

**FIOCRUZ**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

**INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**BUSCA POR MARCADORES CELULARES NA INJÚRIA MIOCÁRDICA  
ATRAVÉS DE DECONVOLUÇÃO TRANSCRIPTÔMICA**

**MURILO DE QUEIROZ RAMOS**

**Salvador - Bahia**

**2023**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa**

**BUSCA POR MARCADORES CELULARES NA INJÚRIA MIOCÁRDICA  
ATRAVÉS DE DECONVOLUÇÃO TRANSCRIPTÔMICA**

**MURILO DE QUEIROZ RAMOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, para obtenção do grau de Mestre

**Orientador:** Prof. Dr. Kiyoshi Fukutani

**Salvador - Bahia**

**2023**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Instituto Gonçalo Moniz/ FIOCRUZ – Bahia - Salvador

**R175b** Ramos, Murilo de Queiroz.

Busca por marcadores celulares na injúria miocárdica através de deconvolução transcriptômica. / Murilo de Queiroz Ramos. \_ Salvador, 2023.

33 f.: il.: 30 cm

Orientador: Prof. Dr. Kiyoshi Fukutani

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2023.

1. Infarto agudo do miocárdio. 2. Deconvolução transcriptômica. I. Título.

CDU 616.127-005.8

Título da Dissertação: "BUSCA POR MARCADORES CELULARES NA INJÚRIA MIOCÁRDICA ATRAVÉS DE DECONVOLUÇÃO TRANSCRIPTÔMICA

MURILO DE QUEIROZ RAMOS

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 25 de julho de 2023.

COMISSÃO EXAMINADORA



Documento assinado digitalmente  
PAULO BENIGNO PENA BATISTA  
Data: 13/08/2023 22:02:48-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

---

Dr. Paulo Benigno Batista  
Professor  
UNIME/Kroton



Documento assinado digitalmente  
TIAGO GRAF  
Data: 26/07/2023 08:54:47-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

---

Dr. Tiago Graf  
Pesquisador em Saúde Pública  
ICC-Fiocruz



Documento assinado digitalmente  
LEONARDO PAIVA FARIAS  
Data: 25/07/2023 17:50:25-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

---

Dr. Leonardo Paiva Farias  
Pesquisador em Saúde Pública  
IGM-Fiocruz

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001."

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor doutor Kiyoshi Fukutani, que ao longo desta jornada se tornou muito mais do que um professor, me dando conselhos para além das metodologias e análises descritivas, me guiando pelo caminho do equilíbrio e me dando a leveza necessária para conduzir o projeto. Se eu pudesse escolher qualquer orientador do mundo, por mil vezes escolheria o senhor. Minha eterna gratidão professor.

A minha esposa, Lee Ane Aranha, que me deu suporte, retaguarda e logística para a conclusão deste projeto, sem ela eu certamente demoraria mais tempo para conclusão do mestrado, mas graças a sua paciência, dedicação e esforço, pude me organizar para alcançar as metas.

À CAPES pelo fomento, apoio financeiro e consolidação do programa de pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa.

RAMOS, Murilo de Queiroz. **Busca por marcadores celulares na injúria miocárdica através de deconvolução transcriptômica.** 2023. 33 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2023.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** O diagnóstico de infarto agudo do miocárdio (IAM) representa um desafio, principalmente em centros de baixa e média complexidade. Nos últimos anos a busca por novos alvos moleculares passou a utilizar transcriptomas para melhor compreensão da patogênese de doenças. A partir da deconvolução transcriptômica, é possível reconstruir a população celular do sangue de pacientes com IAM. **OBJETIVO:** Avaliar as populações celulares associadas ao infarto agudo do miocárdio. **MÉTODOS:** Foram avaliados 2 datasets de microarranjos de sangue de pacientes com IAM com um total de 57 amostras de transcriptomas de sangue de pacientes infartados e comparado com amostras de pacientes não infartados. Para correlação dos achados encontrados no método computacional, foram coletados dados de leucogramas (com contagem diferencial) e CK-MB de 22 pacientes com IAM. **RESULTADOS:** Os pacientes com IAM apresentaram genes significantes em relação aos pacientes sem IAM. A análise de enriquecimento dos genes significantes demonstrou expressão direcionada para células imunológicas. Os números absolutos de células da reconstituição demonstraram um aumento dos valores de neutrófilos e diminuição de células T nos pacientes infartados em relação ao grupo controle. A validação com coleta de hemogramas e CK-MB de pacientes com IAM evidenciou que o aumento dos valores de neutrófilos e diminuição de células T está correlacionado com os valores de CK-MB. **CONCLUSÃO:** O estudo gera a hipótese de que dados derivados da contagem diferencial celular pode se tornar um parâmetro adicional ao raciocínio diagnóstico do IAM. A neutrofilia e a linfopenia no IAM não devem ser utilizadas como parâmetros isolados, porém sugerem investigação mais aprofundada principalmente no paciente cujo diagnóstico é duvidoso.

**Palavras-chave:** Infarto agudo do miocárdio. Deconvolução transcriptômica.

RAMOS, Murilo de Queiroz. **Search for cellular markers in myocardial injury through transcriptomic deconvolution**. 2023. 33 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2023.

## **ABSTRACT**

**INTRODUCTION:** The diagnosis of acute myocardial infarction (AMI) represents a challenge, especially in centers of low and medium complexity. In recent years, the search for new molecular targets has started to use transcriptomes to better understand the pathogenesis of diseases. From transcriptomic deconvolution, it is possible to reconstruct the cellular population of the blood of patients with AMI. **OBJECTIVE:** To evaluate the cell populations associated with acute myocardial infarction. **METHODS:** We evaluated 2 datasets of blood microarrays of patients with AMI with a total of 57 blood transcriptome samples from infarcted patients and compared with samples from non-infarcted patients. To correlate the findings found in the computational method, data were collected from leukograms (with differential count) and CK-MB from 22 patients with AMI. **RESULTS:** Patients with AMI had significant genes in relation to patients without AMI. The enrichment analysis of the significant genes demonstrated expression directed to immune cells. The absolute numbers of reconstitution cells showed an increase in neutrophil values and a decrease in T cells in infarcted patients compared to the control group. The validation with collection of blood counts and CK-MB from patients with AMI showed that the increase in neutrophil values and decrease in T cells is correlated with the CK-MB values. **CONCLUSION:** The study hypothesizes that data derived from the differential cell count may become an additional parameter to the diagnostic reasoning of AMI. Neutrophilia and lymphopenia in AMI should not be used as isolated parameters, but they suggest further investigation, especially in patients whose diagnosis is doubtful.

**Keywords:** Acute myocardial infarction. Transcriptomic deconvolution.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Análise diferencial dos genes expressos	21
<b>Figura 2</b>	Análise de enriquecimento das vias metabólicas	22
<b>Figura 3</b>	Reconstituição celular por deconvolução transcriptômica	23
<b>Figura 4</b>	Comparação dos valores absolutos da reconstituição das populações celulares por deconvolução transcriptômica dos pacientes com alterações no segmento ST e indivíduos saudáveis	24
<b>Figura 5</b>	Correlação entre valores percentuais e contagem absoluta de neutrófilos e linfócitos com valores de CK-MB.	26

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Descrição do conjunto de dados selecionados para análises de transcriptomas	20
<b>Tabela 2</b>	Características clínicas e laboratoriais dos pacientes da UTI cardiovascular do Hospital Geral Roberto Santos entre janeiro e março de 2023	25

## **LISTA DE SIGLAS**

<b>CK-MB</b>	Creatinafosfo-quinase isoenzima MB
<b>CNS</b>	Conselho Nacional de Saúd
<b>DP</b>	Desvio padrão
<b>GEO</b>	Gene Expression Omnibus
<b>IAM</b>	Infarto Agudo do Miocárdio
<b>IL</b>	Interleucina
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>UPA</b>	Unidade de Pronto Atendimento
<b>UTI</b>	Unidade de Terapia Intensiva

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	13
2	<b>OBJETIVOS</b>	16
2.1	<b>Objetivo geral</b>	16
2.2	<b>Objetivo específico</b>	16
3	<b>METODOLOGIA</b>	17
3.1	<b>Seleção dos transcriptomas</b>	17
3.1.1	Critérios de inclusão	17
3.1.2	Critérios de exclusão	17
3.2	<b>Critérios de elegibilidade</b>	18
3.2.1	Critérios de inclusão	18
3.2.2	Critérios de exclusão	18
3.3	<b>Coleta de dados para validação</b>	19
3.4	<b>Análise estatística</b>	19
4	<b>RESULTADOS</b>	20
5	<b>DISCUSSÃO</b>	27
6	<b>CONCLUSÃO</b>	30
	<b>REFERÊNCIAS</b>	31

## 1 INTRODUÇÃO

O infarto agudo do miocárdio (IAM) é uma das principais causas de óbito no Brasil e no mundo<sup>1</sup>. Em 2019 o IAM representou 12 % do total de mortes no país<sup>2</sup> e seu diagnóstico é desafiador, principalmente em centros de saúde de baixa e média complexidade. Com o advento das Unidades de Pronto Atendimento (UPA) o primeiro atendimento desses pacientes passou a ser realizado em ambientes de média complexidade, entretanto essas unidades muitas vezes não possuem a propedêutica armada necessária para o diagnóstico da patologia<sup>3</sup>.

A fisiopatologia do IAM está associada a uma isquemia crítica do lúmen coronariano ocasionando redução do suprimento sanguíneo para determinada parede do coração<sup>4</sup>. O evento ocorre na maioria das vezes pela ruptura ou erosão de uma placa de aterosclerose do vaso, ocluindo significativa ou completamente uma artéria coronária<sup>4</sup>. O processo pode ser reversível se reconhecido e tratado precocemente através principalmente de estratégias de reperfusão, que podem ocorrer de forma química (fibrinólise) ou mecânica (intervenção coronariana percutânea)<sup>4</sup>. Caso não seja revertido, o processo de injúria tecidual evolui para necrose da parede acometida, tornando aquele grupamento muscular acinético e condenando o paciente a uma insuficiência cardíaca de etiologia isquêmica.

O diagnóstico de IAM envolve uma sintomatologia típica com dor precordial em pontada ou aperto que irradia para pescoço, ramo mandibular ou membro superior esquerdo, principalmente quando desencadeada por esforço, associado a uma alteração eletrocardiográfica indicativa de injúria (desnivelamento do segmento ST) e/ou uma curva de ascensão do valor de biomarcadores cardíacos como a CK-MB e a troponina, marcadores que se elevam no sangue quando há lesão cardíaca (principalmente lesões de natureza isquêmicas)<sup>4</sup>.

O biomarcador cardíaco CK-MB é uma enzima encontrada predominantemente no músculo cardíaco e está relacionada a produção e uso de fosfato de alta energia nos tecidos contráteis<sup>5</sup>. Sua elevação ocorre entre 4-6 horas do evento coronariano agudo, com pico em torno de 18 horas e retornando ao valor de normalidade após 48 horas. A recomendação é que esta enzima seja dosada a cada 4 horas, buscando elevações sucessivas em seus valores<sup>5</sup>. Por ter uma meia vida curta, a enzima também pode ser utilizada para diagnóstico de reinfarto<sup>6</sup>.

A troponina é uma proteína muscular presente no músculo cardíaco e responsável pela interação entre actina e miosina no processo de contração muscular<sup>5</sup>. Existem três espectros desta proteína, a troponina C (que se liga ao cálcio), a troponina T (que se liga a tropomiosina) e a troponina I (que se liga a actina). Dentre estes espectros, apenas a troponina T e I apresentam uma boa especificidade para marcador cardíaco de IAM<sup>5</sup>. A troponina é usada como exame

padrão ouro para diagnóstico de IAM podendo se elevar diante de microinfartos mesmo na ausência de elevação de CK-MB<sup>4</sup>. Por permanecer com níveis elevados por períodos prolongados, a troponina não deve ser utilizada para detecção de reinfarto.

Apesar dos critérios diagnósticos bem definidos, algumas situações ainda apresentam desafios no reconhecimento e adoção de estratégias de reperfusão precoce no IAM. Na prática nem toda dor torácica é típica e alguns infartos podem se manifestar através de equivalentes isquêmicos (náuseas, diaforese, epigastria, dispneia, palpitações, síncope)<sup>4</sup>. O supradesnivelamento do segmento ST pode indicar outras doenças que não infarto, podendo representar pericardite, alteração de repolarização precoce, bloqueio de ramo esquerdo ou síndrome de Brugada<sup>7</sup>. A elevação da troponina (isoladamente) pode não significar isquemia crítica das coronárias, também estando elevada em situações como doença renal crônica, tromboembolismo pulmonar ou pericardite<sup>8</sup>. Soma-se a essas dificuldades a não disponibilidade de kits qualitativos para dosagem desses marcadores nas unidades de pronto atendimento, ou seja, esses kits não conseguem quantificar a elevação ou queda desses valores.

Nos últimos anos a expressão gênica passou a ser utilizada para diagnóstico e a busca por alvos moleculares analisou transcriptomas completos para compreender melhor as patogêneses de diversas doenças<sup>10</sup>. O transcriptoma é o conjunto de RNA mensageiros expressos por uma célula ou tecido de um organismo. O reconhecimento de assinaturas de expressão gênica pode evidenciar padrões associados a determinadas doenças que podem ser utilizados para testes diagnósticos moleculares. Existem várias técnicas para se obter amostras de transcriptomas, como a técnica de luminescência (microarranjo) e o a técnica de sequenciamento (RNAseq). Microarranjos utilizam a hibridização de ácidos nucleicos para avaliar a expressão gênica, enquanto a RNAseq emprega o sequenciamento para quantificação dos transcritos. A fim de facilitar o acesso a informações sobre esses dados biológicos, os transcriptomas utilizados passaram a integrar uma ampla base de dados disponível em domínio público (NCBI-GEO)<sup>11</sup> permitindo que estudos secundários sejam realizados com esses produtos.

Um método inovador conhecido como deconvolução computacional de transcriptomas possibilita delinear a celularidade a partir do RNA mensageiro. A deconvolução de dados de transcriptomas tem sido aplicada em diversas áreas da medicina como em estudos de lúpus eritematoso sistêmico<sup>12</sup>, oncologia<sup>13</sup> entre outras. As porcentagens e valores celulares obtidas pelo método são estimativas da matriz de expressão computacional analisada, sendo uma maneira precisa de observar por exemplo, assinaturas de padrões celulares em determinadas condições patológicas<sup>14</sup>. Desta forma é possível, a partir de transcriptomas obtidos do sangue

de pacientes com IAM, obter informações das populações celulares e identificar a riqueza celular destes pacientes na vigência de um evento coronariano agudo.

Pretendemos nesse trabalho analisar de forma exploratória a deconvolução transcriptômica dos pacientes com IAM disponíveis no NCBI-GEO, a fim de investigar os parâmetros celulares com maior definição para se compreender o conteúdo da linhagem branca que está associada ao IAM e averiguar essa análise através do hemograma de pacientes com infarto.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a população de células sanguíneas associadas ao infarto agudo do miocárdio.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Reconstituir as células mais prevalentes em transcriptomas originários de sangue de pacientes com IAM;
- Correlacionar as células da linhagem branca encontradas em hemogramas de pacientes com IAM com os valores de CK-MB destes doentes.



### 3 METODOLOGIA

Trata-se de um estudo descritivo para reconstituir a celularidade sanguínea em pacientes com infarto agudo do miocárdio através do método de deconvolução transcriptômica e posteriormente comparar células da linhagem branca de hemogramas de pacientes com infarto com a CK-MB destes doentes.

#### 3.1 Seleção dos transcriptomas

Identificamos os dados de transcriptomas presentes no banco de dados da Gene Expression Omnibus (GEO) associados a pacientes com IAM. A busca por bancos de dados foi feita utilizando como palavra-chave myocardial infaction.

##### 3.1.1 Critérios de inclusão

- Transcriptomas obtidos de sangue de pacientes com IAM;
- Transcriptomas obtidos com menos de 12 horas da sintomatologia do evento coronariano agudo;
- Transcriptomas obtidos através de técnica de microarranjo.

##### 3.1.2 Critérios de exclusão

- Transcriptomas de pacientes infartados advindos de outros tecidos que não o sangue;
- Transcriptomas que foram obtidos com mais de 12 horas dos inícios de sintomas do evento coronariano agudo;
- Transcriptomas obtidos através de técnica de RNAseq.

Os dados de expressão transcriptômica foram baixados utilizando o pacote GEOquery disponível na plataforma R<sup>15</sup> e para a deconvolução dos transcriptomas foi utilizado o pacote immunedeconv<sup>14</sup>, com as referências celulares provenientes do banco de dados CIBERSORT<sup>14</sup>.

Realizamos análise diferencial dos genes expressos dos pacientes com IAM e comparamos com um grupo controle (composto por pacientes sem IAM) através de fold change visando saber o quanto a expressão genica de pacientes infartados variava em relação ao grupo controle.

Posteriormente avaliamos o enriquecimento das vias metabólicas dos genes significantes encontrados com o objetivo de identificar quais vias estariam sendo direcionadas por esses genes. Para análise utilizamos o banco de dados de genes de células sanguíneas publicado por Puledran<sup>16</sup>.

Para a averiguar os achados encontrados pelo método computacional, realizamos análise de hemogramas de pacientes com IAM que foram internados em uma UTI cardiovascular de um hospital da cidade do Salvador/BA, correlacionando os valores celulares encontrados com os valores da CK-MB.

O estudo foi submetido à apreciação do Comitê de Ética, respeitando as diretrizes e critérios estabelecidos na Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) que normatiza a confidencialidade e a privacidade, com aprovação para a coleta dos dados (CAE: 61412022.9.0000.5028).

### **3.2 Critérios de elegibilidade**

#### 3.2.1 Critérios de inclusão

- Pacientes com supradesnivelamento do segmento ST e/ou troponina positiva e posterior confirmação de IAM por método de cateterismo;
- Pacientes que tenham hemograma e CK-MB coletados de forma concomitante em menos de 12 horas do início dos sintomas.

#### 3.2.2 Critérios de exclusão

- Pacientes menores de 18 anos;
- Presença de neoplasias sanguíneas;
- Tratamento recente com quimioterapia;
- Síndrome de imunodeficiência;
- Infecções ativas ou com menos de 7 dias de resolução;
- Pacientes com taxa de filtração glomerular  $<30\text{ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ .

### **3.3 Coleta de dados para validação**

Foram coletados dados como leucograma, idade, sexo, CK-MB e tempo em minutos do início do sintoma até a coleta do exame. A coleta dos dados foi feita de forma retrospectiva (os pacientes não estavam mais na unidade no momento da coleta) dispensando a necessidade de aplicação do TCLE.

### **3.4 Análise estatística**

A estatística descritiva foi feita com cálculos de frequência e porcentagem para as variáveis qualitativas e medidas de tendências centrais e medidas de dispersão para as variáveis quantitativas. A estatística inferencial foi feita com teste de Mann Whitney e teste de qui-quadrado para variáveis nominais qualitativas. Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado como estatisticamente significativo.

## 4 RESULTADOS

O levantamento dos dados para a análise exploratória foi iniciado com a busca ativa de transcriptomas e ao todo foram encontrados 12 datasets com transcriptomas de sangue de pacientes com IAM obtidos com menos de 12 horas de sintomas, totalizando 213 amostras de transcriptomas (Tabela 1). Com isso, fizemos o download dos bancos de dados e notamos que somente dois bancos de dados se enquadravam ao critério de inclusão (GSE60993 e GSE61144) por se tratar de transcriptomas obtidos através da técnica de microarranjos, sendo os outros datasets excluídos pois tinham seus metadados obtidos pela técnica de sequenciamento.

**Tabela 1** – Descrição do conjunto de dados selecionados para análises de transcriptomas

<b>Código de acesso</b>	<b>Patologia</b>	<b>Número de amostras</b>
GSE169594	IAM	4
GSE141512	IAM	4
GSE62646	IAM	28
GSE159657	IAM	10
GSE103182	IAM	30
GSE127853	IAM	3
GSE123342	IAM	48
GSE53211	IAM	9
<b>GSE60993</b>	<b>IAM</b>	<b>33</b>
GSE66360	IAM	49
<b>GSE61144</b>	<b>IAM</b>	<b>24</b>
GSE123487	IAM	4

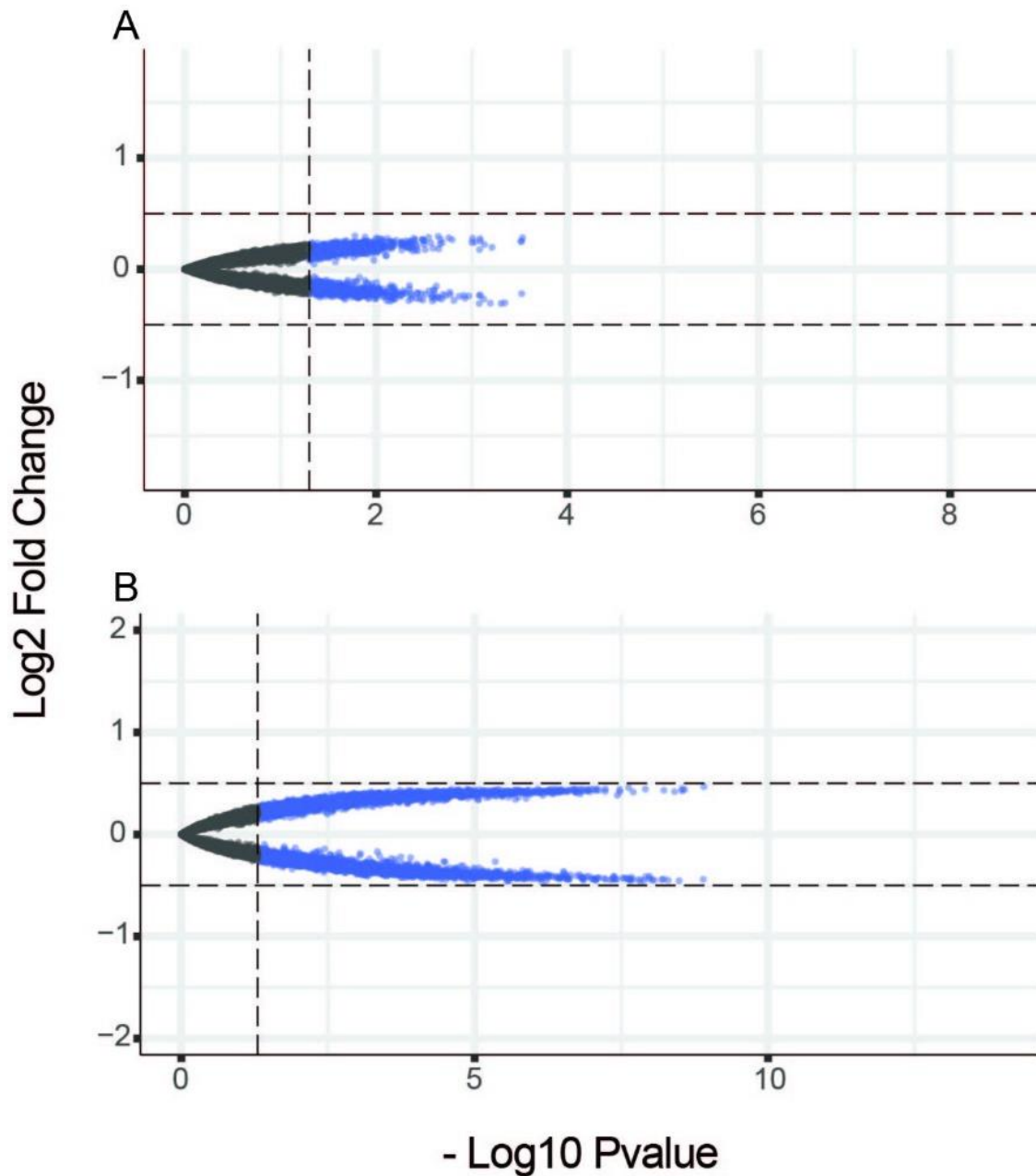
Em Negrito – Datasets selecionados para análise transcriptômica.

**Fonte:** Autor

Detalhando esses datasets, ambos os estudos, possuem amostras de sangue dos pacientes com síndrome coronariana aguda coletadas em Seul (Hospital St. Mary) com menos de 12 horas de sintomatologia e obtidos através de técnica de microarranjos.

Para entender o comportamento de expressão gênica dessas amostras, realizamos uma análise dos genes diferencialmente expressos, demonstrando que os pacientes com IAM, quando comparados com o grupo controle (composto por indivíduos saudáveis com angiografia coronária sem evidência de isquemia coronariana), apresentaram genes significantes, entretanto

não apresentaram grande variação de expressão gênica, com pouca variação no fold change (valor de  $p < 0.05$ , com diferença de expressão gênica de magnitude entre + ou - 0.5 fold change) (Figura 1).



**Figura 1** - Análise diferencial dos genes expressos durante a alterações no segmento ST (A - GSE60993 e B - GSE61144). As cores representam: em preto a não significância ou alteração nos valores de fold change, azul representa significância estatística com p value abaixo de 0.05.

**Fonte:** Autor

Após avaliar os genes diferencialmente expressos, relacionamos a sua função através do enriquecimento das vias celulares associados às células sanguíneas utilizando como referência o banco de genes para o metabolismo de células sanguíneas publicado por Puledran<sup>16</sup>. Os genes

diferencialmente expressos dos pacientes que apresentaram IAM, estavam relacionados ao enriquecimento das células T, NK, monócitos, neutrófilos e células dendríticas, em ambos os datasets (GSE60993 e GSE61144) (Figura 2).



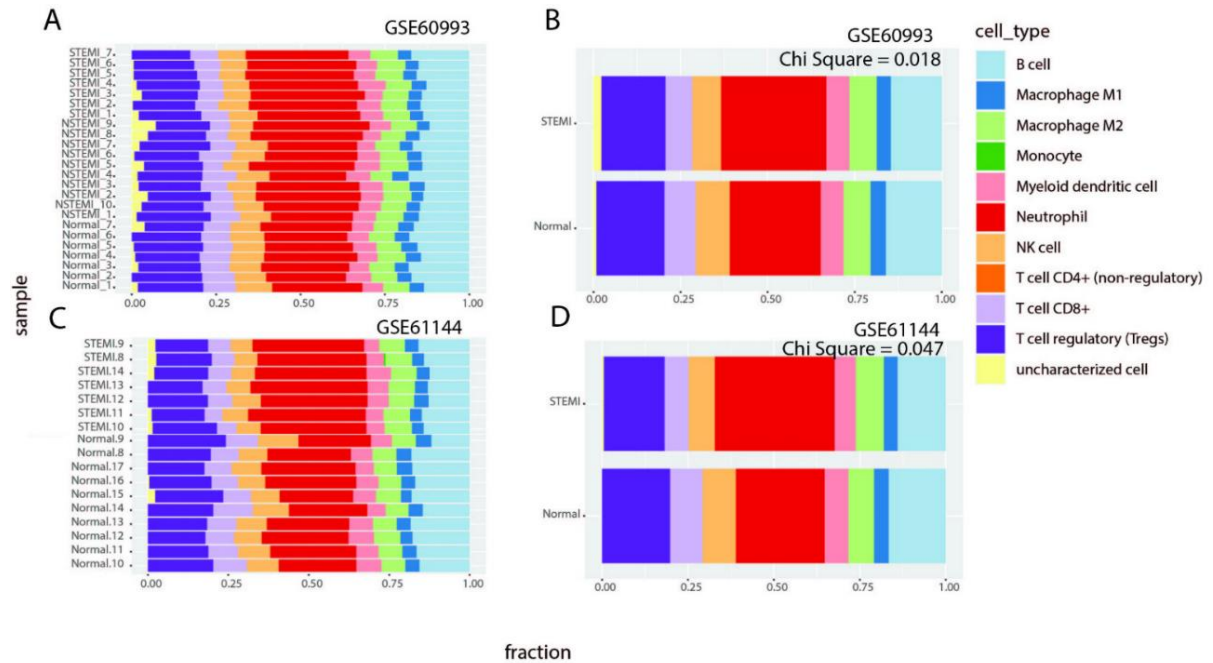
**Figura 2** - Análise de enriquecimento das vias metabólicas das células sanguíneas. As cores representam: em cinza a não significância ou alteração nos valores de fold change, azul representa significância estatística com os valores de p value transformados em  $-\log_{10}$ , com as vias mais significantes com cores próximas a escala roxa, e menos significantes em vermelho. O tamanho do círculo representa a razão de genes encontrada na via e os fornecidos como significantes, representando as maiores circunferências, as vias que possuem mais genes significantes.

**Fonte:** Autor

A avaliação dos genes diferencialmente expressos e as vias enriquecidas associadas nos sugeriu uma forte influências das T, NK, monócitos, neutrófilos e células dendríticas, nos eventos do IAM.

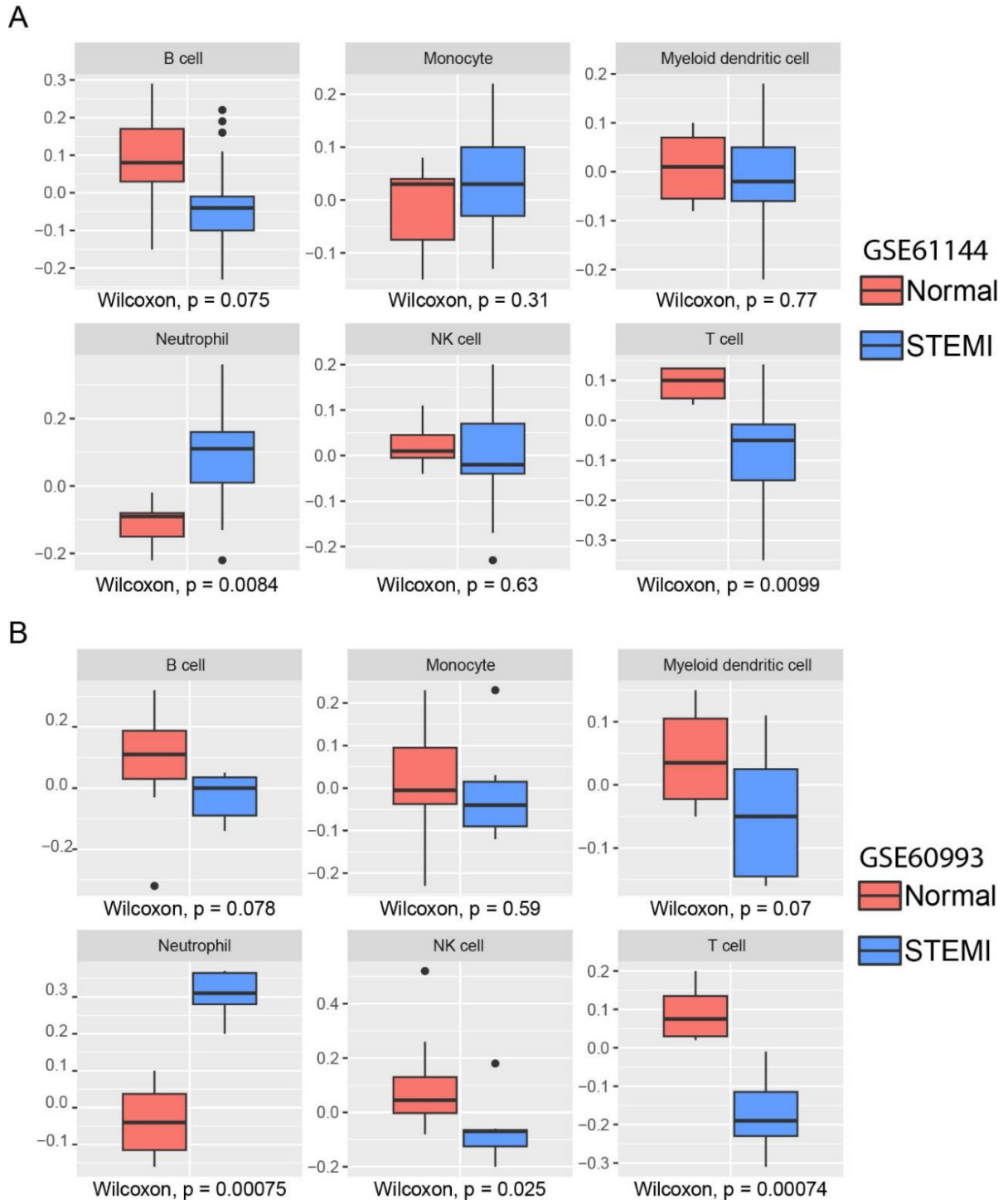
Reconstruímos a partir da deconvolução as populações celulares dos pacientes com IAM em ambos os datasets: GSE60993 e GSE61144 (Figura 3). As proporções das populações celulares dos pacientes com IAM demonstrou um aumento de neutrófilos e diminuição de linfócitos T e B, em ambos os datasets, de forma significativa. Quando avaliamos os números absolutos da reconstituição transcriptômica, encontramos um aumento dos valores de

neutrófilos ( $P < 0.05$ ) e diminuição de células T ( $P < 0.05$ ) em ambos os datasets, GSE61144 (Figura 4A) e GSE60993 (Figura 4B).



**Figura 3** - Reconstituição das populações celulares por deconvolução transcriptômica dos pacientes com alterações no segmento ST e de indivíduos sem infarto. A e C apresentam valores individuais de cada paciente e em B e D valores conglomerados e comparados estatisticamente pelo teste qui-quadrado. Sendo considerados significativos aqueles valores com P valor menor igual a 0.05.

**Fonte:** Autor



**Figura 4** - Comparação dos valores absolutos da reconstituição das populações celulares por deconvolução transcriptômica dos pacientes com alterações no segmento ST e indivíduos saudáveis. A. Comparação entre os tipos celulares no dataset GSE61144. B. Comparação entre os tipos celulares no dataset GSE60993. As variáveis foram comparadas estatisticamente pelo teste de Mann Whitney, sendo considerados significativos aqueles valores com P valor menor igual a 0.05.

**Fonte:** Autor

Após encontrar indícios da participação das células reconstituídas por deconvolução transcriptômica, cujos neutrófilos apresentaram aumento e linfócitos diminuiram durante o IAM, averiguamos se existia alguma tendência de aumento de neutrófilos e redução de



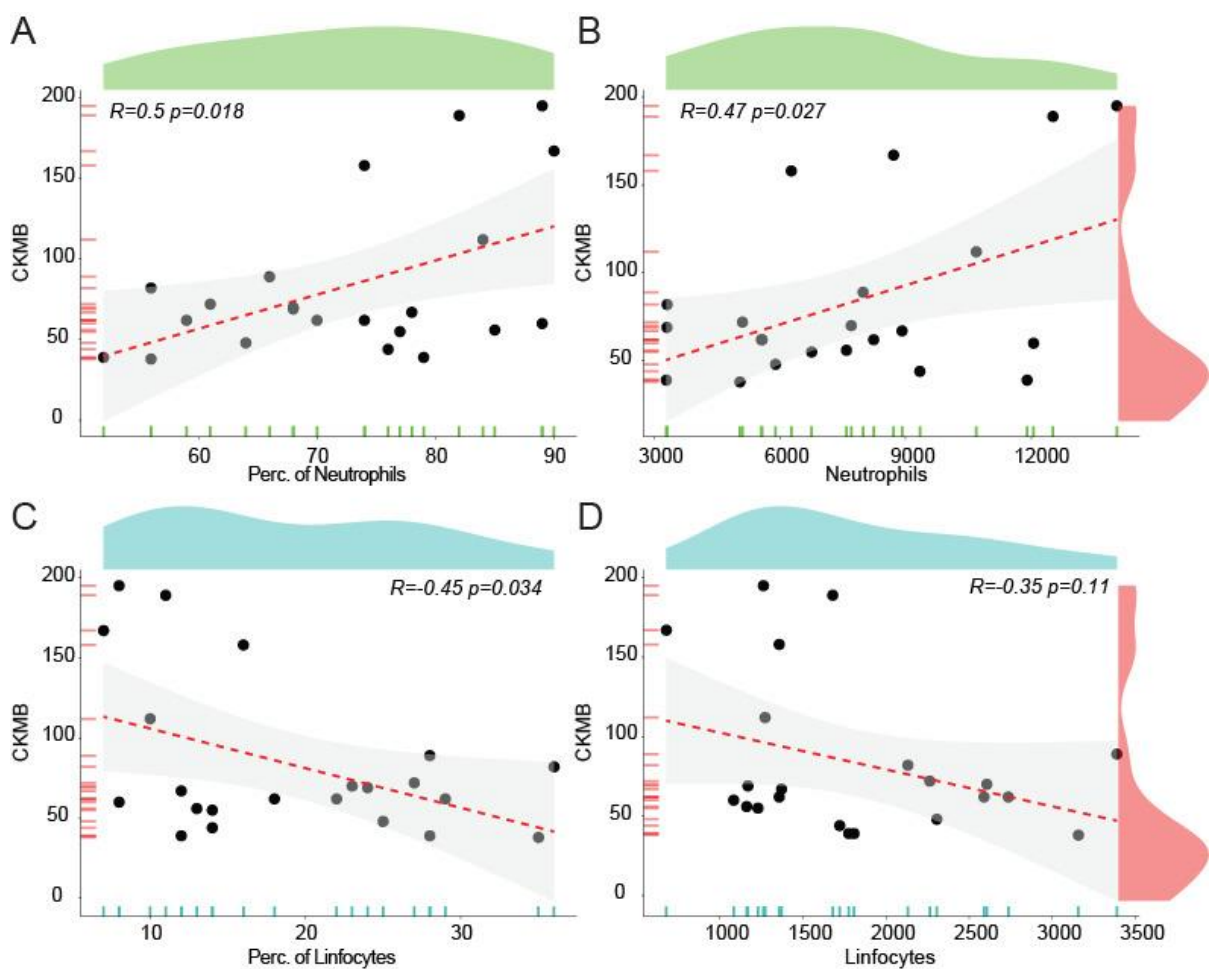
linfócitos em hemogramas de pacientes com IAM e para isso coletamos os dados de leucogramas e CK-MB de pacientes infartados para avaliar a relação das células com a CK-MB. Ao todo foram coletadas informações do prontuário de 22 pacientes (54,5% do sexo masculino), com média de idade de 65 anos (desvio padrão de 12,4), média de tempo de sintomatologia do início dos sintomas de IAM até a coleta dos exames de 208 minutos (desvio padrão de 91,7) e CK-MB e celularidade no leucograma. Os dados relativos à idade, tempo de sintomatologia do início dos sintomas até a coleta dos exames, valor da CK-MB e celularidade no leucograma seguiram distribuição normal, sendo descritos a partir do cálculo da média e desvio padrão de seus valores (Tabela 2).

**Tabela 2** – Características clínicas e laboratoriais dos pacientes da UTI cardiovascular do Hospital Geral Roberto Santos entre janeiro e março de 2023.

<b>Dados</b>	<b>Média</b>	<b>Valores de referência</b>
<b>Sexo Masculino, n (%)</b>	12 (54.5%)	
<b>Idade, média (desvio padrão)</b>	65 (12.4)	-----
<b>Tempo de sintomatologia até a coleta dos exames (min), média (desvio padrão)</b>	208 (91.7)	-----
<b>CK-MB (U/l), média (desvio padrão)</b>	83,4 (48.8)	< 24 U/I
<b>Leucócitos totais (leucócitos/mm<sup>3</sup>), média (desvio padrão)</b>	10357,2 (3025.7)	4000 – 10000 / mm <sup>3</sup>
<b>Neutrófilos (neutrófilos/mm<sup>3</sup>), média (desvio padrão)</b>	7719,4 (3094.8)	1800 – 7000/ mm <sup>3</sup>
<b>Basófilos (basófilos /mm<sup>3</sup>), média (desvio padrão)</b>	13,8 (30.7)	50 – 600/mm <sup>3</sup>
<b>Eosinófilos (Eosinófilos/ mm<sup>3</sup>, média (desvio padrão)</b>	130,4 (137.7)	0 – 200/mm <sup>3</sup>
<b>Linfócitos típicos (linfócitos típicos/mm<sup>3</sup>), média (desvio padrão)</b>	1822,5 (728.6)	1000 – 4000 / mm <sup>3</sup>
<b>Monócitos (monócitos/microlitros), média (desvio padrão)</b>	661,5 (279.4)	80 – 1200/mm <sup>3</sup>

Fonte: Autor

Após a descrição inicial das amostras, investigamos a relação entre a significância encontrada na análise dos neutrófilos e CKMB e dos linfócitos e CK-MB desses pacientes. O aumento dos valores de neutrófilos e diminuição de células T em pacientes com IAM estar correlacionado com os valores encontrados de CK-MB destes pacientes (Figura 5). Mais detalhadamente os valores em percentuais de neutrófilos e linfócitos apresentaram respectivamente correlação positiva ( $R = 0.5$ ) e negativa ( $R=-0.45$ ) de forma significativa ( $P < 0.05$ ), entretanto as contagens absolutas das células só apresentaram relevância estatística para os valores de neutrófilos ( $R = 0.47$  e  $P < 0.05$ ).



**Figura 5** – Correlação entre valores percentuais e contagem absoluta de neutrófilos e linfócitos com valores de CK-MB. A. Correlação linear entre valor percentual de neutrófilo e CK-MB. B. Correlação linear entre contagem absoluta de neutrófilos e CK-MB. C. Correlação linear entre contagem absoluta de linfócitos e CK-MB. D. Correlação linear entre valor percentual de linfócitos e CK-MB. Em vermelho histograma representando valores de CK-MB, em verde histograma representando valores de neutrófilos e em azul histograma representando células valores de linfócitos. Um valor de  $P < 0,05$  foi considerado significativo.

**Fonte:** Autor

## 5 DISCUSSÃO

Dos 12 datasets encontrados com transcriptomas de sangue de pacientes com IAM em menos de 12 horas de sintomas, apenas 2 obedeceram aos critérios de inclusão do estudo (GSE60993 e GSE61144), por se tratar de transcriptomas obtidos através de método de microarranjos. Apesar do transcriptoma estar se tornando cada vez mais popular, ainda é pouco explorado, o que pode acarretar dados numericamente rasos. A escolha da obtenção dos transcriptomas pela técnica de microarranjos em detrimento da técnica de sequenciamento se deve a maior facilidade de análise destes dados, exigindo menor poder computacional.

A derivação de células foi gerada a partir do algoritmo do sistema Cybersort em virtude de este ser um dos atlas de transcriptomas de maior especificidade para células sanguíneas<sup>14</sup>.

A variação da expressão gênica dos datasets de microarranjos foi analisada avaliando-se os valores de significância estatística e o valor de Fold Change. Apesar de encontrarmos genes significantes em nossas comparações, as diferenças de expressão gênica não foram elevadas, isso porque o IAM é uma doença de instalação aguda e os transcriptomas do sangue foram coletados com menos de 12 horas do curso da patologia. Esse curto período pode explicar a pouca variação de expressão gênica dos pacientes com IAM quando comparados ao grupo controle.

A análise das vias metabólicas celulares direcionadas pelos genes significantes revelou que os pacientes com IAM possuíam elevado enriquecimento para ativação de células imunológicas. Apesar da baixa variação na expressão dos genes, os genes diferencialmente expressos foram capazes de perceber a mudança no sistema imunológico durante o IAM, que se inicia nas primeiras horas de obstrução coronariana. O estudo BATTLE-AMI (Avaliação dos Linfócitos Tipos B e T no Infarto Agudo do Miocárdio), onde um dos objetivos foi estudar o comportamento do sistema imune durante a fase precoce do IAM, mostrou prevalência de citocinas pró-inflamatórias (IL1  $\beta$  e IL18) no sangue de pacientes com IAM no primeiro dia do evento coronariano<sup>17</sup>. A ativação do sistema imunológico durante o IAM se inicia nas primeiras horas de obstrução coronariana severa visando reparação miocárdica e dando início ao processo de substituição do tecido necrosado por tecido fibrótico cicatricial<sup>18,19</sup>.

A deconvolução transcriptômica mostrou o aumento do número de neutrófilos e a redução do número de linfócitos T em sangue de pacientes com IAM em comparação ao grupo controle. O enriquecimento das vias metabólicas realizada anteriormente já havia dado indícios do que foi observado pelo método da deconvolução. A maior elevação de neutrófilos reflete o estado de exacerbação inflamatória que ocorre durante a síndrome coronariana aguda. A

participação dos neutrófilos na lesão miocárdica isquêmica se faz através de fatores mecânicos (aderência e agregação endotelial resultando em maior comprometimento do fluxo sanguíneo coronariano) e bioquímicos (através da liberação de radicais livres, enzimas proteolíticas, leucotrienos e substâncias vasoconstrictoras), sendo determinantes para a extensão e gravidade da lesão<sup>20</sup>. Já a redução dos linfócitos pode estar relacionada a estresse fisiológico presentes no IAM, o que determina maior produção de cortisol e posterior decréscimo linfocitário no sangue<sup>21, 22</sup>.

Foram inclusos 22 pacientes na pesquisa, a falta de dados consistentes nos prontuários ocasionou um aproveitamento menor de pacientes infartados. A maioria dos pacientes faziam seus primeiros atendimentos em UPAs e depois eram transferidos para a UTI e neste hiato muitos dados se perdiam. Alguns prontuários estavam sem valores precisos do tempo de sintomatologia até a coleta do primeiro exame, alguns exames de hemograma eram oriundos de amostras diferentes das amostras analisadas para os resultados de CK-MB. Todos esses fatores dificultaram bastante o processo de seleção dos pacientes para inclusão no estudo.

A maioria da população do estudo era idosa do gênero masculino. A média de idade dos pacientes com IAM foi de 65 anos (DP  $\pm$  12,4), resultado consoante com a média de idade da população brasileira com IAM<sup>23</sup>. O tempo médio do início da sintomatologia até a coleta de exames foi de 208 (DP  $\pm$  91,8) minutos, tempo este inferior ao reportado em estudos como Franco et al<sup>24</sup> e Muller et al<sup>25</sup>. Mesmo sendo um tempo menor quando comparado a outros estudos, este tempo ainda reflete uma demora na decisão da procura por atendimento médico, o que impacta diretamente no desfecho clínico da doença. De acordo com a IV diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Tratamento do IAM<sup>7</sup>, alguns fatores interferem na demora do paciente em procurar assistência médica, como: negação que a dor tenha procedência cardíaca, desconhecimento dos benefícios do atendimento rápido e a falta de disponibilidade de atendimento em alguns locais<sup>7</sup>.

Utilizamos os valores de CK-MB ao invés da troponina (exame de maior acurácia) pela ausência da mensuração quantitativa na maioria das unidades de saúde de média e baixa complexidade brasileiras. Os pacientes da UTI de onde os dados foram coletados advinham em sua maioria regulados de UPAs, não possuindo kits qualitativos de troponina que permitisse análise comparativa com os valores celulares encontrados nos hemogramas. Uma metanálises de diagnósticos retrospectivos de infarto do miocárdio demonstra que a CK-MB possui sensibilidade de 97% e especificidade de 90% para diagnóstico de IAM<sup>26</sup>.

A média do número de leucócitos foi de 10357,2 (DP  $\pm$  3025,7), estando levemente acima do limite superior do valor de referência (VR – 4000 – 10000). No IAM, é plausível que

haja uma elevação de leucócitos como parte da reação inflamatória da fase aguda<sup>27,28</sup>. Há evidências na literatura de que a elevação leucocitária está relacionada a maior mortalidade em pacientes com IAM<sup>29,30,31,32</sup>.

A média do número de neutrófilos foi de 7719,4 (DP  $\pm$  3025,7) e a média de linfócitos típicos foi de 1822,5 (DP  $\pm$  728,6). A literatura possui estudos analisando a associação de neutrófilos com contribuição para desenvolvimento de síndromes coronarianas agudas<sup>33</sup>, associação de neutrófilos com mortalidade e prognóstico de pacientes com IAM<sup>29,30,31,32</sup>. Os valores em percentuais de neutrófilos e linfócitos apresentaram respectivamente correlação positiva e negativa quando comparados a CK-MB. A análise de grupo controle correlacionando neutrófilos e linfócitos de pacientes sem IAM com a CK-MB desses pacientes não foi possível visto que não há elevação da CK-MB em doentes sem IAM.

Alguns estudos demonstraram que monócitos são células com maior poder preditor de risco no IAM<sup>34</sup>, enquanto outros estudos relacionam neutrófilos a maior predição de eventos coronarianos agudos<sup>35,36</sup>. O estudo Avaliação da Relação Neutrófilo/Linfócito em Pacientes com Suspeita de Síndrome Coronariana<sup>22</sup> demonstrou uma contagem total de neutrófilos menor em pacientes sem IAM e maior em pacientes com IAM. Quando analisado esses estudos a relação neutrófilos/linfócitos observou-se correlação com o diagnóstico da doença, enquanto em pacientes sem infarto a relação foi mais baixa<sup>22</sup>. A relação neutrófilos/linfócitos em valores de quartis mais elevados apresentou sensibilidade de 31% e especificidade de 91% para diagnóstico de IAM, com área sobre a curva ROC evidenciando uma acurácia de 63%<sup>22</sup>. O índice neutrófilos/linfócitos ainda foi correlacionado a CK-MB mostrando fraca, porém significativa correlação entre as duas variáveis<sup>22</sup>.

## 6 CONCLUSÃO

O método de deconvolução permite discriminar tipos celulares com maior sensibilidade, tornando-se promissor para a geração de insights de marcadores celulares. Essas evidências fornecem substrato para continuação da investigação de populações celulares associadas ao IAM.

Os achados deste estudo geram a hipótese de que dados derivados de um exame simples, de baixo custo e amplamente disponível, podem se tornar um parâmetro adicional ao raciocínio diagnóstico de IAM, principalmente em locais em que a falta de recurso impede o acesso a melhores métodos diagnósticos.

A neutrofilia e a linfopenia no IAM não devem ser utilizadas como parâmetro isolados, porém sugerem investigação mais aprofundada principalmente em pacientes cujo diagnóstico é duvidoso. Novas pesquisas com maior robustez de números analisados devem ser direcionadas para ratificar os achados deste estudo e quem sabe assim incorporar os parâmetros celulares ao fluxograma diagnóstico de IAM.

## REFERÊNCIAS

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World health statistics 2019**: monitoring health for the sdgs, sustainable development goals, 2019.
2. OLIVEIRA, G. M. M. et al. Cardiovascular Statistics - Brazil 2020. **Arq Bras Cardiol.** 2020;115(3):308-439. doi: 10.36660/abc.20200812.
3. ABDON C.; FERREIRA M.C.; TEIXEIRA C. **Planejamento & gestão de sistemas e serviços de saúde. série: informação para tomadores de decisão em saúde pública.** São Paulo: Bireme/Opas/OMS, 2002.
4. AHA. Adult basic life support: international consensus on cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care science with treatment. 2020.
5. BRANCACCIO, P.; LIPPI, G.; MAFFULLI, N. Biochemical markers of muscular damage. **Clin Chem Lab Med.** 2010;48(6):757-67.
6. PIEGAS, L. S. A T et al. Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre Tratamento do Infarto agudo do Miocárdio com Supradesnível do Segmento ST. **Arq Bras Cardiol.** 2009;93(6 Supl 2): e179-e264.
7. AVEZUM JUNIOR, A. et al. [V Guideline of the Brazilian Society of Cardiology on Acute Myocardial Infarction Treatment with ST Segment Elevation]. **Arq Bras Cardiol.** 105(2 Suppl 1):1-105, 2015.
8. BASSAN, R. P. L; LEAES, P. E; TIMERMAN, A. I Diretriz de Dor Torácica na Sala de Emergência. **Arq Bras Cardiol.** 79(supl.11):1-22, 2002.
9. PENN-NICHOLSON, A. et al. RISK6, a 6-gene transcriptomic signature of TB disease risk, diagnosis and treatment response. **Sci Rep.** 10(1):8629, 2020.
10. AVILA, COBOS F. et al. Computational deconvolution of transcriptomics data from mixed cell populations. **Bioinformatics.** 2018;34(11):1969-1979.
11. EDGAR, R.; DOMRACHEV, M.; LASH, A. E. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. **Nucleic Acids Res.** 30(1):207-210, 2002.
12. ABBAS, A. R. et al. Deconvolution of blood microarray data identifies cellular activation patterns in systemic lupus erythematosus. **PLoS One**, 4, e6098, 2009.
13. AHN, J. et al. DeMix: deconvolution for mixed cancer transcriptomes using raw measured data. **Bioinf. Oxf. Engl.**, 29, 1865–1871, 2013.
14. STURM, G. et al. Comprehensive evaluation of transcriptome-based cell-type quantification methods for immuno-oncology. **Bioinformatics.** 35(14):i436-i445, 2019.
15. DAVIS, S.; MELTZER, P. S. GEOquery: a bridge between the Gene Expression Omnibus (GEO) and BioConductor. **Bioinformatics.** 23(14):1846-1847, 2007.

16. PULENDRAN, B.; LI, S.; NAKAYA, H.I. Systems vaccinology. **Immunity**. 33(4):516-529, 2010.
17. COSTE, M. E. R. et al. Early Changes in Circulating Interleukins and Residual Inflammatory Risk After Acute Myocardial Infarction. **Arq Bras Cardiol**. 115(6):1104-1111, 2020.
18. BURKE, A. P; TAVORA, F. **Practical Cardiovascular Pathology**. Lippincott Williams & Wilkins; 2010.
19. SILVER, M. D.; GOTLIEB, A. I, SCHOEN, F. J. **Cardiovascular Pathology**. 2001.
20. SIMINIAK, T.; FLORES, N. A.; SHERIDAN, D. J. Neutrophil interactions with endothelium and platelets: possible role in the development of cardiovascular injury. **Eur Heart J**. 16(2):160-170, 1995.
21. THOMSON, S. P.; MCMAHON, L. J. Nugent CA. Endogenous cortisol: a regulator of the number of lymphocytes in peripheral blood. **Clin Immunol Immunopathol**. 17(4):506-514, 1980.
22. ZAZULA, A. D. et al. An assessment of neutrophils/lymphocytes ratio in patients suspected of acute coronary syndrome. **Arq Bras Cardiol**. 90(1):31-36, 2008.
23. MENDES, L. F da S. et al. Análise epidemiológica das internações por infarto agudo do miocárdio no território brasileiro entre 2012 e 2021. **Res Soc Dev**. 11(5):e55611528533, 2021.
24. FRANCO, B. et al. Patients with acute myocardial infarction and interfering factors when seeking emergency care: implications for health education. **Rev Lat Am Enfermagem**. 16(3):414-418.21, 2008.
25. MULLER, L. A. et al. Fatores de atraso na administração de terapia trombolítica em pacientes com diagnóstico de infarto agudo do miocárdio em um hospital geral. **Rev Latinoam Enferm**. 16(1):52-6, 2008.
26. WU, A. H. B. Creatine Kinase, Isoenzymes, and Variants. In: **Cardiac Markers**. Humana Press. 113-125, 1998.
27. COLLER, B. S. Leukocytosis and ischemic vascular disease morbidity and mortality: is it time to intervene? **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. 25(4):658-670, 2005.
28. THOMSON, S. P. et al. Incremental value of the leukocyte differential and the rapid creatine kinase-MB isoenzyme for the early diagnosis of myocardial infarction. **Ann. Intern Med**. 122:335-41, 1995.
29. CANNON, C. P. Association of white blood cell count with increased mortality in acute myocardial infarction and unstable angina pectoris. OPUS-TIMI 16 Investigators. **Am J Cardiol**. 87(5):636-639, A10, 2001.



30. BARRON, H.V. et al. The association between white blood cell count and acute myocardial infarction mortality in patients  $>$  or  $=65$  years of age: findings from the cooperative cardiovascular project. **J Am Coll Cardiol.** 38(6):1654-1661, 2001.
31. SABATINE, M. S. et al. Relationship between baseline white blood cell count and degree of coronary artery disease and mortality in patients with acute coronary syndromes: a TACTICS-TIMI 18 (Treat Angina with Aggrastat and determine Cost of Therapy with an Invasive or Conservative Strategy- Thrombolysis in Myocardial Infarction 18 trial)substudy. **J Am Coll Cardiol.** 40(10):1761-1768, 2002.
32. PATEL, M. R. et al. Prognostic usefulness of white blood cell count and temperature in acute myocardial infarction (from the CARDINAL Trial). **Am J Cardiol.** 95(5):614-618, 2005.
33. MARECHAL, P. et al. Neutrophil Phenotypes in Coronary Artery Disease. *J Clin Med Res.* 9(5). doi:10.3390/jcm9051602, 2020.
34. SWEETNAM, P. M. et al. Total and differential leukocyte counts as predictors of ischemic heart disease: the Caerphilly and Speedwell studies. **Am J Epidemiol.** 145(5):416-421, 1997.
35. HUANG, Z. S. et al. Peripheral differential leukocyte counts and subsequent mortality from all diseases, cancers, and cardiovascular diseases in Taiwanese. **J Formos Med Assoc.** 102(11):775-781, 2003.
36. KAWAGUCHI, H. et al. Band neutrophil count and the presence and severity of coronary atherosclerosis. **Am Heart J.** 132 (1 Pt 1): 9-12, 1996.