

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA**

LUANA BERNARDES XAVIER COSTA

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO, INFLAMATÓRIOS E
DO SISTEMA FIBRINOLÍTICO EM PACIENTES COM FIBRILAÇÃO ATRIAL**

Belo Horizonte - MG

2022

LUANA BERNARDES XAVIER COSTA

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO, INFLAMATÓRIOS
E DO SISTEMA FIBRINOLÍTICO EM PACIENTES COM FIBRILAÇÃO ATRIAL**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de doutora em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cláudia Natália Ferreira

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Karina Braga Gomes Borges

Belo Horizonte - MG

2022

Costa, Luana Bernardes Xavier.
C837a Avaliação de marcadores de estresse oxidativo, inflamatórios e do sistema fibrinolítico em pacientes com fibrilação atrial [recurso eletrônico] / Luana Bernardes Xavier Costa. – 2022. 1 recurso eletrônico (176 f. : il.) : pdf

Orientadora: Cláudia Natália Ferreira.
Coorientadora: Karina Braga Gomes Borges.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Fibrilação atrial – Teses. 2. Inflamação – Teses. 3. Estresse oxidativo – Teses. 4. Anticoagulantes – Teses. I. Ferreira, Cláudia Natália. II. Borges, Karina Braga Gomes. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 616.12

Elaborado por Aline Guimarães Amorim – CRB-6/2292



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS FACULDADE DE FARMÁCIA COLEGIADO DO CURSO DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

"AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO, INFLAMATÓRIOS E DO
SISTEMA FIBRINOLÍTICO EM PACIENTES COM FIBRILAÇÃO ATRIAL"

LUANA BERNARDES XAVIER

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **vinte e dois de agosto de dois mil e vinte e dois**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Minas Gerais cons tuída pelos seguintes professores:

Ricardo Simões

FCMMG

Maria Auxiliadora Parreiras Martins

UFMG

Lara Carvalho Godoi

COLTEC/UFMG

Luci Maria Sant'Ana Dusse

UFMG

Karina Braga Gomes Borges

UFMG

Cláudia Natália Ferreira – Orientadora

COLTEC/UFMG

Belo Horizonte, 22 de agosto de 2022.

Documento assinado eletronicamente por **Claudia Natalia Ferreira, Chefe de setor**, em 29/08/2022, às 09:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Karina Braga Gomes Borges, Professora do Magistério Superior**, em 29/08/2022, às 10:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lara Carvalho Godoi, Professora Ensino Básico Técnico Tecnológico**, em 29/08/2022, às 10:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Auxiliadora Parreiras Martins, Membro de comissão**, em 29/08/2022, às 17:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luci Maria Sant Ana Dusse, Professora Magistério Superior - Voluntária**, em 30/08/2022, às 10:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Simões, Usuário Externo**, em 31/08/2022, às 16:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Simões, Usuário Externo**, em 31/08/2022, às 16:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1713991** e o código CRC **386B99A9**.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitora

Profa. Sandra Regina Goulart Almeida

Vice-Reitor

Prof. Alessandro Fernandes Moreira

Pró-Reitora de Pós-Graduação

Profa. Isabela Almeida Pordeu

Pró-Reitor de Pesquisa

Prof. Fernando Marcos dos Reis

Faculdade de Farmácia

Diretora

Profa. Leiliane Coelho André

Chefe do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Prof. Vicente de Paulo Coelho Peixoto de Toledo

Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas

Coordenadora

Profa. Adriana Oliveira Costa

Subcoordenadora

Profa. Simone Odília Antunes Fernandes

Colaboradores do projeto

- **Dr. Eduardo Sternick** – Médico cardiologista do Hospital Biocor
- **Dr. Estevão Lanna Figueiredo** – Médico Cardiologista do Hospital Lifecenter
- **Dr. Francisco Rezende Silveira** – Médico cardiologista dos Hospitais Semper e Lifecenter
- **Dr. José Raymundo Sollero Caiaffa** – Médico cardiologista do Hospital Governador Israel Pinheiro (Ipsemg)
- **Dr. Rodrigo Lanna** – Médico cardiologista do Hospital Semper
- **Professora Dr^a. Maria das Graças Carvalho** – Docente da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais

Apoio Financeiro

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

Dedico este trabalho

À minha família, pelo amor, apoio
e incentivo durante toda jornada acadêmica.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me permitir concluir esta etapa e me abençoar em todos os desafios até aqui.

Aos meus pais e meu irmão, que sempre expressaram uma confiança e compreensão incondicional aos meus desejos e compromissos.

Ao meu marido, Renato Costa, e a família que estamos formando. Sua fé em minha caminhada sempre alimentou minha determinação em concluir esta etapa.

À querida Professora Cláudia Natália Ferreira, sua orientação foi fundamental para meu crescimento acadêmico e pessoal. Nossa jornada se iniciou na etapa do mestrado, se estendeu pelos anos de doutorado e, com toda certeza, se eternizou nas melhores lembranças e aprendizados até aqui. Não tenho palavras para expressar minha gratidão pela sua dedicação ao meu conhecimento, pelas oportunidades proporcionadas e pela compreensão com minhas dificuldades. Foi um privilégio aprender tanto com você!

À querida Professora Karina Braga Gomes Borges, que me orientou pelo mestrado e sempre fez questão de estar presente em cada etapa deste doutorado. Sua disponibilidade e generosidade em compartilhar seu conhecimento e experiência, foi o que nos permitiu construir este trabalho e alcançar algumas conquistas até aqui. Seu profissionalismo e sua humanidade são a razão da minha eterna gratidão!

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas, que pelas disciplinas lecionadas ou pelas conversas informais nos corredores da instituição, contribuíram para meu conhecimento, compartilharam valiosas sugestões na construção deste trabalho e alimentaram minha inspiração nessa jornada.

Em especial, deixo meu agradecimento a Professora Maria das Graças Carvalho, que esteve presente desde o início deste projeto e contribuiu imensamente com seu conhecimento até aqui. À Professora Edna Afonso Reis, que disponibilizou seu tempo

e conhecimento em nos orientar com algumas análises estatísticas feitas neste estudo. E ao Professor Helton José Reis, que de forma direta contribuiu com doações e sugestões para construção deste trabalho.

Aos médicos cardiologista, pelo fundamental auxílio na seleção dos pacientes desse estudo, em especial ao Dr. Estevão Lanna Figueiredo.

Às queridas colegas Rita, Gabriela, Daisy e Pâmella pela importante ajuda em contribuir na realizazação deste trabalho.

Aos funcionários e colegas do laboratório de Bioquímica, laboratório Molecular e do laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFMG, pela convivência e companheirismo.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas, pela disponibilidade e auxílios constantes.

À CAPES pela bolsa de estudos e à FAPEMIG, ao CNPq pelo apoio financeiro no desenvolvimento do projeto.

Aos participantes deste estudo que generosamente doaram uma amostra de sangue para a realização das análises laboratoriais concretizando assim a ideia deste trabalho.

Por fim, a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento e conclusão deste projeto, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A fibrilação atrial (FA) é a arritmia cardíaca mais frequente, sendo que sua incidência aumenta à medida em que a idade avança. A doença é caracterizada por uma ativação elétrica irregular dos átrios, levando à contração desordenada e à formação de trombos atriais, principal causa de acidente vascular encefálico (AVE) e embolia sistêmica. Como a fisiopatologia da FA ainda não está totalmente definida, várias pesquisas estão sendo desenvolvidas, avaliando a contribuição de vias do estresse oxidativo, inflamação e do sistema fibrinolítico, na promoção do remodelamento elétrico e estrutural dos átrios, fibrose intersticial e risco aumentado de AVE. Além da varfarina, atualmente, está disponível para a prevenção primária e secundária de tais eventos, o anticoagulante oral rivaroxabana, um inibidor direto do fator X ativado (FXa). Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar marcadores inflamatórios, de estresse oxidativo e do sistema fibrinolítico em indivíduos com fibrilação atrial, em uso dos anticoagulantes orais varfarina ou rivaroxabana, comparado a um grupo de indivíduos controle sem FA. Em amostras de sangue de 147 indivíduos, incluindo 85 pacientes com FA (38 em uso de rivaroxabana e 47 varfarina) e 62 indivíduos controles, foram determinados os parâmetros do estresse oxidativo, pela dosagem de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2yl)-2,5-Difenil Brometo Tetrazolina (MTT) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); e os parâmetros inibidor do ativador do plasminogênio Tipo 1 (PAI-1), inibidor da fibrinólise ativado por trombina (TAFI), haptoglobina (Hp) e vitamina D por ensaio imunoenzimático. Os polimorfismos de Hp foram determinados usando o método de reação em cadeia de polimerase. A capacidade antioxidante, pela expressão de MTT, foi significativamente elevada nos pacientes em uso de rivaroxabana em relação aos pacientes em uso de varfarina e ao grupo controle. Os níveis de PAI-1 foram maiores nos pacientes com FA em comparação ao controle, mas não diferiu quando avaliados segundo o tipo de anticoagulante usado. Já os níveis de TAFI foram menores nos pacientes com FA, e significativamente reduzidos nos pacientes em uso de rivaroxabana quando comparado ao grupo varfarina. Os níveis séricos de Hp e vitamina D não mostraram diferenças significativas entre os grupos controle, varfarina e rivaroxabana. Os resultados encontrados evidenciam estado pró-trombótico na população com a arritmia. O anticoagulante rivaroxabana pode representar ação benéfica pela redução do inibidor fibrinolítico, além do aumento do potencial antioxidante.

Palavras-chave: fibrilação atrial; sistema fibrinolítico; inflamação e estresse oxidativo; rivaroxabana; varfarina.

ABSTRACT

Atrial fibrillation (AF) is the most frequent cardiac arrhythmia, and its incidence increases as age advances. The pathology is characterized by irregular electrical activation of the atria, leading to uncoordinated contraction and the formation of atrial thrombi, the main cause of brain stroke and systemic embolism. As the pathophysiology of AF is not yet fully defined, several studies are being carried out evaluating the contribution of oxidative stress and inflammation pathways, as well as fibrinolytic system, in promoting electrical and structural remodeling of the atria, interstitial fibrosis and increased risk of brain stroke. In addition to warfarin, the direct oral anticoagulant, rivaroxaban, a direct activated factor X inhibitor, is currently available for primary and secondary prevention of such events. In this context, the present study aimed to evaluate and compare the association of inflammatory markers, oxidative stress, genetic and fibrinolytic system in individuals with atrial fibrillation, using oral anticoagulants warfarin or rivaroxaban, as well as in a group of control individuals. In blood samples from 147 subjects, including 85 patients with AF (38 on rivaroxan and 47 on warfarin) and 62 control subjects, the parameters of oxidative stress were determined by the dosage of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-Diphenyl Tetrazoline Bromide (MTT) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS); and the parameters plasminogen activator inhibitor Type 1 (PAI-1), thrombin-activated fibrinolysis inhibitor (TAFI), haptoglobin (Hp) and vitamin D by enzyme immunoassay. The HP genotype was determined using the polymerase chain reaction method. The antioxidant capacity, measure to MTT expression, was significantly elevated in patients using rivaroxaban compared to patients using warfarin and the control group. PAI-1 levels were higher in patients with AF compared to control, but did not differ between control, warfarin and rivaroxaban. TAFI levels were lower in patients with AF, and significantly reduced in patients using rivaroxaban. Serum levels of Hp and vitamin D did not show significant differences between the control, warfarin and rivaroxaban groups. The results found showed the prothrombotic state in the population with arrhythmia. The anticoagulant rivaroxaban may represent a beneficial action by reducing the fibrinolytic inhibitor, in addition to increasing the antioxidant potential.

Keywords: atrial fibrillation; fibrinolytic system; inflammation and oxidative stress; rivaroxaban; warfarin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ação dupla da rivaroxabana na ativação de plaquetas e na via da coagulação.....	34
Figura 2. O papel do estresse oxidativo na fibrilação atrial.....	38
Figura 3. Representação esquemática do sistema fibrinolítico e inibidores da fibrinólise.....	46
Figura 4. Representação esquemática de um gel de agarose a 1% corado com 5 µL de brometo de etídio para amplificação dos alelos Hp1 e Hp2 do gene da haptoglobina.....	57
Figura 5 - Níveis plasmáticos de Haptoglobina entre os grupos controle e FA (A), e na comparação entre os grupos controle, varfarina e rivaroxabana (B).	66
Figura 6 - Níveis plasmáticos de vitamina D entre os grupos controle e FA (A), e na comparação entre controle, varfarina e rivaroxabana (B).	69
Figura 7 - Níveis plasmáticos de PAI-1 e TAFI entre os grupos controle e FA (A), e na comparação entre controle, varfarina e rivaroxabana (B)	70
Figura 8 - Níveis de PAI-1 (A) e TAFI (B) entre os grupos varfarina e rivaroxabana	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização clínica e demográfica dos participantes dos grupos controle e FA.....	59
Tabela 2. Caracterização clínica e demográfica dos participantes dos grupos controle, varfarina e rivaroxabana.	60
Tabela 3. Caracterização bioquímica dos participantes dos grupos controle e FA	61
Tabela 4. Caracterização bioquímica dos participantes dos grupos controle, varfarina e rivaroxabana.	62
Tabela 5. Caracterização do estresse oxidativo entre os participantes dos grupos controle e FA.....	63
Tabela 6. Caracterização do estresse oxidativo entre os participantes dos grupos controle, varfarina e rivaroxabana.	64
Tabela 7. Modelo de Regressão Linear múltiplo para biomarcador MTT e variantes do estudo.....	65
Tabela 8. Frequência alélica e genotípica dos polimorfismos de Haptoglobina nos grupos controle e FA.....	67
Tabela 9. Níveis plasmáticos de Hp para cada genótipo do polimorfismo Hp1-Hp2 no gene da Hp.	68
Tabela 10. Modelo de regressão linear múltiplo para o biomarcador TAFI e variáveis do estudo.....	72
Tabela 11. Correlação de Spearman entre os parâmetros avaliados na população total do estudo.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

AHA	American Heart Association
AIT	Ataque Isquêmico Transitório
ALT	Alanina Aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato Aminotransferase
AVE	Acidente Vascular Encefálico
α-2-antiplasmina	Inibição de Plasmina por Alfa-2-Antiplasmina
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CHA2DS2-VASc	Congestive heart failure, Hypertension, Age \geq75 (doubled), Diabetes, Stroke (doubled)
CICr	Clereance de Creatinina
CV	Cardioversão
DAC	Doença Arterial Coronariana
DCV	Doenças Cardiovasculares
DM	Diabetes Mellitus
DOACs	Anticoagulantes Orais de Ação Direta
DP	Desvio Padrão
ECG	Eletrocardiograma
ERES	Espécies Reativas de Enxofre
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
EP	Embolia Pulmonar
FA	Fibrilação Atrial
FDA	Food and Drug Administration
FIIa	Fator II ativado
FXa	Fator de Coagulação X Ativado
GGT	Gama Glutamil Transferase
GSH	Potencial Redox da Glutathiona
GT	Geração de Trombina
GWAS	<i>Genome Wide Association Studies</i>
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
IC	Insuficiência Cardíaca

IFN-γ	Interferon Gama
IM	Infarto do Miocárdio
IL	Interleucina
IPD-10	Proteína 10 Induzida pelo Interferon-γ
Ipsemg	Hospital Governador Israel Pinheiro
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
Hb	Hemoglobina
Ki	Constante Inibitória
H²O²	Peróxido de Hidrogênio
Hp	Haptoglobina
H³PO⁴	Ácido Fosfórico
HWE	Hardy-Weinberg
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
MCP-1	Proteína Quimiotática de Monócitos 1
MDA	Malondialdeído
MIG	Quimiocina Induzida por Interferon-γ
MPO	Mieloperoxidase
MTT	3-(4,5-Dimetiltíazol-2yl)-2,5-Difenil Brometo Tetrazolina
NFKβ	Fator de Transcrição Nuclear Kappa Beta
NADPH oxidase	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato oxidase
NT-proBNP	N-terminal do Peptídeo Natriurético Tipo B
O²⁻	Superóxido
OH⁻	Hidroxila
PAI-1	Inibidor do Ativador do Plasminogênio Tipo 1
PAR	<i>Proteinase-Activated Receptor</i>
PCR	Proteína C Reativa
PDF	Produtos de Degradação de Fibrina
RAAS	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
RANTES	Quimiocina regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais
RNI	Relação Normalizada Internacional
SCA	Síndrome Coronariana Aguda
SPSS	<i>Statistical Package of the Social Sciences</i>
TAFI	Inibor da Fibrinólise Ativado por Trombina

TAFIa	TAFI Ativado
TAFIai	TAFI Inativado
TAFIa/ai	TAFI Ativado/Inativado
TAT	Complexo trombina-antitrombina III
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TGF-β	Fator de Crescimento Transformador-β
TNF	Fator de Necrose Tumoral
t-PA	Ativador do Plasminogênio do Tipo Tecidual
TVP	Trombose Venosa Profunda
u-PA	Ativador do Plasminogênio do Tipo Uroquinase
VDR	Receptor da Vitamina D
VWF	Fator de Von Willebrand
X²	Teste do Qui-Quadrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	19
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	23
2.1 Fibrilação atrial.....	23
2.2 Terapia antitrombótica na fibrilação atrial.....	26
2.3 Inflamação.....	29
2.3.1 Fator da coagulação X ativado <i>versus</i> Inflamação.....	32
2.4 Estresse Oxidativo.....	34
2.5 Haptoglobina.....	38
2.6 Vitamina D.....	41
2.7 Sistema Fibrinolítico.....	44
3.0 Objetivos.....	49
3.1 Objetivo Geral.....	49
3.2 Objetivos Específicos.....	49
4.0 Material e Métodos.....	50
4.1 Desenho do Estudo.....	50
4.2 Critérios de Inclusão.....	51
4.3 Critérios de não inclusão.....	52
4.4 Métodos.....	52
4.4.1 Determinação dos parâmetros bioquímicos.....	53
4.4.2 Determinação da capacidade antioxidante do soro (MTT).....	53
4.4.3 Determinação da peroxidação lipídica (TBARS).....	53
4.4.4 Quantificação dos parâmetros inflamatórios por microesferas – Cytometric Bead Array (CBA).....	54
4.4.5 Determinação da Haptoglobina plasmática.....	54
4.4.6 Determinação dos níveis de vitamina D.....	55
4.4.7 Determinação dos parâmetros fibrinolíticos.....	55
4.4.8 Genotipagem do gene Haptoglobina.....	55
4.5 Estatística.....	57
5.0 Resultados.....	59
5.1 Características demográficas e clínicas dos participantes do estudo.....	59
5.2 Caracterização laboratorial dos participantes do estudo.....	61
5.3 Avaliação dos marcadores do estresse oxidativo.....	63

5.4 Determinação sérica de Haptoglobina.....	65
5.5 Determinação da frequência alélica e genotípica do polimorfismo Hp2-Hp1 no gene da Haptoglobina.....	66
5.6 Determinação dos níveis de vitamina D.....	68
5.7 Determinação do sistema fibrinolítico.....	69
5.8 Correlações entre as variáveis do estudo.....	72
6.0 Discussão.....	74
6.1 Características demográficas, clínicas e laboratoriais dos participantes do estudo.....	74
6.2 Controle x FA.....	75
6.3 Controle x Varfarina x Rivaroxabana.....	81
7.0 Conclusão.....	85
8.0 Limitações do estudo.....	86
9.0 Referências Bibliográficas.....	87
Apêndice A.....	121
Apêndice B.....	124
Apêndice C.....	126
Anexo A.....	128
Anexo B.....	129
Anexo C.....	136
Anexo D.....	150
Anexo E.....	159
Anexo F.....	160
Produções.....	161

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A FA é a arritmia cardíaca mais comum na prática clínica, caracterizada por uma ativação elétrica irregular dos átrios, levando à contração descoordenada e à formação de trombos atriais (JANUARY *et al.*, 2019; WESTERMAN *et al.*, 2019). Sua prevalência é de 1 a 2% na população em geral, aumentando conforme o avanço da idade. Estima-se que a prevalência de FA continuará a aumentar, afetando 6 a 12 milhões de cidadãos dos EUA em 2050 e quase 18 milhões de europeus em 2060 (SCHNABEL *et al.*, 2015). Na população brasileira (acima de 15 anos de idade), a prevalência de FA é 2,2% com uma projeção de prevalência de 1,5% em 2016 para 1,7% em 2025, um aumento de 0,2% (500.000 novos casos) (MORAES *et al.*, 2019). Além disso, a FA está associada a uma incidência três vezes maior de insuficiência cardíaca (IC) e um risco cinco vezes maior de AVE e embolia sistêmica, o que gera grandes implicações econômicas e na morbidade e mortalidade da população (MONTERA *et al.*, 2009; CAMM *et al.*, 2012; LIP E LANE, 2015).

A fisiopatologia da FA é multifatorial e inclui uma complexa interação entre distúrbios eletrofisiológicos, metabólicos, isquêmicos e hemodinâmicos, juntamente com fatores genéticos (AVILES *et al.*, 2003; ANDRADE *et al.*, 2014; NATEL E HARADA, 2014). Estudos indicam que a remodelação estrutural e elétrica dos átrios são a base patológica para a geração e manutenção da FA. A inflamação e o estresse oxidativo são vias inter-relacionadas que promovem essa remodelação estrutural e elétrica dos átrios, além de fibrose intersticial, responsáveis pelo risco aumentado de AVE (GUTIERREZ E VAN WAGONER, 2015). Vários estudos têm sugerido o controle da inflamação sistêmica e do estresse oxidativo como uma abordagem terapêutica bem-sucedida para o tratamento da FA (RODIÑO-JANEIRO *et al.*, 2013; VIOLI *et al.*, 2014; SOVARI, 2016).

A Hp, uma proteína plasmática induzida por citocinas como IL-1, IL-6 e TNF, antagoniza os efeitos oxidantes da hemoglobina (Hb) por se ligar a ela com alta afinidade, estabilizando o ferro derivado da porção heme, e promovendo a rápida depuração da Hb. O gene da Hp possui dois alelos distintos, Hp1 e Hp2. A proteína Hp codificada pelo alelo Hp2, se liga menos a Hb em comparação ao alelo Hp1, e consequentemente é menos eficiente como antioxidante e na depuração de Hb.

Depuração prejudicada de Hb leva a um aumento da deposição de ferro, geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e formação de placa lipoprotéica. O genótipo Hp2-Hp2 tem sido constantemente associado ao aumento do risco de complicações cardiovasculares (BUEHLER *et al.*, 2010; SCHAER *et al.*, 2013; GRAVES E VIGERUST, 2016).

A vitamina D, apesar do termo vitamina, é um hormônio lipossolúvel, pois além de sua ingestão a partir de alimentos e suplementos, pode ser também produzida endogenamente em humanos. Pesquisas recentes indicaram que a vitamina D pode exercer uma ampla gama de efeitos biológicos, além de seu papel clássico na homeostase mineral e óssea (BELLAN *et al.*, 2020). O status inadequado de vitamina D, por exemplo, tem sido associado a importantes patologias não esqueléticas, como doenças cardiovasculares (DCV). Alguns mecanismos envolvidos na ligação entre vitamina D e DCV também podem estar associados à fisiopatologia da FA. Um desses importantes mecanismos seria a inibição do sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) pela ação da vitamina D. A inibição de RAAS resulta em propriedades antiarrítmicas que reduzem o risco de FA. Além disso, efeitos benéficos da vitamina D na redução da trombogenicidade, inibição do estresse oxidativo e inflamação, melhora da função endotelial e relaxamento vascular; também são vias fisiológicas cruciais na patogênese da FA (KHATIB *et al.*, 2013; VAIDYA E WILLIAMS, 2012; ZHANG *et al.*, 2016).

PAI-1 e TAFI desempenham um papel fundamental em uma ampla gama de processos fisiológicos e patológicos, incluindo fibrinólise, coagulação e processos inflamatórios (XANTHAKIS *et al.*, 2014; LONGSTAFF E KOLEV, 2015; PLUG E MEIJERS, 2016). Além de seu papel na formação de trombos, estudos experimentais mostraram que aumento da expressão de PAI-1 no miocárdio contribui para remodelação ventricular, e desempenha um papel ativo na fibrose tecidual com inflamação prolongada (TAKESHITA *et al.*, 2004; ZAMAN *et al.*; 2009; GHOSH E VAUGHAN, 2012). Já níveis elevados de TAFI têm sido associados como fator de risco para DCV, incluindo doença arterial coronariana (DAC), infarto agudo do miocárdio (IAM) e trombose venosa, além da associação à inflamação (ZORIO *et al.*, 2003; SCHROEDER *et al.*, 2006; VERDÚ *et al.*, 2006, LIN *et al.*, 2011; KOMNENOV *et al.*, 2015).

O elevado risco de ocorrência de AVE e tromboembolismo sistêmico na FA está relacionado a diversos mecanismos, como estase sanguínea no átrio esquerdo, disfunção e lesão endotelial, hiperativação plaquetária e da coagulação, levando ao aumento na geração de trombina (GT) e, conseqüentemente, um estado de hipercoagulabilidade (SOHARA *et al.*, 1997; WATSON *et al.*, 2009). Portanto, uma das principais estratégias para o tratamento da FA em pacientes com risco de complicações tromboembólicas é a prevenção destes eventos por meio do uso de anticoagulantes orais, como a varfarina e a rivaroxabana (AHA/ACC, 2014). O trabalho conduzido por Duarte *et al.* (2020) mostrou uma diminuição da GT nos pacientes com FA tanto em uso de varfarina quanto rivaroxabana. Com base na avaliação de parâmetros do teste de GT, os autores concluíram que os pacientes com FA em uso de varfarina se mostraram mais hipocoaguláveis quando comparados aos pacientes em uso de rivaroxabana.

A varfarina tem sido o anticoagulante de escolha por décadas para a prevenção de eventos tromboembólicos em pacientes com FA. Devido a algumas dificuldades no seu manejo clínico, os anticoagulantes orais de ação direta (DOACs), como a rivaroxabana, estão sendo cada vez mais utilizados na prática clínica devido a perfis farmacológicos favoráveis (LEE, 2016). Uma meta-análise conduzida por Bai *et al.* (2017) mostrou que rivaroxabana é mais promissora na prevenção de eventos tromboembólicos e possui um risco similar a sangramentos quando comparada a varfarina em pacientes com FA. Além disso, a rivaroxabana faz parte da classe dos anticoagulantes orais inibidores do fator Xa, cujas evidências demonstram seu envolvimento com ação anti-inflamatória no remodelamento vascular, regressão de placa aterosclerótica e fibrose tecidual (SPRONK *et al.*, 2014; VAN GORP E SCHURGES, 2015). Diante do exposto, faz-se importante analisar o perfil inflamatório, oxidativo e de marcadores hemostáticos nos indivíduos com FA em uso de varfarina e rivaroxabana.

Tendo em vista o elevado risco de desenvolvimento de AVE e tromboembolismo nos pacientes com FA e a importância de fatores como: processo inflamatório, estresse oxidativo e alterações do sistema fibrinolítico no desenvolvimento destas complicações, torna-se pertinente a busca por um maior entendimento sobre a fisiopatologia desta arritmia, bem como a necessidade de aprimoramento constante dos esquemas

terapêuticos. Deste modo, este estudo se justifica pela possibilidade de preencher esta lacuna no entendimento da FA e seu tratamento.

Além disso, vale ressaltar que estudos avaliando biomarcadores na patologia da FA na população brasileira são escassos na literatura. Trabalhos como os de Duarte *et al.* (2020) e Martins *et al.* (2020), conduzidos pelo nosso grupo de pesquisa, relacionaram diferentes biomarcadores à aspectos da FA na população brasileira. Diante disso, o presente estudo também se propõe a dar continuidade ao trabalho abordado na população brasileira com finalidade de inter-relacionar novos biomarcadores, o que se justifica pela escassez de estudos com esse foco em nível mundial e particularmente no Brasil.

Diante do exposto, surgiram algumas indagações que nortearam esse estudo, a saber:

- Marcadores inflamatórios, de estresse oxidativo (dentre eles, os níveis de Hp e vitamina D) e do sistema fibrinolítico estão alterados em pacientes com FA, sob tratamento, quando comparados a um grupo controle?
- Diferentes anticoagulantes orais podem interferir na resposta inflamatória de indivíduos com FA? Algum apresenta efeito mais favorável?
- Há diferença na frequência do polimorfismo Hp1-Hp2 no gene da Hp em pacientes com FA em relação aos participantes sem FA?
- Como os alelos e os genótipos deste polimorfismo influenciam os níveis da Hp nos grupos estudados?

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Fibrilação Atrial

FA é uma das arritmias cardíacas mais comumente encontradas na prática clínica, sendo relacionada a elevada morbi/mortalidade cardiovascular. O risco elevado de ocorrência de tromboembolismo sistêmico e AVE associados a FA é de 4,9% em pacientes na faixa etária de 50 a 59 anos, aumentando para 20,2% em pacientes com 80 a 89 anos de idade (NORGARD *et al.*, 2012; LIP E LANE, 2015). De acordo com vários estudos, a prevalência de FA na população é bastante heterogênea, sendo de 0,2% na China (GUO *et al.*, 2015), 3,0% em Israel (HAIM *et al.*, 2015), 4,4% na Espanha (GÓMES-DOUBLAS *et al.*, 2014) e 1,7% nos Estados Unidos (COLLILA *et al.*, 2013). Um estudo conduzido por Moraes *et al.* (2019) estimou a prevalência de FA em 2,2% na população brasileira, com uma maior prevalência no sexo masculino e aumentando conforme o avanço da idade, sendo 35% dos portadores da arritmia com pelo menos 80 anos.

Essa doença aumenta em três vezes o risco de IC, cinco vezes o risco de AVE e duas vezes a mortalidade, que é de 25% ao ano, ajustada por idade e sexo (AHA/ACC, 2014). Esse risco aumentado de mortalidade é parcialmente causado por AVE ou tromboembolismo sistêmico, que são atualmente a quinta principal causa de morte nos EUA e a segunda no mundo (IWASAKI *et al.*, 2011; FEIGIN *et al.*, 2017). Essas complicações fatais ou incapacitantes levam à qualidade de vida prejudicada e custos mais elevados de assistência médica em pacientes com FA. O trabalho intitulado: “Os Custos das Doenças Cardíacas no Brasil” publicado pela Sociedade Brasileira de Cardiologia em 2018, mostra que a FA acarretou um custo financeiro cerca de 3,9 milhões de reais no Brasil (STEVENS *et al.*, 2018).

A FA pode ser uma arritmia isolada, entretanto existem alguns fatores que a predispõe como infarto do miocárdio (IM), IC, doença valvar cardíaca, cirurgias e processos inflamatórios cardíacos, doenças metabólicas, hipertensão arterial, obesidade e alterações atriais fibróticas associadas ao envelhecimento (MONTERA *et al.*, 2009). Fatores como: variantes genéticas, tabagismo, consumo de álcool, idade e inflamação também podem aumentar o risco de FA (WAKILI *et al.*, 2011; HEIJMAN *et al.*, 2016). Além disso, a FA pode apresentar causas reversíveis, provocadas durante

situações transitórias, como após ingestão de álcool, cirurgias, IM, hipertireoidismo e outras doenças metabólicas (JANUARY *et al.*, 2014; VILCHEZ *et al.*, 2014).

O diagnóstico da FA é dado de forma simples e de fácil percepção por meio de eletrocardiograma (ECG). No entanto, além do ECG, podem ser realizados o exame clínico, a radiografia de tórax e o ecocardiograma para confirmação diagnóstica da arritmia (MAGALHÃES *et al.*, 2016). A FA pode apresentar-se assintomática durante períodos de duração desconhecida, porém, dentre as suas manifestações clínicas, destaca-se a sensação de palpitações. Podem ocorrer, também, fenômenos tromboembólicos, como AVE, e o desenvolvimento de IC, que consistem nas suas principais complicações e estão associadas a um aumento na morbi/mortalidade observadas nesta arritmia (MAGALHÃES *et al.*, 2016).

Segundo a diretriz da Sociedade Europeia de Cardiologia 2020, a FA é tradicionalmente classificada em cinco padrões de acordo com a apresentação, duração e término dos episódios de FA: 1) Primeiro diagnóstico: FA não diagnosticada antes, independentemente de sua duração ou da presença/gravidade de sintomas relacionados à FA; 2) Paroxística: FA que termina espontaneamente ou com intervenção em até sete dias do início dos episódios; 3) Persistente: FA sustentada continuamente por mais de sete dias, só interrompida por cardioversão (CV) (medicamentos ou cardioversão elétrica); 4) Persistente de longa duração: FA contínua com duração superior a 12 meses com necessidade de adotar uma estratégia de controle do ritmo; 5) Permanente: FA em que não são realizadas mais tentativas de restauração/manutenção do ritmo sinusal (HINDRICKS *et al.*, 2020).

Além da classificação acima, também é utilizada a classificação em relação ao início do episódio da FA (inferior ou superior a 48 horas). A FA com duração inferior a 48 horas é aquela cujo início pode ser identificado por registro eletrocardiográfico ou história clínica. Entretanto, quando não é possível definir precisamente o início do episódio, a FA será considerada, por segurança, como de duração superior a 48 horas. Esta classificação possui grande importância clínica, uma vez que o risco de tromboembolismo sistêmico relacionado à CV (elétrica, química ou espontânea) é significativamente menor até 48 horas do início de um episódio de FA (AHA/ACC, 2014).

O desenvolvimento da FA envolve atividade ectópica (fator desencadeador/gatilho) e substrato de reentrada do impulso elétrico (WORKMAN *et al.*,

2008; HEIJMAN *et al.*, 2014). Ectopias originadas em regiões atriais ou veias pulmonares levam a mudanças no período refratário atrial e na velocidade da condução do impulso. Esse fenômeno é conhecido como remodelamento atrial e é fundamental para o desencadeamento da FA (WAKILI *et al.*, 2011). Quando a atividade ectópica acontece repetidamente e em alta frequência, inicia-se a reinserção do impulso elétrico. O quadro de reinserção é o principal mecanismo de manutenção da FA em um substrato vulnerável caracterizado por anormalidades elétricas, autonômicas, de manipulação dos canais de cálcio e na estrutura dos miócitos, culminando em um remodelamento elétrico e estrutural do átrio (ANDRADE *et al.*, 2014; HEIJMAN *et al.*, 2014). O substrato que mantém a FA pode se originar por: anomalias genéticas do miócito atrial, que facilitam o surgimento da arritmia em certas condições (como na FA de causa familiar ou secundária); por uma doença cardíaca (como por exemplo a hipertensão arterial, IC); ou ser secundária a ectopias de gatilho, descritas anteriormente (KOURLIOUROS *et al.*, 2009; WAKILI *et al.*, 2011; CAMM *et al.*, 2012).

A fibrose no tecido atrial é uma causa importante no quadro de reentrada do impulso elétrico, promovendo bloqueio de condução, condução lenta e heterogênea (BURSTEIN E NATTEL, 2008). Além disso, o encurtamento do período refratário devido a remodelação elétrica e ao aumento do átrio também suportam o quadro de reentrada, aumentando o espaço disponível para os circuitos elétricos reentrantes (ANDRADE *et al.*, 2014). Fatores de risco como diabetes, hipertensão, apneia do sono, obesidade, estresse emocional ou físico, podem ao longo dos anos modificar a estrutura dos átrios e quando um fator desestabilizador surge, atua sobre tal substrato e desencadeia a FA (MENEZES *et al.*, 2013). Nas formas mais avançadas de FA, a atividade elétrica se torna cada vez mais complexa com vários circuitos de reentrada simultâneos e focos ectópicos. Qualquer alteração persistente na função e/ou estrutura dos átrios constitui remodelação atrial elétrica e estrutural que promovem a ocorrência e/ou manutenção da FA (SCOTT *et al.*, 2019).

As principais estratégias de tratamento da FA incluem a melhora dos sintomas (pelo controle do ritmo sinusal ou da frequência cardíaca) e a prevenção tanto de recorrências, quanto de fenômenos tromboembólicos (SIMÃO *et al.*; 2013). Destaca-se que as medidas terapêuticas para controlar a frequência cardíaca (reversão espontânea, uso de cardioversão elétrica, ablação por cateter, ou tratamento farmacológico utilizando-se medicamentos antiarrítmicos) devem ser selecionadas de

acordo com a situação clínica individual de cada paciente (ZIMERMAN *et al.*, 2009; MAGALHÃES *et al.*, 2016).

Uma vez que a FA é considerada uma importante fonte de formação de trombos de origem cardíaca e fator de risco para o AVE, a prevenção ao tromboembolismo sistêmico destaca-se na conduta do paciente com FA. Com base nisso, a terapia medicamentosa com anticoagulante oral é indicada para os pacientes com FA que apresentam risco elevado de desenvolverem fenômenos tromboembólicos.

2.2 Terapia antitrombótica na fibrilação atrial

A terapia com anticoagulantes orais, seja utilizando a varfarina ou os DOACs como a rivaroxabana, é recomendada pela Sociedade Brasileira de Cardiologia para a prevenção primária e secundária de eventos tromboembólicos em pacientes com FA (MAGALHÃES *et al.*, 2016). O CHA₂DS₂-VASc [*Congestive heart failure, Hypertension, Age ≥75 (doubled), Diabetes, Stroke (doubled)*], uma escala que prediz o risco de eventos tromboembólicos em pacientes com FA, é atualmente considerado a principal ferramenta no manejo da terapia de anticoagulação (VITALI *et al.*, 2019). De acordo com esta escala (Quadro 1), atribui-se um ponto para a presença de IC, hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes mellitus (DM), doença vascular (história de IM ou doença arterial periférica), idade entre 65 e 74 anos e sexo feminino, e dois pontos para idade igual ou superior a 75 anos, e ocorrência de AVE ou ataque isquêmico transitório (AIT). Pacientes cuja pontuação for igual a zero (risco muito baixo) não necessitam de anticoagulação, e com CHA₂DS₂-VASc igual a um (risco baixo), a terapia antitrombótica é opcional. No entanto, para aqueles pacientes cuja pontuação for igual ou superior a dois, as Diretrizes Brasileiras de Fibrilação Atrial recomendam a terapia com anticoagulantes orais (MAGALHÃES *et al.*, 2016). Pela alta consistência na estimativa do risco de tromboembolismo, essa escala foi estudada em diferentes contextos e não apenas em pacientes com FA (GUERRA *et al.*, 2018).

Quadro 1. Escala de CHA₂DS₂-VASc utilizada para avaliação do risco tromboembólico em pacientes com fibrilação atrial (MAGALHÃES *et al.*, 2016).

Siglas	Parâmetros	Pontuação
C	Insuficiência cardíaca (IC/disfunção ventricular esquerda)	1
H	Hipertensão (HAS)	1
A ₂	Idade ≥ 75 anos	2
D	Diabetes Mellitus	1
S ₂	AVE/Ataque isquêmico transitório/Tromboembolismo	2
V	Doença vascular (Infarto agudo do miocárdio, doença arterial periférica ou placa de ateroma na aorta)	1
A	Idade entre 65-74 anos	1
Sc	Gênero feminino	1

Abreviaturas: IC = Insuficiência cardíaca; HAS = Hipertensão arterial sistêmica; AVE = Acidente vascular encefálico

Por várias décadas, a varfarina foi o anticoagulante oral mais comumente utilizado na prática clínica, apresentando resultados satisfatórios na prevenção de AVE e eventos tromboembólicos em pacientes com FA. As propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas da varfarina são complexas, além de possuir uma estreita janela terapêutica, por isso, para o manejo do tratamento anticoagulante é imprescindível que seja realizado o monitoramento laboratorial, evitando a superdosagem, que aumenta o risco de sangramento ou a subdosagem, que pode aumentar o risco de eventos tromboembólicos. Além disso, fatores genéticos, idade e interação com alimentos e inúmeros medicamentos interferem na resposta do paciente a este medicamento. Considerando as dificuldades impostas para ajustar e monitorar as doses de varfarina, e as diversas interações com medicamentos que interferem na resposta do paciente, surgiu a necessidade de desenvolver pesquisas envolvendo novos anticoagulantes orais que na prática clínica seriam de mais fácil controle (AGENO *et al.*, 2012; COHEN *et al.*, 2015).

Em 2011 foi aprovada a rivaroxabana, um DOAC com indicação para o tratamento e prevenção de embolia pulmonar (EP) e trombose venosa profunda (TVP) recorrentes em adultos (PATEL *et al.*, 2011). Sua utilização clínica é cada vez mais frequente na prevenção desses eventos trombóticos em pacientes com FA devido ao seu padrão de dosagem [20 mg em pacientes com clearance de creatinina (ClCr) maior ou igual a 50 mL/min, ou de 15 mg em pacientes com a função renal alterada (ClCr

entre 15 e 49 mL/min)], ao perfil farmacológico favorável, sem a necessidade de se realizar um monitoramento de rotina ou o ajuste de doses (CAMM *et al.*, 2016; LEE, 2016). Estudos observacionais mostram uma maior taxa de aderência ao tratamento anticoagulante com rivaroxabana quando comparado ao tratamento com varfarina em pacientes com FA não valvar (NELSON *et al.*, 2015; MARTINEZ *et al.*, 2016; BEYER-WESTENDORF *et al.*, 2016).

A rivaroxabana é um inibidor competitivo e reversível (constante inibitória [Ki], 0,4 nmol/L) do FXa), aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para prevenção de eventos tromboembólicos em pacientes com FA não valvar (PATEL *et al.*, 2011). O fármaco possui biodisponibilidade de 80-100% e é absorvido rapidamente, atingindo o pico de concentração plasmática após 2-4 horas da administração por via oral. FXa representa o ponto de convergência das vias extrínsecas e intrínsecas da cascata de coagulação e converte a protrombina em trombina (KIKUCHI *et al.*, 2019). Evidências na literatura mostram efeito benéfico da inibição do FXa nas complicações cardiovasculares da FA. O estudo clínico intitulado “*Daily oral factor Xa inhibition of rivaroxaban compared to vitamin K antagonism in the prevention of stroke and embolism in atrial fibrillation*” (ensaio ROCKET) mostrou que a taxa de IM tende a ser menor em pacientes com FA que receberam rivaroxabana quando comparados aos pacientes que receberam varfarina (PATEL *et al.*, 2011). Kondo *et al.* (2018) demonstraram que fibrose inflamatória do átrio esquerdo e vulnerabilidade a FA foram atenuadas pelo uso da rivaroxabana, sugerindo que a inibição de FXa provavelmente tem um efeito cardioprotetor contra o remodelamento atrial.

A inibição de FXa também pode estar associada a um melhor equilíbrio entre os perfis de eficácia e segurança em comparação a outros inibidores das vias de coagulação (TANTRY *et al.*, 2020). Russo-Alvarez *et al.* (2018) avaliaram a efetividade e segurança de rivaroxabana versus varfarina e mostraram que ambos os fármacos são igualmente eficazes e seguros no tratamento da FA não valvar, mesmo em pacientes com controle terapêutico abaixo do ideal. Já Bai *et al.* (2017) encontraram que rivaroxabana foi superior a varfarina na prevenção de eventos tromboembólicos na FA, e foi associada com taxas similares de sangramentos.

Apesar da importância dos anticoagulantes na prevenção de eventos tromboembólicos, o estudo de Moraes *et al.* (2019) mostra uma subutilização dos

anticoagulantes orais em pacientes com FA na população brasileira. Dentre os pacientes entrevistados, 62,8% apresentavam alto risco de AVE e apenas 14,8% eram usuários regulares de anticoagulação oral. Outros trabalhos corroboram com estes resultados, estimando o uso de anticoagulantes em cerca de 30% em média em populações diversas (KIRCHHOF *et al.*, 2014; OLDGREN *et al.*, 2014; HAIM *et al.*, 2015; MAIRESSE *et al.*, 2017). Com base no pressuposto, é relevante destacar a importância do rastreamento da FA no contexto da atenção primária para identificar lacunas no tratamento da arritmia.

2.3 Inflamação

Como a fisiopatologia da FA ainda não está totalmente definida, evidências sugerem que a ocorrência e persistência da FA, além de eventos tromboembólicos dessa patologia, estão relacionadas ao remodelamento estrutural dos átrios, fibrose atrial e tem sido associada a processos inflamatórios (HARADA *et al.*, 2015). Por isso, estudos têm investigado mecanismos subjacentes ainda pouco conhecidos como inflamação e estresse oxidativo na FA (CHUNG *et al.*, 2001; SATA *et al.*, 2004; ZAKKAR *et al.*, 2015; BAS *et al.*, 2017; KARAM *et al.*, 2017; NAM *et al.*, 2017; ZHENG *et al.*, 2019).

A inflamação é um processo biológico essencial que os mamíferos utilizam para resolver as lesões, a fim de manter uma homeostase (KAO *et al.*, 2010; HUNTER, 2012). A resposta inflamatória inicial representa um mecanismo de proteção e pode ser autolimitada, progredindo para resolução completa. A resolução da inflamação é um processo ativo e contínuo, que envolve a produção e ativação de diferentes mediadores bioquímicos e vias de sinalização para garantir a restauração rápida e bem-sucedida da homeostase tecidual (ALESSANDRI *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2013). No entanto, a inflamação descontrolada pode contribuir para a fisiopatologia de várias doenças. Para facilitar o processo inflamatório, a vasculatura local é envolvida em sinais e fatores bioativos, como citocinas e quimiocinas, que promovem o recrutamento de células imunes inatas, que se coordenam para interceptar, limitar e neutralizar a ameaça alvo. Caso a inflamação aguda persista além da remoção da ameaça original, a resposta inflamatória pode transitar para um estado mais instável, conhecido como inflamação sistêmica crônica (SCOTT *et al.*, 2019). As citocinas pró-inflamatórias são biomarcadores bem reconhecidos e associados à prevalência e ao prognóstico da FA

(HARADA *et al.*, 2015). A análise de biomarcadores inflamatórios tornou-se uma importante área de pesquisa em FA, com o intuito de se ter maior exatidão na avaliação de risco de FA em pacientes com e sem histórico da arritmia (HIJAZI *et al.*, 2016; JABATI *et al.*, 2018).

Muitas condições e fatores de risco cardiovasculares associados a FA envolvem também a inflamação. Condições clínicas como: obesidade, DM, HAS, IC, DAC, síndrome metabólica e estilo de vida sedentário, são associadas a um estado inflamatório e identificadas como fatores de risco para FA (ANDRADE *et al.*, 2014; HU *et al.*, 2015; MOZAFFARIAN *et al.*, 2016). No DM, por exemplo, há um aumento no risco de desenvolvimento de FA em 40% e estima-se que 2,5% dos pacientes com FA possuem diabetes (MOZAFFARIAN *et al.*, 2016). Os pacientes com DM apresentam um aumento de marcadores inflamatórios, tais como IL-6 e TNF, e de biomarcadores pró-coagulantes como o PAI-1 (DOMINGUETI *et al.*, 2016). Um estudo histológico mostrou que mesmo em pacientes com a chamada “FA solitária” (sem fatores de risco pré-existentes), a infiltração inflamatória atrial local compatível com miocardites estava presente em 2/3 dos indivíduos afetados (FRUSTACI *et al.*, 1997). Além disso, alguns estudos indicaram a associação de distúrbios autoimunes, principalmente artrite reumatoide, e FA comprovando o papel da inflamação crônica na gênese da arritmia atrial (LINDHARDSEN *et al.*, 2012; BAEK *et al.*, 2016; LAZZERINI *et al.*, 2017). Uma outra forma de relacionar o estado inflamatório com uma pré-disposição a FA é evidenciada por condições tais como: pericardite, pós-operatório de cirurgias cardíacas e miocardites (GUO *et al.*, 2012).

O processo de inflamação e FA são igualmente complexos. Inflamação sistêmica ou local resulta em FA, e esta, por sua vez, promove inflamação, levando a um ciclo vicioso (SILVA, 2017). A inflamação induz remodelamento estrutural e elétrico, por meio de mecanismos que incluem fibrose atrial, modulação de junções *gap* e anormalidades intracelulares nos canais de cálcio. Tais anormalidades aumentam a atividade atrial e diminuem a condução atrial, prejudicando a propagação do impulso atrial e promovendo a reentrada do impulso elétrico, o que acarretaria FA (LAZZERINI *et al.*, 2017). Em contrapartida, FA induz uma resposta inflamatória por mecanismos ainda não bem esclarecidos, perpetuando a arritmia (HU *et al.*, 2015). Níveis elevados de marcadores inflamatórios na circulação já foram associados ao desenvolvimento, recorrência e perpetuação de FA e complicações tromboembólicas (KORANTZOPOULOS *et al.*,

2003; HU *et al.*, 2015). Evidências demonstram que marcadores inflamatórios como IL-6, IL-1, mieloperoxidase (MPO) e TNF correlacionam-se positivamente com a progressão da FA de paroxística para a forma FA persistente (QU *et al.*, 2009; LUAN *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2013). Nesse contexto, diferentes biomarcadores de inflamação têm sido usados para prever tanto pacientes em risco de ocorrência da FA, quanto eventos cardiovasculares naqueles com FA existente, como IM, AVE por embolia, bem como a mortalidade (AULIN *et al.*, 2015; HU *et al.*, 2015; GUO *et al.*, 2015; WU *et al.*, 2015; HIJAZI *et al.*, 2016).

As interleucinas (IL) representam importantes mediadores inflamatórios implicados na FA. Acredita-se que as interleucinas sejam capazes de modular a função cardiovascular por uma variedade de mecanismos, incluindo promoção do remodelamento do ventrículo esquerdo, indução de disfunção contrátil e alteração da resposta dos receptores β -adrenérgicos do miocárdio (ZAKKAR *et al.*, 2015; HU *et al.*, 2015). A IL-6, especificamente, tem sido associada com recorrência de FA após CV e ablação, além de aumento do diâmetro atrial esquerdo (PSYCHARI *et al.*, 2005; AULIN *et al.*, 2015; HU *et al.*, 2015; JIANG *et al.*, 2017). A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória que estimula a síntese de proteínas de fase aguda e é um potente regulador do metabolismo extracelular de proteínas por meio da ativação das metaloproteinases da matriz extracelular e deposição de colágeno, que podem induzir fibrose e resultar na arritmia atrial (DE GENNARO *et al.*, 2012). Smit *et al.* (2012) observaram que a recorrência precoce de FA está associada a elevados níveis de IL-6.

Estudos investigando o papel da citocina IFN- γ e IL-10 no desenvolvimento de FA demonstram que pacientes com FA ou FA pós-operatório possuem maiores níveis destes marcadores inflamatórios (LI *et al.*, 2010; CABRERA-BUENO *et al.*, 2015). Wu *et al.* (2016) avaliaram a associação do potencial inflamatório com o aumento do risco de FA, e observaram que os níveis de todas as citocinas examinadas, incluindo IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, IFN- γ , IL-9, IL-6, foram maiores em pacientes com FA quando comparados ao grupo controle. Várias células imunes podem desempenhar papéis críticos na patogênese da FA. No entanto, quais células inflamatórias específicas e suas citocinas relacionadas contribuem para o desenvolvimento de FA ainda permanece incerto. Além disso, estudos clínicos têm mostrado que terapia anti-inflamatória com o uso de medicamentos, como estatinas e corticosteroides, tem sido prescrita para reduzir tanto o risco de FA como a incidência de FA pós-operatória

seguida de cirurgia cardíaca (LIU *et al.*, 2005; RAITEN *et al.*, 2015; REZAEI 2016). Já em ensaios com animais, opções anti-inflamatórias como a colchicina (uma droga delopimerizante de microtúbulos com efeitos antiinflamatórios), o metotrexato de baixa dose (um agente anticâncer com pronunciadas propriedades anti-inflamatórias) e uma variedade de inibidores do fator nuclear kappa beta (NFK β), podem ter efeito anti-FA, modulando os determinantes celulares da atividade ectópica e/ou direcionando os determinantes do substrato de reentrada do impulso elétrico (HAMMERS *et al.*, 2016; MARTINEZ *et al.*, 2016; LENNERZ *et al.*, 2017; YAO *et al.*, 2018; GREBE *et al.*, 2018; BUCKLEY E ABBATE, 2018).

2.3.1 Fator da coagulação X ativado versus Inflamação

Estudos têm mostrado o envolvimento do FXa com a inflamação, remodelamento vascular, progressão de placa aterosclerótica e fibrose tecidual (BUSCH *et al.*, 2005; BORENSZTAJN *et al.*, 2008; SPRONK *et al.*, 2014). Relatos na literatura mostram que FXa aumenta a secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6, IL-8 e MCP-1 (BORENSZTAJN *et al.*, 2008; BUKOWSKA *et al.*, 2013). Contrariamente, o estudo realizado por Kikuchi *et al.* (2019) avaliou os efeitos anti-inflamatórios do inibidor do FXa rivaroxabana versus dabigatrana em pacientes com FA não valvar, e não encontrou diferenças significativas em nenhum dos marcadores usados no estudo (PCR, IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF).

Segundo Bauersachs e Zannade (2018), a ação inibitória do FXa pela rivaroxabana possui uma função de via dupla, pois além de inibir a geração de trombina, tem demonstrado atividade favorável complementar, como efeitos anti-inflamatórios (Figura 1). Os autores relatam que há uma elevação do potencial terapêutico reconhecido nessa dupla ação inibitória do FXa, por meio da combinação de terapia antiplaquetária com anticoagulação na prevenção de eventos aterotrombóticos. Estudos clínicos em pacientes com diversas complicações cardiovasculares demonstram a ação inibitória da rivaroxabana, tanto na via de ativação plaquetária, quanto na via da coagulação, indicando que a rivaroxabana pode ter um efeito sinérgico em combinação, levando à potencialização do efeito antitrombótico. O tratamento com rivaroxabana em diferentes doses reduziu significativamente mortes por cardioversão aterosclerótica, IM e AVE, quando usadas na terapia de base (AAS ou clopidogrel) em

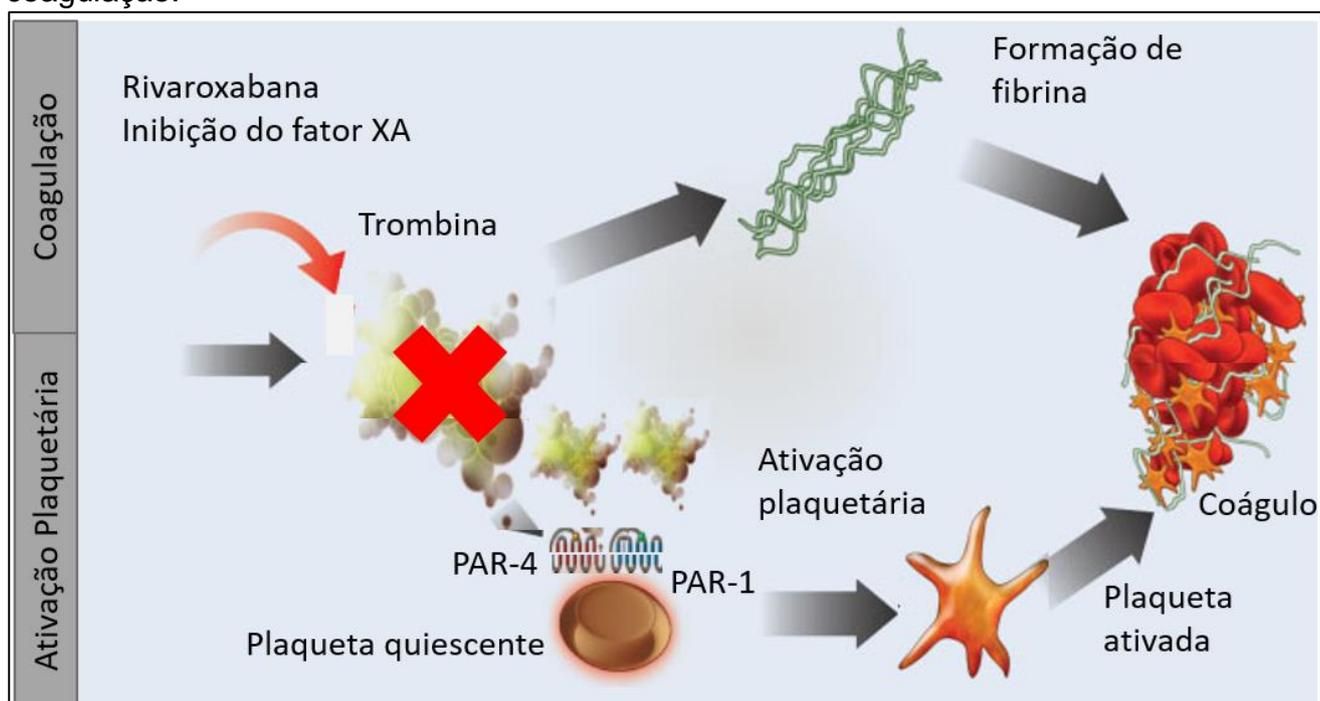
pacientes com síndrome coronariana aguda (SCA) (MEGA *et al.*, 2009; 2012; 2013; GIBSON *et al.*, 2013; CAVENDER *et al.*, 2015; BONACA *et al.*, 2016).

Um possível mecanismo da ação anti-inflamatória exercida pela rivaroxabana relaciona-se com a via de sinalização de receptores ativados por proteases (*proteinase-activated receptor*, PAR). A família PAR é constituída por receptores acoplados a proteína G responsáveis pela transdução de sinal de uma variedade de proteases, incluindo enzimas da coagulação, como a trombina. Compreendem quatro membros (PAR1 – PAR4) com um mecanismo de ativação baseado em clivagem proteolítica (BORGES, 2008; BORENSZTAJN *et al.*, 2011). A serinoprotease trombina, além da ação pró-coagulante, é um forte estimulador plaquetário. A membrana das plaquetas é revestida por uma variedade de receptores, incluindo os receptores da família PAR. A trombina age clivando o domínio externo de PAR, especificamente PAR-1 e PAR-4, para iniciar a sinalização transmembrana que amplifica o recrutamento de plaquetas, medeia a adesão e agregação no local da lesão (Figura 1) (COUGHLIN, 2000; LAWRENCE E LEUNG, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Há relatos que a clivagem PAR-1 e PAR-2 dependente de FXa pode desempenhar um papel no contexto inflamatório que culminaria na fibrose e remodelação tecidual (PAWLINSKI *et al.*, 2007; ANTONIAK *et al.*, 2013). A inibição do FXa teria um efeito anti-inflamatório por inibir a ativação de PAR-1 e PAR-2. De fato, a superexpressão de PAR-2 induz hipertrofia cardíaca em camundongos. Camundongos *knockout* PAR-2, após indução de IM, têm o remodelamento cardíaco inibido (ANTONIAK *et al.*, 2013). Portanto, FXa interage com PAR-1 e PAR-2 para induzir sinalização inflamatória e remodelamento vascular (VAN GORP *et al.*, 2015; YAO *et al.*, 2017a).

Diante do exposto, a inibição do FXa da coagulação pode ter efeitos anti-inflamatórios e representar uma alternativa ao tratamento de reguladores inflamatórios específicos. Pacientes com FA não valvar tratados com inibidores do FXa demonstraram tanto redução da coagulação, quanto da inflamação, quando comparados aos controles (KATOH *et al.*, 2017). Portanto, o estudo aqui proposto pode contribuir para o entendimento dessa relação causal entre inflamação e FA, e se agentes com potencial anti-inflamatório, como a rivaroxabana, podem constituir uma nova abordagem terapêutica no tratamento de pacientes com a arritmia.

Figura 1. Ação dupla da Rivaroxabana na ativação de plaquetas e na via da coagulação.



FXa promove a clivagem de protrombina em trombina, e promove ativação de plaquetas. Tanto trombina quanto plaquetas atuam na formação do coágulo. Fonte: Angiolillo *et al.*, 2010; Bauersachs e Zannad, 2018. Adaptado por Costa, 2022.

2.4 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é resultante do desequilíbrio entre a concentração de EROs e a capacidade antioxidante do organismo. As espécies reativas constituem três classes de compostos: as EROs, espécies reativas de enxofre (EREs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs). As espécies reativas podem ainda ser didaticamente divididas em dois grupos: os radicais livres e os compostos não radicalares. Os radicais livres são átomos ou moléculas que possuem pelo menos um elétron desemparelhado em seus orbitais externos. Isso permite a transferência de elétrons com moléculas vizinhas, podendo agir como aceptores ou doadores de elétrons, criando alterações no ambiente molecular ao seu redor. Já os compostos não radicalares, não possuem elétrons livres, sendo, portanto, menos instáveis que os radicais livres, mas também podem reagir com moléculas próximas (MAGDER, 2006; CAROCHO E FERREIRA, 2013; MARTELLI E NUNES, 2014).

Entre todas as espécies reativas geradas em organismos vivos, as EROs representam a classe mais importante (VALKO *et al.*, 2007). EROs é uma denominação usada para todas as espécies reativas que contêm oxigênio e, em condições

fisiológicas, atuam como oxidantes em reações não enzimáticas (GASPAVORA *et al.*, 2017). As EROs são um produto do estresse oxidativo celular derivadas de várias fontes, incluindo mitocôndrias, xantina oxidase, óxido nítrico sintase e a nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase (NADPH oxidase) (HUANG *et al.*, 2019). Aumento da emissão de EROs foi observada em mitocôndrias isoladas de tecidos atriais de pacientes diabéticos (DUICU *et al.*, 2016) e modelos animais (ZHENG *et al.*, 2017). Várias mudanças fisiopatológicas associadas a EROs são consequências de alterações associadas ao DNA mitocondrial e ao perfil transcricional de alguns genes, aumentando atividade de enzimas, tais como a NADPH oxidase, xantina oxidase, processos inflamatórios, ativação do sistema renina-angiotensina, entre outros (GASPAVORA *et al.*, 2017).

As EROs são consideradas intermediários ativos da molécula de oxigênio que são energeticamente mais reativas que o próprio oxigênio molecular, ou seja, são compostos que têm mais facilidade em reagir com outras substâncias, podendo gerar uma cascata de reações. As formas mais comuns de EROs encontradas nas células são: radicais superóxidos (O_2^-), radicais hidroxilas (OH^\cdot) e radicais peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MONCADA E HIGGS, 2006; LAMBETH E NEISH, 2014). O radical OH^\cdot , derivado do H_2O_2 , é a mais reativa das EROs podendo reagir potencialmente com todas as moléculas biológicas como DNA, proteínas, lipídeos e praticamente qualquer componente celular (WAGNER *et al.*, 2004; BIENERT *et al.*, 2007). Como as células não possuem mecanismos enzimáticos para eliminar essas espécies altamente reativas, seu acúmulo pode levar à morte celular. As EROs são formadas sempre pelo escape inevitável de elétrons do O_2 das reações de transporte de elétrons nos cloroplastos, mitocôndrias e membranas plasmáticas ou como um subproduto de vários processos metabólicos localizados em diferentes compartimentos celulares (DEL RÍO *et al.*, 2006; BLOKHINA E FAGERSTEDT, 2010; HEYNO *et al.*, 2011).

O aumento da oxidação resulta em disfunção celular, necrose, apoptose e alterações nas proteínas celulares e vias de sinalização (HUANG *et al.*, 2009). Outra importante consequência do aumento da oxidação no organismo é a degradação oxidativa dos lipídios, chamada de peroxidação lipídica. O H_2O_2 é um oxidante capaz de iniciar a reação em cadeia da peroxidação lipídica, um processo pelo qual as EROs atacam os ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídeos de membrana das células, desintegrando-as e permitindo assim a entrada dessas espécies nas estruturas

intracelulares (SONG *et al.*, 2006). Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos como o malondialdeído (MDA), culminando com a morte celular (HERSHKO, 1998). Devido à curta meia-vida das EROs, a alternativa para avaliar o potencial de oxidação tem sido a determinação de marcadores estáveis na circulação que refletem o estresse oxidativo celular e sistêmico. Alguns exemplos são: marcadores de peroxidação lipídica, fosfolipídeos oxidados, MDA, MPO e nitrotirosina (MAYANE, 2003; VINCENT *et al.*, 2007).

Um acúmulo de evidências na literatura indica que o estresse oxidativo tem um papel importante na FA (KIM *et al.*, 2005; ELAHI *et al.*, 2008; SOVARI E DUDLEY, 2012; BAS *et al.*, 2017; GASPAVORA *et al.*, 2017). No tecido do miocárdio, o aumento dos níveis de EROs, tais como O_2^- e H_2O_2 , tem sido associado à FA (YOUN *et al.*, 2013). O estudo conduzido por Huang *et al.* (2019) mostrou que os níveis de EROs foram significativamente maiores no grupo de pacientes com FA quando comparados ao grupo controle. O aumento do estresse oxidativo avaliado pelos potenciais redox da glutatona (GSH) foi fortemente associado com alto risco de prevalência e incidência de FA (TAHHAN *et al.*, 2017). Estudos também mostraram que o *status* oxidativo possui uma associação com o tamanho do átrio esquerdo em pacientes com FA (TOUSOULIS *et al.*, 2008; GHASEMZADEH *et al.*, 2014). Além disso, tem sido sugerido que anticoagulantes orais que inibem diretamente o FXa, como a rivaroxabana, podem inibir a produção de EROS e, conseqüentemente, reduzir o estresse oxidativo (Woźniak *et al.*, 2020).

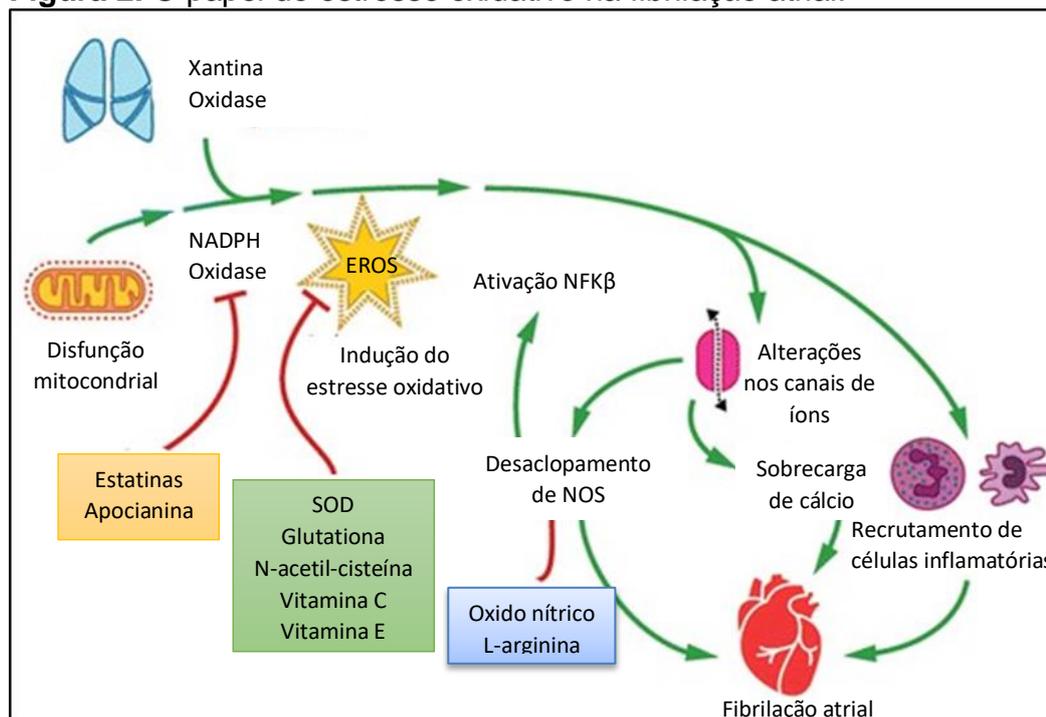
A relação entre estresse oxidativo e FA está embasada no processo de remodelamento elétrico atrial na patogênese da arritmia. O termo remodelamento elétrico do átrio, como já mencionado, é usado para se referir a mudanças afetando a excitabilidade e atividade elétrica dos miócitos cardíacos. Um passo a ser considerado no processo de remodelamento eletrofisiológico do átrio inclui anormalidades nos canais de cálcio dos miócitos e conseqüente sobrecarga de cálcio (GASPAVORA *et al.*, 2017). Segundo Ren *et al.* (2018), o estresse oxidativo induz danos no DNA mitocondrial, controla canais de cálcio levando a sobrecarga de cálcio intracelular que pode promover o remodelamento atrial na FA. Evidências antigas relatam que níveis elevados de cálcio intracelular (DOLMETSCH *et al.*, 1998) e EROs (KUNSCH *et al.*, 1999) foram identificados como principais ativadores da resposta imediata ao fator de

transcrição NFK β . O acúmulo de NFK β foi observado em tecido atrial de pacientes com FA, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*. (BUKOWSKA *et al.*, 2008). Tse *et al.* (2016) revelaram que o excesso de EROs está relacionado à patogênese da FA por afetar canais de íons e propagação do potencial de ação.

A inflamação é uma outra maneira de produzir marcadores de estresse oxidativo. Estudos mostram que o estresse oxidativo e a inflamação estão intimamente ligados, uma vez que a inflamação pode levar à produção de EROs, e EROs também pode promover a síntese de citocinas pró-inflamatórias (SCHINDHELM *et al.*, 2009; KHAPER *et al.*, 2010; MCDONALD *et al.*, 2014; GUTIERREZ E WAGONER, 2015). A íntima relação entre FA, estresse oxidativo e inflamação foi mostrada em estudos histológicos, onde o aumento de biomarcadores inflamatórios e do estresse oxidativo foi observado em tecido atrial de pacientes com FA (HUANG *et al.*, 2009). Resultado semelhante foi observado por Li *et al.* (2016) que encontraram níveis elevados dos marcadores PCR, IL-6, IL-8, TNF, MDA, e LDL oxidada nos pacientes com FA em relação ao grupo controle, sugerindo uma forte associação entre estresse oxidativo e inflamação na FA. A associação vista entre inflamação e estresse oxidativo na FA levou a produção de vários fármacos com propriedades anti-inflamatórias e antioxidante. A estatina é um exemplo de fármaco, amplamente administrado na redução de eventos cardiovasculares que, além da atividade anti-inflamatória, exibe atividade antioxidante, eliminando os radicais de oxigênio, reduzindo o colesterol e inibindo a oxidação do colesterol das lipoproteínas de baixa densidade (UMEJI *et al.*, 2006; YOUN *et al.*, 2013).

Sabe-se que o aumento de EROs por ativação enzimática e/ou disfunção mitocondrial pode levar a ativação das principais vias de sinalização inflamatória e fatores de transcrição, incluindo NFK β , o qual regula a transcrição de algumas citocinas inflamatórias como: TNF, IL-6, IL-8 e IL-1 (BAEUERLE E HENKEL, 1994), além de causar alteração na atividade dos canais iônicos. A diminuição dos níveis de óxido nítrico, por exemplo, pode levar a um aumento da atividade NFK β , resultando em variações inflamatórias e contribuindo para alterar atividade dos canais iônicos seguida por sobrecarga de cálcio (Figura 2). Todas essas alterações metabólicas, mediadas pelo estresse oxidativo, culminam no remodelamento elétrico do átrio e consequentemente na patologia da FA (KORANTZOPOULOS *et al.*, 2007; HUANG *et al.*, 2009; GASPAVORA *et al.*, 2017).

Figura 2. O papel do estresse oxidativo na fibrilação atrial.



Siglas: espécies reativas de oxigênio (EROS), NF-kappaB (fator de transcrição nuclear kappa beta), óxido nítrico sintase (NOS), fosfato de dinucleotídeo nicotinamida adenina (NADPH), superóxido dismutase (SOD). Linhas verdes representam a sequência de eventos oxidativos que contribuem para FA. Linhas vermelhas representam a situação inversa onde a FA já estabelecida pode ativar diferentes vias oxidativas levando ao aumento do estresse oxidativo. Fonte: Gasparova *et al.* 2017, adaptado por Costa, 2022.

2.5 Haptoglobina

A Hp é uma glicoproteína encontrada na fração alfa-1 do soro com capacidade de ligação à Hb intravascular liberada durante o processo de hemólise. Apesar de sua síntese primária ser hepática, a expressão do gene da Hp é observada em outros tecidos, incluindo pulmão, pele, rins e coração (KALMOVARIM *et al.*, 1991; FRIEDRICHS *et al.*, 1995; MCPHERSON, 1999). A produção da Hp é induzida por citocinas tais como, TNF, IL-6 e IL-1, por meio da ligação dessas citocinas aos sítios reguladores do promotor do gene da Hp (BERKOVA *et al.*, 1999; GABAY E KUSHENER 1999; NAKATA *et al.*, 2012). O fato da produção de Hp ser induzida por algumas citocinas inflamatórias sugere que os níveis séricos de Hp aumentam consideravelmente em processos inflamatórios (COSTACOU E LEVY 2012). Já em baixos níveis de Hp, a Hb livre incorporada ao ferro atua como agente oxidante na corrente sanguínea, favorecendo a produção de radicais livres (DALAN *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2021). Portanto, sabe-se que os níveis plasmáticos de Hp estão associados a muitas doenças que levam a processos inflamatórios e oxidativos,

incluindo doenças cardiovasculares, distúrbios autoimunes e diabetes (IRWIN *et al.*, 2015; DALAN *et al.*, 2016; Gurung *et al.*, 2019).

A Hp é uma glicoproteína que tem como principal função biológica sua ligação não covalente à Hb, para formar um complexo que será posteriormente eliminado pelo sistema reticuloendotelial, por meio da endocitose mediada pelo receptor CD163 encontrado na superfície de monócitos e macrófagos. Tal processo fisiológico impede o potencial dano oxidativo do ferro contido na molécula de hemoglobina (KRISTIANSEN *et al.*, 2001; ASLEH *et al.*, 2003; DALAN E LIUH 2018). Na ausência da Hp, a Hb livre incorporada ao ferro atua como um agente oxidante na corrente sanguínea favorecendo a produção de radicais livres, e, subsequentemente, a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL). O estímulo a peroxidação lipídica estabelece uma resposta imune e inflamatória, o qual pode levar a uma significativa lesão tecidual, um mecanismo precoce no desenvolvimento da arterosclerose (VIENER E LEVY 2011). Além disso, a Hb livre pode estar associada a danos renais ao fluir através dos glomérulos. Tais danos são evitados pela formação do complexo Hp-Hb, que é muito grande para ser filtrado no rim e, em vez disso, é reconhecido pelo receptor CD163 (LANGLOIS E DANLANGHE 1996; KRISTIANSEN *et al.*, 2001; COSTACOU E LEVY 2012). Portanto, a rápida depuração da Hb livre fez com que a Hp evoluísse como um mecanismo protetor muito importante para evitar os efeitos deletérios associados à circulação de Hb (LANGLOIS E DANLANGHE 1996).

A estrutura tetramérica da Hp é constituída por duas cadeias peptídicas alfas e duas cadeias peptídicas betas, que se ligam covalentemente por pontes dissulfeto. O gene *Hp* está localizado no braço longo do cromossomo 16 (16q22.2) e apresenta um polimorfismo comum caracterizado por dois alelos: Hp1 e Hp2 (SZAFRANEK *et al.*, 2002; GAST *et al.*, 2008; FARBISTEIN E LEVY 2010; ORCHARD *et al.*, 2013; BOETTGER *et al.*, 2016). O alelo Hp1 corresponde à forma contendo cinco exons e é conservado ao longo da espécie. Já o alelo Hp2 é específico do ser humano e apresenta sete exons que provavelmente surgiram de uma duplicação (cruzamento não homólogo) envolvendo os exons 3 e 4 do alelo Hp1 (YANG *et al.*, 2012). A cadeia peptídica alfa codificada pelo alelo Hp1 ($\alpha 1$ - 9 kDa) é menor do que a produzida pelo alelo Hp2 ($\alpha 2$ - 16-20 kDa). Portanto, a estequiometria da proteína Hp madura é dependente do genótipo: indivíduos Hp1-Hp1 produzem um único homodímero linear, Hp2-Hp2 produzem polímeros cíclicos e, em indivíduos heterozigotos, a proteína Hp

pode ser encontrada como homodímero linear e/ou multímeros (SZAFRANEK *et al.*, 2002; ASLEH *et al.*, 2008; FARBSTEIN E LEVY 2010).

Além das diferenças estruturais, os produtos proteicos Hp1 e Hp2 apresentam outras diferenças funcionais: a capacidade de se ligar a Hb, a capacidade de ligar o complexo Hp-Hb ao receptor CD163 e as taxas de liberação do complexo Hp-Hb da circulação são significativamente maiores em Hp1-Hp1 em comparação ao portador Hp2 (COSTACOU E LEVY 2012). A proteína Hp1-Hp1 apresenta maior capacidade de ligação à Hb e ao receptor CD163, apresentando maiores propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. Por outro lado, a proteína Hp2-Hp2 leva a um comprometimento funcional da depuração da Hb e menor atividade antioxidante (COSTACOU E LEVY 2012; ORCHARD *et al.*, 2013). Estudos mostraram que a proteína Hp1-Hp1 é mais eficiente que a proteína Hp2-Hp2 na prevenção da oxidação causada pelo ferro heme e é internalizada e removida da circulação mais rapidamente, com meias-vidas de aproximadamente 20 minutos e 50 minutos para Hp1-Hp1-Hb e Hp2-Hp2-Hb, respectivamente (ASLEH *et al.*, 2003; 2008).

Devido às diferenças marcantes nas propriedades das proteínas Hp1 e Hp2, vários estudos têm investigado o impacto dos fenótipos da Hp no risco de doenças cardiovasculares (DELANGHE *et al.*, 1999; ROGUIN *et al.*, 2001; LEVY *et al.*, 2004; LIOUPIS *et al.*, 2011; ADAMS *et al.*, 2013). Liu *et al.* (2011) demonstraram que o genótipo Hp2-Hp2 possui associação com DAC na população chinesa, sugerindo que o genótipo pode representar um fator de risco independente para DAC, e o alelo Hp2 um fator genético também susceptível para DAC na mesma população. Um estudo conduzido por Dallen *et al.* (2016) mostrou uma associação do genótipo Hp2-Hp2 com inflamação de baixo grau, concentração sérica de Hp e espessura íntima-média da artéria carótida em uma população multiétnica de Singapura.

Estudos longitudinais mostraram que o genótipo Hp2-Hp2 está associado a um risco duas a cinco vezes maior de DCV incidente na população com DM2 (LEVY *et al.*, 2002; RYNDEL *et al.*, 2010; ADAMS *et al.*, 2013; CAHILL *et al.*, 2013). Mostaza *et al.* 2020 avaliaram a doença carotídea em relação ao genótipo de Hp em pacientes com e sem diabetes. Os autores observaram que indivíduos Hp2-Hp2 apresentavam maior prevalência de arteriosclerose carotídea quando se comparou aos genótipos Hp1-Hp1 e Hp2-Hp1. Os resultados foram semelhantes entre os pacientes com e sem diabetes.

Além disso, a relação entre Hp2-Hp2 e níveis de colesterol tem sido mostrada em alguns estudos epidemiológicos, onde o alelo Hp2 está associado com maiores níveis de colesterol total e colesterol LDL (BOETTGER *et al.*, 2016; ZHENG *et al.*, 2017). Segundo Costacou e Levy (2012), o genótipo Hp2-Hp2 está associado a um maior risco cardiovascular atribuído à diminuição da afinidade pela Hb, diminuição da depuração dos complexos Hp2-Hp2-Hb, vias anti-inflamatórias prejudicadas, oxidação de LDL e transporte do colesterol reverso disfuncional realizado pela lipoproteína de alta densidade (HDL).

Em contraponto a estas evidências, há relatos conflitantes em relação à associação do alelo Hp2 ao risco aumentado de DCV (CAHIL *et al.*, 2013; PECHLANER *et al.*, 2014), uma vez que, estudos mostram que o alelo Hp1 também pode ser um fator de risco para DCV (COSTACOU E LEVY 2012; WANG *et al.*, 2019).

2.6 Vitamina D

Historicamente, a vitamina D é conhecida por seu importante papel no tecido ósseo (LIEBEN E CARMELIET 2013; AVENELL *et al.*, 2014; HALFON *et al.*, 2015). Nas últimas décadas, tem se enfatizado a associação da vitamina D com doenças não esqueléticas, cujos resultados mostram a vitamina D como um fator emergente que pode influenciar o início de DCV. Walters *et al.* (1986) identificaram pela primeira vez o receptor da vitamina D (VDR) em tecidos cardiovasculares de camundongos. Desde então, a descoberta de um receptor específico de vitamina D no tecido cardíaco sugeriu um papel fisiológico da vitamina D na manutenção da função cardiovascular (CHEN *et al.*, 2008; TISHKOFF *et al.*, 2008). Especificamente no coração, o VDR é expresso em cardiomiócitos ventriculares e fibroblastos, promovendo efeitos genômicos e não genômicos que impactam o metabolismo do cálcio.

Níveis reduzidos de vitamina D têm sido associados com o aumento do risco de desenvolvimento de DM, HAS, IC e IM, que são fatores de risco para o desenvolvimento de FA (ZITTERMANN *et al.*, 2003; PITTAS *et al.*, 2006; FORMAN *et al.*, 2007; GIOVANNUCCIE *et al.*, 2008; BRØNDUM-JACOBSEN *et al.*, 2012). As vias subjacentes que podem estar envolvidas na ligação entre a vitamina D e as doenças cardiovasculares incluem seus efeitos na inflamação, função das células endoteliais, trombose e funções dos cardiomiócitos (VITEZOVA *et al.*, 2015). Além disso, estudos demonstraram que a ocorrência de FA e a deficiência de vitamina D podem ser

variações sazonais, com maior incidência no inverno e menor no verão (MURPHY *et al.*, 2004; SHOBEN *et al.*, 2011).

A relação causal entre os níveis circulantes de vitamina D e o risco de FA ainda não foi totalmente elucidada. Embora os achados indiquem uma possível associação entre os níveis reduzidos de vitamina D e várias patologias cardiovasculares como DAC, HAS e hipertrofia ventricular esquerda, a relação entre estes níveis e as arritmias cardíacas, particularmente com FA, não é clara (CHEN *et al.*, 2014; ALONSO *et al.*, 2016; SCRAGG *et al.*, 2017; JENKINS *et al.*, 2018; ZITTERMANN *et al.*, 2018; MANSON *et al.*, 2019). Canpolat *et al.* (2017) mostraram que níveis séricos reduzidos de vitamina D estão significativamente associados a extensiva fibrose atrial esquerda em pacientes com FA paroxística. Estudos observacionais sugerem que pacientes com deficiência de vitamina D têm aproximadamente duas vezes mais chances de apresentar FA do que pacientes com níveis dentro dos valores de referência (> 30 ng/mL) (BELEN *et al.*, 2016, DEMIR *et al.*, 2014; OZCAN *et al.*, 2015). Uma meta-análise conduzida por Zhang *et al.* (2016) e o estudo de Liu *et al.* (2019), relataram que a deficiência de vitamina D pode influenciar o desenvolvimento de FA. Por outro lado, vários estudos prospectivos não encontraram essa associação (RIENSTRA *et al.*, 2011; MATHEW *et al.*, 2014). Alonso *et al.* (2016), não encontraram uma associação clinicamente relevante entre a diminuição dos níveis de vitamina D e FA.

A deficiência de vitamina D é comum em muitos países (LIP E TELLOMONTOLIU, 2007), onde apenas 23% das pessoas apresentam a concentração sérica de vitamina D acima de 30 ng/mL (GINDE *et al.*, 2009). Deficiência de vitamina D pode gradativamente predispor ou agravar HAS e hipertrofia ventricular, que são fatores de risco bem conhecidos para FA, especialmente em idosos (PROIETTI *et al.*, 2015). A associação entre deficiência de vitamina D e FA tem vários mecanismos fisiopatológicos. A inflamação, por exemplo, que tem um papel crucial na patogênese da FA, pode ser citada como um desses mecanismos. Notavelmente, níveis reduzidos de vitamina D podem aumentar direta ou indiretamente a síntese de PCR (SHEA *et al.*, 2007).

Outro mecanismo importante da vitamina D seria a inibição do RAAS. Segundo Zhang *et al.* (2016), o RAAS desempenha um importante papel na remodelação tanto elétrica quanto estrutural dos átrios. Receptores de vitamina D também são

encontrados em miócitos e fibroblastos do coração, os quais medeiam a remodelação cardíaca (CHEN *et al.*, 2011). Hanafy *et al.* (2014) encontraram que a vitamina D aumenta a duração do potencial de ação e intensidade de contração no átrio esquerdo do coração de coelhos, sugerindo que os efeitos eletromecânicos da vitamina D são capazes de promover a prevenção ou o término da FA. Pesquisas relatam que o bloqueio de RAAS tem mostrado efeitos benéficos no remodelamento elétrico do tecido atrial humano (BOLDT *et al.*, 2006; FORMAN *et al.*, 2010). Portanto, a inibição de RAAS apresenta propriedades arritmogênicas, considerando que o bloqueio do sistema diminui o risco de FA (KHATIB *et al.*, 2013). Um estudo experimental com modelo animal mostrou que a presença de vitamina D pode atuar inibindo o sistema RAAS (YI JEN *et al.*, 2010). Portanto, deficiência de vitamina D pode aumentar o risco de FA, secundário à sua propriedade regulatória negativa do RAAS (LIU *et al.*, 2019).

Além disso, efeitos benéficos da vitamina D na redução da trombogenicidade, inibição do estresse oxidativo e inflamação, melhora da função endotelial e relaxamento vascular, também são vias fisiológicas cruciais na patogênese da FA (CHEN *et al.*, 2008; SHEA *et al.*, 2007; PILZ *et al.*, 2016). Segundo Zhang *et al.* (2016) estresse oxidativo e processo inflamatório parece ser a ponte entre deficiência de vitamina D e o desenvolvimento de FA. Em um estudo animal, Assalin *et al.* (2013) avaliaram o efeito da deficiência de vitamina D no metabolismo, morfologia e função cardíaca. Os autores encontraram uma associação significativa entre deficiência de vitamina D e inflamação cardíaca, estresse oxidativo, alterações metabólicas energéticas, hipertrofia cardíaca, alterações na aurícula esquerda e ventrículo esquerdo do coração, com fibrose e apoptose, e disfunção sistólica, características comuns à patologia da FA. Esses achados foram associados ao aumento da secreção de citocinas, incluindo TNF e IFN- γ .

Sabe-se que a deficiência de vitamina D altera a cinética da contração muscular, reduzindo a recaptção de íons cálcio no retículo sarcoplasmático, levando a um prolongamento da fase de relaxamento da contração muscular. Além disso, os níveis reduzidos de vitamina D podem ser responsáveis por alterações na fosforilação oxidativa e pela captação inadequada de íons cálcio nas mitocôndrias, o que resulta em perturbações da homeostase metabólica celular (ZHANG *et al.*, 2016). Daraghme *et al.* (2016) conduziram um estudo de acompanhamento sobre mortalidade por diversas causas e concluíram que níveis reduzidos de vitamina D estão inversamente

associados a DCV e a mortalidade por todas as causas. Por fim, as evidências mostram que a vitamina D exibe propriedades antioxidantes, regula RAAS e vias inflamatórias (LI *et al.*, 2002; VAN ETTEEN E MATHIEU, 2005).

2.7 Sistema Fibrinolítico

O sistema fibrinolítico desempenha um papel crucial na manutenção do equilíbrio da hemostasia no corpo humano. É um sistema complexo e de multicomponentes que controlam estritamente os processos opostos de ativação e inibição da degradação proteolítica da fibrina, a fim de restaurar e manter o fluxo sanguíneo normal (KANNE, 1984; NEGREVA *et al.*, 2016). Uma avaliação do processo de fibrinólise é importante para identificar indivíduos com risco cardiovascular aumentado e o potencial de modular farmacologicamente uma fibrinólise alterada (PANG *et al.*, 2016). Um estudo multidisciplinar, analisando a utilidade da avaliação da fibrinólise usando um ensaio global para predição de risco cardiovascular, documentou que cada aumento de 50% do tempo de lise do coágulo está associado a um aumento relativo de 20% na morte cardiovascular (SUMAYA *et al.*, 2018).

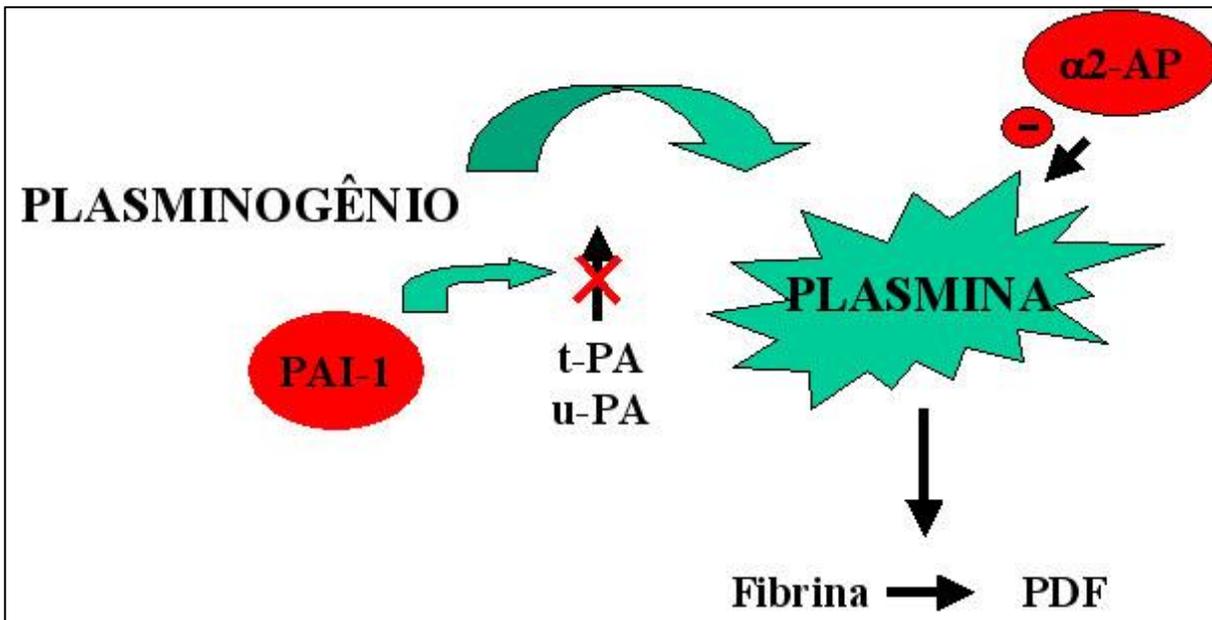
A plasmina é a principal protease efetora no sistema fibrinolítico que medeia a dissolução de polímeros de fibrina. Sua forma zimogênica, o plasminogênio, é convertido em plasmina pela ação de dois ativadores fisiológicos, o ativador do plasminogênio do tipo tecidual (t-PA) e uroquinase (u-PA), este último operando principalmente no espaço extravascular (Figura 3) (CASTELLINO E PLOPLIS 2005; RIJKEN E LIJNEN 2009; AL-HORANI E DESAI 2014). A quantidade de fibrina acelera bastante a conversão do plasminogênio em plasmina. A plasmina, por sua vez, atua quebrando uma série de ligações na molécula de fibrina. Células endoteliais liberam t-PA que juntamente com o plasminogênio, se ligam aos resíduos de lisina expostos pela proteólise da fibrina e aceleram ainda mais a conversão do plasminogênio em plasmina. Na dissolução dos trombos intravasculares, a ativação do plasminogênio mediada por t-PA inicia o processo de fibrinólise, onde a rede de fibrina é clivada em uma série de produtos da degradação de fibrina solúveis (PDF), incluindo o dímero-D (Figura 3) (DOBROVOLSKY E TITAEVA 2002; RIJKEN E LIJNEN 2009; AL-HORANI E DESAI 2014).

Portanto, após a coagulação do sangue, o processo de fibrinólise é iniciado, com uma súbita e ampla ativação que leva à rápida dissolução do coágulo. A fibrinólise

endógena representa um forte mecanismo de defesa contra uma duradoura oclusão trombótica (DIANA *et al.*, 2019; LIN *et al.*, 2020). O processo fibrinolítico pode ser prontamente inibido por meio dos inibidores da fibrinólise: o PAI ou pela inibição de plasmina por alfa-2-antiplasmina (α -2-antiplasmina) (Figura 3), e pelo TAFI (DUBINS E WITKIEWICZ 2010).

São conhecidos vários tipos de PAI, dentre eles o PAI-1, que é liberado das plaquetas sanguíneas e do endotélio quando as citocinas inflamatórias são reguladas em excesso (UNDAS, 2019). Em sua forma ativa, PAI-1 se liga ao t-PA de maneira estequiométrica, inibindo rapidamente e irreversivelmente o t-PA (MEHTA E SHAPIRO 2008). Portanto, o PAI-1 atua como um antagonista do t-PA, impedindo a fibrinólise. Níveis elevados de PAI-1 atuam como um fator de risco para trombose e AVE, levando a um estado protrombótico (SONCINI *et al.*, 1997; LOFFREDO *et al.*, 2005; ZABCZYK *et al.*, 2011). Níveis aumentados de PAI-1 e t-PA podem ser resultados de danos endoteliais e inflamação sistêmica, uma vez que a presença de comorbidades, como cardiopatia isquêmica, IC e HAS também podem estar associadas a concentrações elevadas desses marcadores (FURUI *et al.*, 1987; PRETORIUS *et al.*, 2007; TVEIT *et al.*, 2008). A enzima α -2-antiplasmina é uma enzima responsável pela inativação da plasmina, semelhante ao PAI-1, que em estado fisiológico normal, evita sangramentos excessivos. A α -2-antiplasmina tem a capacidade de inativar rapidamente a plasmina, formando um complexo inativo estável (MUTCH *et al.*, 2007).

Figura 3. Representação esquemática do sistema fibrinolítico e inibidores da fibrinólise.



Siglas: inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1 (PAI-1), ativador do plasminogênio do tipo tecidual (t-PA), ativador do plasminogênio do tipo uroquinase (u-PA), alfa-2-antiplasmina (α -2-AP), produtos de degradação de fibrina (PDF).
Fonte: Franco *et al.* 2001.

O TAFI também age como um regulador negativo do sistema fibrinolítico. Sua principal síntese é no fígado, mas há evidências de produção de TAFI extra-hepática em células endoteliais, macrófagos e plaquetas humanas (MOSNIER *et al.*, 2003; SCHADINGER *et al.*, 2010; LIN *et al.*, 2011). Presume-se que o complexo trombina-trombomodulina seja um dos ativadores fisiológicos do TAFI. A trombina gerada durante a amplificação do coágulo produzirá TAFI ativado (TAFIa) suficiente para modular a fibrinólise (FOLEY *et al.*, 2013). O TAFI remove os resíduos de lisina C-terminais da fibrina reduzindo sua capacidade de se ligar a proteínas pró-fibrinolíticas como plasminogênio e t-PA, inibindo a reação dessas coenzimas (HOFFMAN E MONROE 2007; FERREIRA E SOUSA 2010). Além disso, a via TAFI pode desempenhar vários papéis além da inibição da lise do coágulo, como atenuação da inflamação, regulação da pressão arterial e tônus vascular (FOLEY *et al.*, 2013). Alguns autores defendem que o TAFI desempenha dois papéis: anti-fibrinolítico, por clivar resíduos de lisina C-terminais a partir da fibrina parcialmente degradada, e anti-inflamatório, por regular negativamente as anafilatoxinas C3a e C5a. Anafilatoxinas são fragmentos (C3a, C4a ou C5a) produzidos durante as vias do sistema de complemento e se ligam aos receptores específicos da superfície celular promovendo a inflamação

aguda através da estimulação da quimiotaxia neutrofílica e ativação dos mastócitos (GROSSO *et al.*, 2017).

A atividade fibrinolítica na FA é objeto de pesquisas em numerosos trabalhos até o momento. Uma meta-análise de 59 estudos mostrou que t-PA e PAI-1 estão aumentados em pacientes com FA comparados aos grupos controles (WU *et al.*, 2015). Evidências demonstraram que concentrações elevadas de antígeno PAI-1 são preditores independentes do desenvolvimento de FA em pacientes submetidos à circulação extracorpórea e naqueles após CV bem-sucedida (PRETORIUS *et al.*, 2007; TVEIT *et al.*, 2007). Em pacientes com FA paroxística, Drabik *et al.* (2015) mostraram níveis elevados de antígeno PAI-1 associados a uma tendência a formar coágulos mais densos e pouco lisáveis. Matusik *et al.* (2017) demonstraram em 160 pacientes com FA que o tempo de lise do coágulo estava positivamente correlacionado com o potencial endógeno de trombina, bem como com NT-proBNP (N-terminal do peptídeo natriurético tipo B) e PAI-1. Além disso, os mesmos autores mostraram uma correlação positiva entre níveis de PAI-1 e a fração de ejeção do ventrículo esquerdo em pacientes com FA, sugerindo uma associação entre parâmetros hemostáticos e a sobrecarga nos ventrículos (MATUSIK *et al.*, 2017).

Ainda que raros na literatura, estudos evidenciando níveis aumentados de TAFI também têm sido descritos em pacientes com FA (ROLDÁN *et al.*, 1998; ADAMS E HUNTINGTON *et al.*, 2006; ZABCZYK, *et al.*, 2011). As avaliações sobre os níveis plasmáticos de TAFI indicam, em sua maioria, uma relação com eventos tromboembólicos. Meltzer *et al.* (2009) mostraram que um estado de hipofibrinólise plasmática está associado a risco de tromboembolismo venoso por elevados níveis plasmáticos de TAFI e PAI-1. Níveis plasmáticos de TAFI são também elevados em pacientes com IAM (WANG *et al.*, 2016). Alguns estudos genéticos do gene *TAFI* observaram que polimorfismos estão associados à trombose venosa (SHI *et al.*, 2014), arterial (KOZIAN *et al.*, 2010) e a resistência à revascularização em pacientes com IAM (FERNANDEZ-CADENAS *et al.*, 2007). Em resumo, níveis plasmáticos elevados de TAFI possuem uma sólida associação com aumento do risco de vários eventos cardiovasculares, tais como: AVE (LADEVALL *et al.*, 2007; BRUIJNE *et al.*, 2009); IM (ZORIO *et al.*, 2003); angina de peito (MORANGE *et al.*, 2003); SCA (SANTAMARIÁ *et al.*, 2004) e DAC (BRUIJNE *et al.*, 2009). A observação de alterações nos níveis plasmáticos de TAFI pode ajudar a identificar fatores de risco para AVE e o processo

patológico envolvido (SANTAMARIÁ *et al.*, 2003). Além disso, segundo Dai *et al.* (2017) há a expectativa de que o TAFI seja um novo biomarcador a ser aplicado na prática clínica.

Diante do exposto, torna-se pertinente avaliar biomarcadores na ocorrência da FA e sua associação com parâmetros do estresse oxidativo, do sistema fibrinolítico e inflamatórios. Cumpre ressaltar que até o presente momento, não foram conduzidos estudos com pacientes com FA, na população brasileira, envolvendo parâmetros de diversas vias fisiopatológicas e sua possível interrelação. A comparação entre o uso de anticoagulantes diferentes na FA pode fornecer importantes *insights* que poderão nortear estudos mais robustos visando a obtenção de resultados potencialmente aplicáveis à clínica.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a associação de marcadores inflamatórios, de estresse oxidativo e do sistema fibrinolítico em indivíduos com fibrilação atrial, em uso dos anticoagulantes orais varfarina ou rivaroxabana, comparados a um grupo controle sem fibrilação atrial.

3.2 Objetivos específicos

Comparar entre um grupo de pacientes com FA, em uso de varfarina ou rivaroxabana, e o grupo controle:

- Níveis plasmáticos de Hp e Vitamina D;
- Níveis de parâmetros de estresse oxidativo por meio da quantificação de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);
- As frequências alélica e genotípica do polimorfismo Hp1-Hp2 no gene da Hp;
- Níveis de PAI-1 e TAFI.
- Correlação dos níveis de IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF, TGF- β , IL-8, RANTES, IFN- γ , MIG, MCP-1 e IP-10 com os parâmetros acima citados, cuja associação com a FA foi avaliada em estudo anterior do grupo (MARTINS, 2018).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

- Aspectos éticos

O presente estudo, do tipo transversal e observacional foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP-UFMG Projeto: CAAE – 12603413.0.0000.5149 – **Anexo A**) e pelos Comitês de Ética dos hospitais Lifecenter, Madre Teresa, Semper e Governador Israel Pinheiro (Ipsemg) onde foram selecionados os pacientes, como também ao comitê de ética da Prefeitura de Belo Horizonte para a seleção dos candidatos do grupo controle na Academia da Cidade (bairro Universitário). Aos indivíduos selecionados, foram realizados os esclarecimentos da pesquisa e aqueles que estavam de acordo em participar, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Apêndice A**), bem como responderam a uma ficha clínica com perguntas de interesse médico e da pesquisa (**Apêndices B e C**).

- População do estudo

Participaram do estudo 147 indivíduos, compreendendo pacientes com FA em uso de varfarina (n=47) e rivaroxabana (n=38), além de indivíduos hígidos (controles, n=62). Os indivíduos com FA foram selecionados sequencialmente por médicos especialistas a partir da rotina de atendimento em consultórios e ambulatórios, e foram encaminhados para o local da realização da coleta de sangue. A seleção e coleta de amostras dos participantes do estudo foram realizadas entre o período de junho de 2013 a dezembro de 2017.

Foram coletadas amostras de 20 mL de sangue venoso dos pacientes (5 mL sem anticoagulante, 5 mL em EDTA e 10 mL em citrato de sódio a 3,2%), após jejum de 12h, diretamente em tubos do Sistema Vacutainer® (Becton-Dickinson). As amostras de sangue coletadas sem anticoagulante foram centrifugadas a 1100 g por 15 minutos, em centrífuga refrigerada à 4 °C. Para as amostras de plasma, foi realizada uma segunda centrifugação, a 3500 rpm por 15 minutos, para obtenção do plasma pobre em plaquetas. As amostras de soro e plasma foram aliquotadas em microtubos de polipropileno atóxico, devidamente identificadas e armazenadas em freezer vertical à -80 °C. Parte do sangue total coletado em anticoagulante EDTA foi utilizada para a extração do DNA, que ficou armazenado a -20°C até a realização das análises

genéticas. No momento do uso, as alíquotas foram descongeladas à temperatura ambiente, apenas uma única vez para a realização das determinações previamente definidas.

- Coleta de dados

Dados referentes a sexo, idade (definida em anos), hábito de tabagismo, etilismo, sedentarismo, uso de estatina, anti-hipertensivo, além de outros medicamentos (prescritos e não prescritos), bem como diagnóstico de hipertensão e diabetes mellitus foram obtidos por meio de entrevista e consulta em prontuário médico, para preenchimento de ficha clínica.

A classificação quanto ao hábito de tabagismo (sem considerar tempo e consumo diário) foi de fumante e não fumante de qualquer cigarro, charuto ou similar. Considerou-se tabagista o indivíduo que tinha o hábito no momento da inclusão no estudo ou que houvesse abandonado o hábito de fumar. Classificou-se como não tabagista aqueles indivíduos que nunca fumaram (ALMENOFF *et al.*, 1995). Como etilistas, os participantes que relatavam ingestão de bebidas alcoólicas superior a 30mL de álcool ao dia. Sedentaristas, aqueles que não praticavam atividade física aeróbica com frequência de três a seis dias por semana, sessões, em média, de 40 minutos (REZENDE *et al.*, 2006). Considerou-se como hipertenso o indivíduo que relatasse a presença da doença ou estivesse em uso de medicamento anti-hipertensivo na época da entrevista. Foi considerado com diabetes mellitus o indivíduo que, durante a entrevista, relatasse a presença da doença ou estivesse em uso (ou receita médica) de insulina ou hipoglicemiante oral.

- Variáveis do estudo

Variáveis principais: participante ter ou não FA; participante fazer uso de varfarina ou rivaroxabana; Biomarcadores: TBARS, MTT, PAI-1, TAFI, Hp e Vitamina D.

Co-variáveis: idade, DM, HAS, dislipidemia e atividade física.

4.2 Critérios de Inclusão

- Grupo caso: Foram incluídos no estudo pacientes com FA não valvar paroxística, persistente ou permanente, documentada por eletrocardiograma

com Doppler dentro de 12 meses anteriores, que estavam fazendo uso de varfarina ou rivaroxabana por, no mínimo, um mês antes da realização da coleta de sangue. Para o grupo varfarina todos os pacientes deviam apresentar valor de “Relação Normalizada Internacional” (RNI) dentro da faixa terapêutica. Para o grupo rivaroxabana a coleta deveria anteceder a ingestão da próxima dose do medicamento. Os pacientes elegíveis incluem indivíduos de ambos os sexos com idade superior a 18 anos.

- Grupo controle: Foram incluídos indivíduos com as características demográficas semelhantes aos indivíduos com FA, porém, sem relato de arritmia, ou qualquer outra doença cardíaca, histórico de tromboembolismo e uso de anticoagulantes orais.

4.3 Critérios de não-inclusão

- Uso de terapia medicamentosa com antiagregante plaquetário, corticoides e anti-inflamatórios não esteroidais, heparina, terapia de reposição hormonal, antifibrinolíticos, amiodarona, verapamil, quinidina, antimicóticos azólicos e ritonavir;
- Etilismo, doença renal crônica (*clearance* de creatinina inferior a 30 mL/min), insuficiência hepática, doença tireoidiana, infecciosa, inflamatória, autoimune e maligna, bem como qualquer alteração laboratorial ou clínica relevante detectada pelo médico responsável;
- Gravidez, puerpério e lactação.

4.4 Métodos

Os resultados do hemograma, perfil lipídico, hepático e renal, foram obtidos durante o desenvolvimento experimental da tese da Dr^a Rita Carolina Figueiredo Duarte (DUARTE, 2017). A análise dos parâmetros inflamatórios foi realizada pela doutoranda Gabriela Lopes Martins na condução de sua dissertação de mestrado (MARTINS, 2018) e os resultados foram parcialmente publicados (MARTINS *et al.*, 2020). Estas análises foram refeitas no presente estudo, com um pequeno acréscimo no tamanho amostral,

com a finalidade de se investigar possíveis associações com os novos biomarcadores avaliados.

4.4.1 Determinação dos parâmetros bioquímicos

As determinações séricas dos parâmetros bioquímicos colesterol total, HDLc, LDLc, triglicérides, AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase), GGT (gama glutamil transpeptidase), creatinina e ácido úrico foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Risoleta Tolentino Neves, utilizando o analisador automático Vitros 250, Johnson & Johnson®.

4.4.2 Determinação da capacidade antioxidante do soro (MTT)

O MTT é um sal tetrazólico que pode ser reduzido por antioxidantes como o ascorbato, urato, α -tocoferol, albumina e o grupo das sulfidril proteínas, formando cristais de formazana que possuem cor púrpura e são solúveis em isopropanol (MEDINA *et al.*, 2007).

Para determinação da capacidade antioxidante, foi realizada a quantificação do MTT de amostras de soro de acordo com o protocolo de Medina *et al.* (2007) descrito abaixo, adaptado por Duarte *et al.* (2012).

Foram incubados, ao abrigo de luz, a 37°C por 60 minutos, 100 μ L de soro, 50 μ L de PBS e 12,5 μ L de solução de MTT (0,5 g de MTT em 100 mL de PBS). Em seguida, foram adicionados aos tubos 750 μ L da solução de isopropanol: HCL (0,04 M) e estes foram agitados no vórtex por 30 segundos. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos e a absorvância do sobrenadante foi medida a 570 nm (MEDINA *et al.*, 2007). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias.

4.4.3 Determinação da peroxidação lipídica (TBARS)

Os marcadores usados para monitorar a peroxidação lipídica pertencem à classe das TBARS. A peroxidação lipídica origina produtos secundários como alcanos, aldeídos e isoprostanos que podem ser utilizados para avaliar o *status* oxidativo de materiais biológicos. Entre os biomarcadores mais avaliados para a peroxidação lipídica estão o malondialdeído (MDA) e o F2-isoprostano (DOTAN *et al.*, 2004).

O ensaio para quantificação do TBARS baseia-se na reação do MDA com duas moléculas do ácido tiobarbitúrico (TBA), em meio ácido, e em alta temperatura, formando um produto colorido que pode ser medido fluorometricamente ou espectrofotometricamente a 532 nm (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

O protocolo a seguir, adaptado por Duarte *et al.* (2012), foi utilizado para a determinação dos níveis de TBARS em amostras de soro: 100 µL de soro foram adicionadas à 100 µL de uma solução gelada de TBA (TBA 1%, NaOH 0,05 M e BHT 0,1 mM) e 100 µL de ácido fosfórico (H₃PO₄) concentrado. As amostras foram incubadas no banho-seco por 25 minutos a 98°C e, em seguida, acondicionados no freezer por 10 minutos. Posteriormente, 375 µL de butanol foram adicionados aos tubos, que foram agitados em vórtex por 10 segundos. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 2000 rpm. A absorvância do sobrenadante foi medida a 532 nm e 600 nm. A concentração do TBARS foi calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de 156/ (mM x cm) e o resultado apresentado em µM (HERMES-LIMA *et al.*, 1995).

4.4.4 Quantificação dos parâmetros inflamatórios por microesferas - Cytometric Bead Array (CBA)

As dosagens dos parâmetros inflamatórios do plasma dos indivíduos foram realizadas pelo método CBA, conforme instruções do fabricante (BD Bioscience, San Diego, CA, EUA). Foram quantificadas as citocinas e quimiocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, TGF-β, IL-8, RANTES, IFN-γ, MIG, MCP-1 e IP-10. Analisou-se os resultados utilizando o software FCAP (BD Bioscience), os quais foram representados em pg/mL.

4.4.5 Determinação da Haptoglobina plasmática

A quantificação da Hp plasmática foi realizada em amostras de soro, utilizando-se o kit Quantikine® ELISA (R&D Systems, Incorporated, USA), cujo princípio analítico é o ELISA de captura, seguindo-se as instruções fornecidas pelo fabricante. Resultado expresso em ng/mL.

4.4.6 Determinação dos níveis de vitamina D

A dosagem sérica dos níveis de vitamina D foram realizadas em amostras de soro, utilizando-se o kit de ensaio imunoenzimático fornecido pela Ampligenix Biotech, cujo princípio analítico é o ELISA de captura, seguindo-se as instruções fornecidas pelo fabricante. Resultado expresso em ng/mL.

4.4.7 Determinação dos parâmetros fibrinolíticos

As determinações de PAI-1 e TAFI foram realizadas no plasma citrato, usando-se o conjunto diagnóstico IMUBIND® Plasma PAI-1 (BIOMEDICA DIAGNOSTICS, USA) com resultados expressos em ng/mL, e VisuLize™ TAFI Antigen Kit (AFFINITY BIOLOGICALS INCORPORATED, Canada), com resultados expressos em µg/mL, cujo princípio analítico é o ELISA de captura, seguindo-se as instruções fornecidas pelo fabricante. De acordo com o fabricante, para a determinação do PAI-1, a variabilidade máxima calculada a partir de duas concentrações de amostra testadas em quadruplicata indica um C.V. intra-ensaio = 5,4% e C.V. inter-ensaio = 6,9%, com um limite de detecção de 2,2ng/mL. Para o kit TAFI, de acordo com o fabricante, a variabilidade máxima calculada a partir de resultados de 3 lotes indica um C.V. intra-ensaios = 5,8% e C.V. inter-ensaios = 8,0%, com intervalo normal de 5,8 a 10,0 µg/mL e um limite de detecção de 3,13% do valor de referência padrão.

A leitura dos testes de estresse oxidativo, haptoglobina, vitamina D e parâmetros fibrinolíticos foram realizadas utilizando-se o leitor de microplacas Spectra Max-340 e VersaMax microplate reader (Molecular Devices® USA). Todas as curvas de calibração foram construídas utilizando-se os calibradores, fornecidos pelos fabricantes. Amostras de plasmas-controle específicos para cada teste, também fornecidos pelos fabricantes, foram utilizadas para verificar o desempenho dos ensaios. A exceção de MTT e TBARS, as concentrações dos parâmetros analisados foram obtidas interpolando-se as leituras das amostras em uma curva padrão.

4.4.8 Genotipagem do gene Haptoglobina

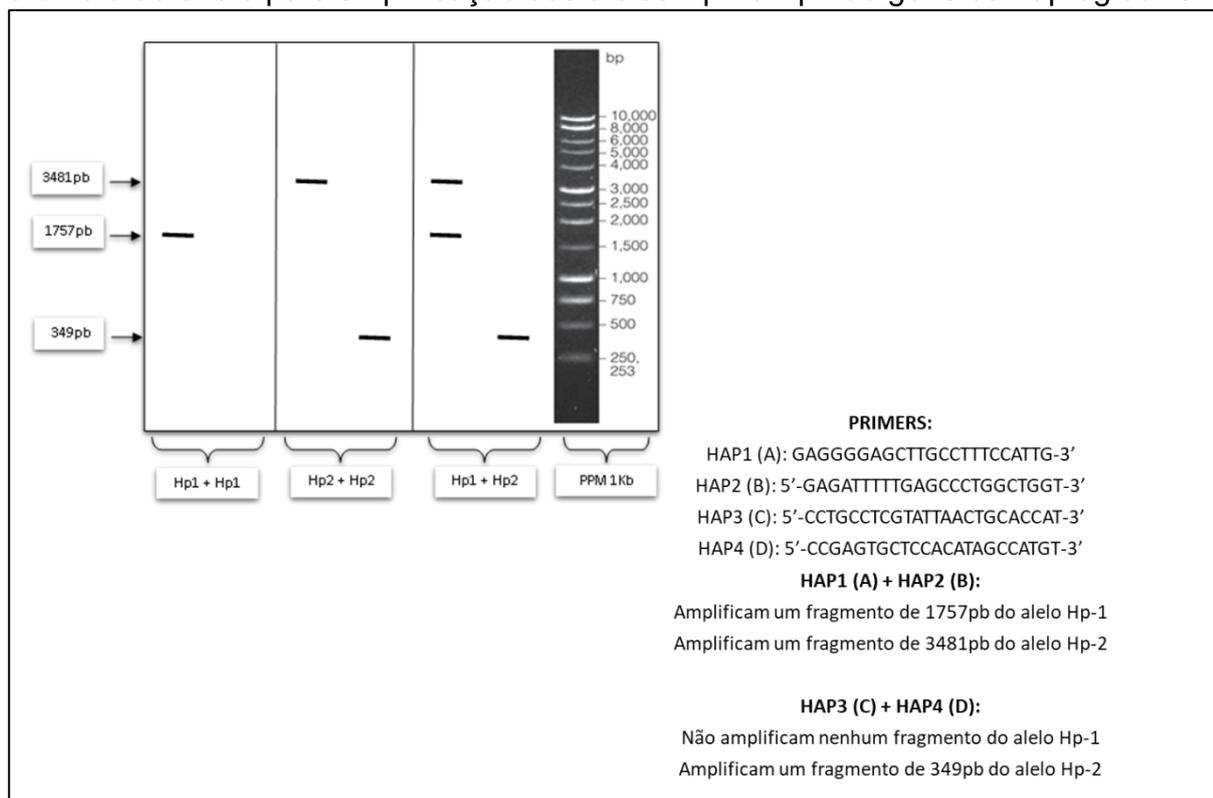
O DNA genômico foi obtido usando-se o Biopur Mini Spin Kit (BiometrixBiotecnologia®). A genotipagem do polimorfismo Hp1-Hp2 foi realizada de

acordo com Koch *et al.* (2002). Os alelos Hp1 e Hp2 divergem em um segmento de DNA de aproximadamente 1700 pb, duplicado em Hp2. Foram utilizadas duas reações de PCR, cada uma contendo um par diferente de iniciadores: primeira reação, iniciador A (5'-GAGGGGAGCTTGCCTTTCCATTG-3') e iniciador B (5'-GAGATTTTTGAGCCCTGGCTGGT-3'); segunda reação, iniciador C (5'-CCTGCCTCGTATTAAGTGCACCAT-3') e iniciador D (5'-CCGAGTGCTCCACATAGCCATGT-3').

As condições de PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 69°C por 2 minutos (1 minuto para a reação 1), 69°C por 2 minutos (1 min para a reação 2) e extensão final de 7 min a 72°C. Os iniciadores A e B se ligam em sítios que flanqueiam regiões específicas dos alelos Hp1 e Hp2, o que permite diferenciá-los. Dois produtos de PCR podem ser visualizados na primeira reação, um produto de 1757 pb (alelo Hp1) e um produto de 3481 pb (alelo Hp2). Na segunda reação, com os iniciadores C e D, um produto de PCR de 349 pb é gerado apenas na presença de Hp2, o que é útil para confirmar os resultados (Figura 4).

Os produtos de PCR foram visualizados em eletroforese em gel de agarose a 1% corada com solução de brometo de etídio (10 mg/mL; Sigma-Aldrich, MO, EUA).

Figura 4. Representação esquemática de um gel de agarose a 1% corado com 5 µL de brometo de etídio para amplificação dos alelos Hp1 e Hp2 do gene da haptoglobina.



Fonte: Koch *et al.*, 2002.

4.5 Análise estatística

Foi realizada uma análise descritiva e avaliação quanto à distribuição normal pelo teste de Shapiro-Wilk. Os resultados foram apresentados como média e desvio-padrão (DP), quando apresentaram distribuição normal e, como mediana e intervalo interquartil, quando a sua distribuição foi não-normal. Os testes t de Student e Mann-Whitney foram utilizados para comparação de dois grupos, quando os dados se mostraram normais ou não, respectivamente. Para comparação de três grupos, foram utilizados a análise de variância - ANOVA e post-hoc LSD (dados normais) e o teste de Kruskal-Wallis, seguido pela correção de Bonferroni (dados não-normais).

Para as análises de correlações entre os parâmetros avaliados no grupo de indivíduos com FA, foi realizado o teste de Correlação de Spearman. Em relação à força da correlação, considerou-se $0,10 < r < 0,29$ uma correlação fraca, $0,30 < r < 0,49$ uma correlação moderada ou $0,50 < r < 1$ uma correlação forte, conforme proposto por Cohen (1989).

Para retirar o efeito de interferência das variáveis de confusão: idade, DM, HAS, dislipidemia e atividade física; na comparação dos biomarcadores entre os grupos, foi

realizada uma análise de regressão logística multivariada em duas etapas. Primeiramente, foi feito um modelo incluindo todas as variáveis de confusão para avaliar a relação com biomarcadores. Em uma segunda etapa, as variáveis que apresentaram $p < 0,02$ foram incluídas no modelo final de regressão linear juntamente com grupos e biomarcadores.

As análises estatísticas foram realizadas com o Statistical Package of the Social Sciences (SPSS) versão 17.0. Foram consideradas como diferenças significativas valores de $p < 0,05$. Para a elaboração dos gráficos utilizou-se o software GraphPad Prism® versão 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA).

O equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foi avaliado usando teste exato no software GENEPOP (http://genepop.curtin.edu.au/genepop_op1.html). As diferenças nas frequências genotípicas e alélicas do gene da haptoglobina entre os grupos foram investigadas pelo teste do qui-quadrado (χ^2).

5.0 RESULTADOS

5.1 Características demográficas e clínicas dos participantes do estudo

As características clínicas dos participantes desse estudo, comparando-se os grupos controle e FA, estão apresentadas na **Tabela 1**.

Tabela 1. Caracterização clínica e demográfica dos participantes dos grupos controle e FA.

Variáveis	Controle (n = 62)	FA (n = 85)	P
Idade (anos)	67 (6)	74 (14)	0,065
Sexo			
Feminino, n (%)	38 (61,3%)	39 (45,9%)	0,069
Masculino, n (%)	24 (38,7%)	46 (54,1%)	
Tabagista, n (%)	2 (3,2%)	4 (4,7%)	0,654
HAS, n (%)	31 (50%)	80 (94,1%)	<0,001*
DM2, n (%)	10 (16,1%)	25 (29,4%)	0,078
Uso de Metformina	10 (16,1%)	19 (23,5%)	0,303
Dislipidemia, n (%)	23 (39%)	48 (56,5%)	0,044*
Uso de estatina, n (%)	25 (40,3%)	42 (51,9%)	0,181
Atividade Física	60 (98,4%)	19 (22,9%)	<0,001*
Etilismo	17 (27,4%)	21 (24,7%)	0,708

Variáveis categóricas foram analisadas pelo teste qui-quadrado ou Fisher e apresentadas pelo número amostral e a frequência em porcentagem. Idade apresentada em mediana (intervalo interquartil) e analisada pelo teste de Mann-Whitney. Valores significativos *: $p < 0,05$. Abreviaturas: HAS = Hipertensão arterial sistêmica; DM2 = Diabetes Mellitus tipo 2.

Os pacientes com FA foram distribuídos em dois grupos, de acordo com o anticoagulante oral que usavam. As características demográficas e clínicas dos participantes, comparando-se os grupos controle, varfarina e rivaroxabana, estão demonstradas na **Tabela 2**.

Tabela 2. Caracterização clínica e demográfica dos participantes dos grupos controle, varfarina e rivaroxabana.

Variáveis	Controles (n = 62)	Varfarina (n = 47)	Rivaroxabana (n = 38)	P
Idade em anos	69 (9)	70 (13)	77 (15)	0,002* P ¹ 0,565 P ² 0,001* P ³ 0,010*
Sexo				
Feminino, n (%)	38 (61,3%)	21 (44,7%)	18 (47,4%)	0,176
Masculino, n (%)	24 (38,7%)	26 (55,3%)	20 (52,6%)	
Tabagista, n (%)	2 (3,2%)	1 (2,1%)	3 (7,9%)	0,371
HAS, n (%)	31 (27,9%)	43 (38,7%) ^a	37 (33,3%) ^a	<0,001*
DM2, n (%)	10 (16,1%)	15 (31,9%)	10 (26,3%)	0,146
Uso de Metformina	10 (16,1%)	12 (26,1%)	7 (20%)	0,444
Dislipidemia	23 (39%) ^b	32 (68,1%) ^a	16 (42,1%)	0,007*
Uso de estatinas, n (%)	25 (40,3%)	29 (63%) ^a	13 (37,1%)	0,027*
Atividade Física	60 (98,4%) ^a	8 (17,8%) ^b	11 (28,9%) ^b	<0,001*
Etilismo	17 (27,4%)	8 (17%)	13 (34,2%)	0,185

Variáveis categóricas foram analisadas pelo teste qui-quadrado com análise residual: ^a mais frequente ^b menos frequente; apresentadas pelo número amostral e a frequência em porcentagem. Idade apresentada em mediana (intervalo interquartil) e analisada pelo teste de Kruskal-Wallis. Teste post-hoc LSD ou Bonferroni para comparações múltiplas de todos os pares de médias: p¹: Controle versus Varfarina; p²: Controle versus Rivaroxabana; p³: Varfarina versus Rivaroxabana. Valores significativos *: p < 0,05. Abreviaturas: HAS = Hipertensão arterial sistêmica; DM2 = Diabetes Mellitus tipo 2.

Comparando-se os indivíduos controles com os pacientes com FA não foram observadas diferenças significativas em relação à idade, sexo, tabagismo, DM2, uso de metformina e estatinas, e etilismo (todos p > 0,05). Em relação à presença de hipertensão arterial e dislipidemias, o grupo de pacientes com FA apresentou maior frequência em relação aos controles (p < 0,001 e p = 0,044, respectivamente), diferentemente da atividade física onde a frequência do grupo controle foi significativa maior em relação aos pacientes (p < 0,001).

Já na comparação dos grupos controle, varfarina e rivaroxabana, observou-se diferença significativa no parâmetro idade. Especificamente, a diferença se encontra entre grupo controle e rivaroxabana (p < 0,001), e entre o grupo varfarina e rivaroxabana (p = 0,010), sendo possível observar que os pacientes em uso de rivaroxabana eram os que apresentavam idade mais avançada (valor de mediana = 77). A HAS foi mais frequente nos grupos varfarina e rivaroxabana (p < 0,001), sendo observado uma frequência maior de hipertensos (38,7%) nos pacientes em uso de varfarina. A

dislipidemia diferiu entre os grupos controle e varfarina, sendo mais frequente nos pacientes em uso de varfarina (68,1%, $p=0,007$). O uso de estatina foi mais frequente no grupo varfarina (63%, $p=0,027$) em relação ao grupo controle e rivaroxabana, que por sua vez não diferiram entre si. A atividade física diferiu entre os grupos, sendo mais frequente no grupo controle (98,4%) e menos frequente nos pacientes em uso de varfarina (17,8%), que por sua vez foi menos frequente ao uso de rivaroxabana (28,9%, $p<0,001$).

5.2 Caracterização laboratorial dos participantes do estudo

A caracterização laboratorial dos participantes do estudo, comparando-se os grupos controle e FA pode ser verificada na **Tabela 3**, e comparando-se os grupos controle, varfarina e rivaroxabana, na **Tabela 4**.

Tabela 3. Caracterização bioquímica dos participantes dos grupos controle e FA

Parâmetros	Controles (n = 62)	FA (n = 85)	P
Colesterol total (mg/dL)	179,3 ± 36,8	178,5 ± 34,8	0,028*
LDLc (mg/dL)	96,6 ± 26,7	90,1 ± 29,2	0,084
HDLc (mg/dL)	53,1 ± 16,2	57 ± 15,4	0,260
Triglicérides (mg/dL)	147,2 ± 49,7	156,7 ± 79,4	0,411
ALT (U/L)	26,9 ± 6,4	23,5 ± 8,8	0,438
AST (U/L)	25,0 (7)	28,5 (14)	0,337
GGT (U/L)	26,0 (17)	34,5 (27)	<0,001*
Creatinina (mg/dL)	0,9 (0,5)	1,2 (0,5)	<0,001*

As variáveis paramétricas são apresentadas como média ± desvio padrão. Variáveis não paramétricas são apresentadas como mediana (intervalo interquartil). Teste t de Student para variáveis paramétricas e teste de Mann-Whitney para variáveis não paramétricas. Significativo *: $p < 0,05$. Abreviaturas: LDL = Lipoproteína de baixa densidade; HDL = Lipoproteína de alta densidade; ALT = Alanina Aminotransferase; AST = Aspartato Aminotransferase; GGT = Gama Glutamil Transferase; PCR = Proteína C reativa.

Tabela 4. Caracterização bioquímica dos participantes dos grupos controle, varfarina e rivaroxabana.

Parâmetros	Controle (n = 62)	Varfarina (n = 47)	Rivaroxabana (n = 38)	p	p ¹	p ²	p ³
Colesterol total (mg/dL)	179,3 ± 36,8	178,5 ± 37,2	178,4 ± 28,6	0,032*	0,235	0,009*	0,151
LD Lc (mg/dL)	96,6 ± 26,7	89,2 ± 31,9	93,1 ± 20,2	0,190	-	-	-
HDLc (mg/dL)	53,1 ± 16,2	56,0 ± 15,9	60,6 ± 14,7	0,242	-	-	-
Triglicérides (mg/dL)	147,2 ± 49,7	166,5 ± 84,5	123,4 ± 52,4	0,357	-	-	-
ALT (U/L)	26,9 ± 6,4	26,2 ± 7,9	14,4 ± 4,8	0,268	-	-	-
AST (U/L)	25,0 (7)	31,0 (16)	24,0 (10)	0,035*	0,033*	0,480	0,337
GGT (U/L)	26,0 (17)	37,0 (28)	23,0 (19)	<0,001*	<0,001*	0,001*	<0,001*
Creatinina (mg/dL)	0,9 (0,5)	1,2 (0,5)	1,0 (0,8)	<0,001*	<0,001*	0,004*	0,000*
CHA2DS2-VASc	-	3 (2.5–4)	4 (3–4)	0.776			

As variáveis paramétricas são apresentadas como média e desvio padrão. Variáveis não paramétricas são apresentadas como mediana e intervalo interquartil. Teste ANOVA para variáveis paramétricas e teste Kruskal-Wallis para variáveis não paramétricas. Teste post-hoc LSD ou Bonferroni para comparações múltiplas de todos os pares de médias: p¹: Controle versus Varfarina; p²: Controle versus Rivaroxabana; p³: Varfarina versus Rivaroxabana. Valores Significativos *: p <0,05. Abreviaturas: LDL = Lipoproteína de baixa densidade; HDL = Lipoproteína de alta densidade; ALT = Alanina Aminotransferase; AST = Aspartato Aminotransferase; GGT = Gama Glutamil Transferase; PCR = Proteína C reativa.

Na avaliação do perfil lipídico, observou-se diferença significativa apenas nos níveis séricos de colesterol total entre os grupos controle e FA (p=0,028). Ao compararmos os três grupos, verificamos a diferença apenas entre o grupo controle e rivaroxabana (p=0,009), ou seja, os indivíduos em tratamento com os dois anticoagulantes não apresentaram diferenças com relação ao perfil lipídico.

Em relação à função hepática, os níveis séricos de ALT e AST não diferiram entre os grupos controle e FA. Na comparação entre os três grupos, os níveis séricos de AST apresentaram diferenças significativas entre os grupos controle e varfarina, com o maior nível nos pacientes em uso de varfarina (p=0,033). Já para o marcador hepático GGT, observou-se valores significativamente aumentados no grupo dos pacientes com FA comparando-se ao grupo controle (p<0,001). Na comparação entre controle com varfarina e rivaroxabana, GGT diferiu significativamente entre os três grupos (p<0,05 para todas as comparações). Contudo, foi possível observar que o maior valor sérico de GGT se encontra naqueles em tratamento de varfarina.

No que diz respeito à função renal, avaliada com base nos valores de creatinina sérica, observou-se níveis significativamente elevados nos indivíduos com FA, em comparação ao grupo controle (p<0,001). Comparando-se os grupos controle, varfarina

e rivaroxabana os valores de creatinina diferiu significativamente entre os três grupos, podendo observar o maior valor nos pacientes em tratamento de varfarina ($p < 0,05$ para todas as comparações).

Os pacientes com FA em uso de varfarina e rivaroxabana apresentaram pontuações iguais a 3 e 4 respectivamente no escore de risco CHA2SD2-VASc, justificando assim o uso de anticoagulante oral para prevenção de eventos tromboembólicos, assim como, indica a homogeneidade dos grupos em relação ao risco de eventos tromboembólicos.

5.3 Avaliação de marcadores do estresse oxidativo

Os valores dos marcadores oxidativos entre os grupos controle e FA são mostrados na **tabela 5**, e na **tabela 6**, na comparação entre os indivíduos dos grupos controle, varfarina e rivaroxabana.

Tabela 5. Caracterização do estresse oxidativo entre os participantes dos grupos controle e FA.

Estresse oxidativo	Controles (n = 62)	FA (n = 85)	P
MTT ^a	0,217 (0,029)	0,224 (0,076)	0,002*
TBARS (μ M)	0,155 \pm 0,035	0,143 \pm 0,033	0,146

As variáveis paramétricas são apresentadas como média \pm desvio padrão. Variáveis não paramétricas são apresentadas como mediana (intervalo interquartil). Teste t de Student para variáveis normais e teste de Mann-Whitney para variáveis não paramétricas. Valores Significativos *: $p < 0,05$. ^aMedida em unidades de absorvância arbitrárias. Abreviaturas: MTT = capacidade antioxidante do soro; TBARS = Espécies reativas ao ácido Tiobarbitúrico.

Tabela 6. Caracterização do estresse oxidativo entre os participantes dos grupos controle, varfarina e rivaroxabana.

Estresse oxidativo	Controle (n = 62)	Varfarina (n = 47)	Rivaroxabana (n = 38)	p	p ¹	p ²	p ³
MTT ^a	0,217 (0,029)	0,212 (0,066)	1,290 (1,040)	<0,001*	0,88 4	<0,001*	0,002*
TBARS (µM)	0,143 ± 0,033	0,156 ± 0,031	0,150 ± 0,052	0,213			

As variáveis paramétricas são apresentadas como média e desvio padrão. Variáveis não normais são apresentadas como mediana e intervalo interquartil. Teste ANOVA para variáveis paramétricas e teste de Kruskal-Wallis para variáveis não paramétricas. Teste LSD ou Bonferroni para comparações múltiplas de todos os pares de médias: p¹: Controle versus Varfarina; p²: Controle versus Rivaroxabana; p³: Varfarina versus Rivaroxaban. Valores Significativos *: p <0,05. ^aMedida em unidades de absorvância arbitrárias. Abreviaturas: MTT = capacidade antioxidante do soro; TBARS = Espécies reativas ao ácido Tiobarbitúrico.

Não foi encontrada diferença significativa das concentrações de TBARS entre os pacientes com FA e grupo controle, bem como entre controle, varfarina e rivaroxabana mesmo quando são consideradas variáveis de confusão no modelo de regressão linear múltiplo para TBARS (resultados não tabelados). Para as concentrações séricas de MTT, observou-se diferença significativa entre controle e FA (p=0,002). Entre os grupos controle e rivaroxabana, varfarina e rivaroxabana, os níveis de MTT diferiram significativamente (p=0,002). O modelo de análise de regressão apresentado na tabela 7 mostrou que o parâmetro MTT está sob o efeito dos grupos avaliados neste estudo (p<0,001) mesmo quando se considera variáveis de confusão.

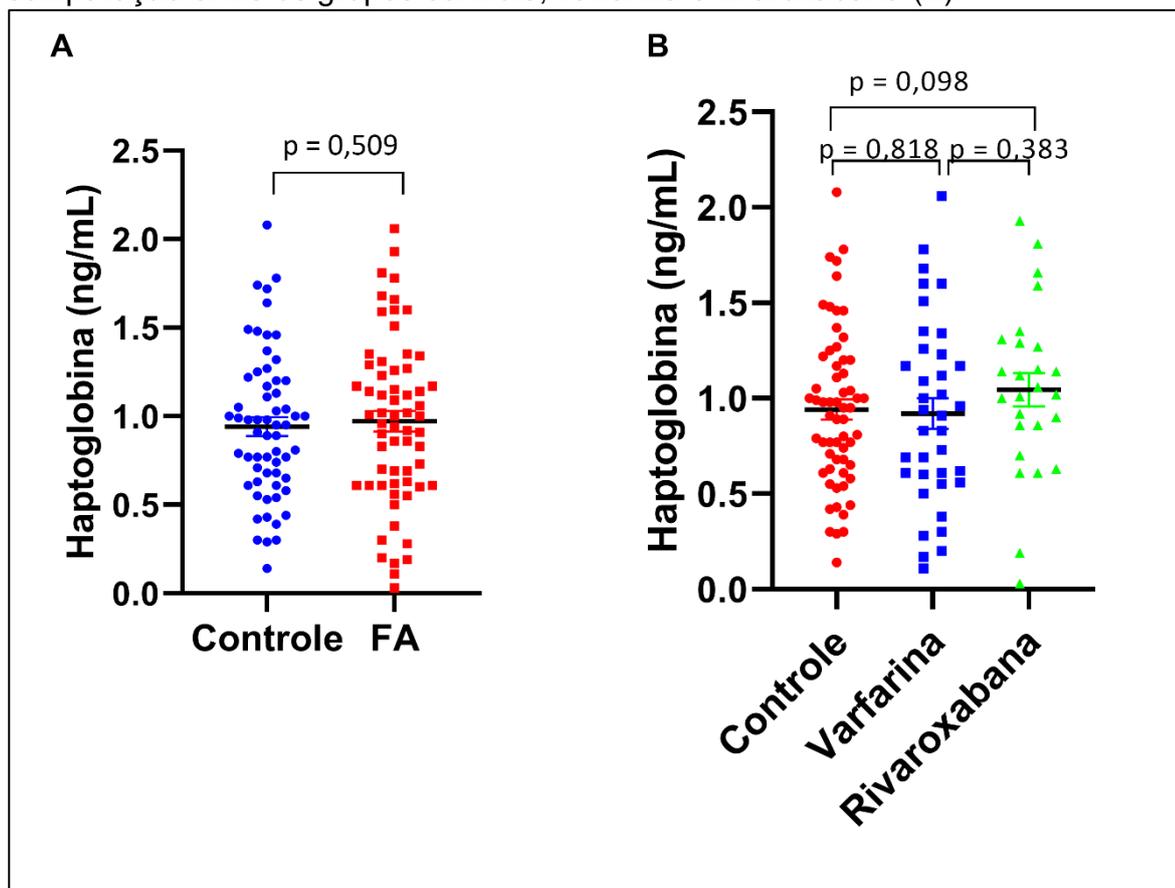
Tabela 7. Modelo de regressão linear múltiplo para biomarcador MTT e variáveis do estudo.

Termo	Coef	EP de Coef	T	P
Constante	1,0318	0,0618	16,70	<0,001
Gupos				
Rivaroxabana	-	-	-	-
Varfarina	-0,8308	0,0540	-15,40	<0,001
Controle	-0,8126	0,0674	-12,06	<0,001
Hipertensão				
Não	0,0118	0,0541	0,22	0,828
Dislipidemia				
Não	-0,0156	0,0423	-0,37	0,713
Atividade Física				
Não	0,0029	0,0723	0,04	0,968

5.4 Determinação sérica de Haptoglobina

Os níveis plasmáticos de haptoglobina não diferiram significativamente entre o grupo controle ($0,9 \pm 0,4$ ng/mL) e FA ($0,8 \pm 0,4$ ng/mL) (**Figura 5A**). Na comparação do grupo controle ($0,9 \pm 0,4$ ng/mL), varfarina ($0,8 \pm 0,4$ ng/mL) e rivaroxabana ($1,03 \pm 1,04$ ng/mL) também não houve diferença significativa nos níveis da proteína (**Figura 5B**).

Figura 5 - Níveis plasmáticos de Haptoglobina entre os grupos controle e FA (A), e na comparação entre os grupos controle, varfarina e rivaroxabana (B).



Legenda: A: Comparação entre os grupos controle (n=62) e FA (n=85); B: comparação entre os grupos controle (n=62), varfarina (n=47) e Rivaroxabana (n=38). Valor de $p < 0,05$ como significativo

5.5 Determinação da frequência alélica e genotípica do polimorfismo Hp2-Hp1 no gene da haptoglobina

O polimorfismo Hp1-Hp2 estava em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p=0,082$ para FA; $p=0,369$ para controles) para ambos os grupos. Não foi observada diferença significativa em relação à frequência genotípica entre os grupos FA e controle, de acordo com o modelo aditivo, recessivo ou dominante. A frequência alélica do polimorfismo Hp1-Hp2 também não apresentou diferença significativa entre os grupos FA e controle (**Tabela 8**). Apesar de não haver diferenças significativas na frequência genotípica e alélica, foi possível observar que, dentre os pacientes com FA (57%), assim como no grupo controle (63%), o genótipo Hp2-Hp2 foi mais frequente. Nos dois grupos o alelo mais frequente foi o Hp2 [FA (76%); controle (81,5%)].

Tabela 8. Frequência alélica e genotípica dos polimorfismos de Haptoglobina nos grupos controle e FA.

Modelo Aditivo	Controle (n=54)	FA (n=65)	OR	95% CI	P
Hp1-Hp1	0 (0%)	3 (4,5%)	0	0	
Hp2-Hp1	20 (37%)	25 (38,5%)	0,871	0,411-1,873	0,261
Hp2-Hp2	34 (63%)	37 (57%)	Reference		
Modelo Recessivo					
Hp2-Hp2	34 (63%)	37 (57%)	0,777	0,371-1,628	0,575
Hp1-Hp1 + Hp2-Hp1	20 (37%)	28 (43%)			
Modelo dominante					
Hp2-Hp2 + Hp2-Hp1	54 (100%)	62 (94%)	0	Não se aplica	0,126
Hp1-Hp1	0 (0%) ^b	4 (6%)			
Alelos					
Hp1	20 (18,5%)	31 (24%)	1,378	0,733 – 2,590	0,319
Hp2	88 (81,5%)	99 (76%)			

Teste qui-quadrado com análise residual. Significativo p< 0,05.

Os níveis plasmáticos de Hp foram comparados entre os genótipos do polimorfismo Hp1-Hp2, de acordo com o modelo aditivo, recessivo ou dominante em cada grupo, a fim de avaliar se o polimorfismo poderia alterar os níveis circulantes da proteína. Os níveis plasmáticos de Hp não diferiram entre os genótipos de acordo com cada modelo (**Tabela 9**).

Tabela 9. Níveis plasmáticos de Hp para cada genótipo do polimorfismo Hp1-Hp2 no gene da Hp.

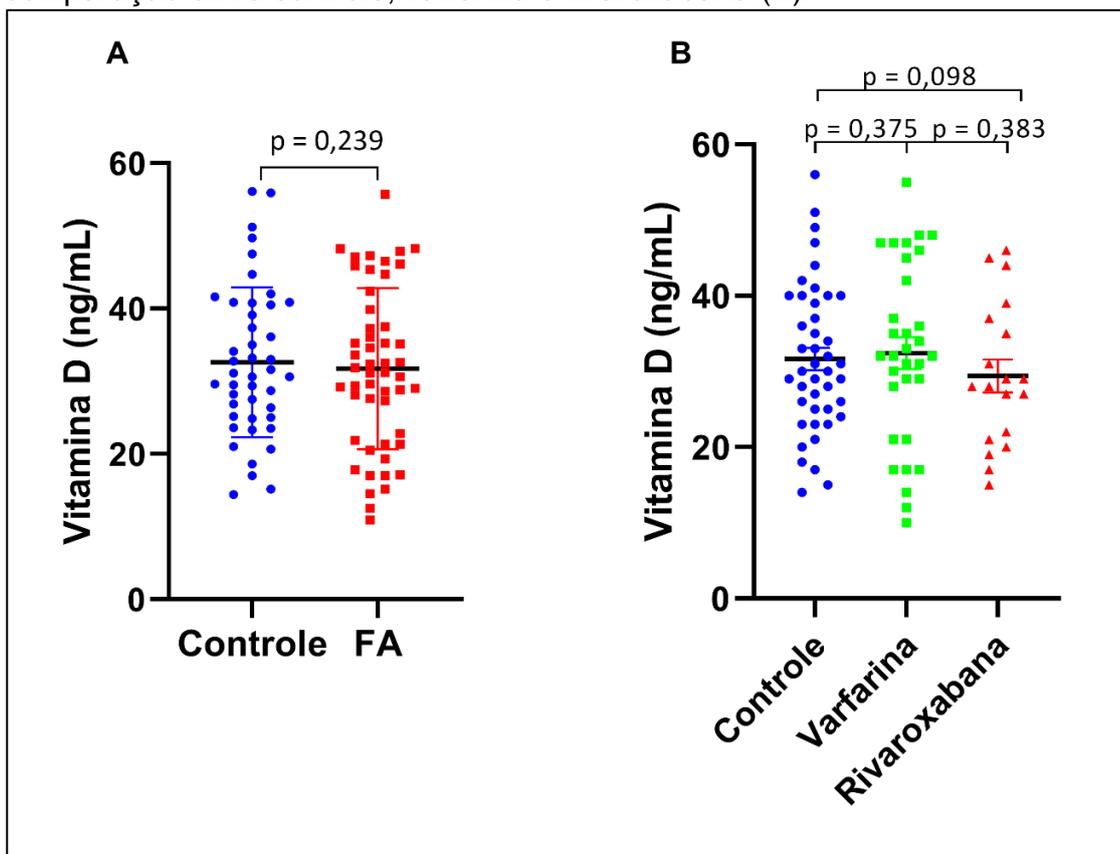
Haptoglobina (ng/mL)						
Modelo Aditivo	Controle	p	FA	p	População Total	p
Hp1-Hp1	0		0,83 ± 0,27		0,83 ± 0,27	
Hp2-Hp1	0,94 ± 0,29	0,868	1,05 ± 0,50	0,382	1,0 ± 0,42	0,481
Hp2-Hp2	0,92 ± 0,48		0,86 ± 0,44		0,90 ± 0,46	
Modelo Recessivo						
Hp2-Hp2	0,94 ± 0,29		0,88 ± 0,24		0,99 ± 0,41	
Hp1-Hp1 + Hp2-Hp1	0,92 ± 0,47	0,868	0,96 ± 0,48	0,736	0,90 ± 0,46	0,302
Modelo Dominante						
Hp1-Hp1	0	Não se aplica	1,02 ± 0,48		0,88 ± 0,24	
Hp2-Hp1 + Hp2-Hp2	0,93 ± 0,41		0,86 ± 0,44	0,238	0,94 ± 0,44	0,770

Teste de Levene e teste-t para igualdade de variâncias e médias, respectivamente. Significativo $p < 0,05$.

5.6 Determinação dos níveis de vitamina D

Os indivíduos do grupo controle (32 ± 10 ng/mL) comparados aos pacientes com FA ($33,4 \pm 14,7$ ng/mL) não apresentaram diferença significativa em relação aos níveis de vitamina D (**Figura 6A**). O mesmo resultado foi visto quando se comparou grupo controle (32 ± 10 ng/mL), varfarina ($35,8 \pm 15,2$ ng/mL) e rivaroxabana ($33 \pm 9,8$ ng/mL) (**Figura 6B**).

Figura 6 - Níveis plasmáticos de vitamina D entre os grupos controle e FA (A), e na comparação entre controle, varfarina e rivaroxabana (B).

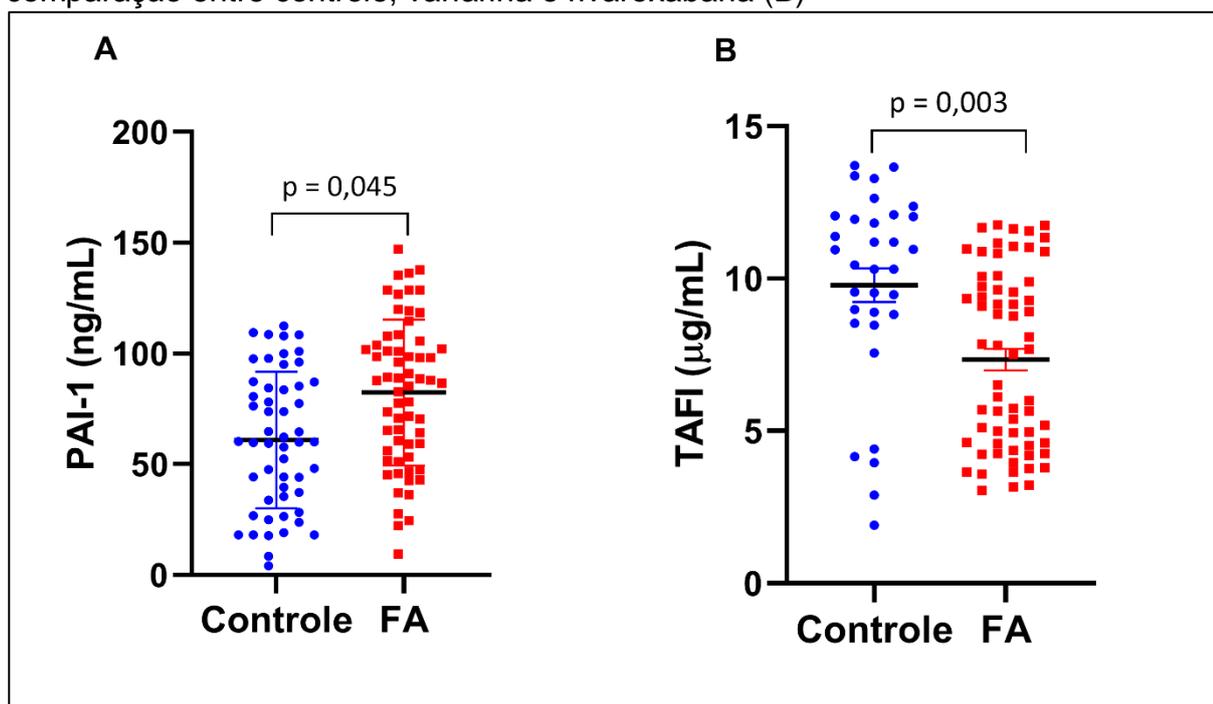


Legenda: A: Comparação entre os grupos controle (n=62) e FA (n=85); B: comparação entre os grupos controle (n=62), varfarina (n=47) e Rivaroxabana (n=38). Valor de $p < 0,05$ como significativo.

5.7 Determinação do sistema Fibrinolítico

Os níveis plasmáticos de PAI-1 e TAFI apresentaram diferenças significativas entre os grupos FA e controle. Os níveis de PAI-1 foram maiores nos pacientes com FA ($77,9 \pm 31,2$ ng/mL) em relação ao grupo controle ($67,4 \pm 33,9$ ng/mL, $p=0,045$) (**Figura 7A**). Já o TAFI apresentou menores níveis nos indivíduos com FA ($9,4 \pm 2,8$ μ g/mL) comparados aos indivíduos sem a arritmia ($10,3 \pm 2,5$ μ g/mL, $p=0,003$) (**Figura 7B**).

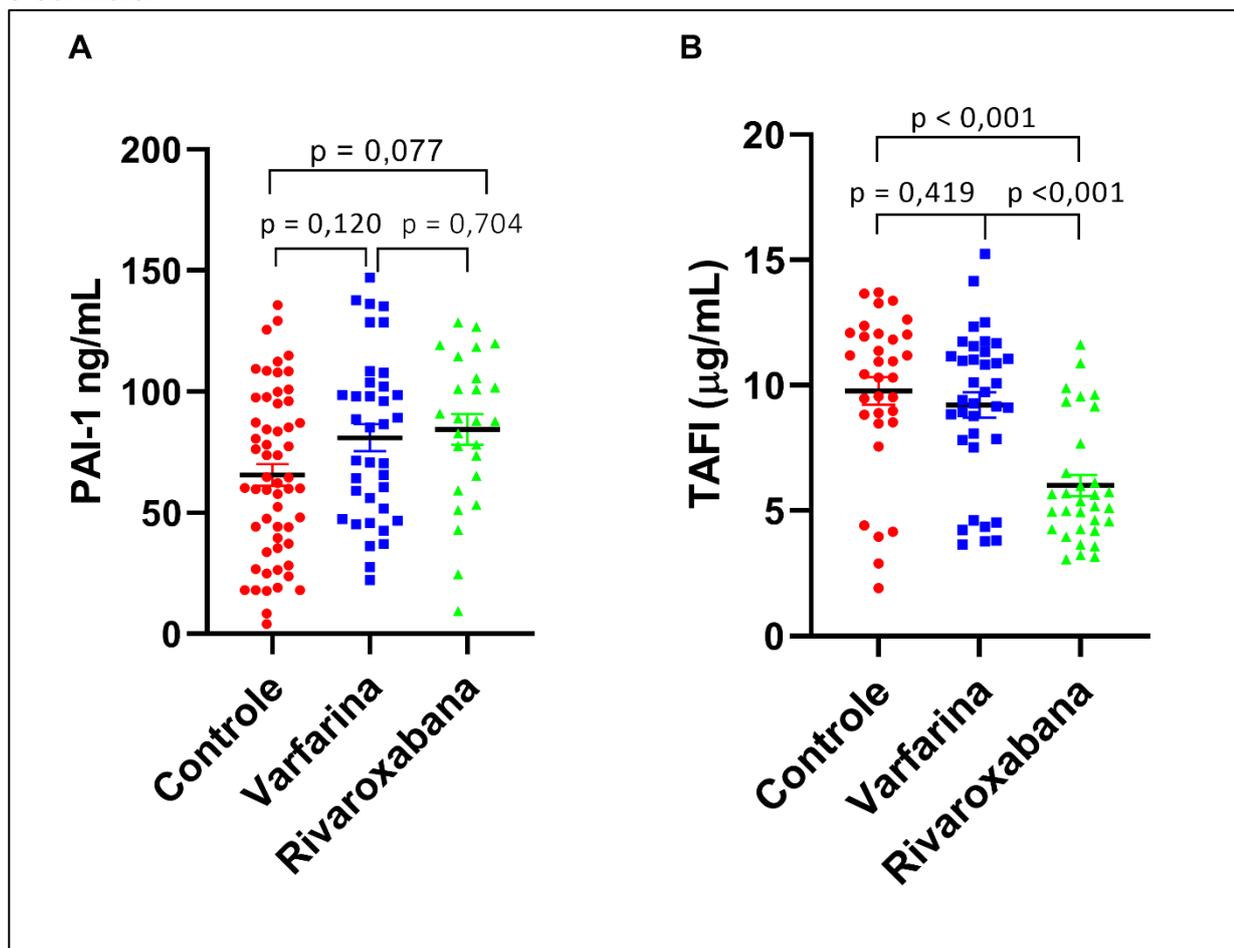
Figura 7 - Níveis plasmáticos de PAI-1 e TAFI entre os grupos controle e FA (A), e na comparação entre controle, varfarina e rivaroxabana (B)



Legenda: A: Níveis de PAI-1 (Inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1) comparados entre os grupos controle (n=62) e FA (n=85); B: níveis de TAFI (Inibidor da fibrinólise ativado por trombina) comparados entre os grupos controle (n=62), e FA (n=85). Valor de $p < 0,05$ como significativo.

Avaliando os grupos controle ($67,4 \pm 33,9$ ng/mL), varfarina ($80,3 \pm 26,6$ ng/mL) e rivaroxabana ($69,4 \pm 46,6$ ng/mL) separadamente, não foi possível observar diferença significativa nos níveis de PAI-1 entre os grupos (**Figura 8A**), mesmo quando variáveis de confusão são consideradas no modelo de regressão linear múltipla para o PAI-1 (dados não apresentados). Já os níveis séricos de TAFI apresentaram diferenças significativas entre os grupos, encontrando-se a diferença entre os indivíduos controle ($10,3 \pm 2,5$ µg/mL) e rivaroxabana ($7,4 \pm 2,5$ µg/mL $p < 0,001$), bem como entre varfarina ($10,0 \pm 2,6$ µg/mL) e rivaroxabana ($7,4 \pm 2,5$ µg/mL, $p < 0,001$) (**Figura 8B**). Essas diferenças foram mantidas mesmo quando consideradas as variáveis de confusão (Tabela 10).

Figura 8 - Níveis de PAI-1 (A) e TAFI (B) entre os grupos varfarina, rivaroxabana e controle.



Legenda: A: Níveis de PAI-1 (Inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1) comparados entre os grupos controle (n=62), varfarina (n=47) e rivaroxabana (n=38); B: níveis de TAFI (Inibidor da fibrinólise ativado por trombina) comparados entre os grupos controle (n=62), varfarina (n=47) e rivaroxabana (n=38). Valor de $p < 0,05$ como significativo.

Tabela 10. Modelo de regressão linear múltiplo para o biomarcador TAFI e variáveis do estudo.

Termo	Coef	EP de Coef	T	P
Constante	1,14	3,83	0,30	0,767
Idade	-0,0100	0,0405	-0,25	0,806
Colesterol Total	0,03162	0,00931	3,40	0,001
Rivaroxabana	-	-	-	-
Varfarina	3,141	0,750	4,19	<0,001
Controle	3,846	0,847	4,54	<0,001
Hipertensão				
Não	-0,508	0,833	-0,61	0,544
Dislipidemia				
Não	0,663	0,605	1,10	0,276
Atividade Física				
Não	0,303	0,846	0,36	0,721

5.8 Correlações entre as variáveis do estudo

As correlações significativas encontradas no presente estudo estão representadas na Tabela 11. Para isso, foram também incluídos os níveis de citocinas, cujos dados foram apresentados no estudo anterior do nosso grupo (MARTINS 2018).

Tabela 11. Correlação de Spearman entre os parâmetros avaliados na população total do estudo.

<i>Parâmetros</i>	<i>População Total</i>	
	<i>ρ de Spearman</i>	<i>p^*</i>
<i>PAI-1 vs TNF</i>	0,249	0,008
<i>PAI-1 vs IL-10</i>	0,233	0,013
<i>PAI-1 vs IL-6</i>	0,196	0,036
<i>PAI-1 vs IL-4</i>	0,212	0,023
<i>PAI-1 vs IL-2</i>	0,195	0,038
<i>TAFI vs IP-10</i>	-0,247	0,015
<i>TAFI vs MCP-1</i>	-0,339	0,001
<i>TAFI vs MIG</i>	-0,341	0,001
<i>TAFI vs IL-8</i>	-0,528	0,000
<i>TAFI vs IFN-γ</i>	-0,229	0,025
<i>TAFI vs TNF</i>	-0,286	0,005
<i>TAFI vs L-10</i>	-0,276	0,007
<i>TAFI vs IL-6</i>	-0,345	0,001

Legenda: PAI-1 = inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1; TAFI = inibidor da fibrinólise ativado por trombina.

Com base nos dados encontrados, observamos correlação positiva fraca de PAI-1 com os marcadores inflamatórios TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2. TAFI, por sua vez, apresentou correlação negativa fraca com os parâmetros inflamatórios IP-10, IFN- γ , TNF e IL-10, e negativa moderada com MCP-1, MIG e IL-6, além de uma correlação negativa forte com IL-8.

6.0 DISCUSSÃO

6.1 Caracterização demográfica, clínica e laboratorial dos participantes do estudo

Variáveis como hipertensão e dislipidemia apresentaram maiores níveis em FA quando comparadas ao grupo controle (Tabela 1), assim como foram mais frequentes nos indivíduos em uso de varfarina e rivaroxabana (Tabela 2). A Hipertensão é uma das comorbidades mais frequentemente associadas á FA (DU *et al.*, 2017; LAU *et al.*, 2017). A FA e HAS compartilham fatores de risco comuns que contribuem para o desenvolvimento dessas doenças, como tabagismo, DM e consumo de álcool (KALLISTRATOS *et al.*, 2018). A dislipidemia, conhecida como promotora de aterosclerose, é uma doença complexa e um fator de risco importante para eventos cardiovasculares (SCANDINAVIAN *et al.*, 1994; BERLENIR *et al.*, 1995; WONG, 2014). Porém, o papel da dislipidemia no desenvolvimento de outras condições cardíacas, tal como a FA, é pouco esclarecido. De uma forma geral, no nosso estudo, o maior número de pacientes com dislipidemia no grupo com FA e naqueles tratados com anticoagulantes, sugerem que a dislipidemia seja um fator de risco cardiovascular comum nesses pacientes.

No presente estudo, a variável dislipidemia foi mais frequente nos pacientes tratados com varfarina. Conseqüentemente, além do uso do anticoagulante, a maioria dos pacientes no grupo varfarina também faz uso de estatinas (Tabela 2). Diversos estudos têm testado a eficácia do tratamento com estatinas na prevenção de FA (INOUE *et al.*, 2016; SAI *et al.*, 2019). Uma subanálise conduzida por Kumagai *et al.* (2017) mostrou que em pacientes japoneses com DM e FA não valvar, o uso de varfarina combinado a um tratamento adicional com estatina foi um preditor independente de menor taxa de eventos tromboembólicos e redução significativa da taxa de mortalidade.

Os níveis séricos de GGT se mostraram aumentados nos pacientes com FA em comparação ao controle (Tabela 3), e na comparação entre aqueles em uso de anticoagulantes e controle, os níveis aumentados estavam nos pacientes em uso de varfarina. Ainda nos tratados com varfarina observamos maiores níveis séricos de AST (Tabela 4). Apesar de pouco compreendido, uma possível explicação sobre o mecanismo de interação entre enzimas hepáticas e FA na literatura, seria o fato de que

concentrações de ALT, AST ou GGT são utilizadas clinicamente para avaliar a gordura hepática não alcoólica, lesão no fígado e estresse oxidativo; fatores associados a um risco aumentado de FA. (TARGHER *et al.*, 2010; LIN *et al.*, 2012; ALONSO *et al.*, 2014). Além disso, alteração de enzimas hepáticas são forte indicador para doenças cardiovasculares (KUNUTSOR *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2019). Liu *et al.* (2019) sugerem que o nível basal de GGT é positivamente associado a incidência futura de FA, porém seus resultados não mostraram evidências de uma associação positiva de ALT ou AST com o risco de FA.

Na função renal, os níveis séricos de creatinina foram maiores nos pacientes com FA em relação ao controle (Tabela 3). E na comparação entre os tratamentos e controle, aqueles em uso de varfarina tinham níveis aumentados de creatinina (Tabela 4). Yao *et al.* (2017b) mostraram que o declínio da função renal é comum entre pacientes com FA tratados com agentes anticoagulantes orais. Portanto, o monitoramento da função renal em pacientes com esta arritmia merece atenção especial.

6.2 Análise dos parâmetros avaliados entre os grupos Controle e FA

Na avaliação do estresse oxidativo, não foi encontrada diferença significativa nos níveis de TBARS entre os grupos FA e controle. Já os níveis de MTT foram maiores no grupo FA em relação ao controle (Tabela 5). Níveis plasmáticos de TBARS podem prever eventos cardiovasculares independente de outros fatores de riscos tradicionais (WALTER *et al.*, 2008). Contrário ao nosso resultado, evidências na literatura relatam que os níveis plasmáticos de TBARS estão aumentados em pacientes com patologias cardiovasculares e envelhecimento (LEE *et al.*, 2012; WHITE *et al.*, 2013; KURLAK *et al.*, 2014; DA CRUZ *et al.*, 2014). Tahhan *et al.* (2017) mostraram que o aumento do estresse oxidativo, medido pelo GSH, está associado a prevalência e incidência de FA. O estudo conduzido por Huang *et al.* (2019), mostrou que os níveis de EROs foram significativamente maiores no grupo de pacientes com FA quando comparados ao grupo controle. A ação catalizadora da enzima NADPH oxidase pode contribuir significativamente para a produção de superóxido no miocárdio atrial humano em fibrilação, bem como para lesão oxidativa atrial e remodelação eletrofisiológica (KIM *et al.*, 2005).

Não houve diferença significativa em relação aos níveis de Hp entre os grupos controle e FA (Figura 5A). De acordo com Cholette *et al.* (2019), os níveis séricos de Hp aumentam em resposta a estímulos inflamatórios locais ou sistêmicos. Os principais indutores são citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, TNF e PCR, uma vez que a produção da proteína é induzida através da ligação dessas citocinas aos sítios reguladores do promotor do gene da Hp (NAKATA *et al.*, 2012; GERMOLEC *et al.*, 2018; CHOLETTE *et al.*, 2019). Além disso, há uma associação reconhecida entre os níveis de Hp e doenças cardiovasculares. Cholette *et al.* (2019) demonstraram que os pacientes pediátricos que passaram por cirurgia cardíaca e mostravam níveis mais elevados de Hb e níveis reduzidos de Hp, estavam associados a complicações clínicas pós-operatórias mais graves (infecção, trombose e morte), imunomodulação e inflamação. Wang *et al.* (2019) observaram uma relação causal entre os níveis séricos de Hp e macroangiopatia em pacientes chineses com DM.

Até onde vai o nosso conhecimento, não há outro estudo na literatura que avalie a determinação sérica de Hp em pacientes com FA. Diante dos nossos achados, a Hp não se mostrou um biomarcador para a FA. Segundo Kazmi *et al.* (2019), fatores como idade, sexo e ancestralidade podem influenciar os níveis de Hp. Estudos clínicos na população francesa mostraram que idade superior a 18 anos não influenciou no nível de Hp (FROGUEL *et al.*, 2012; SHAHABI *et al.*, 2012), e Langlois e Delanche (1996) mostraram que o sexo pode afetar os níveis de Hp circulantes (LANGLOIS E DELANGHE 1996). Soejima *et al.* (2014) também evidenciaram que a ancestralidade impacta na Hp circulante. Portanto, a comparação de estudos realizados em diferentes populações deve ser interpretada com cautela. Além disso, diferenças nos níveis de Hp podem ainda ser devido a diferenças metodológicas na técnica de ensaio de Hp entre os estudos (KAZMIA *et al.*, 2019).

A frequência alélica e genotípica do polimorfismo Hp1-Hp2 não diferiu entre o grupo controle e os pacientes com FA, de acordo com o modelo aditivo, recessivo ou dominante (Tabela 8). Sabe-se que indivíduos com o genótipo Hp2-Hp2 produzem uma proteína que é disfuncional na proteção contra danos oxidativos causados pela Hb, levando ao aumento do estresse oxidativo e inflamação (GUETTA *et al.*, 2007; LEVY *et al.*, 2007). Dallan *et al.* (2016) mostraram que o genótipo Hp2-Hp2 em pacientes com diabetes, foi associado com maiores níveis de PCR-hs. Portanto, o produto proteico do alelo Hp2 é um antioxidante inferior em comparação com o alelo Hp1. Além disso, vários

estudos têm mostrado que indivíduos com genótipo Hp2-Hp2 apresentam risco aumentado de complicações cardiovasculares (LEVY *et al.*, 2002; CHIELLINI *et al.*, 2004; CAHILL *et al.*, 2013; Ijäs *et al.*, 2013; CAHILL *et al.*, 2015; IJÄS *et al.*, 2017). No entanto, não há estudos que avaliaram se tal genótipo está associado a um risco aumentado da ocorrência de FA.

Mesmo sem diferenças significativas, observamos em nossos resultados que o genótipo Hp2-Hp2 foi o mais frequente nos pacientes com FA e no grupo controle. Já o alelo com maior frequência em ambos os grupos foi Hp2. As frequências dos alelos e genótipos Hp variam em todo o mundo. Estudos prévios indicam que o alelo Hp1 é mais frequente na África e na América do Sul e menos frequente no Sudeste Asiático. Nos países ocidentais, a distribuição média dos genótipos Hp é 16% Hp1-Hp1, 48% Hp2-Hp1 e 36% Hp2-Hp2, que correspondem a frequências de alelos de cerca de 40% Hp1 e 60% Hp2 (CARTER E WORWOOD, 2007; YANG *et al.*, 2016). Assim como no presente estudo, os trabalhos de Carvalho *et al.* (2017) e Rodrigues *et al.* (2019) também avaliaram a frequência genotípica e alélica do polimorfismo Hp1-Hp2 na população brasileira. Os genótipos Hp2-Hp1 e Hp1-Hp1 foram os mais frequentes entre os grupos avaliados nos respectivos trabalhos e, conforme os resultados destes estudos, o alelo Hp2 foi o mais frequente. Esses resultados mostram o padrão genético da população brasileira em relação ao polimorfismo Hp1-Hp2, levando em consideração que as características genéticas dessa população são provenientes da miscigenação europeia, africana e indígena. Embora não haja na literatura estudos sobre a avaliação genética do polimorfismo Hp1-Hp2 no gene da Hp especificamente em pacientes com FA, o fenótipo Hp2-Hp2 é associado a um risco cardiovascular aumentado.

Os genótipos do polimorfismo Hp1-Hp2 do gene da Hp dentro dos modelos aditivos, recessivo e dominante, não alteraram os níveis séricos da Hp (Tabela 9). Segundo Kazmia *et al.* (2019), os efeitos diferenciais dos alelos Hp1 e Hp2 podem ser mediados por uma diferença nos níveis da Hp circulante. Langlois e Delanghe (1996) mostraram que polimorfismos influenciam as concentrações de Hp circulantes tendo em vista seu efeito na funcionalidade da proteína, e que o genótipo Hp2-Hp2 é conhecido por estar associado a concentrações plasmáticas de Hp mais reduzidas em comparação com o genótipo Hp1-Hp1. Contrário ao nosso estudo, evidências mostram concentrações de Hp dependentes de genótipo em doenças cardiovasculares.

Trabalhos como o de Lee *et al.* (2013) e Moussa *et al.* (2014) mostram maiores níveis de Hp associados ao fenótipo Hp1-Hp1 em comparação a Hp2-Hp2 nos pacientes com DAC. Esta descoberta é consistente com o fenótipo Hp1-Hp1 tendo maior afinidade de ligação a Hb (MELAMED-FRANK *et al.*, 2001). Dado ao exposto, pacientes com o genótipo Hp1-Hp1 teriam um risco reduzido a doenças cardiovasculares. No entanto, nossos resultados sugerem que as concentrações séricas de Hp na FA são independentes do polimorfismo Hp1-Hp2.

Os níveis séricos de vitamina D não diferiram entre o grupo controle e FA (Figura 6A). Fatores fundamentalmente ligados a patologia da FA como inflamação e estresse oxidativo têm sido associados a deficiência de vitamina D. Assalin *et al.* (2013) avaliaram o efeito da deficiência da vitamina D no metabolismo cardíaco e observaram uma associação significativa entre deficiência de vitamina D e inflamação cardíaca. Os autores observaram um aumento da concentração de citocinas como: TNF e IFN- γ . Sobre a relação entre vitamina D e estresse oxidativo, Dzik *et al.* (2018) demonstraram que a deficiência de vitamina D aumenta a citotoxicidade mediada por EROs. Os autores relatam que é provável que deficiência de vitamina D a longo prazo induza geração de EROs e, em consequência, efeitos deletérios na função mitocondrial que levaria a atrofia muscular severa.

Até o momento, várias evidências revelaram que níveis reduzidos de vitamina D estão associados a FA após cirurgia de revascularização do miocárdio (EMREN *et al.*, 2016; GODE *et al.*, 2016; OZSIN *et al.*, 2018). Liu *et al.* (2019), avaliando a associação dose-resposta entre vitamina D e FA, sugeriram que a deficiência de vitamina D é um preditor moderado de FA (risco de 23%). Já Alonso *et al.* (2016) não encontraram associação clinicamente relevante de níveis reduzidos de vitamina D circulantes com risco de FA. Os resultados de vários estudos observacionais sugerem que os pacientes com deficiência de vitamina D têm aproximadamente duas vezes mais chances de desenvolver FA do que os pacientes com níveis normais (> 30 ng/mL) (DEMIR *et al.*, 2014; OZCAN *et al.*, 2015; BELEN *et al.*, 2016). Neste contexto, a não associação entre os níveis de vitamina D e FA observada em nossos resultados poderia ser explicada pelo fato de que, em todos os grupos analisados neste estudo, poucos participantes mostraram níveis deficientes ou insuficientes de vitamina D (FERREIRA *et al.*; 2017).

Um importante mecanismo fisiopatológico envolvido na relação entre vitamina D e FA consiste na ativação do sistema RAAS. Tal sistema desempenha um importante papel na remodelação elétrica e estrutural dos átrios. Pesquisas relatam que o bloqueio da via RASS pode representar efeitos benéficos no remodelamento elétrico cardíaco e consequentemente diminuir o risco de FA (BOLDT *et al.*, 2006; FORMAN *et al.*, 2010; KHATIB *et al.*, 2013). Estudos experimentais em animais mostram que vitamina D poderia inibir o sistema RASS (YI-JEN *et al.*, 2010), sugerindo que a deficiência de vitamina D pode estar associada ao aumento do risco de FA pela ausência da regulação negativa do sistema RAAS.

Os pacientes com FA apresentaram maiores níveis de PAI-1 quando comparados ao grupo controle (Figura 7A). Corroborando com nosso resultado, uma meta-análise reunindo 59 estudos mostrou maiores níveis de PAI-1 em pacientes com FA em comparação ao grupo controle (WU *et al.*, 2015). Matusik *et al.* (2017) demonstraram que PAI-1 foi positivamente correlacionado com a fração de ejeção do ventrículo esquerdo em pacientes com FA. Na avaliação dos níveis de TAFI, pacientes com FA apresentaram menores níveis do marcador quando comparados ao grupo controle (Figura 7B). Este resultado contraria um grande número de evidências indicando que níveis elevados de TAFI pode representar um marcador de fibrinólise alterada e um potencial fator de risco para trombose (revisado por CLAESSEN *et al.*, 2021). Alessi *et al.* (2016) investigaram a correlação dos níveis de TAFI com a ocorrência e gravidade de AVE. Os autores concluíram que maiores níveis de TAFI estão associados à gravidade clínica durante a trombose. Grosso *et al.* (2017) observaram níveis aumentados de TAFI em pacientes com síndrome fosfolipídica afetados por trombose arterial. No entanto, é possível encontrar na literatura relatos de níveis diminuídos de TAFI em DAC (JUHAN *et al.*, 2002; SCHROEDER, *et al.*, 2002; SANTAMARÍA, *et al.*, 2004). Pang *et al.* (2016) demonstraram menores níveis séricos de TAFI em pacientes com SCA.

Sobre essa relação ambígua dos níveis séricos de TAFI em patologias cardíacas, podemos enumerar alguns motivos encontrados na literatura. Primeiro, diferentes estágios da doença cardiovascular podem influenciar nos níveis séricos de TAFI. Pang *et al.* (2016) sugerem que a redução de TAFI pode ser parcialmente justificada por um grande consumo do inibidor fibrinolítico no estágio agudo da SCA. Os autores suportam a explicação se embasando no trabalho de Brouns *et al.* (2010),

que mostrou que a concentração sérica de TAFI continuamente reduzida estava intimamente associada com ativação extensa de TAFI, AVE em fase inicial, evolução desfavorável na fase aguda e desfecho insatisfatório. Segundo, diferentes ensaios ou reatividade de anticorpos para diferentes isoformas de TAFI podem explicar as diferenças nos níveis de TAFI entre os pesquisadores. Com relação aos ensaios, vários trabalhos usam métodos distintos na determinação sérica de TAFI, o que dificulta a comparação entre os diversos estudos. Neste trabalho, a determinação de TAFI foi realizada através do VisuLize™ TAFI Antigen Kit (AFFINITY BIOLOGICALS INCORPORATED, Canada) que faz a determinação do antígeno TAFI. No entanto, outros autores utilizaram diferentes metodologias para a determinação sérica de TAFI. Matusik *et al.* (2020) determinaram antígeno TAFI por ELISA com um conjunto de reagentes comerciais da American Diagnostica. Pang *et al.* (2016) avaliaram os níveis de TAFI por Kit imunoturbidimetria, aplicando analisador bioquímico automático (Beckman Coulter, EUA).

Pensando em TAFI como um alvo terapêutico atraente, suas isoformas devem ser consideradas. Uma vez ativado, o TAFIa perde sua atividade em 8-15 min a 37°C devido à instabilidade térmica, gerando uma forma inativada (TAFIai) (FOLEY *et al.*, 2013). Segundo Sillen e Declerck 2021, uma vez que nenhum inibidor fisiológico de TAFI foi descrito, acredita-se que essa instabilidade intrínseca de TAFIa desempenhe um papel na autorregulação de sua atividade antifibrinolítica *in vivo*. A instabilidade térmica do TAFIa torna difícil medir a atividade da enzima. Neste contexto, quantificar a extensão da ativação de TAFI por meio da medição do antígeno TAFI ativado/inativado (TAFIa/ai) é uma ferramenta mais precisa para avaliar o papel da ativação de TAFI nas diversas fisiopatologias (CERESA *et al.*, 2006; TREGOUET *et al.*, 2009). Grosso *et al.* (2017) analisaram níveis de TAFI (pró-enzima) pelo STA® - Stachrom® TAFI kit (Diagnostica Stago, France), e TAFIa (enzima) foi quantificado pela medição do complexo TAFIa/ai (complexo de formas ativas e inativas da enzima correspondente à concentração da forma ativa que não pode ser medida devido a instabilidade) usando um kit de ELISA Asserachrom TAFIa/ai; Diagnostica Stago, França. Os resultados mostraram um aumento tanto de TAFI quanto de TAFIa em pacientes com síndrome antifosfolípídica em relação ao controle. Além disso, os autores verificaram que a ativação do TAFI está associada ao fenótipo clínico de trombose arterial.

Terceiro, a análise genética mostra que polimorfismos no gene de TAFI podem contribuir para a diminuição dos níveis séricos do inibidor fibrinolítico (JUHAN *et al.*, 2002; FRÈRE *et al.*, 2005). O estudo conduzido por Harshfield *et al.* (2020) reuniu 27 *genome wide association studies* (GWAS) avaliando a associação de parâmetros hematológicos e AVE. Os autores constataram que níveis reduzidos de antígeno TAFI estavam significativamente associados com aumento do risco de desenvolver isquemia e com polimorfismos no gene TAFI. Os polimorfismos 1542C e Thr147 estão intimamente associados à concentração de TAFI. Em geral, os portadores desses dois alelos apresentam níveis séricos de TAFI mais elevados (HENRY *et al.*, 2001). Em contrapartida, o genótipo GG do polimorfismo C + 1542G, o genótipo TT do polimorfismo Thr325Ile e o genótipo GG do polimorfismo Ala147Thr estão associados a níveis mais reduzidos do antígeno TAFI_{1a/ai} (TÁSSIE *et al.*, 2009). O estudo avaliando níveis de TAFI e seus polimorfismos em dislipidêmicos, mostrou que os genótipos TT, GG e 1542CC referentes aos respectivos polimorfismos: Thr325Ile, Ala147Thr e +1542C/G, estão associados a menores níveis de TAFI na população brasileira (SANTOS *et al.*; 2014). Como não realizamos avaliação de polimorfismos no gene de TAFI, não é possível afirmar o quanto as características genéticas poderiam modificar os níveis de TAFI encontrados em pacientes com FA.

6.3 Análise dos parâmetros avaliados entre os grupos Controle e FA em uso de Varfarina ou Rivaroxabana

Em relação ao estresse oxidativo, não observamos diferenças significativas no nível de TBARS na comparação entre os grupos controle, varfarina e rivaroxabana. Já para MTT, nota-se maiores níveis do marcador antioxidante nos pacientes em uso de rivaroxabana (Tabela 6). Há hipóteses na literatura que o tratamento com rivaroxabana pode indiretamente reduzir a geração de EROS. Acredita-se que, pela ação do FXa, MCP-1 potencializam a geração de EROS. Neste contexto, foi relatado que o tratamento com rivaroxabana suprime a transcrição gênica de MCP-1 em células tubulares por meio da inibição do FXa (ISHIBASHI *et al.*, 2014). Narita *et al.* (2019) também encontraram o tratamento com rivaroxabana suprimindo o estresse oxidativo conduzido por FXa em células tubulares proximais humanas. Camisoto *et al.* (2019) relataram que a ativação da glicoproteína GPVI está associada a um grande aumento do estresse oxidativo. O tratamento com rivaroxabana inibiu a ativação de plaquetas humanas, diminuindo a ativação de GPVI e, conseqüentemente, reduzindo o estresse

oxidativo. Danos no DNA são frequentemente causados pela presença do estresse oxidativo. Woźniak *et al.* (2020) avaliaram o efeito reparador e protetivo dos anticoagulantes dabigatrana e rivaroxabana na produção de EROS e danos oxidativos no DNA em um modelo de dano endotelial vascular. Os resultados indicaram que o tratamento com dabigatrana e rivaroxabana inibiram a produção de EROs nas células do endotélio vascular testadas e, conseqüentemente, neutralizaram os danos ao DNA.

As evidências acima embasam uma hipótese diante dos resultados obtidos sobre a avaliação dos marcadores do estresse oxidativo: a ausência de diferença significativa dos níveis de TBARS entre os grupos analisados pode estar associada à maior capacidade antioxidante de rivaroxabana. Porém, mais estudos são necessários para detalhar a eficiência do efeito antioxidante deste anticoagulante.

Diante do exposto, o tratamento com rivaroxabana nos pacientes com FA, poderia influenciar na resposta ao estresse oxidativo além de exercer um efeito anti-inflamatório como demonstrado em em um estudo anterior do nosso grupo (MARTINS *et al.*; 2020). Martins *et al.* (2020) relatam que os pacientes com FA apresentam um aumento dos níveis de citocinas inflamatórias em relação ao controle. Quando os autores avaliam os tratamentos rivaroxabana e varfarina, o uso de rivaroxabana foi associado a uma diminuição de citocinas inflamatórias (IL-2, IL-4, IL-10, TNF e IFN- γ) em comparação a varfarina. Muitos outros estudos pontuam o potencial da rivaroxabana em ter efeito anti-inflamatório além de suas ações anticoagulantes (WU *et al.*, 2015; ELLINGHAUS *et al.*, 2016; KONDO *et al.*, 2018; MIYAZAWA *et al.*; 2018). É provável que o FXa medeia a sinalização inflamatória no tecido atrial, possivelmente pela ativação de receptores ativados por protease. Portanto, o potencial efeito anti-inflamatório da rivaroxabana pode ser devido a uma inibição direta do FXa (STEINBERG *et al.*, 2005; BUKOWSKA *et al.*, 2013).

Os níveis séricos de PAI-1 não apresentaram diferenças significativas comparando os grupos controle, varfarina e rivaroxabana (Figura 8A). Já para os níveis séricos de TAFI houve diferença significativa entre os grupos (Figura 8B), sendo os pacientes em uso de rivaroxabana com menores níveis séricos do marcador. O estudo conduzido por Sanda *et al.* (2020) mostrou que o tratamento com dabigatrana, anticoagulante usado no tratamento de FA não valvar que inibe o fator II ativado (FIIa), reduziu significativamente a expressão dos níveis de PAI-1 e TAFI, e a atividade

trombolítica em camudongos. Ma *et al.* (2017) relatam que a terapia anticoagulante de rivaroxabana pode inibir a expressão de TAFI, PAI-1, PAIs, PDF, fator de von Willebrand (vWF) e tromboxano. Interessantemente, além da inibição nos parâmetros fibrinolíticos, os autores observaram que o tratamento com rivaroxabana inibiu a resposta inflamatória (reduziu expressão de neutrófilos, IL-1, IL-6, IL-7 E TNF), e o recrutamento de células inflamatórias induzido por MMP-9 *in vitro* (células endoteliais venosas) e *in vivo* (modelo de rato de trombo venoso profundo). Os autores investigaram os efeitos pleiotrópicos da rivaroxabana na função endotelial através da via de sinalização NFK β *in vitro* e *in vivo*. Os resultados mostraram uma tendência decrescente nos níveis de fatores de transcrição NFK β (I κ B α , I κ B β e I κ B ϵ), sugerindo que a rivaroxabana apresenta propriedades anti-inflamatórias e pró-fibrinolíticas mediadas pela sinalização de NFK β .

O estudo conduzido por Kirchof *et al.* (2020) avaliou os efeitos da Rivoraxabana em biomarcadores da coagulação e inflamação. Os autores observaram que o tratamento com rivaroxabana foi associado a níveis reduzidos de dímero D, complexo trombina-antitrombina III (TAT), PCR, e IL-6. Entretanto, trabalhos avaliando a relação entre marcadores fibrinolíticos e inflamatórios em pacientes com FA tratados com rivaroxabana, ainda são escassos na literatura. Nosso resultado de avaliação fibrinolítica juntamente com resultados de parâmetros inflamatórios avaliado em um estudo anterior do nosso grupo (MARTINS *et al.*, 2020), corroboram com a ideia de que fatores de risco trombogênico, como alterações nos níveis de marcadores fibrinolíticos e aumento do perfil inflamatório, podem ser regulados no tratamento com rivaroxabana.

Além disso, em nossa análise de correlação, os marcadores fibrinolíticos avaliados se correlacionaram com vários parâmetros inflamatórios. PAI-1 apresentou uma correlação positiva fraca com TNF, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2. Já TAFI apresentou uma correlação negativa fraca com IP-10, TNF e IL-10; correlação negativa moderada com MCP-1, MIG e IL-6; e correlação negativa forte com IL-8 (Tabela 11). Coagulação e inflamação são processos fortemente associados. A inflamação leva à ativação da coagulação e a coagulação ativada afeta consideravelmente as atividades inflamatórias. Citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores são capazes de ativar o sistema de coagulação e regular negativamente importantes vias anticoagulantes fisiológicas (LEVI E POLL, 2015).

O sistema fibrinolítico exibe funções críticas envolvidas em vários aspectos da progressão da inflamação. Evidências antigas como os trabalhos de Juhan-Vague *et al.* (1984) e Kluft *et al.* (1985), já mostravam que níveis de PAI-1 são elevados em locais com inflamação, o que pode ter duas causas. Primeiro, a inflamação é normalmente acompanhada pela geração excessiva de trombina. O excesso de trombina leva a ativação plaquetária, liberando PAI-1 armazenado nas plaquetas (HUEBENER *et al.*, 2018). Segundo, múltiplas citocinas inflamatórias regulam positivamente a expressão de PAI-1 (RAWSON *et al.*, 2016). Trabalhos como os de Renckens *et al.* (2005) e Gupta *et al.* (2016) demonstram que a deficiência de PAI-1 reduz significativamente a inflamação de fase aguda em modelos animais sépticos induzidos por endotoxinas. Em um modelo de camundongo séptico induzindo inflamação por lipossacarídeo (LPS), houve um aumento significativo na deposição de fibrina pulmonar e lesão pulmonar, que aparentemente foi melhorada pela deficiência de PAI-1 (POOLE *et al.*, 2017).

As correlações negativas entre TAFI e parâmetros inflamatórios vistas neste trabalho corroboram com outros estudos na literatura. Pang *et al.* (2016) investigaram a correlação entre TAFI e citocinas pró-inflamatórias em pacientes com síndrome coronariana aguda. Os autores apontaram uma correlação negativa forte entre TAFI e concentrações de IL-1 β , IL-6, TNF e procalcitonina (PCT). Komnenov *et al.* (2015) conduziram um trabalho onde células HepG2 cultivadas, tratadas com citocinas pró-inflamatórias: IL-6, TNF e IL-1, reduzem a geração de TAFI pela metade. Em contraste, quando tratadas com citocina anti-inflamatória IL-10, as células HepG2 dobram a expressão de TAFI. Além disso, TAFIa pode agir inativando mediadores inflamatórios incluindo elementos do complemento C5a e C3a (LEUNG *et al.*, 2008). Entretanto, a correlação negativa entre níveis séricos de TAFI e parâmetros inflamatórios indica um mecanismo de regulação ainda não preciso na literatura.

7.0 CONCLUSÃO

Para o presente estudo, os resultados obtidos entre a comparação de pacientes com FA e o grupo controle nos permite as seguintes conclusões: os pacientes com FA mostraram um maior perfil antioxidante. Ao contrário do que se esperava para uma avaliação de doenças cardiovasculares, os parâmetros vitamina D, Hp e seus polimorfismos não se mostraram como biomarcadores para a arritmia. Os pacientes com FA, ao mesmo tempo, apresentaram um estado pró-trombótico (constatado pelo aumento de PAI-1), e, de forma inesperada um fraco risco trombótico (pela redução dos níveis de TAFI). Porém, juntamente com outros estudos contraditórios na literatura, este resultado reforça a relação ambígua dos níveis de TAFI nas patologias cardíacas.

Na comparação entre os pacientes com FA em uso dos anticoagulantes varfarina ou rivaroxabana e o grupo controle, nós podemos concluir que: o anticoagulante rivaroxabana apresentou um maior potencial antioxidante, sugerindo que tal tratamento pode influenciar de forma positiva no processo de estresse oxidativo. Além disso, rivaroxabana promoveu a redução dos níveis de TAFI, sugerindo que, além do potencial anti-inflamatório visto na literatura, o tratamento com rivaroxabana pode ter efeito pró-fibrinolítico na população com FA.

Na análise de correlação, a relação positiva de PAI-1 com alguns parâmetros inflamatórios, mostra que a inflamação local pode levar a um aumento de PAI-1, ou vice e versa. Já as relações negativas de TAFI com parâmetros inflamatórios, sugere que a redução do marcador fibrinolítico possa ser influenciada por um aumento de citocinas pró-inflamatórias na população FA visto na literatura.

De forma geral, o efeito benéfico do anticoagulante rivaroxabana na modulação de vias como a do estresse oxidativo, fibrinolítico e do processo de inflamação sugeridos pelos resultados deste trabalho, se mostra de grande interesse clínico para os pacientes com FA que fazem uso de anticoagulantes orais, uma vez que várias comorbidades que cursam com a arritmia impactam nessas vias fisiopatológicas. Porém, outros estudos são necessários para uma melhor compreensão sobre o perfil do medicamento nas complicações da arritmia.

8.0 Limitações do estudo

As principais limitações do presente estudo são: o fato dos participantes do grupo controle terem sido selecionados de academias públicas, portanto, foram favorecidos quanto ao parâmetro de atividade física quando comparados aos grupos de tratamento. Outro importante fator limitante é o fato de que diferentes ensaios ou reatividade de anticorpos a diferentes isoformas podem ser aplicados na avaliação do marcador antifibrinolítico TAFI. Neste trabalho, a metodologia utilizada para este fim refere-se apenas à dosagem do antígeno TAFI, desconsiderando as diferentes isoformas que o marcador pode apresentar devido à instabilidade térmica no processo de medição. Os diferentes métodos utilizados para determinar os níveis de TAFI sérico dificultam comparações entre diferentes estudos. Por fim, este estudo foi baseado em um tamanho de amostra relativamente pequeno dos grupos analisados. Estudos com um tamanho amostral maior ainda são necessários para validar os achados.

9.0 Referências Bibliográficas

ADAMS, J. N. *et al.* Genetic analysis of haptoglobin polymorphisms with cardiovascular disease and type 2 diabetes in the Diabetes Heart Study. **Cardiovasc. Diabetol**, v. 11, p. 12-31, 2013.

AGENO, W. *et al.* Oral anticoagulant therapy: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. **Chest**, v. 141, p. 44-88, 2012.

AHA/ACC/HRS guideline for the management of patients with atrial fibrillation: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the Heart Rhythm Society. **J. Am. Coll. Cardiol**, v. 64, p. 2305-2307, 2014.

ALESSANDRI, A. L. *et al.* Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. **Pharmacol. Ther**, v. 139, p. 189-212, 2013.

ALESSI, M. C. *et al.* Changes in Activated Thrombin-Activatable Fibrinolysis Inhibitor Levels Following Thrombolytic Therapy in Ischemic Stroke Patients Correlate with Clinical Outcome. **Cerebrovasc. Dis**, v. 42, p. 404-414, 2016.

AL-HORANI, R. A. *et al.* Recent advances on plasmin inhibitors for the treatment of fibrinolysis-related disorders. **Med. Res. Ver**, v. 34, p. 1168-1216, 2014.

ALMENOFF, P. L. *et al.* Pulmonary function survey in spinal cord injury: influences of smoking and level and completeness of injury. **Lung**, v. 173, p. 297-306, 1995.

ALONSO, A. *et al.* Serum 25-hydroxyvitamin D and the incidence of atrial fibrillation: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. **Eur**, v. 18, p. 1143-1159, 2016.

ANDRADE, J. *et al.* The Clinical profile and pathophysiology of atrial fibrillation: relationships among clinical features, epidemiology, and mechanisms. **Circ. Res**, v. 114, p. 1453-1468, 2014.

ANGIOLLILLO, D. J. *et al.* Antagonismo do receptor de trombina plaquetária e aterotrombose. **Eur. Heart. J**, v. 31, p. 17-28, 2010.

ANTONIAK, S. *et al.* Protease activated receptor-2 contributes to heart failure. **P. One**, v. 8, p. 817-833, 2013.

ASLEH, R. *et al.* Genetically determined heterogeneity in hemoglobin scavenging and susceptibility to diabetic cardiovascular disease. **Mol. Med**, v. 92, p. 1193-1200, 2003.

ASLEH, R. *et al.* Correction of HDL dysfunction in individuals with diabetes and the haptoglobin 2–2 genotype. **Diab**, v. 57, p. 2794-2800, 2008.

ASSALIN, H. B. *et al.* Impact of the length of vitamin D deficiency on cardiac remodeling. **Circ. Heart. Fail**, v. 6, p. 809-816, 2013.

AULIN, A. S. *et al.* Interleukin-6 and C-reactive protein and risk for death and cardiovascular events in patients with atrial fibrillation. **A. Heart J**, v. 170, p. 1151-1160, 2015.

AVENELL, A. *et al.* Vitamin D and Vitamin D analogues for preventing fractures in post-menopausal women and older men. **Cochr. Dat. Syst. Ver**, v. 2014, p. 1-140, 2014.

AVILES, R. J. *et al.* Inflammation as a risk factor for atrial fibrillation. **Circ**, v. 108, p. 3006-3010, 2003.

BAEK, Y. S. *et al.* Prevalence and the clinical outcome of atrial fibrillation in patients with autoimmune rheumatic disease. **Int. J. Cardiol**, v. 214, p. 4-9, 2016.

BAEUERLE, P. A. *et al.* Function and activation of NF-kappaB in the immune system. **Annu. Rev. Immunol**, v. 12, p. 141-179, 1994.

BAI, Y. *et al.* Rivaroxaban versus dabigatran or warfarin in real-world studies of stroke prevention in atrial fibrillation. **Strok**, v. 48, p. 970-976, 2017.

BAS, H. A. *et al.* The association of plasma oxidative status and inflammation with the development of atrial fibrillation in patients presenting with ST elevation myocardial infarction. **Scand. J. Clin. Lab. Invest**, v. 77, p. 77-82, 2017.

BAUERSACHS, R. *et al.* Rivaroxaban: A New Treatment Paradigm in the Setting of Vascular Protection? **Thromb. Haemost**, v. 29, p. 12-22, 2018.

BELLAN, M. L. *et al.* Pathophysiological role and therapeutic implications of vitamin D in autoimmunity: focus on chronic autoimmune diseases. **Nutrients**, v. 12, p. 789, 2020.

BELEN, E. *et al.* Low-Level Vitamin D Is Associated with Atrial Fibrillation in Patients with Chronic Heart Failure. **Adv. Clin. Exp. Med**, v. 25, p. 51-57, 2016.

BERKOVA, N. *et al.* TNF-induced haptoglobin release from human neutrophils: pivotal role of the TNF p55 receptor. **J. Immunol**, v. 162, p. 6226-6232, 1999.

BERLINER, J. A. *et al.* Atherosclerosis: basic mechanisms oxidation, inflammation, and genetics. **Circ**, v. 91, p. 2488-2496, 1995.

BEYER-WESTENDORF, J. *et al.* Real-world persistence and adherence to oral anticoagulation for stroke risk reduction in patients with atrial fibrillation. **Eur**, v. 18, p. 1150-1157, 2016.

BIENERT, G. P. *et al.* Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. **J. Biol. Chem**, v. 282, p. 1183-1192, 2007.

BLOKHINA, O. *et al.* Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. **Physiol. Plant**, vol. 138, p. 447-462, 2010.

BOETTGER, L. M. *et al.* Recurring exon deletions in the HP (haptoglobin) gene contribute to lower blood cholesterol levels. **Nat. Genet**, v. 48, p. 359-366, 2016.

BOLDT, A. *et al.* ACE inhibitor treatment attenuates atrial structural remodeling in patients with lone chronic atrial fibrillation. **Basic. Res. Cardiol**, v. 101, p. 216-267, 2006.

BONACA, M. P. *et al.* Peripheral revascularization in patients with peripheral artery disease with vorapaxar: insights from the TRA2°P-TIMI 50. **JACC Cardiovasc. Interv**, v. 9, p. 2157-2164, 2016.

BORENSZTAJN, K. *et al.* Factor Xa: at the crossroads between coagulation and signaling in physiology and disease. **Trends Mol. Med**, v. 149, p. 429-440, 2008.

BORENSZTAJN, K. *et al.* Blood coagulation factor Xa as an emerging drug target. **Expert. Opin. Ther. Targets**, v. 15, p. 341-349, 2011.

BORGES, Camila Souza. **Expressão do receptor ativado por protease do tipo 1 (PAR-1) em leucemias**. 2008. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

BRØNDUM-JACOBSEN, P. *et al.* 25-Hydroxyvitamin D levels and risk of ischemic heart disease, myocardial infarction, and early death: population-based study and meta-analyses of 18 and 17 studies. **Arter. Thromb. Vasc. Biol**, v. 32, p. 2794-2802, 2012.

BROUNS, R. *et al.* The decrease in procarboxypeptidase U (TAFI) concentration in acute ischemic stroke correlates with stroke severity, evolution and outcome. **J. Thromb. Haemost**, v. 8, p. 75-80, 2010.

BRUIJNE, E. L. *et al.* The role of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor in arterial thrombosis at a young age: The ATTAC study. **J. Thromb. Haemost**, v. 7, p. 919-927, 2009.

BUCKLEY, L. F. *et al.* Interleukin-1 blockade in cardiovascular diseases: a clinical update. **Eur. Heart J**, v. 39, p. 2063-2069, 2018.

BUEHLER, P. W. *et al.* Hemoglobin-based oxygen carriers: From mechanisms of toxicity and clearance to rational drug design. **Trends Mol. Med**, v. 16, p. 447-457, 2010.

BUKOWSKA, A. *et al.* Mitochondrial dysfunction and redox signaling in atrial tachyarrhythmia. **Exp. Biol. Med. (Maywood)**, v. 233, p. 558-574, 2008.

BUKOWSKA, A. *et al.* Coagulation factor Xa induces an inflammatory signalling by activation of protease-activated receptors in human atrial tissue. **Eur. J. Pharma**, v. 718, p. 114-123, 2013.

BURSTEIN, B. *et al.* Atrial fibrosis: mechanisms and clinical relevance in atrial fibrillation. **J. Am. Coll. Cardiol**, v. 51, p. 802-809, 2008.

BUSCH, G. *et al.* Coagulation Factor Xa stimulates interleukin-8 release in endothelial cells and mononuclear leukocytes: implications in acute myocardial infarction. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol**, v. 25, p. 461-466, 2005.

CABRERA-BUENO, F. *et al.* Serum levels of interleukin-2 predict the recurrence of atrial fibrillation after pulmonary vein ablation. **Cytok**, v. 73, p. 74-78, 2015.

CAHILL, L. E. *et al.* Haptoglobin genotype is a consistent marker of coronary heart disease risk among individuals with elevated glycosylated hemoglobin. **J. Am. Coll. Cardiol**, v. 61, p. 728-737, 2013.

CAHILL, L. E. *et al.* The Risk of Coronary Heart Disease Associated With Glycosylated Hemoglobin of 6.5% or Greater Is Pronounced in the Haptoglobin 2-2 Genotype. **J. Am. Coll. Cardiol**, v. 66, p. 1791-1799, 2015.

CAMM, A. J. *et al.* ESC Committee for Practice Guidelines (CPG). 2012 focused update of the ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation: an update of the 2010 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation. Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association. **Eur. Heart J**, v. 33, p. 2719-2747, 2012.

CAMM, A. J. *et al.* XANTUS: a real-world, prospective, observational study of patients treated with rivaroxaban for stroke prevention in atrial fibrillation. **Eur Heart J**, v. 37, p. 1145-1153, 2016.

CAMMISOTTO, V. *et al.* Nox2-mediated platelet activation by glycoprotein (GP) VI: Effect of rivaroxaban alone and in combination with aspirin. **Biochem. Pharmacol**, v. 163, p. 111-118, 2019.

CANPOLAT, U. *et al.* Relationship between vitamin D level and left atrial fibrosis in patients with lone paroxysmal atrial fibrillation undergoing cryoballoon-based catheter ablation. **J. Cardiol**, v. 69, p. 16-23, 2017.

CAROCHO, M. *et al.* A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food. Chem. Toxicol**, v. 51, p.15-25, 2013.

CARTER, K. *et al.* Haptoglobin: a review of the major allelefrequencies worldwide and their association with diseases. **Int. J. Lab. Hematol**, v. 29, p. 92-110, 2007.

CARVALHO, L. M. *et al.* Haptoglobin levels, but not Hp1-Hp2 polymorphism, are associated with polycystic ovary syndrome. **J. Assist. Reprod. Genet**, v. 34, p. 1691–1698, 2017.

CASTELLINO, F. J. *et al.* Structure and function of the plasminogen/ plasmin system. **Thromb. Haemost**, v. 93, p. 647-654, 2005.

CAVENDER, M. A. *et al.* The effect of rivaroxaban on myocardial infarction in the ATLAS ACS 2 – TIMI 51 trial. **Eur. Heart J. Acute Cardiovasc. Care**, v. 4, p. 468-474, 2015.

CERESA, E. *et al.* Development of ELISAs measuring the extent of TAFI activation. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol**, v. 26, p. 423-428, 2006.

- CHIELLINI, C. *et al.* Serum haptoglobin: a novel marker of adiposity in humans. **J. Clin. Endocrinol. Metab**, v. 89, p. 2678-2683, 2004.
- CHEN, S. *et al.* Expression of the vitamin d receptor is increased in the hypertrophic heart, **Hypert**, v. 52, p. 1106-1112, 2008.
- CHEN, S. *et al.* Cardiomyocyte-specific deletion of the vitamin D receptor gene results in cardiac hypertrophy. **Circ**, v. 124, p. 1838-1847, 2011.
- CHEN, W. R. *et al.* Relation of low vitamin D to nonvalvular persistent atrial fibrillation in Chinese patients. **Ann. Noninvasive Electrocardiol**, v. 19, p. 166-173, 2014.
- CHOLETTE, J. *et al.* Elevated free hemoglobin and decreased haptoglobin levels are associated with adverse clinical outcomes, unfavorable physiologic measures, and altered inflammatory markers in pediatric cardiac surgery patients. **Transfusion**, v. 58, p. 1631-1639, 2018.
- CHUNG, M. K. *et al.* C-reactive protein elevation in patients with atrial arrhythmias: inflammatory mechanisms and persistence of atrial fibrillation. **Circ**, v. 104, p. 2886-2891, 2001.
- CLAESEN, K. *et al.* Carboxypeptidase U (CPU, TAF1a, CPB2) in Thromboembolic Disease: What Do We Know Three Decades after Its Discovery? **Int. J. Mol. Sci**, v. 22, p. 883, 2021.
- COHEN, J. *Statistical power analysis for the behavioral sciences.* **Hillsdale**, NJ, Erlbaum, 1989.
- COHEN, A. T. *et al.* Comparison of the Novel Oral Anticoagulants Apixaban, Dabigatran, Edoxaban, and Rivaroxaban in the Initial and Long-Term Treatment and Prevention of Venous Thromboembolism: Systematic Review and Network Meta-Analysis. **P. One**, v. 10, p. 1-14, 2015.
- COLILLA, S. *et al.* Estimates of current and future incidence and prevalence of atrial fibrillation in the U.S. adult population. **Am. J. Cardiol**, v. 112, p. 1142-1147, 2013.
- COSTACOU, T. *et al.* Haptoglobin genotype and its role in diabetic cardiovascular disease. **J. Cardiovasc. Transl. Res**, v. 5, p. 423-435, 2012.

COUGHLIN, S. R. Thrombin signaling and protease-activated receptors. **Nat**, v. 4, p. 258-264, 2000.

DA CRUZ, A. C. *et al.* Oxidative stress and aging: correlation with clinical parameters. **Aging. Clin. Exp. Res**, v. 26, p. 7-12, 2014.

DABRIK, L. *et al.* Denser plasma clot formation and impaired fibrinolysis in paroxysmal and persistent atrial fibrillation while on sinus rhythm: Association with thrombin generation, endothelial injury and platelet activation. **Thromb. Res**, v. 136, p. 408-414, 2015.

DAI, H. *et al.* Dose-Response Relationship Between Thrombin- Activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI) and Stroke: A Chinese Case-Control Study. **Med. Sci. Monit**, v. 23, p. 4376-4381, 2017.

DALAN, R. *et al.* The haptoglobin 2-2 genotype is associated with inflammation and carotid artery intima-media thickness. **Diab. Vasc. Dis. Res**, v. 13, p. 373-376, 2016.

DALAN, R. *et al.* The protean role of haptoglobin and haptoglobin genotypes on vascular complications in diabetes mellitus. **Eur. J. Prev. Cardiol**, v. 25, p. 1502-1519, 2018.

DARAGHMEH, A. H. *et al.* Evidence for the vitamin D hypothesis: The NHANES III extended mortality follow-up. **Atherosc**, v. 255, p. 96-101, 2016.

DE GENNARO, L. *et al.* Inflammatory activation and carbohydrate antigen-125 levels in subjects with atrial fibrillation. **Eur. J. Clin. Invest**, v. 42, p. 371-375, 2012.

DELANGHE, J. *et al.* Haptoglobin polymorphism and peripheral arterial occlusive disease. **Atherosc**, v. 145, p. 287-292, 1999.

DEL R'IO, L. A. *et al.* Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. **Plant. Physiol**, v. 141, p. 330-335, 2006.

DEMIR, M. *et al.* The effects of vitamin D deficiency on atrial fibrillation. **Clin. Appl. Thromb. Hemost**, v. 20, p. 98-103, 2014.

DIANA, A. G. *et al.* Impaired Spontaneous/Endogenous Fibrinolytic Status as New Cardiovascular Risk Factor? **J. Am. Coll. Cardiol**, v. 74, p. 366-375, 2019.

DOBROVOLSKY, A. B. *et al.* The fibrinolysis system: regulation of activity and physiologic functions of its main components. **Biochem. (Mosc)**, v. 67, p. 99-108, 2002.

DOLMETSCH, R. E. *et al.* Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression. **Nat**, v. 392, p. 933-936, 1998.

DOMINGUETI, C. P. *et al.* Diabetes mellitus: The linkage between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability and vascular complications. **J. Diab. Complic**, v. 30, p. 738-745, 2016.

DOTAN, Y. *et al.* Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. **Progress. Lip. Res**, v. 43, p. 200-227, 2004.

DU CLOS, T. W. Function of C-reactive protein. **Ann. Med**, v. 32, p. 274-278, 2000.

DUARTE, Rita Carolina Figueiredo. **Efeito do ácido acetilsalicílico na ativação plaquetária e perfil oxidativo em pacientes com diabetes mellitus tipo 2**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

DUARTE, Rita Carolina Figueiredo **Efeito da varfarina e dos anticoagulantes orais diretos na ativação plaquetária e geração de trombina em pacientes com fibrilação atrial**. 2017. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.

DUARTE, R. C. F. *et al.* Thrombin Generation and other hemostatic parameters in patients with atrial fibrillation in use of warfarin or rivaroxaban. **J. Thromb. Thrombol**, v. 51, p. 47-57, 2020.

DUBIS, J. *et al.* The role of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in the pathophysiology of hemostasis. **Adv. Clin. Exp. Med**, v. 19, p. 379-387, 2010.

DUICU, O. M. *et al.* Assessment of Mitochondrial Dysfunction and Monoamine Oxidase Contribution to Oxidative Stress in Human Diabetic Hearts. **Oxid. Med. Cell. Longev**, v. 2016, p. 2-12, 2016.

DZIK, K. *et al.* Vitamin D supplementation attenuates oxidative stress in paraspinal skeletal muscles in patients with low back pain. **Eur. J. Appl. Physiol**, v. 118, p. 143-151, 2018.

ELAHI, M. M. *et al.* Tracing the origins of postoperative atrial fibrillation: the concept of oxidative stress-mediated myocardial injury phenomenon. **Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil**, v. 15, p. 735-741, 2008.

ELLINGHAUS, P. *et al.* Expression of proinflammatory genes in human endothelial cells: Comparison of rivaroxaban and dabigatran. **Thromb. Res**, v. 142, p. 44-51, 2016.

EMREN, S. V. *et al.* Does deficiency of Vitamin D increase new onset atrial fibrillation after coronary artery bypass grafting surgery? **Heart Surg. Forum**, v. 19, p. 180-184, 2016.

FARBSTEIN, D. *et al.* The genetics of vascular complications in diabetes mellitus. **Cardiol. Clin**, v. 28, p. 477-496, 2010.

FEIGIN, V. L. *et al.* Global Burden of Stroke. **Circ. Res**, v. 120, p. 439-448, 2017.

FERNANDEZ-CADENAS, I. *et al.* Influence of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphisms on tissue-type plasminogen activator-induced recanalization in ischemic stroke patients. **J. Thromb. Haemost**, v. 5, p. 1862-1868, 2007.

FERREIRA, C. N. *et al.* O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicações. **Rev. Bras. Hemat. Hemot**, v. 32, p. 416-421, 2010.

FERREIRA, C. E. S. *et al.* Consensus - reference ranges of vitamin D [25(OH)D] from the Brazilian medical societies. Brazilian Society of Clinical Pathology/Laboratory Medicine (SBPC/ML) and Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism (SBEM). **J. Bras. Patol. Med. Lab**, v. 53, 2017.

FOLEY, J. H. *et al.* Insights into thrombin activatable fibrinolysis inhibitor function and regulation. **J. Thromb. Haemost**, v. 11, p. 306-315, 2013.

FORMAN, J. P. *et al.* Plasma 25- hydroxyvitamin D levels and risk of incident hypertension. **Hypertens**, v. 49, p. 1063-1069, 2007.

FORMAN, J. P. *et al.* Plasma 25-hydroxyvitamin D and regulation of the renin-angiotensin system in humans. **Hypertens**, v. 55, p. 1283-1288, 2010.

FRÈRE, C. *et al.* Quantification of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) gene polymorphism effects on plasma levels of TAFI measured with assays insensitive to isoform-dependent artefact. **Thromb. Haemost.**, v. 94, p. 373-379, 2005.

FRIEDRICH, W. E. *et al.* Expression and inflammatory regulation of haptoglobin gene in adipocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 209, p. 250-256, 1995.

FROGUEL, P. *et al.* A genome-wide association study identifies rs2000999 as a strong genetic determinant of circulating haptoglobin levels. **P. One**, v. 7, p. 323-327, 2012.

FRUSTACI, A. *et al.* Histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation. **Circ.**, v. 96, p. 1180-1184, 1997.

FURUI, H. *et al.* Effects of treadmill exercise on platelet function, blood coagulability and fibrinolytic activity in patients with atrial fibrillation. **Japan. Heart J.**, v. 28, p. 177-184, 1987.

GABAY, C. *et al.* Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. **N. Engl. J. Med.**, v. 340, p. 448-4454, 1999.

GASPAROVA, I. *et al.* Perspectives and challenges of antioxidant therapy for atrial fibrillation. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 320, p. 1-14, 2017.

GAST, M. C. W. *et al.* Haptoglobin phenotype is not a predictor of recurrence free survival in high-risk primary breast cancer patients. **BMC Cancer**, v. 8, p. 1-15, 2008.

GERMOLEC, D. *et al.* Markers of inflammation. **Methods. Mol. Biol.**, v. 1803, p. 57-79, 2018.

GHASEMZADEH, N. *et al.* Oxidative stress is associated with increased pulmonary artery systolic pressure in humans. **Hypertens.**, v. 63, p. 1270-1275, 2014.

GHOSH, A. K.; VAUGHAN, D. E. PAI-1 in tissue fibrosis. **J. Cell. Physiol.**, v. 227, p. 493-507, 2012.

GIBSON, C. M. *et al.* ATLAS-ACS 2 TIMI 51 Investigators. Reduction of stent thrombosis in patients with acute coronary syndromes treated with rivaroxaban in ATLASACS 2 TIMI 51. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 62, p. 286-290, 2013.

GINDE, A. A. *et al.* Demographic differences and trends of vitamin D insufficiency in the US population, 1988-2004. **Arch. Intern. Med.**, v. 169, p. 626-632, 2009.

- GIOVANNUCCI, E. *et al.* 25-Hydroxyvitamin D and risk of myocardial infarction in men: a prospective study. **Arch. Intern. Med**, v. 168, p. 1174-1180, 2008.
- GODE, S. *et al.* Effect of vitamin D deficiency on the development of postoperative atrial fibrillation in coronary artery bypass patients. **J. Cardiovasc. Thorac. Res**, v. 8, p. 140-146, 2016.
- GÓMEZ-DOBLAS, J. J. *et al.* Prevalencia de fibrilación auricular en España. Resultados del estudio OFRECE. **Rev. Esp. Cardiol**, v. 67, p. 259-269, 2014.
- GRAVES, K. L. *et al.* Hp: an inflammatory indicator in cardiovascular disease. **Future. Cardiol**, v. 12, p. 471-481, 2016.
- GREBE, A. *et al.* NLRP3 Inflammasome and the IL-1 Pathway in Atherosclerosis. **Circ. Res**, v. 122, p. 1722-1740, 2018.
- GROSSO, G. *et al.* Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) — A possible link between coagulation and complement activation in the antiphospholipid syndrome (APS). **Thromb. Research**, v. 158, p. 168-173, 2017.
- GUERRA, F. *et al.* CHA2DS2-VASc risk factors as predictors of stroke after acute coronary syndrome: a systematic review and meta-analysis. **Eur. Heart J. Acute Cardiovasc. Care**, v. 7, p. 264-274, 2018.
- GUETTA, J. *et al.* Haptoglobin genotype modulates the balance of Th1/Th2 cytokines produced by macrophages exposed to free hemoglobin. **Atheroscl**, v. 191, p. 48-53, 2007.
- GUO, Y. *et al.* Inflammation in atrial fibrillation. **J. Am. Coll. Cardiol**, v. 60, p. 2263-2270, 2012.
- GUO, H. *et al.* Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. **Nat. Med**, v. 21, p. 677-687, 2015.
- GUPTA, K. K. *et al.* Plasminogen activator inhibitor-1 stimulates macrophage activation through Toll-like Receptor-4. **Bioch. Bioph. Res. Communicat**, v. 477, p. 503-508, 2016.

GURUNG, R. L. *et al.* Association of haptoglobin phenotype with incident acute myocardial infarction in Chinese patients with type 2 diabetes. **Cardiovasc. Diabetol**, v. 18, p.1-9, 2019.

GUTIERREZ, A. *et al.* Oxidant and inflammatory mechanisms and targeted therapy in atrial fibrillation: an update. **J. Cardiovasc. Pharmacol**, v. 66, p. 523-529, 2015.

HAIM, M. *et al.* Prospective national study of the prevalence, incidence, management and outcome of a large contemporary cohort of patients with incident non-valvular atrial fibrillation. **J. Am. Heart Assoc**, v. 4, p. 1-12, 2015.

HALFON, M. *et al.* Vitamin D: a review on its effects on muscle strength, the risk of fall, and frailty. **Biomed. Res. Int**, v. 2015, p. 1-11, 2015.

HAMMERS, D. W. *et al.* Disease-modifying effects of orally bioavailable NF-kappaB inhibitors in dystrophin-deficient muscle. **JCI Insight**, v. 1, p. 1-14, 2016.

HANAFY, D. A. *et al.* Electromechanical effects of 1,25-dihydroxyvitamin D with antiatrial fibrillation activities. **J. Cardiovasc. Electrophysiol**, v. 25, p. 317-323, 2014.

HARADA, M. *et al.* Role of inflammation in atrial fibrillation pathophysiology and management. **Circ. J**, v. 79, p. 495-502, 2015.

HARSHFIELD, E. L. *et al.* The role of haematological traits in risk of ischaemic stroke and its subtypes. **Brain**, v. 143, p. 210-221, 2020.

HEIJMAN, J. *et al.* Cellular and molecular electrophysiology of atrial fibrillation initiation, maintenance, and progression. **Circulat. Res**, v. 114, p. 1483-1499, 2014.

HEIJMAN, J. *et al.* The value of basic research insights into atrial fibrillation mechanisms as a guide to therapeutic innovation: a critical analysis. **Cardiovasc. Res**, v. 109, p. 467-479, 2016.

HENRY, M. *et al.* Identification of polymorphisms in the promoter and the 3' region of the TAFI gene: evidence that plasma TAFI antigen levels are strongly genetically controlled. **Blo**, v. 97, p. 2053-2058, 2001.

HERMES-LIMA, M. *et al.* Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe (III) xylene orange complex formation. **Free Radic. Biol. & Med**, v. 19, p. 271-280, 1995.

HERSHKO, C. *et al.* Pathophysiology of iron overload. In: annals of the new york academy of sciences, New York. **J. Artic. New York: Wiley**, v. 850, p. 191-201, 1998.

HEYNO, E. *et al.* Oxygen activation at the plasma membrane: relation between superoxide and hydroxyl radical production by isolated membranes. **Plant**, v. 234, p. 35-45, 2011.

HINDRICKS, G. *et al.* 2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association of Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). **Eur. Heart J**, v. 00, p. 1-125, 2020.

HIJAZI, Z. *et al.* Biomarkers of inflammation and risk of cardiovascular events in anticoagulated patients with atrial fibrillation. **Heart**, v. 102, p. 508-517, 2016.

HOFFMAN, M. *et al.* Coagulation 2006: a modern view of hemostasis, **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 21, p. 1-11, 2007.

HU, Y. F. *et al.* Inflammation and the pathogenesis of atrial fibrillation. **Nat, Rev. Cardiol**, v. 12, p. 230-243, 2015.

HUANG, C. *et al.* Oxidative stress: A possible pathogenesis of atrial fibrillation. **Med. Hypotheses**, v. 72, p. 466-467, 2009.

HUANG, H. *et al.* Mechanisms of ROS Regulation of Plant Development and Stress Responses. **Front. Plant. Sci**, v. 10, p. 1-10, 2019.

HUEBNER, B. R. *et al.* Thrombin stimulates increased plasminogen activator inhibitor-1 release from liver compared to lung endothelium. **J. Surgical Res**, v. 225, p. 1-5, 2018.

HUNTER, P. The inflammation theory of disease. The growing realization that chronic inflammation is crucial in many diseases opens new avenues for treatment. **EMBO Rep**, v. 13, p. 968-970, 2012.

IJÄS, P. *et al.* Haptoglobin 2 allele associates with unstable carotid plaque and major cardiovascular events. **J. Atheroscler**, v. 230, p. 228-234, 2013.

IJÄS, P. *et al.* Haptoglobin Hp2 Variant Promotes Premature Cardiovascular Death in Stroke Survivors. **Strok**, v. 48, p. 1463-1469, 2017.

INOUE, H. *et al.* Impact of body mass index on the prognosis of Japanese patients with non-valvular atrial fibrillation. **Am. J. Cardiol**, v. 118, p. 215-221, 2016.

IRWIN, D. C. *et al.* Hemoglobin-induced lung vascular oxidation, inflammation, and remodeling contribute to the progression of hypoxic pulmonary hypertension and is attenuated in rats with repeated-dose haptoglobin administration. **Free Radic. Bio. Med**, v. 82, p. 50-62, 2015.

ISHIBASHI, Y. *et al.* Advanced glycation end products potentiate citrated plasma-evoked oxidative and inflammatory reactions in endothelial cells by up-regulating protease-activated receptor-1 expression. **Cardiovasc. Diabetol**, v. 13, p. 1-8, 2014.

IWASAKI, Y. *et al.* Atrial fibrillation pathophysiology: implications for management. **Circ**, v. 124, p. 2264-2274, 2011.

JABATI, S. *et al.* Biomarkers of Inflammation, Thrombogenesis, and Collagen Turnover in Patients with Atrial Fibrillation. **Clin. Appl. Thromb. Hemost**, v. 24, p. 718-723, 2018.

JANUARY, C.T. *et al.* 2014 AHA/ACC/HRS. Guideline for the management of patients with atrial fibrillation: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines and the Heart Rhythm Society. **Circ**, v. 130, p. 2071-2104, 2014.

JANUARY, C. T. *et al.* 2019 AHA/ACC/HRS focused update of the 2014 AHA/ACC/HRS guideline for the management of patients with atrial fibrillation: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Rhythm Society. **J. Am. Coll. Cardiol**, v. 74, p. 104-132, 2019.

JENKINS, D. J. A. *et al.* Supplemental vitamins and minerals for CVD prevention and treatment. **J. Am. Coll. Cardiol**, v. 71, p. 2570-2584, 2018.

JIANG, H. *et al.* Association of pre-ablation level of potential blood markers with atrial fibrillation recurrence after catheter ablation: A meta-analysis. **Eur**, v. 19, p. 392-400, 2017.

JUHAN-VAGUE, I. *et al.* Thrombogenic and fibrinolytic factors and cardiovascular risk in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Ann. Med**, v. 28, p. 371-380, 1996.

JUHAN, V. I. *et al.* Plasma thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor antigen concentration and genotype in relation to myocardial infarction in the North and South of Europe. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol**, v. 22, p. 867-873, 2002.

KALLISTRATOS, M. S. *et al.* Atrial Fibrillation and Arterial Hypertension. **Pharmacol. Res**, v. 128, p. 322-326, 2018.

KALMOVARIN, N. *et al.* Extrahepatic expression of plasma protein genes during inflammation. **Inflammation**, v. 15, p. 369-379, 1991.

KANE, K. K. Fibrinolysis-a review. **Ann. Clin. Lab. Sci**, v. 14, p. 443-449, 1984.

KAO, Y. H. *et al.* Tumor necrosis factor- α decreases sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase expressions via the promoter methylation in cardiomyocytes. **Crit. Care. Med**, v. 38, p. 217-222, 2010.

KARAM, B. S. *et al.* Oxidative stress and inflammation as central mediators of atrial fibrillation in obesity and diabetes. **Cardiovasc. Diabetol**, v. 16, p. 2-9, 2017.

KATOH, H. *et al.* Anti-inflammatory effect of factor-Xa inhibitors in Japanese patients with atrial fibrillation. **Heart and vessels**, v. 32, p. 1130-1136, 2017.

KAZMIA, N. *et al.* Genetic determinants of circulating haptoglobin concentration. **Clin. Chimica. Acta**, v. 494, p. 138-142, 2019.

KHAPER, N. *et al.* Targeting the Vicious Inflammation–Oxidative Stress Cycle for the Management of Heart Failure. **Antiox. & Redox Signal**, v. 13, p. 1033-1049, 2010.

KHATIB, R. *et al.* Blockade of the renin–angiotensin–aldosterone system (RAAS) for primary prevention of non-valvular atrial fibrillation: a systematic review and meta analysis of randomized controlled trials. **Int. J. Cardiol**, v. 165, p. 17-24, 2013.

KIKUCHI, S. *et al.* Comparison of anti-inflammatory effects of rivaroxaban vs. dabigatran in patients with non-valvular atrial fibrillation (RIVAL-AF study): multicenter randomized study. **Heart and Vessels**, v. 34, p. 1002-1013, 2019.

KIM, Y. M. *et al.* A myocardial Nox2 containing NAD(P)H oxidase contributes to oxidative stress in human atrial fibrillation. **Circ. Res**, v. 97, p. 629-636, 2005.

KIRCHHOF, P. *et al.* Management of atrial fibrillation in seven European countries after the publication of the 2010 ESC Guidelines on atrial fibrillation: primary results of the

PREvention of thromboembolic events--European Registry in Atrial Fibrillation (PREFER in AF). **Eur**, v. 16, p. 6-14, 2014.

KIRCHHOF, P. *et al.* Efeitos da rivaroxabana em biomarcadores de coagulação e inflamação: uma análise post hoc do estudo X-VerT. **Th. Open**, v. 4, p. 20-32, 2020.

KLUFT, C. *et al.* The postoperative fibrinolytic shutdown: a rapidly reverting acute phase pattern for the fast-acting inhibitor of tissue-type plasminogen activator after trauma. **Scand. J. Clin. Lab. Invest**, v. 45, p. 605-610, 1985.

KOBYLIAK, N. *et al.* Perspectives and challenges of antioxidant therapy for atrial fibrillation. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol**, v. 290, p. 1-14, 2017.

KOCH, W. *et al.* Genotyping of the Common Haptoglobin Hp 1/2 Polymorphism Based on PCR. **Clin. Chem**, v. 48, p. 1377-1382, 2002.

KOMNENOV, D. *et al.* Pro-inflammatory cytokines reduce human TAFI expression via tristetraprolin-mediated mRNA destabilisation and decreased binding of HuR. **Thromb. Haemost**, v. 114, p. 337-349, 2015.

KONDO, H. *et al.* Possible role of rivaroxaban in attenuating pressure-overload-induced atrial fibrosis and fibrillation. **J. Cardiol**, v. 71, p. 310-319, 2018.

KORANTZOPOULOS, P. *et al.* Atrial fibrillation and electrical remodeling: the potential role of inflammation and oxidative stress. **Med. Sci. Monit**, v. 9, p. 225-229, 2003.

KORANTZOPOULOS, P. *et al.* The role of oxidative stress in the pathogenesis and perpetuation of atrial fibrillation. **Int. J. Cardiol**, v. 115, p. 135-143, 2007.

KOURLIOUROS, A. *et al.* Protective effect of epicardial adiponectin on atrial fibrillation following cardiac surgery. **Eur. J. Cardio-thor. Surg**, v. 39, p. 228-232, 2011.

KOZIAN, D. H. *et al.* Association between the Thr325Ile polymorphism of the thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor and stroke in the Ludwigshafen risk and cardiovascular health study. **Thromb. Haemost**, v. 103, p. 976-983, 2010.

KRISTIANSEN, M. *et al.* Identification of the haemoglobin scavenger receptor. **Nat**, v. 409, p. 198-201, 2001.

KUMAGAI, N. *et al.* Effect of Addition of a Statin to Warfarin on Thromboembolic Events in Japanese Patients With Nonvalvular Atrial Fibrillation and Diabetes Mellitus. **The Am. J. of Cardiol**, p. 1-14, 2017.

KUNUTSOR, S. K. *et al.* Liver enzymes and risk of cardiovascular disease in the general population: a meta-analysis of prospective cohort studies. **Atheroscler**, v. 236, p. 7-17, 2014.

KUNSCH, C.; MEDFORD, R. M. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. **Circ. Res**, v. 85, p. 753-766, 1999.

KURLAK, L. O. *et al.* Oxidative stress markers in hypertensive states of pregnancy: preterm and term disease. **Front. Physiol**, v. 5, p. 1-8, 2014.

LADENVALL, C. *et al.* Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor activation peptide shows association with all major subtypes of ischemic stroke and with TAFI gene variation. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol**, v. 27, p. 955-967, 2007.

LAMBETH, J. D.; NEISH, A. S. Nox enzymes and new thinking on reactive oxygen: a double-edged sword revisited. **Ann. Rev. Pathol**, v. 9, p. 119-145, 2014.

LANGLOIS, M. R.; DELANGHE, J. R. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. **Clin. Chem**, v. 42, p. 1589-6000, 1996.

LAU, D. H. *et al.* Modifiable risk factors and atrial fibrillation. **Circ.** v. 136, p. 583-596, 2017.

LAWRENCE, L. K.; LEUNG, L. Hemostasis and its Regulation. **ACP Medicine**, 2012.

LAZZERINI, P. E. *et al.* Systemic inflammation and arrhythmic risk: lessons from rheumatoid arthritis. **Eur. Heart J**, v. 38, p. 1717-1727, 2017.

LEE, I. O. *et al.* The effects of direct thrombin inhibition with dabigatran on plaque formation and endothelial function in apolipoprotein E-deficient mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther**, v. 343, p. 253-257, 2012.

LEE, C. W. *et al.* Plasma Haptoglobin Concentrations Are Elevated in Patients with Coronary Artery Disease. **P. One**, v. 8, p. 1-8, 2013.

LEE, L. H. DOACs—advances and limitations in real world. **Thromb. J**, v. 14, p. 10-17, 2016.

- LENNERZ, C. *et al.* Colchicine for primary prevention of atrial fibrillation after open-heart surgery: systematic review and meta-analysis. **Int. J. Cardiol**, v. 249, p. 127-137, 2017.
- LEUNG, L. L. K. *et al.* Regulation of Tissue Inflammation by Thrombin-Activatable Carboxypeptidase B (or TAFI). **Current Topics in Complement II**, p. 59-67, 2008.
- LEVI, M.; POLL, T. V. Coagulation in patients with severe sepsis. **Semin. Thromb. Hemost**, v. 41, p. 9-15, 2015.
- LEVY, A. P. *et al.* Haptoglobin phenotype is an independent risk factor for cardiovascular disease in individuals with diabetes: the strong heart study. **J. Am. Coll. Cardiol**, v. 40, p. 1984-1990, 2002.
- LEVY, A. P. *et al.* Haptoglobin phenotype and prevalent coronary heart disease in the Framingham offspring cohort. **Atheroscler**, v. 172, p. 361-365, 2004.
- LEVY, A. P. *et al.* Haptoglobin genotype is a determinant of iron, lipid peroxidation, and macrophage accumulation in the atherosclerotic plaque. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol**, v. 27, p. 134-140, 2007.
- LI, Y. C. *et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D (3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. **J. Clin. Invest**, v. 110, p. 229-238, 2002.
- LI, J. *et al.* Role of inflammation and oxidative stress in atrial fibrillation. **Heart Rhythm**, v. 7, p. 438-444, 2010.
- LI, P. *et al.* Inhibition of Aberrant MicroRNA-133a Expression in Endothelial Cells by Statin Prevents Endothelial Dysfunction by Targeting GTP Cyclohydrolase 1 in Vivo. **Circ**, v. 134, p.1752-1765, 2016.
- LIEBEN, L.; CARMELIET, G. Vitamin D signaling in osteocytes: effects on bone and mineral homeostasis. **Bon**, v. 54, p. 237-243, 2013.
- LIN, J. H. *et al.* Identification of human thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in vascular and inflammatory cells. **Thromb. Haemost**, v. 105, p. 999-1009, 2011.
- LIN, H. *et al.* Therapeutics targeting the fibrinolytic system. **Exp. Mol. Med**, v. 52, p. 367-379, 2020.
- LINDHARDSEN, J. *et al.* Risk of atrial fibrillation and stroke in rheumatoid arthritis: Danish nationwide cohort study. **BMJ**, v. 344, p. 1-8, 2012.

- LIOUPIS, C. *et al.* Association of haptoglobin genotype and common cardiovascular risk factors with the amount of iron in atherosclerotic carotid plaques. **Atheroscler**, v. 216, p. 131-138, 2011.
- LIP, G. Y.; TELLOMONTOLIU, A. Management of atrial fibrillation. **Int. J. Clin. Pract**, v. 61, p. 9-11, 2007.
- LIP, G. Y. H.; LANE, D. A. Stroke prevention in atrial fibrillation: a systematic review. **JAM**, v. 314, p. 837-847, 2015.
- LIU, T., LI, G. P.; HUANG, T. G. Anti-inflammatory therapies in atrial fibrillation. **Int. J. Cardiol**, v. 104, p. 359-360, 2005.
- LIU, H. B. *et al.* Association of haptoglobin 1/2 polymorphism with coronary heart disease in Chinese. **Chin. J. Med. Genet**, v. 28, p. 60-63, 2011.
- LIU, X. *et al.* The relationship between vitamin D and risk of atrial fibrillation: a dose-response analysis of observational studies. **Nutri. J**, v. 380, p. 2-10, 2019.
- LOFFREDO, L. *et al.* The association between hyperhomocysteinemia and ischemic stroke in patients with non-valvular atrial fibrillation. **Haem**, v. 90, p. 1205-1211, 2005.
- LONGSTAFF, C.; KOLEV, K. Basic mechanisms and regulation of fibrinolysis. **J. Thromb. Haemost**, v. 13, p. 98-105, 2015.
- LUAN, Y. *et al.* Interleukin-18 among atrial fibrillation patients in the absence of structural heart disease. **Europace**, v. 12, p. 1713-1718, 2010.
- MA, J. *et al.* Rivaroxaban attenuates thrombosis by targeting the NF-Kb signaling pathway in a rat model of deep venous thrombus. **Int. J. of Mol. Med**, v. 40, p. 1869-1880, 2017.
- MAGALHÃES, L. P. *et al.* II Diretrizes Brasileiras de Fibrilação Atrial. **Arq. Bras. Cardiol**, v. 106, p. 1-22, 2016.
- MAGDER, S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark life? **Crit. Care**, v.10, p. 1-8, 2006.
- MAIRESSE, G. H. *et al.* Screening for atrial fibrillation: a European Heart Rhythm Association (EHRA) consensus document endorsed by the Heart Rhythm Society (HRS), Asia Pacific Heart Rhythm Society (APHRS), and Sociedad Latinoamericana de

Estimulación Cardíaca y Electrofisiología (SOLAECE). **Europace**, v. 19, p. 1589-1623, 2017.

MANSON, J. E. *et al.* Vitamin D supplements and prevention of cancer and cardiovascular disease. **Engl. J. Med**, v. 380, p. 33-44, 2019.

MARTELLI, F.; NUNES, F. M. F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Cienc. Cult**, v. 66, p. 54-57, 2014.

MARTINEZ, C. *et al.* Therapy persistence in newly diagnosed non-valvular atrial fibrillation treated with warfarin or NOAC: a cohort study. **Thromb. Haemost**, v. 115, p. 31-39, 2016.

MARTINS, Gabriela Lopes. **Aspectos inflamatórios envolvidos na fibrilação atrial em uma população em uso de anticoagulantes orais**. 2018. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Farmacologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

MARTINS, G. L. *et al.* Comparison of Inflammatory Mediators in Patients With Atrial Fibrillation Using Warfarin or Rivaroxaban. **Front. in Cardiovasc. Med**, v. 7, p. 1-8, 2020.

MATHEW, J. S. *et al.* Fibroblast growth factor-23 and incident atrial fibrillation: the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA) and the cardiovascular health study (CHS). **Circ**, v. 130, p. 298-307, 2014.

MATUSIK, P. T. *et al.* Elevated NT-proBNP is associated with unfavorably altered plasma fibrin clot properties in atrial fibrillation. **Int. J. Cardiol**, v. 243, p. 244-250, 2017.

MATUSIK, P. T. *et al.* Association of NT-proBNP and GDF-15 with markers of a prothrombotic state in patients with atrial fibrillation off anticoagulation. **Clin. Res. Cardiol**, v. 109, p. 426-434, 2020.

MAYNE, S. T. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. **J. Nutr**, v. 133, p. 933-940, 2003.

MCDONALD, C. I. *et al.* Oxidative stress during extracorporeal circulation. **Eur. J. Cardiothorac. Surg**, v. 46, p. 937-943, 2014.

MCPHERSON, R. A. Proteínas específicas. In: HENRY, J. B. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais. **18. ed. São Paulo: Manole**, p. 245-260, 1999.

MEDINA, L. O. *et al.* Determination of the antioxidant status of plasma from type 2 diabetic patients. **Diab. Res. and clin. pract**, v. 77, p. 193-197, 2007.

MEGA, J. L. *et al.* ATLAS ACS-TIMI 46 study group. Rivaroxaban versus placebo in patients with acute coronary syndromes (ATLAS ACS-TIMI 46): a randomised, doubleblind, phase II trial. **Lan**, v. 374, p. 29-38, 2009.

MEGA, J. L. *et al.* ATLAS ACS 2–TIMI 51 Investigators. Rivaroxaban in patients with a recent acute coronary syndrome. **Engl. J. Med**, v. 366, p. 9-19, 2012.

MEGA, J. L. *et al.* Rivaroxaban in patients stabilized after a ST-segment elevation myocardial infarction: results from the ATLAS ACS-2-TIMI-51 trial (Anti-Xa Therapy to Lower Cardiovascular Events in Addition to Standard Therapy in Subjects with Acute Coronary Syndrome-Thrombolysis In Myocardial Infarction-51). **J. Am. Coll. Cardiol**, v. 61, p. 1853-1859, 2013.

MEHTA, R.; SHAPIRO, A. D. Plasminogen activator inhibitor type 1 deficiency. **Haemop**, v. 14, p. 1255-1260, 2008.

MELAMED-FRANK, M. *et al.* Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin. **Blo**, v. 98, p.3693-3698, 2001.

MELTZER, M. E. *et al.* Low thrombin activatable fibrinolysis inhibitor activity levels are associated with an increased risk of a first myocardial infarction in men. **Haem**, v. 94, p. 811-818, 2009.

MENEZES, A. R. *et al.* Atrial fibrillation in the 21st Century: a current understanding of risk factors and primary prevention strategies. **May. Clin. Proc**, v. 88, p. 294-409, 2013.

MIYAZAWA, K. *et al.* Left atrial thrombus resolution in non-valvular atrial fibrillation or flutter: biomarker substudy results from a prospective study with rivaroxaban (X-TRA). **Ann. Med**, v. 50, p. 511-518, 2018.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **Br. J. Pharmacol**, v. 147, p. 193-201, 2006.

MONTERA, M. W. *et al.* II Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Aguda. **Arq. Bras. Cardiol**, v. 93, 2009.

MORANGE, P. E. *et al.* Association between TAFI antigen and Ala147Thr polymorphism of the TAFI gene and the angina pectoris incidence. The PRIME Study (Prospective Epidemiological Study of MI). **Thromb. Haemost**, v. 89, p. 554-560, 2003.

MORAES, E. R. F. L. *et al.* Prevalence of atrial fibrillation and stroke risk assessment based on telemedicine screening tools in a primary healthcare setting. **Eur. J. Int. Med**, v. 67, p. 36-41, 2019.

MOSNIER, L. O.; BOUMA, B. N. Regulation of fibrinolysis by thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, an unstable carboxypeptidase B that unites the pathways of coagulation and fibrinolysis. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol**, v. 26, p. 2445-2453, 2006.

MOSTAZAA, J. M. *et al.* Phenotype of haptoglobin and presence of subclinical vascular disease: Population study. **Clin. Investig. Arterioscler**, v. 32, p. 1-7, 2020.

MOUSSA, A. *et al.* Association Between Haptoglobin 2-2 Genotype and Coronary Artery Disease and Its Severity in a Tunisian Population. **Biochem. Genet**, v. 18, p. 269-282, 2014.

MOZAFFARIAN, D. *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. **Cir**, v. 133, p. 38-360, 2016.

MURPHY, N. F. *et al.* Seasonal variation in morbidity and mortality related to atrial fibrillation. **Int. J. Cardiol**, v. 97, p. 283-288, 2004.

MUTCH, N. J. *et al.* TAFIa, PAI-1 and a2- antiplasmin: complementary roles in regulating lysis of thrombi and plasma clots. **J. Thromb. Haemost**, v. 5, p. 812-817, 2007.

NAKATA, K. *et al.* Alteration of intracellular secretory acute phase response proteins expressed in human hepatocyte induced by exposure with interleukin-6. **Cytok**, v. 59, p. 317-323, 2012.

NAM, J. H. *et al.* Discordant Relationships between Systemic Inflammatory Markers and Burden of Oxidative Stress in Patients with Atrial Fibrillation. **Kor. Circ. J**, v. 47, p. 752-761, 2017.

NARITA, Y. *et al.* Edoxaban Exerts Antioxidant Effects Through FXa Inhibition and Direct Radical-Scavenging Activity. **Int. J. Mol. Sci**, v. 24, p. 1-11, 2019.

NEGREVA, M. *et al.* Early effects of paroxysmal atrial fibrillation on plasma markers of fibrinolysis. **Med**, v. 95, p. 1-6, 2016.

NELSON, W. W. *et al.* Medication persistence and discontinuation of rivaroxaban versus warfarin among patients with non-valvular atrial fibrillation. **Curr. Med. Res. Opin**, v. 30, p. 2461-2469, 2015.

NORGARD, N. B. *et al.* Novel anticoagulants in atrial fibrillation stroke prevention. **Therapeutic. Adv. in Chr. Dis**, v. 3, p. 123-136, 2012.

OLDGREN, J. *et al.* Variations in cause and management of atrial fibrillation in a prospective registry of 15,400 emergency department patients in 46 countries: the RE-LY Atrial Fibrillation Registry. **Circ**, v. 129, p. 1568-1576, 2014.

OLIVEIRA, I. *et al.* Plaquetas: Papéis tradicionais e não tradicionais na hemostasia, na inflamação e no câncer. **Health. Sci**, v. 38, p. 153-161, 2013.

ORCHARD, T. J. *et al.* Haptoglobin genotype and the rate of renal function decline in the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study. **Diab**, v. 62, p. 3218-3223, 2013.

OZCAN, O. U. *et al.* Relation of vitamin D deficiency and new-onset atrial fibrillation among hypertensive patients. **J. Am. Soc. Hypertens**, v. 9, p. 307-312, 2015.

OZSIN, K. K. *et al.* Effect of plasma level of Vitamin D on postoperative atrial fibrillation in patients undergoing isolated coronary artery bypass grafting. **Braz. J. Cardiovasc. Surg**, v. 33, p. 217-223, 2018.

PANG, H. *et al.* Reduced thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and enhanced proinflammatory cytokines in acute coronary syndrome. **Med. Intens**, v. 41, p. 475-482, 2016.

PATEL, M. R. *et al.* Rivaroxaban versus warfarin in nonvalvular atrial fibrillation. **Engl. J. Med**, v. 365, p. 883-891, 2011.

PAWLINSKI, R. *et al.* Protease-activated receptor-1 contributes to cardiac remodeling and hypertrophy. **Circ**, v. 116, p. 2298-2306, 2007.

PECHLANER, R. *et al.* Haptoglobin 2-2 Genotype is Not Associated With Cardiovascular Risk in Subjects With Elevated Glycohemoglobin—Results From the Bruneck Study. **J. Am. Heart. Association**, v. 3, p. e000732, 2014.

PILZ, S. *et al.* Vitamin D and cardiovascular disease prevention. **Nat. Rev. Cardiol**, v. 13, p. 404-417, 2016 404-417.

PITTAS, A. G. *et al.* Vitamin D and calcium intake in relation to type 2 diabetes in women. **Diab. Car**, v. 29, p. 650-656, 2006.

PLUG, T.; MEIJERS, J. C. Structure-function relationships in thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. **J. Thromb. Haemost**, v. 14, p. 633-644, 2016.

POOL, L. G. *et al.* Plasminogen Activator Inhibitor-1 Is Critical in Alcohol-Enhanced Acute Lung Injury in Mice. **Am. J. Resp. Cell Mol. Biol**, v. 57, p. 315-323, 2017.

PRETORIUS, M. *et al.* Plasminogen activator inhibitor-1 as a predictor of postoperative atrial fibrillation after cardiopulmonar bypass. **Cir**, v. 116, p. 1-7, 2007.

PROIETTI, M. *et al.* Frequency of left ventricular hypertrophy in non-valvular atrial fibrillation. **Am. J. Cardiol**, v. 116, p. 877-882, 2015.

PSYCHARI, S. N. *et al.* Relation of elevated C-reactive protein and interleukin-6 levels to left atrial size and duration of episodes in patients with atrial fibrillation. **Am. J. Cardiol**, v. 95, p. 764-767, 2005.

QU, Y. C. *et al.* Activated nuclear factor-kappaB and increased tumor necrosis factor-alpha in atrial tissue of atrial fibrillation. **Scand. Cardiovasc. J**, v. 43, p. 292-297, 2009.

RAITEN, J. M. *et al.* Atrial fibrillation after cardiac surgery: clinical update on mechanisms and prophylactic strategies. **J. Cardiothorac. Vasc. Anesth**, v. 29, p. 806-816, 2015.

RAWSON, R. *et al.* TGF- β 1-induced PAI-1 contributes to a profibrotic network in patients with eosinophilic esophagitis. **J. All. Clin. Immunol**, v. 138, p. 791-800, 2016.

REN, X. *et al.* Mechanisms and Treatments of Oxidative Stress in Atrial Fibrillation. **Curr. Pharmaceutic. Design**, v. 24, p. 3062-3071, 2018.

RENCKENS, R. *et al.* The role of plasminogen activator inhibitor type 1 in the inflammatory response to local tissue injury. **J. Thromb. Haemost**, v. 3, p. 1018-1025, 2005.

REZAEI Y. Anti-inflammatory role of statins in preventing postoperative atrial fibrillation. **Am. J. Cardiol**, v. 117, p. 314, 2016.

REZENDE, F. A. *et al.* Body mass index and waist circumference: association with cardiovascular risk factors. **Arq. Bras. Cardiol**, v. 87, p. 728-734, 2006.

RIENSTRA, M. *et al.* Vitamin D status is not related to development of atrial fibrillation in the community. **Am. Heart J**, v. 162, p. 538-541, 2011.

RIJKEN, D. C.; LIJNEN, H. R. New insights into the molecular mechanisms of the fibrinolytic system. **J. Thromb. Haemost**, v. 7, p. 4-13, 2009.

RODIÑO-JANEIRO, K. B. *et al.* Currstatus ent de NADPH oxidase researCH no carroFarmacologia cardiovascular. **Vasc. Healt. Ris. Maneg**, v. 9, p. 401-428, 2013.

RODRIGUES, K. F. *et al.* Haptoglobin levels are influenced by Hp1–Hp2 polymorphism, obesity, infammation, and hypertension in type 2 diabetes mellitus. **Endocrinol. Diabetes. Nutr**, v. 66, p. 99-107, 2019.

ROGUIN, A. *et al.* Haptoglobin phenotype as a predictor of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. **Am. J. Cardiol**, v. 87, p. 330-332, 2001.

ROLDAN, V. *et al.* Hypofibrinolysis in atrial fibrillation. **Am. Heart J**, v. 136, p. 956-960, 1998.

RUSSO-ALVAREZ, G. *et al.* Thromboembolic and Major Bleeding Events With Rivaroxaban Versus Warfarin Use in a Real-World Setting. **Ann. Pharm**, v. 52, p. 19-25, 2018.

RYNDEL, M. *et al.* The haptoglobin 2–2 genotype is associated with carotid atherosclerosis in 64-year old women with established diabetes. **Clin. Chim. Acta**, v. 411, p. 500-504, 2010.

SAI, C.; LI, J. *et al.* Atorvastatin prevents postoperative atrial fibrillation in patients undergoing cardiac surgery. **Hellenic. J. Cardiol**, v. 60, p. 40-47, 2019.

SANDA, T. *et al.* Effects of Long-term Thrombin Inhibition (Dabigatran Etexilate) on Spontaneous Thrombolytic Activity during the Progression of Atherosclerosis in ApoE^{-/-}LDLR^{-/-} Double-Knockout Mice. **Kor. Circ. J**, v. 50, p. 804-816, 2020.

SANTAMARÍA, A. *et al.* Risk of acute coronary artery disease associated with functional thrombin activatable fibrinolysis inhibitor plasma level. **Haem**, v. 89, p. 880-891, 2004.

SANTOS, I. R. *et al.* Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) levels and its polymorphism rs3742264 are associated with dyslipidemia in a cohort of Brazilian subjects. **Clin. Chim. Acta**, v. 10, p. 76-83, 2014.

SATA, N. *et al.* C-reactive protein and atrial fibrillation. Is inflammation a consequence or a cause of atrial fibrillation? **Heart J**, v. 45, p. 441-445, 2004.

SCANDINAVIAN, S. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). **Lan**, v. 344, p. 1383-1389, 1994.

SCHNABEL, R. B. *et al.* 50 year trends in atrial fibrillation prevalence, incidence, risk factors, and mortality in the Framingham Heart Study: a cohort study. **The Lancet**, v. 386, p. 154-162, 2015.

SCHAER, D. J.; *et al.* Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and hemin scavengers as a novel class of therapeutic proteins. **Blo**, v. 121, p. 1276-1284, 2013.

SCHADINGER, S. L. *et al.* Secretion and antifibrinolytic function of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor from human platelets. **J. Thromb. Haemost.** v. 8, p. 2523-2529, 2010.

SCHINDHELM, R. K. *et al.* Myeloperoxidase: A Useful Biomarker for Cardiovascular Disease Risk Stratification? **Clin. Chem**, v. 55, p. 1462-1470, 2009.

SCHNABEL, R. B. *et al.* Relation of multiple inflammatory biomarkers to incident atrial fibrillation. **Am. J. Cardiol**, v. 104, p. 92-96, 2009.

SCHROEDER, V. *et al.* Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) levels in patients with coronary artery disease investigated by angiography. **Thromb. Haemost**, v. 88, p. 1020-1025, 2002.

SCHROEDER, V. *et al.* TAFI activity in coronary artery disease: A contribution to the current discussion on TAFI assays. **Thromb. Haemost**, v. 96, p. 236-237, 2006.

SCOTT, L. *et al.* Role of inflammatory signaling in atrial fibrillation. **International Journal of Cardiology**, v. 287, p. 195-200, 2019.

SCRAGG, R. *et al.* Effect of monthly high-dose vitamin D supplementation on cardiovascular disease in the vitamin D assessment study. **JAMA Cardiol**, v. 2, p. 608-616, 2017.

SHAHABI, P. *et al.* Clinical necessity of partitioning of human plasma haptoglobin reference intervals by recently-discovered rs2000999. **Clin. Chim. Acta**, v. 413, p. 1618-1624, 2012.

SHEA, M. K. *et al.* Vitamin K and vitamin D status: associations with inflammatory markers in the Framingham offspring study. **Am. J. Epidemiol**, v. 167, p. 313-320, 2007.

SHI, J. *et al.* Genetic variations in the thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor gene and risk of cardiovascular disease: A systematic review and meta-analysis. **Thromb. Res**, v. 134, p. 610-616, 2014.

SHOBEN, A. B. *et al.* Seasonal variation in 25-hydroxyvitamin D concentrations in the cardiovascular health study. **Am. J. Epidemiol**, v. 174, p. 1363-1372, 2011.

SILLEN, M.; DECLERCK, P. J. Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor (TAFI): An Updated Narrative Review. **Int. J. Mol**, v. 22, p. 3670, 2021.

SILVA, R. M. Influence of inflammation and atherosclerosis in atrial fibrillation. **Curr. Atheroscler. Rep**, v. 19, p.1-7 2017.

SIMÃO, A. F. *et al.* Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz Brasileira de Prevenção Cardiovascular. **Arq Bras Cardiol**, v. 101, p. 1-63, 2013.

SMITH, J. G. *et al.* Genetic polymorphisms for estimating risk of atrial fibrillation: a literature-based meta-analysis. **J. Int. Med**, v. 272, p. 573-582, 2012.

SOEJIMA, M. *et al.* Genetic factors associated with serum haptoglobin level in a Japanese population. **Clin. Chim. Acta**, v. 433, p. 54-57, 2014.

SOHARA, H. *et al.* Atrial fibrillation activates platelets and coagulation in a time-dependent manner: a study in patients with paroxysmal atrial fibrillation. **J. Am. Coll. Cardiol**, v. 29, p. 106-112, 1997.

SONCINI, M. *et al.* Hypercoagulability and chronic atrial fibrillation: the role of markers of thrombin generation. **Miner. Med**, v. 88, p. 501-505, 1997.

SONG, Y. *et al.* Blocking late sodium current reduces hydrogen peroxide-induced arrhythmogenic activity and contractile dysfunction. **J. Pharmacol. Exp. Ther**, v. 318, p. 214-222, 2006.

SOUZA, L. P. *et al.* Pharmacological strategies to resolve acute inflammation. **Cur. Opin. Pharmacol**, v. 13, p. 1-7, 2013.

SOVARI, A. A.; DUDLEY, S. C. Reactive oxygen species-targeted therapeutic interventions for atrial fibrillation. **Front Physiol**, v. 311, p. 1-64, 2012.

SOVARI, A. A. Cellular and Molecular Mechanisms of Arrhythmia by Oxidative Stress. **Cardiol Res Pract**, v. 2016, p. 1-8, 2016.

SPRONK, H. M. *et al.* Pleiotropic effects of factor Xa and thrombin: what to expect from novel anticoagulants. **Cardiovasc. Res**, v. 101, p. 344-351, 2014.

STEINBERG, S. F. The cardiovascular actions of protease-activated receptors. **Mol. Pharmacol**, v. 67, p. 2-11, 2005.

STEVENS, B. *et al.* Os Custos das Doenças Cardíacas no Brasil. **Arq. Bras. Cardiol**, v. 111, p. 29-36, 2018.

SUMAYA, W. *et al.* Impaired fibrinolysis predicts adverse outcome in acute coronary syndrome patients with diabetes: a PLATO sub-study. **Thromb. Haemost**, v.120, p. 412-422, 2020.

SZAFRANEK, T. *et al.* Haptoglobin: a major susceptibility gene for diabetic vascular complications. **Exp. Clin. Cardiol**, v. 7, p. 113-119, 2002.

TAHHAN, S. A. *et al.* Association between oxidative stress and atrial fibrillation. **Heart Rhythm**, v. 14, p. 1849-2017, 2017.

TAKESHITA, K. *et al.* Increased expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cardiomyocytes contributes to cardiac fibrosis after myocardial infarction. **Am. J. Pathol**, v. 164, p. 449-456, 2004.

TANTRY, U. *et al.* Synergistic influence of rivaroxaban on inflammation and coagulation biomarkers in patients with coronary artery disease and peripheral artery disease on aspirin therapy. **Futur. Cardiol**, v. 16, p. 69-75, 2020.

TARGHER, G. *et al.* Risk of cardiovascular disease in patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Engl. J. Med**, v. 363, p. 1341-1350, 2010.

TÀSSIES, D. *et al.* Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor genetic polymorphisms as markers of the type of acute coronary syndrome. **Thromb. Res**, v. 124, p. 614-618, 2009.

TISHKOFF, D. X. *et al.* Functional vitamin D receptor (VDR) in the t-tubules of cardiac myocytes: VDR knockout cardiomyocyte contractility. **Endocrinol**, v. 149, p. 558-564, 2008 558-564.

TOUSOULIS, D. *et al.* Role of inflammation and oxidative stress in endothelial progenitor cell function and mobilization: therapeutic implications for cardiovascular diseases. **Atheroscler**, v. 201, p. 236-47, 2008.

TREGOUET, D.A. *et al.* Activated thrombin activatable fibrinolysis inhibitor levels are associated with the risk of cardiovascular death in patients with coronary artery disease: the AtheroGene study. **J. Thromb. Haemost**, v. 7, p. 49-57, 2009.

TSE, G. Mechanisms of cardiac arrhythmias. **J. Arrhythm**, v. 32, p. 75-81, 2016.

TVEIT, A. *et al.* Effect of candesartan and various inflammatory markers on maintenance of sinus rhythm after electrical cardioversion for atrial fibrillation. **Am. J. Cardiol**, v. 99, p. 1544-1548, 2007.

UMEJI, K. *et al.* Comparative effects of pitavastatin and probucol on oxidative stress, Cu/Zn superoxide dismutase, PPAR-gamma, and aortic stiffness in hypercholesterolemia. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol**, v. 291, p. 2522-2532, 2006.

UNDAS, A. Altered fibrin clot properties and fibrinolysis in patients with atrial fibrillation: practical implications. **Eur. Soc. Cardiol**, v.22, p. 1-10, 2019.

VAIDYA, A.; WILLIAMS, J. S. The relationship between vitamin D and the renin-angiotensin system in the pathophysiology of hypertension, kidney disease, and diabetes. **Metabol**, v. 61, p. 450-458, 2012.

VALKO, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell. Biol**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VAN ETTEN, E.; MATHIEU, C. Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3: basic concepts. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol**, v. 97, p. 93-101, 2005.

VAN GORP, R. H.; SCHURGERS, L. J. New Insights into the Pros and Cons of the Clinical Use of Vitamin K Antagonists (VKAs) Versus Direct Oral Anticoagulants (DOACs). **Nutri**, v. 7, p. 9538-9557, 2015.

VASCONCELOS, S. M. L. *et al.* Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quím. Nov**, v. 30, p. 1323-1338, 2007.

VERDÚ, J. *et al.* THROMBIN activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) polymorphisms and plasma TAFI levels measured with an ELISA insensitive to isoforms in patients with venous thromboembolic disease (VTD). **Thromb. Haemost**, v. 95, p. 585-586, 2006.

VIENER, H. L.; LEVY, A. P. Haptoglobin genotype and the iron hypothesis of atherosclerosis. **Atheroscler**, v. 216, p. 17-18, 2011.

VILCHEZ, J. A. *et al.* Biomarkers in atrial fibrillation: an overview. **Int. J. Clin. Pract**, v. 68, p. 434-443, 2014.

VINCENT, H. K. *et al.* Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. **Diab. Obes. Metab**, v. 9, p. 813-839, 2007.

VIOLI, F. *et al.* Antioxidants for prevention of atrial fibrillation: a potentially useful future therapeutic approach? A review of the literature and meta-analysis. **Eur**, v. 16, p. 1107-1116, 2014.

VITALI, F. *et al.* CHA2DS2-VASc score predicts atrial fibrillation recurrence after cardioversion: Systematic review and individual patient pooled meta-analysis. **Wil. Period. Inc**, v. 42, p. 358-364, 2019.

VITEZOVA, A. *et al.* Vitamin D and the risk of atrial fibrillation-The rotterdam study. **PLoS One**, v. 10, p. e0125161, 2015.

XANTHAKIS, V. *et al.* Ideal cardiovascular health: associations with biomarkers and subclinical disease and impact on incidence of cardiovascular disease in the Framingham Offspring Study. **Circ**, v. 130, p. 1676-1683, 2014.

WAGNER, D. *et al.* The genetic basis of singlet oxygen-induced stress responses of *Arabidopsis thaliana*. **Sci**, v. 306, p. 1183-1185, 2004.

WAKILI, R. *et al.* Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation. **J. Clin. Invest**, v. 121, p. 2955-2968, 2011.

WALTERS, M. R. *et al.* 1,25Dihydroxyvitamin D receptors identified in rat heart. **J. Mol. Cell. Cardiol**, v. 18, p 67–72, 1986.

WALTER, M. F. *et al.* Circulating lipid hydroperoxides predict cardiovascular events in patients with stable coronary artery disease: the PREVENT study. **J. Am. Coll. Cardiol**, v. 51, p. 1196-1202, 2008.

WANG, W. *et al.* Association between thrombinactivatable fibrinolysis inhibitor gene polymorphisms and venous thrombosis risk: a meta-analysis. **Blo. Coagul. Fibrinol**, v. 27, p. 419-430, 2016.

WANG, S. *et al.* Association between serum haptoglobin and carotid arterial functions: usefulness of a targeted metabolomics approach. **Cardiovasc. Diabetol**, v. 18, p. 8-13, 2019.

WATSON, T. *et al.* Mechanisms of thrombogenesis in atrial fibrillation: Virchow's triad revisited. **Lan**, v. 373, p. 155-166, 2009.

WESTERMAN, S.; WENGER, N. Gender differences in atrial fibrillation: a review of epidemiology, management, and outcomes. **Curr. Cardiol. Rev**, v. 15, p. 136-144, 2019.

WHITE, M. *et al.* Cardiac signaling molecules and plasma biomarkers after cardiac transplantation: impact of tacrolimus versus cyclosporine. **J. Heart Lun. Transplant**, v. 32, p. 1222-1232, 2013.

WHO. **WHO guidelines on physical activity and sedentary behaviour.** World Health Organization Geneva. In summary, <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/336657/9789240015111-eng.pdf>; 2020 [accessed on 03.31.22].

WONG, N. D. Epidemiological studies of CHD and the evolution of preventive cardiology. **Nat. Rev. Cardiol**, v. 11, p. 276-289, 2014.

WORKMAN, A. J. *et al.* Cellular bases for human atrial fibrillation. **Heart Rhythm**, v. 5, p. 1-6, 2008.

WOŹNIAK, E. *et al.* The Protective Effect of Dabigatran and Rivaroxaban on DNA Oxidative Changes in a Model of Vascular Endothelial Damage with Oxidized Cholesterol. **Int. J. Mol. Sci**, v. 21, p. 2-13, 2020.

WU, N. *et al.* Association of inflammatory factors with occurrence and recurrence of atrial fibrillation: a meta-analysis. **Int. J. Cardiol**, v. 169, p. 62-72, 2013.

WU, N. *et al.* Association of hemostatic markers with atrial fibrillation: a meta-analysis and meta-regression. **P. One**, v. 10, p. 1-19, 2015.

WU, N. *et al.* Elevated plasma levels of Th17-related cytokines are associated with increased risk of atrial fibrillation. **Sci. Rep**, v. 6, 2016.

YANG, H. *et al.* Redox modification of cysteine residues regulates the cytokine activity of high mobility group box-1 (HMGB1). **Mol. Med**, v. 18, p. 250-259, 2012.

YANG, H. *et al.* Identification of CD163 as an antiinflammatory receptor for HMGB1-haptoglobin complexes. **JCI Insig**, v. 3, p. 1-14, 2016.

YANG, H. *et al.* Redox modification of cysteine residues regulates the cytokine activity of high mobility group box-1 (HMGB1). **Mol. Med**, v. 27, p. 1-7, 2021.

YAO, X. *et al.* Non-vitamin K antagonist oral anticoagulant dosing in patients with atrial fibrillation and renal dysfunction. **J. Am. Coll. Cardiol**, v. 69, p. 2779-2790, 2017a.

YAO, X. *et al.* Renal Outcomes in Anticoagulated Patients With Atrial Fibrillation. **J. Am. Coll. Cardiol**, v. 70, p. 2622-2631, 2017b.

YAO, C. *et al.* Enhanced Cardiomyocyte NLRP3 Inflammasome Signaling Promotes Atrial Fibrillation. **Circ**, v. 138, p. 2227-2242, 2018.

YI-JEN, C. *et al.* Angiotensin II and angiotensin II receptor blocker modulate the arrhythmogenic activity of pulmonary veins. **J. Pharmacol**, v. 147, p. 12-22, 2010.

YOUN, J. Y. *et al.* Oxidative stress in atrial fibrillation: An emerging role of NADPH oxidase. **J. Mol. Cell. Cardiol**, v. 62, p. 72-79, 2013.

ZABCZYK, M. *et al.* Thromboembolic events are associated with prolonged clot lysis time in patients with permanent atrial fibrillation. **Pol. Arch. Med. Wewn**, v. 121, p. 400-407, 2011.

ZAMAN, A.K. *et al.* A profibrotic effect of plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) in the heart. **Exp. Biol. Med**, v. 234, p. 246-254, 2009.

ZAKKAR, M. *et al.* Inflammation, oxidative stress and postoperative atrial fibrillation in cardiac surgery. **Pharmacol. Ther**, v. 154, p. 13-20, 2015.

ZHANG, Z, Y. *et al.* Meta-analysis of vitamin D deficiency and risk of atrial fibrillation. **Clin. Cardiol**, v. 39, p. 537-543, 2016.

ZHENG, H. *et al.* Rice NAD⁺-dependent histone deacetylase OsSRT1 represses glycolysis and regulates the moonlighting function of GAPDH as a transcriptional activator of glycolytic genes. **Nucleic. Acids. Res**, v. 45, p. 12241-12255, 2017.

ZHENG, K. H. *et al.* Lipoprotein (a) and Oxidized Phospholipids Promote Valve Calcification in Patients With Aortic Stenosis. **J. Am. Coll. Cardiol**, v. 73, p. 2150-2162, 2019.

ZIMERMAN, L. I. *et al.* Sociedade Brasileira de Cardiologia. Diretrizes Brasileiras de Fibrilação Atrial. **Arq. Bras. Cardiol**, v. 92, p. 1-39, 2009.

ZITTERMANN, A. *et al.* Low vitamin D status: a contributing factor in the pathogenesis of congestive heart failure? **J. Am. Coll. Cardiol**, v. 41, p. 105-112, 2003.

ZITTERMANN, A. *et al.* Efeitos da suplementação de vitamina D nas concentrações de renina e aldosterona em pacientes com insuficiência cardíaca avançada: o estudo EVITA. **Rev. Int. Endocrinol**, v. 2018, 2018.

ZORIO, E. *et al.* Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in young patients with myocardial infarction and its relationship with the fibrinolytic function and the protein C system. **J. Haematol**, v. 122, p. 958-965, 2003.

APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa “VARFARINA *versus* NOVOS ANTICOAGULANTES ORAIS: ESTUDO HEMOSTÁTICO COMPARATIVO EM UMA POPULAÇÃO DE PACIENTES COM FIBRILAÇÃO ATRIAL”

Prezado Sr. (a),

A pesquisa que o senhor (a) está sendo convidado (a) a participar como voluntário (a) é um estudo científico que tem como objetivo avaliar alguns parâmetros da coagulação em indivíduos com fibrilação atrial em uso de varfarina, dabigatrana ou rivaroxabana. O benefício que você receberá será através da possibilidade de avaliar o uso do medicamento sobre o ponto de vista da eficácia, segurança e do controle laboratorial que poderá auxiliar o médico responsável em uma melhor conduta terapêutica.

Nesta pesquisa, cada participante deverá responder a um questionário, que será aplicado pela equipe da pesquisa, e deverá doar uma única amostra de sangue, na qual serão realizados vários exames laboratoriais gratuitos, cujos resultados serão encaminhados para o seu médico.

A coleta de sangue venoso inclui um pequeno risco de acidente de punção, representado, principalmente por extravasamento sangüíneo subcutâneo de pequena gravidade, que pode resultar em leve dor localizada e formação de pequeno hematoma. Para minimizar este risco, a coleta de sangue será realizada em local adequado, por um profissional farmacêutico, com capacidade técnica e experiência que estará atento e tomará todas as providências necessárias. Na coleta de 20 mL de sangue será utilizado material descartável de boa qualidade (agulhas e tubos a vácuo), visando o êxito do procedimento.

Serão armazenadas amostras de sangue e de DNA extraídas do sangue coletado, por um período de cinco anos, no Banco de Material Biológico do departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia. Essas amostras poderão ser eventualmente utilizadas em futuras análises para avanços científicos no uso dos anticoagulantes orais e na fibrilação atrial. Neste caso, todos os participantes serão consultados e novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será coletado.

O nome do participante e, também, os resultados dos exames serão mantidos em segredo e privacidade, sob a responsabilidade da equipe de pesquisadores. Os resultados serão apresentados em reuniões clínicas, nos setores da instituição ligados ao estudo ao final do trabalho e estarão disponíveis inclusive para os participantes. Este projeto visa também publicação dos resultados em revistas especializadas e tese de doutorado.

Não haverá despesas pessoais para o paciente, ficando o ônus (material, recurso humano, despesa com laboratório) para o patrocinador, também não haverá compensação financeira pela sua participação, nem remuneração financeira do pesquisador, cujo interesse é apenas científico.

Caso você não queira participar da pesquisa, não haverá qualquer prejuízo no seu tratamento ou na assistência recebida pelo seu médico. Para qualquer dúvida sobre esta pesquisa você deverá entrar em contato, por telefone, com as pessoas responsáveis pela mesma, cujos nomes estão relacionados a seguir:

- Profa. Dra. Cláudia Natália Ferreira – Tel: (31) 3409-4983, 8807-6903.
Professora de Análises Clínicas do Setor de Patologia Clínica do Coltec/UFMG.
Assinatura: _____

- Profa Maria das Graças Carvalho – Tel: (31) 3409-6881
Professora Titular do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG.
Assinatura: _____

- Dr. Estevão Lanna Figueiredo
Médico Cardiologista colaborador do projeto de pesquisa.
Assinatura: _____

- Aluno de mestrado ou doutorado a ser selecionado pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.
Assinatura: _____

- COEP – UFMG: Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais. Endereço: Avenida Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar - Sala 2005, Campus Pampulha, BH, MG. Tel: (31) 3409-4592.

- CEP – Hospital Lifecenter: Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Lifecenter. Endereço: Avenida do Contorno, 4747, 20º andar, vilcrrro: Serra, Belo Horizonte, MG. Tel: (31) 3280-4114.

Agradecemos pela sua valiosa participação!

TERMO DE CONSENTIMENTO

Declaro que, após convenientemente esclarecido (a) pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, concordo em participar como voluntário (a) do projeto de pesquisa "**Varfarina versus novos anticoagulantes orais: estudo hemostático comparativo em uma população de pacientes com fibrilação atrial**", e autorizo a coleta de 20 mL de sangue e o armazenamento do mesmo e de amostras de DNA para eventuais futuras análises sobre anticoagulação oral e fibrilação atrial e que recebi cópia do presente Termo de Consentimento.

Nome completo: _____

Documento de identificação: _____

Assinatura: _____ Data: ____/____/____

APÊNDICE B – Ficha clínica: pacientes

FICHA CLÍNICA – PACIENTES

Projeto de Pesquisa: “VARFARINA *versus* NOVOS ANTICOAGULANTES ORAIS: ESTUDO HEMOSTÁTICO COMPARATIVO EM UMA POPULAÇÃO DE PACIENTES COM FIBRILAÇÃO ATRIAL”

I – IDENTIFICAÇÃO:

- 1.Nome: _____
 2.Data de nascimento: ____/____/____
 3.Endereço: _____
 4.Telefone: _____ 5. CEP: _____
 6.Data da entrevista/coleta de sangue: ____/____/____ 7.Jejum: _____

II – DADOS DEMOGRÁFICOS:

- 1.Sexo: () M () F
 2.Estado Civil: () solteiro () casado () viúvo () separado () divorciado
 3.Tabagista: () Não () Sim Quantos cigarros por dia, em média: _____
 4.Ex-tabagista: () Não () Sim Parou a quanto tempo: _____
 5.Etilista: () Não () Sim Qual bebida: _____ Quantidade/dia: _____
 6.Ex-etilista: () Não () Sim Parou a quanto tempo: _____
 7.Doenças:
 () Hipertensão arterial () Insuficiência cardíaca () Arritmia
 () Doença coronariana () Asma, enfisema () Doença renal
 () Doença hepática () Doença hemorrágica () Tromboses
 () Neoplasias () Doença da tireóide () Diabetes mellitus ()
 Outras: _____
 8.Cirurgias prévias: _____
 9.Atividade física regular? () Não () Sim : Qual modalidade: _____
 Frequência semanal: _____ Duração dos exercícios: _____
 10.Diagnóstico de dislipidemia prévia: () Não () Sim Qual: _____
 Tempo de diagnóstico: _____ Medicamentos em uso e dose: _____
 11.Uso de anticoagulantes orais? () Não () Sim
 Quais: () Varfarina () Dabigatрана () Rivaroxabana Dose: _____
 12. Outros medicamentos em uso e dose:

12. Grau de escolaridade: () Fundamental incompleto () Fundamental completo
 () Médio incompleto () Médio completo () Graduação () Pós-Graduação

III – HISTÓRIA FAMILIAR:

- 1.Etnia: () Caucasiano () Mestiço: mulato, pardo () Negro () Índio () Asiático () Outros mestiços:

 2.Seu pai tem/tinha alguma doença? () Não () Sim (Qual? _____)

3.Sua mãe tem/tinha alguma doença? () Não () Sim (Qual?_____)

4.Algum filho seu tem alguma doença? () Não () Sim () Não se aplica
(Qual?_____)

5.Existe alguma doença presente em mais de uma pessoa de sua família (incluindo tios, tias, primos, avós, sobrinhos)? () Não () Sim (Qual e membros afetados?_____)

IV- EXAME FÍSICO:

Peso :_____

altura:_____

IMC:_____

Circunferência abdominal:_____

Pressão arterial_____

Medida do quadril:_____

Frequência cardíaca _____

HAS-BLED _____

V-CRITÉRIOS PARA FIBRILAÇÃO ATRIAL NÃO REUMÁTICA

() Paroxística () Persistente () Permanente

Recorrente: () Sim () Não

Escore de risco CHADS2 = _____

Escore de risco CHA2DS2-VASc = _____

Fatores de risco predisponentes para fibrilação atrial: () AVC () EIT () Idade > 75 anos

() Idade entre 65-74 anos () Insuficiência cardíaca () Diabetes mellitus () HAS

() Sexo feminino () Doença vascular

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

CLINICOS	MEDICAMENTOSOS
<ul style="list-style-type: none"> - Distúrbios hemorrágicos adquiridos ou hereditários; - Doenças hepáticas, malignas, auto-imunes, tireoidianas e infecciosas; - Insuficiência renal grave (<i>Clearance</i> de creatinina inferior a 30 mL/min); - Gravidez; - Alcoolismo. 	<ul style="list-style-type: none"> - Antiplaquetários e fibrinolíticos - Amiodarona - Verapamil - Quinidina - Cetoconazol - Ritonavir - Corticóides - Antinflamatórios

médico responsável

(carimbo e assinatura)

APÊNDICE C – Ficha clínica: controle

FICHA CLÍNICA – GRUPO CONTROLE

Projeto de Pesquisa: “VARFARINA *versus* NOVOS ANTICOAGULANTES ORAIS: ESTUDO HEMOSTÁTICO COMPARATIVO EM UMA POPULAÇÃO DE PACIENTES COM FIBRILAÇÃO ATRIAL/TROMBOEMBOLISMO VENOSO PROFUNDO”

I – IDENTIFICAÇÃO:

1.Nome: _____

2.Data de nascimento: ____/____/____

3.Endereço: _____

4.Telefone: _____ 5. CEP: _____

6.Data da entrevista/coleta de sangue: ____/____/____ 7.Jejum: _____

II – DADOS DEMOGRÁFICOS:

1.Sexo: () M () F

2.Estado Civil: () solteiro () casado () viúvo () separado () divorciado

3.Tabagista: () Não () Sim Quantos cigarros por dia, em média: _____

4.Ex-tabagista: () Não () Sim Parou há quanto tempo? _____

5.Etilista: () Não () Sim Qual bebida: _____ Quantidade/dia: _____

6.Ex-etilista: () Não () Sim Parou há quanto tempo? _____

7.Doenças:

() Hipertensão arterial () Insuficiência cardíaca

() Doença coronariana () Asma, enfisema () Doença renal

() Doença hepática () Doença hemorrágica () Diabetes mellitus

() Síndrome do Anticorpo Antifosfolípideo () Neoplasias () Doença da

tireóide () Outras: _____

8.Cirurgias prévias: _____

9.Atividade física regular? () Não () Sim : Qual modalidade: _____

Freqüência semanal: _____ Duração dos exercícios: _____

10.Diagnóstico de dislipidemia prévia: () Não () Sim Qual: _____

Tempo de diagnóstico: _____ Medicamentos em uso e dose: _____

11. Medicamentos em uso e dose: _____

12. Grau de escolaridade: () Fundamental incompleto () Fundamental completo

() Médio incompleto () Médio completo () Graduação () Pós-Graduação

III – HISTÓRIA FAMILIAR:

1.Seu pai tem/tinha alguma doença? () Não () Sim (Qual? _____)

2.Sua mãe tem/tinha alguma doença? () Não () Sim (Qual? _____)

3.Algum filho seu tem alguma doença? () Não () Sim () Não se aplica
(Qual? _____)

4. Existe alguma doença presente em mais de uma pessoa de sua família (incluindo tios, tias, primos, avós, sobrinhos)? () Não () Sim

Quais membros afetados? _____)

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Faixa etária: > 18 anos. Idade: ----- anos

Não apresentar histórico de fibrilação atrial

Não apresentar histórico de trombose

Não apresentar histórico de câncer

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

CLÍNICOS	MEDICAMENTOSOS
<ul style="list-style-type: none"> - Distúrbios hemorrágicos adquiridos ou hereditários; - Doenças hepáticas, malignas, auto-imunes, tireoidianas e infecciosas; - Insuficiência renal grave (<i>Clearance</i> de creatinina inferior a 30 mL/min); - Gravidez; - Doenças inflamatórias 	<ul style="list-style-type: none"> - Varfarina - Rivaroxabana - Dabigatrana - Heparina - Fondaparinux - Antiplaquetários e fibrinolíticos - Amiodarona - Verapamil - Quinidina - Cetoconazol - Ritonavir - Corticóides - Antiinflamatórios - Terapia de reposição hormonal - Anticoncepcional

médico responsável
(carimbo e assinatura)

ANEXO A – Carta de aprovação do comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, COEP.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 12603413.0.0000.5149

Interessado(a): Profa. Cláudia Natália Ferreira
Setor de Patologia Clínica
COLTEC - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 03 de maio de 2013, o projeto de pesquisa intitulado "**Varfarina versus novos coagulantes orais: estudo hemostático comparativo em uma população de pacientes com fibrilação atrial**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO B – Artigo I publicado com os resultados do doutorado

Molecular Biology Reports
<https://doi.org/10.1007/s11033-022-07528-5>

ORIGINAL ARTICLE



Evaluation of serum haptoglobin levels and Hp1-Hp2 polymorphism in the haptoglobin gene in patients with atrial fibrillation

Luana Bernardes Xavier Costa¹ · Gabriela Lopes Martins² · Rita Carolina Figueiredo Duarte¹ · Pâmella Lemos Rocha¹ · Estêvão Lanna Figueiredo³ · Francisco Rezende Silveira⁴ · Maria das Graças Carvalho¹ · Helton José Reis² · Karina Braga Gomes¹ · Cláudia Natália Ferreira^{1,5}

Received: 8 February 2022 / Accepted: 26 April 2022
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2022

Abstract

Background Atrial fibrillation (AF) is an arrhythmia that involves structural and electrophysiological abnormalities. Many of the AF-related clinical conditions are associated with an increase in inflammatory and oxidative factors. Haptoglobin (Hp) is an acute phase protein whose biological role is to promote clearance of free hemoglobin (Hb). In addition, for being considered an inflammatory marker, Hp represents a protective mechanism against the oxidative effects of Hb. The Hp1-Hp2 polymorphism at *Hp* locus can lead to three phenotypes related to structural and functional differences in the protein. The objective of this study was to evaluate Hp levels and Hp1-Hp2 polymorphism at *Hp* locus in patients with AF compared to a control group.

Methods and results This study included 65 patients with AF and 54 individuals without the arrhythmia. Biochemical parameters were determined using Vitros system, plasma levels of Hp were measured in serum samples by using ELISA method and polymorphisms were verified by PCR technique. Plasma Hp levels, as well as allelic and genotypic frequency, were not associated with AF. The levels of Hp also did not differ among the genotypes according to the applied models.

Conclusions The results suggest that Hp levels and Hp1-Hp2 polymorphism are not associated to AF.

Keywords Atrial fibrillation · Haptoglobin · Polymorphism · Genotyping

Introduction

Atrial fibrillation (AF) is the most common type of cardiac arrhythmia in clinical practice, characterized by an irregular electrical activation of the atria that leads to uncoordinated contractions and the formation of atrial thrombi [1–3]. The prevalence of AF is around 1–2% in the general population

[4]. In the Brazilian population, the prevalence of AF is estimated at 2.2%, increasing with age [5]. The pathophysiology of AF is multifactorial and is often associated with some traditional risk factors such as obesity, hypertension, diabetes, smoking and coronary artery disease (CAD) [6–9]. These clinical complications lead to an impaired quality of life and increase healthcare costs in patients with AF [3, 6, 10]. In general, such clinical conditions are considered risk factors for AF and they are also associated with an increase in inflammatory and oxidative factors [2, 10]. Therefore, various and sundry studies have investigated underlying mechanisms such as inflammation and oxidative stress in AF [11–13].

Haptoglobin is an acute phase alpha-glycoprotein produced mainly in the liver and found in human plasma. Its biological role is to bind and free circulating hemoglobin (Hb), forming the soluble haptoglobin-hemoglobin (Hp-Hb) complex that is recognized by the CD163 receptor located on the surface of monocytes, macrophages and Kupffer cells. Through CD163 receptor-mediated endocytosis of

✉ Cláudia Natália Ferreira
 ferreiracn@gmail.com

¹ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

² Departamento de Farmacologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

³ Hospital Lifercenter, Belo Horizonte, MG, Brazil

⁴ Hospital Semper, Belo Horizonte, MG, Brazil

⁵ Colégio Técnico, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antonio Carlos, 6627–Pampulha, Belo Horizonte, MG, Brazil

phagocytic cells, Hp is able to promote Hb clearance [14, 15]. The Hp-Hb-CD163 complex induces the production of several anti-inflammatory and antioxidant mediators. The production of Hp is induced by cytokines such as TNF, IL-6 and IL-1, via binding these cytokines to the regulatory promoter sites of *Hp* gene [16, 17]. Then, serum Hp levels increase considerably in the inflammatory processes [18]. At low levels of Hp, iron incorporated into free Hb by acting as an oxidizing agent in the bloodstream, favoring the production of free radicals [17, 19]. Therefore, plasma levels of Hp are known to be associated with many diseases that lead to inflammatory and oxidative processes, including cardiovascular diseases, autoimmune disorders and diabetes [18–22].

Hp is represented by a tetrameric structure composed of two alpha peptide chains (light chain) and two beta peptide chains (heavy chains) that are covalently linked. In humans, the *Hp* locus is polymorphic, having two common alleles, Hp1 and Hp2. One of them, the Hp2 allele, is specific to humans and has seven exons that probably arose from a duplication (non-homologous crossover) involving exons 3 and 4 of the Hp1 allele [23]. The two common alleles result in three Hp genotypes, Hp1-Hp1, Hp2-Hp1, and Hp2-Hp2 [19]. The stoichiometry of mature Hp protein is genotype dependent: Hp1-Hp1 individuals produce a single linear homodimer, Hp2-Hp2 produce cyclic polymers and, in heterozygous individuals Hp2-Hp1, the Hp protein can be found as linear homodimer and/or multimers [24, 25]. In addition to structural differences, the protein products of the *Hp* locus also show functional differences depending on the genotype. The protein product of the Hp1-Hp1 genotype has a greater capacity to bind Hb, the CD163 receptor and a higher rate of release of the Hp-Hb complex from the circulation compared to carriers of the Hp2-Hp2 genotype. In this context, the Hp1 allele is recognized for having greater anti-inflammatory and antioxidant properties, while the Hp2 allele presents a dysfunction in the clearance of Hb and, therefore, it has a lower antioxidant potential.

Considering the differences in the properties of the Hp1 and Hp2 proteins, it is not surprising that the Hp2 allele is often associated with an increased risk of vascular complications such as ischemic stroke, myocardial infarction and CAD [26–28]. However, the association of the Hp1 allele with an increased risk of CVD has also been seen. Costacou et al. [18] and Wang et al. [29] showed that the Hp1 allele may also confer a significant risk factor for CV. In addition, conflicting reports of both association [30] and non-association [31] of the Hp2 allele with increased risk of CVD have been presented. Serum Hp levels are another factor that is influenced by the Hp1-Hp2 polymorphism. By comparing to Hp1 allele, Hp2 allele is associated with a dose-dependent reduction in serum protein levels, with serum Hp level being: Hp1-Hp1 > Hp2-Hp1 > Hp2-Hp2. According to Kazmi et al. the differential effects of the

Hp1 and Hp2 alleles may mediate differences in circulating Hp levels, or functional differences in their protein products, or both [32]. Rodrigues et al. [33] observed that diabetic patients carrying the Hp2 allele had higher levels of Hp when compared to a control group. In the work conducted by Carvalho et al. [34] plasma Hp levels did not differ between the genotypes of the Hp1-Hp2 polymorphism in patients with polycystic ovary syndrome.

By considering the frequent association of Hp polymorphism with cardiometabolic dysfunctions and the involvement of serum Hp with the inflammatory and oxidative process characteristic of AF, it was purposed to investigate in a case-control study the plasma levels of Hp and the Hp1-Hp2 polymorphism in the *Hp* gene patients with AF.

Methods

Subjects

The present study is an observational, cross-sectional and case-control model, which included 65 participants with a diagnosis of AF confirmed by electrocardiography and 54 healthy individuals without the arrhythmia (control).

Patients with AF were recruited from the outpatient clinics of Hospitals Lifecenter, Semper and Ipsemg (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil). Control subjects were recruited from the local community and had no prior diagnosis of AF. The study was approved by the Research Ethics Committee of UFMG (CAAE: 12603413.0.0000.5149), Lifecenter, Semper and Ipsemg Hospitals and were performed in accordance to the principles provided in the Declaration of Helsinki. All participants received clear information about the research, read and signed the written Informed Consent, before any study procedures.

The participants were excluded if they used any anti-platelet agent, non-steroidal anti-inflammatory drugs, heparin, hormone replacement therapy, antifibrinolytics, amiodarone, verapamil, quinidine, azole antifungals, and ritonavir in the 4 weeks prior to the study. Moreover, subjects with the following clinical conditions were also excluded: current diagnosis of alcohol use disorder; chronic kidney disease (creatinine clearance < 30 mL/min); severe dyslipidemia; acquired or hereditary bleeding disorders; liver disease; thyroid disease; infectious, inflammatory, autoimmune, and malignant diseases; pregnancy; puerperium; and breast-feeding.

Biological samples

After a 12 h fasting, blood samples were collected from the patients in tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid

(EDTA) and in tubes without anticoagulant. A centrifugation process at $1100\times g$ for 15 min at 25 °C was performed on the plasma and serum samples within 4 h after collection. After proper identification, the samples were stored at -80 °C until analysis. Aliquots of whole blood in EDTA were stored at -20 °C for later genomic DNA extraction.

Clinical and laboratorial evaluation

The biochemical parameters of total cholesterol (TC), high density lipoprotein (HDL-c), low density lipoprotein (LDL-c), triglycerides, were obtained through the automatic analyzer Vitros 250, Johnson & Johnson®.

Plasma levels of Hp were measured in serum samples by the ELISA method using the Quantikine® ELISA kit (R&D Systems, Incorporated, USA), strictly following the manufacturer's instructions.

Genotyping

DNA samples were obtained from whole blood collected in EDTA using the Biopur Mini Spin Kit (BiometrixBiotechnology®). Genotyping of the Hp1-Hp2 polymorphism was performed following the protocol by Koch et al. as described by Carvalho et al. [34, 35].

Statistical analysis

Our sample size was estimated from the mean values of Hp levels obtained in our previous study [33], including patients with CVD (mean \pm SD), since there are no studies evaluating Hp and AF levels in the Brazilian population. The sample size calculation was performed using T test between two independent groups. The values considered were: power = 0.95; significance level = 0.05. The software used was OpenEpi. The ratio 1:1 case/control resulted in at minimum 35 individuals in each group.

Continuous variables were analyzed for normal distribution using the Shapiro–Wilk test. Student's t and Mann–Whitney tests were used to compare two groups (AF vs controls), when data were normal or not, respectively. Statistical analyzes were performed using the Statistical Package of the Social Sciences (SPSS) version 17.0. Values of $p < 0.05$ were considered as significant. The GraphPad Prism® software version 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) was used to prepare the graphs. Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) was assessed using exact test in the GENEPOP software (http://genepop.curtin.edu.au/genepop_op1.html). Differences in genotypic and allelic frequencies of the Hp gene between the two groups were investigated by the chi-square test (χ^2).

Results

Table 1 summarizes the demographic, clinical and laboratory characteristics of the study participants. There were no significant differences between groups regarding age, sex, smoking, DM2, alcoholism, (all $p > 0.05$). In the evaluation of the lipid profile, a significant difference was observed only in the serum levels of TC between the control and AF group ($p = 0.028$). Regarding the presence of arterial hypertension and dyslipidemia, the group of patients with AF had a higher frequency compared to control ($p < 0.001$ and $p = 0.044$, respectively). Physical activity frequency in control group was significantly higher compared to AF group ($p < 0.001$).

Haptoglobin plasma levels did not differ significantly between the control (0.9 ± 0.4 ng/mL) and AF groups (0.8 ± 0.4 ng/mL) ($p = 0.509$) (Fig. 1).

The Hp1-Hp2 polymorphism was in Hardy–Weinberg (HWE) balance ($p = 0.082$ for AF; $p = 0.369$ for controls) for both groups, suggesting that our case–control study had a well-characterized random sample. There was no difference in allelic and genotypic frequency between the AF and control groups, according to the additive, recessive or dominant model (Table 2).

Table 1 Demographic, clinical, and laboratory characterization of participants of the study

Parameter	Control	AF	P
Age (years)	67 (6)	74 (14)	0.065
Sex			
Female n (%)	38 (61.3%)	39 (45.9%)	0.069
Male n (%)	24 (38.7%)	46 (54.1%)	
Smoker n (%)	2 (3.2%)	4 (4.7%)	0.654
HAS n (%)	31 (50%)	80 (94.1%)	<0.001*
DM2 n (%)	10 (16.1%)	25 (29.4%)	0.078
Dyslipidemia n (%)	23 (39%)	48 (56.5%)	0.044*
Physical Activity	60 (98.4%)	19 (22.9%)	<0.001*
Alcohol Consumption	17 (27.4%)	21 (24.7%)	0.708
Total Cholesterol (mg/dL)	179.3 \pm 36.8	178.5 \pm 34.8	0.028*
LDL-c (mg/dL)	96.6 \pm 26.7	90.1 \pm 29.2	0.084
HDL-c (mg/dL)	53.1 \pm 16.2	57 \pm 15.4	0.260
Tryglicerides (mg/dL)	147.2 \pm 49.7	156.7 \pm 79.4	0.411

Results are presented as median and interquartile range to non-parametric variables. Chi-square or Fisher test were also used for categorical variables and presented by sample number and frequency in percentage. Students t test was used to evaluate parametric variables, presented as mean \pm standard deviation. Significant Values *: $p < 0.05$
 HAS systemic arterial hypertension; DM2 type 2 diabetes mellitus; LDL-c low density lipoprotein cholesterol; HDL-c high density lipoprotein cholesterol

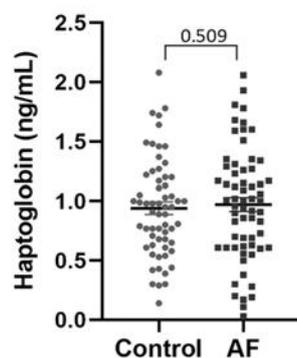


Fig. 1 Haptoglobin plasma levels between control and AF groups

Plasma levels of Hp were compared between the genotypes of the Hp1-Hp2 polymorphism, according to the additive, recessive or dominant model in each group, in order to assess whether the polymorphism could alter the circulating levels of the protein. Plasma levels of Hp did not differ between genotypes according to each model (Table 3).

Discussion

In this case-control study, there were no significant differences regarding Hp levels between the control and AF group. The allelic and genotypic frequency of the Hp1-Hp2 polymorphism also did not differ between the control group and patients with AF, according to the additive, recessive

or dominant model. Similarly, the genotypes of the Hp1-Hp2 polymorphism did not change the serum levels of Hp within the applied models. As far as it is known, this study is unprecedented in the assessment of serum Hp levels, as well as the allelic and genotypic frequency of the Hp1-Hp2 polymorphism in the *Hp* gene in patients with AF.

Although Hp levels present themselves as a marker in several autoimmune pathologies and in cardiovascular diseases [18–22], in our study Hp was not shown to be associated to AF, since serum Hp levels did not differ between the analyzed groups. Some factors intrinsic to the population, such as age, sex and ancestry, can affect Hp levels. Therefore, the comparison of studies carried out in different populations must be interpreted with caution [32]. Langlois and Delanghe already showed that gender can affect circulating Hp levels [19]. Clinical studies in the French population document that age over 18 years does not influence the level of Hp [36, 37]. Soejima et al. showed that ancestry also impacts in circulating Hp [38]. Furthermore, differences in Hp levels between studies may still be due to methodological differences in the Hp assay technique [32].

When investigating the role of the Hp phenotype in cardiovascular disease risk, some studies showed conflicting results [18, 29–31]. However, in general, several studies have indicated that individuals with the Hp2-Hp2 genotype are at increased risk of cardiovascular complications [28, 30, 39]. Despite this, our results did not show differences in genotypic and allelic frequencies of the Hp1-Hp2 polymorphism between patients with AF and the control group, which suggests that such polymorphism in the *Hp* locus is not associated with the etiology of the arrhythmia.

The frequency of the Hp1 and Hp2 alleles is highly variable in world populations. But in general, the Hp1 allele is

Table 2 Genotypic and allelic frequency of the Hp1-Hp2 polymorphism of Haptoglobin in the control and AF group

Aditive model	Control (54)	AF (65)	OR	95% CI	P
Hp1-Hp1	0 (0%)	3 (4.5%)	0	0	0.261
Hp2-Hp1	20 (37%)	25 (38.5%)	0.871	0.411–1.873	
Hp2-Hp2	34 (63%)	37 (57%)	Reference		
Recessive model					
Hp2-Hp2	34 (63%)	37 (57%)	0.777	0.371–1.628	0.575
Hp1-Hp1 + Hp2-Hp1	20 (37%)	28 (43%)			
Dominant model					
Hp2-Hp2 + Hp2-Hp1	54 (100%)	62 (94%)	0	Not applicable	0.126
Hp1-Hp1	0 (0%)	4 (6%)			
Allele					
Hp1	20 (18.5%)	31 (24%)	1.378	0.733–2.590	0.319
Hp2	88 (81.5%)	99 (76%)			

Chi-square test with residual analysis. Significant $p < 0.05$

Table 3 Plasma levels of Hp for each genotype of the Hp1-Hp2 polymorphism in the *Hp* gene

Haptoglobin (ng/mL)						
Aditive model	Control	p	AF	p	Total population	p
Hp1-Hp1	0	0.868	0.83 ± 0.27	0.382	0.83 ± 0.27	0.481
Hp2-Hp1	0.94 ± 0.29		1.05 ± 0.50		1.0 ± 0.42	
Hp2-Hp2	0.92 ± 0.48		0.86 ± 0.44		0.90 ± 0.46	
Recessive model						
Hp2-Hp2	0.94 ± 0.29	0.868	0.88 ± 0.24	0.736	0.99 ± 0.41	0.302
Hp1-Hp1 + Hp2-Hp1	0.92 ± 0.47		0.96 ± 0.48		0.90 ± 0.46	
Dominate model						
Hp1-Hp1	0	Not applicable	1.02 ± 0.48	0.238	0.88 ± 0.24	0.770
Hp2-Hp1 + Hp2-Hp2	0.93 ± 0.41		0.86 ± 0.44		0.94 ± 0.44	

Variables presented as mean ± standard deviation. Significant $p < 0.05$

less frequent in East Asian populations than in other population groups, including European, African, and Native American groups [40]. For Western countries, the mean distribution of Hp genotypes is characterized by: 16% Hp1-Hp1, 48% Hp2-Hp1 and 36% Hp2-Hp2, which correspond to allele frequencies of around 40% Hp1 and 60% Hp2 [41, 42]. Even without significant differences, it was observed in the results that the Hp2-Hp2 genotype was more frequent in patients with AF (57%) and in the control group (63%). The allele with the highest frequency in both groups was Hp2 [AF (76%); control (81.5%)]. Similar to this study, the works by Rodrigues et al. [33] and Carvalho et al. [34] also evaluated the genotypic and allelic frequency of the Hp1-Hp2 polymorphism in the Brazilian population. The heterozygous Hp2-Hp1 genotype was the most frequent among the groups evaluated, and, as in this study results, the Hp2 allele was the most frequent. These results show the genetic pattern of the Brazilian population in relation to the Hp1-Hp2 polymorphism, taking into account that the genetic characteristics of this population come from European, African and Amerindian miscegenation.

The genotypes of the Hp1-Hp2 polymorphism of the *Hp* gene within the additive, recessive and dominant models did not alter the serum levels of the protein in AF patients. Despite this result, according to Kazmi et al. in addition to the functional effects of different protein products from Hp1 to Hp2 alleles, the genotypic differences of the polymorphism may also mediate circulating Hp levels [32]. Studies with the Chinese population demonstrate a correlation of the Hp1 allele with elevated serum Hp levels [22]. The Hp2-Hp2 genotype, in turn, is known to be associated with lower plasma Hp concentrations compared to the Hp1-Hp1 genotype [19].

Contrary to our results, studies in the literature showed genotype-dependent Hp concentrations in cardiovascular

diseases. Lee et al. [43] and Moussa et al. [44] showed higher Hp levels associated with the Hp1-Hp1 genotype compared to Hp2-Hp2 in patients with CAD. Given the above and the fact that Hp1-Hp1 individuals have a protein product with greater binding affinity to Hb, patients with the Hp1-Hp1 genotype would have a reduced risk of cardiovascular disease [45]. In our study, even considering different models of inheritance to minimize the low frequency of the Hp1-Hp1 genotype, no association was observed between genotypes and Hp levels. Our results suggest that serum Hp concentrations in AF are independent of the Hp1-Hp2 polymorphism. In agreement, Carvalho et al. [34] also found no significant differences in Hp levels in relation to the genotypes of the Hp1-Hp2 polymorphism in Brazilian women with PCOS. Rodrigues et al. [33] observed a contrary association in Brazilian diabetic patients, which individuals carrying the Hp2 allele had higher serum levels of Hp. Therefore, we assume that contradictory findings may be related to the genetic characteristics and miscegenation of the Brazilian population.

The main limitation of this study is the small sample size. As AF is a disease commonly observed in elderly population with a lot of comorbidities, we applied a strict inclusion criterion, since these comorbidities could interfere in Hp levels. Consequently, it was an impediment to expand the sample size. Therefore, further studies involving more subjects should be performed to confirm our results.

Conclusion

In conclusion, our study population does not observed association between Hp levels and the Hp1-Hp2 polymorphism at the *Hp* locus with AF. Furthermore, serum Hp concentrations were considered independent of the Hp1-Hp2 polymorphism. However, future studies with more significant sample

sizes are needed in an attempt to identify the relationship between serum levels and/or the Hp phenotype with AF, for a more effective management in this population.

Acknowledgements We would like to thank the sample donors for their participation in the research and all the physicians and staff at Life center and Semper Hospitals for contributing to this study.

Author contributions The investigation was carried out by the authors LBXC, GLM and RCFD. Validation was performed by LBXC, RFD and PLR Resources were offered by ELF, FRS, HJR and KBG. Conceptualization was performed by LBXC, MGC, KBG and CNF. Original writing was done by LBXC. Formal analysis and supervision were carried out by KBG. Review, editing and project management were performed by CNF.

Funding This work was supported by the National Council for Scientific Development—CNPq, by the Research Support Foundation of the State of Minas Gerais—FAPEMIG and by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel—CAPES.

Declarations

Conflict of interest The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

References

- Čihák R, Haman L, Heinc P (2012) Summary of the 2012 focused update of the ESC guidelines for the management of atrial fibrillation: prepared by the Czech Society of Cardiology. *Cor Vasa* 6:341–351. <https://doi.org/10.1016/j.crvasa.2012.11.008>
- Hu YF, Chen YJ, Lin YJ et al (2015) Inflammation and the pathogenesis of atrial fibrillation. *Nat Rev Cardiol* 12:230–243. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2015.2>
- January CT, Wann LS, Calkins H et al (2019) 2019 AHA/ACC/HRS focused update of the 2014 AHA/ACC/HRS guideline for the management of patients with atrial fibrillation: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on clinical practice guidelines and the Heart Rhythm Society. *J Am Col Cardiol* 74:104–132. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.01.011>
- Schnabel RB, Larson MG, Yamamoto JF et al (2009) Relation of multiple inflammatory biomarkers to incident atrial fibrillation. *Am J Cardiol* 104:92–96. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2009.02.053>
- De Moraes ERFL, Cirenza C, Lopes RD et al (2019) Prevalence of atrial fibrillation and stroke risk assessment based on telemedicine screening tools in a primary healthcare setting. *Eur J Intern Med* 67:36–41. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2019.04.024>
- January CT, Wann LS, Alpert JS et al (2014) 2014 AHA/ACC/HRS guideline for the management of patients with atrial fibrillation: executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines and the Heart Rhythm Society. *J Am Col Cardiol* 64:2246–2280. <https://doi.org/10.1161/cir.0000000000000040>
- Fenger-Grøn M, Overvad K, Tjønnelund A et al (2017) Lean body mass is the predominant anthropometric risk factor for atrial fibrillation. *J Am Col Cardiol* 69:2488–2497. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.03.558>
- Tikkanen E, Gustafsson S, Ingelsson E (2018) Associations of fitness, physical activity, strength, and genetic risk with cardiovascular disease: longitudinal analyses in the UK biobank study. *Circulation* 137:2583–2591. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.117.032432>
- Crump C, Sundquist J, Winkleby MA et al (2018) Height, weight, and aerobic fitness level in relation to the risk of atrial fibrillation. *Am J Epidemiol* 187:417–426. <https://doi.org/10.1093/aje/kwx255>
- Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS et al (2016) Executive summary: heart disease and stroke statistics—2016 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 133:447–454. <https://doi.org/10.1161/cir.0000000000000366>
- Bas HA, Aksoy F, Icli A et al (2017) The association of plasma oxidative status and inflammation with the development of atrial fibrillation in patients presenting with ST elevation myocardial infarction. *Scand J Clin Lab Invest* 77:77–82. <https://doi.org/10.1080/00365513.2016.1244857>
- Karam BS, Chavez-Moreno A, Koh W et al (2017) Oxidative stress and inflammation as central mediators of atrial fibrillation in obesity and diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 16:1–9. <https://doi.org/10.1186/s12933-017-0604-9>
- Zheng KH, Tsimikas S, Pawade T et al (2019) Lipoprotein (a) and oxidized phospholipids promote valve calcification in patients with aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol* 73:2150–2162. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.01.070>
- Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C et al (2001) Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* 409:198–201. <https://doi.org/10.1038/35051594>
- Asleh R, Marsh S, Shilkrot M et al (2003) Genetically determined heterogeneity in hemoglobin scavenging and susceptibility to diabetic cardiovascular disease. *Circ Res* 92:1193–1200. <https://doi.org/10.1161/01.res.0000076889.23082.f1>
- Nakata K, Saitoh R, Amano J et al (2012) Alteration of intracellular secretory acute phase response proteins expressed in human hepatocyte induced by exposure with interleukin-6. *Cytok* 59:317–323. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.04.025>
- Schaer DJ, Buehler PW, Alayash AI et al (2013) Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and hemin scavengers as a novel class of therapeutic proteins blood. *J Am Soc Hematol* 121:1276–1284. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-11-451229>
- Costacou T, Levy AP (2012) Haptoglobin genotype and its role in diabetic cardiovascular disease. *J Cardiovasc Transl Res* 5:423–435. <https://doi.org/10.1007/s12265-012-9361-z>
- Langlois MR, Delanghe JR (1996) Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem* 42:1589–1600. <https://doi.org/10.1093/clinchem/42.10.1589>
- Irwin DC, Baek JH, Hassell K et al (2015) Hemoglobin-induced lung vascular oxidation, inflammation, and remodeling contribute to the progression of hypoxic pulmonary hypertension and is attenuated in rats with repeated-dose haptoglobin administration. *Free Radic Biol Med* 82:50–62. <https://doi.org/10.1016/j.freeradiomed.2015.01.012>
- Dalan R, Liew H, Goh LL et al (2016) The haptoglobin 2–2 genotype is associated with inflammation and carotid artery intima-media thickness. *Diab Vasc Dis Res* 13:373–376. <https://doi.org/10.1177/1479164116645247>
- Gurung RL, Yamunaa M, Liu S et al (2019) Association of haptoglobin phenotype with incident acute myocardial infarction in Chinese patients with type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol* 18:1–9. <https://doi.org/10.1186/s12933-019-0867-4>
- Yang H, Lundbäck P, Ottosson L et al (2021) Redox modification of cysteine residues regulates the cytokine activity of high mobility group box-1 (HMGB1). *Mol Med*. <https://doi.org/10.1186/s10020-021-00307-1>

24. Asleh R, Levy AP (2005) In vivo and in vitro studies establishing haptoglobin as a major susceptibility gene for diabetic vascular disease. *Vasc Health Risk Manage* 1:19–28. <https://doi.org/10.2147/vhrm.1.1.19.58930>
25. Farbstein D, Levy AP (2010) The genetics of vascular complications in diabetes mellitus. *Cardiol Clin* 28:477–496. <https://doi.org/10.1016/j.ccl.2010.04.005>
26. Liu H, Shi Y, Guo X et al (2011) Association of haptoglobin 1/2 polymorphism with coronary heart disease in Chinese. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi Chin J Med Gen* 28:60–63. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2011.01.014>
27. Filipek A, Czerwińska ME, Kiss AK et al (2015) Oleacein enhances anti-inflammatory activity of human macrophages by increasing CD163 receptor expression. *Phytomedicine* 22:1255–1261. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.10.005>
28. Ijäs P, Melkas S, Saksi J et al (2017) Haptoglobin Hp2 variant promotes premature cardiovascular death in stroke survivors. *Stroke* 48:1463–1469. <https://doi.org/10.1161/strokeaha.116.015683>
29. Wang S, Wang J, Zhang R et al (2019) Association between serum haptoglobin and carotid arterial functions: usefulness of a targeted metabolomics approach. *Cardiovasc Diabetol* 18:1–13. <https://doi.org/10.1186/s12933-019-0808-2>
30. Cahill LE, Levy AP, Chiuve SE et al (2013) Haptoglobin genotype is a consistent marker of coronary heart disease risk among individuals with elevated glycosylated hemoglobin. *J Am Coll Cardiol* 61:728–737. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2012.09.063>
31. Pechlaner R, Kiechl S, Willeit P et al (2014) Haptoglobin 2-2 genotype is not associated With cardiovascular risk in subjects with elevated glycohemoglobin—results from the bruneck study. *J Am Heart Assoc*. <https://doi.org/10.1161/jaha.113.000732>
32. Kazmi N, Koda Y, Ndiaye NC et al (2019) Genetic determinants of circulating haptoglobin concentration. *Clin Chim Acta* 494:138–142. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.03.1617>
33. Rodrigues KF, Pietrani NT, Carvalho LML et al (2019) Haptoglobin levels are influenced by Hp1–Hp2 polymorphism, obesity, inflammation, and hypertension in type 2 diabetes mellitus. *Endocrinol Diabetes Nutr (Engl Ed)* 66:99–107. <https://doi.org/10.1016/j.endinu.2018.07.008>
34. Carvalho LM, Ferreira CN, De Oliveira DK et al (2017) Haptoglobin levels, but not Hp1–Hp2 polymorphism, are associated with polycystic ovary syndrome. *J Assist Reprod Genet* 34:1691–1698. <https://doi.org/10.1007/s10815-017-1030-3>
35. Koch W, Latz W, Eichinger M et al (2002) Genotyping of the common haptoglobin Hp 1/2 polymorphism based on PCR. *Clin Chem* 48:1377–1382. <https://doi.org/10.1093/clinchem/48.9.1377>
36. Froguel P, Ndiaye NC, Bonnefond A et al (2012) A genome-wide association study identifies rs2000999 as a strong genetic determinant of circulating haptoglobin levels. *PLoS ONE* 7:32327. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032327>
37. Shahabi P, Siest G, Herbeth B et al (2012) Clinical necessity of partitioning of human plasma haptoglobin reference intervals by recently-discovered. *Clin Chim Acta* 413:1618–1624. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.04.033>
38. Soejima M, Sagata N, Komatsu N et al (2014) Genetic factors associated with serum haptoglobin level in a Japanese population. *Clin Chim Acta* 433:54–57. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.02.029>
39. Cahill LE, Jensen MK, Chiuve SE et al (2015) The risk of coronary heart disease associated with glycosylated hemoglobin of 6.5% or greater is pronounced in the haptoglobin 2-2 genotype. *J Am Coll Cardiol* 66:1791–1799. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.07.076>
40. Hardwick RJ, Ménard A, Sironi M et al (2014) Haptoglobin (HP) and haptoglobin-related protein (HPR) copy number variation, natural selection, and trypanosomiasis. *Hum Genet* 133:69–83. <https://doi.org/10.1007/s00439-013-1352-x>
41. Yang H, Wang H, Levine YA et al (2018) Identification of CD163 as an anti-inflammatory receptor for HMGB1-haptoglobin complexes. *JCI Insight* 1:85375. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.85375>
42. Carter K, Worwood M (2007) Haptoglobin: a review of the major allele frequencies worldwide and their association with diseases. *Int J Lab Hematol* 29:92–110. <https://doi.org/10.1111/j.1751-553x.2007.00898.x>
43. Lee CW, Cheng TM, Lin CP et al (2013) Plasma haptoglobin concentrations are elevated in patients with coronary artery disease. *PLoS ONE* 8:76817–76817. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076817>
44. Moussa A, Rejeb J, Omezzine A et al (2014) Association between haptoglobin 2–2 genotype and coronary artery disease and its severity in a tunisian population. *Biochem Genet* 52:269–282. <https://doi.org/10.1007/s10528-014-9646-9>
45. Melamed-Frank M, Lache O, Enav BI et al (2001) Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin. *Blood J Am Soc Hematol* 98:3693–3698. <https://doi.org/10.1182/blood.V98.13.3693>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Anexo C – Manuscrito I submetido com os resultados do doutorado

Antioxidant and fibrinolytic potential of rivaroxaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation

Luana Bernardes Xavier Costa¹, Gabriela Lopes Martins², Rita Carolina Figueiredo Duarte¹, Luma Clara Martins Costa¹, Estêvão Lanna Figueiredo³, Francisco Rezende Silveira⁴, Maria das Graças Carvalho¹, Helton José Reis², Edna Afonso Reis⁵, Karina Braga Gomes¹, Cláudia Natália Ferreira^{1,6*}

1. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil
2. Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil
3. Hospital Lifecenter, Belo Horizonte, MG, Brazil
4. Hospital Semper, Belo Horizonte, MG, Brazil
5. Departamento de Estatística, Instituto de Ciências Exatas (ICEX), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil
6. Colégio Técnico, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

* Corresponding author:

Cláudia N. Ferreira, PhD

Colégio Técnico, Universidade Federal de Minas Gerais

Avenida Antonio Carlos, 6627 – Pampulha.

Belo Horizonte, Minas Gerais/Brazil

Phone: +55 31 3409-4983

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4545-6821>

Email: ferreiracn@gmail.com

Abstract

Atrial fibrillation (AF) is a cardiac arrhythmia characterized by irregular electrical activation of the atria, leading to the absence of mechanical contraction and the formation of atrial thrombi, the main cause of stroke and systemic embolism. Since the pathophysiology of AF is not yet fully defined, the purpose of this study is to evaluate the association of oxidative and anti-fibrinolytic biomarkers in individuals with atrial fibrillation, using oral anticoagulants warfarin or rivaroxaban, compared to a control group. There were 38 patients with AF using rivaroxaban and 47 using warfarin, as well as 62 healthy individuals in the control group. The absorbance value of MTT and serum concentrations of TBARS, PAI-1, TAFI; were determined by spectrophotometry and ELISA, respectively. Patients using rivaroxaban had higher MTT absorbance values and lower TAFI concentration. The results suggest that the treatment with rivaroxaban has showed a beneficial action on antioxidant capacity and reduction of anti-fibrinolytic inhibitor in patients with AF.

Keywords: atrial fibrillation, rivaroxaban, warfarin, oxidative stress, fibrinolytic system.

1. Introduction

Atrial fibrillation (AF) is the most common cardiac arrhythmia in clinical practice, being characterized by rapid and disorganized excitation of the atria and irregular activation of the

ventricles [1]. The occurrence of this arrhythmia is related to high cardiovascular morbidity and mortality. By considering the aging population, AF projection prevalence for the next decades has shown a significant worldwide increasing, as well a high cost impacting to the health system [2]. The incidence of venous thromboembolism is intrinsically related to AF. Recent studies showed an association between increased use of oral anticoagulants and a concomitant reduction in AF-related stroke [3, 4]. Therefore, one of the main treatment strategies for the occurrence of AF is drug therapy with oral anticoagulants to prevent thromboembolic phenomena.

The main stratification tool for anticoagulation therapy in patients with AF is the CHA₂DS₂-VASc score [5]. Due to some restrictions associated with the use of anticoagulants, such as warfarin, and the frequent need for monitoring to adjust doses, direct acting oral anticoagulants (DOACs) have been increasingly used in clinical practice due to their conventional dosage and control more favorable [6]. Rivaroxaban is part of DOACs class that acts directly inhibiting activated coagulation factor X (FXa), and evidence demonstrates its involvement with anti-inflammatory action in vascular remodeling, atherosclerotic plaque regression and tissue fibrosis [7-10].

The oxidative stress plays an important role in AF, being related to the size of left atrium, risk and prevalence of arrhythmia [11-13]. Tanhan et al. demonstrated that the increase in oxidative stress led to a 30% increase in the prevalence and incidence of AF [12]. Furthermore, recent evidence suggests that oral anticoagulants that directly inhibit FXa coagulation, such as rivaroxaban, can inhibit the production of reactive oxygen species and, consequently, reduce oxidative stress [14].

Fibrinolysis is the process that promotes the dissolution of blood clots, inhibiting the obstruction of blood vessels [15]. The combination of the pathophysiological mechanisms of blood stasis, lesions in the vessel wall and fibrinolytic changes are widely recognized for their association with thromboembolic events in AF [16]. Although some evidence has shown the association of AF with increased levels of anti-fibrinolytic markers, such as increased levels of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) [17] and thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) [18], the role of fibrinolysis in the mechanism of thromboembolism associated with AF has been poorly explored [19].

The complex pathophysiology of AF suggests the interaction of physiological pathways such as oxidative stress and inflammation, which lead to electrical and structural remodeling of the atria, fibrosis and, consequently, increased risk of thromboembolic events [20, 21]. The fibrinolytic

system also exhibits critical functions involved in several aspects of the progression of inflammation. Therefore, changes in the fibrinolytic biomarkers TAFI and PAI-1 have also shown a relationship with inflammatory and oxidative activity in cardiovascular pathologies [22]. In this context, the present study aimed to evaluate the association of oxidative and anti-fibrinolytic biomarkers in the occurrence of AF under the use of oral anticoagulants warfarin or rivaroxaban, compared to a control group.

2. Methods

A total of 147 patients with a diagnosis of AF confirmed by electrocardiography, with chronic oral anticoagulation (CHA₂DS₂-VASC \geq 2), using warfarin (n = 47) or rivaroxaban (n = 38), were included in the study, as well as healthy individuals (controls, n = 62). Patients with AF were recruited from the outpatient clinics of Hospitals Lifecenter, Semper and Ipsemg (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil). Control subjects were recruited from the local community and had no prior diagnosis of AF or use of any anticoagulant therapy.

The participants were excluded if they used any antiplatelet agent, non-steroidal anti-inflammatory drugs, heparin, hormone replacement therapy, antifibrinolytics, amiodarone, verapamil, quinidine, azole antifungals, and ritonavir in the 4 weeks prior to the study. Moreover, subjects with the following clinical conditions were also excluded: current diagnosis of alcohol use disorder; chronic kidney disease (creatinine clearance $<$ 30 mL/min); severe dyslipidemia; acquired or hereditary bleeding disorders; liver disease; thyroid disease; infectious, inflammatory, autoimmune, and malignant diseases; pregnancy; puerperium; and breast-feeding.

The present study was approved by the Research Ethics Committees of *Universidade Federal de Minas Gerais* (UFMG – CAAE: 12603413.0.0000.5149), Lifecenter, Semper and Ipsemg Hospitals and was performed in accordance to the principles provided in the Declaration of Helsinki. All participants received clear information about the research, read and signed the written Informed Consent, before any study procedures.

Venous blood samples were collected in tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), and 3.2% sodium citrate, and tubes without anticoagulant, after a 12-hour fast. Plasma and serum samples were processed by centrifuge at 25°C for 15 minutes at 1,100 g, within 4 hours of collection. The samples were identified and stored at -80 °C until analysis.

2.1 Laboratory and biochemical characterization

Serum determinations of biochemical parameters total cholesterol (TC), High Density Lipoprotein-cholesterol (HDL-c), Low Density Lipoprotein-cholesterol (LDL-c) and triglycerides were performed using the automatic analyzer Vitros 250, Johnson & Johnson®.

The oxidative status was evaluated by determining, in serum samples, the lipid peroxidation marker malondialdehyde (MDA), which belongs to the class of thiobarbituric acid reactive species (TBARS), according to the protocol by Vasconcelos et al. and adapted by Duarte [23, 24]. To determine the antioxidant capacity of serum, the quantification of MTT was performed according to the protocol by Medina et al. adapted by Duarte [24, 25]. Both TBARS and MTT were measured by spectrophotometry.

The evaluation of the fibrinolytic profile was performed on citrate plasma samples by the ELISA method, using the following kits: IMUBIND® Plasma PAI-1 (BIOMEDICA DIAGNOSTICS, USA) and VisuLize™ TAFI Antigen Kit (AFFINITY BIOLOGICALS INCORPORATED, Canada) for plasma determination of anti-fibrinolytic markers PAI-1 and TAFI, respectively.

2.2 Covariates

The parameters: dyslipidemia, hypertension (HAS), physical activity, age, total cholesterol (TC) were considered as covariates of possible interference in the study results. For the case group, information about such parameters was taken from the patient records, and for the control group, through individual reports. The diagnosis of dyslipidemia is based on the V Brazilian Guideline on Dyslipidemia and Prevention of Atherosclerosis, which consists of: TC \geq 240mg/dL; LDLc \geq 160mg/dL; HDLc $<$ 40mg/dL; TG (Triglycerides) $>$ 200mg/dL [26]. Hypertension followed the criteria of the Brazilian Guidelines on Arterial Hypertension, which consists of: systolic blood pressure $>$ 140mmHg and diastolic blood pressure $>$ 90mmHg [27]. Physical activity was considered as: 150–300 minutes of moderate-intensity aerobic physical activity; or at least 75–150 minutes of vigorous-intensity aerobic physical activity; or an equivalent combination of moderate and vigorous intensity activity throughout the week for substantial health benefits; according to guidelines on physical activity and sedentary behavior of the World Health Organization (WHO) [28].

2.3 Statistical analyses

All data were subjected to descriptive analysis and continuous variables were analyzed for normal distribution using the Shapiro-Wilk test. Student's t and Mann-Whitney tests were used to compare two groups (FA vs controls) for normally or not normally distributed variable, respectively. To compare three groups (warfarin vs. rivaroxaban vs. controls), analysis of

variance - ANOVA and post-hoc LSD were used for normal variables. Kruskal-Wallis test, followed by Bonferroni correction were used for non-normal variables. In order to discount the interference effect of confounding variables in the comparison of biomarkers between groups, a multivariate logistic regression analysis was performed in two stages. First, a model including all confounding variables was made in order to assess the relationship with biomarkers. In a second step, the variables that presented $p < 0.02$ were included in the final linear regression model along with groups and biomarkers. Statistical analyzes were performed using the Statistical Package of the Social Sciences (SPSS) version 17.0. Values of $p < 0.05$ were considered as significant effects. The GraphPad Prism® software version 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) was used to prepare the graphs.

3. Results

3.1 Demographic, clinical and laboratory characteristics

Table 1 presents demographic, clinical and laboratory characteristics of participants. There were no differences between groups regarding smoking, type 2 diabetes mellitus, use of metformin and alcohol consumption. The patients using rivaroxaban are older than the patients who use warfarin and the individuals in the control group. Hypertension was more frequent in warfarin and rivaroxaban treatments regarding to the control group. Dyslipidemia and statin use were more frequent in patients using warfarin. There was no significant difference between patients on warfarin or rivaroxaban group regarding the CHA2DS2-VASc score. Clearly, physical activity was more frequent in the control group when compared to those treated with warfarin or rivaroxaban. TC levels differed only between the control and rivaroxaban groups with higher levels in control group.

3.2 Evaluation of oxidative stress markers

The values of oxidative markers comparing control, warfarin and rivaroxaban groups are shown in Figure 1. The concentrations of TBARS did not differ significantly between the groups (Fig. 1a), even when confounding variables are considered in the multiple linear regression model for TBARS (data not shown). In relation to the MTT absorbance value, a significant difference was observed in the comparison control and rivaroxaban groups ($p < 0.001$), and in the comparison warfarin and rivaroxaban groups ($p = 0.002$), with higher levels in rivaroxaban group (Fig. 1b). The significant differences were observed even considering the confounding variables (Online Resource 1)

3.3 Evaluation of anti-fibrinolytic parameters

Plasma levels of the anti-fibrinolytic biomarker PAI-1 showed no significant difference between groups (Fig.2a), even when confounding variables are considered in the multiple linear regression model for PAI-1 (data not shown). The serum levels of TAFI showed significant differences between individuals in the control and rivaroxaban groups ($p < 0.001$), as well as between warfarin and rivaroxaban ($p < 0.001$) (Fig.2b), with lower levels of the TAFI in rivaroxaban group. These differences were maintained even when the confounding variables were considered (Online Resource 2).

4. Discussion

To broad knowledge, this study was the first to assess parameters of oxidative stress and fibrinolytic pathways in patients with AF in the Brazilian population, under two different anticoagulant therapies, warfarin and rivaroxaban. It was found that patients using rivaroxaban had higher MTT absorbance values, suggesting a greater antioxidant capacity under rivaroxaban treatment. Reduced levels of TAFI were also seen in rivaroxaban treatment, suggesting an inhibitory effect on anti-fibrinolytic factor expression under such treatment.

Recent evidence supports the hypothesis that FXa inhibition by rivaroxaban treatment may indirectly reduce the generation of reactive oxygen species (ROS) [14, 29, 30]. Wo'zniak et al. reported that treatment with dabigatran and rivaroxaban resulted in repairing and protective effect by inhibiting ROS production and consequently neutralizing DNA damage in the vascular endothelial cells tested [14]. Although it was not observed a reduction in oxidative stress, assessed by TBARS levels, the antioxidant capacity of rivaroxaban was evidenced in this work by the increase in MTT marker. Ishibashi et al. and Moñux et al. demonstrated that FXa inhibition by rivaroxaban reduced the expression of proteins related to oxidative stress and favored an antioxidant state at the abdominal aortic aneurysm site [29, 30]. An antioxidant effect has also been demonstrated in treatment with endoxaban, another FXa-inhibiting anticoagulant [31]. FXa is known not only to play a central role in blood clotting, but also to activate protease-activated receptors (PARs) and cause inflammation, tissue fibrosis and platelet activation through interaction with the GPVI glycoprotein, whose activation is associated with a large increase in oxidative stress [32]. Therefore, our result suggests that rivaroxaban has a potential antioxidant in AF, suggesting that FXa inhibitors can act as a multi-targeted drug for inflammation, tissue fibrosis and oxidative stress pathways [31].

Regards to the results of anti-fibrinolytic markers, there were significant differences in serum TAFI levels among the groups, which were lower in rivaroxaban group. The fibrinolysis status

is useful in predicting cardiovascular risk [22, 33]. Elevated levels of PAI-1 and TAFI markers tend to a prothrombotic state that leads to the risk of vascular thromboembolism, the main complication of AF [34]. Likewise the present study, Ma et al. also reported that rivaroxaban anticoagulant therapy significantly reduced the expression of TAFI as well as other anti-fibrinolytic markers [35]. Interestingly, the recent study conducted by Sanda et al. showed that treatment with dabigatran, an anticoagulant that also acts by inhibiting FXa, significantly reduced the expression of PAI-1 and TAFI levels, and increases thrombolytic activity in mice [36]. The reduction of anti-fibrinolytic markers exerted by rivaroxaban and dabigatran [36] gives rise to the idea that FXa inhibition also exerts an inhibitory action on the expression of anti-fibrinolytic factors.

Furthermore, it is well established that FXa, in addition to its role in coagulation, has a pro-inflammatory effect [21, 37, 38]. Given this reasoning, evidence suggests that the inhibition of FXa by rivaroxaban possibly induces an anti-inflammatory response, in addition to its anticoagulant action [39-41]. Recent works such as those by Miyazawa et al. and Kirchhof et al. showed that treatment with rivaroxaban can favorably affect markers of fibrinolysis and inflammation in patients with atrial fibrillation [42, 43]. Interestingly, some authors advocate an inverse relationship between TAFI and inflammation [44, 45]. The work by Pang et al. investigated the correlation between TAFI and proinflammatory cytokines in patients with acute coronary syndrome. The authors pointed out a strong negative correlation between TAFI and concentrations of IL-1 β , IL-6, TNF, procalcitonin (PCT) and PCR [22]. Therefore, further studies are necessary to evaluate the relationship between fibrinolytic and inflammatory markers in patients with AF treated with rivaroxaban, since this type of study are not yet conducted.

The limitations of this study include: firstly, the participants in the control group were selected from public gyms, therefore, they were favored regarding to physical activity parameter when compared to the treatment groups. Secondly, different assays or antibody reactivity to different isoforms can be applied in evaluating the anti-fibrinolytic marker TAFI. In this work, the methodology used for this purpose refers only to the dosage of TAFI antigen, not considering the different isoforms that the marker can present due to thermal instability in the measurement process. In this context, quantification the extent of TAFI activation by measuring the activated/inactivated TAFI antigen (TAFIa/ai) is a more accurate tool to assess the role of TAFI activation in various pathophysiologies [46, 47]. The different methods used to determine serum TAFI make comparisons between different studies impossible, as well as it fail to explain the differences in TAFI levels among researchers. Finally, this study was based on a relatively small

sample size from the warfarin and rivaroxaban treatment groups. Larger sample size studies are still needed to validate the findings.

5. Conclusion

The treatment with rivaroxaban increased MTT and reduced levels of TAFI, suggesting that, in addition to its anticoagulant action, the drug has a potential antioxidant and pro-fibrinolytic in the FA population. It emphasizes that further studies are needed for a better understanding of the drug profile in arrhythmia complications.

Acknowledgement

We would like to thank the sample donors for their participation in the research and all the physicians and staff at the Lifecenter and Semper Hospitals for contributing to the study.

Funding

This work was supported by the National Council for Scientific Development - CNPq, by the Research Support Foundation of the State of Minas Gerais - FAPEMIG and by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel - CAPES.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have not known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

CRedit authorship contribution statement

Luana Bernardes Xavier Costa: Conceptualization, Investigation, Validation, Data Curation, Original Writing-Draft, Visualization, Project Management. **Gabriela Lopes Martins:** Investigation. **Rita Carolina Figueiredo Duarte:** Investigation, Methodology. **Luma Clara Martins Costa:** Methodology. **Estêvão Lanna Figueiredo:** Resources. **Francisco Resende Silveira:** Resources. **Maria das Graças Carvalho:** Conceptualization. **Helton José Reis:** Resources. **Edna Afonso Reis:** Formal analysis, Resources. **Karina Braga Gomes:** Formal analysis, Conceptualization, Supervision, Resource. **Cláudia Natália Ferreira:** Deadline, Conceptualization, Writing - proofreading and editing, Supervision, Project administration, Acquisition of financing.

5. References

- [1] Westerman S, Wenger N (2019) Gender differences in atrial fibrillation: a review of epidemiology, management, and outcomes. *Curr Cardiol Rev* 15:136-144. <https://doi.org/10.2174/1573403x15666181205110624>
- [2] Kim MH, Johnston SS, Chu BC, Dalal MR, Schulman KL (2011) Estimation of total incremental health care costs in patients with atrial fibrillation in the United States. *Circ: Cardiovasc Qual* 4:313-320. <https://doi.org/10.1161/circoutcomes.110.958165>
- [3] Cowan JC, Wu J, Hall M, Orłowski A, West RM, Gale CP (2018) A 10 year study of hospitalized atrial fibrillation-related stroke in England and its association with uptake of oral anticoagulation. *Eur Heart J* 39:2975-2983. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy411>
- [4] Freedman B (2018) Major progress in anticoagulant uptake for atrial fibrillation at last: does it translate into stroke prevention? *Eur Heart J* 39:2984-2986. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy487>
- [5] Vitali F, Serenelli M, Airaksinen J, Pavasini R, Tomaszuk-Kazberuk A, Młodawska E et al (2019) CHA2DS2-VASc score predicts atrial fibrillation recurrence after cardioversion: Systematic review and individual patient pooled meta-analysis. *Clin Cardiol* 42:358-364. <https://doi.org/10.1002/clc.23147>
- [6] Lee LH (2016) DOACs—advances and limitations in real world. *Thromb J* 14:133-140. <https://doi.org/10.1186/s12959-016-0111-3>
- [7] Spronk HM, De Jong AM, Crijns HJ, Schotten U, Van Gelder IC, Ten Cate H (2014) Pleiotropic effects of factor Xa and thrombin: what to expect from novel anticoagulants. *Cardiovasc Res* 101:344-351. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt343>
- [8] Van Gorp RH, Schurgers LJ (2015) New insights into the pros and cons of the clinical use of vitamin K antagonists (VKAs) versus direct oral anticoagulants (DOACs). *Nutrients* 7(11):9538-9557. <https://doi.org/10.3390/nu7115479>
- [9] Terry CM, He Y, Cheung AK (2016) Rivaroxaban improves patency and decreases inflammation in a mouse model of catheter thrombosis. *Thromb Res* 144:106-112. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2016.06.008>
- [10] Katoh H, Nozue T, Michishita I (2017) Anti-inflammatory effect of factor-Xa inhibitors in Japanese patients with atrial fibrillation. *Heart and vessels* 32:1130-1136. <https://doi.org/10.1007/s00380-017-0962-y>
- [11] Ghasemzadeh N, Patel RS, Eapen DJ, Veledar E, Kassem AIH, Manocha P et al (2014) Oxidative stress is associated with increased pulmonary artery systolic pressure in humans. *Hypertension* 63:1270-1275. <https://doi.org/10.1161/hypertensionaha.113.02360>
- [12] Tahhan AS, Sandesara PB, Hayek SS, Alkholder A, Chivukula K, Hammadah M et al (2017) Association between oxidative stress and atrial fibrillation. *Heart rhythm* 14:1849-1855. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2017.07.028>
- [13] Huang Z, Wang XC, Sheng JL, He F, Cheng C, Zhang CH et al (2019) Analysis of atrial remodeling, fibrosis, oxidative stress and insulin resistance levels in patients with atrial fibrillation. *Journal of Hainan Medical University* 25:52-55.
- [14] Woźniak E, Broncel M, Bukowska B, Gorzelak-Pabiś P (2020) The protective effect of dabigatran and rivaroxaban on DNA oxidative changes in a model of vascular endothelial damage with oxidized cholesterol. *Int J Mol Sci* 21:1953. <https://doi.org/10.3390/ijms21061953>
- [15] Lin H, Xu L, Yu S, Hong W, Huang M, Xu P (2020) Therapeutics targeting the fibrinolytic system. *Exp Mol Med* 52:367-379. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0397-x>
- [16] Freestone B, Lip G (2008) The endothelium and atrial fibrillation. *Hämostaseologie* 28:207-212. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18836646/>
- [17] Adams TE, Huntington JA (2006) Thrombin-cofactor interactions: structural insights into regulatory mechanisms. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26:1738-1745.
- [18] Ząbczyk M, Majewski J, Lelakowski J (2011) Thromboembolic events are associated with prolonged clot lysis time in patients with permanent atrial fibrillation. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej* 121. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22064373/>

- [19] Tóth NK, Csanádi Z, Hajas O, Kiss A, Nagy-Baló E, Kovács KB, Sarkady F et al (2017) Intracardiac hemostasis and fibrinolysis parameters in patients with atrial fibrillation. *BioMed Res Int* 2017: 3678017. <https://doi.org/10.1155/2017/3678017>
- [20] Gutierrez A, Van Wagoner DR (2015) Oxidant and inflammatory mechanisms and targeted therapy in AF: An update. *J Cardiovasc Pharmacol* 66:523-529. Doi:10.1097/FJC.0000000000000313.
- [21] Ellinghaus P, Perzborn E, Hauenschild P, Gerdes C, Heitmeier S, Visser M et al (2016) Expression of pro-inflammatory genes in human endothelial cells: Comparison of rivaroxaban and dabigatran. *Thromb Res* 142:44-51. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2016.04.008>
- [22] Pang H, Zhang C, Liu F, Gong X, Jin X, Su C (2017) Reduced thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and enhanced proinflammatory cytokines in acute coronary syndrome. *Med Intensiva* 41:475-482. <https://doi.org/10.1016/j.medin.2016.10.008>
- [23] Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBDF, Manfredini V, Benfato MDS, Kubota LT (2007) Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quím Nova* 30:1323-1338. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000500046>
- [24] Duarte RCF (2012) Efeito do ácido acetilsalicílico na ativação plaquetária e perfil oxidativo em pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2, 2012.
- [25] Medina LO, Veloso CA, Abreu Borges E, Isoni CA, Calsolari MR, Chaves MM et al (2007) Determination of the antioxidant status of plasma from type 2 diabetic patients. *Diabetes research and clinical practice* 77:193-197. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2006.12.008>
- [26] Xavier J, Matos Soeiro A, Lopes A (2014) Clinically Manifested Myocarditis in Acute Rheumatic Fever. *Arq Bras Cardiol* 102:17-20. <https://doi.org/10.5935/abc.20140017>
- [27] Barroso WKS, Rodrigues CIS, Bortolotto LA, Mota-Gomes MA, Brandão AA, Feitosa ADM et al (2021) Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial–2020. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 116:516-658.
- [28] WHO (2020) WHO guidelines on physical activity and sedentary behaviour. World Health Organization Geneva. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/nbk566045/>
- [29] Ishibashi H, Ishiguchi T, Ohta T, Sugimoto I, Iwata H, Yamada T (2014) Late events and mid-term results after endovascular aneurysm repair. *Surgery today* 44:50-54. <https://doi.org/10.1007/s00595-012-0472-6>
- [30] Moñux G, Zamorano-León JJ, Marqués P, Sopeña B, García-García J, Laich de Koller G et al (2017) FXa inhibition by rivaroxaban modifies mechanisms associated with the pathogenesis of human abdominal aortic aneurysms. *Br J Clin Pharmacol* 83:2661-2670. <https://doi.org/10.1111/bcp.13383>
- [31] Narita Y, Hamamura K, Kashiyama M, Utsumi S, Kakizoe Y, Kondo Y et al (2019) Edoxaban exerts antioxidant effects through FXa inhibition and direct radical-scavenging activity. *Int J Mol Sci* 20:4140. <https://doi.org/10.3390/ijms20174140>
- [32] Cammisotto V, Carnevale R, Nocella C, Stefanini L, Bartimoccia S, Coluccia A et al (2019) Nox2-mediated platelet activation by glycoprotein (GP) VI: Effect of rivaroxaban alone and in combination with aspirin. *Biochem Pharmacol* 163:111-118. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.02.016>
- [33] Sumaya W, Wallentin L, James SK, Siegbahn A, Gabrysch K, Himmelmann A et al (2020) Impaired fibrinolysis predicts adverse outcome in acute coronary syndrome patients with diabetes: a PLATO sub-study. *Thromb Haemost* 120:412-422. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1701011>
- [34] Kernan WN, Ovbiagele B, Black HR, Bravata DM, Chimowitz MI, Ezekowitz MD et al (2014) Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke and transient ischemic attack: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 45:2160-2236. <https://doi.org/10.1161/str.0000000000000024>
- [35] Ma J, Li X, Wang Y, Yang Z, Luo J (2017) Rivaroxaban attenuates thrombosis by targeting the NF-κB signaling pathway in a rat model of deep venous thrombus Retraction in/10.3892/ijmm. 2018.3565. *Int J Mol Med* 40:1869-1880. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3565>
- [36] Sanda T, Yoshimura M, Hyodo K, Ishii H, T. Yamashita T (2020) Effects of long-term thrombin inhibition (dabigatran etexilate) on spontaneous thrombolytic activity during the progression of

atherosclerosis in ApoE-/-LDLR-/- double-knockout mice. Korean Circ J 50:804-816. <https://doi.org/10.4070/kcj.2020.0055>

[37] Chan MY, Lin M, Lucas J, Moseley A, Thompson JW, Cyr D et al (2012) Plasma proteomics of patients with non-valvular atrial fibrillation on chronic anti-coagulation with warfarin or a direct factor Xa inhibitor. Thromb Haemost 108:1180-1191. <https://doi.org/10.1160/th12-05-0310>

[38] Esmon CT (2014) Targeting factor Xa and thrombin: impact on coagulation and beyond. Thromb Haemost 111:625-633. <https://doi.org/10.1160/th13-09-0730>

[39] Wu N, Tong S, Xiang Y, Wu L, Xu B, Zhang Y et al (2015) Association of hemostatic markers with atrial fibrillation: a meta-analysis and meta-regression. PLoS One 10:0124716. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124716>

[40] Kondo H, Abe I, Fukui A, Saito S, Miyoshi M, Aoki K et al (2018) Possible role of rivaroxaban in attenuating pressure-overload-induced atrial fibrosis and fibrillation. J Cardiol 71:310-319. <https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2017.08.007>

[41] Martins GL, Duarte RCF, Vieira ELM, Rocha NP, Figueiredo EL, Silveira FR et al (2020) Comparison of Inflammatory Mediators in Patients With Atrial Fibrillation Using Warfarin or Rivaroxaban. Front Cardiovasc Med 7:114. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00114>

[42] Miyazawa K, Pastori D, Hammerstingl C, Cappato R, Meng IL, Kramer F et al (2018) Left atrial thrombus resolution in non-valvular atrial fibrillation or flutter: biomarker substudy results from a prospective study with rivaroxaban (X-TRA). Annals of medicine 50:511-518. <https://doi.org/10.1080/07853890.2018.1495337>

[43] Kirchhof P, Ezekowitz MD, Purmah Y, Schiffer S, Meng IL, Camm AJ et al (2020) Effects of rivaroxaban on biomarkers of coagulation and inflammation: a post hoc analysis of the X-VerT trial. TH Open 4:20-32. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1701206>

[44] Komnenov D, Scipione CA, Bazzi ZA, Garabon JJ, Koschinsky ML, Boffa MB (2015) Pro-inflammatory cytokines reduce human TAFI expression via tristetraprolin-mediated mRNA destabilisation and decreased binding of HuR. Thromb Haemost 114:423-428. <https://doi.org/10.1160/th14-08-0653>

[47] Tregouet D, Schnabel R, Alessi M, Godefroy T, Declerck P, Nicaud V et al (2009) Activated thrombin activatable fibrinolysis inhibitor levels are associated with the risk of cardiovascular death in patients with coronary artery disease: the AtheroGene study. J Thromb Haemost 7:49-57. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03221.x>

TABLE 1. Demographic, clinical, and laboratory characterization of participants of the study

Parameter	Control (n = 62)	Warfarin (n = 47)	Rivaroxaban (n = 38)	<i>p</i>	<i>p</i> ¹	<i>p</i> ²	<i>p</i> ³
Age in years	69 (9)	70 (13)	77 (15)	0,002*	0,565	0,001*	0,010*
Sex							
Female, n (%)	38 (61,3%)	21 (44,7%)	18 (47,4%)	0,176			
Male, n (%)	24 (38,7%)	26 (55,3%)	20 (52,6%)				
Smoker, n (%)	2 (3,2%)	1 (2,1%)	3 (7,9%)	0,371			
HAS, n (%)	31 (27,9%) ³	43 (38,7%) ^a	37 (33,3%) ^a	<0,001*			
DM2, n (%)	10 (16,1%)	15 (31,9%)	10 (26,3%)	0,146			

Dyslipidemia	23 (39%) ^b	32 (68,1%) ^a	16 (42,1%)	0,007*			
CHA2DS2-VASc	-	3 (2.5–4)	4 (3–4)	0.776			
Physical activity	60 (98,4%) ^a	8 (17,8%) ^b	11 (28,9%) ^b	<0,001*			
Alcohol consumption	17 (27,4%)	8 (17%)	13 (34,2%)	0,185			
Total cholesterol (mg/dL)	179,3 ± 36,8	178,5 ± 37,2	178,4 ± 28,6	0,032*	0,235	0,009*	0,151
LDL-c (mg/dL)	96,6 ± 26,7	89,2 ± 31,9	93,1 ± 20,2	0,190	-	-	-
HDL-c (mg/dL)	53,1 ± 16,2	56,0 ± 15,9	60,6 ± 14,7	0,242	-	-	-
Triglycerides (mg/dL)	147,2 ± 49,7	166,5 ± 84,5	123,4 ± 52,4	0,357	-	-	-

Results are presented as mean and standard deviation (parametric variables), median and interquartile range (non-parametric variables) or frequency (absolute and percentage). Chi-square test with residual analysis: a more frequent, b less frequent. Post-hoc LSD or Bonferroni test for multiple comparisons of all pairs of means: p1: Control versus Warfarin; p2: Control versus Rivaroxaban; p3: Warfarin versus Rivaroxaban. Significant Values *: $p < 0.05$. Abbreviations: SAH = Systemic arterial hypertension; DM2 = Type 2 Diabetes Mellitus; LDL = Low Density Lipoprotein; HDL = High Density Lipoprotein; ALT = Alanine Aminotransferase; AST = Aspartate Aminotransferase; GGT = Gamma Glutamyl Transferase; PCR = C-reactive protein

Fig.1 Levels of oxidative stress markers TBARS (a) and MTT (b) between control, warfarin and rivaroxaban groups

a: TBARS levels compared between control (n=62), warfarin (n=47) and rivaroxaban (n=38) groups; b: MTT absorbance values compared between control (n=62), warfarin (n=47) and rivaroxaban (n=38) groups. P-value < 0.05 as significant. Abbreviations: TBARS = thiobarbituric acid reactive species. MTT = 3-4,5-dimethyl-thiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide

Fig.2 Levels of fibrinolytic markers PAI-1 (a) and TAFI (b) between control, warfarin and rivaroxaban groups

a: PAI-1 levels compared between control (n=62), warfarin (=47) and rivaroxaban (n=38) groups; b: TAFI levels compared between control (n=62), warfarin (n=47) and rivaroxaban (n=38) groups. P-value < 0.05 as significant. Abbreviations: PAI-1 = plasminogen activator inhibitor-1. TAFI = thrombin activatable fibrinolysis inhibitor

E-mail de submissão _ Manuscrito I

25/05/2022 16:53

Gmail - MAJ Submission Confirmation



Cláudia Ferreira <ferreiracn@gmail.com>

MAJ Submission Confirmation

1 mensagem

The American Journal of the Medical Sciences <em@editorialmanager.com>
Responder a: The American Journal of the Medical Sciences <ajms@musc.edu>
Para: Cláudia Natália Ferreira <ferreiracn@gmail.com>

2 de abril de 2022 12:52

Apr 02 2022 11:52AM

Mrs Ferreira,

Your submission entitled "Antioxidant and fibrinolytic potential of rivaroxaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation" has been received by our Editorial office. You may check on the progress of your paper at any time by logging on to Editorial Manager as an author.

Be sure to check out our latest issue at <https://www.amjmedsci.com/>.

<https://www.editorialmanager.com/maj/>

Your username is: FerreiraCN
<https://www.editorialmanager.com/maj/l.asp?i=438216&l=VTORMSEG>

We thank you for submitting your work to The American Journal of the Medical Sciences. I look forward to working with you throughout the review process.

With kind regards,
Sarah McCann
Managing Editor
The American Journal of the Medical Sciences
Official journal of the Southern Society for Clinical Investigation
www.ssciweb.org

Additionally, you may view the Additional Information questions to obtain the copyright information by clicking here:
Additional Information

11. Cláudia Natália Ferreira, PhD

Question: Are you a member in good standing of the Southern Society for Clinical Investigation (SSCI)?
Response: No

%CUSTOM_GENERALSUPPORT%

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/maj/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

Anexo D – Manuscrito II submetido com os resultados do doutorado**Vitamin D levels Assessment in patients suffer from atrial fibrillation**

Luana Bernardes Xavier Costa¹, Gabriela Lopes Martins², Rita Carolina Figueiredo Duarte¹, Estêvão Lanna Figueiredo³, Francisco Rezende Silveira⁴, Maria das Graças Carvalho¹, Helton José Reis², Karina Braga Gomes Borges¹, Cláudia Natália Ferreira^{1,5}

7. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

8. Departamento de Farmacologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

9. Hospital Lifecenter, Belo Horizonte, MG, Brazil

10. Hospital Semper, Belo Horizonte, MG, Brazil

11. Colégio Técnico, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

* Corresponding author:

Cláudia N. Ferreira, PhD

Colégio Técnico, Universidade Federal de Minas Gerais

Avenida Antonio Carlos, 6627 – Pampulha.

Belo Horizonte, Minas Gerais/Brazil

Phone: +55 31 3409-4983

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4545-6821>

Email: ferreiracn@gmail.com

SUMMARY

OBJECTIVE: The aim of this study is to assess vitamin D levels in patients suffering from AF compared to a control group in a Brazilian population. **METHODS:** Eighty-five patients diagnosed with AF and sixty-two healthy individuals (control) were selected. Biochemical parameters were determined by using the Vitros system and plasma vitamin D levels were measured in serum samples by the Elisa method. **RESULTS:** Plasma levels of vitamin D were not associated with AF. **CONCLUSIONS:** This result suggests that vitamin D levels do not change in the pathology of AF.

KEYWORDS: Vitamin D, Atrial Fibrillation, Cardiovascular Diseases, Cardioprotective Potential.

INTRODUCTION

Atrial fibrillation (AF) is a common cardiac rhythm in clinical practice with increasing involvement within aging population¹. The incidence of arrhythmia is related to high cardiovascular morbidity and mortality. Vitamin D, despite the term vitamin, is a lipid-soluble hormone because it is not only ingested from food and supplements, but it can also be produced endogenously in humans². Recent research has indicated that vitamin D can exert a wide range of biological effects in addition to its classic role in mineral and bone homeostasis³. Inadequate vitamin D status, for example, has been associated with important non-skeletal pathologies such as cardiovascular disease (CVD)^{4,5}.

Some mechanisms involved in the link between vitamin D and CVD may also be associated with the pathophysiology of AF. One of the most important mechanisms is the activation of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS), as it is responsible for both structural and electrical remodeling of the atrium. Inhibition of RAAS by vitamin D and a negative correlation between vitamin D levels and angiotensin II levels have been reported. Inhibition of RAAS results in antiarrhythmic properties that reduce the risk of AF⁶. Furthermore, beneficial effects of vitamin D in reducing thrombogenicity, inhibiting oxidative stress and inflammation, improving endothelial function and vascular relaxation; are also crucial physiological pathways in the pathogenesis of AF^{7,8}.

Although the common pathways involving AF and vitamin D action indicate a possible association, there are conflicting results in the literature on this relationship^{9,10}. In this study, the

comparison of plasma levels of vitamin D in the Brazilian population between a group of patients with AF and a control group was aimed.

METHODS

The total population of this study was 147 participants, including 85 patients with AF and 62 individuals without the arrhythmia forming a control group. The group of patients with AF were recruited from the outpatient clinics of Hospitals Lifecenter, Semper and Ipsemg (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil). The individuals in the control group were recruited from the local community and had no previous diagnosis of AF.

This study was approved by the Research Ethics Committee at UFMG (CAAE: 12603413.0.0000.5149), conversely, Lifecenter, Semper and Ipsemg Hospitals were carried out in accordance with the principles set out in the Declaration of Helsinki. All participants received clear information about the research, read and signed the Informed Consent Form, before any study procedure.

Venous blood samples were collected from patients, in tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and in tubes without anticoagulant, after a 12-hour fast. After processing the samples, the serum determination of biochemical parameters: total cholesterol (TC), high density lipoprotein (HDL-c), low density lipoprotein (LDL-c) and triglycerides were obtained through the automatic analyzer Vitros 250, Johnson & Johnson®.

Plasma levels of vitamin D were determined in samples using the 25 OH Total Vitamin D Immunoenzyme Kit provided by Ampligenix Biotech Laboratory.

All data were subjected to descriptive analysis and continuous variables were analyzed for normal distribution using the Shapiro-Wilk test. Student's t and Mann-Whitney tests were used to compare two groups (AF vs controls), when data were average or not, respectively. Statistical analyzes were performed using the Statistical Package of the Social Sciences (SPSS) version 17.0. Values of $p < 0.05$ were considered as significant effects. The GraphPad Prism® software version 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) was used to prepare the graphs.

RESULTS

The parameters age, sex, smoking, type 2 diabetes mellitus (DM2) and alcoholism did not show significant differences when comparing the control group and patients with AF, (all $p > 0.05$). Patients with AF showed a higher frequency of occurrence of dyslipidemia and arterial hypertension compared to the control group ($p < 0.001$ and $p = 0.044$, respectively). Physical

activity was more frequent in the control group when compared to the AF group. Finally, in the assessment of the lipid profile, a significant difference was observed only in the serum levels of total cholesterol between the control and AF group ($p = 0.028$) (Table 1).

Individuals in the control group (32 ± 10 ng/mL) compared to patients with AF (33.4 ± 14.7 ng/mL) showed no significant difference in terms of vitamin D levels (Figure 1).

DISCUSSION

In the present study, there were no significant differences regarding serum vitamin D levels between the control and FA group. Some published meta-analysis studies performed a dose-response analysis according to circulating concentrations of 25(OH)D^{4,11,12}. The results suggest that vitamin D deficiency may represent a risk marker for adverse cardiovascular events. Epidemiological data from studies investigating the potential benefits of vitamin D for the cardiovascular system indicate that vitamin D deficiency in humans is associated with arterial stiffness, hypertension, left ventricular hypertrophy and endothelial dysfunction, further fueling the belief that the vitamin D has a protective role in cardiovascular disease^{13,14}.

The link between vitamin D and CVD is via pathways such as endothelial function, inflammation, oxidative stress, thrombosis, cardiomyocyte function and RAAS. Such mechanisms are also involved in the pathophysiology of AF¹⁵. On the RAAS mechanism, for example, vitamin D deficiency has been speculated to attenuate the benefit of RAS blockade in patients with AF^{16,9}. The recent study by Patel et al. 2020 showed that vitamin D and renin levels have an inverse relationship, suggesting that vitamin D may influence RAAS activation in patients with AF¹⁷.

In fact, previous studies have already shown an association between vitamin D deficiency and an increase in electrocardiographic abnormalities¹⁸. However, the causal relationship between circulating vitamin D levels and the risk of AF is not fully elucidated, and studies in the literature show controversial or inconsistent results^{19,20,21}. Liu et al.¹⁰, evaluating the dose-response association between vitamin D and AF, suggested that vitamin D deficiency is a moderate predictor of the risk of AF¹⁰. Canpolat et al.²² showed that reduced serum vitamin D levels are significantly associated with extensive left atrial fibrosis in patients with paroxysmal AF. The interesting study by Chen et al.²³ demonstrated that there was an increased risk of developing AF in patients genetically deprived of vitamin D due to single nucleotide polymorphisms in their metabolic pathways. Nevertheless, as in the present work, many prospective studies failed to show any substantial association between serum levels of vitamin D and FA^{24,15,19}.

The limitations of this study refer mainly to the fact that the work was based on a relatively small sample. The fact that different methodological tests are used to determine serum vitamin D levels is also a limiting factor. In this study, vitamin D levels were determined by the immunoenzymatic method, but the different methods applied may partially explain the heterogeneity between the studies. The meta-analysis conducted by Gholami et al.²⁵ showed that conflicting results among studies associating vitamin D with CVD were more significant in those that used mass spectrometry compared to studies that used radioimmunoassay to measure the serum level of 25-OH- vitD. Without harmonizing serum vitamin D measurements, caution is warranted when interpreting studies that link vitamin D to cardiovascular risk.

CONCLUSION

The findings show that there is no association between vitamin D and FA levels in the population studied. The evidence so far shows that vitamin D has extensive potential and that many factors remain to be explored in relation to cardiovascular health. However, it is necessary to be cautious when interpreting the studies, since several analytical and research-intrinsic factors - such as lifestyle - can influence the serum concentrations of vitamin D.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

LBXC: Conceptualization, Investigation, Validation, Data Curation, Original Writing-Draft, Visualization, Project Management. **GLM:** Investigation. **RCFD:** Investigation, Methodology. **PLR:** Validation. **ELF:** Resources. **FRS:** Resources. **MGC:** Conceptualization. **HJR:** Resources. **KBGB:** Formal analysis, Conceptualization, Supervision, Resource. **CNF:** Deadline, Conceptualization, Writing - proofreading and editing, Supervision, Project administration, Acquisition of financing.

ACKNOWLEDGEMENT

We would like to thank the sample donors for their participation in the research and all the physicians and staff at Lifecenter and Semper Hospitals for contributing to the study. We extend our thanks to the Ampligenix laboratory for the immunoenzymatic kit provided.

REFERÊNCIAS

1. De Moraes ERFL, Cirenza C, Lopes RD, Carvalho AC, Guimaraes PO, Rodrigues AAE, et al. Prevalence of atrial fibrillation and stroke risk assessment based on telemedicine screening tools in a primary healthcare setting. *Eur J Inter Med* 2019;67:36-41.
2. Nair R, Maseeh A. Vitamin D: The “sunshine” vitamin. *J Pharmacol Pharmacother* 2012;3:118-126.
3. Bellan M, Andreoli L, Mele C, Sainaghi PP, Rigamonti C, Piantoni S, et al. Pathophysiological role and therapeutic implications of vitamin D in autoimmunity: focus on chronic autoimmune diseases. *Nutrients* 2020;12:789.
4. Wang L, Song Y, Manson JE, Pilz S, März W, Michaëlsson K, et al. Circulating 25-hydroxy-vitamin D and risk of cardiovascular disease: a meta-analysis of prospective studies. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 2012;5:819-829.
5. Autier P, Boniol M, Pizot C, Mullie P. Vitamin D status and ill health: a systematic review. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014;2:76-89.
6. Khatib R, Joseph P, Briel M, Yusuf S, Healey J. Blockade of the renin–angiotensin–aldosterone system (RAAS) for primary prevention of non-valvular atrial fibrillation: a systematic review and meta analysis of randomized controlled trials. *Int J Cardiol* 2013;165:17-24.
7. Chen S, Glenn DJ, Ni W, Grigsby CL, Olsen K, Nishimoto M, et al. Expression of the vitamin d receptor is increased in the hypertrophic heart. *Am J Hypertens* 2008;52:1106-1112.
8. Pilz S, Verheyen N, Grübler MR, Tomaschitz A, März W. Vitamin D and cardiovascular disease prevention. *Nat Rev Cardiol* 2016;13:404-417.
9. Turin A, Bax JJ, Doukas D, Joyce C, Lopez JJ, Mathew V, et al. Interactions among vitamin D, atrial fibrillation, and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Am J Cardiol* 2018;122:780-784.
10. Liu X, Wang W, Tan Z, Zhu X, Liu M, Wan R, et al. The relationship between vitamin D and risk of atrial fibrillation: a dose-response analysis of observational studies. *J Nutr* 2019;18:1-10.
11. Yang J, Ou-Yang J, Huang J. Low serum vitamin D levels increase the mortality of cardiovascular disease in older adults: A dose–response meta-analysis of prospective studies. *Medicine* 2019;98:16733.
12. Zhang D. Effect of vitamin D on blood pressure and hypertension in the general population: an update meta-analysis of cohort studies and randomized controlled trials. *Prev Chronic Dis* 2020;17:1-13.

13. Yiu YF, Chan YH, Yiu KH, Siu CW, Li SW, Wong LY, et al. Vitamin D deficiency is associated with depletion of circulating endothelial progenitor cells and endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metabol* 2011;96:830-835.
14. Lee JH, Gadi R, Spertus JA, Tang F, O'Keefe JH. Prevalence of vitamin D deficiency in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2011;107:1636-1638.
15. Vitezova A, Cartolano NS, Heeringa J, Zillikens MC, Hofman A, Franco OH, et al. Vitamin D and the risk of atrial fibrillation-The rotterdam study. *PLoS One* 2015;10:1-11.
16. Pérez-Hernández N, Apton-Duque G, Nostroza-Hernández MC, Vargas-Alarcón G, Rodríguez-Pérez JM, Blachman-Braun R. Vitamin D and its effects on cardiovascular diseases: a comprehensive review. *Korean J Inter Med* 2016;31:1018.
17. Patel D, Druck A, Hoppensteadt D, Bansal V, Brailovsky Y, Syed M. Relationship Between 25-Hydroxyvitamin D, Renin, and Collagen Remodeling Biomarkers in Atrial Fibrillation. *Clin Appl Thromb Hemost* 2020;26:1076029619899702.
18. Canpolat U, Yayla C, Akboğa MK, Özcan EH, Turak O, Özcan F, et al. Effect of vitamin D replacement on atrial electromechanical delay in subjects with vitamin D deficiency. *J cardiovasc Electrophysiol* 2015;26:649-655.
19. Alonso A, Misialek JR, Michos ED, Eckfeldt J, Selvin E, Soliman EZ, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D and the incidence of atrial fibrillation: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study, *Ep Europace* 2016;18:1143-1149.
20. Jenkins DJ, Spence JD, Giovannucci EL, Kim YI, Josse R, Vieth R, et al. Supplemental vitamins and minerals for CVD prevention and treatment. *J Am Coll Cardiol* 2018;71:2570-2584.
21. Manson JE, Cook NR, Lee IM, Christen W, Bassuk SS, Mora S, et al. Vitamin D supplements and prevention of cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 2019;3:33-44.
22. Canpolat U, Aytemir K, Hazirolan T, Özer N, Oto A. Relationship between vitamin D level and left atrial fibrosis in patients with lone paroxysmal atrial fibrillation undergoing cryoballoon-based catheter ablation. *JAMA Cardiol* 2017;69:16-23.
23. Chen S, Swier VJ, Boosani CS, Radwan MM, Agrawal DK. Vitamin D deficiency accelerates coronary artery disease progression in swine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016;36:1651-1659.

24. Mathew JS, Sachs MC, Katz R, Patton KK, Heckbert SR, Hoofnagle AN, et al. Fibroblast growth factor-23 and incident atrial fibrillation: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA) and the Cardiovascular Health Study (CHS). *Circulation* 2014;130:298-307.
25. Gholami F, Moradi G, Zareei B, Rasouli MA, Nikkhoo B, Roshani D, et al. The association between circulating 25-hydroxyvitamin D and cardiovascular diseases: A meta-analysis of prospective cohort studies. *BMC Cardiovasc Dis* 2019;19:1-11.

Figure 1. Vitamin D plasma levels between control and AF group.

E-mail de submissão _ Manuscrito II

21/07/2022 18:51

Gmail - IJCB: Submission Confirmation for Vitamin D levels Assessment in patients suffer from atrial fibrillation - [EMID:807a...



Cláudia Ferreira <ferreiracn@gmail.com>

IJCB: Submission Confirmation for Vitamin D levels Assessment in patients suffer from atrial fibrillation - [EMID:807af9fed87ba86d]

1 mensagem

Indian Journal of Clinical Biochemistry (IJCB) <em@editorialmanager.com>

21 de julho de 2022 18:47

Responder a: "Indian Journal of Clinical Biochemistry (IJCB)" <hemavathi.veerasamy@springer.com>

Para: Cláudia Natália Ferreira <ferreiracn@gmail.com>

Dear Mrs Ferreira,

Your submission entitled "Vitamin D levels Assessment in patients suffer from atrial fibrillation" has been received by journal Indian Journal of Clinical Biochemistry

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <https://www.editorialmanager.com/ijcb/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Editorial Office
Indian Journal of Clinical Biochemistry

This letter contains confidential information, is for your own use, and should not be forwarded to third parties.

Recipients of this email are registered users within the Editorial Manager database for this journal. We will keep your information on file to use in the process of submitting, evaluating and publishing a manuscript. For more information on how we use your personal details please see our privacy policy at <https://www.springernature.com/production-privacy-policy>. If you no longer wish to receive messages from this journal or you have questions regarding database management, please contact the Publication Office at the link below.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/ijcb/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

Anexo E – Artigo II publicado em colaboração durante o desenvolvimento do doutorado

Original Article | [Published: 15 September 2021](#)

Polycystic ovary syndrome: clinical and laboratory variables related to new phenotypes using machine-learning models

[I. S. Silva](#), [C. N. Ferreira](#), [L. B. X. Costa](#), [M. O. Sóter](#), [L. M. L. Carvalho](#), [J. de C. Albuquerque](#), [M. F. Sales](#), [A. L. Candido](#), [F. M. Reis](#), [A. A. Veloso](#) & [K. B. Gomes](#) 

[Journal of Endocrinological Investigation](#) **45**, 497–505 (2022) | [Cite this article](#)

Anexo F – Artigo III publicado em colaboração durante o desenvolvimento do doutorado

Archives of Gynecology and Obstetrics
<https://doi.org/10.1007/s00404-022-06632-y>

CORRESPONDENCE



Association between TAFI and PAI-1 polymorphisms with biochemical and hemostatic parameters in polycystic ovary syndrome

Juliane C. Albuquerque¹ · Natalia M. C. Luz² · Thalles H. O. Ribeiro² · Luana B. X. Costa¹ · Ana L. Candido² · Fernando M. Reis² · Helton J. Reis³  · Franciele S. Silva¹ · Ieda F. O. Silva¹ · Karina B. Gomes¹ · Cláudia N. Ferreira^{1,4} 

Received: 13 January 2022 / Accepted: 14 May 2022

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2022

PRODUÇÕES

I. Participação em Congressos

53º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica Medicina Laboratorial

Local: Centro de Convenções Sul Américas – Rio de Janeiro.

Data: 24 a 27 de setembro de 2019.



75º Congresso Brasileiro de Cardiologia

Modalidade Online

Data: 20 a 22 de novembro de 2020.

Apresentação de pôsteres



17º Encontro de Endocrinologia Feminina

Modalidade: Pôsteres digitais

Data: 11 e 12 de junho de 2021.



76° Congresso Brasileiro de Cardiologia

Modalidade: Pôsteres digitais

Data: 19 a 21 de novembro de 2021.



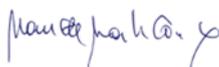
Certificados de participação como membro de comissão examinadora de monografia

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS, PARA OS DEVIDOS FINS QUE

Karina Braga Gomes – orientadora, **Jéssica Abdo Gonçalves Tosatti** – coorientadora, **Laura Machado Lara Carvalho** e **Luana Bernardes Xavier Costa**, participaram como membros da Comissão Examinadora da Monografia de Conclusão de Curso, intitulada "INFLUÊNCIA DA METFORMINA NOS NÍVEIS DE TESTOSTERONA TOTAL EM MULHERES COM A SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA E METANÁLISE DE ENSAIOS CLÍNICOS RANDOMIZADOS" apresentada pela aluna **Adriana Fialho da Silva Fontes**.

Belo Horizonte, 13 de janeiro de 2022.



Prof. Dr. Marcio de Matos Coelho
Coordenador do Colegiado de Coordenação Didática do Curso de Farmácia

FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha – CEP 31270-901 – Fone: 31 3409-6742/6743/6744
cografar@farmacia.ufmg.br www.farmacia.ufmg.br

SEI/UFMG - 1757414 - Certificado

https://sei.ufmg.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_...



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS FACULDADE DE FARMÁCIA COLEGIADO DO CURSO DE BIOMEDICINA

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS, PARA OS DEVIDOS FINS, QUE **Claudia Natália Ferreira (orientadora)**, **Gabriela Lopes Martins (coorientadora)**, **Ieda de FÁma Oliveira Silva (examinadora)** e **Luana Bernardes Xavier Costa(examinadora)** participaram como membros da Comissão Examinadora da Monografia de Conclusão de Curso, intitulada **“Avaliação da Influência no Jejum na determinação do Perfil Lipídico em estudantes do ensino médio ”**, apresentada pelo(a) aluno(a) **Pâmella Lemos Rocha**.

Belo Horizonte, 08 de Julho de 2022.

Professora Ana Paula Lucas Mota
Coordenadora do Colegiado do Curso de Biomedicina

Professora Crisane Alves Silva Menezes
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas



Documento assinado eletronicamente por **Crisane Alves da Silva Menezes, Subcoordenador(a)**, em 16/09/2022, às 18:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Paula Lucas Mota, Coordenador(a) de curso**, em 19/09/2022, às 08:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#). A autenticidade deste



documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1757414** e o código CRC **D19288A5**.

Referência: Processo nº 23072.240380/2022-99 SEI nº 1757414