

CAMILA RODRIGUES MORENO

**VESÍCULAS EXTRACELULARES CONTENDO
ANTÍGENOS DE AGENTES INFECCIOSOS NO SORO
DE PACIENTES COM DAC ATEROSCLERÓTICA E
SUA INFLUÊNCIA NA INSTABILIDADE DA PLACA**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências.

Programa de: Cardiologia

Orientador: Profa. Dra. Maria de Lourdes
Higuchi

**São Paulo
2022**

CAMILA RODRIGUES MORENO

**Vesículas extracelulares contendo antígenos de
agentes infecciosos no soro de pacientes com DAC
aterosclerótica e sua influência na Instabilidade da
placa**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Ciências.

Programa de: Cardiologia

Orientador: Profa. Dra. Maria de Lourdes
Higuchi

**São Paulo
2022**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Moreno, Camila Rodrigues
Vesículas extracelulares contendo antígenos de
agentes infecciosos no soro de pacientes com DAC
aterosclerótica e sua influência na instabilidade da
placa / Camila Rodrigues Moreno. -- São Paulo, 2021.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Cardiologia.
Orientadora: Maria de Lourdes Higuchi.

Descritores: 1. Infarto do miocárdio
2. Aterosclerose 3. Vesículas extracelulares
4. Microbioma 5. Archaea 6. Mycoplasma pneumoniae

USP/FM/DBD-372/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

*Dedico este trabalho aos meus
pais, minha fonte de inspiração.*

Agradecimentos

À Deus por ter me dado sabedoria, paciência, saúde e força, necessários para conduzir este sonho.

Aos primeiros responsáveis por isso tudo, à minha base, Mauricio Donizeti Moreno e Maria Cleine Rodrigues Moreno, os melhores pais que Deus poderia ter me dado.

Obrigada pelo empenho na minha criação e educação, por muitas vezes terem se abdicado dos seus sonhos para que eu pudesse sonhar os meus. Vocês são exemplos de comprometimento, respeito, responsabilidade, integridade e humanidade. A conclusão desse trabalho é uma maneira de dizer obrigada por tudo, esse título é nosso e eu estou levando ele pra casa. Amo vocês imensuravelmente.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria de Lourdes Higuchi, obrigada pela confiança e por ter contribuído tanto com a minha formação pessoal e acadêmica. Agradeço por todo suporte científico ofertado para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. Dr. José Antônio Franchini Ramires, por ter confiado em meu trabalho e por ter aberto as portas dessa instituição que tornou-se minha segunda casa e por muitas vezes à primeira.

O admiro demasiadamente como pessoa, médico e docente.

Aos meus companheiros de trabalho e amigos integrantes do Laboratório de Patologia Cardíaca, Renata Ikegami, Joyce Kawakami, Suely Palomino e Marcia Reis, agradeço à todo apoio técnico ofertado, mas acima disso, por terem contribuído diretamente ou indiretamente com o meu desenvolvimento científico, profissional e pessoal.

Ao Dr. Alexandre de Matos Soeiro, pelo exemplo de dedicação profissional, pelas palavras de incentivo e por sempre ser tão solícito. Agradeço a avaliação clínica dos pacientes infartados que compuseram esse estudo e pela disponibilização dos mesmos.

Você foi peça fundamental na realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. José Carlos Nicolau, por ter aberto as portas da UTI Clínica Coronariana e por disponibilizar sua equipe assistencial, para que a coleta de pacientes com infarto grave fosse possível.

Ao Prof. Dr. Whady Armino Hueb, agradeço por contribuir com o delineamento desse estudo, pelo esclarecimento de dúvidas e pela avaliação clínica e oferta dos pacientes ateroscleróticos estáveis que compuseram esse trabalho.

Aos membros da minha banca de qualificação, Prof. Dr. Luiz Aparecido Bortolotto, Prof. Dr. Alfredo José Mansur e Dr. Pedro Silvio Farsky, pelas sugestões e apontamentos pertinentes que engrandeceram esse estudo.

À minha ex orientadora, Profa. Dra. Maria Luiza Moraes Barreto-Chaves, por ter aberto as portas da pesquisa e da Cardiologia. Agradeço pela condução dos meus primeiros passos e por ter fomentado a minha base científica.

À Dra. Caroline Antunes Lino, que durante seu doutoramento assumiu o papel de Co-Orientadora e despertou em mim o amor pela ciência. Grande parte do que sou como profissional e do que sei devo à você. Jamais me esquecerei da amizade e dos ensinamentos técnicos e científicos. Você é uma cientista brilhante, amo você e tenho uma admiração imensa por ti.

Aos amigos do Laboratório de Miocardiopatias, Dra. Keila Cardoso Fonseca, Dra. Fernanda Gallinaro Pessoa, Orlando Ribeiro e Prof. Dr. Felix José A. Ramires, pela amizade, pela confiança, pelas trocas, por sempre me receberem muito bem e por terem me ajudado quando mais precisei. Obrigada por tudo, amo vocês.

Aos amigos do Laboratórios Metabolismo de Lipídeos e LIM-56, pela ajuda, disponibilidade, apoio e carinho.

À Msc. Jaqueline de Jesus Pereira, pela amizade e pela contribuição científica. Foi um prazer imenso dividir momentos da pós-graduação com você, te admiro por estar sempre disponível a ajudar todos que precisam de você. Obrigada pela torcida, por acreditar na minha competência como profissional e por ter aberto as portas do InovaInCor para mim.

Obrigada por tudo, amo você.

Aos amigos e companheiros de trabalho do núcleo InovaInCor, que hoje faço parte, Prof. Dr. Fabio Biscegli Jatene, Guilherme Rabello, Rosangela Monteiro, Adriana Quadros, Jaqueline de Jesus Pereira e Anderson Manucci, por em pouco tempo terem me enriquecido tanto e expandido a minha visão de pesquisa, que hoje vejo também como uma ferramenta de mercado. Como o Guilherme apostou, de fato, me encontrei na Inovação. Obrigada à todos por tudo.

À todos os membros da minha família, Rodrigues e Moreno, pelo apoio e incentivo. Amo vocês. Em especial à minha vó materna, Raimunda Cavalcante Rodrigues, minha segunda mãe, por ter cuidado de mim na infância e adolescência e por contribuído tanto com a pessoa que eu sou hoje. A senhora é um exemplo de força para mim. Amo a senhora.

À minha vó paterna Maria de Lourdes Moreno – in memoriam.

Ao meu namorado, Gabriel Burk de Oliveira, pela cumplicidade, pelo companheirismo, por ter me incentivado, pelas palavras de carinho e pela paciência comigo durante esse processo. Amo você, meu bem.

À Capes e a FAPESP, pelo apoio financeiro e por acreditar nesse projeto.

Ao Departamento de Cardiologia, do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

***“Tenho a impressão de ter sido uma criança
brincando à beira-mar, divertindo-me em
descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha
mais bonita que as outras, enquanto o imenso
oceano da verdade continua misterioso diante de
meus olhos”.***

Isaac Newton

Normalização

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	24
1.1. Patogênese da Aterosclerose e Infarto Agudo do Miocárdio.....	24
1.2. Contribuição dos Agentes Infecciosos na Patogênese e no Agravamento da Aterosclerose	28
1.3. Vesículas Extracelulares na Aterosclerose: Possível biomarcador?	31
2. OBJETIVOS	36
2.1. Objetivo geral	36
2.2. Objetivos específicos	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1.1 População de Estudo	39
3.1.2 Critérios de Inclusão	41
3.2.1 Separação e Armazenamento dos Soros	42
3.2.2. Separação das frações dos soros – Isolamento de Vesículas Extracelulares	42
3.3.1. Inclusão rápida do soro pela Microscopia Eletrônica de Transmissão	43
3.3.2. Técnica de imunodeteção pós-inclusão (pós-embedding)	44
3.4. Caracterização das Microvesículas e Exossomos no Soro.....	45
3.5. Análise da distribuição do tamanho e da concentração das VECs séricas por Rastreamento de Nanopartículas - NTA (NanoSight)	48
3.6. Citometria de fluxo	49
3.7. Western Blotting.....	50
3.8. Zimografia de Gelatina.....	51
3.9. Determinação do Potencial Zeta	52

3.10. Análise do Perfil Inflamatório pela Citometria de Fluxo (CBA-Cytometric Bead Array).....	52
3.11. Análise Estatística	53
4. RESULTADOS.....	55
4.1. Populações estudadas (tabela de características de linha de base)	55
4.3. Quantificação de VECs séricas (microvesículas e exossomos) pelo Nanosight.....	61
4.4. Expressão proteica de CD63 – Western Blotting	63
4.5. Quantificação (%) da atividade de MMP9	65
4.6. Análise de Microvesículas Infecciosas pela Citometria de Fluxo (0,8-1,34 µm).....	66
4.7. Potencial Zeta	68
4.8. Painel de citocinas inflamatórias	69
5. DISCUSSÃO	73
6. CONCLUSÃO.....	83
7. ANEXOS	85
7.1. Anexo A – Parecer consubstanciado do CEP do HC FMUSP.....	85
7.2. Anexo B - Parecer consubstanciado do CEP do HU USP	93
7.3. Anexo C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	89
7.4. Anexo D – Publicação do artigo fruto da tese	93
8. REFERÊNCIAS.....	94

Listas de Abreviaturas

BSA	albumina de soro bovino (bovine sérum albumin)
CAPPesq	Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisa
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DAMPs	padrões associados a danos moleculares (damage-associated molecular patterns)
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético (ethylenediaminetetraaceticacid)
ELSA	Estudo Longitudinal da Saúde do Adulto (Brazilian Longitudinal Study of Adult Health)
ERICO	Estratégia de Registro de Síndrome Coronariana Aguda (Strategy of Registry of Acute Coronary Syndrome)
Exo	exossomos
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
Fe	ferro
g	grama
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IAM	infarto agudo do miocárdio
IFN	interferón
IgG	imunoglobulina G
IL	interleucina
LDLox	lipoproteína de baixa densidade oxidada (oxidized low density lipoproteins)
L	litro
MASS	Medicine, Angioplasty and Surgery Study (Estudo de Medicina, Angioplastia e Cirurgia)
miRNA	microRNA
mM	miliMolar

M	molar
MMPs	metaloproteinases
Mn	magnésio
MV	microvesículas
NaCl	cloreto de sódio
Na	sódio
ng	nanograma
nm	nanometro
PBS	tampão fosfato salino (phosphate-buffered saline)
RNA	ácido ribonucleico
ROS	espécies reativas de oxigênio (reactiveoxygenspecies)
rpm	rotação por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio (sodiumdodecyl sulfate)
SOD	superoxidodismutases
TBST	solução salina tris tamponada com tween 20 (tris buffered saline withtween 20)
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
TNF	fator de necrose tumoral (tumoral necrosisfactor)
VECs	vesículas extracelulares
µg	micrograma
µl	microlitro
µm	micrometro
°C	graus Celsius

Lista de Figuras

Figura 1 – Ilustração da quantificação/diferenciação dos Exos e MVs pelo IrfanView e Aperio Image Scope.....	46
Figura 2 – Quantificação de VECs e Imunomarcção para MMP9 e <i>M. pneumoniae</i> pela Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	59
Figura 3 – Quantificação absoluta de VECs pelo Nanosight – NTA.....	62
Figura 4 – Validação do método de separação – Western Blotting para CD63 (marcador específico para exossomo).....	63
Figura 5 – Análise da atividade enzimática de MMP9, através da Zimografia de gelatina.....	65
Figura 6 – Quantificação de iMV's pela Citometria de Fluxo.....	67
Figura 7 – Quantificação da carga elétrica das VECs — Potencial Zeta.....	69
Figura 8 – Painel de Citocinas Inflamatórias (CBA): Concentrações de citocinas (fg/mL) no soro dos pacientes nos diferentes grupos de estudo.....	71

Lista de Símbolos

Bases nitrogenadas dos nucleotídeos

Adenina.....	A
Citosina.....	C
Guanina.....	G
Timina.....	T

Símbolos

Alfa.....	α
Beta.....	β
Gama.....	γ
Micro.....	μ

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Classificação de Killip.....	40
Tabela 2 – Critérios de Inclusão.....	41
Tabela 3 – Características de base dos 168 pacientes estudados nos diferentes grupos.....	56

MORENO, Camila Rodrigues. **Vesículas extracelulares contendo antígenos de agentes infecciosos no soro de pacientes com DAC aterosclerótica e sua influência na instabilidade da placa.** 2021. 109 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto do Coração, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

As comunidades microbianas são consideradas decisivas tanto para manutenção da saúde ou para a determinação de doenças. O infarto agudo do miocárdio (IAM) é uma complicação importante da aterosclerose causada pela ruptura de placas de ateroma contendo citocinas pró-inflamatórias, espécies reativas de oxigênio, lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (LDLox), proteínas danificadas, lipídios e DNA, gerando um microambiente favorável para a comunidade microbiana patogênica. Anteriormente, constatamos que microvesículas infecciosas (iMVs) contendo DNA de arqueia, estavam presentes em abundância em placas vulneráveis e no soro de pacientes com insuficiência cardíaca ocasionada pela doença de Chagas. Nesse estudo atual, caracterizamos e quantificamos as vesículas extracelulares infecciosas (iVECs) séricas provenientes do microbioma, por meio de seu tamanho e conteúdo, usando análises morfomoleculares que permitiu estratificar e diferenciar os defechos clínicos da doença arterial coronariana (DAC). Detectamos um número aumentado de iMVs entre 0,8-1,34 µm, com carga de superfície altamente negativa, positivas para DNA de arqueia, antígenos de *Mycoplasma pneumoniae* e MMP9 no soro de pacientes com IAM grave, favorecendo fortemente nossa hipótese de que arqueias patogênicas

podem desempenhar um papel importante, na progressão da doença aterosclerótica e pior desfecho clínico. Os números mais altos de VECs <100 nm (exossomos) e MVs de 100 a 200 nm nos grupos ateroscleróticos estáveis e controles saudáveis em comparação com os grupos IAM foram indicativos de que essas VECs são protetoras, podendo captar e degradar antígenos infecciosos e MMP9 ativa, afim de proteger contra o desenvolvimento da ruptura da placa.

Conclusão - Microbioma com arqueias patogênicas está associado à quantidades elevadas de iMVs séricos no IAM com pior prognóstico. Este trabalho demonstra pioneiramente que a caracterização morfomolecular e quantificação de iMVs no soro pode constituir um biomarcador prognóstico sérico promissor em DAC.

Palavras Chaves: Infarto Agudo do Miocárdio, Vesículas Extracelulares, Microbioma, Arqueia, *Mycoplasma pneumoniae*.

MORENO, Camila Rodrigues. **Extracellular vesicles containing antigens from infectious agents in the serum of patients with DAC atherosclerotic and their influence on plaque instability.** 2021. 109 f. Thesis (Doctorate in Sciences) – Heart Institute, Faculty of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, 2021.

Microbial communities are considered decisive for maintaining a healthy situation or for determining diseases. Acute myocardial infarction (AMI) is an important complication of atherosclerosis caused by the rupture of atheroma plaques containing proinflammatory cytokines, reactive oxygen species, oxidized low-density lipoproteins (LDLox), damaged proteins, lipids and DNA, a microenvironment compatible with a pathogenic microbial community. Previously, we found that archaeal DNA-positive infectious microvesicles (iMVs) were detected in vulnerable plaques and in the sera of Chagas disease patients with heart failure. Now, we characterize and quantify the levels of serum microbiome infectious extracellular vesicles (iVECs) through their size and content using morphomolecular techniques to differentiate clinical outcomes in coronary artery disease (CAD). We detected increased numbers of large iMVs (0.8-1.34 μm) with highly negative surface charge that were positive for archaeal DNA, *Mycoplasma pneumoniae* antigens and MMP9 in the sera of severe AMI patients, strongly favoring our hypothesis that pathogenic archaea may play a role in the worst outcomes of atherosclerosis. The highest numbers of EVs <100 nm (exosomes) and MVs from 100 to 200 nm in the stable atherosclerotic and control healthy

groups compared with the AMI groups were indicative that these EVs are protective, entrapping and degrading infectious antigens and active MMP9 and protect against the development of plaque rupture.

Conclusion – A microbiome with pathogenic archaea is associated with high numbers of serum iEVs in AMI with the worst prognosis. This pioneering work demonstrates that the morphomolecular characterization and quantification of iEVs in serum may constitute a promising serum prognostic biomarker in CAD.

Key Words: Myocardial Infarction, extracellular vesicles, microbiome, Archaea, *Mycoplasma pneumoniae*.

1 INTRODUÇÃO

1.1. Patogênese da Aterosclerose e Infarto Agudo do Miocárdio

A aterosclerose é uma doença crônica, caracterizada pela inflamação da parede vascular e participação do sistema imune no desenvolvimento da lesão⁽¹⁾. Suas complicações, em particular infarto agudo do miocárdio (IAM) e acidente vascular cerebral, constituem a principal causa de mortalidade no mundo⁽²⁾.

Um passo crucial na iniciação e progressão da aterosclerose é o recrutamento de monócitos na parede da artéria, onde eles se diferenciam em macrófagos, internalizam lipoproteínas, removem detritos e células mortas e se transformam em células espumosas⁽³⁾. O microambiente em uma placa aterosclerótica contém citocinas pró-inflamatórias, altos níveis de lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (LDLox), cristais de colesterol e uma variedade de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), liberados durante a morte celular⁽⁴⁾. Também são encontradas espécies reativas de oxigênio (ROS) em abundância⁽⁵⁾, que danificam proteínas, lipídios e o DNA, afetando assim a atividade metabólica celular⁽⁶⁾. Forma-se uma cápsula fibrosa por deposição de colágeno e proteoglicano que circunscreve o ateroma, procurando estabilizar o crescimento da placa.

É classicamente descrito, que a entrada e retenção da LDLox na parede arterial é acarretada por alterações concomitantes na permeabilidade endotelial e na composição da matriz extracelular sob o endotélio, e que componentes dessa

moléculas modificadas bioquimicamente induzem a adesão de leucócitos e endocitose promovida por fagócitos⁽⁷⁾. Além disso, há evidências de que a maior contribuinte para a formação das lesões ateroscleróticas, seja a LDLox, uma vez que a incubação *in vitro* de LDL-C (nativa), mesmo em altas concentrações não leva macrófagos a se converterem em células espumosas⁽⁸⁾.

No entanto, apesar dos avanços sobre o entendimento dos fatores que contribuem para a patogênese da aterosclerose, ainda há um grande questionamento a ser respondido: porque as partículas de LDL se oxidam gerando inflamação e ativação do sistema imune⁽⁹⁾?

Atualmente, as doenças inflamatórias têm sido relacionadas a um desbalanço redox e efeitos do excesso de espécies oxidantes nos organismos (estresse oxidativo). A oxidação é parte fundamental da via aeróbica e do metabolismo, e os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. O desequilíbrio (distúrbios na produção, distribuição ou superabundância de ROS a partir de fontes endógenas ou fatores ambientais) tem sido relacionado à patogênese de diversas doenças, incluindo cardiovasculares, neurodegenerativas, alguns tipos de cânceres, bem como processo de envelhecimento⁽¹⁰⁾. Isso leva a acreditar que atuar sobre esse desequilíbrio redox seja uma alternativa de tratamento promissora. No entanto, grande parte dos ensaios clínicos com terapias antioxidantes não têm mostrado resultados eficazes na contenção dos fatores de risco cardiovasculares^(11,12,13). Apesar de outras etiologias associadas ao desenvolvimento de IAM, a ruptura da placa na doença aterosclerótica continua sendo o principal evento na formação de trombo, que

ocorre em 90% dos casos de oclusão total do lúmen coronariano⁽¹⁴⁾, indicando papel crítico da composição da placa, e não somente o tamanho da placa ou a gravidade da estenose.

Em síntese, o IAM originado pela ruptura da placa arterial coronariana ocorre devido à exposição dos componentes trombogênicos da placa, ativando cascatas de coagulação, que induz ao desenvolvimento e propagação do trombo ao longo da artéria coronariana. O acúmulo de trombos na artéria lesionada promove isquemia aguda com apoptose/necrose do miocárdio, e posteriormente amplificação da zona necrótica em direção ao epicárdio⁽¹⁵⁾.

Em comparação com as placas que causam estenose luminal grave, as placas vulneráveis podem causar estenose relativamente menor pois se associam à um remodelamento positivo, mas geralmente são mais volumosas, e são responsáveis por mais casos de ruptura e trombose. Um dos eventos que precede a vulnerabilidade e ruptura da placa é a diminuição da espessura da capa fibrosa, em decorrência da depleção dos componentes de matriz por meio de ativação de enzimas, como metaloproteinases⁽¹⁶⁾.

Diferentes metaloproteinases de matriz (MMPs) são responsáveis por regular diversos processos na homeostase vascular. Na doença aterosclerótica, podem tanto promover a degradação da matriz extracelular, quanto favorecer a migração e proliferação de células musculares lisas, promovendo a síntese da capa fibrótica⁽¹⁷⁾.

Dentre as MMPs, a MMP9 tem sua expressão aumentada em respostas a agentes inflamatórios, sendo a principal collagenase encontrada em placas

ateroscleróticas, em especial aquelas com aparência morfológicamente vulneráveis⁽¹⁸⁾.

Também se verificou estreita relação entre a MMP9 e IAM. Os níveis dessa collagenase encontram-se aumentados logo após um evento isquêmico agudo, correlacionando-se com a diminuição da fagocitose macrofágica e comprometimento da função ventricular esquerda⁽¹⁹⁾. Já o oposto se observa quando há deleção da MMP9, levando a melhora no remodelamento do ventrículo esquerdo, restabelecendo a função cardíaca⁽²⁰⁾.

Embora haja evidências da contribuição da MMP9 na vulnerabilidade e no IAM, ainda há necessidade da elucidação sobre que fatores que podem coordenar sua expressão e/ou ativação.

1.2. Contribuição dos Agentes Infecciosos na Patogênese e no Agravamento da Aterosclerose

A redução efetiva do colesterol tem se mostrado como insuficiente para interromper ou reverter o processo aterosclerótico⁽²¹⁾, sendo assim, ainda se questiona que outros fatores estariam contribuindo para manutenção da doença. Nas últimas décadas, têm surgido propostas de que a instabilidade da placa e o agravamento da aterosclerose ocorram por estímulos de agentes infecciosos. As comunidades microbianas são consideradas cada vez mais importantes para homeostase do organismo, uma vez que a alteração de sua composição pode levar tanto à manutenção do estado fisiológico ou à condição patológica⁽²²⁾. A ruptura do ateroma ocorre em placas contendo citocinas pro-inflamatórias, espécies reativas de oxigênio, lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (LDLox) proteínas danificadas, lipídios e DNA, gerando um microambiente favorável à comunidade microbiana patogênica.

Essa teoria infecciosa tem sido reforçada, por evidências de que agentes infecciosos que geram infecções no trato respiratório e disbiose da microbiota intestinal, estão também presentes nas placas ateroscleróticas humanas^(23,24,25). Numerosos patógenos, principalmente vírus e bactérias, foram identificados como fatores que contribuem para o estado inflamatório crônico da aterosclerose, a maioria endopatógenos intracelulares capazes de estabelecer infecção persistente^(26,27,28).

Esse processo infeccioso promove a ativação diferencial de células do sistema imune, capazes de secretar fatores pró-inflamatórios abundantes, tais como TNF- α , IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, e IL-17⁽²⁹⁾. Hoje se sabe que o balanço entre as citocinas pró e antiinflamatórias é um fator determinante para a estabilidade da placa aterosclerótica^(30,31).

Além disso, há comprovação de que microorganismos além de promover aumento de citocinas pró-aterogênicas, podem também agir por efeito direto através da infecção de macrófagos e células endoteliais, aumentando a expressão moléculas de adesão, fatores de crescimento e ROS⁽³²⁾.

Dentre os patógenos identificados em placas ateroscleróticas humanas, em maior quantidade nas placas rotas e vulneráveis⁽³³⁾, estudos em nosso laboratório evidenciaram importante atuação de *Mycoplasma pneumoniae* (*M. pneumoniae*) e *Chlamydomphila pneumoniae*^(34,35). Reforçando a importância desses microorganismos no agravamento da aterosclerose, estudos clínicos mostraram aumento de níveis de anticorpos anti-*Chlamydomphila pneumoniae* e anti-*M.pneumoniae* após IAM^(36,37).

Micoplasma são procariotos que crescem em simbiose interagindo com células do hospedeiro e apresenta características únicas como a necessidade de colesterol para sua sobrevivência. Quando expostos a situações estressantes, são capazes de liberar vesículas extracelulares (VECs) contendo proteínas e genes, como resposta a esse estresse, podendo aumentar o seu fator de virulência e permitir sua adaptação a vários ambientes, levando ao seu crescimento e sobrevivência⁽³⁸⁾.

Além da participação do *M. pneumoniae* na patogênese da aterosclerose, em estudo anterior, Higuchi e cols.⁽³⁹⁾ identificaram VECs revestidas por dupla membrana com conteúdo eletrólucido, no interior de placas vulneráveis em associação com a degeneração mixomatosa da placa. Estas VECs continham DNA de arqueia, sugerindo uma possível etiologia infecciosa.

Arquéias são microorganismos muito antigos, mas só descobertos na década de 70 e que mudaram a classificação genealógica, compondo um dos três domínios descritos por Woese⁽⁴⁰⁾ (*Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya*). É o ser mais primitivo existente na natureza, apresenta membrana com carga elétrica negativa, capacidade de oxidação, produção de metalopeptidases e indução de inflamação. Sua presença nas placas ateroscleróticas pode levar à inflamação, fragmentação do colágeno e instabilidade da placa^(41,42,43,44). Caracterizam-se por oxidar hidrogênio e reduzir metais como Fe (ferro) e Mn (manganês)^(45,46), favorecendo a produção de radicais livres. Sabe-se que placas vulneráveis são ricas em radicais livres e ROS⁽⁴⁷⁾. Sendo assim, questiona-se como *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* e outros microorganismos apresentam maior crescimento nesse ambiente desfavorável? Uma possível explicação seria o fato de que superóxido dismutases (SOD), que são frequentes nas arqueias⁽⁴⁸⁾, impediria a oxidação do oxigênio diminuindo radicais livres, favorecendo a proliferação microbiana dentro da placa aterosclerótica.

Além disso, aquisição por transferência horizontal de abundantes genes primitivos derivados de arqueia foi descrita em patógenos persistentes, sugerindo que esses genes conferem estratégias adaptativas para a sobrevivência dos mesmos

em ambientes danosos aos microorganismos⁽⁴⁹⁾. A presença de arqueias poderia explicar resultados prévios de grande quantidade de *M. pneumoniae* no interior das placas vulneráveis⁽⁵⁰⁾ e bactérias como as periodontais⁽⁵¹⁾.

1.3. Vesículas Extracelulares na Aterosclerose: Possível biomarcador?

Embora originalmente vesículas extracelulares (VECs) tenham sido consideradas artefatos ou um sinal de morte celular, na última década passaram a ser consideradas como mediadoras de comunicação celular de longo alcance, presentes na maioria dos fluidos corporais. Além disso, a literatura descreve que agentes infecciosos também liberam vesículas extracelulares (iVECs), que neste trabalho denominamos exossomos infecciosos (iExos), ou microvesículas infecciosas (iMVs)^(52,53).

As VECs são compostas por uma bicamada lipídica, envolvem material citosólico solúvel e componentes nucleares, e são classificadas de acordo com a sua biogênese e tamanho: as microvesículas (MVs) com diâmetro > 100 a 1000 nm, e os exossomos (Exo) de 40 à 100 nm⁽⁵⁴⁾.

Os Exos são vesículas formadas pelo brotamento da membrana do endossomo, uma etapa crucial na formação dessas vesículas é a reorganização das proteínas de membrana endossomal em microdomínios enriquecidos com tetraspanina, uma família de proteínas de membrana, também conhecidas como

CD81, CD9 e CD63. Subseqüencialmente, os complexos de classificação endossomal necessário para transportes, também conhecido como ESCRTs (*endosomal sorting complex required for transport*) são recrutados para o local de brotamento, impulsionando a liberação dos exossomos^(53,55).

Já as MVs surgem a partir do brotamento externo e da fissão da membrana plasmática. Por serem resultados da interação dinâmica entre a redistribuição de fosfolipídios e a contração da proteína do citoesqueleto, sua biogênese requer vários rearranjos moleculares dentro da membrana, incluindo alteração dos componentes lipídicos e proteicos e aumento do transiente de Ca²⁺ dentro da célula^(52,54). Após a secreção, tanto as microvesículas quanto os exossomos podem ser transferidos para as células receptoras através de: endocitose, interação receptor-ligante ou fusão direta⁽⁵¹⁾.

As VECs participam da comunicação intercelular, promovendo transferência de informações biológicas como proteínas, lipídios, material nuclear, miRNA e RNAs não codificantes da célula de origem, podendo contribuir com efeitos funcionais remotos. Promovem homeostase e imunidade em processos fisiológicos, atuando também em processos patológicos, incluindo a resposta inflamatória^(56,57).

Em placas de ateroma humanas tem sido descrita presença de grande quantidade de VECs^(58,59). As VECs isoladas de lesões ateroscleróticas humanas são altamente trombogênicas e se originam de diversas células, como macrófagos, linfócitos, eritrócitos, células musculares lisas e endoteliais ^(58,60,61). Atuam desde a formação inicial da lesão à progressão da placa, promovendo o

aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias, disfunção endotelial através da diminuição de NO, aumentando a expressão de moléculas de adesão, favorecendo a proliferação/migração de células musculares lisas, através da supressão do sistema imune e fornecimento de enzimas pró-apoptóticas aos fagócitos^(62,63,64,65,66,67).

Além da participação das VECs na modulação do sistema imune e no estabelecimento na doença aterosclerótica, foi também evidenciado que VECs provenientes de macrófagos M1 (pró-inflamatórios) favorecem o processo de microcalcificação da capa fibrótica através da ativação de vias osteogênicas, provocando modificação no estresse local, promovendo assim a ruptura da placa⁽⁶⁸⁾.

Em contrapartida, estudos com modelos experimentais de IAM e in vitro, evidenciaram que células progenitoras cardíacas após injúria, secretavam Exos com capacidade cardioprotetora, promovendo reparo tecidual cardíaco através da diminuição da área de infarto, apoptose, remodelação cardíaca patológica e promoção da angiogênese^(69,70,71). Tais evidências são sugestivas de que as VECs têm papel importante nas doenças crônicas inflamatórias humanas e no IAM. Entretanto, até o presente momento, o entendimento sobre suas participações e funções nessas patologias permanece incerto, visto a complexidade de caracterização e diferenciação das VECs protetoras e as “nocivas”.

Com base no exposto acima, é fundamental esclarecer se as infecções desempenham um importante papel na patogênese da aterosclerose e suas complicações, e como as infecções por diferentes patógenos e seus metabólitos

interferem no curso da doença.

As VECs provenientes dos microorganismos presentes na placa estariam atuando na interação entre a comunidade microbiana-hospedeiro e na resposta imune? Elas poderiam auxiliar a identificar fatores preditivos da doença aterosclerótica e IAM?

Uma das grandes dificuldades no acompanhamento dos pacientes com aterosclerose é conseguir identificar os pacientes vulneráveis. Um biomarcador específico e sensível, que possa ser identificado de forma rápida, com baixo custo e pouco invasiva, pode mudar significativamente a história natural da doença cardiovascular.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar se as VECs e os agentes infecciosos se associam ao desenvolvimento da vulnerabilidade da placa aterosclerótica, através da análise direta em soros humanos para detecção de antígenos (Ags) infecciosos em VECs circulantes. Verificar se contagem das VECs no sangue circulante, marcadas com antígenos ou DNA de agentes infecciosos poderiam ser utilizadas como indicadores de eventos agudos isquêmicos.

2.2. Objetivos específicos

1. Quantificar e caracterizar microvesículas e exossomos presentes no soro de pacientes ateroscleróticos, pacientes infartados e indivíduos saudáveis, através da morfologia, tamanho, carga e composição dessas VECs.
2. Investigar se há VECs provenientes de agentes infecciosos (*Mycoplasma pneumoniae* e Arquéias), e se estariam relacionados com a piora na evolução clínica do IAM.
3. Avaliar se a presença de VECs de agentes infecciosos no soro de pacientes infartados, estaria associada ao aumento da quantidade e da

atividade de MMP9, colagenase presente no IAM.

4. Avaliar se o perfil inflamatório dos pacientes é diferente entre os grupos de estudo e analisar se as quantidades desses marcadores inflamatórios estariam relacionadas com a presença e/ou ausência de agentes infecciosos.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1.1 População de Estudo

Esse trabalho foi realizado no Instituto do Coração (InCor) da Universidade de São Paulo em São Paulo, Brasil, de Setembro de 2018 a março de 2020. O protocolo do estudo e termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi submetido ao Comitê Científico do InCor e foram aprovados pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), CAE 95700518.0.0000.0068 e parecer 2.827.637. (Anexo 1)

Nós estudamos prospectivamente 168 pacientes com doença aterosclerótica, infarto do miocárdio com segmento ST (IAMCSST) e indivíduos saudáveis. Os pacientes com IAMCSST foram divididos em grupos de acordo com a gravidade da doença seguindo a classificação de Killip⁽⁷²⁾. A classificação foi realizada no momento da admissão na sala de emergência, determinada para cada paciente pelo médico que o internou.

Os critérios de elegibilidade e a composição da amostra dos diferentes grupos de estudo são descritos abaixo:

- IAM (n=40): (IAM grau Killip I ou II, com supra desnivelamento de ST pelo ECG).
- IAM grave (n=34): (IAM grau Killip III ou IV, com supradesnivelamento de ST pelo ECG).

- CTL (n=34): (Controle, indivíduos saudáveis (LDL <130, HAS <130/80 e glicose sanguínea <99)
- ATR (n=40): (Ateroscleróticos estáveis, com obstrução $\geq 70\%$ em pelo menos duas artérias principais observadas por angiografia de coronária).

Para completar os casos dos grupos de IAM graves e CTL, usamos soros de 10 pacientes da clínica longitudinal estudos ELSA (Estudo Longitudinal Brasileiro de Saúde do Adulto) e ERICO (Estratégia de Registro de Síndrome Coronariana Aguda), com aprovação do subprojeto na CaPPesq do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (registro CEP-HU/USP: 866/08F). (Anexo 2)

O TLCE foi aplicado à todos os pacientes, ou familiares mais próximos quando os pacientes se encontravam incapacitados. (Anexo 3)

Tabela 1. Classificação de Killip

Killip I	<i>Sem dispnéia, terceira bulha ou estertoração pulmonar. Mortalidade=6%</i>
Killip II	<i>Dispnéia e estertoração pulmonar nos terços inferiores do tórax. Mortalidade=17%</i>
Killip III	<i>Edema agudo de pulmão. Mortalidade=38%</i>
Killip IV	<i>Choque cardiogênico. Mortalidade=81%</i>

3.1.2 Critérios de Inclusão

Para serem incluídos na pesquisa, os indivíduos deveriam apresentar os critérios de inclusão referentes ao seu respectivo grupo de estudo, conforme apresentados na tabela abaixo:

Tabela 2. Critérios de Inclusão dos indivíduos utilizados na pesquisa e seus respectivos grupos de estudo.

GRUPOS DE ESTUDO	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO
IAM	Idade superior a 18 anos.
	Diagnóstico de IAM estabelecido através da elevação dos biomarcadores de necrose cardíacos (preferencialmente troponina I), sintomas de isquemia e elevação no segmento ST.
	Grau de Killip I ou II
IAM grave	Idade superior a 18 anos.
	Diagnóstico de IAM estabelecido através da elevação dos biomarcadores de necrose cardíacos (preferencialmente troponina I), sintomas de isquemia e elevação no segmento ST.
	Grau de Killip III ou IV
CTL (Indivíduos Saudáveis)	Idade superior a 18 anos.
	Não apresentar: colesterol elevado, hipertensão, doença autoimune e doença crônica.
ATR (Ateroscleróticos)	Idade superior a 18 anos.
	Apresentar obstrução luminal igual ou maior que 70% em pelo menos duas artérias coronárias principais, diagnosticada visualmente pela cinecoronariografia (cateterismo cardíaco).

3.2.1 Separação e Armazenamento dos Soros

Foram coletados em tubo seco, aproximadamente, 10 ml de sangue total dos pacientes dos diversos grupos. Subsequentemente, os tubos ficaram por uma hora a 37°C para promover a retração do coágulo. A seguir foram centrifugados a 2000 rpm por 10 minutos, posteriormente os soros foram aliquotados em microtubos e armazenados em freezer -80° C.

3.2.2. Separação das frações dos soros – Isolamento de Vesículas

Extracelulares

Os soros previamente aliquotados foram descongelados, posteriormente as vesículas extracelulares foram isoladas. O método de isolamento foi realizado baseando-se em procedimento de separação de mitocôndrias descrito por Bustamente et al.(73) e modificado por nós, que possibilitou uma recuperação no soro de microvesículas e exossomos. Os soros foram diluídos (1:5) em meio H contendo 200 mM de D-manitol (Fresenius Kabi Brasil, Aquiraz, CE, BR), Sacarose 70 mM (EMS Electron Microscopy Sciences - Hatfield, PA, EUA), HEPES 2 mM (Fair Lawn, NJ, EUA) e 0,5 g/L BSA pH 7,2 (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e incubado por 1 h em temperatura ambiente (TA). As amostras foram então centrifugadas por 12 min a 9.500×g, e os sobrenadantes foram coletados para processamento pelas técnicas de análise morfobiomolecular.

Em nosso método de escolha utilizamos um meio rico em sacarose e manitol que possui densidade e osmolaridade semelhante aos meios utilizados

nos métodos de isolamento por ultracentrifugação diferencial (dUC) já validado pela ISEV⁽⁷⁴⁾. A dUC possibilita obter uma amostra com uma população específica através da aplicação de alta força de rotação. No entanto a purificação para obter uma população específica levaria à perda de uma amostra com populações heterogêneas, que podem perder importantes informações sobre a diferença na composição e na concentração dos diferentes subtipos de VECs de acordo com a gravidade da doença. Desse modo, nosso método permitiu isolar uma população de VECs heterogênea (com alta concentração em exossomos, e outras microvesículas presentes)⁽⁷⁵⁾, preservadas morfologicamente.

3.3.1. Inclusão rápida do soro pela Microscopia Eletrônica de Transmissão

A inclusão foi feita seguindo o procedimento descrito por Duarte et. al⁽⁷⁶⁾, com algumas modificações. As amostras, foram fixadas em glutaraldeído 3% à 4°C *overnight*, pós-fixados na solução tetróxido de ósmio 1% a 4°C por 2 horas e centrifugadas por 5 minutos. A seguir, foram lavadas em solução salina e incubadas em acetato de uranila 0,5% por 3 horas a 4°C. O material foi desidratado em etanol 70% por 10 minutos e 2,2- dimetoxipropano acidificado por 5 minutos, seguido de fixação em acetona e sulfato de cobre 4% por 2 minutos. A infiltração foi feita com uma mistura contendo resina eponEMbed 812 com resina araldite502 (1:1) e a polimerização em estufa 60°C por 24 horas. Os blocos foram cortados em ultramicrótomo com espessura entre 60-70 nm e colocados em telas

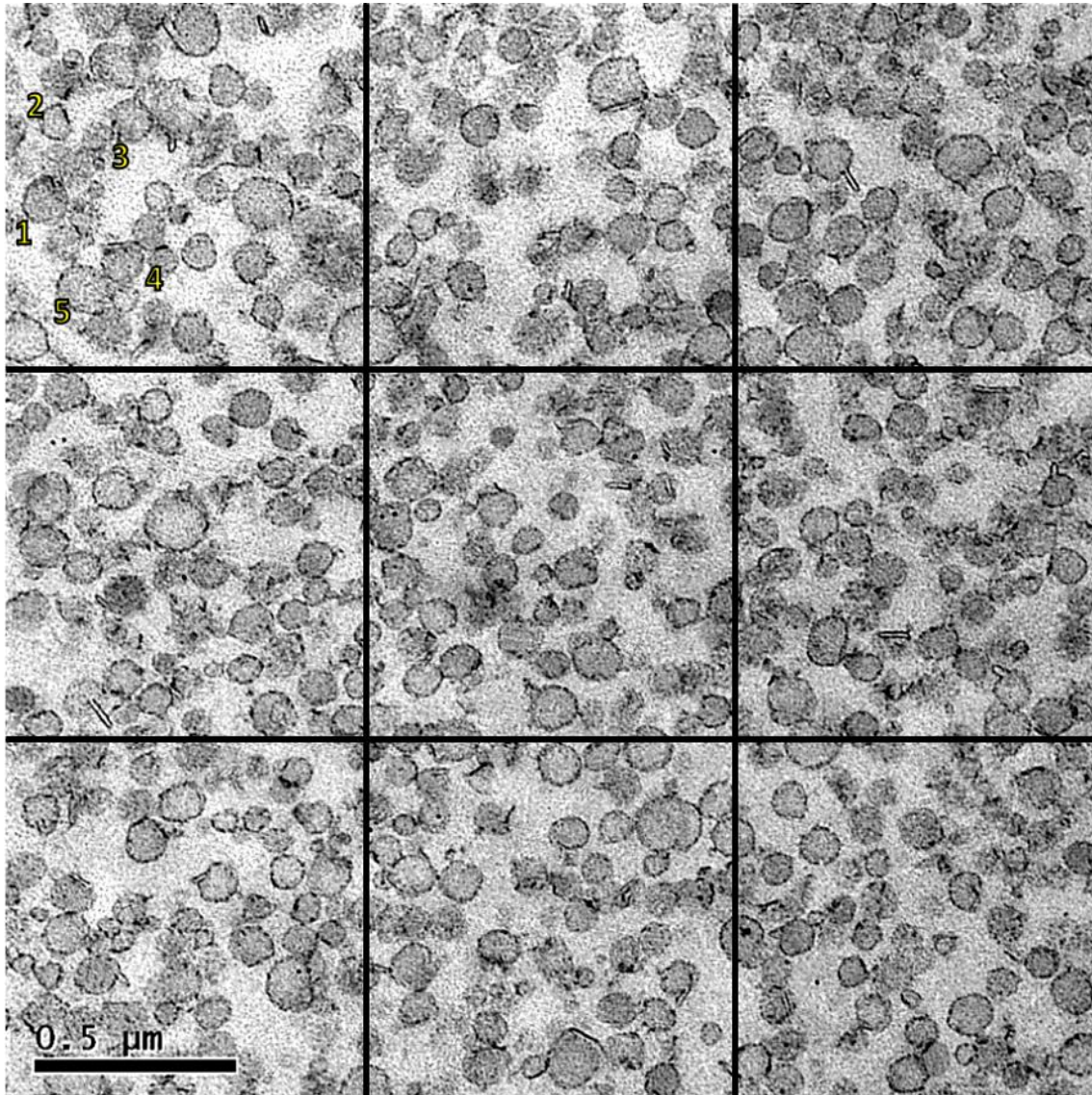
de cobre de 200 mesh revestidas com película de Parlódio ou Formvar, contrastadas com citrato de chumbo 0,08M por 10 minutos, para posterior análise em microscópio eletrônico de transmissão, onde foram fotografadas em aumento de 50.000x.

3.3.2. Técnica de imunodeteção pós-inclusão (pós-embedding)

Após a inclusão do material descrito previamente (3.3.1) os mesmos blocos foram cortados em ultramicrotomo com espessura entre 60-70 nm e colocados em telas de níquel com tamanho de 300 grades revestidas com película de Parlódio ou Formvar. As amostras foram hidratadas e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente com a solução Cas-block (Life Technologies, Frederick, MD, USA). Para possibilitar a quantificação de antígenos, as amostras foram incubadas com os diferentes anticorpos primários *M. pneumoniae* (#20MR54, Fitzgerald, USA) e MMP-9 (#RB1539P0, Thermo Scientific, UK), diluídos em solução contendo 0,1% de albumina bovina por 16 hs a 4°C, seguidas de lavagem em PBS a temperatura ambiente com incubação do anticorpo secundário (1:20) marcado com partículas de ouro de 10nm por 1 hora à temperatura ambiente. As telas foram contrastadas com citrato de chumbo por 10 minutos, para então serem fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão no aumento de 50.000x, para quantificação de antígenos.

3.4. Caracterização das Microvesículas e Exossomos no Soro

Foram analisadas quatro fotos de cada caso em áreas de maior concentração, avaliando o número de Exossomos (<100 nm) e de Microvesículas (> 100nm). Também foram analisadas 4 fotos de cada caso com imunomarcção dos diferentes anticorpos, sendo 2 fotos contendo grande quantidade de marcação e 2 fotos com grande quantidade de exossomos e/ou microvesículas. Foram quantificados antígenos presentes dentro e fora dos exossomos e MVs. Todas as imagens foram analisadas e quantificadas através dos programas IrfanView 4.5.2 e Aperio Image Scope (Leica Biosystems).



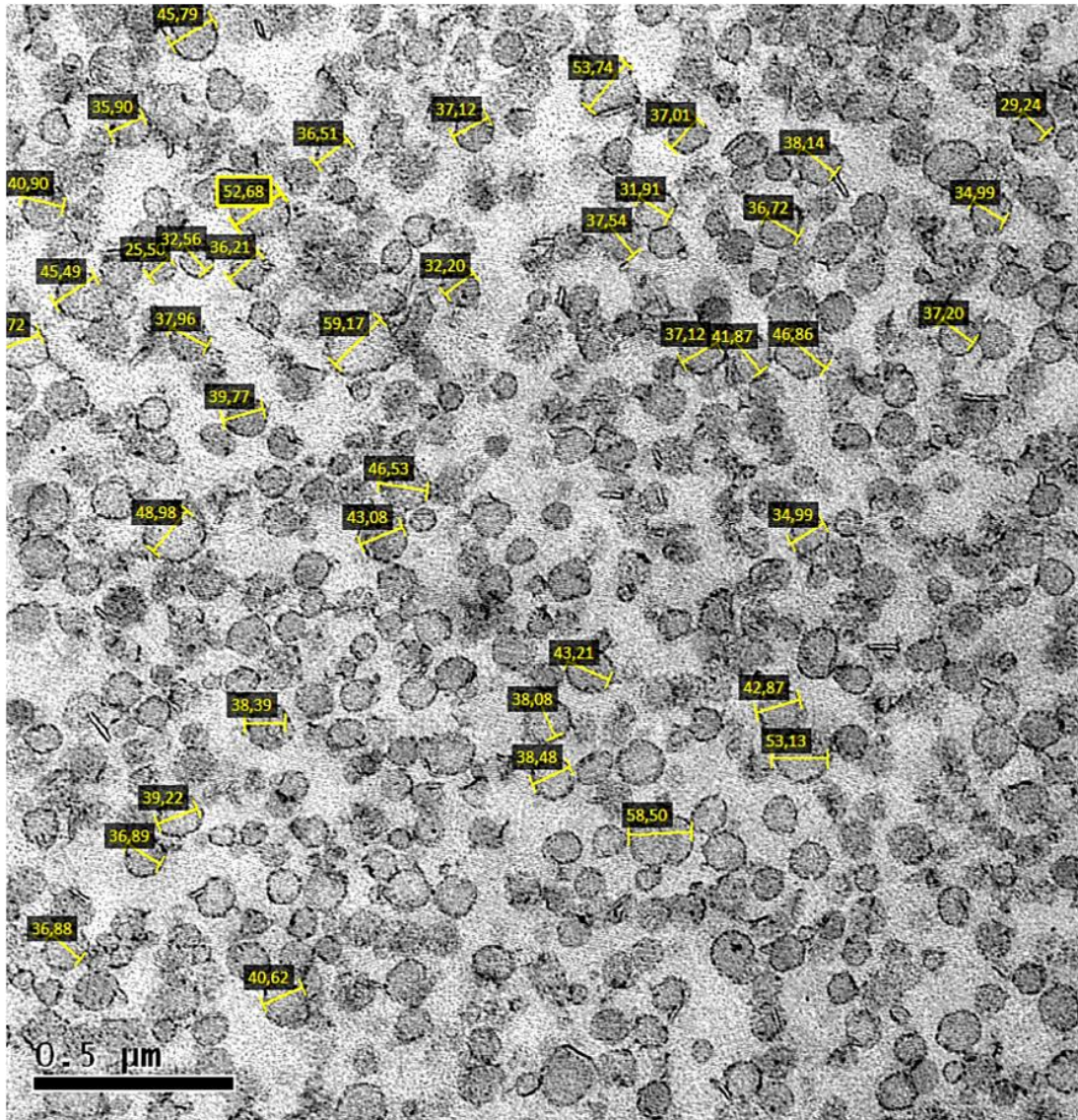


Figura 1. Ilustração da quantificação/diferenciação dos Exos e MVs pelo IrfanView e Aperio Image Scope.

3.5. Análise da distribuição do tamanho e da concentração das VECs séricas por Rastreamento de Nanopartículas - NTA (NanoSight)

A análise de rastreamento de nanopartículas (NTA) foi realizada usando um instrumento NanoSight LM10 acoplado a um instrumento altamente sensível câmera sCMOS (Malvern Instruments, Ltd., Malvern, Reino Unido), que captura um arquivo de vídeo das VECs do soro movendo-se sob Movimento browniano. As VECs isoladas do soro dos pacientes foram diluídas (1:50) em meio H livre de partículas (filtrado a 0,02 μm) para obter uma concentração dentro da medicação recomendada intervalo ($1-10 \times 10^8$ partículas / mL). As seguintes configurações foram utilizadas: nível de câmera definido como automático, limite e foco definido manualmente para otimizar as leituras de acordo com o fabricante instruções, uma temperatura de medição de 25°C, 5 execuções de 30 quadros por segundo e um tempo de medição de tempo de 60 s. A distribuição de tamanho e a concentração das VECs foram analisadas usando o software NTA v.3.4 (Malvern Panalytical, Ltd., Malvern, Reino Unido), aplicando a equação de Stokes-Einstein. A quantificação absoluta das VECs pelo método NTA foi realizado em 50% do tamanho total da amostra.

3.6. Citometria de fluxo

As microvesículas séricas também foram quantificadas pela Citometria de Fluxo. O citometro foi calibrado com microesferas de poliestireno (0,8-1,34 μm Spherotech Inc., Libertyville, IL, EUA) para definir os limites da área de detecção^(77,78). A imunomarcação das MVs com DNA de arqueia, foi realizada através da hibridização *in situ* utilizando uma sonda genérica biotilada, ARCH 915 (GTGCTCCCCCGCCAATTCCT). Cada amostra de 20 μl de o soro foi incubado com a sonda (40 ng/ μl) em estufa à 45°C por 20 h e em seguida, incubada com PE Texas Red Streptavidin (BD PharmingenTM, EUA) por 30 min à temperatura ambiente, protegido da luz. A sonda foi previamente diluída para 400 ng/ml em tampão de hibridização (50% formamida, 10X solução salina-sódio tampão de citrato [SSC: NaCl 1,5 M, citrato de sódio 0,15 M, pH 7], 2X solução de Denhardt, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DNA de esperma de salmão e 10% de sulfato de dextrana). Este buffer permite que a hibridização ocorra com uma alta amplificação, forçando proximidade entre a sonda e o alvo e bloqueando a ligação a alvos não específicos. A identificação de antígenos das MVs também foi realizada com anticorpos específicos para *M. pneumoniae* e MMP-9 usando diluições de 1:400 e 1:1.000, respectivamente. As amostras foram incubadas com os anticorpos primários por 1 h em temperatura ambiente e foram então incubados com anticorpos secundários (AlexaFluor 488 e 555 Invitrogen, CA) por 30 min à temperatura ambiente no escuro. Além disso, IgG de camundongo anticorpos marcados com FITC e PE (controle de isotipo) foram usados.

3.7. Western Blotting

A proteína total do sobrenadante enriquecido com VECs foi extraída usando um tampão RIPA de extração (Tris-HCl 25 mM pH 7,6, NaCl 150 mM, NP-40 1%, desoxicolato de sódio 1%, SDS 0,1%) contendo inibidores de protease e fosfatase. Após centrifugação (21.000g, 15 min, 4°C), o sobrenadante foi armazenado à -80°C. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford⁽⁷⁹⁾ e foi calculada de acordo com a equação linear obtida a partir de uma curva de concentração. Trinta microgramas de proteína total foram incubados com tampão Laemmli e fervido por 5 min. Os géis contendo as amostras foram submetidos à eletroforese (140 V por 1 h), e posteriormente transferidos para uma membrana de nitrocelulose (100 V por 1 h; Mini TransBlot BioRad), subsequencialmente a membrana foi incubada com o anticorpo primário (TA por 4 h). Os seguintes anticorpos foram utilizados: CD63 (# ab134045; Abcam), para validação do método de isolamento e β -actina (# sc47778; Santa Cruz), como controle de carga. Posteriormente, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (TA por 1 h) e submetidas a uma reação quimioluminescente (Luminata Forte Western HRP Substrate, Millipore). A banda de proteína foi analisada por um transiluminador (UVItec Limited, Cambridge)

3.8. Zimografia de Gelatina

Este procedimento foi usado para determinar os níveis de MMP9 ativa no sobrenadante enriquecido com VECs. Aproximadamente 100 µg de proteína de cada amostra previamente extraída e dosada foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida. As amostras foram incubadas com tampão Tris-glicina SDS Novex™ 2x (Thermo Fisher) sem a presença de um agente redutor ou aquecimento para manter a função das enzimas presentes. As amostras foram carregadas em um gel de poliacrilamida à 10% contendo 4 mg/ml de gelatina (G9391 Sigma), uma vez que é o substrato específico para enzimas da classe das gelatinases. Após a eletroforese, o gel foi lavado com tampão de renaturação 1X contendo detergente não iônico e 2,5% Triton X-100 (Novex Zymogram Tampão de renaturação - Invitrogen) por 30 min à temperatura ambiente sob agitação suave. Posteriormente, o gel foi incubado em tampão Tris por 30 min à temperatura ambiente. Esta incubação foi repetida por 48 h a 37°C, permitindo a digestão do substrato pela protease. O gel foi lavado com água deionizada, corado por 1 h com Coomassie Azul R-350, e colocado em suporte plástico de 300 dpi ou superior. As intensidades das bandas foram determinadas por densitometria, usando o UVITEC Alliance Q4-365 Advanced Imaging System Programas. As bandas claras digeridas foram normalizadas em relação ao valor da β-actina obtida pelo Western Blotting.

3.9. Determinação do Potencial Zeta

Procurando entender se arqueias ligadas ao grupo de IAM tinham características diferentes das demais VECs, a carga elétrica foi determinada através da medição do potencial zeta (potencial elétrico) de cada amostra, utilizando a técnica de espalhamento de luz eletroforético, no aparelho ZetaPals (Brookhaven Inst. Corp.). Todas as amostras foram analisadas utilizando um laser de hélio-neon (29 mW, $\lambda=658\text{nm}$) para excitar as amostras, sob um ângulo de detecção da luz espalhada fixo em 90° , na temperatura de 25°C , em cubetas de acrílico.

Os sobrenadantes foram diluídos 100 vezes em meio H (D-Manitol 200mM, sucrose 70mM, Hepes 2mM e BSA 0,5g/L, pH 7.2) e filtrado em membrana de nitrocelulose $0,45\ \mu\text{m}$, a fim de retirar “contaminantes” e resíduo de sais que poderiam interferir na determinação da carga elétrica das VECs.

3.10. Análise do Perfil Inflamatório pela Citometria de Fluxo (CBA-Cytometric Bead Array)

As medições de citocinas no soro total de pacientes nos diferentes grupos foram realizadas através do método Cytometric Bead Array (CBA), usando o kit Human Inflammation Enhanced - Sensitivity Flex Set (IL-2, IL-10, IL-6, IL-1 β , IFN- γ e TNF) (BD Pharmingen, CA, EUA). Os soros e os padrões de citocinas do kit foram incubados com microesferas de captura cobertas com anticorpos

específicos para as respectivas citocinas e com o anticorpo de detecção marcado com ficoeritrina (PE). Após as incubações, 1 mL da solução de lavagem foi adicionado e centrifugado por 10 min a 1.100 rpm. O sobrenadante foi descartado e 300 μ L da solução de lavagem foram adicionados. As amostras foram ressuspensas para aquisição em um BD LSRFortessa™ (Becton Dickinson, EUA). Os resultados foram gerados em formato gráfico e tabulados usando BD CBA Software de análise.

3.11. Análise Estatística

O software utilizado nos cálculos estatísticos foi o GraphPad Prism 6. Os dados de cada variável foram inicialmente comparados com a curva normal pelo teste de distância Kolmogorov-Smirnov, sendo classificados em paramétricos e não paramétricos. Os dados paramétricos foram descritos em média \pm desvio-padrão. E os grupos comparados pela análise de variância (ANOVA), com posterior aplicação do pós-teste de Tukey.

Os dados não paramétricos foram descritos em mediana e intervalos interquartis, e os grupos comparados utilizando o teste de Kruskal-Wallis, empregando Dunn como pós-teste.

Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados

4. Resultados

4.1. Populações estudadas (tabela de características de linha de base)

Observamos que os pacientes do grupo ATR eram mais velhos (média de 70,23 anos) e 72% eram do sexo masculino. Por outro lado, os pacientes do grupo de IAM apresentaram média de idade inferior (55,7 anos) e maior percentual do sexo masculino (75%). A média de idade dos pacientes com IAM grave foi de 68,50 anos, sendo 50% do sexo masculino e a outra metade do sexo feminino. O grupo CTL foi composto por indivíduos com idade média de 51,50 anos, sendo 67,64% do sexo masculino. Com relação aos fatores de risco, os pacientes do grupo ATR foram aqueles que apresentaram os maiores percentuais de diabetes, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e hipertensão e apresentaram IMC mais elevados. Um fato interessante é que os pacientes com IAM grave tiveram mortalidade de 47,05%, e a evolução do óbito ocorreu antes de 30 dias após o evento. Além disso, o grupo com IAM grave apresentou os maiores percentuais de pacientes diabéticos e hipertensos. (Tabela 3)

Tabela 3. Características de base dos 168 pacientes estudados nos diferentes grupos

	IAM n = 40	IAM grave n = 34	CTL n = 34	ATR n = 40
Idade (anos) média ± desvio padrão	55,7 ± 11,23	68,50 ± 15,46	51,50 ± 11,77	70,23 ± 12,96
Sexo masculino n, (%)	(30) 75	(17) 50	(23) 67,64	(29) 72,5
Fumantes n, (%)	(18) 45	(13) 38,23	(3) 8,82	(17) 42,5
Diabéticos n, (%)	(18) 45	(12) 35,29	N/A	(27) 67,5
Hipercolesterolemicos n, (%)	(29) 72,5	(20) 58,82	N/A	(38) 95
Hipertrigliceridemicos n, (%)	(15) 37,5	(16) 47,05	N/A	(28) 70
Sedentários n, (%)	(13) 32,5	(26) 76,47	(7) 20,58	(15) 37,5
Hipertensos n, (%)	(29) 72,5	(30) 88,23	N/A	(36) 90
IMC > 30 n, (%)	(14) 35	(13) 38,23	(13) 38,23	(15) 37,5
Óbitos n, (%)	N/A	(16) 47,05	N/A	N/A

Os resultados são apresentados como média (DP) ou número (%) de indivíduos. Todos os valores das características, exceto a idade, são expressos em número de pacientes (n) e porcentagem.
N / A: não aplicável

4.2. Quantificação e demonstração morfológica das VECs pela Microscopia Eletrônica de Transmissão

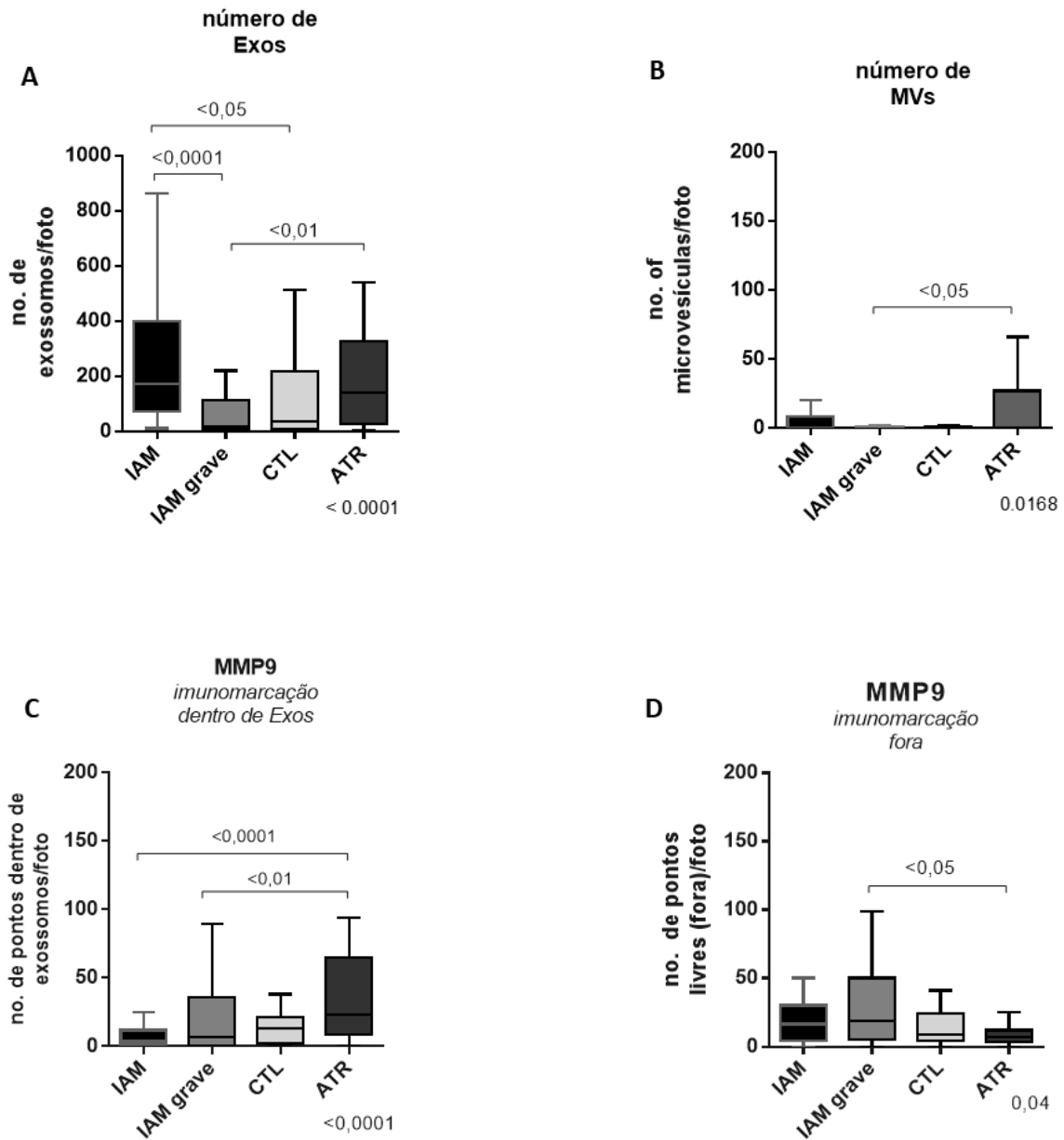
A quantificação de Exos (<100 nm/foto) pela técnica de MET mostrou menor número no grupo de IAM grave [15,5 (4-112,8)] em comparação com os grupos ATR [139,5 (28-327)] e IAM [172,5 (72-400)] (Kruskal-Wallis, $p < 0,001$). O grupo IAM também teve um número superior ao grupo CTL [34,5 (8,25-219)].

A quantificação de MVs (>100 nm/foto) também exibiu menor número no grupo IAM grave [0,0 (0-0,75)] em comparação com o grupo ATR [0,0 (0-27)] (Kruskal-Wallis, $p < 0,01$) (Fig 2A, B)

Através da imunomarcção pela MET, os grupos IAM grave [7 (0-36)] e IAM [3,5 (1-11,75)] exibiram menor número de pontos positivos de MMP9 dentro de Exos/foto em comparação com o grupo ATR [23 (8,5-65)] (Kruskal-Wallis, $< 0,0001$). Além disso, o grupo de IAM grave [19 (5-15)] tinha maior número de antígenos de MMP9 livres em comparação com o grupo ATR [7 (3-12)] (Kruskal-Wallis, $p 0,04$). (Fig 2C, D).

A imunomarcção de *M. pneumoniae* apresentou menos pontos positivos dentro de Exos/foto no grupo IAM grave [0,5 (0-13)] em comparação com o grupo ATR [10 (1,5-27,5)] (Kruskal-Wallis $p = 0,0039$). O grupo com IAM grave [48,5 (13,2-76,5)] também exibiu maior número de antígenos de *M. pneumoniae* livres do que o grupo ATR [24 (7,25-38,75)] (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). (Fig 2E, F)

Nas imagens representativas referentes à imunomarcação, é possível verificar que o grupo de IAM grave apresentou maior número de antígenos MMP9 e *M. pneumoniae* livres em relação ao grupo ATR, que apresentou elevado número de antígenos dentro dos VECs. (Fig 3A, B)



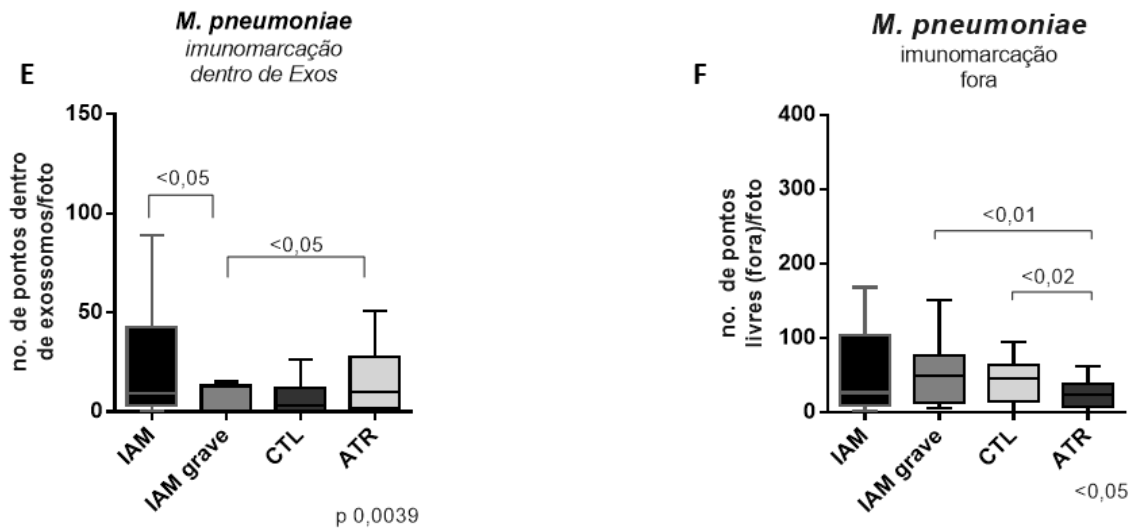
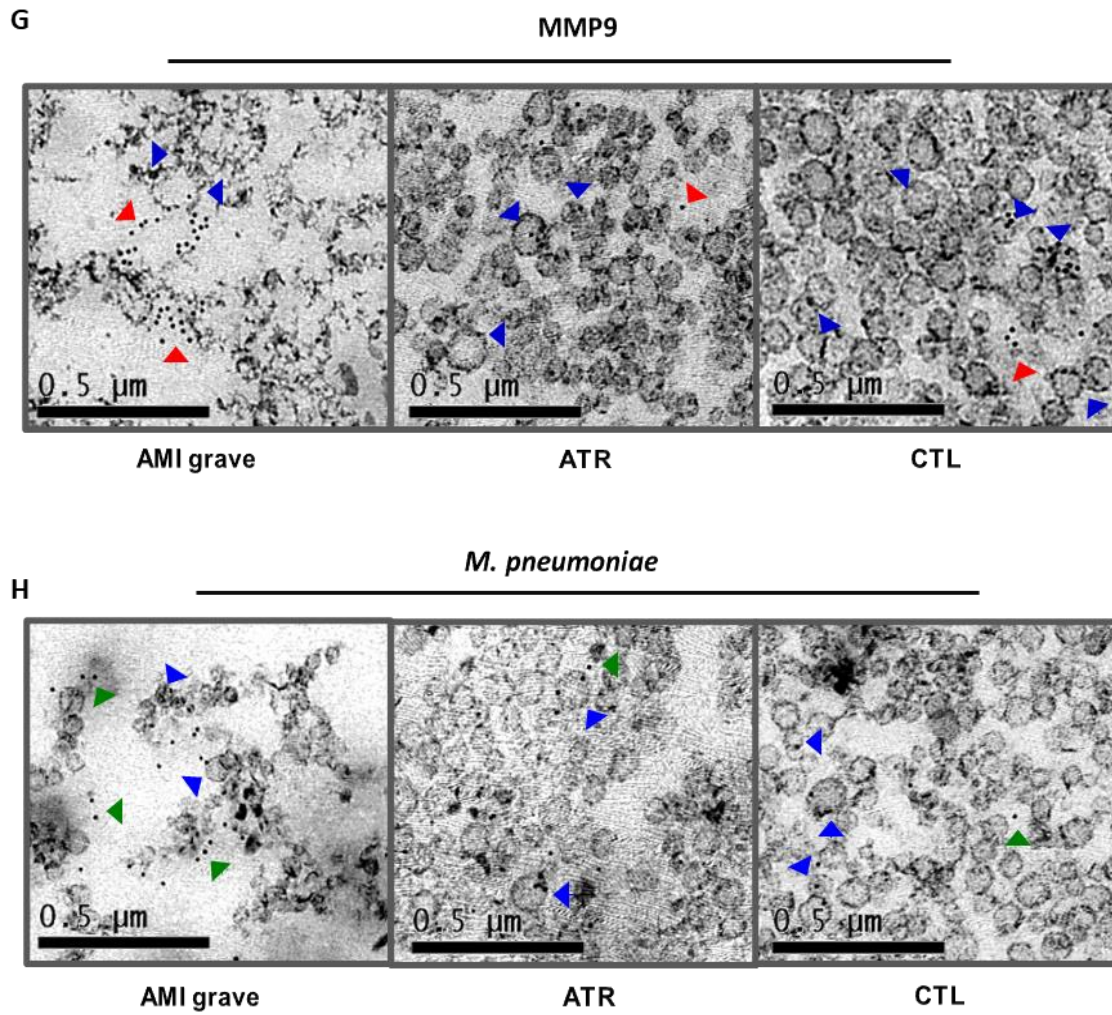


Figura 2 – Quantificação de VECs e Imunomarcacão para MMP9 e *M. pneumoniae* pela Microscopia Eletrônica de Transmissão. A diminuicão dos exossomos leva a uma remocão deficiente de MMP9 e *M.pneumoniae* antígenos de em infarto grave. (A) Número de exossomos / fotos. (B) Número de microvesículas/foto (n=10 por grupo). (C) Número de antígenos MMP9 (pontos) dentro de exossomos/foto (n=10 por grupo). (D) Número de antígenos MMP9 (pontos) fora dos exossomos/foto (n=10 por grupo). (E) Número de *M. Pneumoniae* antígenos (pontos) dentro de exossomos/foto (n=10 por grupo). (F) Número de antígenos de *M. pneumoniae* (pontos) fora dos exossomos/foto (n=10 por grupo). (Os dados são expressos mediana e intervalos interquartil 25%-75%).

Kruskal-Wallis (Dunn aplicado como pós-teste).



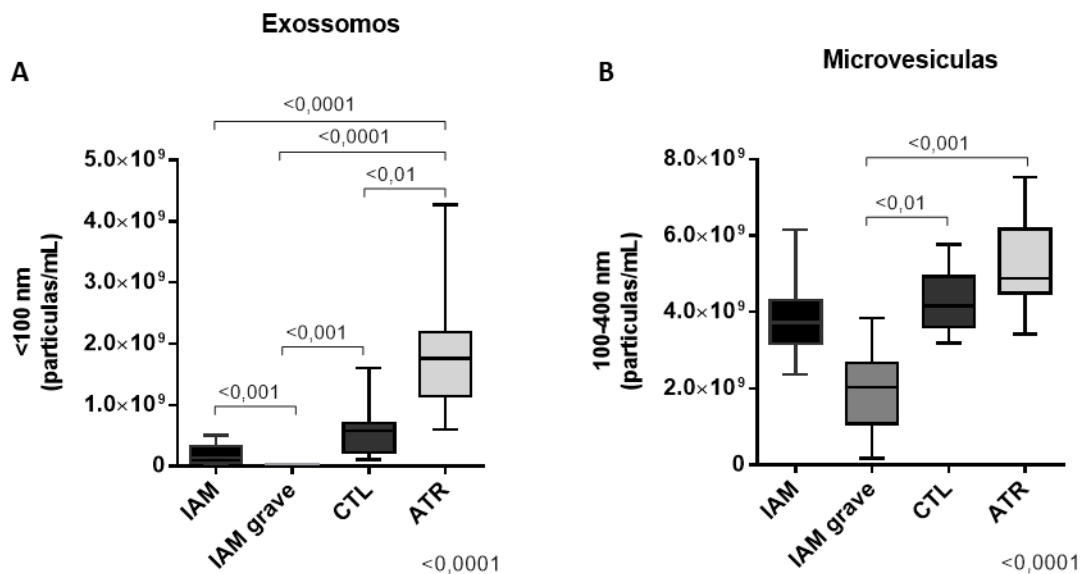
(G, H) IAM grave apresentando maior número de antígenos livres (seta vermelha, MMP9; seta verde, *M. pneumoniae*), e ATR apresentando maior número de antígenos MMP9 e *M. pneumoniae* dentro das VECs (seta azul). ouro-coloidal 10 nm – 50.000X

(Os dados são expressos mediana e intervalos interquartil 25%-75%).

Kruskal-Wallis (Dunn aplicado como pós-teste).

4.3. Quantificação de VECs séricas (microvesículas e exossomos) pelo Nanosight

A quantificação absoluta de VECs mostrou maiores números de Exos no ATR [$1,76^9$ ($1,13^9$ – $2,19^9$)] do que no IAM [$1,40^8$ ($5,70^7$ – $3,25^8$)], AMI grave [$8,50^6$ ($7,50^5$ – $1,06^7$)] e CTL [$5,79^8$ ($2,22^8$ – $7,02^8$)] grupos (Kruskal-Wallis $p=0,0001$). O grupo de IAM grave apresentou o menor número de Exos. (Fig 3A) Os números de MVs no grupo de IAM grave [$2,12^9$ ($1,51^9$ – $2,83^9$)] foram menores do que nos grupos CTL [$3,9^9$ ($3,65^9$ – $4,62^9$)] e ATR [$5,85^9$ ($4,83^9$ – $6,90^9$)]. Além disso, o grupo IAM [$3,589$ ($3,169$ – $4,209$)] também exibiu menos microvesículas do que o grupo ATR. (Fig 3B)



C

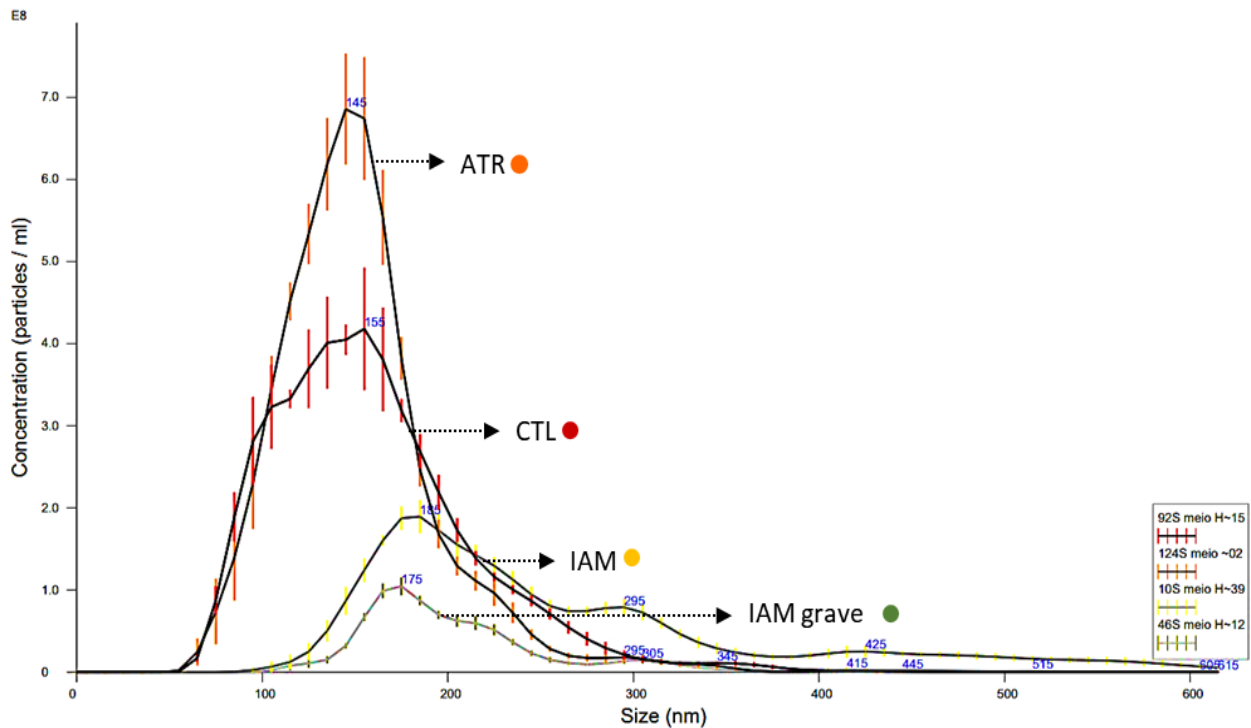


Figura 3 – Quantificação absoluta de VECs pelo Nanosight – NTA. (A, B) Concentração dos exossomos séricos (<100) e microvesículas (100-400 nm) (partículas/mL). A diminuição dos exossomos circulantes é acompanhada pela progressão da piora da evolução. Nos exossomos, a diminuição ocorre de forma mais significativa (n=20 por grupo). (C) Curva que representa a concentração e a dispersão do tamanho das VECs séricas totais nos diferentes grupos de estudo (laranja, ATR; vermelho, CTL; amarelo, IAM; verde, IAM grave). (Os dados são expressos mediana e intervalo interquartil 25%-75%).

Kruskal-Wallis (Dunn aplicado como pós-teste).

4.4. Expressão proteica de CD63 – Western Blotting

Os níveis de expressão do marcador específico de exossomo (CD63), utilizado para validar o método de separação foi analisado pela técnica de *Western Blotting*. Os resultados indicaram que este biomarcador de exossomo apresentou-se maior no grupo ATR ($123,4 \pm 16,79$) do que nos grupos IAM grave ($87,90 \pm 16,65$), IAM ($106,1 \pm 29,71$) e CTL ($100 \pm 0,0$) (ANOVA, $p < 0,0001$) O grupo de IAM também apresenta expressão aumentada em comparação ao grupo de IAM grave (Figuras 4A, B).

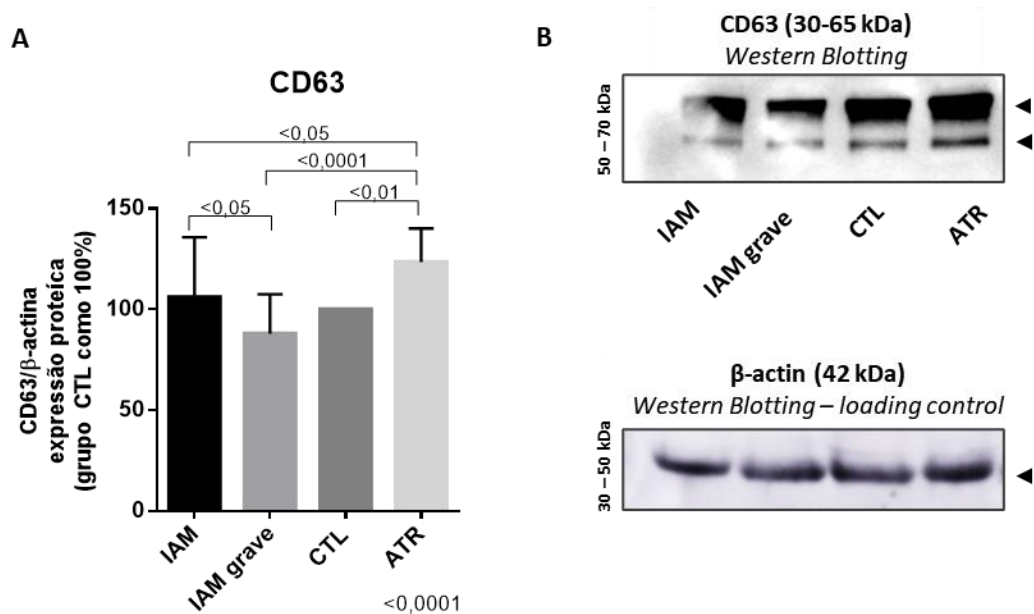


Figura 4 - Validação do método de separação – Western Blotting para CD63 (marcador específico para exossomo). A expressão da proteína CD63 é modulada positivamente em pacientes com

melhor prognóstico (A) Quantificação dos níveis de CD63 (%), com grupo controle ajustado em 100% (n = 34. por grupo). (B) Gel representativo de CD63 nos grupos de estudo. A β -actina é usada como um controle de carregamento. (Os dados são expressos como média \pm desvio padrão).

ANOVA (Tukey aplicado como pós-teste).

4.5. Quantificação (%) da atividade de MMP9

A banda de digestão zimográfica correspondente às formas pró-enzimáticas de MMP9 (Fig 5A, B) mostrou maior atividade de MMP9 nos grupos de IAM [203,4 (176,0–254,4)] e IAM grave [237,4 (207,2–301,9)] em comparação aos grupos CTL [100 (100–100)] e ATR [122,5 (108,9–142,4)] (ANOVA, $p < 0,0001$); o grupo de IAM grave também exibiu atividade de MMP9 significativamente maior em comparação ao grupo de IAM (Fig 5A, B).

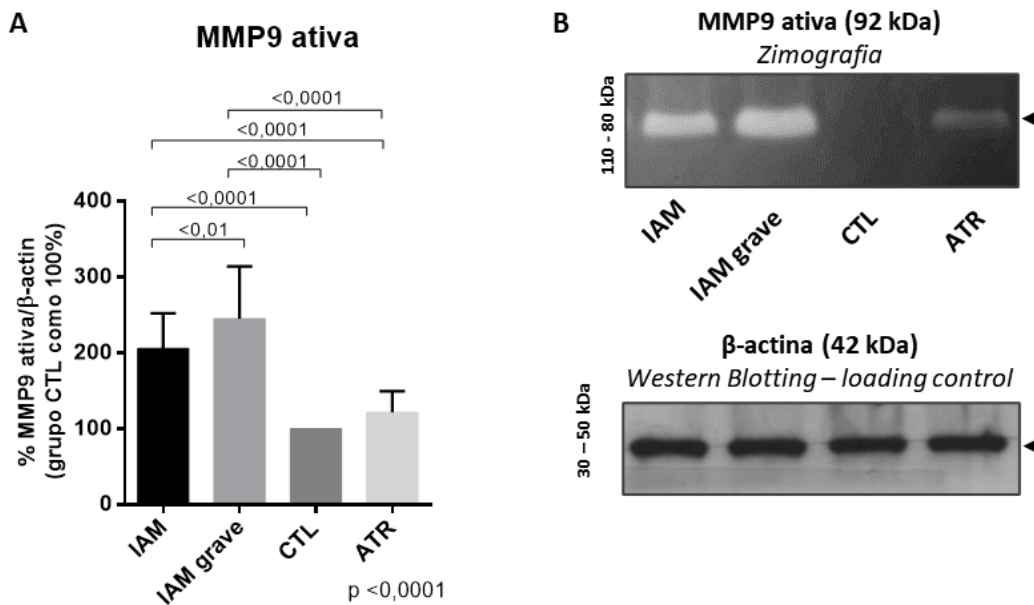


Figura 5 - Análise da atividade enzimática de MMP9 por meio de Zimografia de gelatina. Há regulação positiva da atividade catalítica de MMP9 em pacientes infartados, e a gravidade acentua a ativação. (A) Quantificação de MMP9 ativo (%), com o grupo controle ajustado para 100% (n = 34. por grupo). (B) Gel representativo de atividade de MMP9 nos grupos de estudo. A β -actina é usada como um controle de carregamento.

(Os dados são expressos como média \pm desvio padrão).

ANOVA (Tukey aplicado como um pós-teste).

4.6. Análise de Microvesículas Infecciosas pela Citometria de Fluxo

(0,8-1,34 μ m)

Os números de MVs positivas (%) para antígenos MMP9 e para DNA de arqueia foram maiores no grupo de IAM grave [32,90 (11,20–20,28)] e [11,30 (6,46–15,05)] respectivamente, em comparação com os grupos IAM [14,05 (11,20–20,28)] e [5,41 (3,88–7,77)]; ATR [12,55 (9,54–16,20)] e [3,77 (2,52–6,81)]; e CTL [18 (12,03–27,7)] e [2,90 (2,31–5,13)] respectivamente, (Kruskal-Wallis, $p < 0,0001$). (Fig 6A, B)

A quantidade de MVs positivas (%) para antígenos de *M. pneumoniae* também foi significativamente maior nos grupos IAM [42,84 (30,13–54,30)] e IAM grave [45 (21,15–64,05)] em comparação aos grupos ATR [24,15 (19,55–31,48)] e CTL [30,2 (21,25–35,98)] (Kruskal-Wallis, $p < 0,0001$). O grupo com IAM grave também exibiu maior número de MVs positivas (%) em comparação ao grupo CTL. (Fig 6C)

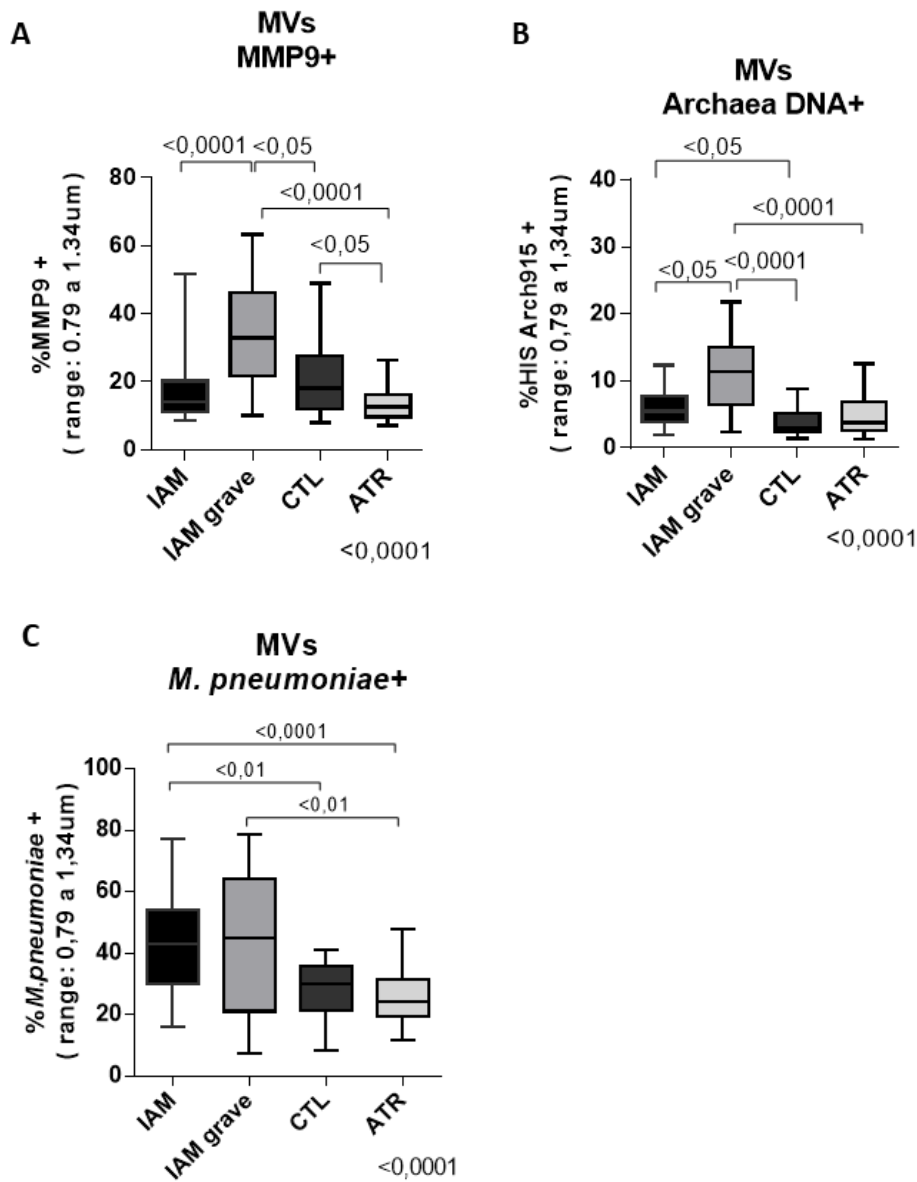


Figura 6 – Quantificação de iMVs pela Citometria de Fluxo. A quantidade de MVs de agentes infecciosos aumenta progressivamente de acordo com a gravidade da doença aterosclerótica, e a simbiose observada entre arqueia e *M. pneumoniae* observada em pacientes infartados aumenta o número de MVs de MMP9 positivas, especialmente nos casos graves. (A) % MVs positivas para MMP9 (B) % MVs com DNA de arqueia (sonda Arch915) (C) % MVs positivas para *M. pneumoniae* (tamanho: 0,8-1,34 μ m - aquisição de 10.000 eventos) (AMI n=40, IAM grave n=34, CTL n=34, ATR n=40)

(Os dados são expressos como mediana e intervalo interquartil 25-75%).

Kruskal-Wallis (Dunn aplicado como pós-teste).

4.7. Potencial Zeta

O potencial elétrico zeta apresentou um maior número de VECs com carga altamente negativa no grupo de IAM grave ($-24,46 \pm 4,73$), que foi significativamente maior do que nos outros grupos (AMI ($-12,79 \pm 9,46$), CTL ($-6,46 \pm 2,27$) e ATR ($-11,96 \pm 2,71$)) (ANOVA, $p < 0,0001$). O grupo IAM também teve uma carga elétrica altamente negativa em comparação com os grupos CTL e ATR (Fig 7).

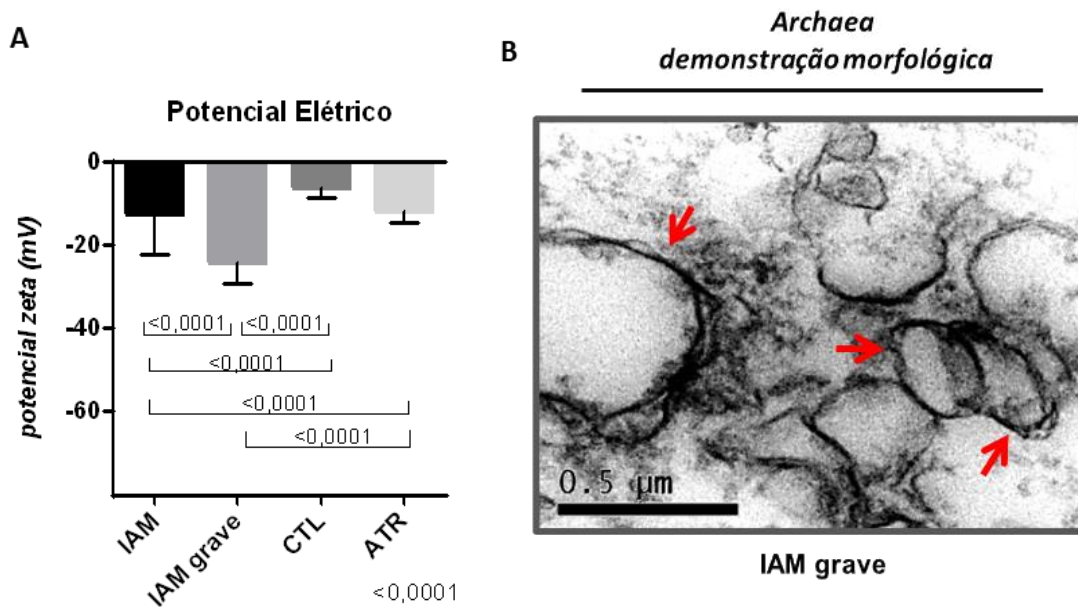


Figura 7 - Quantificação da carga elétrica das VECs — Potencial Zeta. A diminuição da carga elétrica das VECs é acompanhada pelo agravamento da evolução da doença aterosclerótica. (A)

Pacientes infartados, especialmente aqueles que têm uma quantidade maior de arquêias patogênicas, exibem VECs com carga elétrica altamente negativa. VECs (Exos e MVs) com carga elétrica negativa (mV) (IAM n = 40, IAM grave n = 34, CTL n = 34, ATR n = 40). (B) Demonstração da morfologia característica de arquêias presente no IAM grave.

(Os dados são expressos como média e desvio padrão).

ANOVA (Tukey aplicada como pós-teste).

4.8. Painel de citocinas inflamatórias

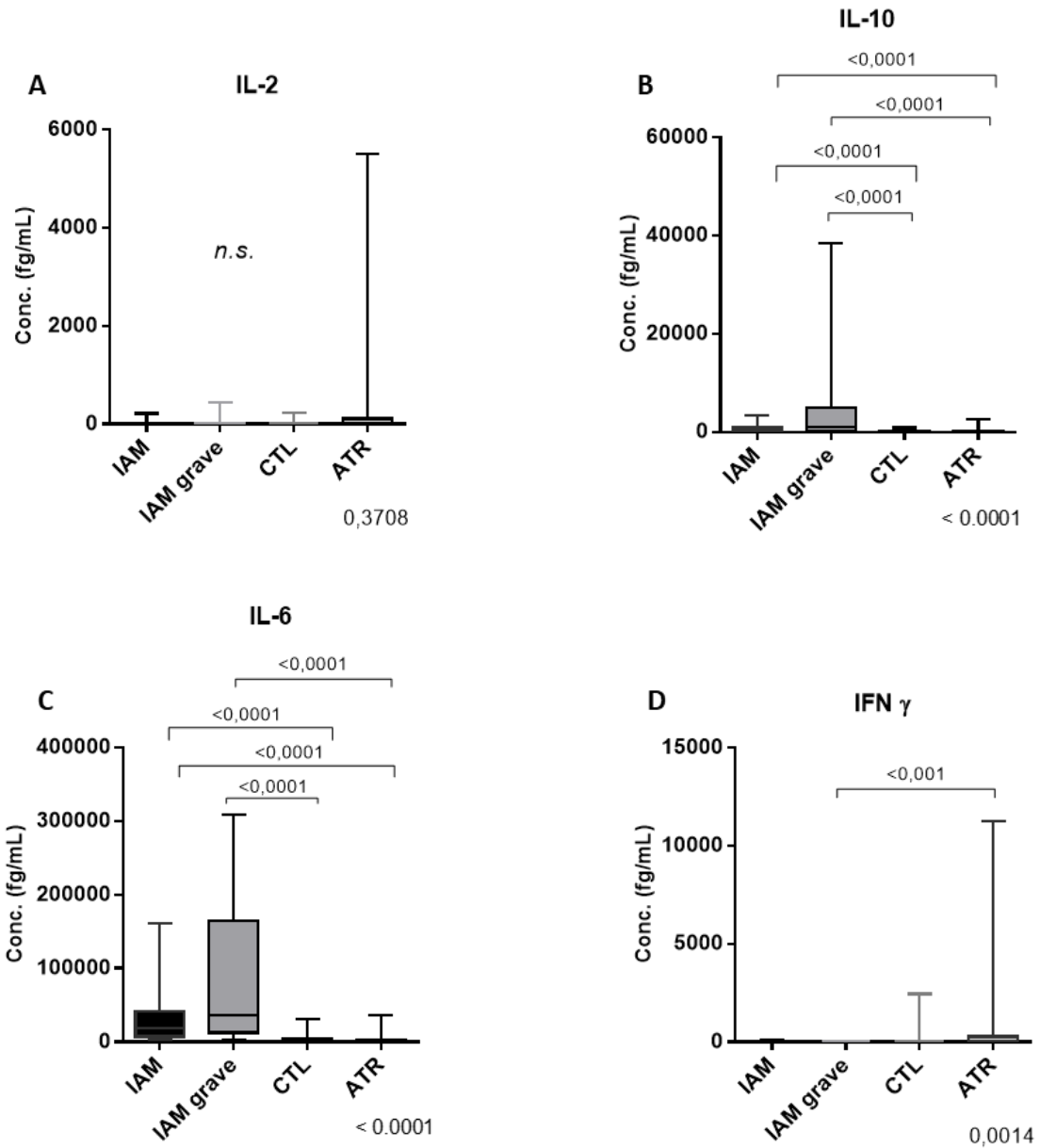
O painel de citocinas não mostrou diferença entre os grupos em IL-2 (Fig 8A) (Kruskal-Wallis, $p = 0,3708$), mas apresentou maiores quantidades de IL-10 nos grupos IAM grave [1515 (530,9–7497)] e IAM [385,6 (249,2–913,4)] em comparação com os grupos CTL [96,45 (43,79–212,5)] e ATR [95,25 (60,13–158,7)] (Kruskal-Wallis, $p < 0,0001$). (Fig 8B)

IL-6 exibiu um perfil semelhante, com maiores quantidades nos grupos IAM [18632 (7610–41591)] e IAM grave [115455 (16298–197428)] em comparação aos grupos CTL [1349 (787–3025)] e ATR [2304 (926,4–4074)] (Kruskal-Wallis, $p < 0,0001$). (Fig 8C)

O nível de IFN- γ do grupo CTL [263,6 (0,0–11645)] apresentou-se aumentado em comparação com o do grupo de IAM grave [0,0 (0,0–0,0)] ($p < 0,001$). (Fig 8D) Já TNF- α foi mais abundante nos grupos CTL [519 (154,5–1947)] e ATR [1044 (207,2–1826)] em comparação com os grupos IAM [204,7 (39,95–468,4)] e IAM grave [60,12 (13,91–227,9)] (Kruskal-Wallis, $p < 0,0001$). (Fig 8E) Além disso, o grupo com IAM também exibiu uma quantidade

maior de TNF- α do que o grupo com IAM grave.

A concentração de IL-1 β foi maior no grupo IAM [109,7 (0,0–240,5)] do que no grupo ATR [0,0 (0,0–45,89)] (Kruskal-Wallis, p 0,0013). (Fig 8F)



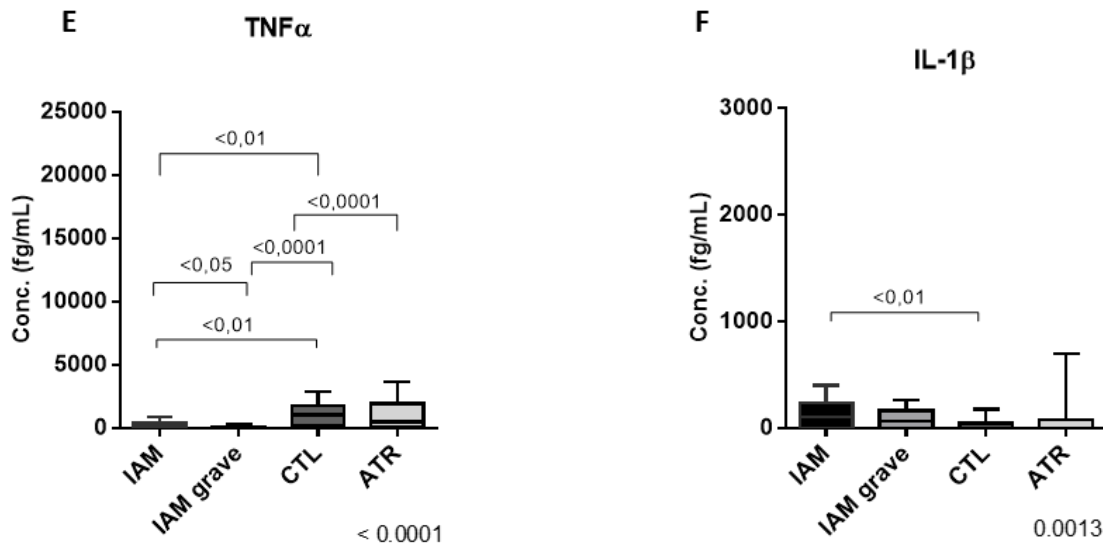


Figura 8 – Painel de Citocinas Inflamatórias (CBA): Concentrações de citocinas (fg/mL) no soro dos pacientes nos diferentes grupos de estudo. A progressão da doença aterosclerótica e a gravidade do infarto promovem uma resposta inflamatória exacerbada principalmente pelas vias IL-6 e IL1B, mas o mecanismo de compensação pela IL-10 não é suficiente para conter a inflamação. (A) IL-2, (B) IL-10, (C) IL-6, (D) IFN- γ , (E) TNF α , (F) IL-1 β . (IAM n=40, IAM grave n=34, CTL n=34, ATR n=40)

(Os dados são expressos como mediana e intervalo interquartil 25-75%).

Kruskal-Wallis (Dunn aplicado como pós-teste).

5. Discussão

A interação entre o hospedeiro e os microorganismos, e a composição das comunidades microbianas são consideradas essenciais tanto para a conservação de uma situação de saúde quanto para a determinação de doenças, principalmente no intestino^(22,80,81). A composição dessas comunidades microbianas é afetada por vários estímulos externos do hospedeiro e de outros patógenos simbióticos. Mudanças na composição da comunidade microbiana estiveram associadas ao agravamento de várias doenças como aterosclerose, diabetes mellitus, hipertensão, obesidade e insuficiência cardíaca^(82,83). Uma publicação recente mostrou que a remodelação direcionada do microbioma intestinal do camundongo, eliminando bactérias Gram-positivas, usando um peptídeo antibacteriano, inibiu o desenvolvimento de aterosclerose⁽⁸⁴⁾. Além disso, outro estudo analisando placas ateroscleróticas de indivíduos que morreram por doença arterial coronariana (DAC) mostrou que o aumento de *Enterobacteriaceae* patogênicas no microbioma intestinal causou aterosclerose coronariana mais grave associada ao aumento da idade⁽⁸⁵⁾. Assim, fica evidente que a alteração da comunidade microbiana intestinal pode contribuir tanto para a progressão da doença quanto para a vulnerabilidade da placa.

Alguns estudos observaram que vários outros microorganismos podem participar do desenvolvimento da DAC⁽⁸⁶⁾, mas a literatura sobre a comunidade microbiana em placas de ateroma permanece bastante pobre. Nosso grupo tem contribuído consideravelmente para o esclarecimento desse assunto, sendo os

pioneiros na descrição da presença de *M. pneumoniae* em associação com *C. pneumoniae* e archaea, em placas ateroscleróticas humanas instáveis^(36,87), propondo que um microbioma apresentando arqueias patogênicas está relacionado ao agravamento da doença aterosclerótica. Nosso grupo também observou a presença de VECs revestidas por uma membrana dupla com conteúdo elétron-lucente, apresentando DNA arqueia, como parte do microbioma em placas vulneráveis e associado à degeneração mixomatosa⁽³⁸⁾.

Como já mencionado, as arqueias, apesar de muitas vezes consideradas não patogênicas, são resistentes à antibioticoterapia e induzem inflamação por meio da ativação de linfócitos T CD8+. Além de promover a síntese e oxidação das metaloproteinases devido à sua membrana eletronegativa.

Vários estudos sugerem que arqueias, bactérias gram-negativas e células eucarióticas liberam vesículas de membrana infecciosas como um produto final da secreção. Além de serem diretamente infecciosas, elas também podem preparar células vizinhas, tornando-as mais suscetíveis à infecção, bloqueando as respostas à antibióticos e compartilhando moléculas infecciosas isoladas⁽⁸⁸⁾.

Através da técnica de Citometria de Fluxo quantificando VECs entre 0,79 - 1,34 μm , encontramos maior quantidade de VECs positivas para antígenos DNA de arqueia, antígenos de *M. pneumoniae* e MMP9 no soro de pacientes com IAM grave comparação com pacientes ateroscleróticos estáveis ou indivíduos saudáveis. Favorecendo nossa hipótese de que essas microvesículas infecciosas (iMVs) positivas para DNA de arqueia, carregadas de antígenos (MMP9 e *M. pneumoniae*) no soro caracterizam as arqueias patogênicas que descrevemos

como relacionadas a placas vulneráveis ^(38,49).

Uma característica notável das membranas das arqueias, é a capacidade das proteínas da camada S que compõem a membrana de se agruparem em uma proteína cristalina bidimensional, formando poros que variam de 2 a 8 nm de diâmetro e podem ocupar até 70% do envelope celular, tornando a membrana permeável dependendo do ambiente em que está inserido ⁽⁸⁹⁾. Essa característica reforça o fato que as arqueias podem captar e liberar bioprodutos, tais como iVECs e antígenos infecciosos.

Usando o equipamento Nanosight, encontramos os maiores números de VECs <100 nm (exossomos) e de 100 a 200 nm em grupos ateroscleróticos estáveis e controle saudável, em comparação com grupos de IAM, indicativo de que essas VECs são protetoras. Este achado corrobora nosso resultado em relação à marcação de CD63 (marcador de exossomos) usado para provar que nosso método de isolamento de VECs é eficaz. Pois também observamos uma modulação semelhante, com maior expressão nos grupos com boa evolução em relação aos com infarto grave.

Os exossomos têm a função de se ligar a proteínas não vesiculares em cada meio fisiológico, diminuindo sua concentração circulante^(90,91). Neste estudo, também detectamos uma modulação na quantificação por Microscopia Eletrônica semelhante à observada pelo Nanosight, conferindo confiabilidade a esta análise semiquantitativa. Também foi possível observar através dessa técnica um maior número de exossomos contendo antígenos *M. pneumoniae* e MMP9 (utilizando imunomarcação) em seu interior nos grupos ATR e CTL, sugerindo que esses

exossomos podem tanto englobar antígenos infecciosos quanto degradar a MMP9 ativa, protegendo contra o desenvolvimento de ruptura da placa.

Outros estudos reforçam a visão de que os exossomos possuem um papel protetor, onde essas nanovesículas podem ser liberadas por células extracardíacas e plaquetas, e também localmente pelos principais tipos de células cardiovasculares (endoteliais, cardiomiócitos, macrófagos e fibroblastos). Esses exossomos, através da transferência de cargas moleculares, atenuam a senescência celular, inflamação, lesão miocárdica e tamanho da área de infarto^(92,93).

Por outro lado, é possível que simbiose entre *M. pneumoniae* e arquéias presentes em placas vulneráveis leva à liberação de iMVs menores que 200nm no sangue periférico, que podem desempenhar um papel na redução de VECs protetoras no soro, promovendo instabilidade da placa e agravamento do IAM. Também mostramos que o aumento de iMVs está presente em associação com aumento de iMVs positivas para MMP9. Esses dados podem explicar os resultados da Zimografia onde observamos aumento da atividade enzimática de MMP9 no soro de pacientes infartados, especialmente aqueles com maior gravidade, em comparação com indivíduos ateroscleróticos saudáveis e estáveis.

Nossos resultados são convergentes com as evidências existentes na literatura sobre a participação das iMVs na DAC. As iMVs de certas espécies de bactérias negativas principais (relacionadas à periodontite) mostraram ativar as plaquetas e podem sugerir um possível mecanismo de contribuição para a aterosclerose⁽⁹⁴⁾. Outro mecanismo que surgiu para vincular a inflamação estimulada pela infecção ao potencial pró-trombótico, é que a infecção promove o aumento de microvesículas pró-inflamatórias e pró-coagulantes derivadas da membrana da célula hospedeira ativada⁽⁹⁵⁾.

Além disso, conforme apresentamos neste trabalho, dados convergentes da literatura também mostram que o aumento da MMP9, diretamente associado à instabilidade da placa, maior infarto, função ventricular esquerda prejudicada e evolução clínica fatal no infarto agudo do miocárdio com supra desnivelamento de ST^(96,97,98).

Mesmo com um conjunto de dados convergentes sobre o impacto da atividade desta collagenase, até o momento não há uma explicação clara sobre os orquestradores de sua ativação e seu papel no agravamento do IAM. No entanto, foi demonstrado que a liberação dessas proteínas degradantes da matriz (especialmente MMP9) pode ser desencadeada por *C. pneumoniae*, que se correlacionou significativamente em carótidas instáveis⁽⁹⁹⁾. As MMPs da matriz também desempenham um papel importante no recrutamento de células imunes para o local da infecção, seja pela degradação dos componentes da matriz extracelular ou pela regulação da atividade de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias⁽¹⁰⁰⁾. Além disso, um estudo recente identificou centenas de genes

homólogos a MMPs presentes em arqueias⁽¹⁰¹⁾. Nossos achados atuais, juntamente com a publicação anterior, mostrando metaloproteinase de arqueia correlacionando-se com a insuficiência cardíaca na cardiomiopatia chagásica⁽⁴³⁾, sugerem que há uma possível contribuição de agentes infecciosos para o aumento da expressão de MMP9 e sua ativação catalítica por outras MMPs infecciosas, além de serem capazes de diminuir a biodisponibilidade de exossomos protetores pela diminuição de sua remoção.

Assim, neste trabalho, ao demonstrar que possivelmente iMVs de arqueias patogênicas podem fornecer proteção e resistência ao sistema imunológico a outros microrganismos (*Mycoplasma pneumoniae*) presentes na progressão e instabilidade da placa, sugerimos que o encontro sérico de VECs destes os agentes podem ser um potencial biomarcador sérico da gravidade da DAC.

Outro dado que reforça o papel patogênico das arqueias foi demonstrado pela quantificação do potencial zeta, onde encontramos um aumento significativo em VECs com carga elétrica altamente negativa em pacientes infartados, especialmente aqueles com maior gravidade. Esse achado está de acordo com estudo publicado recentemente, que demonstrou que pacientes hipertensos que evoluíram com IAM, apresentavam deformidade eritrocitária com diminuição do potencial zeta dos eritrócitos e apresentavam peroxidação lipídica, em comparação com pacientes hipertensos sem infarto⁽¹⁰²⁾. Indicar que a determinação do potencial zeta pode ser uma ferramenta diagnóstica para determinar o risco de eventos isquêmicos agudos, e a correlação da diminuição da carga elétrica com a presença de arqueias patogênicas poderia ajudar a

estratificar a gravidade desse desfecho. Assim, hipotetizamos que a remoção de arquéias patogênicas poderia favorecer um melhor prognóstico em pacientes infartados.

Como mencionado anteriormente, é classicamente descrito que a doença aterosclerótica ocorre por meio de vários estímulos inflamatórios. Porém, não há relatos de como os agentes infecciosos podem impactar o sistema imunológico favorecendo o agravamento desta doença. Nosso presente trabalho mostra que as citocinas tipicamente inflamatórias IL-1 β , IL-10 e IL-6 estão em níveis mais elevados no soro de pacientes infartados, principalmente em casos graves, em comparação com indivíduos saudáveis e ateroscleróticos.

Esses dados estão de acordo com estudos já publicados que sugerem que o aumento dessas citocinas desempenha um papel crítico na ativação da inflamação pós-infarto, promovendo degradação da matriz, retardo na cicatrização da área infartada e apoptose de cardiomiócitos, mediando disfunção pós-IAM^(103,104,105). Além disso, há evidências de que a elevação simultânea de IL-10 e IL-6 distingue pacientes infartados com pior evolução clínica, estando diretamente correlacionada com aumento do risco de disfunção diastólica e óbito em até seis meses após o evento⁽¹⁰⁶⁾.

Curiosamente, nosso estudo mostrou uma quantidade sérica de TNF α reduzida em pacientes infartados, especialmente em pacientes graves em comparação com indivíduos ateroscleróticos e saudáveis. Estudos relatam que o TNF tem função ambígua, apesar de classicamente descrito como pró-inflamatório, logo após o evento isquêmico, o TNF α é recrutado para a área lesada

e, quando combinado com seu receptor tipo II, pode formar um complexo que a inibe a reação inflamatória e remodelação ventricular após exercício de IAM, em função protetora^(107,108,109).

Apesar das evidências das publicações, na síndrome coronariana aguda a literatura continua a se concentrar em associar a produção de citocinas ao processo inflamatório de forma isolada. Contribuindo para a ideia de que os patógenos são importantes para modular a resposta inflamatória, os estudos publicados que mostram bactérias orais e respiratórias quando inoculadas em animais de um modelo experimental de aterosclerose, levam ao aumento de citocinas plasmáticas e teciduais, como IL-1 β , IL-6, TNF α , IL-18, IL-17 e IFN- γ ^(110,111,112). Reforçando a hipótese da participação de agentes infecciosos e suas MVs no agravamento da aterosclerose, há evidências de que a liberação de citocinas por células infectadas por microrganismos estimula a liberação de MVs de células não infectadas. Por exemplo, citocinas inflamatórias, como TNF- α ou IL-1, estimulam a produção in vitro de MVs de monócitos e células endoteliais, potencializando a inflamação e conferindo uma alta atividade pró-coagulante⁽¹¹³⁾. Além disso, há evidências de que a geração local de VECs no coração de ratos infartados após a lesão coordena a inflamação cardíaca após o evento isquêmico, aumentando a liberação de quimiocinas e citocinas de monócitos inflamatórios, amplificando a inflamação através de um sinal de *feedback* positivo⁽¹¹⁴⁾.

Em resumo, arqueias presentes em maiores quantidades nas lesões ateroscleróticas do IAM podem gerar radicais livres, devido à sua capacidade de induzir a oxidação, possuindo membrana de carga eletro-negativa⁽⁴⁰⁾, causando

um efeito altamente prejudicial, induzindo inflamação exacerbada por citocinas pró-inflamatórias, ruptura de placa, trombose e IAM. Atualmente, um número crescente de estudos sugere que os níveis de marcadores de estresse oxidativo em fluidos corporais se correlacionam com a atividade da doença aterosclerótica, reforçando nossos achados^(115,116).

Os dados obtidos neste trabalho favorecem nossa hipótese de que arqueias patogênicas podem contribuir com a elevação de radicais livres, conhecidos como pilares das placas vulneráveis, causando pior prognóstico dos pacientes infartados. Além disso, a co-infecção com *M.pneumoniae* associada com a liberação de iMVs podem levar à supressão do sistema imune e diminuição de exossomos protetores, favorecendo a expressão proteica e ativação de MMP9. Assim, o presente trabalho traz pioneiramente fortes indícios de que a simbiose entre arqueias patogênicas e *M.pneumoniae* pode ser um fenômeno fundamental na piora na evolução clínica na DAC.

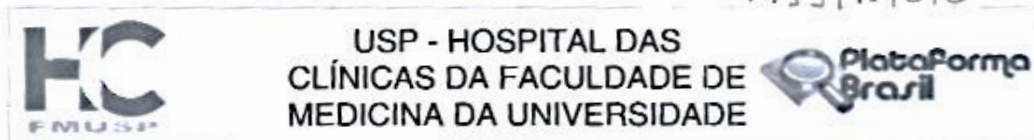
Conclusão

6. Conclusão

Os achados deste estudo têm uma relevância clínica importante, pois demonstram que as arqueias patogênicas apresentam MMPs, liberam iMVs, e promovem a diminuição da concentração de exossomos protetores circulantes. Assim sendo, podemos concluir que com novos estudos marcando nanovesículas menores e maiores de 100nm com MMP9, *M.pneumoniae* e DNA de arqueia, em diferentes e amplas populações ateroscleróticas, poderemos demonstrar de forma clara e indiscutível se estamos frente a biomarcadores específicos de presença de placa vulnerável e se podemos discriminar antecipadamente o prognóstico de pacientes com Infarto Agudo do Miocárdio.

7. ANEXOS

7.1. Anexo A – Parecer consubstanciado do CEP do HC FMUSP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: MICROPARTÍCULAS NO SORO: ESTUDO DE POSSÍVEIS NOVOS BIOMARCADORES DE INSTABILIDADE DA PLACA

Pesquisador: Maria de Lourdes Higuchi

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 95700518.0.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

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

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.827.637

Apresentação do Projeto:

O estudo proposto pelos pesquisadores será prospectivo utilizando amostras de soros de 160 pacientes provenientes do Instituto do Coração sem aterosclerose ou com aterosclerose, com e sem infarto agudo do miocárdio com a finalidade de procurar um marcador que possa auxiliar a história da doença cardiovascular. O projeto apresenta relevância na área de apoio diagnóstico e não trará riscos para o sujeito da pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

Os pesquisadores apresentam como objetivo do estudo achar um biomarcador altamente específico e sensível, que possa ser medido de forma rápida e com baixo custo, poderia mudar muito a história natural da doença cardiovascular, reduzindo de forma significativa a mortalidade. O estudo está bem justificado pelos pesquisadores e é de grande valia para apoio diagnóstico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O protocolo proposto não trará riscos para o sujeito da pesquisa.

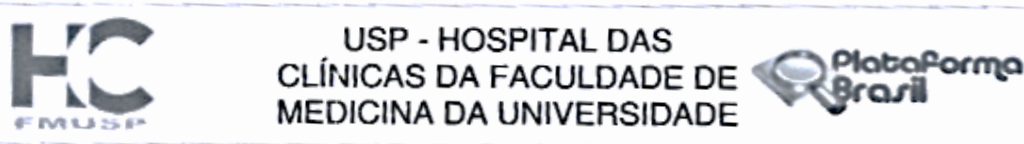
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa de grande importância na área médica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O TCLE está adequado para o desenvolvimento do estudo.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SÃO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 2.627.637

Recomendações:

Recomendamos sua aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1180873.pdf	10/08/2018 07:58:02		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_biomarcadores.doc	10/08/2018 07:57:49	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Micropariculas_biomarcadores_de_instabilidade_1.doc	10/08/2018 07:57:40	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	Cronograma_de_execucao.docx	10/08/2018 07:56:41	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	SGP_6751_ASSINADO.pdf	10/08/2018 07:55:59	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Orçamento	despacho_resultado_fapesp_2017.pdf	10/08/2018 07:55:42	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Folha de Rosto	FR_PB_ASSINADA.pdf	10/08/2018 07:55:00	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
 Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE

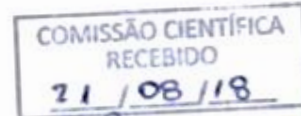


Continuação do Parecer: 2.827.637

Não

SAO PAULO, 17 de Agosto de 2018

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)



Fabiano

Endereço: Rua Ovidio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br

7.2. Anexo B - Parecer consubstanciado do CEP do HU USP



São Paulo, 19 de dezembro de 2013.

Il^{mo(a)}. Sr^a.

Profa. Dra. Maria de Lourdes Higuchi

Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

REFERENTE: **Subprojeto de Pesquisa** “Micropartículas no soro: estudo de possíveis novos biomarcadores de instabilidade da placa”

Pesquisadora Responsável: Profa. Dra. Maria de Lourdes Higuchi

Equipe de Pesquisa: Paulo Andrade Lotufo, Raul Dias dos Santos Filho, Marcia Martins Resi, Joyce T. Kawakami, Renata N. Ikegami, Suely Ap. P. Palomino, Natalia Zanete Pereira, Maria Notomi Sato

Registro CEP-HU/USP: 866/08 F

SISNEP CAAE: --.

Prezado(a) Senhor(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, em reunião ordinária realizada no dia 13 de dezembro de 2013, analisou o Subprojeto de pesquisa acima citado, considerando-o como **APROVADO**.

Trata-se o referido Subprojeto de proposta de continuidade do Projeto de Pesquisa “*Estratégia do Registro de Insuficiência Coronariana - ERICO*”.

Lembramos que cabe ao Pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios parciais semestrais e final, de acordo com a Resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, inciso XI.2, letra “d”.

O primeiro relatório está previsto para 13 de junho de 2014.

Atenciosamente,

Dr. Mauricio Seckler
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Universitário da USP

7.3. Anexo C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

**MICROPARTÍCULAS NO SORO: ESTUDO DE POSSÍVEIS NOVOS BIOMARCADORES DE
INSTABILIDADE DA PLACA**

PESQUISADOR PRINCIPAL

PROFA. DRA MARIA DE LOURDES HIGUCHI

CARGO/FUNÇÃO: Medica Pesquisadora. INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº .CRM. 22191.

DEPARTAMENTO/INSTITUTO -: LABORATÓRIO DE PATOLOGIA CARDÍACA.

DURAÇÃO DA PESQUISA: 2 anos

Convite à participação:

Convidamos o Sra/Sr para participar desta pesquisa, cujas informações estão sendo fornecidas caso haja interesse em sua participação voluntária neste estudo

Justificativa e os objetivos da pesquisa:

Estamos avaliando pacientes que, como o(a) senhor(a), tiveram infarto agudo do miocárdio ou que apresenta aterosclerose estável. Nossa pesquisa pretende confirmar achados iniciais que mostraram presença de vesículas extracelulares no sangue circulante em casos de pacientes que possuem placa instável que pode romper e causar infarto agudo do miocárdio. Se confirmado esse achado em maior número de pacientes, essas microvesículas no sangue podem ser futuramente utilizadas como biomarcador prognóstico de infarto agudo do miocárdio, podendo auxiliar no diagnóstico precoce e cuidados ao paciente.

Descrição dos procedimentos que serão utilizados:

Caso o senhor tenha na sua avaliação do seu estado de saúde e do funcionamento do coração, a realização de exames de sangue feitos de rotineiramente, o médico / enfermeira colherá uma amostra de sangue a mais para estudarmos as microvesículas.

Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos:

Durante a coleta de sangue poderá se formar um pequeno hematoma (mancha roxa) no local da punção, mas que é uma consequência da coleta de sangue em geral.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Benefícios esperados para o participante:

Não há benefício direto esperado para o participante deste estudo. Mas futuramente, poderemos ter um biomarcador específico a todo paciente com aterosclerose, em risco de desenvolver um infarto agudo do miocárdio, podendo melhorar a orientação terapêutica.

Esclarecimento sobre a forma de acompanhamento e assistência a que terão direito os participantes da pesquisa:

Não se aplica, pois não haverá acompanhamento.

Garantia de acesso:

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição e Sr/Sra receberá uma via do termo de consentimento livre e esclarecido. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o **Dr^a Maria de Lourdes Higuchi**, telefone(s) **26615098 e 26615541**.

Os médicos clínicos responsáveis serão encontrados no endereço **Av Dr Enéas de Carvalho Aguiar, 44**, respectivamente:

1o. **Dr Alexandre Soeiro 26610400**, responsável pela coleta do sangue de pacientes com síndrome coronariana aguda, pode ser encontrado na **Emergência**

2o. **Dr Whady Ueb 26615032 / 26615188 /26615227** responsável pela coleta do sangue de pacientes com aterosclerose estável pode ser encontrado no **ambulatório sala 114**.

3o. **Dr Alfredo Mansur 26615237 ou 26615247** responsável pela coleta do sangue de indivíduos saudáveis, pode ser encontrado na **Unidade Clínica Ambulatório Geral**

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar –tel: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____
Rubrica do pesquisador _____

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

Fui suficientemente informado a respeito do estudo “**MICROPARTÍCULAS NO SORO:
ESTUDO DE POSSÍVEIS NOVOS BIOMARCADORES DE INSTABILIDADE DA PLACA**”

Eu discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável **Maria de Lourdes Higuchi** ou pessoa (s) por ele delegada (s) **Dr Alexandre Soeiro, Dr Whady Ueb e Dr Alfredo Mansur** sobre a minha decisão em participar nesse estudo.

Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, potenciais desconfortos, riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo um via rubricada pelo pesquisador.

----- Data / /

Assinatura do paciente/representante legal

Assinatura do responsável pelo estudo Data / /

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE.....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M F

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE.....

CEP: TELEFONE: DDD

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____
 Rubrica do pesquisador _____

7.4. Anexo D – Publicação do artigo fruto da tese



Morphomolecular Characterization of Serum Nanovesicles From Microbiomes Differentiates Stable and Infarcted Atherosclerotic Patients

Camila Rodrigues Moreno¹, José Antonio Franchini Ramires², Paulo Andrade Lotufo², Alexandre Matos Soeiro², Luanda Mara da Silva Oliveira⁴, Renata Nishiyama Ikegami¹, Joyce Tiyeko Kawakami¹, Jaqueline de Jesus Pereira¹, Marcia Martins Reis¹ and Maria de Lourdes Higuchi^{1*}

¹ Laboratório de Patologia Cardíaca, Instituto do Coração, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, ² Instituto do Coração, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, ³ Hospital Universitário, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, ⁴ Laboratório de Investigação em Dermatologia e Imunodeficiências - LIM56, Departamento de Dermatologia, Hospital das Clínicas HCFMUSP, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

A. Phillip Owens III,
University of Cincinnati, United States

Reviewed by:

Veronika Lukacs-Kornak,
University of Bonn, Germany
Xiaofeng Yang,
Temple University, United States

*Correspondence:

Maria de Lourdes Higuchi
anplourdes@incor.usp.br
orcid.org/0000-0002-1673-6456

Specialty section:

This article was submitted to
Atherosclerosis and Vascular
Medicine,
a section of the journal
Frontiers in Cardiovascular Medicine

Received: 13 April 2021

Accepted: 08 July 2021

Published: 05 August 2021

Citation:

Moreno CR, Ramires JAF, Lotufo PA,
Soeiro AM, Oliveira LMS, Ikegami RN,
Kawakami JT, Pereira JJ, Reis MM
and Higuchi ML (2021)
Morphomolecular Characterization of
Serum Nanovesicles From
Microbiomes Differentiates Stable and
Infarcted Atherosclerotic Patients.
Front. Cardiovasc. Med. 8:694851.
doi: 10.3389/fcvm.2021.694851

Microbial communities are considered decisive for maintaining a healthy situation or for determining diseases. Acute myocardial infarction (AMI) is an important complication of atherosclerosis caused by the rupture of atheroma plaques containing proinflammatory cytokines, reactive oxygen species, oxidized low-density lipoproteins (oxLDL), damaged proteins, lipids, and DNA, a microenvironment compatible with a pathogenic microbial community. Previously, we found that archaeal DNA-positive infectious microvesicles (iMVs) were detected in vulnerable plaques and in the sera of Chagas disease patients with heart failure. Now, we characterize and quantify the levels of serum microbiome extracellular vesicles through their size and content using morphomolecular techniques to differentiate clinical outcomes in coronary artery disease (CAD). We detected increased numbers of large iMVs (0.8–1.34 nm) with highly negative surface charge that were positive for archaeal DNA, *Mycoplasma pneumoniae* antigens and MMP9 in the sera of severe AMI patients, strongly favoring our hypothesis that pathogenic archaea may play a role in the worst outcomes of atherosclerosis. The highest numbers of EVs <100 nm (exosomes) and MVs from 100 to 200 nm in the stable atherosclerotic and control healthy groups compared with the AMI groups were indicative that these EVs are protective, entrapping and degrading infectious antigens and active MMP9 and protect against the development of plaque rupture.

Conclusion: A microbiome with pathogenic archaea is associated with high numbers of serum iMVs in AMI with the worst prognosis. This pioneering work demonstrates that the morphomolecular characterization and quantification of iEVs in serum may constitute a promising serum prognostic biomarker in CAD.

Keywords: myocardial infarction, extracellular vesicles, microbiome, archaea, *Mycoplasma pneumoniae*

8. Referências

1. Witztum JL, Lichtman AH. The Influence of Innate and Adaptive Immune Responses on Atherosclerosis. *Annu. Rev. Pathol.* 2014;9:73–102.
2. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2016 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2016;133(4):e38–e360
3. Tabas I, García-Cardeña G, Owens GK. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J Cell Biol.* 2015;209(1):13–22.
4. Zheng Y, Gardner SE, Clarke MCH. Cell Death, Damage-Associated Molecular Patterns, and Sterile Inflammation in Cardiovascular Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2011;31(12):2781–6.
5. Fearon IM, Faux S P. Oxidative stress and cardiovascular disease: novel tools give (free) radical insight. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2009;47(3):372–81.
6. Liu H, Colavitti R, Rovira II, Finkel T. Redox-dependent transcriptional regulation. *Circ. Res.* 2005;97(10): 967–74.
7. Mundi S, Massaro M, Scoditti E, Carluccio MA, Van Hinsbergh VW, Iruela-Arispe ML. "Endothelial permeability, LDL deposition, and cardiovascular risk factors—a review." *Cardiovasc. Res.* 2018;114(1):35-52.
8. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *PNAS.* 1979;76(1):333-7.

9.Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011;473(7347):317-25.

10.Kattoor AJ, Pothineni NVK, Palagiri D, Mehta JL. Oxidative stress in atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* 2017;19(11):1-11.

11.Cabezas KG, Gómez-Fernandez CR, Vazquez-Padron R. A comprehensive review of oxidative stress as the underlying mechanism in atherosclerosis and the inefficiency of antioxidants to revert this process. *Curr. Pharm. Des.* 2018; 24(40):4705-10.

¹² Rafieian-Kopaei, M., Baradaran, A., & Rafieian, M. (2013). Estresse oxidativo e os efeitos paradoxais dos antioxidantes. *Journal of Research in Medical Sciences* , 18 (7), 628.

¹³ Leopold, JA (2015). Antioxidantes e doença arterial coronariana: da fisiopatologia à terapia preventiva. *Doença da artéria coronária* , 26 (2), 176.

14.Kiel RG, Ambrose JA. Vulnerable plaques versus patients-how to reduce acute coronary events in the future. *Controver. in Cardiol.* Springer, Cham. 2015; 33-42.

15.Burke AP, Virmani R. Pathophysiology of acute myocardial infarction. *Med. Clin. N. Am.* 2007;91(4):553-72.

16.Ruddy JM, Ikonomidis JS, Jones JA. Multidimensional contribution of matrix metalloproteinases to atherosclerotic plaque vulnerability: multiple mechanisms of inhibition to promote stability. *J. Vasc. Res.* 2016;53(1-2):1-16.

17.Gunter S, Solomon A, Tsang L, Woodiwiss AJ, Robinson C, Millen AM, et al. Apelin concentrations are associated with altered atherosclerotic plaque stability

mediator levels and atherosclerosis in rheumatoid arthritis. *Atherosclerosis*. 2017; 256:75-81.

18.Sluijter JP, Pulskens WP, Schoneveld AH, Velema E, Strijder CF, Moll F, et al. Matrix metalloproteinase 2 is associated with stable and matrix metalloproteinases 8 and 9 with vulnerable carotid atherosclerotic lesions: a study in human endarterectomy specimen pointing to a role for different extracellular matrix metalloproteinase inducer glycosylation forms. *Stroke*. 2006;37(1):235-9.

19.DeLeon-Pennell KY, Tian Y, Zhang B, Cates CA, Iyer RP, Cannon P, et al. CD36 is a matrix metalloproteinase-9 substrate that stimulates neutrophil apoptosis and removal during cardiac remodeling. *Circ. Cardiovasc. Genet*. 2016;9(1):14-25.

20.Halade GV, Jin YF, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase (MMP)-9: a proximal biomarker for cardiac remodeling and a distal biomarker for inflammation. *Pharmacol. Ther*. 2013;139(1):32-40.

21.Karabulut A. The Role of Microbiologic Agents in the Progression of the Atherosclerosis: a Comprehensive Review. *J Saudi Heart Assoc*. 2020; 32(3):440.

22.Cho I, Blaser MJ. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nature Rev. Gen*. 2012;13:260-70.

23.Vahed SZ, Barzegari A, Zuluaga M, Letourneur D, Pavon-Djavid G. Myocardial infarction and gut microbiota: an incidental connection. *Pharmacol. Res*. 2018;129:308-17.

24.Dahal U, Sharma D, Dahal K. An Unsettled Debate About the Potential Role of Infection in pathogenesis of Atherosclerosis. *JClin Med Res*. 2017;

9(7):547-54.

25.Campbell LA, Rosenfeld ME. Infection and atherosclerosis development. *Arch. Medic. Res.* 2015;46(5):339-50.

26.Dahal U, Sharma D, Dahal K. An Unsettled Debate About the Potential Role of Infection in pathogenesis of Atherosclerosis. *JClin Med Res.* 2017; 9(7):547-54.

27.Campbell LA, Rosenfeld ME. Infection and atherosclerosis development. *Arch. Medic. Res.* 2015;46(5):339-50.

28.Leentjens J, Bekkering S, Joosten LA, Netea MG, Burgner DP, Riksen NP. Trained innate immunity as a novel mechanism linking infection and the development of atherosclerosis. *Circ. Res.* 2018;122(5):664-9.

29.Muñoz-Carrillo JL, Contreras-Cordero JF, Gutiérrez-Coronado O, Villalobos-Gutiérrez PT, Ramos-Gracia LG, Hernández-Reyes VE. Cytokine profiling plays a crucial role in activating immune system to clear infectious pathogens. *In Immune response activation and immunomodulation. IntechOpen.* 2018.

30.Moss JW, Ramji DP. Cytokines: roles in atherosclerosis disease progression and potential therapeutic targets. *Future Med. Chem.* 2016;8(11):1317-30.

31.Fatkhullina AR, Peshkova IO, Koltsova EK. The role of cytokines in the development of atherosclerosis. *Biochem. (Mosc).* 2016;81(11):1358-70.

32.Sessa R, Di Pietro M, Filardo S, Turriziani O. Infectious burden and atherosclerosis: A clinical issue. *World J Clin Cases*. 2014;2(7):240.

33.Abibiglou SS, Baghi HB, Memar MY, Safaei N, Parvizi R, Banani M, et al. The Presence of Porphyromonas Gingivalis, Chlamydia Pneumonia, Helicobacter Pylori, Mycoplasma Pneumonia and Enterobacter Hormaechei DNA in the Atherosclerotic Plaques. *J. Med. Dent. Sci*. 2018; 6(3):1-6.

34.Higuchi ML, Sambiase N, Palomino S, Gutierrez P, Demarchi LM, Aiello V D, Ramires JAF. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in ruptured atherosclerotic plaques. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 2000; 33(9):1023-6.

35.Higuchi ML, Reis MM, Sambiase NV, Palomino SP, Castelli JB, Gutierrez PS, et al. Co-infection with *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in ruptured plaques associated with acute myocardial infarction. *Arq. Bras. Cardiol*. 2003;81(1):12-22.

36.Maia IL, Nicolau JC, Machado MN, Maia LN, Takakura IT, Rocha PR, et al. Prevalence of Chlamydia pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae in different forms of coronary disease. *Arq Bras Cardiol*. 2009;92(6):405-11.

37.Momiyama Y, Ohmori R, Taniguchi H, Nakamura H, Ohsuzu F. Association of Mycoplasma pneumoniae infection with coronary artery disease and its interaction with chlamydial infection. *Atherosclerosis*. 2004;176:139-44.

38.Medvedeva ES, Baranova NB, Mouzykantov AA, Grigoreva TY, Davydova MN, Chernova OA, et al. Extracellular vesicles of mycoplasmas and development of resistance to quinolones in bacteria. *Dokl Biochem Biophys*. 2014;454(1):34-7.

39.Higuchi ML, Santos MH, Rogério A, Kawakami JT, Bezerra HG, Canzian M. A role for archaeal organisms in development of atherosclerotic vulnerable plaques and myxoid matrices. *Clinics*. 2006;61:473-8.

40.Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *PNAS*. 1990;87(12):4576-9.

41.Rodrigues-Oliveira T, Belmok A, Vasconcellos D, Schuster B, Kyaw CM. Archaeal S-layers: overview and current state of the art. *Front. Microbiol*. 2017;8:2597.

42.Ramiro FS, de Lira EAG, Soares GMS, Retamal-Valdes B, Feres M, Figueiredo LC, et al. Effects of different periodontal treatments in changing the prevalence and levels of Archaea present in the subgingival biofilm of subjects with periodontitis: a secondary analysis from a randomized controlled clinical trial. *Int. J. Dent. Hyg*. 2018;16(4):569-75.

43.Gomis-Rüth FX. Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases. *J. Biol. Chem*. 2009;284(23):15353-7.

44.Higuchi ML, Kawakami JT, Ikegami RN, Reis MM, Pereira JJ, Ianni BM, et al. Archaea symbiont of *T. cruzi* infection may explain heart failure in Chagas disease. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2018;8:412.

45.Lovley DR, Holmes DE, Nevin KP. Dissimilatory Fe(III) and Mn (IV) reduction. *Adv. Microb. Physiol*. 2004;49:219-86.

-
- 46.Kurtz DM. Microbial detoxification of superoxide: the non-heme iron reductive paradigm for combating oxidative stress. *Acc. Chem. Res.* 2004; 37:902-8.
- 47.Imlay JA. Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.* 2003;57:395-418.
- 48.Cannio R, Florentino G, Morana A, Ossi M, Bartolucci S. Oxygen: friend or foe? Archaeal superoxide dismutases in the protection of intra- and extracellular oxidative stress. *Front Biosci.* 2000;5: D768-79.
- 49.Srinivasan V, Morowitz HJ. Ancient genes in contemporary persistent microbial pathogens. *Biol Bull.* 2006;210:1-9.
- 50.Ikegami RN, Kawakami JT, Abdalla DSP, Santos RD, Filho RK, Ramires JAF, et al. Infection and microparticles may cause complication of atherosclerotic plaques. *J Diabetes Metab.* 2015;6:5.
- 51.Matarazzo F, Ribeiro AC, Feres M, Faveri M, Mayer MPA. Diversity and quantitative analysis of Archaea in aggressive periodontitis and periodontally healthy subjects. *J Clin Periodontol.* 2011;38:621-7.
- 52.Yang JE, Rossignol ED, Chang D, Zaia J, Forrester I, Raja K, et al. Complexity and ultrastructure of infectious extracellular vesicles from cells infected by non-enveloped virus. *Sci Rep.* 2020;10:7939.
- 53.Xiong J, Miller VM, Li Y, Jayachandran M. Microvesicles at the crossroads between infection and cardiovascular diseases. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2012;59:124-32.

54. Abels ER, Breakefield XO. Introduction to extracellular vesicles: biogenesis, RNA cargo selection, content, release, and uptake. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2016;36(3):301-12.

55. Van Niel G, d'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018;19(4):213-28.

56. Mathieu M, Martin-Jaular L, Lavieu G, Théry C. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature cell. biol.* 2019;21(1):9-17.

57. Tkach M, Théry C. Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go. *Cell.* 2016;164(6):1226-32.

58. Deng W, Tang T, Hou Y, Zeng Q, Wang Y, Fan W, et al. Extracellular vesicles in atherosclerosis. *Clin Chim Acta.* 2019;495:109-17.

59. Ridger VC, Boulanger CM, Angelillo-Scherrer A, Badimon L, Blanc-Brude O, Bochaton-Piallat ML, et al. Microvesicles in vascular homeostasis and diseases. Position Paper of the European Society of Cardiology (ESC) Working Group on Atherosclerosis and Vascular Biology. *Thromb. Haemost.* 2017;117(7):1296-316.

60. Leroyer AS, Isobe H, Leseche G, Castier Y, Wassef M, Mallat Z, et al. Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49:772-7.

61. Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Leseche G, Freyssinet JM, Tedqui A. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation.* 1999;99:348-

53.

62. Huber J, Vales A, Mitulovic G, Blumer M, Schmid R, Witztum JL, et al. Oxidized membrane vesicles and blebs from apoptotic cells contain biologically active oxidized phospholipids that induce monocyte-endothelial interactions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002;22:101–7.

63. Pizzirani C, Ferrari D, Chiozzi P, Adinolf E, Sandona D, Savaglio E, et al. Stimulation of P2 receptors causes release of IL-1 β -loaded microvesicles from human dendritic cells. *Blood.* 2007;109(9), 3856-64.

64. Agouni A, Lagrue-Lak-Hal AH, Ducluzeau PH, Mostefai HA, Draunet-Busson C, Leftheriotis G, et al. Endothelial dysfunction caused by circulating microparticles from patients with metabolic syndrome. *Am. J. Clin. Pathol.* 2008;173(4):1210-9.

65. Nomura S, Tandon NN, Nakamura T, Cone J, Fukuhara S, Kambayashi J. High-shear-stress- induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. *Atherosclerosis.* 2001;158:277-87.

66. Rautou PE, Leroyer AS, Ramkhelawon B, Devue C, Duflaut D, Vion AC, et al. Microparticles from human atherosclerotic plaques promote endothelial ICAM-1-dependent monocyte adhesion and transendothelial migration. *Circulation Res.* 2011;108(3):335-43.

67. Sarkar A, Mitra S, Mehta S, Raices R, Wewers MD. Monocyte derived microvesicles deliver a cell death message via encapsulated caspase-1. *PloS one.* 2009;4(9):e7140.

68. New SE, Goettsch C, Aikawa M, Marchini JF, Shibasaki M, Yabusaki K, et al. Macrophage-derived matrix vesicles: an alternative novel mechanism for microcalcification in atherosclerotic plaques. *Circ. Res.* 2013;113(1):72-7.

69. Barile L, Lionetti V, Cervio E, Matteucci M, Gherghiceanu M, Popescu LM, et al. Extracellular vesicles from human cardiac progenitor cells inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve cardiac function after myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* 2014;103(4):530-41.

70. Gray WD, French KM, Ghosh-Choudhary S, Maxwell JT, Brown ME, Platt MO, et al. Identification of therapeutic covariant microRNA clusters in hypoxia-treated cardiac progenitor cell exosomes using systems biology. *Circulation Res.* 2015;116(2):255-63.

71. Ibrahim AGE, Cheng K, Marbán E. Exosomes as critical agents of cardiac regeneration triggered by cell therapy. *Stem Cell Rep.* 2014;2(5):606-19.

72. Killip III T, Kimball JT. Treatment of myocardial infarction in a coronary care unit: a two year experience with 250 patients. *Am. J. Cardiol.* 1967;20:457-64.

73. Bustamante E, Pediaditakis P, He LH, Lemasters JJ. Isolated mouse liver mitochondria are devoid of glucokinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005;334(3):907-10.

74. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J. Extracell. Vesicles.* 2018;7(1):1535750.

75.Sidhom K, Obi PO, Saleem A. A review of exosomal isolation methods: is size exclusion chromatography the best option?. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(18):6466.

76.Duarte MIS, Mariano ON, Takakura CFH. A fast method for processing biologic material for electron-microscopic diagnosis in infectious-disease. *Ultrastruc. Pathol.* 1992;16(4):475-82.

77.P Bode, Darren HM, Hickerson A. Characterization and quantitation by flow cytometry of membranous microparticles formed during activation of platelet suspensions with ionophore or thrombin. *Platelets.* 2000;11(5):259-71.

78.Couper KN, Barnes T, Hafalla JC, Combes V, Ryffel B, Secher T, et al. Parasite-derived plasma microparticles contribute significantly to malaria infection-induced inflammation through potent macrophage stimulation. *PLoS pathogens.* 2010;6(1):e1000744.

79.Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytic Bioch.* 1976;72(1-2):248-54.

80.Hardison RL, Harrison A, Wallace RM, Heimlich DR, O'Bryan ME, Sebra RP, et al. Microevolution in response to transient heme-iron restriction enhances intracellular bacterial community development and persistence. *PLoS Pathog.* 2018;14(10):e1007355.

81.Manrique P, Dills M, Young MJ. The human gut phage community and its implications for health and disease. *Viruses.* 2017;9:141.

82.Tang WW, Hazen SL. Microbiome, trimethylamine N-oxide, and

cardiometabolic disease. *Transl. Res.* 2017; 179:108-115.

83.Tang, WW, Kitai T, Hazen SL. Gut microbiota in cardiovascular health and disease. *Circulation Res.* 2017.120:1183-96.

84.Chen PB, Black AS, Sobel AL, Zhao Y, Mukherjee P, Molparia B, et al. Directed remodeling of the mouse gut microbiome inhibits the development of atherosclerosis. *Nature biotech.* 2020;38:1288-97.

85.Tuomisto S, Huhtala H, Martiskainen M, Goebeler S, Lehtimäki T, Karhunen PJ. Age-dependent association of gut bacteria with coronary atherosclerosis: Tampere Sudden Death Study. *PloS one.* 2019;14:e0221345.

86.Campbell LA, Rosenfeld ME. Infection and atherosclerosis development. *Arch. Medic. Res.* 2015;46:339-50.

87.Higuchi ML, Sambiase N, Palomino S, Gutierrez P, Demarchi LM, Aiello VD, et al. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in ruptured atherosclerotic plaques. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2000;33:1023-6.

88.Bose S, Aggarwal S, Singh DV, Acharya N. Extracellular vesicles: An emerging platform in gram-positive bacteria. *Microbial Cell.* 2020;7(12):312.

89.Albers SV, Meyer BH. The archaeal cell envelope. *Nature Rev. Microbiol.* 2011;9(6):414-26.

90.Santucci L, Bruschi M, Del Zotto G, Antonini F, Ghiggeri GM, Panfoli I, Candiano G. Biological surface properties in extracellular vesicles and their effect on cargo proteins. *Scientific Rep.* 2019;9(1):1-12.

91.Keller MD, Ching KL, Liang FX, Dhabaria A, Tam K, Ueberheide BM et al. Decoy exosomes provide protection against bacterial toxins. *Nature*. 2020;579:260-4.

92.Femminò S, Penna C, Margarita S, Comità S, Brizzi MF, Pagliaro P. Extracellular vesicles and cardiovascular system: Biomarkers and Cardioprotective Effectors. *Vasc Pharmacol*. 2020;106790.

93.Emanuelli C, Shearn AI, Angelini GD, Sahoo S. Exosomes and exosomal miRNAs in cardiovascular protection and repair. *Vasc pharmacol*. 2015;71:24-30.

94.Sharma A, Novak EK, Sojar HT, Swank RT, Kuramitsu HK, Genco RJ. *Porphyromonas gingivalis* platelet aggregation activity: outer membrane vesicles are potent activators of murine platelets. *Oral Microbiol and Immunol: Short commun*. 2000;15:393-6.

95.Schwartz MK, Hunter LW, Huebner M, Lieske JC, Miller VM. Characterization of biofilm formed by human-derived nanoparticles. *Nanomedicine*. 2009;4:931-41.

96.Opstad TB, Seljeflot I, Bøhmer E, Arnesen H, Halvorsen S. MMP-9 and its regulators TIMP-1 and EMMPRIN in patients with acute ST-elevation myocardial infarction: a NORDISTEMI substudy. *Cardiology*. 2018;139:17-24.

97.Jordakieva G, Budge-Wolfram RM, Budinsky AC, Nikfardjam M, Delle-Karth G, Girard A, et al. Plasma MMP-9 and TIMP-1 levels on ICU admission are associated with 30-day survival. *Wien. Klin. Wochenschr*. 2021;133(3):86-95.

98.Iyer RP, Jung M, Lindsey ML. MMP-9 signaling in the left ventricle following myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2016;311:H190-H198.

99.Stintzing S, Heuschmann P, Barbera L, Ocker M, Jung A, Kirchner T, Neureiter D. Overexpression of MMP9 and tissue factor in unstable carotid plaques associated with Chlamydia pneumoniae, inflammation, and apoptosis. *Ann. Vasc. Surg*. 2005;19:310.

100.Khokha R, Murthy A, Weiss A. Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nature Rev. Immunol*. 2013;13:649-665.

101.Marino-Puertas L, Goulas T, Gomis-Rüth FX. Matrix metalloproteinases outside vertebrates. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell. Res*. 2017;1864(11):2026-35.

102.Gaikwad SS, Avari JG, Patil ML. Zeta potential as a diagnostic tool to determine the angina risk. Wanadongri: Apolipoproteins, Triglycerides and Cholesterol; 2020:1-8.

103.Frangogiannis NG. Interleukin-1 in cardiac injury, repair, and remodeling: pathophysiologic and translational concepts. *Discoverie*. 2015;3(1).

104.Debrunner M, Schuiki E, Minder E, Straumann E, Naegeli B, Mury R, et al. Proinflammatory cytokines in acute myocardial infarction with and without cardiogenic shock. *Clinic. Res. Cardiol*. 2008;97:298-305.

105.Neri M, Fineschi V, Di Paolo M, Pomara C, Riezzo I, Turillazzi E, Cerretani, D. Cardiac oxidative stress and inflammatory cytokines response after

myocardial infarction. *Current Vasc. Pharmacol.* 2015;13(1):26-36.

106.Ammirati E, Cannistraci CV, Cristell NA, Vecchio V, Palini AG, Tornvall P, et al. Identification and predictive value of interleukin-6+ interleukin-10+ and interleukin-6- interleukin-10+ cytokine patterns in ST-elevation acute myocardial infarction. *Circulation Res.* 2012;111:1336-1348.

107.Tian M, Yuan YC, Li JY, Gionfriddo MR, Huang RC. Tumor necrosis factor- α and its role as a mediator in myocardial infarction: a brief review. *Chronic. Dis. Transl. Med.* 2015; 1:18-26.

108.Nilsson L, Szymanowski A, Swahn E, Jonasson L. Soluble TNF receptors are associated with infarct size and ventricular dysfunction in ST-elevation myocardial infarction. *PLoS One.* 2013;8:e55477.

109.Santos MHH, Higuchi ML, Tucci PJ, Garavelo SM, Reis MM, Antonio EL, et al. Previous exercise training increases levels of PPAR- α in long-term post-myocardial infarction in rats, which is correlated with better inflammatory response. *Clinics.* 2016;71:163-8.

110.Campbell LA, Yaraei K, Van Lenten B, Chait A, Blessing E, Kuo CC, et al. The acute phase reactant response to respiratory infection with *Chlamydia pneumoniae*: implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Microb. Infect.* 2010;12:598-606.

111.Yamaguchi Y, Kurita-Ochiai T, Kobayashi R, Suzuki T, Ando T. Activation of the NLRP3 inflammasome in *Porphyromonas gingivalis*-accelerated atherosclerosis. *Pathog. Dis.* 2015;73(4).

112.Jia R, Hashizume-Takizawa T, Du Y, Yamamoto M, Kurita-Ochiai T. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* induces Th17 cells in atherosclerotic lesions. *Pathog. Dis.* 2015;73(3).

113.Angelot F, Seillès E, Biichlé S, Berda Y, Gaugler B, Plumas J. Endothelial cell-derived microparticles induce plasmacytoid dendritic cell maturation: potential implications in inflammatory diseases. *Haematologica.* 2009;94:1502.

114.Loyer X, Zlatanova I, Devue C, Yin M, Howangyin KY, Klaihmon P, et al. Intra-cardiac release of extracellular vesicles shapes inflammation following myocardial infarction. *Circulation Res.* 2018; 123:100-6.

115.Pandey KB, Rizvi SI. Biomarkers of oxidative stress in red blood cells. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc* 2011;155(2).

116.Feng Y, Shen C, Ma G, Wang J, Chen Z, Dai Q, et al. Prolonged pain to hospital time is associated with increased plasma advanced oxidation protein products and poor prognosis in patients with percutaneous coronary intervention for ST-elevation myocardial infarction. *Heart and vessels.* 2010;25:374-8.