

“Avaliação da expressão gênica em placas ateroscleróticas de pacientes diabéticos e não diabéticos através da análise de fragmentos de placa obtidos por aterectomia direcionada.”

Dissertação de Mestrado

Gabriel Zago

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde:

Cardiologia e Ciências Cardiovasculares

“Avaliação da expressão gênica em placas ateroscleróticas de pacientes diabéticos e não diabéticos através da análise de fragmentos de placa obtidos por aterectomia direcionada.”

Autor: Gabriel Zago

Orientador: Alexandre do Canto Zago

Co-orientadora: Juliane da Silva Rossato

*Dissertação submetida como requisito para obtenção
do grau de mestre ao Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde, Área de Concentração:
Cardiologia e Ciências Cardiovasculares, da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul*

Porto Alegre, Dezembro de 2018

Dedicatória

In memoriam

Ao meu pai, Ademir Rui Zago, por toda a dedicação na condução de minha vida e por ser um exemplo para sempre ser seguido.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Alexandre do Canto Zago, pela oportunidade dada em desenvolver este projeto e seguir aprimorando o conhecimento na área da cardiologia intervencionista.

À minha co-orientadora, a bióloga Profa Dra. Juliane Rossato, por todo o auxílio na difícil tarefa de interpretação dos resultados de análise gênica do estudo.

Ao biólogo e Pós-Doutorando do CPE, Dr. Tiago Falcón Lopes, pelo grande auxílio na análise do banco de dados gênico.

Ao Prof. Dr. Alcides José Zago, pela confiança e ensinamentos que foram e continuam sendo de fundamental importância para minha formação.

À Thais Brasil Modkovski, minha esposa, a quem devo muito, não só pela ajuda na concretização desta tese como também, por estar ao meu lado sempre me guiando para o caminho certo.

À minha mãe e irmã, Hilda Teresinha Refosco Zago e Rachel Zago, por toda dedicação e preocupação de que eu sempre esteja bem.

Ao Lauro e Sissa, meus sogros, por toda ajuda diária.

SUMÁRIO

1.	Lista de abreviaturas (português).....	6
2.	Lista de abreviaturas (inglês).....	7
3.	Resumo	8
4.	Abstract	9
5.	Introdução	10
6.	Referencial teórico	15
7.	Justificativa e Objetivos.....	27
8.	Artigo original.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS - PORTUGUÊS

ADF - Aterectomia direcional fracionada

ACTP - angioplastia coronária transluminal percutânea

AVC - acidente vascular cerebral

BVS - stent bioabsorvível (bioresorbable vascular scaffold)

CRM - cirurgia de revascularização miocárdica

DAC - Doença arterial coronariana

DCV - Doença cardiovascular

DES - Stent farmacológico (drug eluting stent)

DM - Diabetes

DMID - diabetes insulino-dependente

DNA - Ácido desoxirribonucléico

ECR - ensaio clínico randomizado

EG - Expressão gênica

IAM - infarto agudo do miocárdio

OR - odds ratio

RNA - Ácido ribonucléico

TLR - Taxa de revascularização da lesão alvo (target lesion revascularization)

LISTA DE ABREVIATURAS - INGLÊS

APC - Anaphase promoting complex

BUB - Budding uninhibited by benzimidazole

IVUS - Intravascular ultrasound

MAD2 - Mitotic arrest deficient 2

NFκB - Nuclear factor kappa B

NO - Nitric oxide

PCI - Percutaneous coronary intervention

PKG - Protein Kinase G

VASP - Vasodilatory - stimulated phosphoprotein

RESUMO

Introdução: A reestenose permanece sendo o principal desafio pós-implante de stents. Pacientes diabéticos apresentam doença coronária mais severa e taxas de reestenose que podem chegar a valores próximos a 20%. A busca por novas tecnologias que visem reduzir a proliferação neointimal é constante, com o objetivo de reduzir a incidência de revascularização da lesão alvo. A terapia gênica vem ganhando espaço no tratamento de inúmeras doenças, embora ainda tenha um papel pouco expressivo no tratamento da doença aterosclerótica e da reestenose *intrastent*.

Métodos: Placas ateroscleróticas de quarenta pacientes com doença coronariana sintomática foram obtidas por aterectomia direcional, que antecedeu o implante de stent não farmacológico. A análise do RNA de mais de 22.000 genes destas placas foi realizada com o *Affymetrix GeneChip microarray system*.

Resultados: As placas de 28 pacientes foram consideradas adequadas para análise e inclusão no estudo. Destas, 10 eram de pacientes diabéticos. O microarranjo demonstrou 9 genes com expressão gênica aumentada nas placas ateroscleróticas dos diabéticos e 6 nas dos não diabéticos, com $p < 0,01$. Entre os genes mais expressos nos diabéticos, 2 estão envolvidos em processos fisiopatológicos que podem estar relacionados com a aterosclerose e a reestenose intrastent (VASP e MAD2L1BP).

Conclusão: O estudo em questão identificou genes que podem estar relacionados a maior gravidade da doença aterosclerótica e a maior incidência de reestenose pós implante de stent coronário em pacientes diabéticos. Esses dados apontam genes que podem ser potenciais alvos em pesquisas de terapia gênica.

Palavras-chave: doença coronariana aterosclerótica, expressão gênica, microarranjo, aterectomia, reestenose intrastent.

ABSTRACT

Background: Restenosis remains the main challenge after stent implantation. Diabetic patients have more severe coronary disease and restenosis rates that can reach to 20%. The search for new technologies with the intention of reducing neointimal proliferation is constant, aiming to reduce the incidence of revascularization of target lesion. Gene therapy has been gaining ground in the treatment of numerous diseases, although it still plays a less expressive role in the treatment of atherosclerotic disease and intrastent restenosis.

Methods: Atherosclerotic plaques from forty patients with symptomatic coronary disease were obtained by directional atherectomy, which preceded the implantation of a non-pharmacological stent. RNA analysis of more than 22,000 genes from these plaques was performed with the Affymetrix GeneChip microarray system.

Results: Plaques from 28 patients were considered adequate for analysis and inclusion in the study. Of these, 10 were from diabetic patients. The microarray showed 9 overexpressed genes in atherosclerotic plaques of diabetics and 6 in non-diabetic patients, with $p < 0.01$. Among the overexpressed genes in diabetics, 2 are involved in pathophysiological processes that can be related to atherosclerosis and intrastent restenosis (VASP and MAD2L1BP).

Conclusion: In this study, genes that may be related to the greater severity of atherosclerotic disease and the higher incidence of post-implantation restenosis of coronary stents in diabetic patients were identified. These data point to genes that may be potential targets in gene therapy research.

Keywords: atherosclerotic coronary disease, gene expression, microarray, atherectomy, intrastent restenosis.

INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares (DCV) representam importante problema de saúde pública em todo o mundo, uma vez que constituem não só a principal causa de mortalidade como também uma das mais importantes causas de morbidade, gerando altos custos em assistência médica¹. A doença arterial coronariana (DAC) representa grande parcela das DCV e caracteriza-se pela presença de placas de ateroma nas artérias coronárias, resultando em estreitamento luminal destas com consequente redução do fluxo sanguíneo e isquemia/necrose miocárdica².

Os fatores de risco envolvidos no processo de aterosclerose já são amplamente conhecidos e estudados³. Dentre eles, o diabetes (DM) tem mostrado grande relação com a incidência e a gravidade da doença arterial coronariana e é um grande adversário às terapêuticas vigentes principalmente por se tratar de um dos principais fatores associados a reestenose pós-implante de stents coronários.⁴ Pesquisas laboratoriais e clínicas realizadas nas últimas décadas identificaram as principais vias bioquímicas envolvidas no desenvolvimento da doença aterosclerótica em pacientes diabéticos: 1) superprodução de espécies reativas de oxigênio, 2) aumento da formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) e ativação do receptor AGEs, 3) ativação da via do Polyol, 4) ativação de proteína kinase C e 5) inflamação vascular crônica⁵.

A definição dos componentes e processos fisiopatológicos da placa aterosclerótica e reestenótica é, portanto, crucial para o entendimento dos mecanismos que possam estar implicados em sua instalação e progressão⁶. Porém, os eventos bioquímico-moleculares envolvidos ainda não foram suficientemente esclarecidos. Impõe-se portanto, a necessidade de aprofundar a investigação agregando novas tecnologias, como as análises genômicas, a fim de identificar possíveis genes envolvidos que possam ser alvo para o desenvolvimento de novas terapias^{7,8,9,10,11}.

A partir da codificação do genoma humano, novos avanços tem sido possíveis no entendimento da patogênese de inúmeras doenças. Avanços recentes no campo da tecnologia de genotipagem, permitiram a identificação de genes implicados em diversas rotas fisiopatológicas da aterosclerose^{12,13}.

A grande maioria dos seres vivos utilizam ácidos nucleicos para armazenar informação genética. O ácido desoxirribonucleico (DNA) armazena informação, a qual determina a sequência do ácido ribonucleico (RNA) que, por sua vez, determina a estrutura das proteínas. Expressão gênica (EG) é o processo em que o material genético contido em um gene (sequência de DNA) gera um produto funcional, seja RNA ou proteínas. Este processo pode ser regulado, dando à célula controle sobre sua função, o que consiste na base molecular para a adaptação dos organismos ao ambiente. Esta regulação da EG pode ser modulada em várias etapas, incluindo a transcrição (produção de RNA a partir do DNA), tradução (produção de proteínas a partir do RNA) e a modificação pós-traducional de uma proteína^{14, 15}.

A técnica de microarranjo, por sua particularidade em permitir o rastreamento de milhares de genes na amostra assim como a realização de comparações entre as diferentes apresentações clínicas e fisiopatológicas, possibilitou a realização deste estudo^{15, 16, 17}. Os microarranjos são utilizados na detecção e quantificação de ácidos nucleicos provenientes de amostras biológicas, as quais são postas para hibridizar com o DNA fixado no microarranjo. O diferencial desta técnica é que permite a determinação da expressão diferencial de milhares de genes num único experimento^{18, 19, 20}.

Um possível problema encontrado na análise de dados de microarranjo é o fato de que o número de observações por amostra é muito maior do que o número de amostras no experimento. Esta condição impossibilita a utilização de métodos multivariados clássicos para covariâncias entre os níveis de expressão dos diferentes genes. Além disso, pelo mesmo motivo, procedimentos comuns para ajustes de múltiplos testes tornam-se muito conservadores, diminuindo significativamente o poder do teste para detecção de diferenças na expressão gênica²¹.

Em tratando-se da análise gênica de placas ateroscleróticas, tem-se grande dificuldade de obtenção de material in vivo. A única técnica percutânea que possibilita a extração de material em quantidade suficiente para este tipo de análise é a aterectomia direcional fracionada (ADF). Esta técnica foi originalmente desenvolvida para ser adjuvante nas intervenções coronárias percutâneas em detrimento do uso do cateter balão. É um método capaz de remover substancialmente a lesão obstrutiva por utilizar um cateter com uma janela de corte que, por rotação, permite a retirada da placa. O tecido removido pela ADF pode ser submetido a diversas análises, incluindo microscopia, imunohistoquímica e análises gênicas, sendo de grande valia na ampliação do entendimento sobre a

aterosclerose coronariana. Do ponto de vista assistencial, o método não é mais utilizado por não haver superioridade em desfechos clínicos com seu uso, comparativamente com técnicas padrão com cateter balão e implante de stent^{22, 23}. Assim, estudo com semelhante metodologia de extração de placas ateroscleróticas será muito difícil reprodutibilidade.

Referências bibliográficas

1. Ministério da Saúde. Datasus.gov.br
2. Canty JM. Coronary blood flow and myocardial ischemia. Braunwald's Heart Disease Textbook of Cardiovascular Medicine 8th ed. Saunders 2009, 1167 – 1194.
3. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. European Heart Journal (2016) 37, 2315 - 2381.
4. Standards of medical care in Diabetes 2016. The Journal of Clinical and applied research and education, vol 39 - supplement 1.
5. Katakami N. Mechanism of Development of Atherosclerosis and Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus. J Atheroscler Thromb. 2018 Jan 1;25(1):27-39.
6. Ridker PM, Libby P, Risk Markers for Atherothrombotic Disease. Braunwald 9th ed. Saunders. 2012. Chap. 44: 914 - 934.
7. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. Circulation. 2005 Jun 28;111(25):3481-8
8. Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. N Engl J Med. 1999; 340 (2) 115 – 126
9. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. N Engl J Med. 2005; 352 1685-95.
10. Ambrose JA, Tannenbaum MA. Angiographic progression of coronary artery disease and the development of myocardial infarction. J Am Coll Cardiol. 1988 Jul;12(1):56-62.
11. Stone GW, Maehara A. A prospective natural-history study of coronary atherosclerosis. N. Eng J Med. 2011; 364: 226-235.
12. O'Donnell CJ, Nabel EG. Genomics of cardiovascular disease. N Engl J Med. 2011; 365:2098-2109.
13. Samani NJ, Erdmann J, Hall AS. Genomewide association analysis of coronary artery disease. N Engl J Med. 2007; 357 (5) 443-53.

14. Woski AS, Schmidt FJ. DNA and RNA: Structure and composition. Textbook of Biochemistry with clinical correlations. 2006, John Wiley & Sons. 6th ed. 23-70.
15. Dunican D, Parle-McDermott A, Croke DT. Gene expression of cells and tissues. Current Diagnostic Pathology 1997; 4:170-175
16. Cook SA, Rosenzweig A. DNA Microarrays: implications for cardiovascular medicine. Circulation Research 2002, 91 559-564.
17. Guindalini C, Tufik S. Use of microarrays in the search of gene expression. Rev. Bras Psiquiatr. 2007; 29 (4): 370-4
18. Simkhovich BZ, Kloner RA. Gene expression profiling – a new approach in the study of myocardial ischemia. Cardiovascular pathology 12 (2003) 180-185.
19. Cook SA, Rosenzweig A. DNA Microarrays: implications for cardiovascular medicine. Circ Res. 2002, 91 559-564.
20. Winslow RL, Boguski MS. Genome informatics: current status and future prospects. Circ Res 2003, 92 953-961.
21. Gentleman RC, Carey VJ, et al. BioConductor: open software development for computational biology and bioinformatics. Genome Biol . 5:R80. 2004
22. Williams DO, Fahrenbach, MC. Directional Coronary Atherectomy But Wait, There's More. Circulation 1998;97:309-311.
23. Rogers C, Baim D. Coronary Atherectomy, Thrombectomy and Embolic Protection. Grossman's cardiac catheterization, angiography and intervention. Lippincott Williams & Wilkins. 23. 467-491.

REFERENCIAL TEÓRICO

A relação entre o diabetes e a presença de doença arterial coronariana já é conhecida a bastante tempo. Dados do Estudo de Framingham publicados em 1979 demonstraram uma incidência de DAC duas vezes maior em homens e três vezes maior nas mulheres com diabetes (DM) quando comparados aos não diabéticos¹. No estudo MRFIT, que analisou preditores de mortalidade por DCV em homens com e sem DM, 9,7% dos pacientes em tratamento para diabetes morreram vs 2,6% dos pacientes sem DM dentro de um período de observação de 12 anos². O estudo INTERHEART analisou o efeito dos fatores de risco modificáveis (tabagismo, hipertensão, diabetes, relação cintura/quadril, dieta, atividade física, consumo de álcool e níveis séricos de apolipoproteínas) com a incidência de infarto do miocárdio. Em relação ao diabetes, foi observada um razão de chances de 2,37 para o desfecho primário³. Metanálise que incluiu 102 estudos e mais de 530 mil pacientes sem história de angina, infarto agudo do miocárdio (IAM) ou acidente vascular cerebral (AVC) demonstrou que pacientes diabéticos apresentam risco duas vezes maior de eventos cardiovasculares em relação aos não diabéticos⁴.

Além de a DM estar fortemente associada com o desenvolvimento de DAC, pacientes com diabetes apresentam uma incidência maior de doença multivascular. O estudo TAMI, foi desenhado para avaliar os desfechos de pacientes diabéticos submetidos à terapia trombolítica e suas características angiográficas. Foram analisadas as cinecoronariografias de 148 pacientes com diabetes e 923 sem diabetes. Observou-se que pacientes com DM tinham DAC mais severa (66% vs 46%, $p < 0,0001$)⁵. Outro estudo analisou a cinecoronariografia de 2253 pacientes e observou que lesões com estenose $> 50\%$ eram mais prevalentes nos diabéticos em relação aos não diabéticos (85% vs 67%, $p < 0,0001$). Além disso, estes últimos apresentavam mais doença trivascular (36% vs 17%, $p < 0,0001$)⁶.

As principais explicações para esta maior prevalência e maior gravidade da DAC nos pacientes diabéticos são as seguintes⁷:

1- Disfunção endotelial: foi documentada em pacientes diabéticos com artérias coronárias normais e sem outros fatores de risco. O grau de disfunção apresenta relação com a duração do diabetes e com a presença de resistência à insulina.

2- Ativação plaquetária: o diabetes predispõe à trombose por aumentar a agregação plaquetária devido a sua ação sobre a tromboglobulina e o fator plaquetário 4 e por levar a um aumento da expressão da glicoproteína IIb/IIIa na superfície das plaquetas, estimulando sua ligação com o fibrinogênio.

3- Sistema de coagulação: eleva os níveis de fibrinogênio e reduz a atividade fibrinolítica por aumento da concentração do inibidor do ativador do plasminogênio.

4- Composição da placa: observam-se placas de ateroma ricas em lipídio e com maior infiltração de macrófagos, achados que estão associados com maior risco de instabilização e ruptura de placa.

Pacientes com diabetes que são submetidos à angioplastia coronariana (ACTP) apresentam maiores taxas de reestenose e menores taxas de sobrevida livre de eventos. Em uma análise de 6 meses de 3090 pacientes submetidos a implante de stent não farmacológico, dos quais 418 tinham DM, observou-se maior taxa de reestenose nos diabéticos (31% vs 21%, $p < 0,001$)⁸. O estudo J-Cypher, que incluiu pacientes submetidos a implante de stent farmacológico, analisou 10.778 pacientes (966 DM insulino-dependentes, 3404 DM não insulino-dependentes e 6378 sem DM). Em 3 anos, a taxa de revascularização da lesão alvo foi superior nos pacientes diabéticos com e sem uso de insulina quando comparados aos não DM (19%, 14% e 10% respectivamente)⁹.

O principal mecanismo relacionado à reestenose intrastent é a proliferação neointimal que se origina a partir do trauma vascular pós-implante do stent, que leva à migração de células musculares lisas da camada média para a íntima, com a subsequente produção de matriz extracelular^{10,11,12}. Em uma etapa precoce em relação à descrita acima, ocorre um processo inflamatório que envolve deposição de macrófagos, neutrófilos, plaquetas e fibrina no local de injúria endotelial¹³. O conceito de reestenose angiográfica binária é a perda luminal $\geq 50\%$ vista na angiografia de controle. Reestenose clínica se refere à reestenose binária associada à presença de angina ou sinais de isquemia em testes funcionais, ou então reestenose $\geq 70\%$ independente de sintomas ou sinais de isquemia¹⁴.

Na década de 70, iniciou-se a implementação de uma nova técnica como alternativa para a cirurgia de revascularização miocárdica cirúrgica: a angioplastia coronária com balão. No entanto, as taxas de complicações com esta técnica (especialmente *recoil* do vaso, dissecação e reestenose) chegavam a 40%. Com o objetivo de resolver estas complicações, foram desenvolvidas prótese intracoronárias metálicas (*stents*). Os *stents* reduziram drasticamente a ocorrência de *recoil* e dissecação coronariana. No entanto, o mesmo efeito não foi observado com tanta intensidade nas taxas de reestenose, que ainda se mantiveram elevadas^{15,16,17}.

Em metanálise de 6 grandes estudos com stents não farmacológicos publicada em 2002, totalizando 6186 pacientes, a taxa de revascularização da lesão alvo (TLR) em 1 ano foi de 12,2%. Dos preditores de reestenose, o de mais forte associação foi a presença de diabetes (OR de 1,49)¹⁸.

O desenvolvimento e aperfeiçoamento dos stents farmacológicos (DES) e dos métodos adjuntos utilizados para o auxílio no implante dos stents foi de extrema importância para a redução da incidência de reestenose intrastent. Apesar disto, as taxas de reestenose pós-implante dos DES podem atingir valores próximos a 20%. Isto depende de fatores técnicos e anatômicos (tipo de stent utilizado, tempo de seguimento, complexidade da lesão tratada, número de vasos tratados e de stents implantados) e de fatores de risco clínicos, tais como diabetes, sexo feminino, hipertensão e índice de massa corporal. Dentre os fatores clínicos, o diabetes vem se mostrando como o principal fator de risco para reestenose¹⁹.

Em estudo que incluiu 1845 pacientes (2093 lesões tratadas) submetidos ao implante DES de primeira geração eluído com sirolimus (Cypher, Johnson) ou paclitaxel (Taxus, Boston), analisou-se preditores independentes de reestenose intrastent. Foi realizada cinecoronariografia de controle em 1495 pacientes e identificou-se de reestenose angiográfica em 13%. Após análise multivariada, os principais preditores de reestenose foram: diâmetro do vaso (OR 1,74 para cada 0,5 mm de decréscimo), diâmetro final da estenose (OR 1,3 para cada 5% de aumento) e sirolimus vs paclitaxel (OR 0,6). Dados deste estudo mostraram que o tipo de stent utilizado tem impacto sobre as taxas de reestenose²⁰.

Em coorte consecutiva do estudo RESEARCH, com 238 pacientes com doença coronariana complexa (441 lesões) tratados com implante de DES de primeira geração eluído com sirolimus (Cypher, Johnson), avaliou-se fatores clínicos, angiográficos e relacionados ao procedimento associados com reestenose. Em 6 meses, 70% dos pacientes foram submetidos a nova cinecoronariografia. A incidência da reestenose foi de 7,9%, e os preditores associados a reestenose foram reestenose intra-stent prévia (OR 4,16), lesões ostiais (OR 4,84), comprimento da lesão (OR 1,42 para cada 10 mm de stent), diâmetro de referência (OR 0,46 para cada 1 mm de aumento), tratamento da artéria descendente anterior esquerda (OR 0,3) e diabetes (OR 2,63). Baseados nestes dados, podemos ver que a maioria dos fatores associados a reestenose intrastent são relacionadas às características angiográficas da lesão, exceto a presença de diabetes¹².

Atualmente, os DES disponíveis no mercado para uso clínico são os de segunda geração. Observam-se entre eles algumas diferenças em relação ao material e desenho da plataforma, tipo de polímero (durável ou bioabsorvível) e droga antiproliferativa. Os stents de segunda geração possuem hastes mais finas, facilitando a navegabilidade e entrega do dispositivo, e polímeros mais biocompatíveis, reduzindo a resposta inflamatória e proporcionando uma reendotelização mais rápida.

O ensaio clínico randomizado Resolute All-Comers comparou DES de segunda geração eluído com zotarolimus (Resolute, Medtronic) e stent eluído com everolimus (Xience V, Abbott). Foram avaliados desfechos clínicos e preditores da necessidade de nova revascularização em 4 anos. Entre os 2292 pacientes divididos nos dois grupos, ocorreu 8,6% de falha de tratamento da lesão alvo (TLR). Os preditores independentes de TLR foram idade, diabetes em uso de insulina (DMID), SYNTAX score, *stent* implantado em ponte de safena, lesões ostiais e tratamento de reestenose prévia. O *odds ratio* (OR) de TLR em pacientes com DMID foi de 1,97²¹.

No estudo EVOLVE II, que comparou DES de segunda geração com polímero bioabsorvível com DES de segunda geração com polímero durável, foram avaliados 1684 pacientes com angina estável ou síndrome coronariana aguda sem supradesnivenamento do segmento ST. Na análise do desfecho primário em 12 meses, observou-se falha do tratamento da lesão alvo de 6,7% no grupo do polímero bioabsorvível e 6,5% no grupo de polímero durável ($p = 0,83$)²².

Outros dois estudos que compararam stents de segunda geração com polímeros bioabsorvíveis vs. polímeros duráveis não demonstraram diferenças significativas entre os desfechos primários analisados. No estudo NEXT, que incluiu 3235 pacientes, a taxa de revascularização da lesão alvo em 12 meses foi de 4,2% em ambos os grupos²³. No estudo BIOSCIENCE, ao final de 5 anos de seguimento, não houve diferença no desfecho primário (morte cardíaca, infarto e indicação clínica de revascularização da lesão alvo) entre os grupos de polímero bioabsorvível e durável (20,2% vs 18,8%)²⁴.

Metanálise de 16 ensaios clínicos randomizados (ECR) de 2017, totalizando 19.886 pacientes, comparou *stents* farmacológicos de segunda geração com polímero durável vs. *stents* com polímeros bioabsorvíveis. Não houve diferença significativa entre os dois grupos de *stents* em relação à morte, infarto, trombose de *stent* ou necessidade de revascularização da lesão alvo. Desfechos semelhantes foram observados em sub-análise por tipo de droga antiproliferativa, material da plataforma ou espessura das hastas dos *stents*²⁵.

Os *stents* foram desenvolvidos com o objetivo de prevenir *recoil* do vaso, tratar dissecção coronariana após angioplastia por balão, e reduzir a reestenose, que ocorre principalmente entre 6 e 12 meses após a angioplastia. Em contrapartida, as desvantagens atribuídas a presença do dispositivo no vaso a longo prazo são inúmeras: comprometimento permanente de lesões ostiais em bifurcações, prejuízo na imagem de métodos não invasivos para avaliação da anatomia coronariana, maior dificuldade técnica na anastomose de enxerto em cirurgia de revascularização, inflamação persistente com comprometimento da função vasomotora da coronária e formação de

neointermediosclerose²⁶. Tendo em vista que os benefícios da permanência do stent após o primeiro ano parecem ser limitados, foram desenvolvidas próteses totalmente biodegradáveis.

O estudo ABSORB III, com 2008 pacientes, comparou o uso de stent farmacológico bioabsorvível (BVS) com DES de segunda geração. No seguimento de 3 anos, foram observadas taxas de falha da lesão tratada de 13,4% no grupo BVS e 10,4% no grupo DES ($p = 0,06$). A incidência de IAM relacionado ao vaso tratado e trombose de stent foi de 8,6% vs 5,9% ($p = 0,03$) e 2,3% vs 0,7% ($p = 0,01$) entre os grupos BVS e DES, respectivamente²⁷.

Em 2017 foi publicada uma metanálise de 7 estudos, totalizando 5.583 pacientes, que comparou BVS com DES de segunda geração. Demonstrou-se, em um tempo médio de seguimento de 2 anos, falha de tratamento da lesão alvo de 9,6% vs 7,2% ($p = 0,003$) e de trombose de stent de 2,4% vs 0,7% ($p < 0,0001$) para BVS e DES, respectivamente²⁸.

Após o resultado destes estudos, as sociedades de hemodinâmica sugeriram a suspensão do uso dos BVS até que novos dados demonstrem evidência de sua segurança.

Na comparação entre revascularização percutânea (ACTP) vs cirúrgica (CRM) em pacientes com anatomia propícia para ambos os tratamentos, observa-se que, na maioria dos estudos, que a grande causa de inferioridade dos stents em relação a CRM é a necessidade de revascularização da lesão alvo. Quando inclui-se apenas pacientes diabéticos nesta análise, as diferenças nos desfechos são ainda mais relevantes. No estudo CARDia, foram incluídos 510 pacientes diabéticos e com doença multivascular, randomizados para tratamento percutâneo (incluiu stent não farmacológico e farmacológico) vs cirúrgico. O desfecho primário foi composto de morte por todas as causas, IAM e AVC e o desfecho secundário incluiu os componentes do desfecho primário somados à necessidade de revascularização da lesão alvo. Quando analisou-se o desfecho primário em 1 ano, não houve diferença significativa entre os grupos ACTP vs CRM (13% vs 10,5%, $p = 0,39$). No entanto, quanto ao desfecho secundário, observou-se diferença significativa (19,3% vs 11,3%, $p = 0,02$), fato este que deveu-se à maior incidência de revascularização da lesão alvo²⁹. O estudo SYNTAX, que incluiu apenas pacientes submetidos a ACTP com stent farmacológico, comparou ACTP x CRM em pacientes com doença coronariana trivascular ou lesão de tronco da coronária esquerda. Entre os pacientes incluídos, 452 eram diabéticos. Ao final de 5 anos, a taxa de revascularização da lesão alvo e a mortalidade foi superior em diabéticos vs não diabéticos (29% vs 19% e 20% vs 12%, respectivamente).

O estudo FREEDOM foi o maior ensaio clínico randomizado que comparou CRM vs ACTP com DES (a maior parte, de primeira geração) em pacientes diabéticos com doença coronariana

multivascular. Foram incluídos 1900 pacientes e o desfecho primário avaliado foi composto de morte por qualquer causa, IAM não fatal e AVC não fatal. Na análise em 5 anos, o desfecho primário foi mais frequente no grupo ACTP (26,6% vs 18,7%, $p = 0,005$). Quando foram analisados os desfechos isolados, as incidências foram as seguintes: morte (16,3% vs 10,9%, $p = 0,049$), IAM não fatal (13,9% vs 6,0%, $p < 0,001$), AVC não fatal (2,4% vs 5,2%, $p = 0,03$) e revascularização da lesão alvo (12,6% vs 4,8%, $p < 0,001$ - este desfecho avaliado em 1 ano) para ACTP vs CRM respectivamente³⁰.

O desenvolvimento dos DES reduziu significativamente a reestenose *intra-stent* e a necessidade de revascularização da lesão alvo. No entanto, em alguns subgrupos de pacientes com anatomia coronariana complexa e em pacientes diabéticos, a reestenose ainda é um importante desafio. Por essa razão, há interesse no desenvolvimento de novas drogas no combate à reestenose *intra-stent*. Diversas linhas de tratamento na área médica vêm sendo desenvolvidas a partir da identificação de alvos gênicos. Na área cardiovascular este é um campo ainda pouco explorado.

Estudo publicado em 2009 analisou placas ateroscleróticas e reestenóticas de carótidas retiradas por endarterectomia. A análise destas placas mostrou alteração da expressão gênica de 13 dos 96 genes analisados. Quando comparadas placas ateroscleróticas com reestenóticas, observou-se aumento da expressão do ativador do inibidor do plasminogênio (PAI-1), do inibidor tecidual da metaloproteinase (TIMP-1), das pro-metaloproteinases 2 e 9 e da atividade da metaloproteinase 2 nas placas ateroscleróticas³¹. Outro estudo analisou material aterosclerótico e reestenótico de coronárias retirado por aterectomia direcional. Foram analisadas a expressão do receptor do fator de crescimento ligado a insulina 1 (IGF-1) e 5 proteínas ligantes de IGF. IGF-1 e as proteínas ligantes não foram localizados em células musculares lisas de coronárias normais, apenas nas placas ateroscleróticas e reestenóticas. O receptor de IGF-1 foi mais expresso nas placas ateroscleróticas em relação as reestenóticas. Estas alterações de expressão gênica encontradas sugerem que este sistema pode estar associado à fisiopatologia da aterosclerose³².

O estudo de maior impacto e com análise do maior número de genes foi publicado em 2005. Dos 89 pacientes recrutados, apenas 47 apresentaram amostra suficiente para análise gênica (32 com lesão de novo e 15 com lesão reestenótica). Destes pacientes, apenas 1 no grupo aterosclerose e 2 no grupo reestenose eram diabéticos. O material foi coletado a partir de aterectomia rotacional e foram analisados 22.000 genes. Observou-se maior expressão gênica, no material reestenótico, do subgrupo de genes relacionados ao pró-colageno tipo 1 alfa 2 e, no material aterosclerótico, do subgrupo de genes do ADAM17/enzima conversora do fator de necrose tumoral alfa (ADAM17/TNF). Este último subgrupo de genes parece estar associado à regulação do processo inflamatório

através da clivagem e liberação de proteínas transmembrana da superfície celular, dentre elas, o TNF e os receptores do TNF. A presença do TNF alfa já foi identificada na superfície de macrófagos, o que reforça ainda mais sua possível associação com a fisiopatologia da aterosclerose. Quanto aos genes relacionados ao colágeno, sabe-se que sua inibição poderia bloquear uma das principais vias de formação da placa reestenótica, já que é o principal componente da matriz extracelular produzido pelas células musculares lisas³³. Apesar de inovador, o estudo apresenta algumas limitações. A principal delas é o fato de não haver a possibilidade de analisar alterações gênicas ao longo do tempo no mesmo paciente, comparando a expressão gênica da placa aterosclerótica com a reestenótica, já que o material de cada grupo de pacientes foi misturado e analisado em uma única placa de microarranjo.

Referências bibliográficas

1. Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular risk factors: the Framingham study. *Circulation*. 1979;59(1):8.
2. Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care*. 1993;16(2):434.
3. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*. 2004;364(9438):937.
4. Sarwar N, Gao P, Seshasai SR, Gobin R, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Ingelsson E, Lawlor DA, Selvin E, Stampfer M, Stehouwer CD, Lewington S, Pennells L, Thompson A, Sattar N, White IR, Ray KK, Danesh J. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet*. 2010;375(9733):2215.
5. Granger CB, Califf RM, Young S, Candela R, Samaha J, Worley S, Kereiakes DJ, Topol EJ. Outcome of patients with diabetes mellitus and acute myocardial infarction treated with thrombolytic agents. The Thrombolysis and Angioplasty in Myocardial Infarction (TAMI) Study Group. *J Am Coll Cardiol*. 1993;21(4):920.
6. Natali A, Vichi S, Landi P, Severi S, L'Abbate A, Ferrannini E. Coronary atherosclerosis in Type II diabetes: angiographic findings and clinical outcome. *Diabetologia*. 2000;43(5):632.
7. Eckel RH, Wassef M, Chait A, Sobel B, Barrett E, King G, Lopes-Virella M, Reusch J, Ruderman N, Steiner G, Vlassara H. Prevention Conference VI: Diabetes and Cardiovascular Disease: Writing Group II: pathogenesis of atherosclerosis in diabetes. *Circulation*. 2002;105(18):e138.

8. West NE, Ruygrok PN, Disco CM, Webster MW, Lindeboom WK, O'Neill WW, Mercado NF, Serruys PW. Clinical and angiographic predictors of restenosis after stent deployment in diabetic patients. *Circulation*. 2004;109(7):867.
9. Tada T, Kimura T, Morimoto T, Ono K, Furukawa Y, Nakagawa Y, Nakashima H, Ito A, Siode N, Namura M, Inoue N, Nishikawa H, Nakao K, Mitsudo K. Comparison of three-year clinical outcomes after sirolimus-eluting stent implantation among insulin-treated diabetic, non-insulin-treated diabetic, and non-diabetic patients from j-Cypher registry. *Am J Cardiol*. 2011;107(8):1155.
10. Costa MA, Simon DI. Molecular basis of restenosis and drug-eluting stents. *Circulation*. 2005;111:2257-2273.
11. Lemos PA, Hoye A, Goedhart D, Arampatzis CA, Saia F, van der Giessen WJ, McFadden E, Sianos G, Smits PC, Hofma SH, de Feyter PJ, van Domburg RT, Serruys PW. Clinical, angiographic, and procedural predictors of angiographic restenosis after sirolimus-eluting stent implantation in complex patients: An evaluation from the rapamycin-eluting stent evaluated at rotterdam cardiology hospital (research) study. *Circulation*. 2004;109:1366-1370.
12. Moreno PR, Palacios IF, Leon MN, Rhodes J, Fuster V, Fallon JT. Histopathologic comparison of human coronary in-stent and post-balloon angioplasty restenotic tissue. *Am J Cardiol*. 1999;84:462-466, A469.
13. Kornowski R, Hong MK, Tio FO, Bramwell O, Wu H, Leon MB. In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31(1):224.
14. Dangas GD, Claessen BE, Caixeta A, Sanidas EA, Mintz GS, Mehran R. In-stent restenosis in the drug-eluting stent era. *J Am Coll Cardiol*. 2010;56:1897-1907.

15. Ormiston JA, Stewart FM, Roche AH, Webber BJ, Whitlock RM, Webster MW. Late regression of the dilated site after coronary angioplasty: a 5-year quantitative angiographic study. *Circulation*. 1997;96(2):468.
16. Guiteras-Val P, Varas-Lorenzo C, Garcia-Picart J, Martí-Claramunt V, Augé-Sanpera JM. Clinical and sequential angiographic follow-up six months and 10 years after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am J Cardiol*. 1999;83(6):868.
17. Cannan CR, Yeh W, Kelsey SF, Cohen HA, Detre K, Williams DO. Incidence and predictors of target vessel revascularization following percutaneous transluminal coronary angioplasty: a report from the National Heart, Lung, and Blood Institute Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty Registry. *Am J Cardiol*. 1999;84(2):170.
18. Cutlip DE, Chauhan MS, Baim DS, Ho KK, Popma JJ, Carrozza JP, Cohen DJ, Kuntz RE. Clinical restenosis after coronary stenting: perspectives from multicenter clinical trials. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40(12):2082.
19. Kastrati A, Schömig A, Elezi S, Schühlen H, Dirschinger J, Hadamitzky M, Wehinger A, Hausleiter J, Walter H, Neumann FJ. Predictive factors of restenosis after coronary stent placement. *J Am Coll Cardiol*. 1997;30(6):1428.
20. Kastrati A, Dibra A, Mehilli J, Mayer S, Pinieck S, Pache J, Dirschinger J, Schömig A. Predictive factors of restenosis after coronary implantation of sirolimus- or paclitaxel-eluting stents. *Circulation*. 2006 May;113(19):2293-300.
21. Taniwaki M, Stefanini GG, Silber S, Richardt G, Vranckx P, Serruys PW, Buszman PE, Kelbaek H, Windecker S. RESOLUTE All-Comers Investigators. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63(16):1617.
22. Kereiakes DJ, Meredith IT, Windecker S, Lee Jobe R, Mehta SR, Sarembock IJ, Feldman RL, Stein B, Dubois C, Grady T, Saito S, Kimura T, Christen T, Allocco DJ, Dawkins KD. Efficacy and safety of a novel bioabsorbable polymer-coated, everolimus-eluting coronary stent: the EVOLVE II Randomized Trial. *Circ Cardiovasc Interv*. 2015 Apr;8(4).

23. Natsuaki M, Kozuma K, Morimoto T, Kadota K, Muramatsu T, Nakagawa Y, Akasaka T, Igarashi K, Tanabe K, Morino Y, Ishikawa T, Nishikawa H, Awata M, Abe M, Okada H, Takatsu Y, Ogata N, Kimura K, Urasawa K, Tarutani Y, Shiode N, Kimura T. Biodegradable polymer biolimus-eluting stent versus durable polymer everolimus-eluting stent: a randomized, controlled, noninferiority trial. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(3):181.
24. Pilgrim T, Heg D, Roffi M, Tüller D, Müller O, Vuilliomenet A, Cook S, Weilenmann D, Kaiser C, Jamshidi P, Fahrni T, Moschovitis A, Noble S, Eberli FR, Wenaweser P, Jüni P, Windecker S. Ultrathin strut biodegradable polymer sirolimus-eluting stent versus durable polymer everolimus-eluting stent for percutaneous coronary revascularisation (BIOSCIENCE): a randomised, single-blind, non-inferiority trial. *Lancet*. 2014 Dec; 384(9960):2111-22.
25. El-Hayek G, Bangalore S, Casso Dominguez A, Devireddy C, Jaber W, Kumar G, Mavromatis K, Tamis-Holland J, Samady H. Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials Comparing Biodegradable Polymer Drug-Eluting Stent to Second-Generation Durable Polymer Drug-Eluting Stents. *JACC Cardiovasc Interv*. 2017;10(5):462.
26. Ellis SG, Kereiakes DJ, Metzger DC, Caputo RP, Rizik DG, Teirstein PS, Litt MR, Kini A, Kabour A, Marx SO, Popma JJ, McGreevy R, Zhang Z, Simonton C, Stone GW. Everolimus-Eluting Bioresorbable Scaffolds for Coronary Artery Disease. *N Engl J Med*. 2015;373(20):1905.
27. Kereiakes DJ, Ellis SG, Metzger C, Caputo RP, Rizik DG, Teirstein PS, Litt MR, Kini A, Kabour A, Marx SO, Popma JJ, McGreevy R, Zhang Z, Simonton C, Stone GW. 3-Year Clinical Outcomes With Everolimus-Eluting Bioresorbable Coronary Scaffolds: The ABSORB III Trial. *J Am Coll Cardiol*. 2017 Dec 12;70(23):2852-2862.
28. Sorrentino S, Giustino G, Mehran R, Kini AS, Sharma SK, Faggioni M, Farhan S, Vogel B, Indolfi C, Dangas GD. Everolimus-Eluting Bioresorbable Scaffolds Versus Everolimus-Eluting Metallic Stents. *J Am Coll Cardiol*. 2017;69(25):3055.

29. Kapur A, Hall RJ, Malik IS, Qureshi AC, Butts J, de Belder M, Baumbach A, Angelini G, de Belder A, Oldroyd KG, Flather M, Roughton M, Nihoyannopoulos P, Bagger JP, Morgan K, Beatt KJ. Randomized comparison of percutaneous coronary intervention with coronary artery bypass grafting in diabetic patients. 1-year results of the CARDia. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55(5):432.
30. Farkouh ME, Domanski M, Sleeper LA, Siami FS, Dangas G, Mack M, Yang M, Cohen DJ, Rosenberg Y, Solomon SD, Desai AS, Gersh BJ, Magnuson EA, Lansky A, Boineau R, Weinberger J, Ramanathan K, Sousa JE, Rankin J, Bhargava B, Buse J, Hueb W, Smith CR, Muratov V, Bansilal S, King S 3rd, Bertrand M, Fuster V. Strategies for multivessel revascularization in patients with diabetes. *N Engl J Med.* 2012;367(25):2375.
31. Murillo CA, Woodside KJ, Guo Q, Zhang S, O'Connor KL, Hunter GC. Integrin and matrix metalloproteinase expression in human carotid plaque. *J Surg Res.* 2009 Jul;155(1):157-64.
32. Grant MB, Wargovich TJ, Ellis EA, Tarnuzzer R, Caballero S, Estes K, Rossing M, Spoerri PE, Pepine C. Expression of IGF-I, IGF-I receptor and IGF binding proteins-1, -2, -3, -4 and -5 in human atherectomy specimens. *Regul Pept.* 1996 Dec 17;67(3):137-44.
33. Ashley EA, Ferrara R, King JY, Vailaya A, Kuchinsky A, He X, Byers B, Gerckens U, Oblin S, Tsalenko A, Soito A, Spin JM, Tabibiazar R, Connolly AJ, Simpson JB, Grube E, Quertermous T. Network analysis of human in-stent restenosis. *Circulation.* 2006 Dec 12;114(24):2644-54.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

O diabetes está fortemente relacionado com a presença de doença aterosclerótica e ao processo de reestenose pós-implante de stents coronários. Tem-se como hipótese a possibilidade de haver diferença na expressão de alguns genes entre as placas ateroscleróticas de pacientes com e sem diabetes.

O estudo tem por objetivo realizar uma profunda análise gênica de placas ateroscleróticas com a finalidade de buscar possíveis alvos gênicos para o desenvolvimento de novas terapias. Será analisada e comparada a expressão gênica de placas ateroscleróticas de pacientes com e sem diabetes, buscando identificar genes mais expressos que possam ser preditores de reestenose.

ARTIGO ORIGINAL

Gene expression of atherosclerotic plaques in diabetic and non diabetic patients through the analysis of plaque fragments obtained by coronary atherectomy

Abstract:

Background: Restenosis remains the main challenge after stent implantation. Diabetic patients have more severe coronary disease and restenosis rates that can reach to 20%. The search for new technologies with the intention of reducing neointimal proliferation is constant, aiming to reduce the incidence of revascularization of target lesion. Gene therapy has been gaining ground in the treatment of numerous diseases, although it still plays a less expressive role in the treatment of atherosclerotic disease and intrastent restenosis.

Methods: Atherosclerotic plaques from forty patients with symptomatic coronary disease were obtained by directional atherectomy, which preceded the implantation of a non-pharmacological stent. RNA analysis of more than 22,000 genes from these plaques was performed with the Affymetrix GeneChip microarray system.

Results: Plaques from 28 patients were considered adequate for analysis and inclusion in the study. Of these, 10 were from diabetic patients. The microarray showed 9 overexpressed genes in atherosclerotic plaques of diabetics and 6 in non-diabetic patients, with $p < 0.01$. Among the overexpressed genes in diabetics, 2 are involved in pathophysiological processes that can be related to atherosclerosis and intrastent restenosis (VASP and MAD2L1BP).

Conclusion: In this study, genes that may be related to the greater severity of atherosclerotic disease and the higher incidence of coronary stents restenosis, in diabetic patients, were identified. These data point to genes that may be potential targets in gene therapy research.

Keywords: atherosclerotic coronary disease, gene expression, microarray, atherectomy, intrastent restenosis.

Background

Since the appearance of intracoronary stents for the treatment of flow limitation present in coronary atherosclerotic disease, research aimed to understand the physiopathology and the treatment of in-stent restenosis has been a big challenge for interventional cardiologists^{1,2,3,4}. The incidence of restenosis is quite variable, depending on the risk factors and the anatomical characteristics of the lesion and treated vessel. Among these factors, diabetes has been strongly associated with high rates of restenosis in clinical studies⁵.

The development of first and second-generation drug-eluting stents and, subsequently, the emergence of bioabsorbable polymers and ultrathin-Strut stents has not yet completely solved the in-stent reestenosis^{5,6,7,8,9,10,11}. Despite all new technologies in percutaneous coronary intervention (PCI), target lesion revascularization can reach values close to 20%. When compared to surgical treatment, PCI has been inferior, mainly due to the greater need for future revascularization^{12,13}. This difference is even more significant in the subgroup of diabetic patients. The development of biodegradable scaffolds, although based on a quite plausible theoretical rationale, failed in large clinical trials because of the high rates of stent thrombosis and target lesion failure^{14,15}.

Because of the reasons described above, the search for new technologies, whether related to the development of new drugs or materials, is essential. The ideal drug should selectively block the smooth muscle cell proliferation and extracellular matrix production without inhibiting early reendothelization of the stent, reducing thereby the rates of restenosis and stent thrombosis and the time of antiplatelet use.

This study has the objective to perform a deep genetic analysis of atherosclerotic plaques and to identify possible genetic targets for the development of new therapies. The analysis and comparison of the gene expression of atherosclerotic plaques of diabetic and non-diabetic patients was done, seeking to identify possible predictors of restenosis.

Methods

Study Population

Forty patients with symptomatic *de novo* coronary artery disease who underwent coronary stenting with adjunctive directional atherectomy were included in the study. Patients were excluded if they required treatment for: (a) saphenous vein lesions, (b) ostial right coronary artery lesions, (c) in-stent restenotic lesions, or (d) if they had a history of cardiac transplant, dilated or restrictive

cardiomyopathy. The study was conducted following its approval by the ethics committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre and all patients gave written informed consent.

Procedure

IVUS was performed before percutaneous coronary intervention to achieve plaque and vessel data in order to help in the decision making of the stent size. Next, directional atherectomy was performed with the Flexicut directional atherectomy device (Guidant Corp., Temecula, USA) through an 8Fr guiding catheter as previously described¹⁶. This atherectomy catheter has a 6Fr shaft and an urging balloon available in 3 different diameters (2.5, 3.0, and 3.5 mm) that was inflated to low pressure (about 0.5 atm) to allow proper apposition of the cutting window against the atheromatous plaque. Once it is activated, the cutter rotates at a speed of 2,000 rpm and should be slowly advanced to the distal end of the window to suck the excised material into the nosecone located at the distal portion of the catheter. After atherectomy, all lesions received bare-metal stents according to standard techniques followed by IVUS to confirm satisfactory stent expansion and apposition. When necessary, stent post dilation followed by IVUS control was performed.

Quantitative Measurements

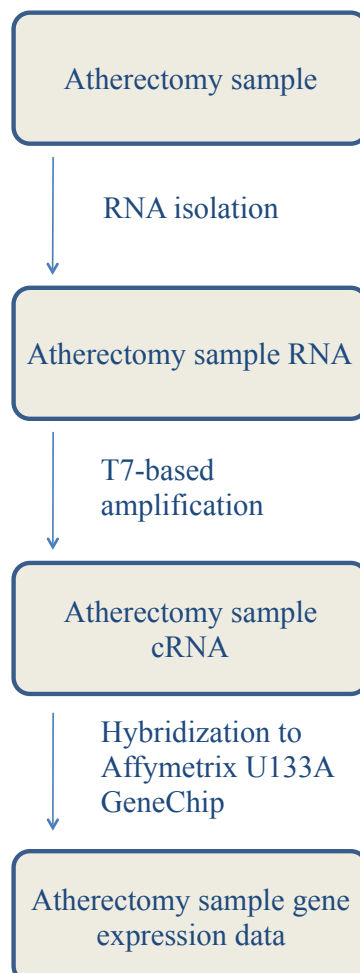
Quantitative coronary angiography and IVUS imaging were performed after bolus infusion of intracoronary nitrates during the index procedure and at follow-up assessments. IVUS images were acquired with a motorized pullback at a constant speed of 0.5 mm/s. Quantitative angiographic analysis was performed by independent investigators at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Porto Alegre, Brazil) and volumetric IVUS analyses was performed by independent core laboratory at UH Hospitals (Cleveland, USA).

Genetic analysis and gene expression profiling

Atherectomy specimens were placed in RNA Stat 60, stored in liquid nitrogen and sent to Millennium Pharmaceuticals (Cambridge, USA) for gene profiling analysis of more than 22,000 genes. RNA was isolated from atherectomy lesion samples by homogenization with a PowerGen model 125 homogenizer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), followed by extraction with 0.2 volume chloroform, precipitation with 0.5 volume isopropanol, wash in 75% ethanol, and suspension in RNase-free water. RNA concentration was measured by use of the NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). RNA quality and purity were assessed with the use

of the RNA 6000 pico or nano assay (Agilent 2100 Bioanalyzer; Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

Samples were labeled for gene expression profiling using the Affymetrix GeneChip microarray system (Affymetrix, Santa Clara, USA). A standard T7-based amplification protocol (Affymetrix) was used to convert RNA to biotinylated cRNA. Fragmented, biotin-labeled cRNA was hybridized to Affymetrix GeneChip Human Genome U133A arrays according to standard Affymetrix protocol. Operators, chip lots, and scanners (GeneArray 3000, Affymetrix) were controlled throughout. Quality controls of arrays that used GeneChip Operating Software included scaling factor and percentage of genes present (figure 1).



Statistical analysis

For the expression analyzes of the Affymetrix platform microarray data (HG-U133A - GPL96-57554) we used the library R v.3.4.4 (R Core Team, 2018), affy v.1.56.0 libraries (Gautier et al. 2004) and limma v.3.34.9 (Ritchie et al., 2015). The normalization was done by RMA (Robust MultiArray Average) (Irizarry et al., 2003). Gene Ontology analysis for the detection of biological processes (GO-BP) and metabolic pathways (KEGG - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) was performed with the library pathfindR v.1.2.1 (Ulgen et al., 2018). As differentially expressed genes, we considered those with p-value $<0.01^{17,18,19,20,21}$.

Results

From 40 patients who underwent single bare-metal stenting with adjunctive directional atherectomy, 28 had adequate tissue sampling for RNA analysis. Baseline and procedural characteristics are summarized in Table 1.

	Diabetics (10)	Non-diabetics (18)
Age	53,42 ± 5,44	63,84 ± 12,25
Male	8 (80%)	14 (78%)
Hypertension	6 (60%)	12 (67%)
Smoking	4 (40%)	11 (61%)
Hyperlipidemia	7 (70%)	8 (44%)
Acute coronary syndrome	7 (70%)	15 (85%)
Vessel		
Left Anterior Descending	8 (80%)	10 (56%)
Circunflex	0 (0%)	4 (22%)
Right	2 (20%)	4 (22%)
Preinterventional angiographic findings		
Reference Segment Diameter, mm	3,27 ± 0,24	3,5 ± 0,21
Lesion Length, mm	24 ± 7,50	22 ± 7,57
Stenosis, (%)	75,5 ± 6,85	71 ± 14

Values are mean ± SD and n (%).

The microarray revealed 9 genes overexpressed in atherosclerotic plaques of diabetics and 6 in non-diabetic patients, with $p < 0.01$ (Table 2 and 3). Among the overexpressed genes in diabetics, were considered relevant 2 genes that are involved in pathophysiological processes that can be related to atherosclerosis and intrastent restenosis: VASP (*vasodilatory-stimulated phosphoprotein*) and MAD2L1BP (*mitotic arrest deficient 2*).

Tabela 2. Overexpressed genes in diabetic patients

Gene	Symbol	Function	Non-diabetic	Diabetic	Foldchange	t	p-value
Vasodilator stimulated phosphoprotein	VASP	Inflammatory process	2,1276	2,4616	0,3340	3,5208	0,0021
Colony stimulating factor 1	CSF1	Macrophages function control	2,0435	2,4551	0,4116	3,4888	0,0023
Bone morphogenetic protein 4	BMP4	TGF-beta ligand. Regulates adipogenesis	1,8288	2,1607	0,3319	3,2511	0,0040
Sulfotransferase family 1A member 2	SULT1A2	Catalyzes conjugation of many hormones	1,8317	2,3428	0,5111	3,1425	0,0051
Spindle checkpoint protein	MAD2L1BP	Cell proliferation	1,8088	2,0418	0,2330	3,0497	0,0063
RB binding protein 4	RBBP4	Histone acetylation and chromatin assembly	1,6937	2,0109	0,3172	2,9635	0,0076
abl interactor 1	ABI1	Signal transduction	1,6190	1,9055	0,2865	2,9149	0,0085
Proliferation-associated 2G4	PA2G4	Transducing growth regulatory signals	4,4292	4,9451	0,5159	2,9125	0,0085
Tousled like kinase 1	TLK1	Regulation of chromatin assembly	1,6683	1,9609	0,2926	2,8656	0,0095

Tabela 3. Overexpressed genes in non-diabetic patients

Gene	Symbol	Function	Non-diabetic	Diabetic	Foldchange	t	p-value
Cyclin dependent kinase 16	CDK16	Signal transduction cascades in cell differentiation	2,4258	2,1599	-0,2659	-4,2823	0,0004
Ubiquitination factor E4B	UBE4B	Degradation of unwanted proteins	2,4079	2,1054	-0,3025	-3,2823	0,0037
Mitogen-activated protein kinase 7	MAP2K7	Cellular response to proinflammatory cytokines	2,2030	1,8545	-0,3485	-2,9332	0,0082
Cell division cycle 6	CDC6	DNA replication	1,5868	1,2877	-0,2991	-2,8744	0,0093
Centrin 1	CETN1	Cell cycle - related to microtubules and centrosome	1,7620	1,5682	-0,1938	-2,8606	0,0096
Cryptochrome circadian regulator 2	CRY2	Circadian clock	2,2666	1,9101	-0,3565	-2,8577	0,0097

Discussion

In this study, we sought to identify new therapeutic targets in the fight against atherosclerosis and intrastent restenosis. In the literature, we find few studies outlined for this purpose, probably due to the difficulty in obtaining material *in vivo*. The vast majority of published studies performed analysis of circulating markers^{22,23, 24}.

Among the genes identified in the study, two may be associated with the pathogenesis of atherosclerosis and intrastent restenosis in diabetic patients: 1) the *vasodilatory-stimulated phosphoprotein* (VASP) gene, that is associated with nitric oxide (NO)-dependent anti-inflammatory mechanisms and 2) the *mitotic arrest deficient* (MAD2) gene, involved in the mitotic process.

The VASP gene produces a protein that is an important component of the anti-inflammatory and vasodilatory mechanism mediated by nitric oxide (NO). In vessels without endothelial dysfunction, which have an adequate NO bioavailability, VASP is phosphorylated in a serine residue by Protein Kinase G (PKG), becoming activated. This mechanism blocks NFκB (Nuclear Factor kappa B), an important transcription factor responsible for the activation of more than 200 genes of the inflammatory cascade. Nitric oxide production is dependent of the *inducible nitric oxide synthase* (iNOS) enzyme expression, via activation of NFκB in response to changes in redox status and stimulation by cytokines such as IFN-γ (Interferon gamma), TNF-α (Tumor Necrosis Alpha factor), IL-1β (Interleukin 1 beta). These cytokines induce, in endothelial cells, the expression of receptors for extracellular matrix adhesion molecules, such as ICAM-1 (Intracellular Cell Adhesion Molecule-1) and VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1).

Advanced glycation products, present in diabetic patients, generate oxidative stress, which consequently decrease the bioavailability of nitric oxide. NO is determinant for the activation of PKG. Therefore, VASP can not be phosphorylated to exert its anti-inflammatory function (NFκB blockade). In our study, VASP was more expressed in diabetic individuals probably due to an up-regulation mechanism caused by failure in its phosphorylation process due to oxidative stress and decreased NO bioavailability. This scenario of inadequate phosphorylation of VASP does not allow it to exert its anti-inflammatory action^{25,26}.

MAD2 participates of the mitotic spindle checkpoint, which monitors the binding of chromosomes to microtubules. MAD2 and BUB (*budding uninhibited by benzimidazole*) are associated with the structure of the kinetochores (central region of the centromere where the mitotic spindle attaches to the migration of the chromosomes to the cell poles) not bound to the microtubules during metaphase. Activation of MAD2 allows blockage of anaphase beginning, preventing unequal chromosome segregation. The increased expression of this gene generates chromosomal instability and contributes to the occurrence of mutations that induce deregulation of the proliferative process.

MAD2 acts as a cell cycle control mechanism, allowing its progression to the anaphase. However, two premises are fundamental: 1) the microtubules must be connected to the centromere kinetochores, leading to the binding of all chromosomes to the mitotic spindle; 2) all chromosomes must be aligned in metaphase, with adequate connection between the sister chromatids. When any of these conditions fail, MAD2 is activated to interact with BUB, inactivating the anaphase promoter complex (APC) by direct binding to Cdc20. The MAD2/BUB1/Cdc20 complex preclude

the progression of the anaphase until all the kinetochores are adequately connected to the microtubules²⁷. Thus, the MAD2 gene is a key component in the mitotic process of G2/M cell cycle conduction, presenting increased expression in different types of neoplasms^{28,29,30,31,32}.

In a previously study, it was shown that the inactivation of MAD2 by the overexpression of p31 (protein involved in the activation of the apoptotic cascade and cellular senescence process) promoted the death induction of the cells with chromosomal abnormalities. In this study, 19 cultures of different types of cancer cells and 3 cultures of healthy cells were developed. P31 was inserted into the cells through a retrovirus. Cell proliferation blocking was observed in 17 out of 19 cancer cell cultures whereas no cell proliferation blocking was observed in any of the 3 healthy cell cultures. It was suggested that the activation of p31 to block the expression of MAD2 could be an important therapeutic strategy for antiproliferative drugs inhibiting the uncontrolled proliferation of smooth muscle cells without blocking stent reendothetization.³³.

With the advent of drug-eluting stents, there was a drastic reduction in the incidence of restenosis. However, some subgroups of patients, especially diabetics, still have high rates of target lesion revascularization. Neointimal hyperplasia, the main factor related to restenosis, led to the rationale for the use of drugs with antiproliferative properties, such as rapamycin and paclitaxel³⁴. These drugs have a direct action on the progression of the cell cycle, preventing the disordered proliferation of cells.

At the interphase, the moment of the cell cycle in which there is no mitosis, the cell presents three distinct phases: G1, S and G2, whose activity change occurs due to proteins called cyclin-dependent kinases (Cdks). These proteins regulate the necessary transitions in the different stages of the cell cycle, especially at two irreversible points: the S phase, in which there is DNA duplication, and the M phase, in which the cytoplasmic division occurs in two daughter cells^{35,36}. The cell cycle has two critical checkpoints, in which there is a cellular decision about the viability of the progression of the cycle. The first one occurs in the transition from phase G1 to S, and the second, in the transition from phase G2 to M³⁷. The mentioned points are considered of greater vulnerability for the continuity of the cell cycle, because if the cell presents mutations, translocations or deletions, there is an apoptotic mechanism that prevents the divisional progression of a functionally altered cell³⁸. Apoptosis usually occurs by an intrinsic cytochrome c release pathway, a component present in mitochondrial ridges, which is released into the cytosol and promotes activation of the *caspase* cascade³⁹. This cascade induces nuclear fragmentation and

exposure of recognition factors for phagocytes in the plasma membrane, generating, consequently, an apoptotic body that can be endocytosed by the immune cells.

Rapamycin, the sirolimus active principle, has a potential ability to prevent restenosis by binding to the intracellular receptor FK506 and thereby inhibiting the mTOR pathway⁴⁰. The mTOR pathway blocks the cellular interface, precluding the progression of the cycle from G1 to S. Thus, without DNA synthesis, the cell does not become able to perform mitosis⁴¹.

Paclitaxel is an antiproliferative drug that has a different mechanism from that of rapamycin, but also generates cell cycle blockade, precluding the passage of the cell from the G2 phase of the interphase to the beginning of mitosis. This drug acts in the generation of microtubules, which are fundamental elements for the formation of the mitotic spindle and orientation of the chromosomes during the process of cell division⁴².

It is known that diabetes can cause an attenuation of the effect of sirolimus and its analogs on mTOR, suggesting that these drugs may not be the best option for a DES in diabetics. Because of this, numerous studies were conducted in diabetic patients comparing drug-eluting stents coated with *limus-family* and paclitaxel drugs. However, the hypothesis of paclitaxel superiority in diabetics was not confirmed in randomized clinical trials and meta-analysis. Paclitaxel-coated stents were inferior in several outcomes. So, it was noticed that the action of paclitaxel on microtubules is not as effective in the cell proliferation blockage as is was thought previously. Thus, the MAD2 gene appears to be an interesting target for new antiproliferative drugs^{43,44}.

Limitations of the Study

In the present study, some limitations should be considered. First, as we analysed a large number of genes, many genes that bear no relationship with the biology of atherosclerosis and restenosis were screened and found to have a random positive or negative relationship. Secondly, RNA extraction and the test of each atherosclerotic plaque, which are also a strong point of the methodology, led to insufficient analysis of RNA in 12 of the 40 samples of tissue causing its exclusion. This is probably due to the presence of large amounts of lipids and the small number of cells in the atheroma plaques. Finally, the amount of tissue recovered did not allow further validation of the study results by direct measurement of the protein through the Western Blot test.

The above mentioned technical limitations regarding tissue sampling and genetic testing do

not compromise the present study, because complete elucidation of all physiopathological mechanisms of atherosclerosis and restenosis in diabetic patients was out of its scope. However, the study exploratory design allowed to point out new features for better understanding the complex processes involved in the genesis and severity of atherosclerotic disease as well as the restenosis between diabetic and non diabetic patients.

Conclusions

Atherosclerotic coronary lesions of diabetic patients present several overexpressed genes, of which two may play an important role in the genesis and severity of atherosclerotic disease and in-stent restenosis: VASP and MAD2. The latter, because of its relation to cell proliferation, ought to be subject for future studies aiming the development of new anti-restenotic therapies.

Perspectives

The study presents two new possible targets for future research in the treatment of atherosclerotic disease and in-stent restenosis in diabetic patients.

The development of a therapy that makes VASP phosphorylation more effective in diabetic patients may be the subject of future research, due to its relationship with nitric oxide and inflammatory processes, both closely related to the pathogenesis of atherosclerotic disease and of in-stent restenosis.

Even more interesting, blocking MAD2 by p31 has been shown to inactivate the proliferation of damaged cells without blocking healthy cell proliferation. This is a key point for the development of an ideal drug against restenosis: a drug that inhibits the proliferation of genetically modified smooth muscle cells without inhibiting the early reendothelization of the stent, reducing the risk of stent thrombosis.

References

1. Costa MA, Simon DI. Molecular basis of restenosis and drug-eluting stents. *Circulation*. 2005;111:2257-2273.
2. Lemos PA, Hoye A, Goedhart D, Arampatzis CA, Saia F, van der Giessen WJ, McFadden E, Sianos G, Smits PC, Hofma SH, de Feyter PJ, van Domburg RT, Serruys PW. Clinical, angiographic, and procedural predictors of angiographic restenosis after sirolimus-eluting stent implantation in complex patients: An evaluation from the rapamycin-eluting stent evaluated at rotterdam cardiology hospital (research) study. *Circulation*. 2004;109:1366-1370.
3. Moreno PR, Palacios IF, Leon MN, Rhodes J, Fuster V, Fallon JT. Histopathologic comparison of human coronary in-stent and post-balloon angioplasty restenotic tissue. *Am J Cardiol*. 1999;84:462-466, A469.
4. Kornowski R, Hong MK, Tio FO, Bramwell O, Wu H, Leon MB. In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia. *J Am Coll Cardiol*. 1998;31(1):224.
5. Tada T, Kimura T, Morimoto T, Ono K, Furukawa Y, Nakagawa Y, Nakashima H, Ito A, Siode N, Namura M, Inoue N, Nishikawa H, Nakao K, Mitsudo K. Comparison of three-year clinical outcomes after sirolimus-eluting stent implantation among insulin-treated diabetic, non-insulin-treated diabetic, and non-diabetic patients from j-Cypher registry. *Am J Cardiol*. 2011;107(8):1155.
6. Kastrati A, Dibra A, Mehilli J, Mayer S, Pinieck S, Pache J, Dirschinger J, Schömig A. Predictive factors of restenosis after coronary implantation of sirolimus- or paclitaxel-eluting stents. *Circulation*. 2006 May;113(19):2293-300.
7. Taniwaki M, Stefanini GG, Silber S, Richardt G, Vranckx P, Serruys PW, Buszman PE, Kelbaek H, Windecker S. RESOLUTE All-Comers Investigators. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63(16):1617.

8. Kereiakes DJ, Meredith IT, Windecker S, Lee Jobe R, Mehta SR, Sarembock IJ, Feldman RL, Stein B, Dubois C, Grady T, Saito S, Kimura T, Christen T, Allocco DJ, Dawkins KD. Efficacy and safety of a novel bioabsorbable polymer-coated, everolimus-eluting coronary stent: the EVOLVE II Randomized Trial. *Circ Cardiovasc Interv.* 2015 Apr;8(4).
9. Natsuaki M, Kozuma K, Morimoto T, Kadota K, Muramatsu T, Nakagawa Y, Akasaka T, Igarashi K, Tanabe K, Morino Y, Ishikawa T, Nishikawa H, Awata M, Abe M, Okada H, Takatsu Y, Ogata N, Kimura K, Urasawa K, Tarutani Y, Shiode N, Kimura T. Biodegradable polymer biolimus-eluting stent versus durable polymer everolimus-eluting stent: a randomized, controlled, noninferiority trial. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62(3):181.
10. Pilgrim T, Heg D, Roffi M, Tüller D, Muller O, Vuilliomenet A, Cook S, Weilenmann D, Kaiser C, Jamshidi P, Fahrni T, Moschovitis A, Noble S, Eberli FR, Wenaweser P, Jüni P, Windecker S. Ultrathin strut biodegradable polymer sirolimus-eluting stent versus durable polymer everolimus-eluting stent for percutaneous coronary revascularisation (BIOSCIENCE): a randomised, single-blind, non-inferiority trial. *Lancet.* 2014 Dec; 384(9960):2111-22.
11. El-Hayek G, Bangalore S, Casso Dominguez A, Devireddy C, Jaber W, Kumar G, Mavromatis K, Tamis-Holland J, Samady H. Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials Comparing Biodegradable Polymer Drug-Eluting Stent to Second-Generation Durable Polymer Drug-Eluting Stents. *JACC Cardiovasc Interv.* 2017;10(5):462.
12. Kapur A, Hall RJ, Malik IS, Qureshi AC, Butts J, de Belder M, Baumbach A, Angelini G, de Belder A, Oldroyd KG, Flather M, Roughton M, Nihoyannopoulos P, Bagger JP, Morgan K, Beatt KJ. Randomized comparison of percutaneous coronary intervention with coronary artery bypass grafting in diabetic patients. 1-year results of the CARDia. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55(5):432.
13. Farkouh ME, Domanski M, Sleeper LA, Siami FS, Dangas G, Mack M, Yang M, Cohen DJ, Rosenberg Y, Solomon SD, Desai AS, Gersh BJ, Magnuson EA, Lansky A, Boineau R, Weinberger J, Ramanathan K, Sousa JE, Rankin J, Bhargava B, Buse J, Hueb W, Smith CR,

- Muratov V, Bansilal S, King S 3rd, Bertrand M, Fuster V. Strategies for multivessel revascularization in patients with diabetes. *N Engl J Med*. 2012;367(25):2375.
14. Kereiakes DJ, Ellis SG, Metzger C, Caputo RP, Rizik DG, Teirstein PS, Litt MR, Kini A, Kabour A, Marx SO, Popma JJ, McGreevy R, Zhang Z, Simonton C, Stone GW. 3-Year Clinical Outcomes With Everolimus-Eluting Bioresorbable Coronary Scaffolds: The ABSORB III Trial. *J Am Coll Cardiol*. 2017 Dec 12;70(23):2852-2862.
 15. Sorrentino S, Giustino G, Mehran R, Kini AS, Sharma SK, Faggioni M, Farhan S, Vogel B, Indolfi C, Dangas GD. Everolimus-Eluting Bioresorbable Scaffolds Versus Everolimus-Eluting Metallic Stents. *J Am Coll Cardiol*. 2017;69(25):3055.
 16. Zohlhofer D, Klein CA, Richter T, Brandl R, Murr A, Nuhrenberg T, Schomig A, Baeuerle PA, Neumann FJ. Gene expression profiling of human stent-induced neointima by cDNA array analysis of microscopic specimens retrieved by helix cutter atherectomy: Detection of fk506-binding protein 12 upregulation. *Circulation*. 2001;103:1396-1402.
 17. Gautier, L., Cope, L., Bolstad, B. M., and Irizarry, R. A. (2004). affy---analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics* 20, 307-315.
 18. Irizarry, R. A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y. D., Antonellis, K. J., Scherf, U., and Speed, T. P. (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*, 4, 249–264.
 19. R Core Team. (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
 20. Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., and Smyth, G.K. (2015). limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research* 43, e47.
 21. Ulgen E, Ozisik O, and Sezerman OU. (2018). pathfindR: An R Package for Pathway Enrichment Analysis Utilizing Active Subnetworks. *bioRxiv*.

22. Petrovic D, Peterlin B. Genetic markers of restenosis after coronary angioplasty and after stent implantation. *Med Sci Monit.* 2005;11: RA127–RA135.
23. Ribichini F, Steffenino G, Dellavalle A, Matullo G, Colajanni E, Camilla T, Vado A, Benetton G, Uslenghi E, Piazza A. Plasma activity and insertion/deletion polymorphism of angiotensin I–converting enzyme: a major risk factor and a marker of risk for coronary stent restenosis. *Circulation.* 1998;97:147–154.
24. Monraats PS, Rana JS, Zwinderman AH, de Maat MP, Kastelein JP, Agema WR, Doevendans PA, de Winter RJ, Tio RA, Waltenberger J, Frants RR, van der Laarse A, van der Wall EE, Jukema JW. 455G/A polymorphism and preprocedural plasma levels of fibrinogen show no association with the risk of clinical restenosis in patients with coronary stent placement. *Thromb Haemost.* 2005;93:564–569.
25. Yu Mi Kang, Francis Kim, Woo Je Lee. Role of NO/VASP Signaling Pathway against Obesity- Related Inflammation and Insulin Resistance. *Diabetes Metab J* 2017;41:89-95.
26. Priksz D, Bombicz M, Varga B, Kurucz A, Gesztelyi R, Balla J, Toth A, Papp Z, Szilvassy Z, Juhasz B. Upregulation of Myocardial and Vascular Phosphodiesterase 9A in A Model of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 2882.
27. Teichner A, Eytan E, Sitry SD, Miniowitz-Shemtov S, Dumin E, Gromis J, Hershko A. p31comet Promotes disassembly of the mitotic checkpoint complex in an ATP-dependent process. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Feb 22;108(8):3187-92.
28. Yun M, Han YH, Yoon SH, Kim HY, Kim BY, Ju YJ, Kang CM, Jang SH, Chung HY, Lee SJ, Cho MH, Yoon G, Park GH, Kim SH, Lee KH. p31comet Induces cellular senescence through p21 accumulation and Mad2 disruption. *Mol Cancer Res.* 2009 Mar;7(3):371-82.
29. Fava LL, Kaulich M, Nigg EA, Santamaria A. Probing the in vivo function of Mad1:C-Mad2 in the spindle assembly checkpoint. *EMBO J.* 2011 Jul 19;30(16):3322-36.

30. Ma HT, Chan YY, Chen X, On KF, Poon RY. Depletion of p31comet protein promotes sensitivity to antimitotic drugs. *J Biol Chem*. 2012 Jun 15;287(25):21561-9.
31. Date DA, Burrows AC, Venere M, Jackson MW, Summers MK. Coordinated regulation of p31(Comet) and Mad2 expression is required for cellular proliferation. *Cell Cycle*. 2013 Dec 15;12(24):3824-32.
32. Toshiyuki H, Sang HK, Jasminder W, Tomohiro M. Identification of a MAD2-binding protein, CMT2, and its role in mitosis. *EMBO J*. 2002 Dec 2; 21(23): 6419–6428.
33. Shin HJ, Park ER, Yun SH, Kim SH, Jung WH, Woo SR, Joo HY, Jang SH, Chung HY, Hong SH, Cho MH, Park JJ, Yun M, Lee KH. p31comet-Induced Cell Death Is Mediated by Binding and Inactivation of Mad2. *PLoS One*. 2015 Nov 6;10(11):e0141523.
34. Tarantini G, Facchin M, Capodanno D, Musumeci G, Saia F, Menozzi A, et al. Paclitaxel versus sirolimus eluting stents in diabetic patients: Does stent type and/or stent diameter matter?: Long-term clinical outcome of 2,429-patient multicenter registry. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2012 Apr 18.
35. Murray AW. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):221-34.
36. Haberichter T, Madge B, Christopher RA, Yoshioka N, Dhiman A, Miller R, et al. A systems biology dynamical model of mammalian G1 cell cycle progression. *Mol Syst Biol*. 2007;3:84.
37. Chen T, Stephens PA, Middleton FK, Curtin NJ. Targeting the S and G2 checkpoint to treat cancer. *Drug Discov Today*. 2012 Mar;17(5-6):194-202.
38. Simon DK, Johns DR. Mitochondrial disorders: clinical and genetic features. *Annu Rev Med*. 1999;50:111-27.

39. Hui-qing X, Jian-da Z, Xin-min N, Yan-zhong Z, Cheng-qun L, Quan-yong H, et al. HSP70 inhibits burn serum-induced apoptosis of cardiomyocytes via mitochondrial and membrane death receptor pathways. *J Burn Care Res.* 2008 May-Jun;29(3):512-8.
40. Abe M, Kimura T, Morimoto T, Taniguchi T, Yamanaka F, Nakao K, et al. Sirolimus-eluting stent versus balloon angioplasty for sirolimus-eluting stent restenosis: Insights from the j-Cypher Registry. *Circulation.* 2010 Jul 6;122(1):42-51.
41. Yano H, Horinaka S, Yagi H, Ishimitsu T. Comparison of inflammatory response after implantation of sirolimus- and paclitaxel-eluting stents in patients on hemodialysis. *Heart Vessels.* 2012 Apr 22.
42. Cheng H, An SJ, Zhang XC, Dong S, Zhang YF, Chen ZH, et al. In vitro sequence-dependent synergism between paclitaxel and gefitinib in human lung cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011 Mar;67(3):637-46.
43. Wang HB, Zeng P, Yang J, Yang J, Liu XW. Paclitaxel-eluting stents versus sirolimus-eluting stents in patients with diabetes mellitus undergoing percutaneous coronary intervention: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Intern Emerg Med.* 2016 Oct;11(7):1005-13.
44. Kaul U, Bangalore S, Seth A, Arambam P, Abhaichand RK, Patel TM, Banker D, Abhyankar A, Mullasari AS, Shah S, Jain R, Kumar PR, Bahuleyan CG. Paclitaxel-Eluting versus Everolimus-Eluting Coronary Stents in Diabetes. *N Engl J Med.* 2015 Oct 29;373(18):1709-19.