



**UNIVERSIDADE SANTO AMARO – UNISA**  
**PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Daniel Carneiro de Carvalho**

**EFEITO DE TERAPIAS FARMACOLÓGICAS EM SUBTIPOS DE**  
**MONÓCITOS NO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO**

**São Paulo**

**2021**

**Daniel Carneiro de Carvalho**

**EFEITO DE TERAPIAS FARMACOLÓGICAS EM SUBTIPOS DE  
MONÓCITOS NO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Carolina Nunes França

Coorientador: Prof. Dr. André Luis Lacerda Bachi

**São Paulo**

**2021**

C321e Carvalho, Daniel Carneiro de.

Efeitos de terapias farmacológicas em subtipos de monócitos no Infarto Agudo do Miocárdio / Daniel Carneiro de Carvalho. — São Paulo, 2021.

52 f.: il., color.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) — Universidade Santo Amaro, 2021.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carolina Nunes França.  
Coorientador: Dr. André Luis Lacerda Bachi.

1. Subtipos de monócitos. 2. Aterosclerose. 3. Infarto agudo do miocárdio. 4. Hipolipemiante. 5. Antiplaquetário. I. França, Carolina Nunes, orient. II. Bachi, André Luis Lacerda, coorient. III. Universidade Santo Amaro. IV. Título.

Dedico meu mestrado aos meus pais, Edimar e Ana Maria (in memorian), que foram os pilares da minha formação como ser humano e que levaram a ser o que sou hoje.

À minha esposa Karina, pelo apoio e suporte incondicional durante o mestrado, o qual teve muita paciência, sabedoria e manteve o controle familiar enquanto o mesmo estava sendo realizado, agradeço pelo sonho realizado. Muito obrigado por existir em minha vida e por ser essa mulher maravilhosa meu amor.

À minha filha Giovanna que me trouxe muita alegria, amor e esperança de uma vida e um mundo melhor.

À minha orientadora e querida Profa. Carol à qual carinhosamente é conhecida por todos e que me manteve focado e com sua dedicação e paciência, me incentivou, motivou e direcionou ao longo de todo projeto com sua experiência e sabedoria. Agradeço por sua preciosa orientação e meu muito obrigado por tudo.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Santo Amaro (UNISA), responsável pela minha formação acadêmica, ética e profissional.

À Universidade Santo Amaro (UNISA), por te me dado a oportunidade e aprendizado desses dois últimos anos.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Carolina Nunes França, muito obrigado por sua atenção, compreensão, orientação e por confiar e acreditar em mim.

Ao Dr. Ighor do laboratório de lípidos, aterosclerose e biologia vascular da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), por auxiliar na execução deste trabalho.

Aos queridos Prof. Dr. Neil e Profa. Dra. Yara, Prof. Dr. Luiz Nali, Prof. Dr. Lucas Neves, Profa. Dra. Marina Tiemi, Profa. Dra. Ana Paula, Prof. Dr. André Bachi, Prof. Dr. Álvaro Avezum, meu muito obrigado por todas as aulas que foram fundamentais para o aprendizado e desenvolvimento do meu projeto de mestrado.

Ao Dr. Carlos Eduardo dos Santos Ferreira e ao Prof. Dr. Luiz Nali pelas orientações.

Aos meus colegas deste mestrado acadêmico, pela convivência, amizade e troca de experiências e conhecimento.

***“O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria se aprende  
é com a vida e com os humildes.”***

Cora Coralina

## RESUMO

De Carvalho, DC. Efeito de terapias farmacológicas em subtipos de monócitos no Infarto Agudo do Miocárdio (dissertação). São Paulo: Universidade Santo Amaro; 2021.

**Introdução:** A aterosclerose é uma doença inflamatória caracterizada pela deposição de elementos lipídicos e fibróticos em artérias de grande calibre. Dependendo do ambiente, pode ocorrer recrutamento dos monócitos, classificados em três subpopulações, conhecidas como clássicas monócitos (CD14++CD16-), intermediárias (CD14++CD16+) e não clássicas (CD14+CD16++). **Objetivos:** Identificar, quantificar e caracterizar fenotipicamente subtipos de monócitos em pacientes sob tratamento hipolipemiante e antiplaquetário, após infarto agudo do miocárdio. **Métodos:** Os participantes foram incluídos em esquema fatorial 2x2 a serem tratados com rosuvastatina 20 mg ou sinvastatina 40 mg mais ezetimiba 10 mg, bem como ticagrelor 90 mg ou clopidogrel 75 mg. Os subtipos de monócitos foram analisados por citometria de fluxo no início do estudo e após um e seis meses de tratamento. **Resultados:** Foram incluídos 148 pacientes, sendo 105 homens (71%) e 43 mulheres (29%). Após comparações entre os tempos de tratamento (Teste de Friedman), independente das quatro estratégias farmacológicas, houve um aumento nos monócitos clássicos e uma redução nos monócitos não clássicos, sem diferenças para monócitos intermediários, após seis meses, ( $p < 0,0001$ ;  $p < 0,0001$  e  $p = 0,299$ , respectivamente). Além disso, após comparações entre os braços de tratamento, foi observada maior porcentagem de monócitos intermediários no grupo sinvastatina + ezetimiba + clopidogrel, sem diferenças para monócitos clássicos e não clássicos ( $p = 0,020$ ;  $p = 0,097$  e  $p = 0,158$ , respectivamente). Nos quatro braços de tratamento, houve uma porcentagem maior de monócitos intermediários em comparação com os outros subtipos ( $p < 0,0001$  para os quatro grupos). **Conclusão:** Foi observada persistência do fenótipo inflamatório após seis meses de tratamento, mesmo sob terapia hipolipemiante e antiplaquetária efetiva. Esses resultados podem ser devido à imunidade treinada, relacionada à persistência do fenótipo pró-inflamatório.

**Descritores:** subtipos de monócitos; aterosclerose; infarto agudo do miocárdio; hipolipemiante; antiplaquetário.

## ABSTRACT

De Carvalho, DC. Effect of pharmacological therapies on monocyte subtypes in Acute Myocardial Infarction (dissertation). São Paulo: Universidade Santo Amaro; 2021.

**Introduction:** Atherosclerosis is an inflammatory disease characterized by the deposition of lipid and fibrotic elements in large-caliber arteries. Depending on the environment, it might occur the recruitment of monocytes, classified into three subpopulations, known as classical (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>), intermediate (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) and non-classical (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>). **Objectives:** To identify, quantify and phenotypically characterize monocyte subtypes in patients undergoing lipid-lowering and antiplatelet treatment after acute myocardial infarction. **Methods:** Participants were included in a 2x2 factorial design to be treated with rosuvastatin 20 mg or simvastatin 40 mg plus ezetimibe 10 mg, as well as ticagrelor 90 mg or clopidogrel 75 mg. Monocyte subtypes were analyzed by flow cytometry at baseline and after one and six months of treatment. **Results:** Patients (n = 148) were included, 105 men (71%) and 43 women (29%). After comparisons between treatment times (Friedman test), regardless of the four pharmacological strategies, there was an increase in classical monocytes and a reduction in non-classical monocytes, with no differences for intermediate monocytes, after six months (p < 0.0001; p < 0.0001 and p = 0.299, respectively). Furthermore, after comparisons between the treatment arms, a higher percentage of intermediate monocytes was observed in the simvastatin + ezetimibe + clopidogrel group, with no differences for classical and non-classical monocytes (p = 0.020; p = 0.097 and p = 0.158, respectively). In the four treatment arms, there was a higher percentage of intermediate monocytes compared to the other subtypes (p < 0.0001 for the four groups). **Conclusion:** Persistence of the inflammatory phenotype was observed after six months of treatment, even under effective lipid-lowering and antiplatelet therapy. These results may be due to trained immunity, related to the persistence of the pro-inflammatory phenotype.

**Keywords:** monocyte subsets; atherosclerosis; acute myocardial infarction; hipolipemiant; antiplatelet.

## Lista de abreviaturas

AAS - ácido acetilsalicílico (aspirina)

CD- cluster differentiation (cluster de diferenciação ou grupamento de diferenciação)

CT – colesterol total

FRS - *Framingham Risk Score*

HbA1c- hemoglobina glicada

HDL-C – colesterol da lipoproteína de alta densidade.

HMG-CoA redutase - enzima 3-hidroxi-3-methyl-glutaril-CoA redutase

IAM- infarto agudo do miocárdio

IAMSSST - infarto do miocárdio sem elevação do segmento ST

ICP-intervenção coronária percutânea

LDL-C – colesterol da lipoproteína de baixa densidade

Não-HDL-C – colesterol não HDL

oxLDL - lipoproteína de baixa densidade oxidada

PROBE - *prospective, randomized, open label trial with blinded endpoints*

(prospectivo, aberto, aleatório e com análise cega de desfechos)

RC: Rosuvastatina + Clopidogrel

RT: Rosuvastatina + Ticagrelor

SCA- síndrome coronariana aguda

SEC: Sinvastatina + Ezetimiba + Clopidogrel

SET: Sinvastatina + Ezetimiba + Ticagrelor

STEMI - infarto do miocárdio com elevação do segmento ST

TG – triglicérides

TGF- taxa de filtração glomerular

UAP - angina de peito instável

## **Lista de Tabelas**

**Tabela 1.** Características gerais da amostra estudada

**Tabela 2.** Perfil bioquímico nas primeiras 24 horas de hospitalização

**Tabela 3.** Perfil lipídico ao longo do estudo

**Tabela 4.** Porcentagem dos subtipos de monócitos, ao longo do estudo

**Tabela 5.** Porcentagem dos subtipos de monócitos, segundo os braços de tratamento

## **Lista de Figuras**

Figura 1. Análise por Citometria de Fluxo de Subtipos de monócitos.

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	10
1.1 Aspectos Gerais das Doenças Cardiovasculares .....	10
1.2 Infarto Agudo do Miocárdio.....	11
1.3 Monócitos e seus subtipos.....	13
1.4 Hipolipemiantes .....	14
1.5 Antiplaquetários .....	16
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	17
<b>3. MÉTODOS</b> .....	18
3.1 Desenho do estudo.....	18
3.2 Critérios de inclusão e exclusão .....	18
3.3 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico .....	19
3.4 Caracterização fenotípica de subtipos de monócitos.....	19
3.5 Análise estatística.....	22
3.6 Aspectos éticos.....	22
<b>4. RESULTADOS</b> .....	23
4.1 Parâmetros de função renal, diabetes e lesão miocárdica .....	24
4.2 Perfil Lipídico .....	24
4.3 Análises por Citometria de Fluxo .....	28
4.3.1 Avaliação dos subtipos de monócitos – comparações entre visitas .....	28
4.3.2 Avaliação dos subtipos de monócitos – comparações entre os braços de tratamento .....	30
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	30
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	34
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	35
ANEXO A – Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa.....	40
ANEXO B – Submissão do Artigo para a Revista Biociences Reports. ....	43

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos Gerais das Doenças Cardiovasculares

As doenças cardiovasculares, que compreendem o infarto do miocárdio, angina e acidente vascular cerebral,<sup>1,2</sup> são a principal causa de morte e comorbidades na população em geral, sendo responsável por cerca de 16,7 milhões de mortes a cada ano no mundo.<sup>3,4</sup> É um importante problema de saúde pública mundial, devido às altas taxas de morbidade e mortalidade.<sup>5,6</sup> Segundo a Organização Mundial da Saúde, estima-se que em 2015 cerca de 7,4 milhões de 17,7 milhões de pessoas que morreram por doenças cardiovasculares tinham doença isquêmica do coração.<sup>1,3,7</sup>

No ano de 2016, 31% das mortes no mundo foram acarretadas por doenças cardiovasculares, custando cerca de US\$ 555 bilhões aos Estados Unidos, e estima-se que os gastos chegarão a US\$ 1,1 trilhão em 2035.<sup>8</sup>

No Brasil, as doenças cardiovasculares são consideradas a principal causa de morte, sendo responsável por 27% dos óbitos. No ano de 2014, cerca de 10,1% das internações no Brasil tiveram como causa as doenças cardiovasculares, e dessas 57,2% foram entre pessoas acima de 60 anos.<sup>9,10</sup> Nas últimas décadas, a taxa de mortalidade por doença cardiovascular padronizada por idade diminuiu significativamente entre os brasileiros.

Recentemente, foram implementados no Brasil o Programa de Prevenção e Controle da Hipertensão e do Diabetes e a Política Nacional de Promoção da Saúde, buscando diminuir as taxas de mortalidade por doenças cardiovasculares.<sup>5</sup> Desde então, as taxas de mortalidade e morbidade vêm apresentando queda, provavelmente pela implicação de políticas de saúde bem-sucedidas, mesmo com o aumento do envelhecimento da população brasileira.<sup>5,6</sup>

## 1.2 Infarto Agudo do Miocárdio

No Brasil e no mundo, o Infarto agudo do miocárdio é considerada a principal causa de morte. Segundo o DATASUS em 2017 cerca de 7,06% do total de óbitos tiveram como causa o infarto agudo do miocárdio. Das internações no Sistema Único de Saúde, o infarto do miocárdio representou 10,2%, com maior prevalência em indivíduos com idade superior a 50 anos, em que representou 25% dessas internações.<sup>11</sup>

O infarto do miocárdio se divide em categorias para auxiliar no tratamento precoce, com terapia de reperfusão. É comum designar em indivíduos com desconforto torácico ou outros sintomas isquêmicos, que desenvolvem novas elevações do segmento ST como infarto do miocárdio com elevação de ST. Já os indivíduos sem supradesnivelamento do segmento ST na apresentação são geralmente denominados sem supradesnivelamento do ST (IAMSSST). Além dessas categorias, o IM pode ser classificado em vários tipos com base nas diferenças patológicas, clínicas e prognósticas, juntamente com diferentes estratégias de tratamento.<sup>12</sup>

O infarto do miocárdio tipo 1 é ocasionado por doença arterial coronariana aterotrombótica, onde ocorre a ruptura ou erosão da placa aterosclerótica. Essa ruptura da placa pode apresentar complicações não apenas por trombose intraluminal, mas também por hemorragia na placa por meio da superfície rompida.<sup>12</sup>

Já no infarto do miocárdio tipo 2 acontece à lesão isquêmica do miocárdio devido a uma incompatibilidade entre a oferta e a demanda de oxigênio. No infarto tipo 2 não ocorre a ruptura aguda da placa aterotrombótica como no tipo 1. Esse tipo de infarto tem como causa um estressor agudo, como um sangramento agudo que poderá gerar a queda abrupta na hemoglobina, ou uma taquiarritmia sustentada com manifestações clínicas de isquemia miocárdica, podendo resultar em lesão miocárdica. Esses efeitos são ocasionados devido ao fluxo sanguíneo insuficiente para o miocárdio isquêmico para atender ao aumento da demanda miocárdica de oxigênio do estressor.<sup>12</sup>

Estudos epidemiológicos apresentam taxas de mortalidade em torno de 30%, com metade dessas acontecendo nas duas primeiras horas do evento. Aproximadamente 14% dos pacientes morrem sem receber tratamento médico.<sup>13-17</sup>

No infarto, ocorre a morte de cardiomiócitos ocasionada por isquemia prolongada,<sup>12</sup> decorrente da redução ou interrupção do fluxo sanguíneo para uma parte do coração. O fornecimento de sangue para o miocárdio pelas artérias coronárias passa a ser insuficiente para suprir a demanda, levando à isquemia e necrose do tecido, dano ao músculo cardíaco e perda de cardiomiócitos.<sup>14,16-18</sup>

Grande parte dos infartos é causada pela aterosclerose. Na aterosclerose, ocorre uma ação inflamatória crônica na parede interna de artérias e envolve células endoteliais vasculares, monócitos, macrófagos, linfócitos T, células do músculo liso vascular, lipídios e plaquetas. A aterosclerose tem início quando a LDL adentra a parede das artérias, resultando em uma cascata de citocinas inflamatórias, enzimas e produção de moléculas de adesão celular. Essa ação resulta no deslocamento de linfócitos T e monócitos para o espaço subintimal. A concentração de LDL oxidada compromete ainda mais as células endoteliais, resultando em produção de radicais livres decorrentes de citocinas e oxigênio no espaço subintimal. A LDL oxidada é captado por macrófagos que se tornam células espumosas. Com o passar do tempo, forma-se uma capa fibrosa contendo células musculares lisas, elastina e colágeno e as complicações podem levar à ruptura da placa aterosclerótica.<sup>19</sup>

Um importante regulador relacionado às complicações que levam ao Infarto é a resposta imune inata. Essa ocorre em três fases: inflamatória, proliferativa e de maturação. A fase inflamatória tem início com a morte celular, e é desencadeada pela inflamação estéril, por meio da apresentação de padrões moleculares associados a danos endógenos ao sistema imunológico inato. O reconhecimento desses danos por receptores de células imunes inatas residentes requer uma cascata de liberação de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, atraindo e ativando neutrófilos, monócitos e macrófagos. Essas células quando reunidas, além de remodelar a matriz extracelular, tem a função de eliminar as células necróticas, por meio da fagocitose.

Essa fase alcança o seu pico após o terceiro dia. A fase proliferativa dura em média 10 dias, é intercedida por células do sistema imunológico, ocorre a proliferação de fibroblastos e o depósito de tecido de granulação. Na fase de maturação ainda há a remodelação da matriz extracelular, com poucas células imunes presentes no local da lesão.<sup>19,20</sup>

### **1.3 Monócitos e seus subtipos**

O sistema fagocitário mononuclear é formado por monócitos, macrófagos e células dendríticas. Os monócitos são células com vida curta, originadas na medula óssea e liberadas para a circulação.<sup>19</sup> Os monócitos desempenham funções importantes no sistema imunológico, inflamação e homeostase, eliminando patógenos e células mortas e iniciando a imunidade adaptativa. Além disso, colaboram para a reparação do tecido e podem se diferenciar em macrófagos e produzir citocinas inflamatórias.<sup>21</sup>

No Infarto do Miocárdio acontece um processo inflamatório, onde ocorre a migração de monócitos, macrófagos e neutrófilos para os locais com isquemia e necrose. No local de lesão tecidual ocorre migração de células inflamatórias pela cascata de sinalização e ativação neuro-hormonal.<sup>21,22</sup> Os monócitos e macrófagos aumentam na área do infarto, sendo maior o recrutamento a partir de 30 minutos após o evento.<sup>21</sup> As modificações de monócitos e macrófagos no miocárdio após o infarto são seguidas por uma ampliação dos monócitos circulantes. O reservatório esplênico é considerado a principal fonte de monócitos circulantes após o infarto.<sup>19</sup>

Em 1988 pela primeira vez os subconjuntos de monócitos foram isolados por meio de citometria de fluxo. Há três subtipos de monócitos descritos na literatura, que podem se distinguir pela presença ou ausência do receptor de lipopolissacarídeo CD14 e do receptor Fcγ CD16. Para definir o subconjunto de monócitos humanos foram usadas as expressões de CD14 (receptor de lipopolissacarídeo) e CD16 (receptor Fc), que definem as subpopulações de monócitos clássicos (CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>-</sup>), intermediários (CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>+</sup>) e não clássicos (CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>++</sup>).<sup>23-27</sup>

Os monócitos clássicos estão envolvidos no processo de inflamação, são pró-inflamatórios e produzem altos níveis de citocinas. São liberados pela medula óssea e por locais extramedulares de hematopoiese. Participam da resposta imune inata e da ativação da resposta imune adaptativa, por meio da apresentação de antígenos às células T. Eles chegam ao pico no terceiro dia após o infarto e participam da deterioração do miocárdio necrótico.<sup>25</sup>

Monócitos intermediários são potentes apresentadores de antígenos, participam da regulação da angiogênese, têm função fagocítica e colaboram para a explosão oxidativa. Estudos sugerem que, provavelmente, essas células correspondem à transição entre monócitos clássicos e não clássicos.<sup>25</sup>

Monócitos não clássicos têm função de patrulhamento, sendo localizados próximos à parede do vaso na circulação e eliminando lipídios oxidados, detritos celulares e patógenos. Seu pico é no quinto dia após o infarto. E podem participar da regulação e formação de cicatrizes, angiogênese e cicatrização miocárdica, estão associados à melhora na recuperação do miocárdio.<sup>25</sup>

#### **1.4 Hipolipemiantes**

A LDL leva o colesterol e outros lipídios por todo o corpo e desempenham a função no início e evolução da aterosclerose. Logo, manter os níveis lipídicos ideais é um elemento importante para a saúde cardiovascular. O aumento da placa aterosclerótica em níveis críticos pode levar ao seu rompimento, formando um trombo que obstrui agudamente o fluxo sanguíneo, e que resultará em angina instável, infarto do miocárdio ou morte.<sup>20</sup>

A diminuição do impacto socioeconômico das doenças cardiovasculares, principalmente das que têm como fisiopatologia de base a aterosclerose, pode ser obtida por um melhor controle dos fatores de risco e pelo correto tratamento da própria doença aguda, particularmente por meio da manutenção de níveis saudáveis de colesterol, pois como dito, este é um fator de risco relevante para infarto agudo do miocárdio.<sup>3,6</sup>

Nesse sentido, as estatinas são fármacos inibidores da síntese endógena de colesterol, utilizadas no tratamento para hiperlipidemia, que apresenta proteção com relação à doença cardiovascular aterosclerótica comprovada mesmo em pacientes normolipêmicos. São exemplos desses fármacos a sinvastatina, pravastatina, atorvastatina.<sup>4,28</sup>

Na década de 1990, foram realizados os primeiros estudos com estatinas, onde foram ressaltados os seus benefícios, principalmente em indivíduos com histórico de doença cardiovascular.<sup>5</sup> Estudos mostraram que as estatinas são capazes de melhorar os desfechos cardiovasculares em pacientes com doença arterial coronariana estável e com risco aumentado para essa doença. Além disso, pacientes sem manifestação de aterosclerose podem se favorecer com o tratamento com estatinas.<sup>3,29</sup> As estatinas desempenham um importante papel nas síndromes coronarianas agudas e, nos pacientes que realizaram à revascularização percutânea, o tratamento precoce pode fornecer significativos benefícios.<sup>29</sup>

A sinvastatina é uma estatina considerada segura, bem tolerado e é utilizado para o tratamento de distúrbios lipídicos em especial a hipercolesterolemia, pois atua como modificador de lipídios é considerada segura e bem tolerada. É um inibidor da 3-hidroxi-3metil-glutaril coenzima A redutase. Auxilia na redução da morbimortalidade em indivíduos com doença cardiovascular aterosclerótica, mesmo com níveis normais de colesterol.<sup>30,31</sup>

Rosuvastatina é uma estatina utilizada na redução de lipídios, sendo indicada para hipercolesterolemia familiar, hiperlipidemia, dislipidemia mista, disbetalipoproteinemia primária, hipertrigliceridemia e prevenção de doenças cardiovasculares. Em especial, além de inibir a HMG-CoA redutase, também promove a inibição da agregação plaquetária, reduz a inflamação na região de uma placa coronária, melhora a função endotelial, e apresenta efeitos anticoagulantes.<sup>32</sup>

Ezetimiba é um inibidor da absorção do colesterol intestinal, sendo por isso indicada na diminuição do colesterol total e LDL em pacientes com hiperlipidemia

primária, hiperlipidemia mista, hipercolesterolemia familiar e sitosterolemia homozigótica (fitosterolemia).<sup>33</sup>

## 1.5 Antiplaquetários

Nas doenças cardiovasculares ocorre a ativação plaquetária que tem início com um endotélio vascular lesionado. Isso leva à agregação plaquetária, e ocorre a formação de trombo patológico e eventos isquêmicos, diante disso o uso de antiplaquetários é fundamental na terapia e prevenção secundária dessas doenças.<sup>30</sup>

Nesse sentido, o clopidogrel é uma droga antiplaquetária que tem sido utilizada em todo o mundo para a prevenção de eventos isquêmicos em pacientes com síndrome coronariana aguda (SCA), intervenção coronária percutânea (ICP) e infarto do miocárdio. Pelo fato desta droga necessitar de conversão hepática, seus efeitos de inibição plaquetária variam entre os indivíduos. Corroborando esta afirmação, estudos relatam que em um terço dos pacientes que utilizaram esse fármaco apresentaram mínima inibição plaquetária.<sup>31-35</sup>

Um dos mais novos fármacos antiplaquetários é o ticagrelor, pesquisas demonstram que esse diminui a mortalidade por doenças cardiovasculares. Interessantemente, quando comparado com o clopidogrel, este fármaco não só tem um início de ação mais rápido, como também uma inibição plaquetária mais potente. Além de ser antiplaquetário, este também é vasodilatador e cardioprotetor.<sup>32</sup>

## **2. OBJETIVOS**

Comparar o efeito de quatro estratégias farmacológicas, com base em hipolipemiantes e anti-plaquetários, nos níveis de monócitos clássicos, intermediários e não clássicos de pacientes após Infarto Agudo do Miocárdio, nas visitas inicial (após 24 horas de hospitalização), um e seis meses de tratamento.

### **3. MÉTODOS**

#### **3.1 Desenho do estudo**

O estudo foi do tipo PROBE (*prospective, randomized, open label trial with blinded endpoints*) ou seja, prospectivo, aberto, aleatório e com análise cega de desfechos.

O estudo foi registrado como ensaio clínico antes de seu início (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02428374) e obedeceu as normas internacionais da boa prática clínica e harmonização de dados (GCP/ICH).

Os pacientes foram aleatorizados em desenho fatorial 2x2 para tratamento com rosuvastatina 40 mg/dia ou sinvastatina 40 mg/dia, bem como ticagrelor 180 mg inicialmente e 90 mg 2x/dia de manutenção ou clopidogrel 600 mg inicialmente e 75 mg/dia de manutenção (pacientes com estratégia de intervenção percutânea primária) ou 90 mg de ticagrelor (dose inicial e mantida 12/12h) e 300 mg de clopidogrel (seguido de 75 mg/dia, quando do uso de trombolíticos), além da terapia convencional do IAM. O tratamento foi mantido por seis meses. Os fármacos utilizados no estudo foram doados pela indústria farmacêutica.

#### **3.2 Critérios de inclusão e exclusão**

Foram incluídos pacientes de ambos os sexos com idade inferior a 75 anos, com Infarto Agudo do Miocárdio com supradesnívelamento do segmento ST, tratados com trombolíticos nas primeiras seis horas de início dos sintomas. Foram excluídos pacientes com comorbidades que pudessem impedir a introdução dos fármacos ou a avaliação dos tratamentos, como hepatopatia ativa, sangramentos recentes, neoplasias, choque cardiogênico, conhecida intolerância aos fármacos do estudo, ou antecedentes pessoais que pudessem impedir uma adequada avaliação dos tratamentos (alcoolismo, dependência de drogas, doenças infecciosas ou

reumatológicas crônicas, como AIDS, artrite reumatoide, Lúpus Eritematoso Sistêmico, dentre outros).

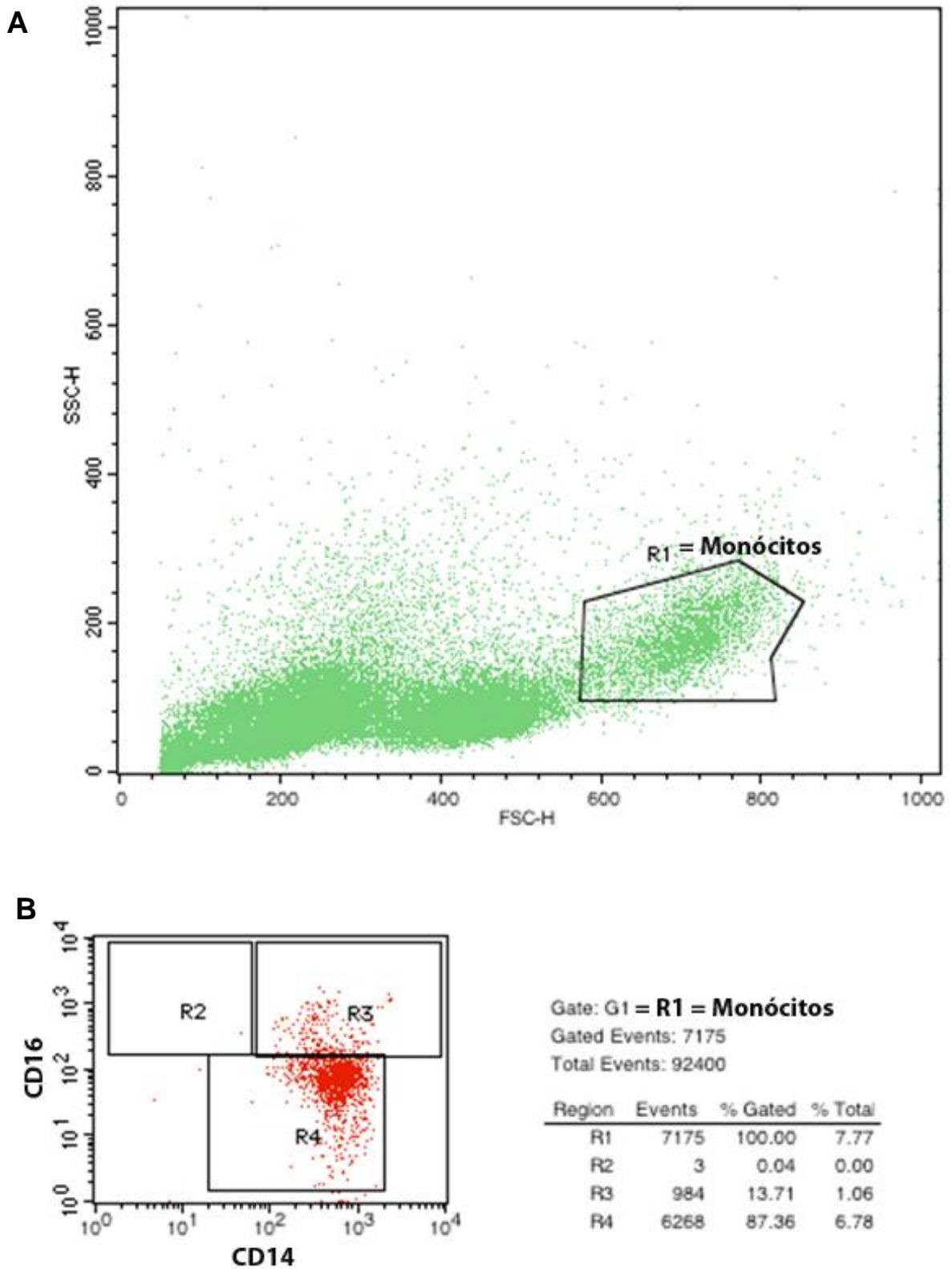
### **3.3 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico**

Foram colhidos aproximadamente 15 mL de sangue periférico dos pacientes em tubos com EDTA (para evitar coagulação) em três momentos distintos: 24 horas após a hospitalização (basal), após 30 dias e 180 dias de tratamento farmacológico. O sangue foi misturado a soro fisiológico na proporção 1:1, em seguida acrescido Ficoll-Hypaque (Ficoll Paque Plus, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) e centrifugado a 800 g, 22<sup>o</sup> C por 20 minutos, para que houvesse separação de células mononucleares por gradiente de concentração. Posteriormente, as células obtidas foram lavadas em PBS. A viabilidade celular e contagem das células foram realizadas em Câmara de Neubauer (hemocitômetro), após coloração de 10 uL das células com 90 uL de Azul de Tripán 60% (Sigma-Aldrich, MO, USA) por cinco minutos; em seguida as amostras foram centrifugadas e utilizadas imediatamente, ou congeladas com 1 mL de solução para congelamento (DMSO + soro fetal bovino), sendo estas mantidas em nitrogênio líquido.

### **3.4 Caracterização fenotípica de subtipos de monócitos**

As células mononucleares do sangue periférico foram centrifugadas e imunomarcadas por 15 minutos à temperatura ambiente com os seguintes anticorpos: CD14 conjugado com alofococianina - APC (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) e CD16 conjugado com isotiocianato de fluoresceína - FITC (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), Como controles foram analisadas células marcadas com os isotipos IgG1 APC (BD, Biosciences, Franklin Lakes, USA) e IgG1 FITC (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Após etapa de lavagem e remoção do excesso de anticorpos, foi realizada a leitura em citômetro de fluxo (FACSCalibur – BD Biosciences, San Jose, USA) com análise feita pelo software Cell Quest Pro, no basal, após um mês e seis meses de tratamento.

Os subtipos de monócitos foram expressos em porcentagem (%), sendo adquiridos aproximadamente 50.000 eventos. A Figura 1 mostra um exemplo de como a população de monócitos é identificada segundo critérios de tamanho x complexidade (FSC X SSC – Figura 1A) e a caracterização fenotípica (Figura 1B) com base nas proteínas de superfície celular CD14 e CD16, que distinguem monócitos não clássicos (CD14+/CD16++), intermediários (CD14++/CD16+) e clássicos (CD14++/CD16-).



**Figura 1.** Análise por Citometria de Fluxo de subtipos de monócitos. **A)** Tamanho (FSC-H) x complexidade (SSC-H), R1 = região de monócitos; **B)** Amostra marcada com os anticorpos anti-CD14 FITC e anti-CD16 PE, identificando-se três subpopulações de monócitos: R2 = Não-clássicos, R3 = intermediários e R4 = clássicos.

### **3.5 Análise estatística**

Para análise dos dados, foi utilizado o programa SPSS versão 18.0. Foram realizados os testes não paramétricos Friedman e Kruskal-Wallis e definiu-se o nível de significância em  $p < 0,05$ .

### **3.6 Aspectos éticos**

O estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Santo Amaro – UNISA, parecer nº 2.275.621.

#### 4. RESULTADOS

Foram incluídos 148 pacientes, sendo 105 homens (71%) e 43 mulheres (29%). A Tabela 1 apresenta as características gerais da amostra.

**Tabela 1.** Características gerais da amostra estudada

Idade, mediana (IQ), anos	59 (53-64)
Sexo masculino, n (%)	105 (71)
Peso, média (EPM), Kg	75,49 (1,31)
Altura, média (EPM), m	1,66 (0,01)
Índice de massa corpórea, média (EPM), kg/m <sup>2</sup>	27,50 (0,45)
Pressão arterial sistólica, média (EPM), mmHg	125 (2)
Pressão arterial diastólica, média (EPM), mHg	76 (1)
Diabetes*, n (%)	43 (29)
Hipertensão, n (%)	40 (23)
Tabagismo, n (%)	34 (23)

Os valores mostrados expressam as médias e erros-padrão das médias (EPM), ou mediana (intervalo interquartis - IQ) ou dados em percentagem para variáveis categóricas.

\*Não diabético: Hb glicada < 5,7%; pré-diabético: Hb glicada entre 5,7 e 6,4%; diabético ≥ 6,5%.

#### 4.1 Parâmetros de função renal, diabetes e lesão miocárdica

A Tabela 2 mostra parâmetros de função renal, diabetes e lesão miocárdica avaliados nas primeiras 24 horas de hospitalização.

**Tabela 2.** Perfil bioquímico nas primeiras 24 horas de hospitalização

Exame	Média (EPM)
HbA1c	6,5 (0,1)
Glicose	141 (5)
Troponina	7762 (797)
Creatinina	0,96 (0,03)
TFG	83 (2)

Valores representam médias e erros-padrão das médias. Valores de glicose e creatinina em mg/dL; HbA1c em %; Troponina em picomol/L; TFG – taxa de filtração glomerular estimada (CKD-EPI).

#### 4.2 Perfil Lipídico

O perfil lipídico dos pacientes ao longo do estudo está representado na Tabela 3. Após comparações entre as visitas basal, 30 dias e 180 dias, foram encontradas reduções no colesterol total, LDL-C, não-HDL-C e aumento no HDL-C, sem diferenças para triglicérides ( $p < 0,0001$ ;  $p < 0,000$ ;  $p < 0,0001$ ;  $p = 0,001$  e  $p = 0,098$ , respectivamente. Teste ANOVA, pós teste de Bonferroni).

**Tabela 3.** Perfil lipídico ao longo do estudo

Exame	Média (EPM)	Média (EPM)	Média (EPM)	Valores de referência	p*
	Basal	30 dias	180 dias		
Colesterol total	202 (4)	126 (3)	127 (3)	inferior a 190	<0,0001
LDL-C	131 (3)	65 (2)	64 (2)	inferior a 100	<0,0001
HDL-C	41 (1)	38 (1)	45 (1)	superior a 40	0,001
Não-HDL-C	121 (6)	87 (3)	87 (3)	inferior a 130	<0,0001
Triglicérides	175 (14)	152 (12)	140 (7)	inferior a 150	0,098

Valores representam médias e erros-padrão das médias em mg/dL. CT – colesterol total; LDL-C – colesterol da lipoproteína de baixa densidade; Não-HDL-C – colesterol não HDL; TG – triglicérides; HDL-C – colesterol da lipoproteína de alta densidade.

\*Teste ANOVA, pós teste de Bonferroni

### **4.3 Análises por Citometria de Fluxo**

#### **4.3.1 Avaliação dos subtipos de monócitos – comparações entre visitas**

A Tabela 4 representa as porcentagens obtidas para cada subtipo de monócito, ao longo do estudo, independente do braço de tratamento. Houve aumento de monócitos clássicos após seis meses e redução de monócitos não-clássicos, sem diferenças para monócitos intermediários ( $p < 0,0001$ ;  $p < 0,0001$  e  $p = 0,299$ , respectivamente. Teste de Friedman). Além disso, a porcentagem de monócitos intermediários foi maior nas três visitas, quando comparados aos demais subtipos ( $p < 0,0001$  nas três visitas. Teste de Kruskal-Wallis).

**Tabela 4.** Porcentagem dos subtipos de monócitos, ao longo do estudo

Monócitos	Basal	30 dias	180 dias	p intragrupos	p intergrupos		
					Basal	30 dias	180 dias
Clássicos	28,89 (1,79)	28,00 (1,62)	36,09 (1,97)	<0,0001			
Intermediários	51,04 (2,22)	57,86 (1,94)	55,40 (1,99)	0,299	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Não-clássicos	5,23 (0,96)	6,53 (1,07)	1,30 (0,33)	<0,0001			

Os dados representam as médias (erros-padrão das médias – EPM). Teste de Friedman, comparações intra grupos (basal x 30 dias x 180 dias) e Teste de Kruskal-Wallis, comparações entre grupos (clássicos x intermediários x não-clássicos).

#### **4.3.2 Avaliação dos subtipos de monócitos – comparações entre os braços de tratamento**

Também foram comparados os quatro braços de tratamento quanto às porcentagens dos subtipos de monócitos. Conforme pode ser observado na Tabela 5, maior porcentagem de monócitos intermediários foi observada no grupo Sinvastatina + Ezetimiba + Clopidogrel, sem diferenças para monócitos não clássicos e clássicos ( $p=0,020$ ;  $p=0,097$  e  $p=0,158$ , respectivamente. Teste de Kruskal-Wallis). Nos quatro braços de tratamento houve maior porcentagem de monócitos intermediários quando comparados aos outros subtipos ( $p<0,0001$  para todos os grupos. Teste de Kruskal-Wallis).

**Tabela 5.** Porcentagem dos subtipos de monócitos, segundo os braços de tratamento

Monócitos	RT	RC	SET	SEC	p entre grupos*	p entre grupos#			
						RT	RC	SET	SEC
Clássicos	30,73 (1,77)	31,48 (2,17)	34,10 (2,41)	27,44 (2,11)	0,158				
Intermediário	53,11 (2,27)	52,49 (2,50)	51,45 (2,60)	61,65 (2,11)	0,020	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Não-clássicos	3,90 (0,90)	4,84 (1,21)	4,41 (1,02)	4,52 (0,97)	0,097				

Os dados representam as médias (erros-padrão das médias – EPM). Teste de Kruskal-Wallis, \*comparações entre braços de tratamento e #comparações entre grupos de monócitos (clássicos x intermediários x não-clássicos). RT: Rosuvastatina + Ticagrelor; RC: Rosuvastatina + Clopidogrel; SET: Sinvastatina + Ezetimiba + Ticagrelor; SEC: Sinvastatina + Ezetimiba + Clopidogr

## 5. DISCUSSÃO

Até onde se tem conhecimento, este foi o primeiro estudo de *follow-up* com humanos em que foi avaliado o efeito crônico de terapias farmacológicas (envolvendo hipolipemiantes e agentes antiplaquetários) em subtipos de monócitos após IAM. Os estudos transversais publicados mostram comparações entre pacientes após IAM e indivíduos saudáveis, avaliando apenas a fase aguda. Os estudos que avaliam os efeitos crônicos em subconjuntos de monócitos são escassos.

Nossos principais achados mostraram maiores porcentagens de monócitos clássicos e redução de monócitos não clássicos após seis meses de tratamento, independente da escolha da estratégia farmacológica. Estudos mostram que os monócitos clássicos possuem um papel predominantemente pró-inflamatório,<sup>37</sup> enquanto os monócitos não clássicos, por outro lado, apresentam um fenótipo mais antiinflamatório e a capacidade de remover debris da vasculatura (patrulhamento).<sup>38</sup>

Com base nos dados apresentados por Berg et al (2012),<sup>39</sup> que compararam um grupo de indivíduos com pelo menos um desfecho durante um seguimento de 15 anos com um grupo controle sem desfechos, foram evidenciados níveis mais elevados de monócitos clássicos no grupo caso. Além disso, os mesmos autores também relataram a menor sobrevida livre de eventos entre os participantes com maiores níveis dessas células, sugerindo que os monócitos clássicos predizem eventos cardiovasculares. Corroborando essas informações, Höpfner et al (2019)<sup>40</sup> encontraram elevação dos monócitos clássicos em pacientes hospitalizados com doença coronariana, sem correlações entre monócitos intermediários e não clássicos com desfechos cardíacos, sugerindo que o subtipo clássico é preditivo de eventos cardíacos maiores.

Além desses achados, Zeynalova et al (2021)<sup>41</sup> avaliaram os subconjuntos de monócitos em pacientes com diferentes riscos cardiovasculares, sem IAM prévio, de acordo com o *Framingham Risk Score (FRS)*, e verificou-se não apenas menores contagens de monócitos dos três

subconjuntos em pacientes com menor risco cardiovascular, mas também aumento contínuo dessas células nos pacientes de maior risco. Além disso, Leers et al (2017)<sup>42</sup> avaliaram os subconjuntos de monócitos no contexto da síndrome coronariana aguda (SCA) [angina de peito instável (UAP), infarto do miocárdio sem elevação do segmento ST (IAMSSST) e infarto do miocárdio com elevação do segmento ST (STEMI)]. Esses autores encontraram níveis mais elevados dos três subconjuntos de monócitos em pacientes com IAM (IAMSSST ou IAMCSST) quando comparados a pacientes sem SCA ou com UAP, indicando um aumento desses leucócitos relacionado à gravidade da SCA.

Marsh et al (2021)<sup>43</sup> avaliaram monócitos circulantes durante IAMCSST agudo, imediatamente antes de uma intervenção coronária percutânea primária até 90 minutos após a reperfusão. Os autores relataram uma redução expressiva nos três subtipos de monócitos, principalmente não clássicos, que foi diretamente correlacionada com o aumento no tamanho do infarto e fração de ejeção do ventrículo esquerdo) prejudicada. Segundo os mesmos autores, alguns estudos evidenciam um papel mais reparador dos monócitos não clássicos no contexto do IAM, seus resultados sugerem um agravamento da inflamação local no IAM anterior promovido por monócitos não clássicos.

Particularmente no presente estudo, evidenciamos maior percentual de monócitos intermediários, quando comparados às demais subpopulações, nas três visitas (24 horas após o IAM e após um e seis meses de tratamento). Poucos estudos descrevem o verdadeiro papel desse subtipo de monócito no contexto da aterosclerose/IAM; entretanto, alguns estudos indicam que este subtipo apresenta alta capacidade fagocítica, o que favorece a remoção de células apoptóticas após IAM.<sup>44</sup>

De acordo com o estudo de Lu et al. (2015),<sup>45</sup> em que foi investigado o papel dos monócitos intermediários em pacientes pós-IAM, essas células estão intimamente associadas à extensão do infarto e também podem ser úteis na predição de novos eventos cardiovasculares. Nesse sentido, Rogacev et al. (2012)<sup>46</sup> analisaram monócitos intermediários em 951 indivíduos elegíveis para angiografia coronariana e mostraram associação entre esse subtipo de

monócitos e eventos cardiovasculares, durante um período de seguimento de 2,6 anos. Em outro estudo do mesmo grupo, no qual foi avaliada a relação entre subtipos de monócitos e eventos cardiovasculares em pacientes com doença renal crônica, os autores mostraram que monócitos intermediários estão independentemente associados a eventos cardiovasculares futuros nos pacientes analisados.<sup>47</sup> Em conjunto, esses dados corroboram nossos achados, indicando uma relação importante entre monócitos intermediários e complicações cardiovasculares.

Outro achado importante apresentado no presente estudo foi relacionado ao fato de que apesar de submetidos aos tratamentos hipolipemiantes e antiplaquetários mais efetivos existentes para IAM, os pacientes ainda apresentavam risco residual inflamatório após seis meses de tratamento, pois foram encontrados maiores percentuais do subtipo clássico (pró-inflamatório). De acordo com a literatura, esse risco residual inflamatório poderia ser explicado, pelo menos em parte, pela imunidade treinada, que se refere a um fenótipo pró-inflamatório persistente (por meses a  $\leq 1$  ano)<sup>48</sup> após a exposição a compostos aterogênicos, como a lipoproteína de baixa densidade oxidada (oxLDL).<sup>49</sup> A reprogramação epigenética de modificações de histonas, bem como alterações metabólicas, que podem ocorrer a partir de progenitores mieloides na medula óssea,<sup>50,51</sup> são responsáveis por conduzir a essa imunidade treinada.<sup>52</sup>

De maneira interessante, Bekkering et al (2019)<sup>53</sup> avaliaram a imunidade treinada em pacientes com hipercolesterolemia familiar, em tratamento por três meses com estatinas, e, embora os autores não tenham observado diferenças na contagem de monócitos pró-inflamatórios após o tratamento, houve uma redução dos níveis de colesterol. Além disso, os mesmos autores também compararam pacientes com aterosclerose coronariana grave sintomática e pacientes com aterosclerose leve assintomática, e foi observada hiperresponsividade persistente nos monócitos do grupo de pacientes com sintomas graves, pois essas células mantiveram a produção de citocinas pró-inflamatórias, o que não foi encontrado no grupo de pacientes com sintomas leves.<sup>54</sup>

Particularmente, no presente estudo, também foi investigado o efeito de quatro estratégias farmacológicas, baseadas em hipolipemiantes e antiplaquetários, nas porcentagens dos subtipos de monócitos. Foi observado no grupo sinvastatina + ezetimiba + clopidogrel aumento nos percentuais de monócitos intermediários. É importante ressaltar que era esperada uma ação antiinflamatória menos potente para este braço de tratamento, uma vez que o clopidogrel tem metabolismo pelo citocromo P450 CYP 3A4, o mesmo local de metabolismo da sinvastatina (mas não da rosuvastatina), levando a uma diminuição da magnitude do efeito antiinflamatório pleiotrópico promovido pela sinvastatina. Além disso, a sinvastatina não só apresenta uma meia-vida mais curta do que a rosuvastatina, mas também uma inibição menos potente da síntese do colesterol. Essas informações podem ajudar no melhor entendimento dos achados do presente estudo, pois os efeitos antiinflamatórios mediados pelas estatinas são dependentes da menor ativação da via endógena de síntese do colesterol.<sup>55</sup>

Diferentemente dos achados do presente estudo, os resultados apresentados por Belhassena et al (2020),<sup>56</sup> em um estudo no qual os autores avaliaram os efeitos da aspirina (ácido acetilsalicílico - AAS) na imunomodulação de monócitos de pacientes com IAM e controles, células que foram tratadas ex vivo com diferentes concentrações de AAS apresentaram modulação fenotípica para um perfil antiinflamatório. Esses achados aparentemente contraditórios podem estar relacionados aos diferentes aspectos metodológicos: 1) antiagregantes plaquetários utilizados (no presente estudo foram utilizados clopidogrel e ticagrelor); 2) os monócitos foram tratados ex vivo por algumas horas no estudo Belhassena; e, 3) poucos pacientes foram analisados pela Belhassena.

## 6. CONCLUSÕES

No presente estudo foi mostrada uma persistência do fenótipo inflamatório após seis meses de tratamento, apesar de terem sido utilizadas as terapias hipolipemiantes e antiplaquetárias mais eficazes existentes, pois foi encontrado aumento dos monócitos clássicos (pró-inflamatórios) e redução dos monócitos não clássicos (antiinflamatórios). Isso pode estar relacionado à imunidade treinada, definida como a persistência de um fenótipo pró-inflamatório, independentemente da escolha da estratégia farmacológica. Além disso, a observação de níveis elevados de monócitos intermediários após seis meses de tratamento pode reforçar o papel dessas células com complicações cardiovasculares.

## REFERÊNCIAS

1. Alves L, Polanczyk CA. Hospitalização por infarto agudo do miocárdio: um registro baseado na população. *Arq Bras Cardiol* 2020;115 (5): 916-924.
2. Rebouças JS, Santos-Magalhães NS, Formiga FR. Regeneração cardíaca usando fatores de crescimento: avanços e desafios. *Arq Bras Cardiol* 2016;107 (3): 271-275.
3. Taylor F, Huffman MD, Macedo AF, et al. Statins for the primary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 2013(1):CD004816.
4. Mesa F, Magan-Fernandez A, Castellino G, et al. Periodontitis and mechanisms of cardiometabolic risk: Novel insights and future perspectives. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2019; 1865(2): 476-484.
5. Santos J, Meira KC, Camacho AR, et al. Mortality due to acute myocardial infarction in Brazil and its geographical regions: analyzing the effect of age-period-cohort. *Ciênc. Saúde Coletiva* 2018; 23( 5 ): 1621-1634.
6. Bernardi A, Rocha VZ, Faria-Neto JR. Uso de estatinas e incidência de diabetes mellitus tipo 2. *Rev Assoc Med Bras* 2015; 61 (4): 375-380.
7. Ferreira LCM, Nogueira MC, Carvalho MS, et al. Mortalidade por infarto agudo do miocárdio no Brasil de 1996 a 2016: 21 anos de disparidades nas regiões brasileiras. *Arq Bras Cardiol* 2020; 15 (5): 849-859.
8. Stein R, Beuren T, Cela LR, et al. Farmacogenômica e doenças cardiovasculares: onde estamos e para onde vamos a partir daqui? *Arq Bras Cardiol* 2020; 115 (4): 690-700.
9. Massa KHC, Duarte YAOI, Chiavegatto FADP. Análise da prevalência de doenças cardiovasculares e fatores associados em idosos, 2000-2010. *Ciência Saúde Coletiva* 2019; 24(1): 105-114.
10. Costa LR, Passos EV, Silvestre OM. O Redescobrimto do Brasil Cardiovascular: Como Prevenimos e Tratamos a Doença Cardiovascular em Nosso País. *Arq Bras. Cardiol* 2021; 116(1): 117-118.
11. DATASUS. Sistema de Informação sobre Mortalidade. [Internet] 2017 [acessado 2021 Jan 02]. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205>

12. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Executive Group on behalf of the Joint European Society of Cardiology (ESC)/American College of Cardiology (ACC)/American Heart Association (AHA)/World Heart Federation (WHF) Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction. Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *J Am Coll Cardiol*. 2018; 72(18): 2231-2264.
13. Saleh M, Ambrose JA. Understanding myocardial infarction. *F1000Res*. 2018; 7:F1000 Faculty Rev-1378.
14. Pesaro AEP, Serrano JCV, Nicolau JC. Infarto agudo do miocárdio: síndrome coronariana aguda com supradesnível do segmento ST. *Rev Assoc Med Bras* 2004; 50(2): 214-220.
15. Rebouças JS, Santos-Magalhães NS, Formiga FR. Regeneração cardíaca usando fatores de crescimento: avanços e desafios. *Arq Bras Cardiol* 2016; 107(3): 271-275.
16. Miranda AVS, Rampellotti LF. Incidência de dor torácica como sintoma de infarto agudo do miocárdio em unidade de pronto atendimento. *BrJP* 2019; 2(1): 44-48.
17. Tuan TS, Venâncio TS, Nascimento LFC. Efeitos da exposição a poluentes atmosféricos no infarto agudo do miocárdio, de acordo com o gênero. *Arq Bras Cardiol* 2016; 107(3): 216-222.
18. Flores-Vergara R, Olmedo I, Aránguiz P, et al. Communication between cardiomyocytes and fibroblasts during cardiac ischemia/reperfusion and remodeling: Roles of TGF- $\beta$ , CTGF, the renin angiotensin axis, and non-coding RNA molecules. *Front Physiol* 2021;12:716721.
19. Peet C, Ivetic A, Bromage DI, et al. Cardiac monocytes and macrophages after myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2020; 116(6): 1101-1112.
20. Ference BA, Graham I, Tokgozoglu L, et al. Impact of Lipids on Cardiovascular Health: JACC Health Promotion Series. *J Am Coll Cardiol* 2018; 72(10): 1141-1156.
21. Boyette LB, Macedo C, Hadi K, et al. Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. *PLoS One* 2017; 12(4): e0176460.
22. Shahid F, Lip GYH, Shantsila E. Papel dos Monócitos na Insuficiência Cardíaca e Fibrilação Atrial. *J Am Heart Assoc* 2018; 7(3): e007849.

23. Amengual J, Barrett TJ. Monocytes and macrophages in atherogenesis. *Curr Opin Lipidol*. 2019; 30(5): 401-408.
24. Hakimzadeh N, van Lier MG, van Horssen P, et al. Selective subepicardial localization of monocyte subsets in response to progressive coronary artery constriction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2016; 311(1): H239-H250.
25. Liang EC, Rossetti M, Sidwell T, Groyberg V, Sunga G, et al. Differences in Proinflammatory Cytokines and Monocyte Subtypes in Older as Compared With Younger Kidney Transplant Recipients, *Transplantation Direct*: March 2018 - Volume 4 - Issue 3 - p e348.
26. Mangold A, Hofbauer TM, Ondracek AS, Artner T, et al. Neutrophil Extracellular Traps Induce MCP-1 at the Culprit Site in ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *Sci Rep* 2019; 9 (1): 16304.
27. Kologrivova I, Shtatolkina M, Suslova T, et al. Cells of the Immune System in Cardiac Remodeling: Main Players in Resolution of Inflammation and Repair After Myocardial Infarction. *Front Immunol* 2021; 12: 664457.
28. Zhang X, Xing L, Jia X, et al. Comparative Lipid-Lowering/Increasing Efficacy of 7 Statins in Patients with Dyslipidemia, Cardiovascular Diseases, or Diabetes Mellitus: Systematic Review and Network Meta-Analyses of 50 Randomized Controlled Trials. *Cardiovasc Ther* 2020; 2020: 3987065.
29. Furtado RHM, Genestreti PR, Dalção TF, et al. Associação entre Terapia com Estatinas e Menor Incidência de Hiperglicemia em Pacientes Internados com Síndromes Coronarianas Agudas. *Arq Bras Cardiol* 2021; 116(2): 285-294.
30. Patti G, Micieli G, Cimminiello C, et al. The Role of Clopidogrel in 2020: A Reappraisal. *Cardiovasc Ther* 2020; 2020: 8703627.
31. Wang D, Yang XH, Zhang JD, et al. Eficácia comparada do clopidogrel e ticagrelor no tratamento da síndrome coronariana aguda: uma meta-análise. *BMC Cardiovasc Disord* 2018; 18 (1): 217.
32. Volney C, Collins A, Adams S. Ticagrelor versus clopidogrel na gestão do infarto agudo do miocárdio. *J Community Hosp Intern Med Perspect* 2019; 9(4): 314-318.
33. Ogungbenro K, Wagner JB, Abdel-Rahman S, et al. Um modelo farmacocinético populacional para sinvastatina e seus metabólitos em crianças e adolescentes. *Eur J Clin Pharmacol* 2019; 75(9): 1227-1235.
34. Dávila-Fajardo CL, Díaz-Villamarín X, Antúnez-Rodríguez A, et al. Farmacogenética no tratamento de doenças cardiovasculares e seu progresso atual quanto à implementação na rotina clínica. *Genes (Basel)* 2019; 10(4): 261.

35. Shahin MH, Johnson JA. Testes farmacogenéticos de clopidogrel e varfarina: quais as evidências para uso na prática clínica? *Curr Opin Cardiol* 2013; 28(3): 305-314.
36. Gautier EL, Jakubzick C, Randolph GJ. Regulation of the migration and survival of monocyte subsets by chemokine receptors and its relevance to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:1412-8.
37. Gautier EL, Jakubzick C, Randolph GJ. Regulation of the migration and survival of monocyte subsets by chemokine receptors and its relevance to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:1412-8.
38. Thomas G, Tacke R, Hedrick CC, *et al*. Nonclassical patrolling monocyte function in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015;35:1306-16.
39. Berg KE, Ljungcrantz I, Andersson L, *et al*. Elevated CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> monocytes predict cardiovascular events. *Circ Cardiovasc Genet* 2012;5:122–31.
40. Höpfner F, Jacob M, Ulrich C, Russ M, Simm A, Silber RE, *et al*. Subgroups of monocytes predict cardiovascular events in patients with coronary heart disease. The PHAMOS trial (Prospective Halle Monocytes Study). *Hellenic J Cardiol* 2019;60:311-21.
41. Zeynalova S, Bucksch K, Scholz M, *et al*. Monocyte subtype counts are associated with 10-year cardiovascular disease risk as determined by the Framingham Risk Score among subjects of the LIFE-Adult study. *PLoS One* 2021;16:e0247480.
42. Leers MPG, Stockem C, Ackermans, *et al*. Intermediate and nonclassical monocytes show heterogeneity in patients with different types of Acute Coronary Syndrome. *Cytometry A* 2017;91:1059-67.
43. Marsh SA, Park C, Redgrave RE, *et al*. Rapid fall in circulating non-classical monocytes in ST elevation myocardial infarction patients correlates with cardiac injury. *FASEB J* 2021;35:e21604.
44. Zawada AM, Rogacev KS, Rotter B, *et al*. SuperSAGE evidence for CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes as a third monocyte subset. *Blood* 2011;118:e50-61.
45. Lu W, Zang Z, Fu C, Ma G. Intermediate monocytes lead to enhanced myocardial remodelling in STEMI patients with diabetes. *Int Heart J* 2015;56:22-8.
46. Rogacev KS, Cremers B, Zawada AM, *et al*. CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes independently predict cardiovascular events. *J Am Coll Cardiol* 2012;60:1512-20.

47. Rogacev KS, Seiler S, Zawada AM, *et al.* CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes and cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease. *Eur Heart J* 2011;32:84-92.
48. Kleinnijenhuis J, Quintin J, Preijers F, Benn CS, Joosten LA, Jacobs C, *et al.* Long-lasting effects of BCG vaccination on both heterologous Th1/Th17 responses and innate trained immunity. *J Innate Immun* 2014;6:152–8.
49. Bekkering S, Quintin J, Joosten LAB, *et al.* Oxidized low-density lipoprotein induces long-term proinflammatory cytokine production and foam cell formation via epigenetic reprogramming of monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014;34:1731-8.
50. Christ A, Gunther P, Lauterbach MAR, Duewell P, Biswas D, Pelka K, *et al.* Western diet triggers NLRP3-dependent innate immune reprogramming. *Cell* 2018;172:162-75.e114.
51. Mitroulis I, Ruppova K, Wang B, Che LS, Grzybek M, Grinenko T, *et al.* Modulation of myelopoiesis progenitors is an integral component of trained immunity. *Cell* 2018;172:147-61.e112.
52. Netea MG, Joosten LAB, Latz E, *et al.* Trained immunity: a program of innate immune memory in health and disease. *Science* 2016;352:aaf1098.
53. Bekkering S, Stiekema LCA, Moens SB, Verweij SL, Novakovic B, Prange K, *et al.* Treatment with statins does not revert trained immunity in patients with Familial Hypercholesterolemia. *Cell Metabolism* 2019;30:1-2.
54. Bekkering S, van den Munckhof I, Nielen T, *et al.* Innate immune cell activation and epigenetic remodeling in symptomatic and asymptomatic atherosclerosis in humans in vivo. *Atherosclerosis* 2016;254:228-36.
55. Oesterle A, Laufs U, Liao JK. Pleiotropic Effects of Statins on the Cardiovascular System. *Circ Res* 2017;120:229-43.
56. Belhassena I, Nouari W, Messaoud A, *et al.* Aspirin enhances regulatory functional activities of monocytes and downregulates CD16 and CD40 expression in myocardial infarction autoinflammatory disease. *Int Immunopharmacol* 2020;83:106349.

## ANEXO A – Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SANTO  
AMARO - UNISA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Efeito de terapias farmacológicas em subtipos de monócitos após infarto agudo do miocárdio

**Pesquisador:** DANIEL CARNEIRO DE CARVALHO

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 45394121.1.0000.0081

**Instituição Proponente:** OBRAS SOCIAIS E EDUCACIONAIS DE LUZ

**Patrocinador Principal:** FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.704.968

#### **Apresentação do Projeto:**

Não houve alteração.

#### **Objetivo da Pesquisa:**

Não houve alteração

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Não houve alteração

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

No último parecer, ficaram pendentes as seguintes informações no método.

- Há necessidade de explicar no método, de onde serão recrutados estes pacientes. Qual o serviço que eles são acompanhados?

- Haverá médico fazendo a prescrição e acompanhando o tratamento? Caso haja algum problema com a medicação do paciente, quem fará a troca do medicamento ou acompanhará este paciente?

- Quem fará a coleta deste sangue, o pesquisador ou somente fará a análise da amostra?

- Se for utiliza amostras de sangue já coletadas de projeto anterior, explicar no método.

**Endereço:** Rua Profº Enéas de Siqueira Neto, 340

**Bairro:** Jardim das Imbuías

**CEP:** 02.450-000

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)2141-8687

**E-mail:** pesquisaunisa@unisa.br

Continuação do Parecer: 4.704.968

A resposta do pesquisador é de que os pacientes serão recrutados no Hospital São Paulo e serão acompanhados no Departamento de Medicina, Disciplina de Cardiologia (Setor de Lípidos, Aterosclerose e Biologia Vascular) da mesma instituição. Os pacientes serão acompanhados pela equipe médica do Setor de Lípidos da

UNIFESP, sob chefia do Prof. Dr. Francisco Antonio Helfenstein Fonseca. As coletas serão realizadas pela equipe de Enfermagem do Hospital São Paulo. Ao pesquisador caberá, apenas, a análise das amostras. O estudo irá incluir pacientes de ambos os gêneros com idade inferior a 75 anos, com Infarto Agudo do Miocárdio com supradesnivelamento do segmento ST, tratados com trombolíticos nas primeiras seis horas de início dos sintomas.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Pendencia anterior:

- Se os pacientes forem de uma clínica ou hospital, há necessidade de apresentação da carta de coparticipante.

- Metodologia: perguntas esclarecidas e atendidas na Plataforma Brasil.

O pesquisador apresenta a carta de coparticipante devidamente assinada pelos representantes institucionais.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovado.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1723220.pdf	20/04/2021 11:47:34		Aceito
Outros	Coparticipante.docx	16/04/2021 09:49:29	DANIEL CARNEIRO DE CARVALHO	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRostoDaniel.pdf	08/04/2021 19:08:44	DANIEL CARNEIRO DE CARVALHO	Aceito

**Endereço:** Rua Profº Enéas de Siqueira Neto, 340

**Bairro:** Jardim das Imbuías

**CEP:** 02.450-000

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)2141-8687

**E-mail:** pesquisaunisa@unisa.br

Continuação do Parecer: 4.704.968

Outros	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_ CEP_2275621.pdf	29/03/2021 06:40:56	DANIEL CARNEIRO DE CARVALHO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	AuxilioRegularFAPESPCEPUNISA.docx	29/03/2021 06:40:26	DANIEL CARNEIRO DE CARVALHO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEFAPESP2017UNISA.doc	29/03/2021 06:40:08	DANIEL CARNEIRO DE CARVALHO	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 11 de Maio de 2021

---

**Assinado por:**  
**Ana Paula Ribeiro**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Rua Profº Enéas de Siqueira Neto, 340

**Bairro:** Jardim das Imbuías

**CEP:** 02.450-000

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)2141-8687

**E-mail:** pesquisaunisa@unisa.br

## ANEXO B – Submissão do Artigo para a Revista Biosciences Reports.

BSR-2021-2338 **Bioscience Reports** submission received Caixa de entrada x  

 **editorial@portlandpress.com** qui., 7 de out. 11:41   

para mim, dcarneirocarvalho, fahfonseca, mcoizar, daniborgesgrrmano, izabela.Tuleta, amaraljb, mtshio, albach, Imneves ▾

 inglês ▾ > português ▾ [Traduzir mensagem](#) [Desativar para: inglês x](#)

Dear Dr França,

Thank you for submitting your manuscript entitled "Role of pharmacological therapies on monocyte subpopulations after Acute Myocardial Infarction" by Daniel de Carvalho, Francisco Fonseca, Maria Cristina Izar, Danielle Germano, Izabela Tuleta, Jônatas do Amaral, Marina Shio, André Luis Bachi, Lucas Neves, and Carolina França to **Bioscience Reports**.

The manuscript has been assigned the paper number BSR-2021-2338.

You may check on the status of this manuscript at any time by selecting the "Check Manuscript Status" link under the following URL:

<https://bioscirep.msubmit.net/cgi-bin/main.plex?el=A3KH2RAw3A5lsk2F5A9ftdB75MiHlesOsCn7X0EJAQDwZ>