-1B-glycoprotein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=A1BG PE=1 SV=4	13	P0421 7	3,23E-04	3,98E-05
SERP INA4	Kallistatin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SERPINA4 PE=1 SV=3	10	P2962 2	2,78E-06	3,63E-03
SERP IND1	Heparin cofactor 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SERPIND1 PE=1 SV=3	14	P0554 6	2,88E-04	2,84E-03
C6	Complement component C6 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C6 PE=1 SV=3	17	P1367 1	2,29E-05	6,25E-05
SERP INA3	Alpha-1-antichymotrypsin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SERPINA3 PE=1 SV=2	20	P0101 1	3,45E-05	3,98E-05
B4E1 Z4	C3/C5 convertase OS=Homo sapiens OX=9606 PE=1 SV=1	24	B4E1 Z4	3,37E-09	1,68E-07
CFI	Complement factor I OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CFI PE=1 SV=1	7	E7ET H0	4,14E-03	3,76E-04
PGL YRP2	Isoform 2 of N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PGLYRP2	10	Q96P D5-2	1,99E-05	2,84E-03
CD14	Monocyte differentiation antigen CD14 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CD14 PE=1 SV=2	3	P0857 1	7,88E-08	2,36E-04
APCS	Serum amyloid P-component OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APCS PE=1 SV=2	9	P0274 3	1,28E-01	9,11E-02
C8A	Complement component C8 alpha chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C8A PE=1 SV=2	6	P0735 7	8,20E-06	1,76E-04
C8B	Complement component C8 beta chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C8B PE=1 SV=3	9	P0735 8	1,02E-03	9,04E-03
C5	Complement C5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C5 PE=1 SV=4	30	P0103 1	1,95E-02	1,30E+00
KLK B1	Plasma kallikrein (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=KLKB1 PE=1 SV=1	7	H0Y AC1	9,04E-01	4,68E+01
ITIH2	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ITIH2 PE=1 SV=2	23	P1982 3	7,00E-02	4,37E-01
LDH B	L-lactate dehydrogenase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LDHB PE=1 SV=1	2	A0A5 F9ZH M4	1,42E-04	2,50E-04
LUM	Lumican OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LUM PE=1 SV=2	10	P5188 4	7,26E-12	1,09E-07
SERP INA5	Plasma serine protease inhibitor OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SERPINA5 PE=1 SV=3	8	P0515 4	2,54E-01	1,66E+00
HRG	Histidine-rich glycoprotein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=HRG PE=1 SV=1	9	P0419 6	1,19E+00	7,00E-02
VTN	Vitronectin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VTN PE=1 SV=1	9	P0400 4	5,52E-01	3,52E-01
СР	Ceruloplasmin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CP PE=1 SV=1	6	P0045 0	2,02E+03	8,07E+02
APO A1	Apolipoprotein A-I OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOA1 PE=1 SV=1	26	P0264 7	3,55E+01	1,59E+02
APO H	Beta-2-glycoprotein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOH PE=1 SV=3	2	P0274 9	2,14E-01	1,19E+01
APO A4	Apolipoprotein A-IV OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOA4 PE=1 SV=4	24	P0672 7	3,56E-02	2,81E-01
CDH1 3	Isoform 4 of Cadherin-13 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CDH13	2	P5529 0-4	8,49E+01	3,59E+02
CPB2	Carboxypeptidase B2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CPB2 PE=1 SV=2	4	Q96I Y4	3,91E+02	1,54E+04
CLE C3B	Tetranectin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CLEC3B PE=1 SV=3	4	P0545 2	1,58E-01	1,08E+00
SERP INF1	Pigment epithelium-derived factor OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SERPINF1 PE=1 SV=4	15	P3695 5	8,46E+01	3,59E+02
-------------------	--	----	--------------------	----------	----------
SERP INA1 0	Protein Z-dependent protease inhibitor OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SERPINA10 PE=1 SV=1	6	G3V2 W1	9,39E+01	3,91E+03
IGHG 1	Immunoglobulin heavy constant gamma 1 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGHG1 PE=1 SV=1	5	A0A0 A0M S08	9,88E-03	7,23E-02
NCA M1	Neural cell adhesion molecule 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NCAM1 PE=1 SV=1	3	A0A0 87W V75	2,58E+01	1,21E+03
F7	Coagulation factor VII OS=Homo sapiens OX=9606 GN=F7 PE=1 SV=1	2	P0870 9	3,12E+03	1,02E+05
APO A2	Apolipoprotein A-II OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APOA2 PE=1 SV=1	4	V9G YM3	3,28E+05	9,55E+04
AFM	Afamin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AFM PE=1 SV=1	7	P4365 2	4,24E+07	9,87E+07
F9	Coagulation factor IX OS=Homo sapiens OX=9606 GN=F9 PE=1 SV=2	3	P0074 0	6,99E-01	3,68E+00
LCA T	Phosphatidylcholine-sterol acyltransferase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LCAT PE=1 SV=1	4	P0418 0	7,64E-02	4,63E-01
GC	Isoform 3 of Vitamin D-binding protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=GC	10	P0277 4-3	2,99E+01	1,38E+03
AHS G	Alpha-2-HS-glycoprotein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=AHSG PE=1 SV=1	6	C9JV 77	3,38E+01	1,54E+03
BTD	Isoform 2 of Biotinidase OS=Homo sapiens OX=9606 GN=BTD	6	P4325 1-2	1,33E+02	6,44E+00
C2	Complement C2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C2 PE=1 SV=2	4	P0668 1	3,86E+06	9,82E+06
IGHG 2	Immunoglobulin heavy constant gamma 2 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGHG2 PE=1 SV=1	3	A0A2 86YE Y4	2,94E+05	8,17E+05
LCP1	Plastin-2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LCP1 PE=1 SV=6	7	P1379 6	2,50E+04	8,42E+01
ORM 1	Alpha-1-acid glycoprotein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ORM1 PE=1 SV=1	6	P0276 3	1,53E+04	5,52E+03
C8G	Complement component C8 gamma chain OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C8G PE=1 SV=3	3	P0736 0	1,27E+03	5,14E+02
C1S	Complement C1s subcomponent OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C1S PE=1 SV=1	11	P0987 1	2,21E+07	5,71E+06
FETU B	Fetuin-B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FETUB PE=1 SV=2	3	Q9U GM5	7,14E+03	2,23E+05
IGHG 3	Immunoglobulin heavy constant gamma 3 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGHG3 PE=1 SV=1	5	A0A2 86YE S1	1,31E+04	4,79E+03
C1RL	Complement C1r subcomponent-like protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C1RL PE=1 SV=2	3	Q9NZ P8	7,09E+02	2,63E+04
С9	Complement component C9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C9 PE=1 SV=2	11	P0274 8	4,21E+01	1,83E+03
ECM 1	Extracellular matrix protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ECM1 PE=1 SV=2	6	Q166 10	2,37E+03	8,27E+03
LRG1	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LRG1 PE=1 SV=2	10	P0275 0	2,48E+04	8,42E+01
ITIH3	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ITIH3 PE=1 SV=2	16	Q060 33	1,44E+07	3,83E+06
SELE NOP	Selenoprotein P OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SELENOP PE=1 SV=3	4	P4990 8	7,60E+06	1,87E+08
F12	Coagulation factor XII OS=Homo sapiens OX=9606 GN=F12 PE=1 SV=3	2	P0074 8	4,53E+03	1,46E+05

IGFA	Isoform 2 of Insulin-like growth factor-binding protein	11	P3585	5,28E+07	1,21E+09
LS	complex acid labile subunit OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGFALS		8-2		
TGFB	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	8	Q155	3,12E+07	7,38E+06
I	OS=Homo sapiens OX=9606 GN=TGFBI PE=1 SV=1		82		
MCA M	Cell surface glycoprotein MUC18 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=MCAM PE=1 SV=2	2	P4312 1	1,80E+07	4,70E+06
EFE MP1	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EFEMP1 PE=1 SV=2	2	Q128 05	2,52E+07	6,10E+07
CDH5	Cadherin-5 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CDH5 PE=1 SV=5	4	P3315 1	3,07E+07	7,30E+07
C4A	Complement C4-A OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C4A PE=1 SV=2	3	P0C0 L4	5,63E+02	2,17E+02
C4B	Complement C4-B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C4B PE=1 SV=2	3	P0C0 L5	3,39E+08	7,43E+08
PON3	Serum paraoxonase/lactonase 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PON3 PE=1 SV=3	2	Q151 66	1,51E+06	3,69E+07
CFD	Adipsin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CFD PE=1 SV=1	2	K7ER G9	6,49E+06	1,63E+08
ANG PTL3	Angiopoietin-related protein 3 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ANGPTL3 PE=1 SV=1	2	Q9Y5 C1	6,20E+09	1,24E+11
VASN	Vasorin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=VASN PE=1 SV=1	4	Q6E MK4	5,16E+11	9,26E+10
CA2	Carbonic anhydrase 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CA2 PE=1 SV=2	4	P0091 8	5,17E+09	1,06E+11
CA1	Carbonic anhydrase 1 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CA1 PE=1 SV=2	5	P0091 5	1,93E+09	4,33E+09
IGHG 4	Immunoglobulin heavy constant gamma 4 (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGHG4 PE=1 SV=1	3	A0A2 86YF J8	4,20E+10	7,64E+10
ORM 2	Alpha-1-acid glycoprotein 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ORM2 PE=1 SV=2	5	P1965 2	0.000280 83259839	0.000481 42731153
SHB	Sex hormone-binding globulin OS=Homo sapiens	10	P0427	0.001128	0.001745
G SFRP	OX=9606 GN=SHBG PE=1 SV=2	10	8 P0818	97023752 5.45E±09	$\frac{83026421}{1.11E\pm11}$
INA6	OX=9606 GN=SERPINA6 PE=1 SV=1	10	5	5,451107	1,112+11
AGT	Angiotensinogen OS=Homo sapiens OX=9606	11	P0101	0.008532	0.012189
FNPP	GN=AG1 PE=1 SV=1	2	9	0.006923	0.010083
2	pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ENPP2	2	22-2	98061291	46691201
YWH AZ	14-3-3 protein zeta/delta (Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606 GN=YWHAZ PE=1 SV=1	2	E7EX 29	0.023725 32799776	0.031774 99285415
LDH	Isoform 3 of L-lactate dehydrogenase A chain	2	P0033	6,22E+10	0.000111
A	OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LDHA		8-3		07373877 4281
IGHV 1-24	Immunoglobulin heavy variable 1-24 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGHV1-24 PE=3 SV=1	2	A0A0 C4D	0.000140 20892805	0.000245 98057553
			H33	0.0000.000	0.000.11.5
5100 49	Protein S100-A9 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=S100A9 PE=1 SV=1	3	P0670 2	0.000366 76285204	0.000612
VNN1	Pantetheinase OS=Homo saniens OX=9606	2.	<u>~</u> 0954	0.002445	0.003705
, I I I I	GN=VNN1 PE=1 SV=2	2	97	79945899	75675605
QSO	Sulfhydryl oxidase 1 OS=Homo sapiens OX=9606	3	O003	0.000370	0.000614
<u>X1</u>	GN=QSOX1 PE=1 SV=3		<u>91</u>	56657551	19874395
SELL	Isotorm 2 of L-selectin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=SELL	4	P1415 1-2	0.000658 30608887	0.001056 10602493

IGKV	Probable non-functional immunoglobulin kappa	2	A0A0	0.002262	0.003445
3-7	variable 3-7 OS=Homo sapiens OX=9606		75B6	48511094	40879839
	GN=IGKV3-7 PE=5 SV=1		H7		
APO	Apolipoprotein C-I OS=Homo sapiens OX=9606	2	P0265	0.007207	0.010445
C1	GN=APOC1 PE=1 SV=1		4	63251252	84422105

Tabela suplementar 2. Lista de proteínas significativas (N=38 proteínas com 2 ou mais peptídeos únicos) entre controle e HF para o proteômica de exossomos (comparação de dois grupos – caso e controle; p<0,05 e q≤0,048).

	Descrição	#	UniPr	p-valor	q-valor
Gene		Peptíde	ot		
		0S únicos			
APM	Adipocyte plasma membrane-associated protein		09H	0.0283028	0.035540
AP	OS=Homo sapiens OX=9606 GN=APMAP PE=1		DC9	74646841	54517290
	SV=2		207	378	7244
APO	Apolipoprotein B-100 OS=Homo sapiens OX=9606	228	P0411	0.0005921	0.007500
В	GN=APOB PE=1 SV=2		4	61810372	71626472
				722	1145
APO	Apolipoprotein D (Fragment) OS=Homo sapiens	6	C9JF1	0.0021761	0.016538
D	OX=9606 GN=APOD PE=1 SV=1		7	28733729	57837634
			0107	5405	4506
APO	Apolipoprotein F OS=Homo sapiens OX=9606	2	Q137	0.0289936	0.035540
ľ	GN=APOF PE=1 SV=2		90	02641055	54517290 7244
	Apolipoprotein MOS-Homo sapiens OX-9606	3	095/	0.0068833	0.021797
M	GN=APOM PF=1 SV=2	5	45	63534863	31786040
111			15	534	119
ATP	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Homo	7	P0657	0.0427081	0.043862
5F1B	sapiens OX=9606 GN=ATP5F1B PE=1 SV=3		6	02985818	37603948
	-			17	893
C4B	Complement C4-B OS=Homo sapiens OX=9606	3	P0C0	0.0487401	0.048740
	GN=C4B PE=1 SV=2		L5	74297796	17429779
			D 0400	94	694
C4B	C4b-binding protein alpha chain OS=Homo sapiens	8	P0400	0.0104085	0.023875
PA	OX=9606 GN=C4BPA PE=1 SV=2		3	48864336	80436955
САТ	Catalase OS-Homo saniens OX-9606 GN-CAT	1	P0/0/	0.0390719	0.042652
CAI	PF=1 SV=3	-	0	06007817	83953053
			0	125	3254
CD5	CD5 antigen-like OS=Homo sapiens OX=9606	4	O438	0.0392855	0.042652
L	GN=CD5L PE=1 SV=1		66	10093912	83953053
				21	3254
CFH	Complement factor H-related protein 4 OS=Homo	2	Q924	0.0039359	0.016643
R4	sapiens OX=9606 GN=CFHR4 PE=1 SV=3		96	59859829	60386174
CLU	Lasform 2 of Christopin OS, Home conjuga OV, 0000	12	D1000	75	9654
CLU	GN-CLU	13	P1090	0.03/1/08 2505/660	0.042052
			9-2	23934009 78	3254
COL	Collectin-10 OS=Homo sapiens OX=9606	4	09Y6	0.0049500	0.018810
EC1	GN=COLEC10 PE=1 SV=2		Z7	90521321	34398102
0				42	1396
FET	Fetuin-B OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FETUB	3	Q9U	0.0030849	0.016643
UB	PE=1 SV=2		GM5	27144365	60386174
-			0.000	859	9654
FGL	Fibrinogen-like protein 1 OS=Homo sapiens	2	Q088	0.0157972	0.026729
I	UA=9000 GN=FGL1 PE=1 SV=3		30	05307052 422	51920700 252
CIU	Glutamate dehydrogenase 1. mitochondrial	6	DU036	433	233
D1	OS=Homo saniens OX=9606 GN-GI UD1 PE-1	0	r 0030 7	0.0039419	6038617 <i>4</i>
D 1	SV=2		1	813	9654

GPL	Phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D	15	P8010	0.0004823	0.007500
D1	OS=Homo saniens OX=9606 GN=GPL D1 PE=1		8	15159278	71626472
21	SV-3		0	2/3/	1145
юч	Immunoglobulin house constant mu OS-Homo	16	D0197	0.0070567	0.022161
M	anniana OX 0000 CN ICLIM DE 1 SV 4	10	1	49596965	0.022101
IVI	sapiens OX=9606 GN=IGHM PE=1 SV=4		1	48586865	24590154
		-		3/4	27
IGH	Immunoglobulin heavy variable 3-15 OS=Homo	3	A0A0	0.0193586	0.027245
V3-	sapiens OX=9606 GN=IGHV3-15 PE=3 SV=1		B4J1	25493568	47291687
15			V0	503	4187
IGH	Immunoglobulin heavy variable 3-49 OS=Homo	3	A0A0	0.0151829	0.026729
V3-	sapiens OX=9606 GN=IGHV3-49 PE=3 SV=1		A0M	68150878	51920700
49	•		S15	263	253
IGH	Immunoglobulin heavy variable 3-73 OS=Homo	2	A0A0	0.0170583	0.026729
V3-	sapiens OX=9606 GN=IGHV3-73 PE=3 SV=1		B4J1	41296736	51920700
73			V6	05	253
IGK	Immunoglobulin kappa constant OS-Homo sapiens	11	P0183	0.0015616	0.014835
C	OX-0606 CN-IGKC PE-1 SV-2	11	10105	40124253	58118040
C	0A-9000 0N-10KC 1 E-1 5 V-2		4	40124255	7014
	Immunoglabulin konne verieble 1.9 OS-Home	2	1010	0.0265522	0.025540
IGA V1 0	aminulogiobulin kappa variable 1-8 OS=Hollio	Z	AUAU CADU	0.0203333	0.055540
V 1-8	sapiens $OX=9000$ GN=IGK v 1-8 PE=3 S v=1		C4DH	14/8181/	54517290
1077			0/	83	1244
IGK	Probable non-functional immunoglobulin kappa	2	A0A0	0.0182310	0.026/29
V2D-	variable 2D-24 OS=Homo sapiens OX=9606		75B6	38265984	51920700
_24	GN=IGKV2D-24 PE=5 SV=1		R9	514	253
IGK	Probable non-functional immunoglobulin kappa	2	A0A0	0.0004237	0.007500
V3-7	variable 3-7 OS=Homo sapiens OX=9606		75B6	48758024	71626472
	GN=IGKV3-7 PE=5 SV=1		H7	9938	1145
IGL	Immunoglobulin lambda constant 2 OS=Homo	3	P0DO	0.0182886	0.026729
C2	sapiens OX=9606 GN=IGLC2 PE=1 SV=1		Y2	18404791	51920700
				207	253
IGL	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5	2	A0A0	0.0106812	0.023875
L5	OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IGLL5 PE=1		B4J23	80902167	80436955
	SV=1		1	177	0162
IGL	Immunoglobulin lambda variable 2-18 OS=Homo	2	A0A0	0.0285985	0.035540
V2-	sapiens OX=9606 GN=IGLV2-18 PE=3 SV=2		75B6J	69327335	54517290
18			9	753	7244
	Apolipoprotein(a) OS-Homo saniens OX-9606	14	P0851	0.0368263	0.042652
	GN-I PA PF-1 SV-1	11	9	63144815	83953053
)	154	3254
MAS	Isoform 2 of Mannan hinding lactin spring protosso 1	2	D/97/	0.0418206	0.043862
D1	OS-Homo sopions OX-0606 GN-MASD1	2	0.2	62650028	0.043802
L I	OS-HOIIIO Sapielis OX-9000 ON-MASP I		0-2	10	37003940 902
MDI			D1100	19	0.02(720
MBL	Mannose-binding protein C OS=Homo sapiens	0	P1122	0.0161075	0.026729
2	OX=9606 GN=MBL2 PE=1 SV=2		0	145/896/	51920700
				37	253
P4H	Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens	5	P0723	0.0140417	0.026729
В	OX=9606 GN=P4HB PE=1 SV=3		7	43174486	51920700
				856	253
PCY	Prenylcysteine oxidase 1 OS=Homo sapiens	14	Q9U	0.0058589	0.020240
OX1	OX=9606 GN=PCYOX1 PE=1 SV=3		HG3	51268769	01347392
				0455	9428
PRO	Vitamin K-dependent protein S (Fragment)	11	A0A0	0.0029525	0.016643
S1	OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PROS1 PE=1		S2Z4	44108398	60386174
	SV=1		L3	012	9654
PTG	Prostaglandin-H2 D-isomerase OS=Homo sapiens	2	P4122	0.0082712	0.022161
DS	OX=9606 GN=PTGDS PE=1 SV=1	-	2	79418714	24590154
			-	271	27

SAA	SAA2-SAA4 readthrough OS=Homo sapiens	3	A0A0	0.0138880	0.026729
2-	OX=9606 GN=SAA2-SAA4 PE=3 SV=1		96LP	92537217	51920700
SAA			E2	225	253
4					
SER	Heparin cofactor 2 OS=Homo sapiens OX=9606	14	P0554	0.0087478	0.022161
PIN	GN=SERPIND1 PE=1 SV=3		6	60224293	24590154
D1				17	27
TUB	Tubulin alpha chain OS=Homo sapiens OX=9606	3	F5H5	0.0182827	0.026729
A1C	GN=TUBA1C PE=1 SV=1		D3	73865766	51920700
				662	253

Tabela suplementar 3. Lista de proteínas significativas (N=31 proteínas com 2 ou mais peptídeos únicos) entre controle e HF para proteômica plasmático (comparação de dois grupos – caso e controle; p<0,05 e q≤0,461).

Gene	Descrição	#	UniPr	p-valor	q-valor
		Peptíde	ot		
		os			
		unicos	W7ED	0.0200242	0.400102
APOC	Apolipoprotein C-II US=Homo sapiens UX=9606	5	K/ER	0.0289343	0.408123
4-	GN=APOC4-APOC2 PE=1 SV=1		/4	86004753	051/923
APUC				124	//8
	Apolipoprotein F OS-Homo sapiens OX-9606	20	P0264	0.0228692	0.403574
M OL	GN=APOF PF=1 SV=1	20	9	41206914	8448278
			,	13	964
PRG4	Isoform F of Proteoglycan 4 OS=Homo sapiens	10	09295	0.0304554	0.408123
	OX=9606 GN=PRG4		4-6	48724860	0517923
				435	778
C4BP	C4b-binding protein alpha chain OS=Homo sapiens	8	P0400	0.0074714	0.225287
Α	OX=9606 GN=C4BPA PE=1 SV=2		3	83580613	0021712
				239	739
APO	Apolipoprotein M OS=Homo sapiens OX=9606	3	O9544	0.0298731	0.408123
Μ	GN=APOM PE=1 SV=2		5	62123627	0517923
001			D0076	73	778
ORMI	Alpha-1-acid glycoprotein I US=Homo sapiens	6	P0276	0.0128/12	0.351032
	OA=9000 GN=ORM11 PE=1 SV=1		3	04327301	8307300 5425
CFH	Complement factor H OS-Homo saniens OX-9606	15	P0860	0.0380315	0.450756
CIII	GN=CFH PF=1 SV=4	15	3	77886923	9801366
			5	224	02
PROS	Vitamin K-dependent protein S (Fragment)	11	A0A0	0.0020024	0.139124
1	OS=Homo sapiens OX=9606 GN=PROS1 PE=1		S2Z4L	45971868	3699215
	SV=1		3	4107	469
APOB	Apolipoprotein B-100 OS=Homo sapiens OX=9606	228	P0411	0.0001940	0.058216
	GN=APOB PE=1 SV=2		4	54994188	4982565
				4003	2009
ORM2	Alpha-1-acid glycoprotein 2 OS=Homo sapiens	5	P1965	0.0256950	0.408123
	OX=9606 GN=ORM2 PE=1 SV=2		2	45995509	051/923
T DA	Apolinoprotain(a) OS-Homo sonions OV-0606	14	D0951	0.0405681	//8
LFA	Aponpoprotein(a) $OS=nonio sapiens OX=9000GN-L PA PE-1 SV-1$	14	0	0.0403081	0.430736
)	18	02
SELL	Isoform 2 of L-selectin OS=Homo sapiens OX=9606	4	P1415	0.0027027	0.139124
02222	GN=SELL	·	1-2	38877524	3699215
				974	469
C1RL	Complement C1r subcomponent-like protein	3	Q9NZ	0.0075095	0.225287
	OS=Homo sapiens OX=9606 GN=C1RL PE=1		P8	66739042	0021712
	SV=2			462	739
IGKV	Probable non-functional immunoglobulin kappa	2	A0A0	0.0006291	0.094368
3-7	variable 3-7 OS=Homo sapiens OX=9606		75B6	21862411	2793617
	GN=IGKV3-/ PE=5 SV=1	2	H7	9335	9003
1GHV 2 15	immunoglobulin neavy variable 3-15 US=Homo	3		0.0052298	0.204455 2159162
3-13	sapiens UA=9000 UN=10H V 3-13 PE=3 5 V=1		D4J1V 0	02221093	5130103 5434
	Immunoglobulin lambda constant 2 OS-Homo	2		0.01780/6	0 383/55
2	sapiens OX=9606 GN=IGLC2 PF=1 SV=1	5	Y2	00528003	7256000
-			1 4	25	696

ICHV	Immunoglobulin heavy variable 3-72 OS-Homo	2	4044	0.0192940	0 385880
3 77	sopions OV-0606 GN-IGHV3 72 DE-1 SV-1	2	WQ7V	20040815	4008163
5-12	sapiens OA-9000 ON-1011 v 3-72 FE-1 S v -1		WOLA M2	20040813	4008103
		2		194	0387
IGKV	Immunoglobulin kappa variable 1-33 US=Homo	2	A0A2	0.0398135	0.450/56
1D-33	sapiens OX=9606 GN=IGKV1D-33 PE=1 SV=1		Q2TT	80813968	9801366
			Z9	56	02
IGHG	Immunoglobulin heavy constant gamma 1	5	A0A0	0.0312894	0.408123
1	(Fragment) OS=Homo sapiens OX=9606		A0MS	33970748	0517923
	GN=IGHG1 PE=1 SV=1		08	966	778
IGKV	Immunoglobulin kappa variable 1-8 OS=Homo	2	A0A0	0.0430721	0.459772
1-8	sapiens OX=9606 GN=IGKV1-8 PE=3 SV=1		C4DH	31551004	4758586
			67	05	36
IGKV	Immunoglobulin kappa variable 3-11 OS=Homo	2	P0443	0.0054521	0.204455
3-11	sapiens OX=9606 GN=IGKV3-11 PE=1 SV=1		3	41755102	3158163
				782	5434
IGKV	Immunoglobulin kappa variable 2D-29 OS=Homo	3	A0A5	0.0020734	0.139124
2D-29	sapiens OX=9606 GN=IGKV2D-29 PE=1 SV=1		H1ZR	22992795	3699215
	1		S9	314	469
IGHV	Immunoglobulin heavy variable 6-1 OS=Homo	2	A0A0	0.0283123	0.408123
6-1	sapiens OX=9606 GN=IGHV6-1 PE=3 SV=1	_	B4J1U	02449083	0517923
~ -			7	73	778
ENPP	Isoform 2 of Ectonucleotide	2	01382	0.0215776	0 403574
2	pyrophosphatase/phosphodiesterase family member	-	2-2	13524613	8448278
-	2 OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ENPP2			14	964
SHBG	Sex hormone-binding globulin OS=Homo sapiens	10	P0427	0.0383954	0 450756
Shibo	OX-9606 GN-SHBG PE-1 SV-2	10	8	50873572	9801366
			0	72	02
VTN	Vitronectin OS=Homo saniens OX=9606 GN=VTN	9	P0400	0.0171454	0 383455
, 11,	PE-1 SV-1		4	67180706	7256000
				916	696
OAF	Out at first protain homolog OS-Homo sanians	3	08611	0.0450772	0.459772
UAI	OX = 0.606 CN = 0.4 E PE = 2 SV = 1	5	Q000	17585863	1758586
	$0X = 3000 \text{ OIN} = 0\text{ AI}^{-1} \text{ I}^{-2} \text{ S}^{-1} \text{ I}^{-1}$		DI	47585805	4758580
DSC1	Desmoglain 1 OS-Home senions OV-0606	2	00241	0 0027824	0.120124
DSGI	CN_DSC1 DE_1 SV_2	3	20241	0.0027824	0.159124
	GN=DSGTPE=TSV=2		3	8/398430	3699215
CDV2		2	D2225	9377	409
GPX3	Glutathione peroxidase 3 US=Homo sapiens	3	P2235	0.01/0591	0.383455
	OX=9606 GN=GPX3 PE=1 SV=2		2	21705338	7256000
			DECIO	656	696
ЕРРК	Epiplakin OS=Homo sapiens OX=9606 GN=EPPK1	3	P5810	0.0459139	0.459772
1	PE=1 SV=3		7	70769630	4758586
				996	36
KRT1	Keratin, type I cytoskeletal 14 OS=Homo sapiens	6	P0253	0.0476701	0.461323
4	OX=9606 GN=KRT14 PE=1 SV=4		3	16114238	7043313
				81	4334

ANEXOS

A. Ficha do Aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



9136 - 10568527/1 - Renata Caroline C	Costa de Freitas
Email:	recarolinecf@usp.br
Data de Nascimento:	04/09/1992
Cédula de Identidade:	RG - 001.832.801 - RN
Local de Nascimento:	Estado de Rio Grande do Norte
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutica - Universidade Federal do Rio Grande do Norte - Rio Grande do Norte - Brasil - 2014
Mestrado:	Mestre em Ciências Farmacêuticas - Área: Bioanálises e Medicamentos (1) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte - Rio Grande do Norte - Brasil - 2017
Curso:	Doutorado
Programa:	Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área:	Análises Clínicas
Data de Matrícula:	10/10/2017
Início da Contagem de Prazo:	10/10/2017
Data Limite para o Depósito:	17/06/2022
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Mario Hiroyuki Hirata - 10/10/2017 até o presente. Email: mhhirata@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, 10/10/2017
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 28/11/2019
Estágio no Exterior:	Harvard Medical School, Estados Unidos da América - Período de 28/01/2020 até 27/01/2021
Data do Depósito do Trabalho: Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa: Data da Defesa: Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matricula em 10/10/2017

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018). Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 19/07/2021 Impresso em: 07/03/2022 13:48:29

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas FICHA DO ALUNO

9136 - 10568527/1 - Renata Caroline Costa de Freitas

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
PSP5121- 1/5	Bioestatística (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	20/02/2018	01/05/2018	90	0	-		N	Pré- matrícula indeferida
BIO5752- 3/1	Bioestatística (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	01/03/2018	21/06/2018	90	0	-		Ν	Pré- matrícula indeferida
FBC5792- 5/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia III	05/03/2018	19/06/2018	15	1	75	А	Ν	Concluída
MCM5880- 4/1	Bioestatística (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	06/03/2018	30/04/2018	120	8	100	А	Ν	Concluída
VPS5717- 7/2	Preparação Pedagógica (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo)	12/03/2018	25/03/2018	30	2	93	А	Ν	Concluída
TIC5021- 1/1	Genética em Cardiologia (Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia - Universidade de São Paulo)	16/04/2018	06/05/2018	90	6	100	А	Ν	Concluída
FBC5766- 6/2	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia IV	07/08/2018	19/11/2018	15	1	87	А	Ν	Concluída
FBC5709- 7/1	Biologia Molecular em Análises Clínicas	12/09/2018	10/10/2018	60	4	100	А	Ν	Concluída
FBC5708- 7/2	Farmacogenômica Cardiovascular	15/10/2018	26/11/2018	90	0	-	-	Ν	Turma cancelada
MCP5835- 3/10	Princípios de Análise de Dados e de Bioestatística (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	11/03/2019	24/03/2019	60	4	100	А	Ν	Concluída

	Créditos mínimo	Créditos obtidos	
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	26
Estágios:			
Total:	0	20	26

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Curso com validade nacional, de acordo com o disposto na Portaria MEC nº 1.077, de 31.08.2012.

Conceito a partir de 02/01/1997:

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

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

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 19/07/2021 Impresso em: 07/03/2022 13:48:29

B. Curriculum Vitae

Renata Caroline Costa de Freitas Curriculum Vitae

Abril/2021

Renata Caroline Costa de Freitas Curriculum Vitae

Nome civil

Nome Renata Caroline Costa de Freitas

Dados pessoais

Filiação Carlos Ailton Freire de Freitas e Maria Cristina Costa Nascimento 04/09/1992 - Mossoro/RN - Brasil 001832801 ITEP - RN - 15/01/2010 Carteira de Identidade CPF 099.684.124-57 Endereço residencial Rua Marselha, 1101, Apto 71 Jaguaré - São Paulo 05332000, SP - Brasil Telefone: 11 970446559 Celular 84 998186559 Endereço profissional Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas Avenida Professor Lineu Prestes, 580 Butantā - São Paulo 05508000, SP - Brasil Telefone: 11 30913660 Endereço eletrônico E-mail para contato : renata karoline@hotmail.com E-mail alternativo recarolinecf@gmail.com

Formação acadêmica/titulação

2017	Doutorado em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia). Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil Título: Avaliação do Perfil de miRNAs exossomais em Portadores de Hipercolesterolemia Familial Orientador: Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata Bolisista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
2015 - 2017	Mestrado em Ciências Farmacêuticas.
	Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Brasil Título: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE miRNAS EXOSSOMAIS NA TOXICIDADE HEPÁTICA INDUZIDA PELO CLOPIDOGREL EM CÉLULAS HepG2, Ano de obtenção: 2017
	Orientador: André Ducati Luchessi Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
2010 - 2014	Graduação em Farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Brasil Título: PREVALÊNCIA DE SÍNDROME METABÓLICA E RESISTÊNCIA À INSULINA EM PACIENTES COM SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS Orientador: Telma Maria Araujo Moura Lemos

Formação complementar

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 07/04/2022 as 21:31:26

Página 2 de 8

2014 - 2014	ESTUDANTES D. (Carga horária: 25h). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Brasil
2014 - 2014	Extensão universitária em ATIVIDADES INTEGRATIVAS EM SAÚDE E CIDADANIA -2014. (Carga horária: 8h). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Brasil
2013 - 2013	Extensão universitária em EXPERIÊNCIAS EXITOSAS EM SACI/POTI 2013.2. (Carga horária: 8h). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Brasil
2013 - 2013	Extensão universitária em X SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO À DOCENCIA E VII ENCONTRO. (Carga horária: 20h). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Brasil
2013 - 2013	Extensão universitária em I SIMPÓSIO DE MEDICAMENTOS INJETÁVEIS: DA PRESCRIÇ. (Carga horária: 8h). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Brasil
2012 - 2013	Extensão universitária em PROGRAMA SAÚDE PRISIONAL DO RN: CUIDANDO PARA REIN. (Carga horária: 260h). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Brasil
2013 - 2013	Extensão universitária em SEMANA ACADÊMICA DO CURSO DE FARMÁCIA: DEFESAS DOS. (Carga horária: 16h). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Brasil
2013 - 2013	Extensão universitária em USO RACIONAL DE MEDICAMENTOS. (Carga horária: 8h). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Brasil

DELVALÊNCIA DA SÍNDROME METADÓLICA EM

Áreas de atuação

1. Farmácia

Projetos

Projetos de pesquisa

2016 - Atual Biomarcadores moleculares da cardiomiopatia diabética: Estudo in vitro de cardiomiócitos de ratos

Descrição: O Diabetes mellitus (DM) é um grupo de distúrbios metabólicos heterogêneos caracterizado por um quadro de hiperglicemia crônica, na qual é decorrente de defeitos na ação e/ou secreção de insulina. A hiperglicemia do DM está associada ao desenvolvimento de processos inflamatórios em diversos tecidos e órgãos do indivíduo diabético, conduzindo a uma série de complicações crônicas micro e macrovasculares que incluem: retinopatia, nefropatia, neuropatia periférica e doenças cardiovasculares (DCV). Especialmente para as DCV no diabetes, diversos estudos têm sido realizados, visto que esta representa uma complicação com alta incidência e prevalência no âmbito mundial. Dentre as DCV, a cardiomiopatia diabética vem sem amplamente estudada, uma vez que é uma complicação muscular cardíaca, onde a capacidade do coração em circular o sangue através do corpo de forma efetiva estará afetada. Os sinais que a caracterizam envolvem uma dilatação e hipertrofia do miocárdio, além da diminuição na função sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo. Porém, apesar dos avanços médicos, as bases moleculares da fisiopatologia da cardiomiopatia diabética não estão totalmente elucidadas. Nesse contexto, estudos moleculares em culturas celulares de cardiomiócitos de ratos mantidos em meio

Página 3 de 8

hiperglicêmico podem auxiliar no melhor entendimento do envolvimento gênico nas alterações funcionais destas células. Assim, o objetivo do presente estudo será avaliar a expressão do RNAm PLA2G2A e dos miRNAs miR-122 e miR-214, que foram previamente selecionados em análise in silico, e assim avaliá-los de forma inédita em um estudo utilizando cultura de células primárias de tecido cardíaco de roedores, mantidas em estado hiperglicêmico. Os resultados obtidos neste estudo poderão contribuir no processo de validação de novos potenciais biomarcadores precoces desta complicação do DM.. Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1);

Integrantes: Renata Caroline Costa de Freitas; Vivian Nogueira Silbiger; Raul Hernandes Bortolin; Mariana Borges Lopes; Andre Ducati Luchessi (Responsável); Adriana Augusto de Rezende

2014 - Atual Biomarcador farmacogenômico baseados na tecnologia de miRNA exossomais

Descrição: A resistência à ação de antiagregantes plaquetários, como o bissulfato de clopidogrel, contribui para a evolução desfavorável da trombose arterial em pacientes submetidos à angioplastia. Neste contexto, o presente projeto tem como objetivo principal buscar o aprimoramento da terapêutica, do diagnóstico e prognóstico das doenças cardiovasculares, através da identificação de novos biomarcadores de resposta terapêutica baseados em estratégias biotecnológicas utilizando miRNA e exossomos. Assim o objetivo principal deste projeto é realizar um estudo in vitro, para identificação de partículas exossomais, utilizando o kit ExoQuick-TC (System Bioscience) de cultura de célula HepG2 com e sem tratamento com clopidogrel, através da detecção de anticorpos específico da fração exossomal da cultura celular por Western blot e posteriormente determinar o perfil de miRNA presentes nestas partículas pela PCR em tempo real (Applied Biosystems). Dessa forma, considerando o grande potencial de aplicação da farmacogenômica no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, diagnóstico, prognóstico, o presente projeto visa estabelecer quais são as influências da genômica individualizada na variação da resposta terapêutica, culminado em novas propostas de medicina personalizada, principalmente com a identificação da expressão de miRNA celular, e através do estudo in vitro utilizando modelos em cultura celular

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Renata Caroline Costa de Freitas; Vivian Nogueira Silbiger; Raul Hernandes Bortolin; Andre Ducati Luchessi (Responsável); Mario H Hirata; Luiz Antonio Salazar Navarrete ; Alvaro Danilo Cerda Maureira; Ivanise Marina Moretti Rebecchi ; Ananília Medeiros Gomes da Silva

2013 - 2014 Síndrome dos ovários policísticis: Estudo comparativo entre narcadres inflamatótios e resistência a insulina

Descrição: Aluna de Inicação Científica com carga horária total de 300 horas Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Renata Caroline Costa de Freitas (Responsável); ; T M A M Lemos; A C S Santos; N P Soares

Projeto de extensão

 2015 - 2015
 DIA D DA CARDIOPATIA CONGÊNITA NA UFRN

 Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão
 Integrantes: Renata Caroline Costa de Freitas (Responsável); ; GISELE CORREIA PACHECO

 LEITE
 Concluido Natureza: Projeto de extensão

2015 - Atual Atendimento à comunidade de Brasília Teimosa: avaliação e orientação dos fatores de risco para doenças cardiovasculares

Situação: Em andamento Natureza: Projeto de extensão Integrantes: Renata Caroline Costa de Freitas (Responsável); ; Vivian Nogueira Silbiger

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 07/04/2022 as 21:31:26

Página 4 de 8

2011 - 2012 Projeto Saúde Prisional do RN: Cuidando para Reintegrar Descrição: Aluna de IC do projeto de extensão, cunprindo uma carga horária de 1000 horas Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão Integrantes: Renata Caroline Costa de Freitas (Responsável); ; T M A M Lemos; A C S Santos; N P Soares

Idiomas		
Inglês	Compreende	Razoavelmente , Fala Razoavelmente , Escreve Bem , Lê Bem
Português	Compreende	Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

Prêmios e títulos

2019 2019 Best Abstract Award Outstanding Research in Lipoproteins and Vascular Diseases, American Association for Clinical Chemistry, Lipoproteins and Vascular Diseases Division

Producão

Produção bibliográfica Artigos completos publicados em periódicos

1. SCHLOTTER, FLORIAN; **DE FREITAS, RENATA C.C.**; ROGERS, MAXIMILLIAN A.; BLASER, MARK C.; WU, PIN-JOU; HIGASHI, HIDEYUKI; HALU, ARDA; IQBAL, FARWAH; ANDRASKI, ALLISON B.; RODIA, CAYLA N.; KURAOKA, SHIORI; WEN, JENNIFER R.; CREAGER, MICHAEL; PHAM, TAN; HUTCHESON, JOSHUA D.; BODY, SIMON C.; KOHAN, ALISON B.; SACKS, FRANK M.; AIKAWA, MASANORI; SINGH, SASHA A.; AIKAWA, ELENA

ApoC-III is a novel inducer of calcification in human aortic valves. JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., v.296, p.100193 - , 2021.

2. DE FREITAS, RENATA CAROLINE COSTA; HIRATA, ROSARIO DOMINGUEZ CRESPO; HIRATA, MARIO HIROYUKI; AIKAWA, ELENA

Circulating Extracellular Vesicles As Biomarkers and Drug Delivery Vehicles in Cardiovascular Diseases. BIOMOLECULES., v.11, p.388 - , 2021.

3. DAGLI-HERNANDEZ, CAROLINA; **DE FREITAS, RENATA CAROLINE COSTA**; MARÇAL, ELISANGELA DA SILVA RODRIGUES; GONÇALVES, RODRIGO MARQUES; FALUDI, ANDRE ARPAD; BORGES, JÉSSICA BASSANI; BASTOS, GISELE MEDEIROS; LOS, BRUNA; MORI, AUGUSTO AKIRA; BORTOLIN, RAUL HERNANDES; FERREIRA, GLAUCIO MONTEIRO; DE OLIVEIRA, VICTOR FERNANDES; HIRATA, THIAGO DOMINGUEZ CRESPO; HIRATA, MARIO HIROYUKI; HIRATA, ROSARIO DOMINGUEZ CRESPO

Late response to rosuvastatin and statin-related myalgia due to SLCO1B1, SLCO1B3, ABCB11, and CYP3A5 variants in a patient with Familial Hypercholesterolemia: a case report. Annals of Translational Medicine., v.9, p.76 - 76, 2021.

4. COSTA DE FREITAS, RENATA CAROLINE; BORTOLIN, RAUL HERNANDES; VECCHIA GENVIGIR, FABIANA DALLA; BONEZI, VIVIAN; CRESPO HIRATA, THIAGO DOMINGUEZ; FELIPE, CLAUDIA ROSSO; TEDESCO-SILVA, HELIO; MEDINA-PESTANA, JOSÉ OSMAR; CERDA, ALVARO; DOI, SONIA QUATELI; HIRATA, MARIO HIROYUKI; CRESPO HIRATA, ROSARIO DOMINGUEZ

Página 5 de 8

Differentially expressed urinary exo-miRs and clinical outcomes in kidney recipients on short-term tacrolimus therapy: a pilot study. Epigenomics., v.12, p.2019 - 2034, 2020.

5. PEGO, A.M.F.; LEYTON, V.; MIZIARA, I.D.; BORTOLIN, R.H.; **FREITAS, R.C.C.**; HIRATA, M.; TOMAZ, P.R.X.; SANTOS, J.R.; SANTOS, P.C.J.L.; YONAMINE, M.

SNPs from BCHE and DRD3 genes associated to cocaine abuse amongst violent individuals from Sao Paulo, Brazil. FORENSIC SCIENCE INTERNATIONAL., v.317, p.110511 - , 2020.

6. MEDEIROS, JEANE FRANCO PIRES; DE OLIVEIRA BORGES, MICHELLE VASCONCELOS; SOARES, ALINE ALVES; DOS SANTOS, JESSICA CAVALCANTE; DE OLIVEIRA, ANA BEATRIZ BEZERRA; DA COSTA, CONCEIÇÃO HORRANA BELO; CRUZ, MARINA SAMPAIO; BORTOLIN, R. H.; FREITAS, R. C. C.; DANTAS, PAULO MOREIRA SILVA; HIRATA, MARIO HIROYUKI; SILBIGER, VIVIAN NOGUEIRA; LUCHESSI, ANDRÉ DUCATI

The impact of vitamin D supplementation on VDR gene expression and body composition in monozygotic twins: randomized controlled trial. Scientific Reports. , v.10, p.11943 - , 2020.

7. SILVA, ANANÍLIA MEDEIROS GOMES DA; ARAÚJO, JÉSSICA NAYARA GÓES DE; FREITAS, RENATA CAROLINE COSTA DE; SILBIGER, VIVIAN NOGUEIRA

Circulating MicroRNAs as Potential Biomarkers of Atrial Fibrillation. BioMed Research International. , v.2017, p.1 - 7, 2017.

8. FREITAS, RENATA C. COSTA DE; BORTOLIN, RAUL H.; LOPES, MARIANA B.; TAMBORLIN, LETÍCIA; MENEGUELLO, LETÍCIA; SILBIGER, VIVIAN N.; HIRATA, ROSARIO D. C.; HIRATA, MÁRIO H.; LUCHESSI, AUGUSTO D.; LUCHESSI, ANDRÉ D.

Modulation of miR-26a-5p and miR-15b-5p Exosomal Expression Associated with Clopidogrel-Induced Hepatotoxicity in HepG2 Cells. Frontiers in Pharmacology., v.8, p.906 - , 2017.

9. LOPES, MARIANA BORGES; **FREITAS, R. C. C.**; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C.; SILBIGER, V. N.; BORTOLIN, R. H.; LUCHESSI, ANDRÉ DUCATI

mRNA-miRNA integrative analysis of diabetes-induced cardiomyopathy in rats. Frontiers in Bioscience. , v.9, p.194 - 229, 2017.

10. **DE FREITAS, RENATA CAROLINE COSTA**; BORTOLIN, RAUL HERNANDES; LOPES, MARIANA BORGES; HIRATA, MARIO HIROYUKI; HIRATA, ROSARIO DOMINGUEZ CRESPO; SILBIGER, VIVIAN NOGUEIRA; LUCHESSI, ANDRÉ DUCATI

Integrated analysis of miRNA and mRNA Gene expression microarrays: Influence on platelet reactivity, clopidogrel response and drug-induced toxicity. GENE., v.593, p.172 - 178, 2016.

Artigos aceitos para publicação

1. LOS, B.; BORGES, J. B.; OLIVEIRA, VICTOR FERNANDES DE; **FREITAS, R. C. C.**; HERNANDEZ, C. D.; BORTOLIN, R.H.; GONCALVES, R. M.; FALUDI, A. A.; RODRIGUES, A. C.; BASTOS, G. M.; HIRATA, R. D. C.; HIRATA, M. H.

Functional analysis of PCSK9 3'UTR variants and mRNA-miRNA interactions in patients with familial hypercholesterolemia. Epigenomics. , 2021.

2. BRAGA, AÉCIO A; BORTOLIN, RAUL H; GRACIANO-SALDARRIAGA, MAGDA E; HIRATA, THIAGO DC; CERDA, ALVARO; **DE FREITAS, RENATA CC**; LIN-WANG, HUI T; BORGES, JESSICA B; FRANÇA, JOÃO ID; MASI, LAUREANE N; CURI, RUI; PITHON-CURI, TANIA C; SAMPAIO, MARCELO F; CASTRO, LARA R; BASTOS, GISELE M; HIRATA, ROSARIO DC; HIRATA, MARIO H

High serum miR-421 is associated with metabolic dysregulation and inflammation in patients with metabolic syndrome. Epigenomics., 2021.

3. BORGES, JÉSSICA BASSANI; OLIVEIRA, VICTOR FERNANDES DE; FERREIRA, GLAUCIO MONTEIRO; LOS, BRUNA; BARBOSA, THAIS KRISTINI ALMENDROS AFONSO; MARÇAL, ELISANGELA DA SILVA RODRIGUES; DAGLI-HERNANDEZ, CAROLINA; **DE FREITAS, RENATA CAROLINE COSTA**; BORTOLIN, RAUL HERNANDES; MORI, AUGUSTO AKIRA; HIRATA, THIAGO DOMINGUEZ CRESPO; NAKAYA, HELDER TAKASHI IMOTO; BASTOS, GISELE MEDEIROS; THUROW, HELENA STRELOW; GONÇALVES, RODRIGO MARQUES; ARAUJO, DANIEL BRANCO DE; ZATZ, HENRY PAULO; BERTOLAMI, ADRIANA; FALUDI, ANDRÉ ARPAD; BERTOLAMI, MARCELO CHIARA; SOUSA, AMANDA GUERRA DE MORAES REGO; FRANÇA, JOÃO ÍTALO DIAS; JANNES, CINTHIA ELIM; PEREIRA, ALEXANDRE DA COSTA; NAKAZONE, MARCELO ARRUDA; SOUZA, DOROTÉIA ROSSI SILVA; CARMO, TAYANNE SILVA; SAMPAIO, MARCELO FERRAZ; GORJÃO, RENATA; PITHON-CURI, TANIA CRISTINA; MORIEL, PATRICIA; SILBIGER, VIVIAN NOGUEIRA; LUCHESSI, ANDRÉ DUCATI; DE ARAÚJO, JÉSSICA NAYARA GÓES; NASLAVSKY, MICHEL SATYA; WANG, JAQUELINE YU TING; KRONENBERGER, THALES; CERDA, ALVARO; LIN-WANG, HUI TZU; GAROFALO, ADRIANA REGINA; FAJARDO, CRISTINA MORENO; HIRATA, ROSARIO DOMINGUEZ CRESPO; HIRATA, MARIO HIROYUKI Genomics, epigenomics and pharmacogenomics of Familial Hypercholesterolemia (FHBGEP): A study protocol. Research in Social & Administrative Pharmacy., 2020.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. BORTOLIN, R.H.; BRAGA, AÉCIO A; GRACIANO-SALDARRIAGA, MAGDA E; HIRATA, THIAGO DC; MAUREIRA, A. D. C.; **FREITAS, R. C. C.**; LIN-WANG, HUI TZU; BORGES, J. B.; FRANÇA, JOÃO ID; MASI, LAUREANE N; CURI, RUI; PITHON-CURI, TANIA C; SAMPAIO, MARCELO F; CASTRO, LARA R; BASTOS, G. M.; HIRATA, R. D. C.; HIRATA, M. H.

Circulating miR-421 expression is associated with insulin resistance in metabolic syndrome patients In: 71st AACC Annual Scientific Meeting & Clinical Lab Expo, 2019, Anahein.

71st AACC Annual Scientific Meeting & Clinical Lab Expo., 2019.

2. FAJARDO, CRISTINA MORENO; BORTOLIN, R.H.; MAUREIRA, A. D. C.; FREITAS, R. C. C.; Oliveira, R; Moraes, T. I.; Malaquias, V.B.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C.

IRS2 rs1865434 variant is associated with adiposity and insulin resistance in Brazilian subjects In: 71st AACC Annual Scientific Meeting & Clinical Lab Expo, 2019, Anahein.

71st AACC Annual Scientific Meeting & Clinical Lab Expo., 2019.

3. FREITAS, R. C. C.; BORTOLIN, R.H.; BORGES, J. B.; LOS, B.; HERNANDEZ, C. D.; MORI, AUGUSTO AKIRA; OLIVEIRA, VICTOR FERNANDES DE; FERREIRA, GLAUCIO MONTEIRO; MARÇAL, ELISANGELA DA SILVA RODRIGUES; BASTOS, G. M.; FAJARDO, CRISTINA MORENO; GONCALVES, R. M.; FALUDI, A. A.; LUCHESSI, A. D.; HIRATA, ROSARIO D. C.; HIRATA, MARIO H

miRNA Predictive Profile Based on LDLR, APOB and PCSK9 3'UTR Variants as Potential Biomarker for Familial Hypercholesterolemia In: 71st AACC Annual Scientific Meeting & Clinical Lab Expo, 2019, Anahein. **71st AACC Annual Scientific Meeting & Clinical Lab Expo**., 2019.

4. BORTOLIN, R.H.; **FREITAS, R. C. C.**; VECCHIA GENVIGIR, FABIANA DALLA; BONEZI, V.; FELIPE, CLAUDIA ROSSO; TEDESCO-SILVA, HELIO; MEDINA-PESTANA, JOSÉ OSMAR; MAUREIRA, A. D. C.; HIRATA, M. H.; HIRATA, ROSARIO D. C.

Tacrolimus-based therapy modifies expression of microRNAs in urinary exosome of kidney transplant recipients In: XX Congresso Farmacêutico de São Paulo, 2019, São Paulo.

XX Congresso Farmacêutico de São Paulo., 2019.

5. BORGES, J. B.; THUROW, H.; HERNANDEZ, C. D.; **FREITAS, R. C. C.**; BASTOS, G. M.; GONCALVEZ, R.; FALUDI, A.; HIRATA, R. D. C.; HIRATA, M. H.

Characterization of the Most Frequent Variants in a Brazilian Population with Familial Hypercholesterolemia In: ACMG - Annual Clinical Genetics Meeting, 2018, Charlotte.

ACMG - Annual Clinical Genetics Meeting. , 2018.

6. HERNANDEZ, C. D.; LOS, B.; BORGES, J. B.; **FREITAS, R. C. C.**; BASTOS, G. M.; GONCALVES, R. M.; FALUDI, A. A.; HIRATA, R. D. C.; HIRATA, M. H.

INFLUÊNCIA DA VARIANTE APOA5 C.56G>C NO PERFIL LIPÍDICO DE INDIVÍDUOS COM HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAL In: 73° Congresso Brasileiro de Cardiologia, 2018, Brasilia/DF. Anais do 73° Congresso Brasileiro de Cardiologia., 2018.

7. LOS, B.; **FREITAS, R. C. C.**; BORTOLIN, R. H.; HERNANDEZ, C. D.; BORGES, J. B.; BONEZI, V.; HIRATA, R. D. C.; HIRATA, M. H.

mRNA-microRNA integrated analysis in Familial Hypercholesterolemia using Watson platform and microarray datasets In: X-meeting 2018 - 14th International Conference of the AB3C, 2018, São Pedro.

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 07/04/2022 as 21:31:26

Página 7 de 8

Anais do X-meeting 2018 - 14th International Conference of the AB3C., 2018.

8. FREITAS, R. C. C.; BORTOLIN, R. H.; MENEGUELLO, L.; TAMBORLIN, L.; LOPES, M. B.; SILBIGER, V. N.; HIRATA, R. D. C.; HIRATA, M. H.; LUCHESSI, A. D.; LUCHESSI, A. D.

miR-26a and miR-15b expression profiles as a potential early biomarker for clopidogrel-induced hepatotoxicity In: 69th AACC Annual Scientific Meeting & Clinical Lab Expo, 2017, San Diego. Anais da 69th AACC Annual Scientific Meeting & Clinical Lab Expo., 2017.

9. FREITAS, R. C. C.; BORTOLIN, R. H.; TAMBORLIN, L.; MENEGUELLO, L.; PEREIRA, K. D.; SILBIGER, V. N.; LUCHESSI, A. D.; LUCHESSI, A. D.

Clopidogrel Toxicity Measuring by Flow cytometry: A pilot study in HepG2 cell line In: 45a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2016, Natal.

Anais da 45a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular., 2016.

10. FREITAS, R. C. C.; BORTOLIN, R. H.; LOPES, M. B.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C.; SILBIGER, V. N.; LUCHESSI, A. D.

In Silico Analysis of miRNA and mRNA Gene Expression profiles: Interaction Gene-Toxicity of Antiplatelet Therapy In: 45a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2016, Natal. Anais da 45a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2016.

11. LOPES, M. B.; FREITAS, R. C. C.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C.; REZENDE, A. A.; SILBIGER, V. N.; BORTOLIN, R. H.; LUCHESSI, A. D.

Integrative in Silico Analysis of miRNA and mRNA Expression Profiles in Left Ventricle of Diabetic Rats In: 45a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2016, Natal.

Anais da 45a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular., 2016.

Apresentação de trabalho e palestra

1. LUCHESSI, A. D.; BRION, M.; SILBIGER, V. N.; BORTOLIN, R. H.; **FREITAS, R. C. C.**; INIGUEZ, A.; BRAVO, M.; BASTOS, G.; HIRATA, R. D. C.; CARRACEDO, A.; HIRATA, M. H. **VARIAÇÕES GENÉTICAS NA CYP2C19, CYP2C9, CYP5A1 E ITGA2 ASSOCIADAS COM A FALTA DE RESPOSTA AO CLOPIDOGREL**, 2017. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

C. PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



INSTITUTO DANTE

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Ultrassequenciamento exômico dos principais genes relacionados com a hipercolesterolemia familiar

Pesquisador: Jéssica Bassani Borges

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 8

CAAE: 24618713.0.1001.5462

Instituição Proponente: Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia - SP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio CNPQ

FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.587.235

Apresentação do Projeto:

Nº DO PROTOCOLO DO CEP:4398/ 2013

A hipercolesterolemia familial (HF) é uma doença autossômica dominante com bases genéticas ainda não totalmente esclarecidas. O presente

estudo propõe a análise genômica, epigenômica e farmacogenômica de portadores de HF monogênica e poligênica. Serão recrutados pacientes

com HF diagnosticada fenotipicamente, em seis centros de pesquisa de diferentes regiões do Brasil. Os métodos utilizados incluem: (i)

ultrassequenciamento dos principais genes relacionados à HF e outras dislipidemias primárias utilizando o equipamento MiSeq (Illumina); (ii) análise

funcional de novas variantes nos genes LDLR, APOB e PCSK9 por citometria de fluxo, com estudo de interação com receptores de LDL em

linfócitos primários e com estudo de mutagênese dirigida utilizando CRISPR/Cas9 em células HepG2 e HUVEC; (iii) perfil de expressão diferencial

de miRNAs circulantes em amostras de plasma por PCR array; (iv) perfil de metilação dos genes LDLR, APOB e PCSK9 em leucócitos por

Endereço: Av. Dr. Dante Pazzanese N.º 500, Torre 6º andar				
Bairro:	Bairro: Ibirapuera CEP:		04.012-909	
UF: SP	Município:	SAO PAULO		
Telefone	(11)5085-6040	Fax: (11)5085-6040	E-mail:	cep@dantepazzanese.org.br

Página 01 de 05

otoforma





Continuação do Parecer: 2.587.235

pirossequenciamento; (v) análise farmacogenômica incluindo genes envolvidos no metabolismo e na resposta a hipolipemiantes. As análises de

bioinformática serão realizadas utilizando-se os programas MiSeq Reporter e CLC Genomic Workbench. Este estudo é pioneiro no país e a sua

realização na população brasileira, altamente miscigenada, é inovadora e desafiadora. Os resultados deste estudo visam contribuir para o

conhecimento das bases moleculares da HF, fornecer elementos para direcionamento no diagnóstico genético e na terapia personalizada de

pacientes afetados, e possibilitar a criação de um banco nacional de dados genômicos que auxilie na orientação da conduta diagnóstica molecular

para pacientes com fenótipo HF e seus familiares. Contribuirá para a formação de recursos humanos, consolidação da pesquisa e integração das

instituições envolvidas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Identificar as causas genéticas das dislipidemias primárias dos pacientes diagnosticados fenotipicamente no Instituto Dante Pazzanese de

Cardiologia.

Objetivo Secundário:

 Sequenciar os exomas dos genes relacionados a dislipidemias de origem genética e verificar o perfil das novas variantes polimórficas em pacientes

com diagnóstico de hipercolesterolemia familiar.

- · Identificar novas variantes nos genes relacionados com alteração do metabolismo do colesterol.
- · Avaliar as correlações entre as mutações e as alterações fenotípicas.

 Caracterizar a funcionalidade de variantes do gene LDLR in vitro pelo perfil de captação de LDL, em cultura primária de linfócitos oriundos de

portadores de HF;

 Caracterizar a funcionalidade de variantes do gene APOB in vitro pelo perfil de captação de LDL oriunda de portadores de HF, em células HepG2 e

HUVEC;

 Realizar a mutagênese de variantes dos genes LDLR e PCSK9, encontradas no sequenciamento, em células HepG2 e HUVEC para avaliar sua

funcionalidade independente da presença de outras variantes.

Endereço: Av. Dr. Dante Pazzanese N.º 500, Torre 6º andar				
Bairro:	birapuera	CEP:	04.012-909	
UF: SP	Município:	SAO PAULO		
Telefone	(11)5085-6040	Fax: (11)5085-6040	E-mail:	cep@dantepazzanese.org.br

Página 02 de 05



Continuação do Parecer: 2.587.235

 Avaliar o perfil de expressão diferencial de miRNAs circulantes entre os diferentes padrões fenotípicos de HF encontrados em nossa população;

 Avaliar o perfil de metilação das ilhas CpG dos genes LDLR, APOB e PCSK9 de portadores de HF com diferentes padrões fenotípicos;

 Avaliar a associação de variantes em genes envolvidos no metabolismo e na resposta a medicamentos hipolipemiantes, em pacientes HF.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os participantes deste estudo não se submeterão a procedimentos adicionais, exceto a coleta de material biológico para dosagem dos

biomarcadores, que em alguns serviços fazem parte da rotina do atendimento desses pacientes. Os riscos físicos referentes à coleta de amostra de

sangue para o estudo são: hematoma, flebite, breve dor. Algumas pessoas têm vertigens quando coletam sangue, mas os sintomas desaparecem

quando a pessoa se deita.

Benefícios:

Os participantes deste estudo não poderão receber nenhum benefício direto por fazer parte do Estudo. As informações obtidas deste estudo serão

importantes para melhorar o diagnóstico, prognóstico e a prevenção dos eventos cardiovasculares em pacientes com dislipidemias primárias.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem restrições do ponto de vista de ética em pesquisa

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

1_Inclusão de 4 centros participantes; USP HC de porto alegre UNICAMP Cruzeiro do sul educacional s.a

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem restrições do ponto de vista de ética em pesquisa

 Endereço:
 Av. Dr. Dante Pazzanese N.º 500, Torre 6º andar

 Bairro:
 Ibirapuera
 CEP:
 04.012-909

 UF:
 Município:
 SAO PAULO

 Telefone:
 (11)5085-6040
 Fax:
 (11)5085-6040
 E-mail:
 cep@dantepazzanese.org.br

Página 03 de 05

otoforma





Continuação do Parecer: 2.587.235

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012, resolução 510/96 e da Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, em reunião ordinária de 27/03/2018 manifesta-se pela aprovação da emenda.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	emenda_inclusaocentors.pdf	20/03/2018 09:50:50	Pedro Silvio Farsky	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_107240 4_E6.pdf	16/03/2018 14:26:04		Aceito
Outros	Carta_Emenda.pdf	30/06/2016 16:01:00	Jéssica Bassani Borges	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	HF_CEP_ultima_versao.pdf	30/06/2016 16:00:32	Jéssica Bassani Borges	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	HF_TCLE2.pdf	30/06/2016 15:59:44	Jéssica Bassani Borges	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Justificativa_CEPIDPC_vinculo_Instituci onal.pdf	11/12/2015 16:40:04	Jéssica Bassani Borges	Aceito
Folha de Rosto	PLATAFORMA BRASIL - JESSICA.pdf	06/03/2015 11:01:08		Aceito
Outros	Troca de Pesquisador.pdf	08/12/2014 10:17:29		Aceito
Outros	Troca pesquisador.pdf	08/12/2014 10:17:29		Aceito
Outros	Carta de mudança de pesquisador.pdf	14/11/2014 12:20:49		Aceito
Outros	DECLARAÇÕES CEP Thiago D C Hirata.pdf	12/11/2013 14:32:38		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Não

 Endereço:
 Av. Dr. Dante Pazzanese N.º 500, Torre 6º andar

 Bairro:
 Ibirapuera
 CEP: 04.012-909

 UF:
 SAO PAULO

 Telefone:
 (11)5085-6040
 Fax: (11)5085-6040
 E-mail: cep@dantepazzanese.org.br

Página 04 de 05



Continuação do Parecer: 2.587.235

SAO PAULO, 09 de Abril de 2018

Assinado por: Pedro Silvio Farsky (Coordenador)

 Endereço:
 Av. Dr. Dante Pazzanese N.º 500, Torre 6º andar

 Bairro:
 Ibirapuera
 CEP:
 04.012-909

 UF:
 Município:
 SAO PAULO
 E-mail:
 cep@dantepazzanese.org.br

Página 05 de 06

D. PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto wash-out



CAAE: 05234918.4.0000.5462 Instituição Proponente: Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia - SP Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.179.465

Apresentação do Projeto:

Nº DO PROTOCOLO DO CEP:4914/2019

Nº DE PARTICIPANTES DA PESQUISA:310

Este estudo se trara de uma pesquisa prospectiva longitudinal de intervenção. Para este estudo serão selecionados 210 pacientes com HF

selecionados considerando uma variabilidade da expressão de miRNAs de aproximadamente 4, poder de 95% e margem de erro () de 5%. Os

pacientes selecionados são de prevenção primária, maiores de 18 anos, de ambos os gêneros incluídos no estudo principal, em uso de sinvastatina

(20-80 mg) ouatorvastatina (20-80 mg), provenientes da Seção Médica de Dislipidemias do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia. A seleção dos

pacientes será realizada juntamente com um cardiologista dessa Seção Médica que avaliará a possibilidade

Endereço:	areço: Av. Dr. Dante Pazzanese N.º 500, Torre 6º andar				
Bairro: Ib	irapuera		CEP:	04.012-909	
UF: SP	Município:	SAO P/	AULO		
Telefone:	(11)5085-6040	Fax:	(11)5085-6040	E-mail:	cep@dantepazzanese.org.br

Página 01 de 05





Continuação do Parecer: 3.179.465

de participarem do estudo e terem sua

medicação hipolipemiante interrompida por 6 semanas (wash-out). Também serão selecionados 100 indivíduos normolipidêmicos (NL, sem diagnóstico clínico de dislipidemia). O grupo NL será utilizado como controle do estudo, possibilitando identificar potenciais biomarcadores de estadometabólico, uma vez quepossuem perfil lipídico normal em comparação com o HF. Serão excluídos os indivíduos que não aceitarem participar do protocolo ou que apresentem as seguintes condições clínicas: insuficiência hepática, insuficiência renal (depuração de creatinina menor que 30ml/min) e/ou síndrome nefrótica, neoplasias,anticorpos anti-HIV, disfunção tireoideana e síndrome de Cushing. Também serão excluídas mulheres grávidas e indivíduos que

desistirem da participação em qualquer momento do estudo.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Identificar potenciais biomarcadores de estado metabólico e de resposta terapêutica a estatinas pela avaliação do perfil epigenômico de pacientes

com Hipercolesterolemia Familial.

Objetivo Secundário:

Descrever o perfil de miRs circulantes em pacientes com HF e comparar com o de indivíduos

normolipidêmicos. Identificação in silico de genes

alvos dos miRs diferencialmente expressos e analisar sua expressão em sangue periférico dos pacientes com HF e indivíduos normolipidêmicos.

Descrever o perfil de metilação de genes relacionados com a homeostase do colesterol e a resposta a estatinas em pacientes com HF e comparar

com o de indivíduos normolipidêmicos; Avaliar a influência de estatinas no perfil de miRs

Endereço: Av. Dr. Dante Pazzanese N.º 500, Torre 6º andar				
Bairro: Ib	pirapuera	CEP: (04.012-909	
UF: SP	Município:	SAO PAULO		
Telefone:	(11)5085-6040	Fax: (11)5085-6040	E-mail:	cep@dantepazzanese.org.br

Página 02 de 05





Continuação do Parecer: 3.179.465

circulantes de

pacientes com HF; Analisar a influência de estatinas no perfil de metilação de genes relacionados à homeostase do colesterol e a resposta a estatinas. Identificar biomarcadores epigenômicos com potencial aplicação na avaliação de estado metabólico de pacientes com HF; Identificar miRs circulantes associados com a resposta terapêutica e eventos adversos relacionados com estatinas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Riscos aos pacientes selecionados: algum desconforto durante a coleta de sangue ou durante a entrevista que demora aproximadamente 20 minutos. Também pode ter risco de problemas causados pela punção venosa periférica (coleta de

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto preenche os requisitos fundamentais da Resolução CNS 466 de 12 de Dezembro de 2012, sobre as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos, do Conselho Nacional de Saúde / Agência Nacional de Vigilância Sanitária e as Boas Práticas de Pesquisa Clínica do ICH-GCP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

1)Fazer o TCLE dos dois grupos, um para cada grupo (Pendência Atendida)

 Esclarecer o orçamento referente aos exames que estão fora da rotina e que não estão sendo informado no orçamento; (Pendência Atendida)

3)Informar e esclarecer critérios de exclusão referentes pacientes com diabetes e doenças coronarianas.(Pendência Atendida)

Recomendações:

Informar imediatamente:

Relatório sobre qualquer evento adverso ocorrido.

Comunicar qualquer alteração no projeto e/ou no TCLE através de emenda. Elaborar e enviar via Plataforma Brasil ao CEP relatórios:

Semestrais sobre o andamento da pesquisa e o Relatório Final do Estudo.

 Endereço:
 Av. Dr. Dante Pazzanese N.º 500, Torre 6º andar

 Bairro:
 Ibirapuera
 CEP:
 04.012-909

 UF: SP
 Município:
 SAO PAULO

 Telefone:
 (11)5085-6040
 Fax:
 (11)5085-6040
 E-mail:
 cep@dantepazzanese.org.br

Página 03 de 05





Continuação do Parecer: 3.179.465

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram observados óbices éticos.

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012, resolução 510/96 e da Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, após analise das pendências em reunião ordinária de 27/09/2019 manifesta-se pela aprovação do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P	19/02/2019		Aceito
do Projeto	ROJETO 1275244.pdf	13:00:05		
Orçamento	Orcamento.pdf	19/02/2019	RODRIGO	Aceito
		12:38:21	MARQUES	
Outros	Carta_Pendencias.pdf	19/02/2019	RODRIGO	Aceito
		12:38:03	MARQUES	
TCLE / Termos de	TCLE_controle_final.pdf	19/02/2019	RODRIGO	Aceito
Assentimento /		09:34:40	MARQUES	
Justificativa de			GONCALVES	
Ausência				
TCLE / Termos de	TCLE_pacientes_com_alteracoes_final.	19/02/2019	RODRIGO	Aceito
Assentimento /	pdf	09:34:34	MARQUES	
Justificativa de	-		GONCALVES	
Ausência				
Projeto Detalhado /	Projeto_Pendencias_com_alteracoes_fin	19/02/2019	RODRIGO	Aceito
Brochura	al.pdf	09:34:24	MARQUES	
Investigador			GONCALVES	
Outros	Declaracoes.pdf	18/02/2019	RODRIGO	Aceito
		12:19:49	MARQUES	
Folha de Rosto	folha_de_rosto_assinadafinal.pdf	21/12/2018	RODRIGO	Aceito
		12:15:03	MARQUES	
Cronograma	Cronograma_de_atividades.pdf	12/12/2018	RODRIGO	Aceito
_		16:40:06	MARQUES	

Situação do Parecer: Aprovado Necessita Apreciação da CONEP: Não

 Endereço:
 Av. Dr. Dante Pazzanese N.º 500, Torre 6º andar

 Bairro:
 Ibirapuera
 CEP:
 04.012-909

 UF:
 Município:
 SAO PAULO
 E-mail:
 cep@dantepazzanese.org.br

Página 04 de 05





Continuação do Parecer: 3.179.465

SAO PAULO, 01 de Março de 2019

Assinado por: Pedro Silvio Farsky (Coordenador(a))

 Endereço:
 Av. Dr. Dante Pazzanese N.º 500, Torre 6º andar

 Bairro:
 Ibirapuera
 CEP:
 04.012-909

 UF:
 SP
 Município:
 SAO PAULO

 Telefone:
 (11)5085-6040
 Fax:
 (11)5085-6040
 E-mail:
 cep@dantepazzanese.org.br

Página 05 de 05



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE Coordenadoria de Serviços de Saúde INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO ESTUDO: " ULTRASSEQUENCIAMENTO EXÔMICO DOS PRINCIPAIS GENES RELACIONADOS COM A HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAR"

CENTRO: INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA

INVESTIGADOR: JÉSSICA BASSANI BORGES

NÚMERO DO PACIENTE: _____

INICIAIS DO PACIENTE:

OBJETIVO DESTE ESTUDO

Você está sendo convidado para participar deste estudo que irá avaliar as alterações genéticas que podem ser causadoras de dislipidemia primária ou afetar o seu tratamento. As informações obtidas deste estudo serão importantes para melhorar o diagnóstico, prognóstico e a prevenção dos eventos cardiovasculares em pacientes com dislipidemias primárias (gorduras no sangue alteradas de origem genética).

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Caso você concorde em participar deste estudo, você receberá o mesmo cuidado que hoje é aplicado nesta instituição a todos os pacientes que passam no Departamento de Dislipidemias. Será necessário que você responda algumas perguntas sobre hábitos de vida, histórico de doenças, uso de medicamentos e doenças existentes nas pessoas de sua família.

A seguir serão coletadas amostras sanguíneas (total de 20 ml) para os exames laboratoriais e os testes genéticos. Pode ser necessário uma nova coleta de sangue para testes adicionais, caso isto aconteça o senhor (a) será convidado a uma nova visita onde

Ru	bricas	Av. Dr. Dante Pazzanese, 500, Prédio da Administração, 1º andar • Ibirapuera • São Paulo – SP • CEP: 04012-909 •
Paciente		Laboratório de Biologia Molecular (LIMC) • Fone: (11) 5085-6086 • E-mail: thiagodch@gmail.com
Investigador		FORM 001IDPC Mar/09 rev.1



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE Coordenadoria de Serviços de Saúde INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA



serão coletados mais 16ml de sangue. Se o (a) senhor (a) concordar, seu material será conservado e guardado no Laboratório de Investigação Molecular de Cardiologia (LIMC), por, no máximo, 5 anos.

O(a) senhor(a) concorda que seu sangue seja armazenado?

Sim, eu concordo (

Não, eu não concordo ()

Mesmo que o(a) senhor(a) não concorde que parte do seu sangue seja armazenado, o(a) senhor(a) poderá participar do estudo.

Abaixo está a lista de exames de análises clínicas que serão realizados:

- a. Hemograma completo
- b. Ácido úrico
- c. Apo A
- d. Apo B
- e. Colesterol Total e frações
- f. Triglicérides
- g. Glicemia
- h. Hemoglobina glicada
- **RISCOS E DESCONFORTOS**

Os participantes deste estudo não terão riscos além das intercorrências inerente à punção venosa periférica (coleta de amostra de sangue) como formação de hematomas, flebite, breve dor, que são raras e sem maiores complicações clínicas. Algumas pessoas têm vertigens quando coletam sangue, mas os sintomas desaparecem quando a pessoa se deita.

BENEFÍCIOS POTENCIAIS

Você não receberá qualquer benefício direto ou pagamento por sua participação, pois se trata de um estudo desenhado para determinação dos processos fisiopatológicos visando ao incremento do conhecimento sobre o tema.

Rubricas		Av. Dr. Dante Pazzanese, 500, Prédio da Administração, 1º andar • Ibirapuera • São Paulo – SP • CEP: 04012-909 •
Paciente		Laboratório de Biologia Molecular (LIMC) • Fone: (11) 5085-6086 • E-mail: thiagodch@gmail.com
Investigador		FORM 001IDPC Mar/09 rev.1

- j. Proteína C reativa ultra sensível
- k. TGO (AST), TGP (ALT)
- I. CPK
- m. TSH, T4

i. Insulina

- n. Uréia
- o. Creatinina



ALTERNATIVAS À PARTICIPAÇÃO

Caso você não queira participar deste estudo, e esteja sendo tratado na instituição você continuará recebendo o tratamento já utilizado de rotina.

CONFIDENCIALIDADE

Assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido você está aceitando participar deste estudo e permitindo que todos os seus registros médicos sejam verificados pela equipe de pesquisa em busca de dados para o estudo.

Sua identidade será mantida em segredo quando os resultados do estudo forem publicados, pois, você está autorizando que os seus dados a serem publicados como artigos em revistas, artigos e serem tema de debates e aulas. As informações coletadas durante o estudo serão armazenadas em um computador, mas seu nome não. A coleta e análise de dados de estudos médicos são consideradas pessoais protegidas por leis nacionais e internacionais. Seu médico será informado de sua participação neste estudo.

NOVOS ACHADOS

Você será informado sobre quaisquer novos achados importantes que se tornarem disponíveis durante o estudo que possam influenciar seu desejo de continuar ou não a participar do estudo.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA E CONSENTIMENTO

Sua participação neste estudo é voluntária. Você pode se recusar a participar ou pode desistir, a qualquer momento durante o estudo, sem ter que dar explicações. Isso

Rut	oricas	Av. Dr. Dante Pazzanese, 500, Prédio da Administração, 1º andar • Ibirapuera • São Paulo - SP • CEP: 04012-909 •
Paciente		Laboratório de Biologia Molecular (LIMC) • Fone: (11) 5085-6086 • E-mail: thiagodch@gmail.com
Investigador		FORM 001IDPC Mar/09 rev.1



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE Coordenadoria de Serviços de Saúde INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA



não mudará a qualidade de atendimento que você estará recebendo muito menos em qualquer tipo de penalidade.

Por qualquer motivo, independente do seu consentimento, os membros da equipe de pesquisa poderão encerrar sua participação no estudo, sendo explicado imediatamente a você os motivos para tal acontecimento. Caso isso venha a acontecer seu tratamento continuará sendo feito pelo seu médico.

SOLICITAÇÃO DE INFORMAÇÕES ADICIONAIS

O pesquisador Mario Hiroyuki Hirata, Jéssica Bassani Borges e/ou Thais Kristini Almendros Afonso, tel. (011) 5085-6086 ou (011) 5085-6574 irá responder todas as dúvidas que você possa ter sobre sua participação neste estudo. Em caso de dúvidas ou preocupações quanto aos seus direitos como participante deste estudo, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia no telefone (011) 5085-6040. Uma cópia deste termo será entregue para você.

Li e compreendi este termo de consentimento e todas as minhas dúvidas foram resolvidas. Recebi explicações sobre o objetivo da pesquisa, os procedimentos de estudo a que serei submetido e os possíveis riscos, desconfortos e benefícios que posso apresentar. As alternativas à minha participação neste estudo também foram discutidas. Portanto, concordo voluntariamente em fornecer meu consentimento para participar deste estudo clínico.



F. TCLE – Wash-out



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE Coordenadoria de Serviços de Saúde INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO ESTUDO: PERFIL EPIGENÔMICO NA HIPERCOLESTEROLEMIA FAMILIAL: CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DE BIOMARCADORES E TERAPIA PERSONALIZADA

Número do Participante da Pesquisa: ______ Iniciais do Participante da Pesquisa:

1) INTRODUÇÃO

Antes de concordar em participar deste procedimento, é importante que você leia e entenda as explicações a seguir. O Comitê de Ética em Pesquisa deste hospital revisou os objetivos e a condução proposta para o estudo, tendo sido aprovado e recebeu parecer favorável a sua realização.

2) CONVITE

Convidamos o(a) Sr(a)_____ para participar de um procedimento da pesquisa intitulada "Perfil epigenômico na hipercolesterolemia familial: contribuição ao estudo de biomarcadores e terapia personalizada", desenvolvida pelo Dr. Rodrigo Marques Gonçalves.

3) FINALIDADE

Você está sendo convidado para participar deste estudo que irá fazer análises de biologia molecular para avaliar as alterações no perfil de metilação de DNA (alterações que não modificam o DNA) e expressão de miRNAs (pequenas moléculas que são alteradas pelas doenças) que podem ser causadoras de dislipidemia primária ou afetar o seu tratamento. As informações obtidas deste estudo serão importantes para descobrir doenças do coração e ajudar no tratamento.

Critérios Inclusão:

Pacientes com Hipercolesterolemia Familial em prevenção primária, com idade maior de 18 anos, homens e/ou mulheres, em uso de sinvastatina (20-80 mg) ou atorvastatina (20-80 mg), indicados pelo médico participante do estudo.

Critérios de Exclusão:

Pacientes que não aceitarem participar do protocolo ou apresentarem condições que possam interferir nos resultados, sendo elas, doença arterial coronariana, diabetes tipo 2 (com dois exames de glicemia em jejum superiores a 126 mg/dL), insuficiência hepática, insuficiência renal (depuração de creatinina 30ml/min) e/ou síndrome nefrótica, neoplasias, anticorpos anti-HIV, disfunção tireoidiana e síndrome de Cushing, mulheres grávidas. Também serão excluídos os pacientes que desistirem da participação em qualquer momento do estudo.

Rubrica do Participante da Pesquisa:_____ RUBRICA DO PESQUISADOR:_____

1 de 4



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE Coordenadoria de Serviços de Saúde INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA



4) DURAÇÃO ESPERADA PARA A PARTICIPAÇÃO

Sua participação, na pesquisa, será de 12 semanas e você terá que comparecer a Seção Médica de Dislipidemias do IDPC três vezes para passar por consultas médicas, responder questionários e fazer exames de laboratório. Os detalhes de sua participação na pesquisa estão indicados no item de Procedimentos, indicados a seguir.

5) PROCEDIMENTOS

Caso você concorde em participar deste estudo, você receberá o mesmo cuidado que hoje é aplicado nesta instituição a todas as pessoas atendidas na Seção Médica de Dislipidemias do IDPC. Você será entrevistado para responder algumas perguntas sobre hábitos de vida, doenças que teve, histórico familiar e tratamentos que fez. Também vamos ver seu prontuário para ver os resultados dos seus exames laboratoriais.

Na primeira consulta, seu médico vai orientar você a parar de tomar a medicação para o colesterol durante 6 semanas. Nesse dia, vão ser coletadas amostras de sangue para os exames que você já faz no laboratório e também amostras para análises de biologia molecular.

Na segunda consulta, depois de 6 semanas que você parar de tomar a medicação para o colesterol, seu médico vai fazer uma avaliação e dar uma receita de estatina que é um medicamento para o colesterol que você vai tomar durante 6 semanas. No dia da segunda consulta, vão ser coletadas amostras de sangue para os exames que você já faz no laboratório e também amostras para análises de biologia molecular.

Na terceira e última consulta, você será reavaliado pelo médico, serão coletadas amostras de sangue para os exames de rotina e para analises de biologia molecular e você será novamente entrevistado para responder algumas perguntas sobre o seu tratamento.

Com a participação desta pesquisa, você poderá ter algum desconforto durante a coleta de sangue. Também pode ter algum desconforto durante a entrevista que demora aproximadamente 20 minutos. Com a pesquisa você poderá ter risco de aumento do colesterol quando parar a medicação para o colesterol, mas o risco será diminuído pelo acompanhamento do médico. Você também pode ter risco de problemas causados pela punção venosa periférica (coleta de amostra de sangue), tais como formação de hematomas, flebite, breve dor, que são raras e sem maiores complicações clínicas. Algumas pessoas têm vertigens quando coletam sangue, mas os sintomas desaparecem quando a pessoa se deita.

6) SUAS RESPONSABILIDADES

Em caso de apresentar qualquer sintoma ou desconforto você deverá contatar o médico do estudo imediatamente. O médico perguntará o que você está sentindo e agendará uma visita. Se você decidir interromper a medicação, será pedido que você retorne para uma visita e passe por uma avaliação médica para a sua própria segurança.

Rubrica do Participante da Pesquisa: _____ RUBRICA DO PESQUISADOR:_____

2 de 4



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE Coordenadoria de Serviços de Saúde INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA



7) CONTATO EM CASO DE EMERGÊNCIA/CONTATO COM O CEP

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O pesquisador responsável pelo estudo, Dr. Rodrigo Marques Gonçalves, poderá ser encontrado no endereço Avenida Dr. Dante Pazzanese, 500 – Setor de Dislipidemias – CEP 04012-180 – São Paulo – SP – Telefones 11 5085-6086. Você também poderá entrar em contato com as auxiliares do estudo: Carolina Dagli Hernandez (11 97255-2715), Elisangela da Silva Rodrigues Marçal (11 96524-1963) e Renata Caroline Costa de Freitas (11 97044-6559).

Se você tiver alguma dúvida sobre a **ética da pesquisa**, entre em contato com o CEP – Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia – Av. Dr. Dante Pazzanese, 500 – Prédio I – CEP 04012-909 – Telefone 11 5085-6040. O CEP é um grupo formado por profissionais capacitados que fazem a revisão ética inicial e contínua do estudo de pesquisa para manter sua segurança e proteger seus direitos.

Se você procurar por atendimento emergencial em outro hospital ou se for necessária internação, avise o médico que você faz parte de um estudo de pesquisa realizado pelo Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia.

8) PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA/DESCONTINUAÇÃO

Você pode optar por não participar por qualquer razão sem penalidade ou perda dos benefícios aos quais tem direito e sem qualquer efeito sobre seu tratamento futuro. O médico poderá interromper ou reintroduzir a medicação pelas seguintes razões: se o tratamento aparentar ser prejudicial a você, se você não seguir as instruções.

Você tem garantida a liberdade de recusar sua participação ou retirar seu consentimento em qualquer fase deste procedimento, sem penalização, tendo assegurado o anonimato e a privacidade durante a realização da pesquisa.

Rubrica do Participante da Pesquisa:_____ R

RUBRICA DO PESQUISADOR:

3 de 4


SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE Coordenadoria de Serviços de Saúde INSTITUTO DANTE PAZZANESE DE CARDIOLOGIA



DATA: _/__/___

DATA / /

DATA / /

9) DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Fui informado (a) de todos os detalhes relacionados com os efeitos conhecidos e imprevisíveis, efeitos colaterais e riscos referentes ao estudo.

Fui esclarecido (a) sobre meu direito a tratamento e as terapias alternativas que será mantido.

Ao assinar este termo de consentimento de forma **voluntária** não estarei abrindo mão de meus direitos legais.

Recebi uma via rubricada e assinada em todas as páginas deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Li e entendi as informações apresentadas nesse Termo de Consentimento Livre e Esclarecidas. Pude fazer perguntas e todas minhas dúvidas foram esclarecidas.

Nome do paciente:

Assinatura do Paciente

Nome da Testemunha (se necessário):

Assinatura da Testemunha

Nome do Pesquisador:

(Nome da Pessoa Autorizada da Equipe do Estudo que está Obtendo o Consentimento Livre e Esclarecido)

Assinatura do Pesquisador

Rubrica do Participante da Pesquisa:_____ RUBRICA DO PESQUISADOR:_____

4 de 4