



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

Leandro Santos da Silva

**Modulação da expressão de receptores de quimiocinas no
Infarto Agudo do Miocárdio por terapias farmacológicas**

São Paulo

2021

Leandro Santos da Silva

**Modulação da expressão de receptores de quimiocinas no
Infarto Agudo do Miocárdio por terapias farmacológicas**

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. Luiz Henrique da Silva Nali

São Paulo

2021

S581m Silva, Leandro Santos da

Modulação da expressão de receptores de quimiocinas no infarto agudo do miocárdio por terapias farmacológicas / Leandro Santos da Silva. – São Paulo, 2021.

52 f.

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

Orientador(a): Prof^a. Dra. Carolina Nunes França

1. Receptores de quimiocinas. 2. Infarto agudo do miocárdio. 3. Terapias farmacológicas. 4. Inflamação I. França, Carolina Nunes II. Universidade Santo Amaro. III. Título.

Um espírito nobre engrandece o menor dos homens

Os Simpsons

DEDICATÓRIA

A professora Carolina Nunes França por todo carinho, incentivo e requerimentos para a finalização dessa tese.

Ao meu esposo, companheiro e melhor amigo, Jeferson Souza da Cruz, pela confiança e força nesta empreitada. Seu apoio, incentivo foi fundamental para a finalização deste trabalho.

Aos meus irmãos Vitor Ramon, Maria Clara e Eduarda.

Ao amor e a esperança de dias melhores, que nos movem em busca dos nossos sonhos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Santo Amaro (UNISA), pela oportunidade e por todo aprendizado desses dois últimos anos.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Carolina Nunes França. Sua competência e trajetória. Muito obrigada por seu carinho e atenção. Muito obrigada por confiar em mim.

Ao professor Luiz Nali, pelo seu apoio e compartilhamento de todo o conhecimento.

À minha família por serem incríveis e me acolherem em todos os momentos da minha vida.

Aos pacientes, por aceitarem e me auxiliarem nesta empreitada.

Aos meus colegas deste mestrado acadêmico, pela convivência, aprendizado e compartilhar o conhecimento.

RESUMO

Modulação dos receptores de quimiocinas no Infarto Agudo do Miocárdio por terapias farmacológicas.

Da Silva, LS. Modulação da expressão de receptores de quimiocinas no Infarto Agudo do Miocárdio por terapias farmacológicas (dissertação). São Paulo: Universidade Santo Amaro; 2021.

Introdução: As doenças cardiovasculares são as principais causas de morte no mundo, e o principal desfecho é o Infarto Agudo do Miocárdio (IAM), que ocorre devido à formação de placa de ateroma nas paredes das artérias. Nesse contexto, ocorre adesão e migração de monócitos e linfócitos T para a região subendotelial, processo regulado por quimiocinas e seus receptores, como CCR2, CCR5 e CX3CR1.

Objetivos: O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão dos receptores CCR2, CCR5 e CX3CR1 em nível de RNA ao longo de 180 dias após IAM e por quatro diferentes estratégias combinadas hipolipemiantes e antiplaquetárias. **Métodos:** Incluímos participantes em um 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 receptores de quimiocinas CCR2, CCR5 e CX3CR1 foram analisados por PCR em tempo real, na linha de base (V1), após um mês e seis meses de tratamento (V2 e V3, respectivamente).

Resultados: Após as comparações entre as três visitas, independentemente do braço de tratamento, houve aumento da expressão do CCR2 e menor expressão do CCR5 após seis meses de tratamento ($p < 0,0001$ para ambos os casos), sem diferenças para CX3CR1. Após comparações entre os quatro braços, houve maior expressão de CCR2 no grupo Sinvastatina + Ezetimiba + Clopidogrel ($p = 0,007$), sem diferenças para CCR5 e CX3CR1 ($p = 0,90$ e $p = 0,45$, respectivamente).

Conclusão: Esses resultados apontam para o papel do CCR2 e do CCR5 como biomarcadores úteis do processo inflamatório relacionado ao IAM.

Palavras-chave: receptores de quimiocinas; infarto agudo do miocárdio; terapias farmacológicas; inflamação.

ABSTRACT

Da Silva, LS. Modulation of the expression of chemokine receptors in Acute Myocardial Infarction by pharmacological therapies (dissertation). São Paulo: Universidade Santo Amaro; 2021.

Introduction: Cardiovascular diseases are the main causes of death worldwide, and the main outcome is Acute Myocardial Infarction (AMI), which occurs due to the formation of atheromatous plaque on the walls of the arteries. In this context, there is adhesion and migration of monocytes and T lymphocytes to the subendothelial region, a process regulated by chemokines and their receptors, as CCR2, CCR5 and CX3CR1.

Objectives: The aim of this study was to evaluate the expression of the receptors CCR2, CCR5 and CX3CR1 at RNA level over 180 days after AMI and also by four different lipid-lowering and antiplatelet combined strategies.

Methods: We included participants 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. The chemokine receptors CCR2, CCR5 and CX3CR1 were analyzed by real time PCR, in the baseline (V1), after one month and six months of treatment (V2 and V3, respectively).

Results: After comparisons between the three visits, regardless of the treatment arm, there was an increase in CCR2 expression and lower expression in CCR5 after six months of treatment ($p < 0.0001$ for both cases), without differences for CX3CR1. After comparisons between the four arms, there was higher expression of CCR2 in the Simvastatin + Ezetimibe + Clopidogrel group ($p = 0.007$), without differences for CCR5 and CX3CR1 ($p = 0.90$ and $p = 0.45$, respectively).

Conclusion: These results pointing to the role of CCR2 and CCR5 as useful biomarkers of inflammatory process related to the AMI.

Keywords: chemokine receptors; acute myocardial infarction; pharmacological therapies; inflammation.

LISTA DE ABREVIATURAS

IAM - Infarto Agudo do Miocárdio

OMS – Organização Mundial da Saúde

LDL – Lipoproteína de Baixa densidade

VLDL – Lipoproteína de Densidade Muito Baixa

HDL – Lipoproteína de Alta densidade

MCP 1 – Monocyte Chemotatic Protein – 1

RANTES – regulated on Activation, Normal T Cell Expressed na Secreted

APC's – Células Apresentadoras de Antígenos

PROBE – Prospective Randomized Open Label Trial With Blinded Endpoints

GCP/ICH – Normas Internacionais de Boas Práticas Clínicas Harmonização de
Dados

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra - Acético

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características gerais da amostra estudada	133
Tabela 2. Perfil bioquímico nas primeiras 24 horas de hospitalização	144
Tabela 3. Perfil lipídico ao longo do estudo	15
Tabela 4. Quantificação relativa dos receptores de quimiocinas CCR2, CCR5 e CX3CR1, independente dos braços de tratamento	16
Tabela 5. Quantificação relativa dos receptores CCR2, CCR5 e CX3CR1 de acordo com os braços de tratamentos	17

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** . Expressão dos receptores de quimiocinas CCR2, CCR5 e CX3CR1 após 30 e 180 dias de tratamento (V2 e V3, respectivamente) em relação à visita inicial (V1). Após comparações entre V2 e V3, não foram encontradas diferenças na expressão do CCR2 e do CX3CR1 ($p=0,88$ e $p=0,99$), porém houve redução na expressão de CCR5 ($*p<0,0001$) após 180 dias de tratamento. Teste de Mann-Whitney..... 18
- Figura 2.** Expressão do receptor de quimocina CCR2 durante o tratamento, considerando os quatro braços de tratamento separadamente. T1: rosuvastatina + ticagrelor; T2: rosuvastatina + clopidogrel; T3: sinvastatina + ezetimiba + ticagrelor; T4: sinvastatina + ezetimiba + clopidogrel. Houve maior expressão no braço sinvastatina + ezetimiba + clopidogrel ($p = 0,007$, Teste de Kruskal-Wallis)..... 20
- Figura 2.** Expressão do receptor de quimocina CCR2 durante o tratamento, considerando os quatro braços de tratamento separadamente. T1: rosuvastatina + ticagrelor; T2: rosuvastatina + clopidogrel; T3: sinvastatina + ezetimiba + ticagrelor; T4: sinvastatina + ezetimiba + clopidogrel. Houve maior expressão no braço sinvastatina + ezetimiba + clopidogrel ($p = 0,007$, Teste de Kruskal-Wallis)..... 20
- Figura 3.** Expressão do receptor de quimocina CCR5 durante o tratamento, considerando os quatro braços de tratamento separadamente. T1: rosuvastatina + ticagrelor; T2: rosuvastatina + clopidogrel; T3: sinvastatina + ezetimiba + ticagrelor; T4: sinvastatina + ezetimiba + clopidogrel. Não houve diferenças entre os grupos ($p = 0,90$, teste de Kruskal-Wallis)..... 21
- Figura 3.** Expressão do receptor de quimocina CCR5 durante o tratamento, considerando os quatro braços de tratamento separadamente. T1: rosuvastatina + ticagrelor; T2: rosuvastatina + clopidogrel; T3: sinvastatina + ezetimiba + ticagrelor; T4: sinvastatina + ezetimiba + clopidogrel. Não houve diferenças entre os grupos ($p = 0,90$, teste de Kruskal-Wallis)..... 21
- Figura 4.** Expressão do receptor de quimocina CX3CR1 durante o tratamento, considerando os quatro braços de tratamento separadamente. T1: rosuvastatina + ticagrelor; T2: rosuvastatina + clopidogrel; T3: sinvastatina + ezetimiba + ticagrelor; T4: sinvastatina + ezetimiba + clopidogrel. Não houve diferença significativa ($p = 0,45$, teste de Kruskal-Wallis)..... 22

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Infarto Agudo do Miocárdio: Aspectos Gerais	1
1.2. Tratamento Farmacológico do Infarto Agudo do Miocárdio	2
1.3. Receptores de quimiocinas de monócitos	4
2. JUSTIFICATIVA	8
3. OBJETIVOS	9
4. MÉTODOS	10
4.1. Desenho do estudo e Critérios de inclusão e exclusão	10
4.2. Obtenção de células mononucleares do sangue periférico	11
4.3. Isolamento do RNA e Transcrição Reversa	11
4.4. PCR em tempo real	12
4.5. Análise estatística	12
4.6. Aspectos éticos	12
5. RESULTADOS	13
<i>Parâmetros de função renal, diabetes e lesão miocárdica</i>	13
5.1. Perfil Lipídico	14
5.2. Análises de Expressão Gênica	16
5.3. Comparações entre visitas	17
<i>Comparações entre braços de tratamento – CCR2, CCR5 e CX3CR1</i>	19
REFERÊNCIAS	27

1.INTRODUÇÃO

1.1. Infarto Agudo do Miocárdio: Aspectos Gerais

As doenças cardiovasculares são as principais causas de morte no mundo atualmente, no ano de 2016 desfechos como o Infarto Agudo do Miocárdio (IAM) acometeram aproximadamente 10 milhões de mortes pelo mundo.^{1,2}

De acordo com a OMS (Organização Mundial da Saúde), estima-se que dentre as doenças não comunicáveis como a doença cardiovascular, 17,3 milhões de pessoas morreram em 2008, representando 30% das mortes globais, com projeção de aumento para 23,6 milhões até 2030.³

Como doenças cardiovasculares temos a aterosclerose, doença arterial coronária, doença vascular cerebral e doença vascular periférica, associadas a infecções, inflamações e doenças imunes, e seus fatores de risco, tanto os modificáveis como tabagismo, dislipidemia, hipertensão, sedentarismo, obesidade, diabetes e estresse quanto os não modificáveis como idade, sexo e histórico familiar.^{1,3}

As inflamações crônicas na aterosclerose induzem os fatores de agregação plaquetária. Ocorre aumento na circulação de lipídeos, quimiocinas são atraídas para as paredes das artérias, causando uma disfunção vascular. Por meio da ativação da proteína G, as quimiocinas induzem a quimiotaxia, acopladas nos receptores específicos GPCR's, onde as quimiocinas são responsáveis pelos sinais pré e pró-inflamatórios que possuem papel importante na seleção, recrutamento de monócitos, neutrófilos e linfócitos.⁴

Na aterosclerose, ocorre adesão e migração de monócitos e linfócitos T para a região subendotelial, os macrófagos fagocitam substâncias pró-inflamatórias, como o colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL-C), originando as células espumosas. Com o processo inflamatório crônico forma-se a placa de ateroma, onde ocorre a produção de citocinas inflamatórias e metaloproteinases que destroem o colágeno, ocorrendo trombos por meio dos fatores de coagulação, podendo levar a um IAM.⁵

O IAM ocorre devido à formação da placa de ateroma nas paredes das artérias, que reduzem a passagem sanguínea nas artérias coronárias, causando hipoxia no músculo cardíaco. Os sintomas do IAM incluem dor no peito, dor que se

estende do braço esquerdo até o pescoço (Sinal de Lavigne), dificuldade de respirar, sudorese, arritmias, fraqueza, náusea, vômitos, ansiedade, fadiga, depressão, dentre outros.⁶⁻⁸

As quimiocinas e seus receptores atuam coordenando o processo inflamatório, entre os componentes do sangue e os da parede arterial, regulam o influxo, captura e fluxo de leucócitos, tal como sua proliferação e apoptose das células da placa de ateroma.⁹

Em 1882, Mechinivok identificou os macrófagos como primeiro sistema de defesa em caso de dano físico ou celular, resposta a uma inflamação, infecção, onde monócitos são mobilizados, infiltram nos tecidos e se diferenciam em macrófagos. No IAM secretam proteínas anti-inflamatórias, onde realizam fagocitose de células mortas e interação com outras células para o reparo do tecido.⁵

A resposta imune inata atua como um importante regulador na inflamação, proliferação e maturação de monócitos e macrófagos, que no IAM se expandem e proliferam rapidamente, no início há uma infiltração de população pró inflamatória, depositando na lesão, após duas semanas ocorre uma redução e remodelação de macrófagos e monócitos que retornam ao nível basal.⁵

Sendo polarizados em M1 e M2, os macrófagos M1 são pró inflamatórios fagocitados, atuando na limpeza celular, já os M2 migram para o local da inflamação, atuando no processo de remodelação cardíaca. Nos tecidos em que residem, os macrófagos possuem funções específicas, no tecido cardíaco contribuem para a regulação, termogêneses, influenciam o balanço eletrolítico e atuam na reciclagem do ferro. A população de macrófagos que atua nas doenças coronárias, isquêmicas cardiovasculares e no miocárdio exercem função de modeladores e reparadores do tecido após o IAM.⁵

1.2. Tratamento Farmacológico do Infarto Agudo do Miocárdio

O tratamento farmacológico após o IAM inclui os medicamentos: morfina/meperidina para dor, anti-hipertensivos, betabloqueadores, inibidores dos canais de cálcio, diuréticos, anticoagulantes, dentre outros.¹⁰⁻¹⁵ As estatinas ou inibidores da HMG-CoA redutase reduzem a morbidade e a mortalidade causadas pelas doenças coronarianas, reduzindo a inflamação vascular, agregação e adesão plaquetária, deposição de trombos e promovem uma modelação nas células do miocárdio.¹¹ As

estatinas são fármacos utilizados para reduzir os níveis sanguíneos da LDL-C (ou LDL oxidado) inibem a síntese endógena do colesterol.¹⁰

Diversas diretrizes são utilizadas mundialmente para estabelecer o uso de estatinas em síndromes coronarianas. BANGLORE S, SLOAN S, QUIN J, et al. 2010, avaliaram pravastatina e Atorvastatina na terapia do trombolismo no IAM, houve acompanhamento durante 24 meses de 4162 pacientes onde a atorvastatina comparada à pravastatina mostrou uma redução de 16% na ocorrência de eventos cardiovasculares, como também redução da proteína C reativa, importante proteína que eleva o processo inflamatório, os benefícios clínicos permaneceram após 30 dias e continuaram sendo avaliados após 2 anos e 5 meses de estudo.¹⁶

As estatinas são fármacos usados no tratamento da hipercolesterolemia. Os medicamentos são utilizados para reduzir os níveis sanguíneos da lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol), inibindo a síntese endógena do colesterol. A rosuvastatina é um potente inibidor competitivo da HMG-CoA redutase (forma ativa), a enzima que limita a velocidade de formação do precursor do colesterol. A sinvastatina, uma lactona inativa (pró- fármaco), é hidrolisada para o seu correspondente b-hidroxiácido. Esse é o principal metabólito e o inibidor enzima (HMG-CoA) redutase, reduz as concentrações do colesterol plasmático total e do colesterol ligado à lipoproteína de baixa densidade (LDL-C) e à lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL). Além disso, a sinvastatina aumenta o colesterol da lipoproteína de alta intensidade (HDL-C) e reduz os triglicérides plasmáticos.¹¹

As estatinas são anti-inflamatórios e cardioprotetores na aterosclerose, atuando na diminuição dos marcadores inflamatórios, como fator de necrose tumoral, interleucina-6 (IL-6), quimiocinas (MPC-1/CCL2), monócitos e outros. No IAM reduzem a migração e infiltração de neutrófilos, monócitos e macrófagos.¹⁷

A Ezetimiba age ao reduzir a absorção do colesterol no intestino delgado, enquanto outros hipolipemiantes como as estatinas e o fenofibrato diminuem o colesterol de formas diferentes. Atua com ação complementar às estatinas, resinas e fibratos. É absorvido e metabolizado no intestino, sofre metabolização no citocromo P-450, não possuindo interações medicamentosas.¹⁸

Os anticoagulantes (Clopidogrel e Ticagrelor) são introduzidos como terapêutica no IAM, onde a cascata de coagulação possui importante papel na evolução da síndrome coronariana devido à formação de trombos, agregação e adesão plaquetária, sendo a terapia com anticoagulantes (anti-vitamina K) oral ou

Intravenosa utilizada em combinação com outros medicamentos no tratamento do IAM.^{13,14}

Os antiplaquetários são agentes diversos, que inibem a formação do trombo induzido predominantemente por plaquetas sem interferir de forma significativa nos demais segmentos da coagulação. Estes fármacos promovem a inibição das funções plaquetárias como adesão e agregação, por meio de diferentes vias, entre estas vias destacam-se a inibição da ciclooxygenase, da tromboxano sintetase, da fosfodiesterase. Também sofrem ação as vias de inibição do ADP e da ligação do fibrinogênio com receptores das glicoproteínas IIb/IIIa, a dos antagonistas dos receptores das glicoproteínas IIb/ IIIa e inibidores de agonistas específicos como a trombina, serotonina, adrenalina.^{13,14}

O Clopidogrel age no sangue reduzindo a chance de formação de trombos (coágulos sanguíneos), o Ticagrelor impede o acúmulo de plaquetas (agregação plaquetária), reduzindo a possibilidade de formação de coágulos que podem bloquear um vaso sanguíneo.^{12,13}

1.3. Receptores de quimiocinas de monócitos

Quimiocinas são pequenas proteínas que possuem receptores específicos, com papel importante na resposta inflamatória e carcinogênese, são uma família de proteínas com pequena massa molecular, compostas por 70-90 aminoácidos, e são atraídas para as diferentes células do corpo por meio dos fatores quimiotáticos. As quimiocinas clássicas são CCL2, CCL7, CCL8, CCL12 e CCL3 que se ligam no receptor CCR2, potente ativador do sinal de indução da transmigração de monócitos.¹⁷

As diferentes quimiocinas diferenciam-se pela disposição da primeira e da segunda cisteína na posição N-terminal (C; CC; CXC, CX3C). As quimiocinas das famílias CC possuem maior atração em leucócitos, monócitos e células NK, a família CX3 atrai granulócitos (neutrófilos). As famílias de quimiocinas possuem ligantes específicos para receptores com estruturas e funções diversas. Em humanos tem-se o conhecimento de identificação de mais ou menos 50 quimiocinas e 40 receptores de quimiocinas.¹⁹

A MCP-1 (*Monocyte Chemotactic Protein 1*), também conhecida por CCL2, é amplamente estudada no contexto da doença cardiovascular, os receptores CCR1,

CCR2 e CCR3, são expressos em linfócitos T. Os monócitos e basófilos expressam os receptores CCR1 e CCR2, já eosinófilos expressam CCR1 e CCR3.^{19,20}

Os monócitos são fundamentais no processo inflamatório de doenças como a aterosclerose e IAM. Recentemente, foram descobertas três subpopulações de monócitos, definidas por meio da expressão dos receptores de superfície CD14 e CD16. Os monócitos clássicos são CD14⁺⁺CD16⁻, expressam o receptor de quimocina CCR2, os não clássicos CD14⁺CD16⁺ não expressam CCR2, mas produzem citocinas pró-inflamatórias, atuam no reparo vascular e remoção de lipídios (*patrolling*) na aterosclerose, são células reparadoras e de remoção. Os intermediários CD14⁺CD16⁺ são expressos no HIV e na doença cardiovascular, expressam CCR2, atuam na remoção de células que sofreram apoptose e na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e mediadores inflamatórios.²¹

A primeira quimocina descoberta foi a MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*) ou CCL2, localizada no 17^o cromossomo, composta por 76 aminoácidos.⁵ No coração possui uma população residente de macrófagos, e receptor na superfície celular CCR2. Os macrófagos CCR2⁺ originam-se na linhagem hematopoiética, entram no coração nas primeiras semanas de vida, mantendo uma combinação de mecanismos para recrutamento e proliferação de monócitos.²²

O CCR2 possui importante papel no recrutamento de macrófagos e monócitos para as paredes dos vasos, atuando no processo de aterosclerose. Os macrófagos CCR2⁻ e o CCR2⁺ possuem funções distintas no coração, sendo que as células que não expressam o receptor estão envolvidas em remodelação de tecidos e desenvolvimento coronário, expressão vascular e reparo do tecido cardíaco, e macrófagos CCR2⁺ estão presentes em corações adultos, ainda não possuem papel definido, mas essas células participam do início da inflamação.^{21,22}

O receptor CCR5 é expresso por leucócitos e monócitos/macrófagos e seu ligante é conhecido por RANTES (*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*) ou CCL5, estando associado à ativação dos linfócitos T, monócitos, células dendríticas células epiteliais na resposta inflamatória, macrófagos, granulócitos, micróglia, mastócitos, neurônios, fibroblastos, músculo esquelético e liso. O receptor CCR5 possui grande afinidade por ligantes agonistas como CCL3, CCL4, CCL5, CCL3L1, CCL8, CCL11, CCL13, CCL14, CCL16 e pelo antagonista CCL7.²³ Estudos *in vivo* e *in vitro* mostram que a deficiência em CCL5 ou CCR5 reduz significativamente a formação da aterosclerose, e há estudos que mostram que o bloqueio de CCR5 pode ser útil para a redução da placa de ateroma.^{24,25}

A quimocina CCR5 foi identificada como correceptor para entrada do vírus HIV nas células, representando 95% de novos casos de infectados por HIV no mundo.²⁴ Como variante do CCR5 encontra-se o Δ 32 – CCR5, essa alteração oferece uma condição de proteção contra o HIV. Esse polimorfismo na expressão do CCR5 confere uma resistência ao vírus do HIV, onde a depleção em terapia de células foi evidenciada em pacientes como o de Berlim e o de Londres.²⁶

O CCR5 é responsável pela migração de monócitos, células NK e células T para o sítio da inflamação, tanto na aterosclerose quanto na sua principal complicação, o IAM. O polimorfismo CCR5 delta 32 regula o processo inflamatório, obtendo assim uma significativa redução na doença cardiovascular, promovendo uma resistência e longevidade em algumas populações no mundo.²⁶

Na expressão de quimiocinas, promove a adesão, recrutamento de neutrófilos e infiltração dos leucócitos no tecido cardíaco no IAM. O bloqueio de CCR5 pode diminuir o IAM e modelar a resposta inflamatória, estudos feitos com ratos evidenciaram que esse bloqueio pode ser utilizado como uma modalidade terapêutica, o bloqueio reduziu a resposta inflamatória cardíaca e proteção cardíaca via inibição do CCR5.²⁴⁻²⁶

O CCR5 expresso por macrófagos regula a resposta inflamatória, sua deleção no IAM, observado em ratos, redução na ativação de macrófagos, decréscimo de fragmentos de colágeno e remodelação diminuída.²⁴

Os polimorfismos CCR5 Δ 32, CCR5 -59029- A-G e CX3CR1 V2491/T280M estão relacionados ao risco cardiovascular, sendo que o CCR5 Δ 32 está associado a menor risco de IAM, o CCR5 -59029- A-G relaciona-se ao agravamento de doenças coronarianas e IAM, já o CX3CR1 V2491/T280M está associado à diminuição na progressão da aterosclerose atuando na proteção contra o IAM e em doenças vasculares.²⁶

O CX3CR1 é um receptor expresso em monócitos, células NK, células T e musculatura esquelética lisa, onde atua como mediador de migração, adesão e proliferação.²⁷ O CX3CR1 é uma quimocina que se liga ao receptor CX3XL e possui função de redução na neuro inflamação e altos níveis de CX3CL1 indicam progressão de doenças como aterosclerose, asma, rinite e artrite reumatoide (doenças crônicas inflamatórias).²⁸

Em células T, o CXCR1 atua como componente de memória no processo inflamatório em infecções específicas, onde as células T CD8+ possuem papel crucial na resposta imune e memória nas inflamações e recrutamento celular. São

atuantes na resposta das células apresentadoras de antígenos (APC's), no endotélio vascular ou no linfodo.²⁹

O CX3CR1 possui dois diferentes polimorfismos, possui substituição isoleucina por valina na posição 249 (CX3CR1V249I) e metionina por treonina na posição (CX3CR1-T280M) essa associação no alelo 280M reduz os riscos de doença arterial coronariana em heterozigotos, exibindo a habilidade de reduzir a morbidade e mortalidade nas doenças cardiovasculares.³⁰

O CX3CR1 é uma quimocina pró inflamatória, induz por quimiotaxia a circulação de monócitos, recrutamento e seleção de linfócitos Th1 expresso por células T, observados na lesão da aterosclerose, atuam na aterogênese e progressão da placa de ateroma, o polimorfismo em CX3CR1 (V249I e T280M) reduz a capacidade de desenvolvimento da aterosclerose e da placa.³¹

Na aterosclerose, estenose arterial, diabetes Mellitus tipo 2, síndrome metabólica, doença coronária, IAM e angina, o CX3CL1/ CX3CR1 possui grande potencial clínico para ser utilizado como marcador prognóstico, diagnóstico e terapêutico, os altos níveis séricos de CXCL1 são potenciais biomarcadores de diagnóstico e prognóstico, sendo um biomarcador ideal que oferece informações de pacientes com doença cardiovascular e/ou prognóstico para pacientes no início da doença Cardiovascular e/ou preventivo na intervenção terapêutica.³¹

2. JUSTIFICATIVA

Há poucos estudos avaliando a relação entre os receptores de quimiocinas de monócitos e o Infarto Agudo do Miocárdio, principalmente relacionando tratamentos hipolipemiantes. As estatinas podem diferir em seu efeito mais precoce pela magnitude do efeito pleiotrópico. Além disso, agentes antiplaquetários podem retardar a biotransformação das estatinas reduzindo seus efeitos pleiotrópico na fase mais aguda do Infarto Agudo do Miocárdio. Diferenças na expressão de CCR2, CCR5 e CX3CR1 podem contribuir para a facilitação da entrada dos monócitos na íntima vascular e consequentes complicações coronarianas.

3. OBJETIVOS

- Avaliar o nível de expressão dos receptores de quimiocinas CCR2, CCR5 e CX3CR1 ao longo de 180 dias de tratamento farmacológico após IAM;
- Comparar quatro diferentes estratégias farmacológicas com relação à expressão de CCR2, CCR5 e CX3CR1.

4. MÉTODOS

4.1. Desenho do estudo e Critérios de inclusão e exclusão

O estudo incluiu pacientes de ambos os sexos com idade inferior a 75 anos, com Infarto Agudo do Miocárdio com supra desnivelamento do segmento ST, tratados com trombolíticos nas primeiras seis horas de início dos sintomas. Foram excluídos pacientes com comorbidades que podiam 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 (alcoolicismo, dependência de drogas, doenças infecciosas ou reumatológicas crônicas, como AIDS, artrite reumatoide, Lúpus Eritematoso Sistêmico, dentre outros). O estudo foi do tipo PROBE (*Prospective, randomized, open label trial with blinded endpoints*) ou seja, 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 às 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.

4.2. Obtenção de células mononucleares do sangue periférico

Foram colhidos aproximadamente 5 mL de sangue periférico dos pacientes em tubo com EDTA (para evitar coagulação), sendo acrescido Ficoll-Hypaque (Ficoll Paque Plus, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) e centrifugado a 800 g, 22° C por 20 minutos, havendo separação de células mononucleares por gradiente de concentração. Posteriormente, as células obtidas foram lavadas em PBS. A variabilidade celular e contagem das células foram realizadas em Câmara de Neubauer (Hemocitômetro), após coloração de 10uL 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 foi adicionado 1 mL de solução para congelamento (DMSO+ soro fetal bovino) e as amostras foram mantidas em nitrogênio líquido.

4.3. Isolamento do RNA e Transcrição Reversa

Para extração do RNA, foi utilizado o kit *PureLink RNA Mini Kit* (ThermoFisher), seguindo normas do fabricante. O kit extrai o RNA pelo método de colunas de sílica, cuja purificação do RNA consiste em ligação iônica entre os ácidos nucleicos e a sílica seguida de lavagens e posterior eluição. Todas as etapas foram realizadas seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida as amostras foram tratadas com DNase (Turbo DNA-free kit, ThermoFisher), para a remoção do DNA genômico contaminante nas amostras.

A concentração e qualidade do RNA presente em cada amostra foi obtida com o aparelho Nanodrop 2000 (Applied Biosystems).

Para a obtenção do cDNA (transcrição reversa), foi utilizado o kit *Superscript II Reverse Transcriptase* (ThermoFisher).

4.4. PCR em tempo real

Os experimentos foram realizados em duplicatas, contendo cada amostra 2X *TaqMan Gene Expression Master Mix* (Thermofisher) - 10 µL, água livre de DNase e RNase, 1 µL de cDNA e 1 µL de 20X *TaqMan Gene Expression Assay* em um total de 20 µl por reação.

As reações foram avaliadas utilizando o equipamento *StepOnePlus™ Real-Time PCR System*.

Os *primers* para CCR2 foram:

Forward 5'-ATGCTGTCCACATCTCGTTCTCG-3', *reverse* 5'-TTATAAACCGAGCCGAGACTTCCTGC-3'.³²

Os *primers* para CX₃CR1 foram:

forward 5'-CCCTGAATCAGTGACAGAAACT-3'; *reverse* 5'-ACGGAGTAGAATATGGACAGGAA-3'.³³

Os *primers* para CCR5 foram:

forward 5'-CACCTGCAGCTCTCATTTTCC-3'; *reverse* 5'-TTGTAGGGAGCCCAGAAGAG-3'.³⁴

As condições de ciclagem para todos os ensaios foi de 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

4.5. 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 $p < 0,05$.

4.6. Aspectos éticos

O estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Santo Amaro – UNISA, parecer nº 4.650.405.

5. RESULTADOS

Foram incluídos 109 pacientes, sendo 78 homens (72%) e 31 mulheres (28%). 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 (%)	78 (72)
Peso, média (EPM), Kg	74,73 (1,44)
Altura, média (EPM), m	1,66 (0,01)
Índice de massa corpórea, média (EPM), kg/m ²	27,18 (0,47)
Pressão arterial sistólica, média (EPM), mmHg	127 (2)
Pressão arterial diastólica, média (EPM), mmHg	77 (2)
Diabetes*, n (%)	30 (28)
Hipertensão, n (%)	25 (23)
Tabagismo, n (%)	42 (39)

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%.

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	6,4 (0,1)
Glicose	139 (6)
Troponina	7923 (1057)
Creatinina	0,93 (0,02)
TFG	85 (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).

5.1. Perfil Lipídico

O perfil lipídico dos pacientes ao longo do estudo está representado na Tabela 3. Após comparações entre as visitas inicial, 30 dias e 180 dias, foram encontradas reduções no colesterol total, LDL-C e não-HDL e aumento do HDL-C, sem diferenças significantes para triglicérides ($p < 0,0001$; $p < 0,0001$; $p = 0,001$; $p < 0,0001$ e $p = 0,22$, 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	203 (5)	126 (3)	127 (3)	inferior a 190	<0,0001
LDL-C	133 (4)	65 (3)	64 (2)	inferior a 100	<0,0001
HDL-C	40 (1)	38 (1)	45 (2)	superior a 40	0,001
Não-HDL-C	162 (4)	88 (3)	87 (3)	inferior a 130	<0,0001
Triglicérides	182 (17)	164 (16)	146 (8)	inferior a 150	0,22

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

5.2. Análises de Expressão Gênica

As análises levaram em consideração o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, que calcula o valor de vezes de mudança (*fold-change*) dos níveis de transcritos dos receptores de monócitos, dos pacientes tratados após a visita 2 e 3 (V2 e V3), em comparação à visita (V1). O valor igual a 1 corresponde à não alteração na expressão gênica dos marcadores nas visitas 2 e 3 (V2 e V3) em relação ao controle (V1), já valores maiores que 1 indicam aumento e menores que 1, diminuição na expressão gênica.

Nas Tabelas 4 e 5 estão representadas as médias (erros-padrões das médias – EPM) dos transcritos de CCR2, CCR5 e CX3CR1 obtidos na visita 2 (após 30 dias de tratamento) em relação à visita 1 (inicial, até 24 h do IAM) e visita 3 (após 180 dias de tratamento) em relação à visita 1. A Tabela 4 refere-se aos dados obtidos de todos os participantes do estudo, independente do braço de tratamento. E a Tabela 5 separando por braços de tratamento.

Tabela 4. Quantificação relativa dos receptores de quimiocinas CCR2, CCR5 e CX3CR1, independente dos braços de tratamento

Marcadores	Média ± EPM
CCR2 V2	0,92 ± 0,08
CCR2 V3	0,85 ± 0,07
CCR5 V2	2,28 ± 0,21
CCR5 V3	0,46 ± 0,04
CX3CR1 V2	2,04 ± 0,16
CX3CR1 V3	2,04 ± 0,16

Os dados representam a Média ± EPM da quantificação (método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$) dos transcritos de CCR2, CCR5 e CX3CR1 das visitas 2 e 3 (V2 e V3) em relação à visita 1 (V1).

Tabela 5. Quantificação relativa dos receptores CCR2, CCR5 e CX3CR1 de acordo com os braços de tratamentos

	CCR2 V2	CCR2 V3	CCR5 V2	CCR5 V3	CX3CR1 V2	CX3CR1 V3
T1	0,79 ± 0,14	0,95 ± 0,14	2,45 ± 0,45	0,49 ± 0,09	1,90 ± 0,32	1,90 ± 0,32
T2	0,79 ± 0,13	0,85 ± 0,16	2,28 ± 0,45	0,53 ± 0,09	2,13 ± 0,30	2,13 ± 0,30
T3	0,82 ± 0,18	0,66 ± 0,11	1,77 ± 0,31	0,41 ± 0,07	2,08 ± 0,42	2,08 ± 0,42
T4	1,25 ± 0,18	0,95 ± 0,12	2,54 ± 0,43	0,41 ± 0,08	2,06 ± 0,26	2,06 ± 0,26

Os dados representam a Média ± EPM da quantificação (método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$) dos transcritos de CCR2, CCR5 e CX3CR1 das visitas 2 e 3 (V2 e V3) relativas à visita 1 (V1).

T1: Rosuvastatina + Ticagrelor; T2: Rosuvastatina + Clopidogrel; T3: Sinvastatina + Ezetimiba + Ticagrelor; T4: Sinvastatina + Ezetimiba + Clopidogrel.

5.3. Comparações entre visitas

A Figura 1 representa os dados obtidos para os três receptores de quimiocinas, nas três visitas, independentemente do braço de tratamento. Após as comparações entre as três visitas (teste de Friedman), houve aumento da expressão do CCR2 em V3 em relação a V2 (em comparação com V2 em relação a V1 e V3 em relação a V1), $p < 0,0001$ (Figura 1A). Em relação ao CCR5, houve menor expressão no CCR5 na V3 em relação a V2 (em comparação a V2 em relação a V1 e V3 em relação a V1), $p < 0,0001$. (Figura 1B). Não houve diferença para CX3CR1, $p = 0,45$ (Figura 1C).

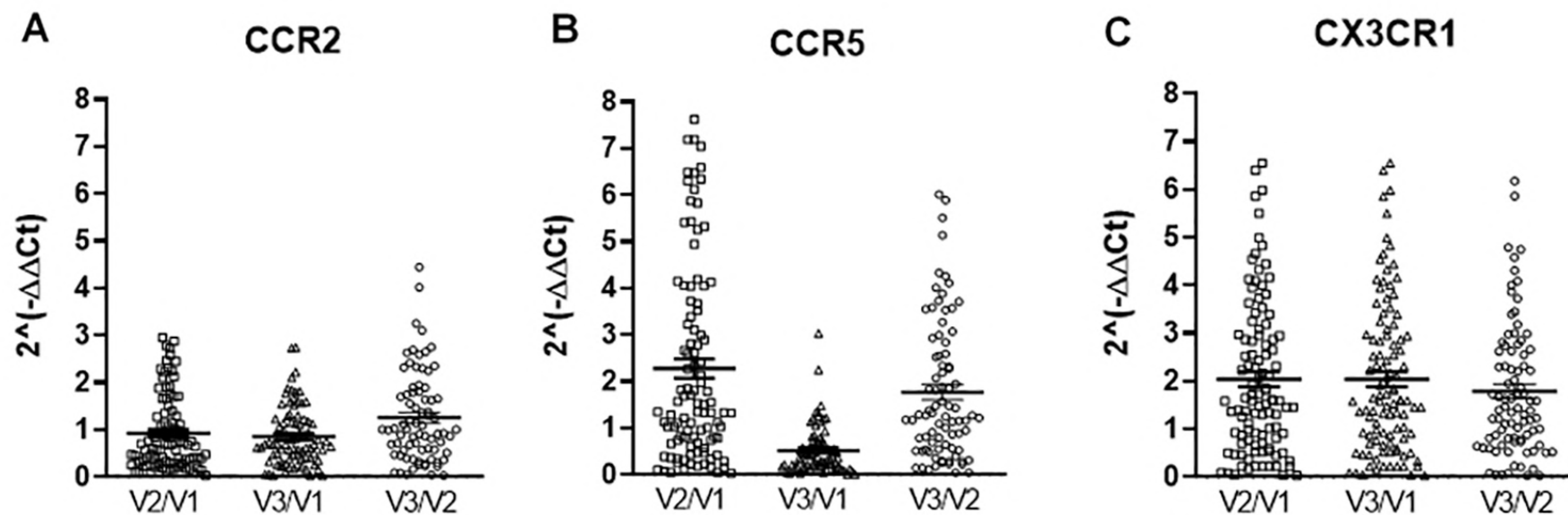


Figura 1. Expressão dos receptores de quimiocinas CCR2, CCR5 e CX3CR1 após 30 e 180 dias de tratamento (V2 e V3, respectivamente) em relação à visita inicial (V1). Após comparações entre V2 e V3, não foram encontradas diferenças na expressão do CCR2 e do CX3CR1 ($p=0,88$ e $p=0,99$), porém houve redução na expressão de CCR5 ($*p<0,0001$) após 180 dias de tratamento. Teste de Mann-Whitney.

Comparações entre braços de tratamento – CCR2, CCR5 e CX3CR1

As Figuras 2-4 mostram os valores obtidos para CCR2, CCR5 e CX3CR1, considerando os quatro braços de tratamento separadamente. Após comparações entre os quatro braços (teste de Kruskal-Wallis), houve maior expressão de CCR2 no grupo Sinvastatina + Ezetimiba + Clopidogrel ($p = 0,007$), sem diferenças para CCR5 e CX3CR1 ($p = 0,90$ e $p = 0,45$, respectivamente), figura 2.

0

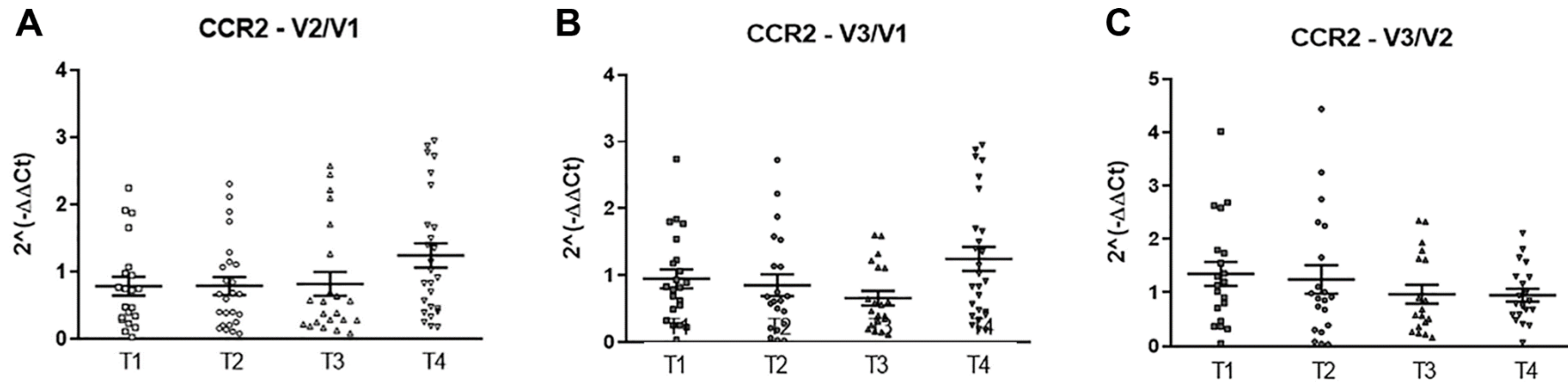


Figura 3. Expressão do receptor de quimocina CCR2 durante o tratamento, considerando os quatro braços de tratamento separadamente. T1: rosuvastatina + ticagrelor; T2: rosuvastatina + clopidogrel; T3: sinvastatina + ezetimiba + ticagrelor; T4: sinvastatina + ezetimiba + clopidogrel. Houve maior expressão no braço sinvastatina + ezetimiba + clopidogrel ($p = 0,007$, Teste de Kruskal-Wallis).

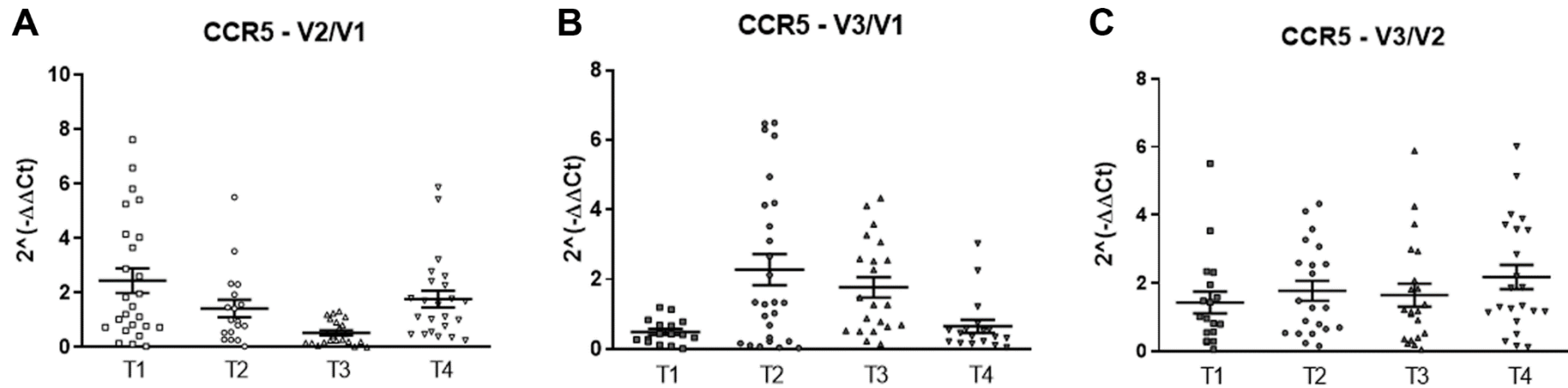


Figura 5. Expressão do receptor de quimocina CCR5 durante o tratamento, considerando os quatro braços de tratamento separadamente. T1: rosuvastatina + ticagrelor; T2: rosuvastatina + clopidogrel; T3: sinvastatina + ezetimiba + ticagrelor; T4: sinvastatina + ezetimiba + clopidogrel. Não houve diferenças entre os grupos ($p = 0,90$, teste de Kruskal-Wallis)

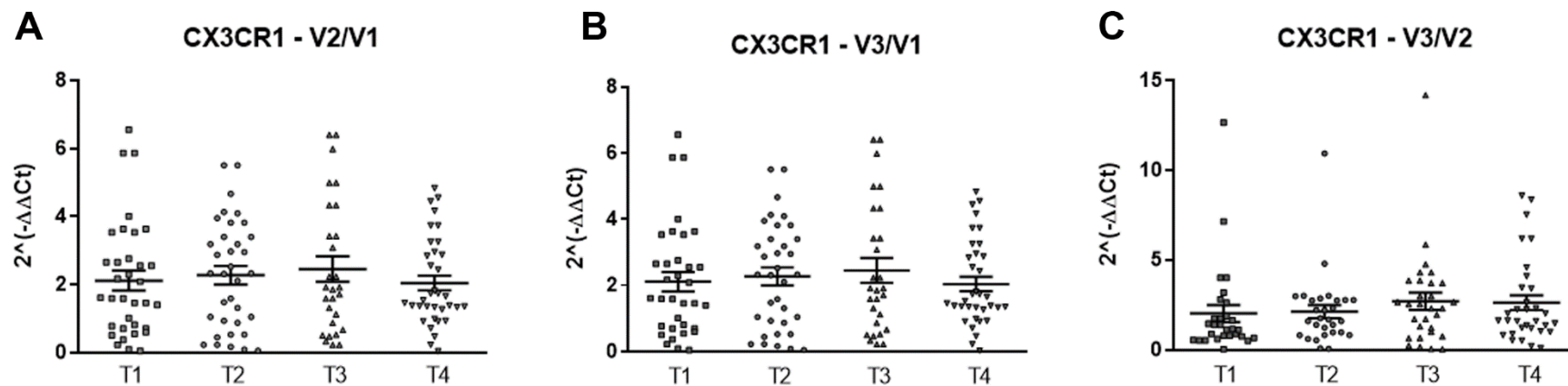


Figura 7. Expressão do receptor de quimocina CX3CR1 durante o tratamento, considerando os quatro braços de tratamento separadamente. T1: rosuvastatina + ticagrelor; T2: rosuvastatina + clopidogrel; T3: sinvastatina + ezetimiba + ticagrelor; T4: sinvastatina + ezetimiba + clopidogrel. Não houve diferença significativa ($p = 0,45$, teste de Kruskal-Wallis).

6. DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi analisar a influência do tratamento hipolipemiantes e antiplaquetário por seis meses na expressão dos receptores de quimiocinas de monócitos CCR2, CCR5 e CX3CR1, em pacientes após IAM. Até onde sabemos, os efeitos crônicos desses medicamentos relacionados a esses receptores de quimiocinas, após o infarto do miocárdio, não foram avaliados em humanos.

Nossos principais achados mostraram aumento na expressão de CCR2 após seis meses de tratamento, independentemente do braço de tratamento, além da maior expressão no grupo sinvastatina + ezetimiba + clopidogrel. Essa diferença entre os quatro braços era esperada, uma vez que a sinvastatina por seu efeito pleiotrópico é um antiinflamatório menos potente do que a rosuvastatina. Além disso, tanto o clopidogrel quanto a sinvastatina apresentam metabolismo pelo citocromo P450 CYP 3A4, diferentemente da rosuvastatina, o que pode explicar uma menor magnitude do efeito antiinflamatório pleiotrópico sob tratamento com sinvastatina.³⁵

Muitos estudos têm mostrado um papel inflamatório relacionado ao CCR2. Tapp et al. (2012)³⁶ analisaram a expressão do CCR2 desde a fase aguda até a recuperação após infarto do miocárdio com elevação do segmento ST (IAMCSST), mostrando maior expressão de CCR2 em monócitos clássicos (considerados células inflamatórias) em pacientes após IAMCSST, em comparação aos indivíduos do grupo controle.

Han et al. (1999)³⁷ trataram culturas de monócitos da linhagem THP-1 com lipoproteína de baixa densidade (LDL) e observaram maior expressão de CCR2, e esses resultados foram posteriormente confirmados in vivo. No mesmo trabalho, um aumento de aproximadamente duas vezes na expressão do CCR2 foi encontrado em monócitos isolados de indivíduos com hipercolesterolemia, em comparação com pacientes normais, e uma correlação significativa entre a expressão do CCR2 e a concentração plasmática de LDL foi encontrada.

Em relação ao tratamento hipolipemiante e antiplaquetário relacionado ao CCR2, Yang et al. (2015)³⁸ avaliaram o efeito de uma dose única de terapia

intensiva (80 mg) com atorvastatina, em comparação a um grupo com dose de 20 mg, no recrutamento de monócitos em pacientes com angina instável. Todos os pacientes também receberam terapia com os antiplaquetários aspirinas + clopidogrel (doses de 300 mg para os dois medicamentos). Os autores encontraram uma redução na expressão de CCR2 no grupo de atorvastatina 80 mg em comparação com o grupo de 20 mg após 24 horas. No presente estudo, por outro lado, encontramos níveis mais elevados de CCR2 após o tratamento, o que pode sugerir um risco inflamatório residual apresentado pelos participantes do estudo, mesmo sob tratamento hipolipemiante e antiplaquetário efetivo. Esse risco inflamatório pode ser explicado pelo conceito de imunidade treinada, que se refere à persistência do fenótipo inflamatório após meses de tratamento com hipolipemiantes, como as estatinas, devido à reprogramação epigenética das modificações das histonas.³⁹

Também encontramos menor expressão de CCR5 após seis meses de tratamento, independentemente do braço de tratamento. Baragetti et al (2017)⁴⁰ avaliaram células T CD4 + CCR5 + em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) em comparação com controles e encontraram níveis mais elevados de células T CD4 + CCR5 + em pacientes com LES que desenvolveram aterosclerose carotídea em comparação com aqueles que não apresentavam carótida aterosclerose e aos controles, sugerindo que essas células podem ser úteis para prever a progressão da doença vascular.

Czepluch et al. (2014)⁴¹ investigaram a expressão do CCR5 em monócitos circulantes em pacientes com doença arterial coronariana (DAC). Houve menor número de monócitos CCR5 + circulantes em pacientes com DAC, provavelmente devido ao maior recrutamento dessas células para a placa aterosclerótica.

Dinh et al. (2015)⁴² avaliaram o impacto do polimorfismo CCR5-Δ32, que torna o CCR5 não funcional, nas doenças cardiovasculares. Os autores não encontraram associação entre CCR5eΔ32 e quantificação de monócitos, bem como os níveis de Proteína C Reativa (PCR), mas houve aumento do risco de cardiopatia isquêmica relacionado ao polimorfismo CCR5-Δ32, destacando a importância do CCR5 como marcador de risco cardiovascular.

A expressão de CCR5 em monócitos clássicos (inflamatórios) é baixa quando comparada à expressão por outros subtipos de monócitos. A redução da expressão do CCR5 no estudo atual, aliada ao aumento do CCR2, pode reforçar a ideia de uma persistência do estado inflamatório após o IAM por meses, conhecida como imunidade treinada.⁴³⁻⁴⁷

No presente estudo, não encontramos diferenças para CX3CR1 após seis meses de tratamento. Shao et al (2020)⁴⁸ avaliaram a expressão de CX3CR1 na superfície de macrófagos tipo M2 (células relacionadas à cicatrização e remodelação cardíaca após infarto do miocárdio). Os autores mostraram um aumento nos macrófagos CX3CR1 + CD163 + M2, sugerindo um papel potencial no diagnóstico precoce do IAM.

Zhang et al. (2015)⁴⁹ avaliaram possíveis variações genéticas em CX3CL1 / CX3CR1 e seu impacto na doença aterosclerótica. Os autores encontraram expressão aumentada de CX3CL1 e CX3CR1 associada à placa aterosclerótica em artérias coronárias humanas. Além disso, variações genéticas em CX3CL1 / CX3CR1 (CX3CL1 rs170364 e CX3CR1 rs17793056) foram associadas ao desenvolvimento de CAD entre indivíduos chineses Han.

Os estudos que mostram a importância do CX3CR1 na fase aguda do infarto do miocárdio vão ao encontro do presente estudo, pois avaliamos apenas o efeito crônico dos receptores de quimiocinas, e não encontramos diferença na expressão do CX3CR1 após seis meses de tratamento.

7. CONCLUSÕES

A maior expressão de CCR2 encontrada após seis meses de tratamento, bem como a redução dos níveis de CCR5, independentemente do braço de tratamento, sugerem uma persistência do fenótipo inflamatório, conhecido como imunidade treinada, mesmo com as terapias hipolipemiantes e antiplaquetárias altamente eficazes.

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. Balakumar P, Maung-U K, Jagadeesh G. Prevalence and prevention of cardiovascular disease and diabetes mellitus. *Pharmacol Res.* 2016;113(Pt A):600-609.
4. Peet C, Ivetic A, Bromage DI, et al. Cardiac monocytes, and macrophages after myocardial infarction. *Cardiovascular Research.* 2020. 116 -1101-1112.
5. Kanter JE, Hsu CC, Bornfeldt KE. Monocytes and Macrophages as Protagonists in Vascular Complications of Diabetes. *Front Cardiovasc Med.* 2020;14; 7:10.
6. 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.
7. Saleh M, Ambrose JA. Understanding myocardial infarction. *F1000Res.* 2018; 7: F1000 Faculty Rev-1378.
8. 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.
9. Deshmane SL, Kremlve S, Amini S, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res.* 2009;29(6):313-326.
10. Cianflone E, Cappetta D, Mancuso T, et al. Statins Stimulate New Myocyte Formation After Myocardial Infarction by Activating Growth and

- Differentiation of the Endogenous Cardiac Stem Cells. *Int J Mol Sci.* 2020;21(21):7927.
11. Furtado RHM, Genestreti PR, Dalçóquio 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.
 12. Patti G, Micieli G, Cimminiello C, et al. The Role of Clopidogrel in 2020: A Reappraisal. *Cardiovasc Ther* 2020; 2020: 8703627.
 13. 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.
 14. 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.
 15. 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.
 16. Bangalore S, Quin J, Sloan S, et al. What is the optimal blood pressure in patients after acute coronary syndromes? Relationship of blood pressure and cardiovascular events in the PRavastatin OR atorVastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis In Myocardial Infarction (PROVE IT-TIMI) 22 trial. *Circulation* 2010; 122:2142-51.
 17. Wang X, Li T, Wang W, et al. Cytokine-like 1 Chemoattracts Monocytes/Macrophages via CCR2. *J Immunol.* 2016;196(10):4090-9.
 18. Araújo RG, Casella Filho A, Chagas AC. Ezetimiba--farmacocinética e terapêutica [Ezetimibe--pharmacokinetics and therapeutics]. *Arq Bras Cardiol.* 2005; Suppl 5:20-4.
 19. Ji JF, He BP, Dheen ST, et al. Expression of chemokine receptors CXCR4, CCR2, CCR5 and CX3CR1 in neural progenitor cells isolated from the subventricular zone of the adult rat brain. *Neurosci Lett.* 2004 ;355(3):236-40.
 20. Siebert H, Sachse A, Kuziel WA, et al. The chemokine receptor CCR2 is involved in macrophage recruitment to the injured peripheral nervous system. *J Neuroimmunol.* 2000 ;110(1-2):177-85.

21. França CN, Izar MCO, Hortêncio MNS, et al. Monocyte subtypes and the CCR2 chemokine receptor in cardiovascular disease. *Clin Sci* 2017; 131:1215-24.
22. Siebert H, Sachse A, Kuziel WA, et al. The chemokine receptor CCR2 is involved in macrophage recruitment to the injured peripheral nervous system. *J Neuroimmunol.* 2000 ;110(1-2):177-85.
23. Lin CS, Hsieh PS, Hwang LL, et al. The CCL5/CCR5 Axis Promotes Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Atherogenic Phenotype Switching. *Cell Physiol Biochem.* 2018, 47(2):707-720.
24. Fantuzzi L, Tagliamonte M, Gauzzi MC, et al. Dual CCR5/CCR2 targeting opportunities for the cure of complex disorders. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(24):4869-4886.
25. Suarez-Carmona M, Chaorentong P, Kather JN, et al. CCR5 status and metastatic progression in colorectal cancer. *Oncoimmunology.* 2019 ;8(9):e1626193.
26. Kallel A, Abdessalem S, Sédiri Y, et al. Polymorphisms in the CC-Chemokine receptor – 2 (CCR2) and 5- (CCR5) genes and risk of myocardial infarction among Tunisian male patients. *Clinical Biochemistry* 45.2012; 420-424.
27. Zhang H, Guo C, Wu D, et al Hydrogen sulfide inhibits the development of atherosclerosis with suppressing CX3CR1 and CX3CL1 expression. *PLoS One.* 2012;7(7):e41147
28. Apostolakis S, Spandidos D. Chemokines, and atherosclerosis: focus on the CX3CL1/CX3CR1 pathway. *Acta Pharmacol Sin.* 2013;34(10):1251-6.
29. Chen P, Zhao W, Guo Y, et al. CX3CL1/CX3CR1 in Alzheimer's Disease: A Target for Neuroprotection. *Biomed Res Int.* 2016; 2016:8090918.
30. Gordon CL, Lee LN, Swadling L, et al. Induction and Maintenance of CX3CR1-Intermediate Peripheral Memory CD8⁺ T Cells by Persistent Viruses and Vaccines. *Cell Rep.* 2018 ;23(3):768-782.
31. Pucci S, Mazzarelli P, Zonetti MJ, et al. CX3CR1 receptor polymorphisms, Th1 cell recruitment, and acute myocardial infarction outcome: looking for a link. *Biomed Res Int.* 2013; 2013:451-349.
32. Van LM, Damoiseaux J, Duijvestijn A, et al. The therapeutic potential of

- targeting B cells and anti-oxLDL antibodies in atherosclerosis. *Autoimmun. Rev.* 2009 (1):53-7.
33. Schepers E, Houthuys E, Dhondt A, et al. Transcriptome analysis in patients with chronic kidney disease on hemodialysis disclosing a key role for CD16⁺CX3CR1⁺ monocytes. *PLoS One.* 2015 1;10(4).
34. Seay K, Qi X, Zheng JH, et al. Mice transgenic for CD4-specific human CD4, CCR5 and cyclin T1 expression: a new model for investigating HIV-1 transmission and treatment efficacy. *PLoS One.* 2013 15;8(5).
35. Oesterle A, Laufs U, Liao JK. Pleiotropic Effects of Statins on the Cardiovascular System. *Circ Res* 2017; 120:229-43.
36. Tapp LD, Shantsila E, Wrigley BJ, et al. The CD14⁺⁺CD16⁺ monocyte subset and monocyte-platelet interactions in patients with ST-elevation myocardial infarction. *J Thromb Haemost.* 2012 ;10(7).
37. Han KH, Han KO, Green SR, et al. Expression of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor CCR2 is increased in hypercholesterolemia. Differential effects of plasma lipoproteins on monocyte function. *J Lipid Res.* 1999 ;40(6).
38. Yang J, Liu C, Zhang L, et al. Intensive Atorvastatin Therapy Attenuates the Inflammatory Responses in Monocytes of Patients with Unstable Angina Undergoing Percutaneous Coronary Intervention via Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Activation. *Inflammation.* 2015;38(4).
39. Mitroulis I, Ruppova K, Wang B, et al. Modulation of myelopoiesis progenitors is an integral component of trained immunity. *Cell* 2018; 172:147-61. e112.
40. Baragetti A, Ramirez G, Magnoni M, et al. Disease Trends Over Time and CD4⁺CCR5⁺ T-Cells Expansion Predict Carotid Atherosclerosis Development in Patients with Systemic Lupus Erythematosus, *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* (2017).
41. Czepluch FS, Kuschicke H, Dellas C, et al. Increased proatherogenic monocyte-platelet cross-talk in monocyte subpopulations of patients with stable coronary artery disease. *J Intern Med.* 2014 ;275(2).
42. Dinh KM, Pedersen OB, Petersen MS, et al. The impact of CCR5- Δ 32 deletion on C-reactive protein levels and cardiovascular disease:

Results from the Danish Blood Donor Study. *Atherosclerosis*. 2015 ;242(1):222-5.

41. Kleinnijenhuis J, Quintin J, Preijers F, 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.
43. 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.
44. Christ A, Gunther P, Lauterbach MAR, et al. Western diet triggers NLRP3-dependent innate immune reprogramming. *Cell* 2018; 172:162-75. e114.
45. Mitroulis I, Ruppova K, Wang B, et al. Modulation of myelopoiesis progenitors is an integral component of trained immunity. *Cell* 2018; 172:147-61. e112.
46. Netea MG, Joosten LAB, Latz E, et al. Trained immunity: a program of innate immune memory in health and disease. *Science* 2016;352: aaf1098.
47. Shao X, Wu B, Chen P, et al. Circulating CX3CR1+CD163+ M2 monocytes markedly elevated and correlated with cardiac markers in patients with acute myocardial infarction. *Ann Transl Med* 2020;8(9):578.
48. Zhang X, Feng X, Cai W, et al. Chemokine CX3CL1 and its receptors CX3CR1 are associated with human atherosclerotic lesion vulnerability. *Thromb Res*. 2015;135(6):1147-53.

ANEXO A – APROVAÇÃO CEP

UNIVERSIDADE DE SANTO
AMARO - UNISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFEITOS DE TERAPIAS FARMACOLÓGICAS SOBRE A EXPRESSÃO DE RECEPTORES DE MONÓCITOS NO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO

Pesquisador: LEANDRO SANTOS DA SILVA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 45395821.5.0000.0081

Instituição Proponente: Universidade de Santo Amaro - UNISA

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.704.956

Apresentação do Projeto:

idem

Objetivo da Pesquisa:

idem

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

idem

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

idem

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

-TCLE: De acordo

-Folha de Rosto: De acordo

-Carta de participante: De acordo

Apresentada resposta à demanda anterior:

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

Endereço: Rua Profº Enéas de Siqueira Neto, 340

Bairro: Jardim das Imbuías

CEP: 02.450-000

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)2141-8687

E-mail: pesquisaunisa@unisa.br

Continuação do Parecer: 4.704.956

pela equipe de Enfermagem do Hospital São Paulo. Ao pesquisador caberá, apenas, a análise das amostras. Os pacientes serão 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 será mantido por seis meses. Os fármacos utilizados no estudo serão doados pela indústria farmacêutica.

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_1722761.pdf	20/04/2021 14:30:54		Aceito
Outros	Coparticipante.docx	16/04/2021 10:05:35	LEANDRO SANTOS DA SILVA	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRostoLeandro.pdf	08/04/2021 19:04:14	LEANDRO SANTOS DA SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEFAPESP2017UNISA.doc	29/03/2021 06:45:47	LEANDRO SANTOS DA SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	AuxilioRegularFAPESPCEPUNISA.docx	29/03/2021 06:45:36	LEANDRO SANTOS DA SILVA	Aceito
Outros	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_2275621.pdf	29/03/2021 06:45:23	LEANDRO SANTOS DA SILVA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

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

UNIVERSIDADE DE SANTO
AMARO - UNISA



Continuação do Parecer: 4.704.956

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

Página 03 de 03