



Tipo de trabalho: TRABALHO COMPLETO (MÍNIMO 08 PÁGINAS, MÁXIMO 15 PÁGINAS)

O USO DA BIOINFORMÁTICA NA CARACTERIZAÇÃO DE PROCESSOS RELEVANTES NO REPARO TECIDUAL NO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO COM ELEVAÇÃO DO SEGMENTO-ST¹

Melissa Kristochek Da Silva², Marco Antônio De Bastiani³, Lucinara Dadda Dias⁴, Raphael Boesche Guimarães⁵, Marcela Corso Arend⁶, Melissa Medeiros Markoski⁷

¹ Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde do Instituto de Cardiologia/Fundação Universitária de Cardiologia (ICFUC)

² Doutora e Mestre em Ciências da Saúde: Cardiologia (IC/FUC), Pós-Graduada em Farmacologia Geral (UFLA-MG), Farmacêutica e Bioquímica (UFSM)

³ Mestre em Bioquímica (UFRGS), aluno de doutorado em bioquímica (UFRGS), Biomédico (UFRGS)

⁴ Mestre em Ciências da Saúde: Cardiologia (ICFUC), Bióloga (UNISINOS)

⁵ Mestre em Cardiologia (ICFUC), Médico Cardiologista

⁶ Aluna de mestrado do programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular (UNIFESP), Biomédica (UNISINOS)

⁷ Doutora em Biologia Molecular (UFRGS), Pós-Doutora em Diagnóstico Fitossanitário (UFRGS), Sinalização Celular (PUCRS) e Imunologia (UFCSPA), Professora adjunta da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Bióloga (UFRGS)

Introdução: O eixo SDF-1/CXCR4 desempenha importante papel no reparo do miocárdio desencadeando efeitos protetivos que melhoram a função cardíaca após infarto agudo do miocárdio com elevação do segmento-ST (STEMI). **Objetivo:** Identificar genes envolvidos na sinalização SDF-1/CXCR4 com auxílio da bioinformática e analisar níveis de expressão de transcritos (qPCR) relacionados aos mecanismos de reparo no STEMI em seguimento de 6 meses pós-evento. **Resultados:** Foram enriquecidos genes envolvidos com regeneração de órgão, regulação de células endoteliais, fatores de crescimento e adesão celular na fase aguda pós-STEMI. Seis meses pós-evento, genes associados às duas últimas funções mantiveram-se enriquecidos. Na rede de interação proteína-proteína identificamos moléculas-chave e suas interações, que apresentaram níveis elevados de expressão gênica nos primeiros momentos pós-evento. **Conclusão:** Identificamos genes e interações associadas ao reparo cardíaco no STEMI. Estes dados podem auxiliar novas estratégias terapêuticas ou preventivas, para aumentar a sobrevivência e recuperação do tecido cardíaco após a oclusão coronária.

Introdução

O infarto agudo do miocárdio com elevação do segmento-ST STEMI usualmente reflete isquemia devido à oclusão trombótica de uma artéria coronária, evento que culmina na morte celular de cardiomiócitos. A reperfusão urgente, por meio de intervenção coronária percutânea primária (ICP), melhora significativamente o prognóstico do paciente e reduz a morbidade e os custos associados a esta patologia (MARTÍ et al., 2014).



Tipo de trabalho: TRABALHO COMPLETO (MÍNIMO 08 PÁGINAS, MÁXIMO 15 PÁGINAS)

A análise do perfil de expressão gênica por microarranjo oferece uma ferramenta abrangente na descoberta de mecanismos envolvidos em doenças, permitindo a identificação simultânea de milhares de genes e potenciais vias de sinalização associados a diferentes patologias. No STEMI, o perfil de expressão gênica permite elucidar mecanismos subjacentes ao infarto agudo do miocárdio (IAM) (KIM et al., 2014) Informações acerca da expressão alterada de genes envolvidos em vias de sinalização associadas à manutenção de atividades celulares básicas reparativas, podem refletir novos alvos potencialmente fundamentais para o entendimento da evolução e do prognóstico da doença.

Crescentes evidências apontam importante papel do eixo de sinalização SDF-1/CXCR4 no contexto do IAM tanto por estimular o recrutamento de células progenitoras (SAXENA et al., 2008), quanto por auxiliar na sobrevivência celular e reparo cardíaco após isquemia/reperfusão (HU et al., 2007). Esta interação, uma vez ativada, modula várias vias intracelulares de transdução de sinal, entre elas, PI3K/AKT, MAPK e JAK/STAT que estão associadas ao acionamento de mecanismos de reparo e proteção ao miocárdio (GANJU et al., 1998), oferecendo vantagem potencial na recuperação do paciente no pós-IAM.

Assim, o objetivo do estudo foi o de investigar o perfil de expressão de moléculas envolvidas com os componentes da sinalização SDF-1/CXCR4 e proteínas efetoras na transdução deste sinal. Para isso, utilizamos dados de microarranjos depositados em repositório público para inferir sobre o perfil gênico de pacientes com STEMI em diferentes fases após o evento de IAM. Foi realizada a análise de enriquecimento de conjuntos de genes (GSEA) e, a construção de redes de interação proteína-proteína (PPI) a fim de avaliar as associações entre os genes relacionados ao eixo de reparo e à patologia. Finalmente, utilizamos PCR quantitativo em tempo real (qPCR) para analisar a expressão gênica dos alvos selecionados, em grupo de pacientes com STEMI, nos diferentes momentos após o IAM.

Material e métodos

Busca de dados de microarranjos

As informações sobre dados de microarranjos e transcritos foram obtidas do repositório público Gene Expression Omnibus (GEO). O estudo que preencheu os critérios de elegibilidade foi de MACIEJAK et al. (2015), (GSE59867). Neste estudo, o perfil de expressão dos dados de microarranjo foram obtidos a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com STEMI (n=111) nas primeiras horas pós-infarto (admissão hospitalar) e após média de 7 dias (alta hospitalar), que são relativos à fase aguda do pós-IAM, e análises subsequentes de 30 dias e seis meses após o evento, que caracterizam cenário crônico. O grupo controle (n=46) foi constituído de pacientes com doença arterial coronariana e sem histórico prévio IAM. A plataforma utilizada na análise foi GPL6244 (GeneChip® Human Gene 1.0 array) (Affymetrix), os dados foram processados pelo software Partek Genomics Suite™ e normalizados com o algoritmo multi-array average (RMA).

Gene Ontology e análise de enriquecimento de grupos de genes envolvidos com a sinalização ativada pelo eixo SDF-1/CXCR4



Tipo de trabalho: TRABALHO COMPLETO (MÍNIMO 08 PÁGINAS, MÁXIMO 15 PÁGINAS)

Com relação à análise dos componentes da sinalização ativada pelo eixo SDF-1/CXCR4 e seus mediadores intermediários, funções biológicas de interesse foram selecionadas explorando-se conjuntos de termos do Gene Ontology (GO) relacionados a esta via. A relevância destas funções foi estimada com a utilização do método Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) (SUBRAMANIAN et al., 2005) para diferentes comparações obtidas a partir dos perfis de expressão do GEO. Inicialmente, foram realizadas as GSEA dos termos de interesse sobre o estudo GSE59867, com as seguintes comparações: (i) IAM.admissão hospitalar vs. controle, (ii) IAM.alta hospitalar vs. controle, (iii) IAM.1 mês vs. controle e (iv) IAM.6 meses vs. controle. A medida do logFC foi utilizada para obter-se o ranqueamento de fenótipos, requerido para a análise de GSEA.

Construção da rede de interação proteína-proteína

Os genes dos termos enriquecidos nas comparações citadas anteriormente foram agrupados e utilizados para gerar uma rede global de interação proteína-proteína (PPI). Esta rede foi criada utilizando o banco de dados String (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes <https://string-db.org/>) considerando apenas interações observadas experimentalmente e com escore maior que 0.5. Todas as análises estatísticas e a construção da rede PPI foram realizadas em R statistical environment.

Seleção dos alvos de interesse para validação

Na escolha de genes diferencialmente expressos (DEGs) para validação, os critérios de seleção foram divididos em "time-dependent variation" e "time-independent variation". Para "time-dependent variation", a inclusão de genes potenciais adotou dois filtros: 1) a correlação entre os tempos e o log de fold change (logFC) das comparações foi alta (correlação de Spearman > 0.8); e 2) a variação de logFC entre o tempo final e inicial foi maior que 15%. Para "time-independent variation", a inclusão de genes potenciais também adotou dois filtros: 1) a correlação entre os tempos e o logFC das comparações foi baixa (correlação de Spearman < 0.3); e 2) valor de p ajustado do gene-candidato < 0.05 em todos os tempos. Todos estes candidatos para validação foram incluídos no "time frame plot" para visualização. A análise dos dados de expressão gênica foi conduzida utilizando Bioconductor package limma. Para cada termo enriquecido em cada contraste, foi realizado o teste exato de Fisher.

Análise da expressão gênica e validação dos alvos selecionados

População

Pacientes com STEMI submetidos à ICP no Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul (ICFUC) foram incluídos na etapa de validação dos alvos pré-selecionados (n=14). O grupo controle foi constituído por sujeitos submetidos à angioplastia, com diagnóstico de coronárias sem lesões e sem histórico de IAM (n=9). Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido em respeito à lei 196/96. Como critérios de elegibilidade, foram incluídos no estudo, pacientes com idade entre 40 e 75 anos, sem doenças hematológicas, neoplasias ou em tratamento com quimioterápicos, sem intercorrências cardíacas prévias e sob terapia medicamentosa padrão. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da instituição sob o número 4986/14.



Tipo de trabalho: TRABALHO COMPLETO (MÍNIMO 08 PÁGINAS, MÁXIMO 15 PÁGINAS)

Coleta de sangue e isolamento do RNA

Amostras de sangue periférico foram coletadas de pacientes com STEMI no dia 1 do evento (admissão hospitalar), 3 dias, 5-7 dias (alta hospitalar), 1 mês e 6 meses após o IAM. As coletas dos sujeitos controles foram realizadas posteriormente ao procedimento de angioplastia, após descartar lesão nas coronárias e a suspeita de IAM. O método utilizado para a separação e isolamento das PBMC baseia-se na técnica de separação através do gradiente de centrifugação Ficoll-Hypaque® (densidade 1077g/mL) utilizado em conformidade com as instruções do fabricante.

O RNA total foi isolado a partir das PBMC utilizando-se o kit de extração PureLink™ RNA Mini Kit Ambion® (Life, Invitrogen). O RNA mensageiro (mRNA) e a síntese do DNA complementar (cDNA) foram obtidos com uso do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). A determinação da concentração e da pureza do cDNA foi realizada por Nanodrop2000 (ThermoFisher®).

Reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR real time)

Para análise da expressão gênica dos alvos selecionados, utilizamos a técnica do qPCR, a partir do cDNA obtido de PBMC de pacientes com STEMI, empregando o sistema TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems). O GAPDH foi utilizado como normalizador e as amostras dos sujeitos controles constituíram o calibrador do estudo. O método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (desenvolvido por LIVAK et al., 2001), utilizando o valor dos CT (threshold cycle) gerados pelo sistema qPCR. O aparelho utilizado para esta análise foi Applied Agilent 7500 Fast Real Time PCR System, ThermoFisher Scientific (USA).

Resultados

Características clínicas dos grupos amostrais

Conforme a tabela 1, observamos o predomínio no grupo de pacientes com STEMI do sexo masculino ($p=0,013$) e com idade média de 55 anos. No grupo controle a presença de dislipidemia foi o fator de risco mais prevalente nestes indivíduos ($p=0,014$). Na seção da terapia farmacológica utilizada pelos pacientes com STEMI na admissão e na alta hospitalar, observa-se número maior de indivíduos sob terapia com estatinas ($p=0,004$), beta-bloqueadores ($p=0,039$), inibidores da enzima conversora da angiotensina ($p=0,004$) e antiagregantes plaquetários ($p=0,008$).

Termos do Gene Ontology associados à via SDF-1/CXCR4

Na tabela 2 estão descritos os termos do GO utilizados neste estudo, relacionados à sinalização SDF-1/CXCR4 e o número de genes anotados. Com relação à classificação de ontologias dos termos definidos, a maioria delas mostrou-se associada a processos biológicos, abrangem ações sobre proliferação de células endoteliais, quimiotaxia, adesão celular, transdução de sinal celular (inclusive sinalização via receptores acoplados a proteína G), recuperação tecidual, regulação



Tipo de trabalho: TRABALHO COMPLETO (MÍNIMO 08 PÁGINAS, MÁXIMO 15 PÁGINAS)

celular de íons cálcio e regulação anti-apoptose. Para os termos da categoria função molecular, destacamos aqueles relacionados à ligação seletiva com receptor e referentes à atividade de quimiocina e de fator de crescimento.

Análise de enriquecimento de grupos de genes associados à via de sinalização SDF-1/CXCR4

Após definição dos termos do GO foram realizadas as GSEA a partir dos termos de interesse (Figura 1). De acordo com os escores de enriquecimento (ES), observam-se imediatamente ao evento de IAM (Figura 1A), produtos gênicos relacionados ao processo de quimiotaxia, com a regeneração de órgão comprometido por lesão e com a regulação positiva na proliferação de células endoteliais apresentaram ES elevado (≥ 0.5). Na comparação entre o perfil de expressão gênica do STEMI na alta hospitalar com o grupo controle (Figura 1B), observou-se ES ≥ 0.4 para o enriquecimento de genes associados à regeneração do órgão. Verificou-se também, valores muito similares (ES ≥ 0.3) para genes integrantes dos termos associados à quimiotaxia, adesão celular, homeostase celular de íons cálcio e atividade de fator de crescimento. Ao comparar-se o perfil gênico no STEMI 1 mês após o IAM ao grupo controle (Figura 1C), foram obtidos ES ≥ 0.4 para grupos de genes relevantes na função celular de atividade de fator de crescimento e processo biológico de regulação positiva na proliferação de células endoteliais. No enriquecimento de perfis gênicos de amostras pertencentes ao contexto crônico do infarto (Figura 1D), houve a manutenção de genes integrantes da função molecular identificada como atividade de fator de crescimento e da relativa a processo biológico de adesão celular, com escores de enriquecimento muito próximos (ES ≥ 0.3). As demais funções biológicas não mostraram enriquecimento significativo nesta comparação.

Rede de interação proteína-proteína

Utilizamos os genes que compuseram os termos significativamente enriquecidos nas comparações estudadas para construir a rede PPI_SDF-1/CXCR4_STEMI (Figura 1E). Os transcritos das proteínas Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src (SRC), Heat shock protein HSP 90-alpha 1 (HSP90AA1) e Epidermal growth factor receptor (EGFR) apresentaram alto grau de conectividade. Com menor grau de conectividade, também se destacam as associações da qual fazem parte as moléculas Paxillin (PXN), Serine/Threonine Kinase-1 (AKT1), Signal transducers and activators of transcription (STAT3), Mitogen Activated Protein Kinases-1 (MAPK1), Hypoxia inducible fator-1alfa (HIF-1 α) e Vascular endothelial growth fator (VEGF).

Análise temporal de genes diferencialmente expressos envolvidos com o reparo pós-IAM - análise in silico

Um dos critérios utilizados para a seleção de alvos a serem validados foi a análise de DEGs que compõe o GSE59867, com base no tempo de seguimento do pós- IAM (admissão, alta hospitalar, 1 mês e 6 meses após IAM), comparados aos termos selecionados (Figura 2A). As moléculas diferencialmente expressas nas comparações analisadas e designadas para validação foram Leukocyte surface antigen (CD47), C-C motif chemokine 5 (CCL5/Rantes), cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit beta (PRKACB), Transforming growth factor beta receptor type 3



Tipo de trabalho: TRABALHO COMPLETO (MÍNIMO 08 PÁGINAS, MÁXIMO 15 PÁGINAS)

(TGFB3), Interferon gamma receptor 1 (IFNGR1) e Signal regulatory protein alfa (SIRP α).

Análise temporal de genes diferencialmente expressos envolvidos com o reparo pós-IAM - validação experimental

Para avaliar a expressão dos DEGs no GSE59867 (Figura 3), realizamos a validação das mesmas por qPCR nos diferentes tempos do seguimento pós-IAM (Figura 2B). Os resultados mostraram que INFGR1 e SIRP α apresentaram comportamento semelhante ao revelado pela análise in silico. As demais moléculas apresentaram níveis de expressão distintos do esperado no momento seguinte ao infarto (na admissão hospitalar) e mantiveram-se com padrões de expressão diferentes daqueles observados nas análises in silico no seguimento avaliado.

Validação experimental da interação entre genes evidenciados pela PPI_SDF-1/CXCR4_STEMI

A expressão de transcritos com maior grau de interação na PPI foi avaliada por qPCR em amostras de PBMC de pacientes com STEMI (n=14) e controles (n=9) obtidas para o seguimento avaliado. Primeiramente, com base no grau de conectividade da rede PPI, os alvos selecionados foram SRC, HSP90AA1, PXN e AKT1 (Figura 2C). Transcritos expressos para o gene SRC mostraram-se aumentados no momento da admissão quando comparados aos analisados em 6 meses após IAM (p=0,019), para AKT1 elevada expressão na admissão comparada a alta hospitalar (p=0,011) e aos 6 meses (p=0,012) após infarto. Transcritos para o HSP90AA1, apresentaram seus níveis aumentados na admissão quando comparados a alta hospitalar (p=0,017), 1 mês (p=0,038) e 6 meses (p=0,001) após IAM. O mesmo comportamento foi observado nos níveis do mRNA da PXN, elevada expressão na admissão comparada a alta hospitalar (p=0,001) e aos 6 meses (p=0,002).

Ainda com base na rede PPI_SDF-1/CXCR4_STEMI, investigamos a expressão de transcritos comprovadamente comprometidos com a ativação da via de sinalização SDF-1/CXCR4: CXCR4, VEGF, HIF-1 α e MAPK1 (Figura 2D). Transcritos expressos para o gene CXCR4 mostraram-se elevados no momento da admissão quando comparados aos analisados na alta hospitalar (p=0,006) e aos 6 meses, quando comparados aos níveis presentes em 1 mês após o IAM (p=0,023). Para o VEGF, foi observado níveis elevados de expressão dos transcritos na admissão quando comparados aos analisados na alta hospitalar (p=0,001) e aos níveis observados 1 mês após o evento (p=0,002). Os níveis relativos aos transcritos para o gene HIF-1 α mostraram-se aumentados na admissão quando comparados aos analisados na alta hospitalar (p=0,001), 1 mês (p=0,001) e 6 meses (p=0,001) após o IAM. Não foram observadas diferenças significativas entre os níveis de expressão para MAPK nos momentos avaliados, admissão comparado aos 3 dias após IAM (p=1,000), a alta hospitalar (p=0,076), 1 mês (p=1,000) e 6 meses após IAM (p=0,297).

Por fim, a tabela 3 apresenta as associações entre a expressão relativa do receptor CXCR4 com moléculas associadas a ativação da sinalização SDF-1/CXCR4. De acordo com esta análise, foi observada correlação positiva forte do CXCR4 com VEGF E HIF-1 α na fase aguda após o IAM (admissão, 3 dias após-IAM), alta hospitalar e aos 6 meses com as moléculas. A MAPK apresentou correlação positiva forte na admissão, 3 dias e 6 meses após IAM.



Tipo de trabalho: TRABALHO COMPLETO (MÍNIMO 08 PÁGINAS, MÁXIMO 15 PÁGINAS)

Discussão

A partir de dados de microarranjo depositados no GEO por MACIEJAK et al (GSE59867) e com auxílio de ferramentas de bioinformática, este estudo integra diferentes critérios de análises para identificar genes biologicamente significativos no contexto do STEMI e úteis como preditivos no reparo cardíaco pós-IAM. Posteriormente, apresenta o perfil gênico destes alvos em PBMC de pacientes com STEMI no seguimento de 6 meses.

De acordo com as análises de enriquecimento e anotações funcionais associadas ao eixo de reparo SDF-1/CXCR4, observa-se na fase aguda, o enriquecimento de genes relacionados a regulação e adesão de células endoteliais, quimiotaxia e regeneração do órgão. Logo após IAM ocorre um aumento no número de células endoteliais circulantes que promovem a angiogênese. Adicionalmente, células endoteliais CD34+KDR+ que expressam moléculas de adesão também são mobilizadas e auxiliam na implantação de células progenitoras no miocárdio isquêmico, onde modulam crescimento, sobrevivência e proliferação celular, favorecendo o reparo tecidual (BREHM et al.,2009). Constata-se mudanças no padrão de anotações funcionais no seguimento avaliado, com manutenção do enriquecimento de genes anotados na função de adesão celular e atividade de fatores de crescimento na fase crônica pós-IAM, o que pode indicar uma continuidade no reparo tecidual por mecanismos distintos da fase aguda do infarto.

Uma das contribuições deste estudo é o estabelecimento da rede PPI_SDF-1/CXCR4_STEMI e a identificação de moléculas relevantes, devido ao seu alto grau de interações, que representam possíveis hubs funcionais, importantes no eixo SDF-1/CXCR4 e que podem servir de ponto de partida para análises funcionais, relacionadas à progressão da doença isquêmica. Destacam-se proteínas importantes quanto ao potencial envolvimento no reparo cardíaco, particularmente, SRC, PXN e STAT3. CHENG et al. (2015) evidenciaram o papel da SRC no recrutamento de células progenitoras da medula óssea para áreas isquêmicas via SDF-1/CXCR4, favorecendo o acionamento de mecanismos de reparo tecidual (CHENG et al., 2015). O SRC é considerado um gene preditivo no contexto das doenças cardiovasculares (SARAJLIĆ et al., 2013) devido sua atividade regulatória sobre proteínas de adesão. Esta proteína desempenha papel crítico na regulação e organização do citoesqueleto fosforilando proteínas de adesão, entre elas a PXN, modulando adesão, mobilidade e crescimento celular (CHENG et al. 2015) A interação SRC/PXN corrobora com análise de enriquecimento na regulação positiva de moléculas de adesão na fase aguda e crônica pós-IAM. Contudo, ambas as moléculas apresentam níveis elevados dos seus transcritos na admissão hospitalar, sugerindo favorecimento da fosforilação da PXN pela SRC nos momentos iniciais pós-IAM.

A interação SRC/STAT3 pode estar relacionada à ativação mediada por receptores β -adrenérgicos SRC-dependentes que resulta na regulação da expressão de genes envolvidos na sinalização β -adrenérgica, uma resposta adaptativa ao estresse pós lesão isquêmica (Zhang et al., 2016). A STAT3 é reguladora do efeito cardioprotetivo mediado pelo eixo SDF-1/CXCR4 pós-lesão tecidual, envolvida em processos angiogênicos e migratórios (HUANG et al., 2011). Os agentes farmacológicos estatina, amplamente utilizados na cardiologia, beneficiam o acoplamento SDF-1/CXCR4 com conseqüente aumento na expressão do fator de transcrição STAT3, mecanismo



Tipo de trabalho: TRABALHO COMPLETO (MÍNIMO 08 PÁGINAS, MÁXIMO 15 PÁGINAS)

parcialmente responsável pela melhora da função cardíaca, proporcionada pela a estatinas (QIU et al., 2012). A interação STAT3/EGFR na PPI condiz com a literatura, uma vez que os receptores para membros da família de fatores de crescimento epidermal (EGFR) modulam a cascata efetora do STAT3 (FULLER et al., 2008). Não foram avaliadas a expressão dos transcritos EGFR e STAT3.

A família HSP90 desempenha papel crítico na regulação dos efeitos mediados pelo óxido nítrico (NO) na angiogênese em situações patológica e fisiológicas e atuam em benefício dos efeitos pró-angiogênicos das estatinas (BROUET et al., 2001). A interação entre a chaperona HSP90AA1 e AKT1, uma das proteínas quinases mais extensamente caracterizadas no miocárdio, na PPI merece atenção na cardioproteção via NO, cuja liberação é mediada pela via PI3K/AKT (HAUSENLOY et al., 2005). Entretanto, nossos dados apontam para possível ação cardioprotetora desta interação nos momentos iniciais pós-IAM, fase na qual observa-se expressivos níveis de transcritos da HSP90AA1 e AKT1. Ademais, o gene da proteína HSP90 é considerado preditivo de DCV (SARAJLIĆ et al., 2013) uma vez que a mesma contribui para o desenvolvimento da disfunção endotelial, causa primária da aterosclerose (KIM et al., 2014).

Fatores comprovadamente comprometidos com a ativação da sinalização SDF-1/CXCR4, como HIF- α , VEGF e MAPK1, acionados após o infarto e cuja resposta final são adaptações fisiológicas limitantes da lesão do músculo cardíaco (GANJU et al., 1998) também estão evidenciados na PPI, porém em menor grau de conectividade. Em situações de hipóxia, o fator de transcrição HIF- α liga-se a regiões promotoras de genes alvos, entre eles o VEGF, cuja indução beneficia processos citoprotetores, como a migração e mobilização de células-tronco cardíacas, reduzindo o tamanho do infarto e melhorando a função ventricular (TANG et al., 2011). O perfil de expressão gênica destas moléculas corrobora com dados da literatura que apontam o HIF- α como mediador da transcrição do VEGF (CERADINI et al., 2004). Na análise dos transcritos HIF- α e VEGF sugere-se favorecimento na ativação do eixo SDF-1/CXCR4 na fase aguda pós-IAM, uma das primeiras adaptações do miocárdio humano à isquemia (TANG et al., 2011). Entretanto, o HIF- α diminui progressivamente no terceiro dia pós-evento, reduzindo seus efeitos benéficos (SARAJLIĆ et al., 2013) nossos resultados apoiam estas evidências. Verifica-se níveis elevados do transcrito da MAPK na admissão hospitalar, sugerindo funções celulares requeridas na manutenção do tecido cardíaco no contexto pós-IAM, desencadeados por esta via, podem estar ativas nos momentos subsequentes ao infarto.

Observa-se correlação positiva entre a expressão gênica do CXCR4 e as moléculas que se destacam na PPI, o que sugere favorecimento dos efeitos cardioprotetores proporcionados pelo eixo SDF-1/CXCR4, particularmente na fase aguda pós-IAM.

Na análise dos DEGs relacionados aos dados de microarranjo do estudo GSE59867, destaca-se a quimiocina CCL5 ou RANTES envolvida na angiogênese patológica mediada por inflamação (RIDIANDRIES et al., 2016), receptores como o TGFBR3 que possui ação anti-fibrótica (LIANG et al., 2012), o IFNGR1 envolvido em processos biológicos fundamentais nos mecanismos de reparo no contexto do IAM (RUPARELIA et al., 2015) e SIRP α que interage com CD47 presente na maioria das células e desempenha papel importante na preservação da integridade e reconstrução tecidual (OLDENBORG et al., 2001). Por fim, a PRKACB subunidade enzimática na sinalização via



Tipo de trabalho: TRABALHO COMPLETO (MÍNIMO 08 PÁGINAS, MÁXIMO 15 PÁGINAS)

proteína quinase A (PKA) que influencia aspectos importantes da proliferação e diferenciação celular (KUVARDINA et al., 2017). Dentre os DEGs somente o IFNGR1 e SIRP α mostram-se aumentados no seguimento avaliado confirmando as análises de bioinformática. Ambos receptores são mediadores no acionamento de mecanismos para limitar o dano cardíaco após lesão e no estímulo do reparo tecidual. O IFNGR1 é considerado alvo terapêutico de interesse na cardiologia (SZELAG et al., 2016) e apontamos a SIRP α potencial alvo terapêutico a ser investigado.

Conclusão

Nossos dados integram análises de bioinformática e análises experimentais e sugerem parâmetros moleculares a serem considerados quando se deseja alcançar o reparo tecidual fisiologicamente significativo. Tal entendimento pode ser útil na descoberta de novos alvos potenciais, bem como no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas ou preventivas para aumentar a sobrevivência e recuperação do tecido cardíaco após a oclusão coronária.

Limitações: A análise prospectiva de populações representativas e bem caracterizadas para obtenção de poder estatístico é uma limitação importante neste estudo. Anotações obtidas do GO são muitas vezes incompletas; e a ausência de uma anotação não implica ausência de função. Os sistemas de sinalização discutidos aqui são somente alguns exemplos de mecanismos envolvidos no reparo cardíaco e suas descrições são extremamente simplificadas, é difícil ter certeza de que tudo foi realmente explorado e se há propriedades emergentes. O acesso imediato ao tecido cardíaco humano é inviável, onde a utilização de sangue periférico é uma alternativa acessível e segura. Por sua vez, a literatura nos dá suporte à utilização deste tecido para detectar mudanças transcricionais, dentro do órgão de interesse. Por fim, a análise da expressão através do estudo de mRNA (transcriptoma), pode não revelar as quantidades de proteínas efetivamente funcionais, já que não considera a existência de possíveis etapas de regulação pós-transcricional e/ou pós-transducional.

Palavras-chave: bioinformática, STEMI, SDF-1/CXR4, microarranjo

Agências financiadoras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) - bolsa de doutorado, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).



Tipo de trabalho: TRABALHO COMPLETO (MÍNIMO 08 PÁGINAS, MÁXIMO 15 PÁGINAS)

Tabelas

Tabela 1. Características clínicas dos grupos amostrais

Características	STEMI (n=14)	Controles (n=9)	P
Idade (anos)	55±10	61±9	0,213
Gênero masculino (%)	78	21	0,013*
Fatores de risco cardiovascular e comorbidades (%)			
Hipertensão	64,3	55,6	1,000
Tabagismo	43,0	11,0	0,176
Diabetes mellitus	28,6	0,00	0,127
Dislipidemia	0,00	44,4	0,014*
Terapia farmacológica na admissão/alta hospitalar (%)			
Estatina	21,3/85,7	44,4/NA	0,363/0,004**
Beta-bloqueadores	42,9/92,9	44,4/NA	1,000/0,039**
Inibidores da ECA	21,4/85,7	0,00/NA	0,253/0,004**
Antiagregante plaquetários	28,4/85,7	55,6/NA	0,383/0,008**
ARAs	7,1/7,1	33,3/NA	0,206/1,000
Bloqueadores dos canais de cálcio	14,3/21,4	0,00/NA	0,502/1,000
Antidiabéticos	21,4/28,6	0,00/NA	0,253/1,000

Idade descrita em média e desvio padrão, t-Test, demais variáveis descritas em porcentagem (%), chi-Square test. STEMI=ST-elevation myocardial infarction, ECA=enzima conversora de angiotensina, ARA=antagonistas dos receptores da angiotensina, NA=não aplicável **comparação entre medicamentos na admissão vs. alta hospitalar (McNemar test). *<0.05



Tipo de trabalho: TRABALHO COMPLETO (MÍNIMO 08 PÁGINAS, MÁXIMO 15 PÁGINAS)

Tabela 2. Descrição dos termos do *Gene Ontology* relacionados a via de sinalização SDF-1/CXCR4 utilizados na análise de enriquecimento de conjunto de genes

Processo biológico do GO	n*
GO:0001938 Regulação positiva da proliferação de células endoteliais	66
GO:0005102 Ligação ao receptor	306
GO:0006874 Homeostase celular de íons cálcio	82
GO:0006935 Quimiotaxia	119
GO:0007155 Adesão celular	421
GO:0007165 Transdução de sinal	983
GO:0007186 Sinalização via receptores acoplados a proteína G (GPCR)	862
GO:0008009 Atividade de quimiocina	47
GO:0008083 Atividade de fator de crescimento	161
GO:0031100 Regeneração de órgão	50
GO:0042379 Ligação a receptores de quimiocinas	08
GO:0045236 Ligação a receptores de quimiocina CXCR	09
GO:0045785 Regulação positiva de adesão celular	38
GO:0050930 Indução de quimiotaxia positiva	15
GO:0060326 Quimiotaxia celular	52
GO:0070098 Via de sinalização mediada por quimiocina	45
GO:0090026 Regulação positiva da quimiotaxia de monócitos	12
GO:0090280 Regulação positiva da entrada de íons cálcio na célula	15
GO:1902230 Regulação negativa da via de sinalização intrínseca da apoptose em resposta ao dano do DNA	14

*coluna n corresponde ao número de genes anotados no referido termo



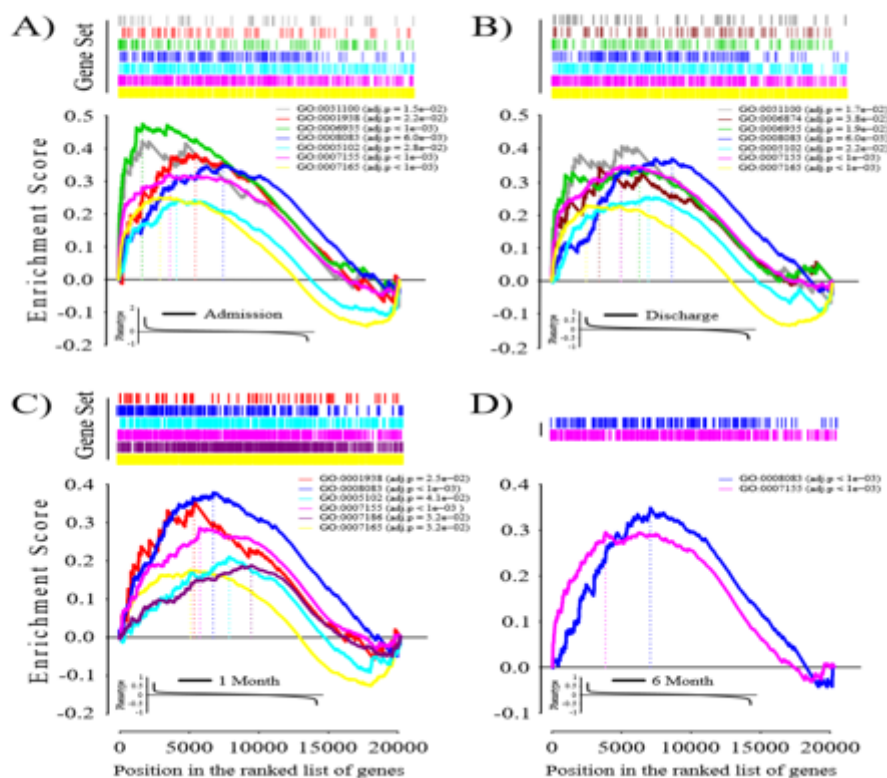
Tipo de trabalho: TRABALHO COMPLETO (MÍNIMO 08 PÁGINAS, MÁXIMO 15 PÁGINAS)

Tabela 3. Análise de correlação entre o perfil de expressão gênica das moléculas da rede de interação proteína-proteína e do CXCR4

Moléculas	Admissão hospitalar		Dia 3 após IAM		Alta hospitalar		1 mês após IAM		6 meses após IAM	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
AKT1	0,788	0,002*	0,947	0,014*	0,956	0,011*	0,645	0,166	0,774	0,071
SRC	0,766	0,004*	0,877	0,051*	0,970	0,006*	0,073	0,891	0,771	0,073
HSP90AA1	0,892	0,001*	0,800	0,104	0,900	0,037*	0,553	0,255	0,791	0,061
MAPK1	0,607	0,036	0,891	0,042*	0,682	0,205	0,768	0,075	0,876	0,022*
PXN	0,721	0,008*	0,935	0,020*	0,986	0,002*	0,634	0,176	0,104	0,844
VEGF	0,943	0,001*	0,952	0,013*	0,879	0,050*	0,230	0,661	0,847	0,033*
HIF-1 α	0,855	0,001*	0,943	0,016*	0,996	0,001*	0,708	0,115	0,807	0,052

Teste estatístico Correlação de Pearson (r =coeficiente de relação) e $*p<0,05$.

Figuras





Tipo de trabalho: TRABALHO COMPLETO (MÍNIMO 08 PÁGINAS, MÁXIMO 15 PÁGINAS)

E)

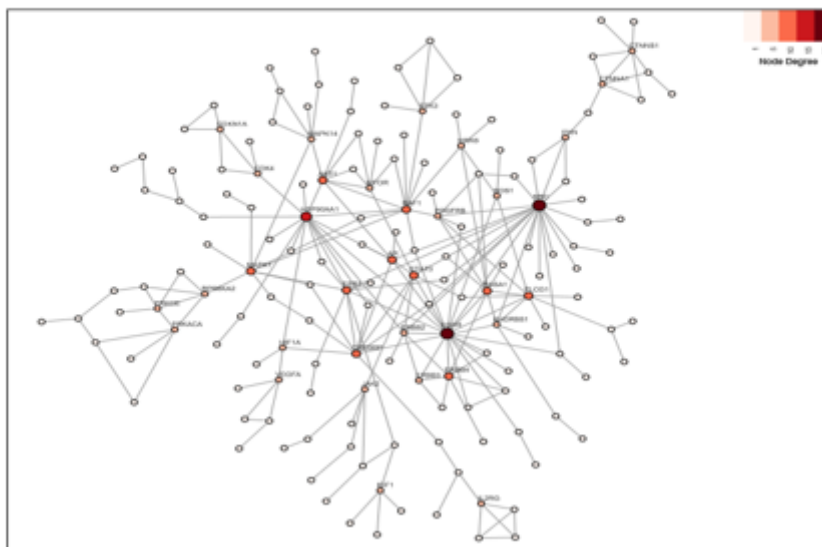


Figura 1. Enriquecimento termos do GO relacionados ao eixo SDF-1/CXCR4 no STEMI. (A) STEMI admissão vs. controle, (B) STEMI alta hospitalar vs. controle, (C) STEMI 1 mês pós-evento vs. controle e (D) STEMI 6 mês pós-evento vs. controle. GO = *gene ontology*. Go e identificadores - GO:0031100, regeneração de órgão; GO:0001938, regulação positiva da proliferação de células endoteliais; GO:0006935, quimiotaxia; GO:0008083, atividade de fator de crescimento; GO:0005102, ligação ao receptor; GO:0007155, adesão celular, GO:0007165, transdução de sinal; GO:0006874, homeostase celular de íons cálcio e GO:0007186, sinalização via receptores acoplados a proteína G (GPCR). **(E) Rede de interação proteína-proteína** formada com base nos genes enriquecidos no STEMI. Proteínas são representadas nos nodos, o grau de associação está representado pela intensidade da cor do nodo.



Tipo de trabalho: TRABALHO COMPLETO (MÍNIMO 08 PÁGINAS, MÁXIMO 15 PÁGINAS)

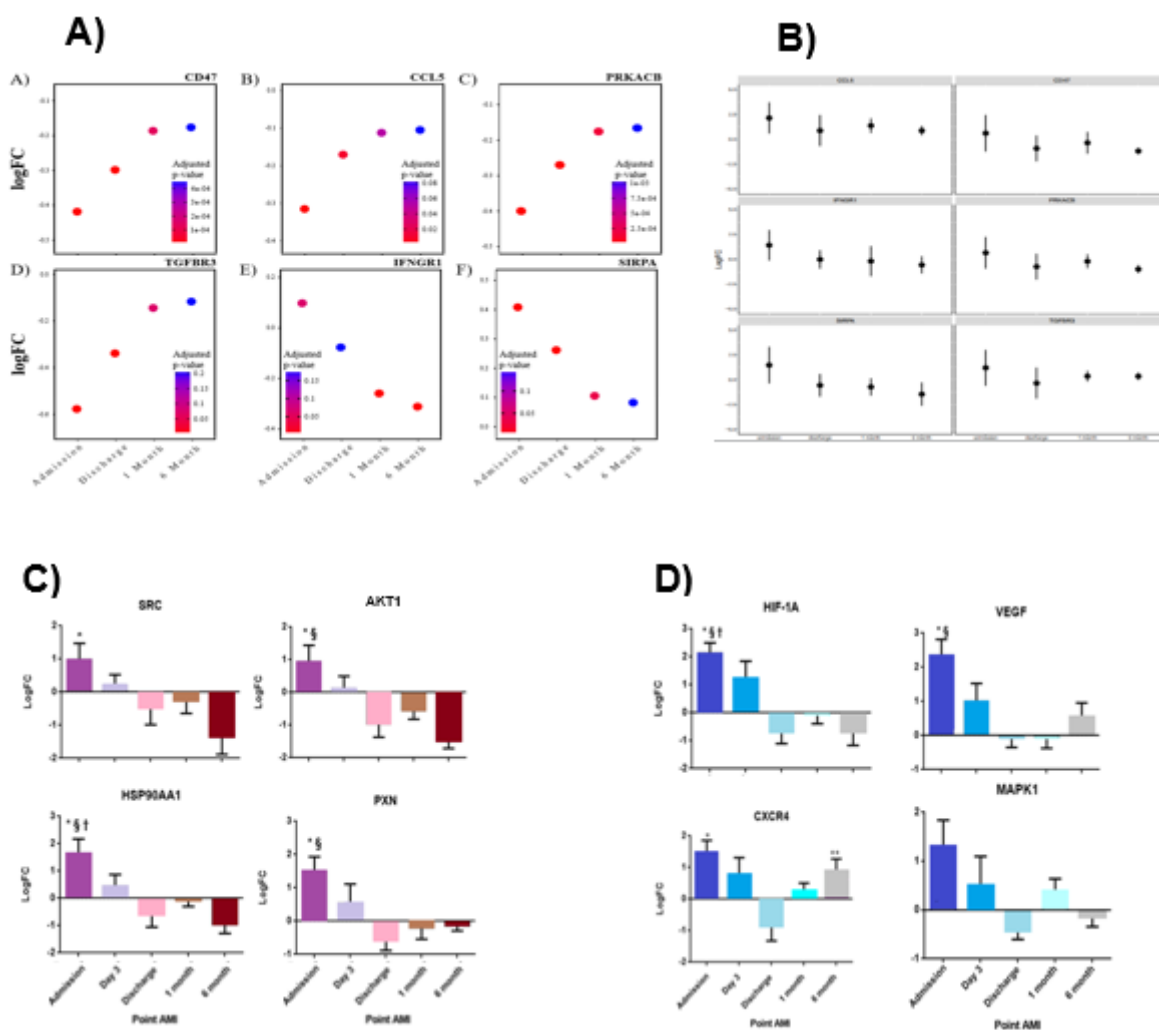


Figura 2. (A) Timeframeplots dos transcritos diferencialmente expressos de acordo com GSE59867. CD47 (*Leukocyte surface antigen*), CCL5 (*Rantes (C-C motif chemokine 5)*), PRKACB (*cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit beta*), TGFBR3 (*Transforming growth factor beta receptor type 3*), IFNGR1 (*Interferon gamma receptor 1*), SIRP α (*Signal regulatory protein α*), LogFC= log (2) fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). **(B) Timeframeplot transcritos diferencialmente expressos e avaliados em coorte de pacientes com STEMI.** LogFC= log (2) fold change ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). **(C) Níveis da expressão gênica das moléculas selecionadas de acordo com o grau de associação na rede PPI.** SRC (*admis vs. 6 m pós-IAM p=0,019), AKT1 (*admis vs. alta p=0,011 e §admis vs. 6 m pós-infarto p=0,012), HSP90AA1 (*admis vs. alta p=0,017; §admis vs. 1 mês pós-IAM p=0,038 e †admis vs. 6 m pós-IAM p=0,001), PXN (*admis vs. alta p=0,001 e §admis vs. 6 m pós-IAM p=0,002) e **(D) Níveis de expressão gênica de moléculas comprometidas com a ativação da sinalização SDF-1/CXCR4.** CXCR4 (*admis vs. alta p=0,006 e **6 m vs. 1 mês pós-IAM p=0,023), VEGF (§admis vs. alta p=0,001 e †admis vs. 1 mês pós-IAM p=0,002), HIF- α (†admis



Tipo de trabalho: TRABALHO COMPLETO (MÍNIMO 08 PÁGINAS, MÁXIMO 15 PÁGINAS)

vs. alta $p=0,001$, $^{\square}$ admis vs. 1 mês pós-IAM $p=0,001$ e † admis vs. 6 m pós-IAM $p=0,005$) e MAPK1. $\text{LogFC} = \log(2)^{\Delta\Delta Ct}$.

Referências

BREHM, M. et al. Enhanced mobilization of CD34(+) progenitor cells expressing cell adhesion molecules in patients with STEMI. *Clin Res Cardiol.*, v. 98, n. 8, p. 477-486, mai. 2009.

BROUET, A. et al. Hsp90 and caveolin are key targets for the proangiogenic nitric oxide-mediated effects of statins. *Circ Res.*, v. 89, n. 10, p. 866-873, nov. 2001.

CERADINI, D. J. et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med.*, v. 10, p. 858-864, ago. 2004.

CHENG, M. et al. A critical role of Src family kinase in SDF-1/CXCR4-mediated bone-marrow progenitor cell recruitment to the ischemic heart. *J Mol Cell Cardiol.*, v. 81, p. 49-53, fev. 2015.

FULLER, S. J.; SIVARAJAH, K.; SUGDEN, P.H. ErbB receptors, their ligands, and the consequences of their activation and inhibition in the myocardium. *J Mol Cell Cardiol.*, v. 44, n. 5, p. 831-854, mar. 2008.

GANJU, R. K. et al. The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. *J Biol Chem.*, v. 273, n. 36, p. 23169-23175, set. 1998.

HAUSENLOY, D. J. et al. Ischemic preconditioning protects by activating prosurvival kinases at reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, v. 288, n. 2, p. H971-976, fev. 2005.

HU, X. et al. Stromal cell derived factor-1 alpha confers protection against myocardial ischemia/reperfusion injury: role of the cardiac stromal cell derived factor-1 alpha CXCR4 axis. *Circulation*, v. 116, n. 6, p. 654-663, ago. 2007.

HUANG, C. et al. SDF-1/CXCR4 mediates acute protection of cardiac function through myocardial STAT3 signaling following global ischemia/reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, v. 301, n. 4, p. H1496-1505, ago. 2011.



Tipo de trabalho: TRABALHO COMPLETO (MÍNIMO 08 PÁGINAS, MÁXIMO 15 PÁGINAS)

KIM, J. et al. Gene expression profiles associated with acute myocardial infarction and risk of cardiovascular death. *Genome Med.*, v. 6, n. 5, p. 40, mai. 2014.

KIM, J. et al. The role of heat shock protein 90 in migration and proliferation of vascular smooth muscle cells in the development of atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol.*, v. 72, p. 157-167, mar. 2014.

KIM, C. H. Early expression of myocardial HIF-1alpha in response to mechanical stresses: regulation by stretch-activated channels and the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *Circ Res.*, v. 90, n. 2, p. E25-33, fev. 2002.

KUVARDINA, O. N. et al. Hematopoietic transcription factors and differential cofactor binding regulate PRKACB isoform expression. *Oncotarget*, v. 8, n. 42, p.71685-71698, set. 2017.

LIANG, H. et al. A novel reciprocal loop between microRNA-21 and TGFβRIII is involved in cardiac fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol.*, v. 44, n. 12, p. 2152-2160, set. 2012.

LIVAK, K. J; SCHMITTGEN T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402-408, dez. 2001.

MACIEJAK, A. et al. Gene expression profiling reveals potential prognostic biomarkers associated with the progression of heart failure. *Genome Med.*, v. , 7, n. 1, p. 26, mar. 2015.

MARTÍ, D. et al. Incidence, angiographic features and outcomes of patients presenting with subtle ST-elevation myocardial infarction. *Am Heart J.*, v. 168, v. 6, p. 884-890, set. 2014.

OLDENBORG, P. A.; GRESHAM, H. D.; LINDBERG, F. P. CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPalpha) regulates Fcγ and complement receptor-mediated phagocytosis. *J Exp Med.*, v. 193, n. 7, p. 855-862, abr. 2001.

QIU, R. et al. SDF-1α upregulation by atorvastatin in rats with acute myocardial infarction via nitric oxide production confers anti-inflammatory and anti-apoptotic effects. *J Biomed Sci.*, v. 19, p. 99, nov. 2012.

RIDIANDRIES, A. et al. The Role of CC-Chemokines in the Regulation of Angiogenesis. *Int J Mol Sci.*, v. 17, n. 11, nov. 2016.



6° CONGRESSO INTERNACIONAL EM SAÚDE CISaúde

Vigilância em Saúde: Ações de Promoção,
Prevenção, Diagnóstico e Tratamento



Tipo de trabalho: TRABALHO COMPLETO (MÍNIMO 08 PÁGINAS, MÁXIMO 15 PÁGINAS)

ROSS, R. S.; BORG, T. K. Integrins and the myocardium. *Circ Res.*, v. 88, n. 11, p. 1112-1119, jun. 2001.

RUPARELIA, N. et al. Acute myocardial infarction activates distinct inflammation and proliferation pathways in circulating monocytes, prior to recruitment, and identified through conserved transcriptional responses in mice and humans. *Eur Heart J.*, v. 36, n. 29, p.1923-1934, mai. 2015.