



Interação molecular entre o reparo tecidual via sinalização SDF-1/CXCR4 e a resposta inflamatória no infarto agudo do miocárdio com supradesnivelamento do segmento-ST

Melissa Kristochek Da Silva^{a*} | Marco Antônio De Bastiani^b | Lucinara Dadda Dias^c | Raphael Boesche Guimarães^d | Marcela Corso Arend^e | Melissa Medeiros Markoski^f

^aDoutora e Mestre em Ciências da Saúde: Cardiologia (IC/FUC), Pós-Graduanda em Farmacologia Geral (UFLA-MG), Farmacêutica e Bioquímica (UFSM). Instituto de Cardiologia - Fundação Universitária de Cardiologia, Porto Alegre, RS, Brasil.

^bBiomédico (UFRGS), Mestre em Bioquímica (UFRGS), Doutor em bioquímica (UFRGS). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

^cBióloga (UNISINOS), Mestre em Ciências da Saúde: Cardiologia (IC/FUC). Instituto de Cardiologia - Fundação Universitária de Cardiologia, Porto Alegre, RS, Brasil.

^dMédico Cardiologista, Mestre em Cardiologia (ICFUC). Instituto de Cardiologia - Fundação Universitária de Cardiologia, Porto Alegre, RS, Brasil.

^eBiomédica (UNISINOS), Mestre em Biologia Molecular (UNIFESP). Instituto de Cardiologia - Fundação Universitária de Cardiologia, Porto Alegre, RS, Brasil.

^fBióloga (UFRGS), Doutora em Biologia Molecular (UFRGS), Pós-Doutora em Diagnóstico Fitossanitário (UFRGS), Sinalização Celular (PUCRS) e Imunologia (UFCSA), Professora adjunta da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brasil.

*Corresponding author: melks5@yahoo.com.br

Resumo A relação resposta inflamatória/dano isquêmico é pré-requisito para início do processo de adaptação do tecido cardíaco pós-infarto, contexto no qual a sinalização SDF-1/CXCR4 desempenha papel central no reparo tecidual. Este estudo objetivou investigar a modulação exercida pelo eixo SDF-1/CXCR4 sobre a resposta inflamatória após infarto agudo do miocárdio com elevação do segmento-ST (STEMI). Para tanto, desenvolvemos Redes Bayesianas a partir de dados de microarranjo (GEO) e avaliamos a expressão dos transcritos de interesse em pacientes com STEMI por qPCR. No contexto pró-inflamatório e agudo pós-infarto observamos forte relação entre proteínas de adesão endotelial e do infiltrado celular. No cenário crônico e anti-inflamatório, verificamos relação entre proteínas envolvidas com remodelamento tecidual e bloqueio de vias apoptóticas. Os níveis de expressão dos transcritos avaliados encontravam-se aumentados nos momentos iniciais pós-infarto. Conclui-se que os efeitos promovidos pela interação SDF-1/CXCR4 podem ser modulados segundo o perfil imunológico, influenciando diretamente nos seus efeitos adaptativos e cardioprotetores.

Palavras-chave: dano tecidual, eixo SDF-1/CXCR4, inflamação, infarto do miocárdio, reparo cardíaco

Molecular interaction between tissue repair via SDF-1/CXCR4 signaling and the inflammatory response in acute myocardial infarction with ST-segment elevation

Abstract The inflammatory response/ischemic damage relationship is a prerequisite for the initiation of the process of adaptation of the post-infarction cardiac tissue, in which the SDF-1/CXCR4 signaling plays a central role in tissue repair. This study aimed to investigate the modulation exerted by the SDF-1/CXCR4 axis on the inflammatory response after ST-segment elevation acute myocardial infarction (STEMI). Therefore, we developed Bayesian Networks from microarray (GEO) data and evaluated the expression of transcripts of interest in patients with STEMI by qPCR. In the chronic and anti-inflammatory scenario, we verified a relationship between proteins involved in tissue remodeling and the blockade of apoptotic pathways. The expression levels of the transcripts evaluated were increased in the initial moments after the infarction. In conclusion, the effects promoted by the SDF-1/CXCR4 interaction can be modulated according to the immunological profile, directly influencing its adaptive and cardioprotective effects. Therefore, we believe that students can contribute to the awareness of family and friends about COVID-19 and fake news.

Keywords: tissue damage, SDF-1/CXCR4 axis, inflammation, inflammatory response, myocardial infarction, heart repair

1. Introdução



O processo isquêmico, estabelecido durante o período que antecede o infarto agudo do miocárdio (IAM) e após evento, encontra-se entre as formas mais comuns de inflamação do miocárdio. A liberação de quimiocinas específicas é um sinal característico da resposta inflamatória no contexto do infarto, atuando como mediadoras no recrutamento de leucócitos pró-inflamatórios para áreas de lesão, determinando a composição do infiltrado leucocitário (Frangogiannis 2012). Dentre as quimiocinas, o SDF-1 pode exercer ações inflamatórias no pós-IAM além do importante papel no reparo fisiológico cardíaco após lesão tecidual (Hu et al 2007).

O eixo SDF-1/CXCR4 desempenha importante papel no reparo do miocárdio desencadeando efeitos protetivos que melhoram a função cardíaca após IAM (saxena et al 2008). Já foi demonstrado que esta via de sinalização celular possui duplo papel no contexto pós-IAM (Liehn et al 2011), com evidências de que os efeitos benéficos no reparo tecidual podem ser parcialmente revertidos, devido à resposta pró-inflamatória induzida pela via. Por outro lado, a interação de células CXCR4⁺, como neutrófilos e subtipos de macrófagos, é favorável no sentido de intensificar a inflamação local (Gordon and Martinez 2010). Adicionalmente, a persistência da resposta inicial pró-inflamatória pode aumentar as chances do desenvolvimento de falência cardíaca (Liehn et al 2011). Tais efeitos ocorrem por meio da expressão de genes específicos responsáveis pela manutenção da secreção de citocinas e pela ativação de vias pró-inflamatórias, possivelmente associadas ao receptor CXCR4 (Lachtermacher et al 2010).

No cenário da inflamação, dependendo do microambiente onde se localizam, os macrófagos podem ser identificados por dois fenótipos diferentes, denominados "clássico" ativado (M1) ou "alternativo" ativado (M2), os quais apresentam quadros comportamentais inflamatórios e anti-inflamatórios, respectivamente (Gordon and Martinez 2010).

Considerando a importância da resposta inflamatória no prognóstico de pacientes no pós-infarto (Frangogiannis 2015) e o papel central da sinalização SDF-1/CXCR4 no reparo tecidual (Hu et al 2007), o presente estudo se propõe a investigar a modulação exercida pela ativação do eixo SDF-1/CXCR4 sobre a resposta inflamatória, na fase aguda e crônica do pós-infarto. Para tanto, empregamos abordagem de Redes Bayesianas (RB) e avaliamos a expressão dos transcritos diferencialmente expressos que fazem parte destas redes em grupo de pacientes com infarto agudo do miocárdio com elevação do segmento-ST (STEMI). No cenário clínico, alterações na expressão de genes relacionados a estes mecanismos moleculares podem direcionar pesquisas sobre aspectos reguladores nas diferentes fases do IAM, com impacto na descoberta de possíveis e inovadores alvos terapêuticos direcionados ao reparo tecidual e úteis para fins de prognóstico.

2. Material e Métodos

2.1. Termos e funções biológicas no Gene Ontology

Com relação à análise dos componentes da sinalização ativada pelo eixo SDF-1/CXCR4 e seus mediadores intermediários, as funções biológicas de interesse foram investigadas explorando-se a expressão de conjunto de genes relacionados a esta via de sinalização, conforme anotações obtidas pelo *Gene Ontology* (GO) (Ashburne 2000) Utilizamos termos associados com a ativação do eixo e envolvidos com sinalização mediada pela *proteína G* (GO:0007186) e *quimiotaxia* (GO:0070098). O primeiro refere-se a série de sinais moleculares, resultantes da ativação de receptor específico, associado a proteína G, iniciando a ativação de vias associadas a esta proteína, o segundo a sinais moleculares iniciados pela ligação de uma quimiocina a receptor na superfície celular e que termina com a regulação e ativação de diferentes funções.

2.2. Análise da expressão gênica diferencial dos dados de microarranjo e análise de enriquecimento de grupos de genes

As análises de expressão diferencial dos genes presentes nos termos acima mencionados, foram conduzidas a partir dos dados de microarranjo obtidos dos estudos selecionados e identificados por GSE48060 (Suresh et al 2014), GSE62646 (Kiliszek et al 2012) e GSE59867 (Maciejak et al 2015). Utilizamos como critério de seleção dos estudos pacientes com STEMI e sob terapia farmacológica, análises de microarranjo em amostras de células mononucleares isoladas de sangue periférico (PBMC) nas primeiras horas após infarto, aos 30 dias e seis meses após o evento.

As comparações foram feitas de modo independente em cada estudo, confrontando dados dos transcritos no IAM (fase aguda ou crônica) com os basais, obtidos de indivíduos controles, de cada banco de dados. No estudo GSE48060 comparamos dados de microarranjo de pacientes com eventos recorrentes vs. sem eventos. No estudo GSE62646, comparamos dados de pacientes com STEMI vs. pacientes com doença arterial coronariana (DAC). Para o GSE59867, foram realizadas 4 comparações, dados obtidos na admissão (24 - 48 h após evento agudo de infarto), alta hospitalar (4 - 7 dias após evento), 1 mês e 6 meses, todos comparados ao controle (pacientes com DAC). A análise dos dados de expressão gênica diferencial dos dados de microarranjo foi conduzida utilizando a ferramenta *Bioconductor package limm*. A medida do *log fold change* (logFC) foi utilizada para obter o ranking de fenótipos requerido para a análise de enriquecimento de grupo de genes (GSEA). Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa R (*statistical environment*) versão 34.0.

2.3. Associação dos dados extraídos com assinaturas macrocíticas do perfil inflamatório e dados de microarranjo obtidos a partir dos estudos selecionados

Como última etapa do processo de busca e seleção de dados, realizamos a análise de interação entre os componentes do eixo SDF-1/CXCR4 e assinaturas gênicas, relacionadas à polarização de macrófagos propostas por Becker et al (2015). Para isso, utilizamos análise de enriquecimento com o auxílio da GSEA (Subramanian et al 2005), na qual, os transcritos foram ordenados em um ranqueamento com base na correlação entre sua expressão e categoria fenotípica distinta. Estas análises foram conduzidas a partir dos transcritos relacionados ao eixo SDF-1/CXCR4 e diferencialmente expressos, obtidos a partir dos dados de transcriptoma dos estudos selecionados, juntamente com os transcritos contidos nas assinaturas inflamatórias M1 (IFN γ + LPS, TNF α) e M2 (IL-4, IL-13) para inferir o perfil pró-inflamatório e anti-inflamatório, respectivamente.

2.4. Construção das Redes Bayesianas

As RB foram utilizadas para investigar padrões de interação de proteínas que contribuem conjuntamente na função biológica de interesse (Ni et al 2018). Neste caso, a interação entre os componentes do eixo SDF-1/CXCR4 e assinaturas gênicas relacionadas à polarização de macrófagos. Os transcritos utilizados para a construção das RB foram selecionados de acordo com os seguintes critérios: presença em todos os estudos e nas assinaturas e termos definidos; estarem diferencialmente expressos e consistentemente associados com o mesmo fenótipo biológico. Somente os genes que apresentaram valor de $P < 0,001$ foram utilizados para elaboração das redes. A informação obtida por meio de RB é detectar se duas proteínas estão interagindo, independentemente do tipo de interação envolvida, processo que envolve o reconhecimento de entidades (proteína) mencionadas e a extração da relação entre elas.

Os transcritos relacionados com o eixo SDF-1/CXCR4, e seus mediadores intermediários, tiveram suas funções biológicas de interesse avaliadas pela expressão de conjunto de genes no GO. De acordo com a importância biológica atribuída aos termos, foram filtrados apenas os transcritos presentes nos termos acima mencionados (GO:0007186 e GO:0070098). Primeiramente, os dados analisados foram estratificados em três níveis, utilizando-se o algoritmo *Hartemink's discretization algorithm*. Posteriormente, por meio do algoritmo *Tabu*, foi conduzida a etapa de pesquisa com base na pontuação obtida, que serviu de parâmetro para a construção da estrutura do grafo. Após a “aprendizagem” da estrutura gráfica, foram geradas 5000 redes randômicas (*5000 random bootstrap resamples*), nas quais cada vértice relaciona-se de maneira aleatória com até cinco vértices distintos, gerando os arcos e suas direções. A pontuação das redes foi obtida por *Bayesian Dirichlet*. Por fim, a estrutura do grafo foi construída a partir da média das 5000 redes, considerando-se a retenção de arcos que passaram em um limiar de relacionamento probabilístico (acurácia) com base na sua força de interação. Todos os passos da presente análise de redes foram realizados em R *statistical environment*, utilizando o pacote *bnlearn*.

2.5. População

Pacientes com diagnóstico de STEMI provenientes do Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul/Fundação Universitária de Cardiologia (ICFUC), submetidos à intervenção coronária percutânea primária (ICP), foram incluídos na etapa de análise da expressão gênica dos alvos pré-selecionados ($n=14$). O grupo controle foi constituído por pacientes submetidos à angioplastia, com diagnóstico de coronárias sem lesões e sem histórico de infarto do miocárdio ($n=8$). Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, em respeito à lei 196/96. Como critérios de elegibilidade, foram incluídos no estudo, pacientes com idade entre 40 e 75 anos, sem doenças hematológicas, neoplasias ou em tratamento com quimioterápicos, sem intercorrências cardíacas prévias e sob terapia medicamentosa padrão. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da instituição sob o número 4986/14.

2.6. Coleta de sangue e isolamento do RNA total

Amostras de sangue periférico foram coletadas de pacientes com STEMI no dia do evento (admissão hospitalar), 3 dias, 5-7 dias (alta hospitalar), 1 mês e 6 meses pós-IAM. As coletas dos sujeitos controles foram realizadas posteriormente ao procedimento de angioplastia. O método utilizado para a separação e isolamento da fração mononuclear do sangue periférico baseia-se na técnica de separação por gradiente de centrifugação Ficoll-Hypaque[®] (densidade 1077g/mL) (GE, Healthcare).

O RNA total foi isolado a partir das PBMC utilizando o Kit de extração *PureLink[™] RNA Mini Kit Ambion[®]* (Life, Invitrogen, Brasil). O RNA mensageiro (mRNA) foi obtido pelo Kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, USA). A determinação da concentração e da pureza do cDNA foi realizada por Nanodrop2000 (ThermoFisher, USA).

2.7. Análise dos transcritos de interesse por Reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR real time)

Avaiamos a expressão dos transcritos diferencialmente expressos que fazem parte das RB e mais relevantes no contexto do estudo, em grupo de pacientes com STEMI. Para análise da expressão gênica foi utilizada a técnica de Reação em cadeia da polimerase, quantitativa (qPCR), realizada a partir do cDNA obtido das PBMC de pacientes com STEMI. Empregamos o sistema *TaqMan[®] Gene Expression Assay* (Applied Biosystems, USA). O GAPDH foi utilizado como *normalizador* e as amostras dos sujeitos controles constituíram o *calibrador* do estudo. O método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK et al 2001), onde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (gene alvo) – ΔCt (gene normalizador), foi empregado para calcular os níveis relativos da expressão gênica, utilizando o valor dos CT (*threshold*

cycle) gerados pelo sistema qPCR, equipamento *Applied Biosystems 7500 Fast Real Time PCR System* (ThermoFisher Scientific, USA).

3. Resultados

3.1 Seleção dos estudos com dados de expressão gênica obtidos por microarranjos

Após a triagem que considerou critérios previamente definidos, foram selecionados três estudos: A - GSE59867; B - GSE62646; C - GSE48060. A partir destes estudos (Figura 1A) e da interferência entre a resposta imune inflamatória e a expressão gênica dos componentes das vias relacionadas ao eixo SDF-1/CXCR4, foram construídas as RB. Para inferir sobre o perfil inflamatório, utilizamos 109 transcritos referentes ao fenótipo M1 e 56 relacionados ao fenótipo M2 com base nas assinaturas de Becker et al (2015). Estes transcritos foram desafiados contra o eixo SDF-1/CXCR4 e o tipo de resposta imunológica das assinaturas (pró ou anti-inflamatória) (Figura 1B) para gerar os perfis de enriquecimento de grupos de genes (Figura 1C). As RB foram geradas apenas sobre dados considerados estatisticamente significantes (Figura 1D e 1E).

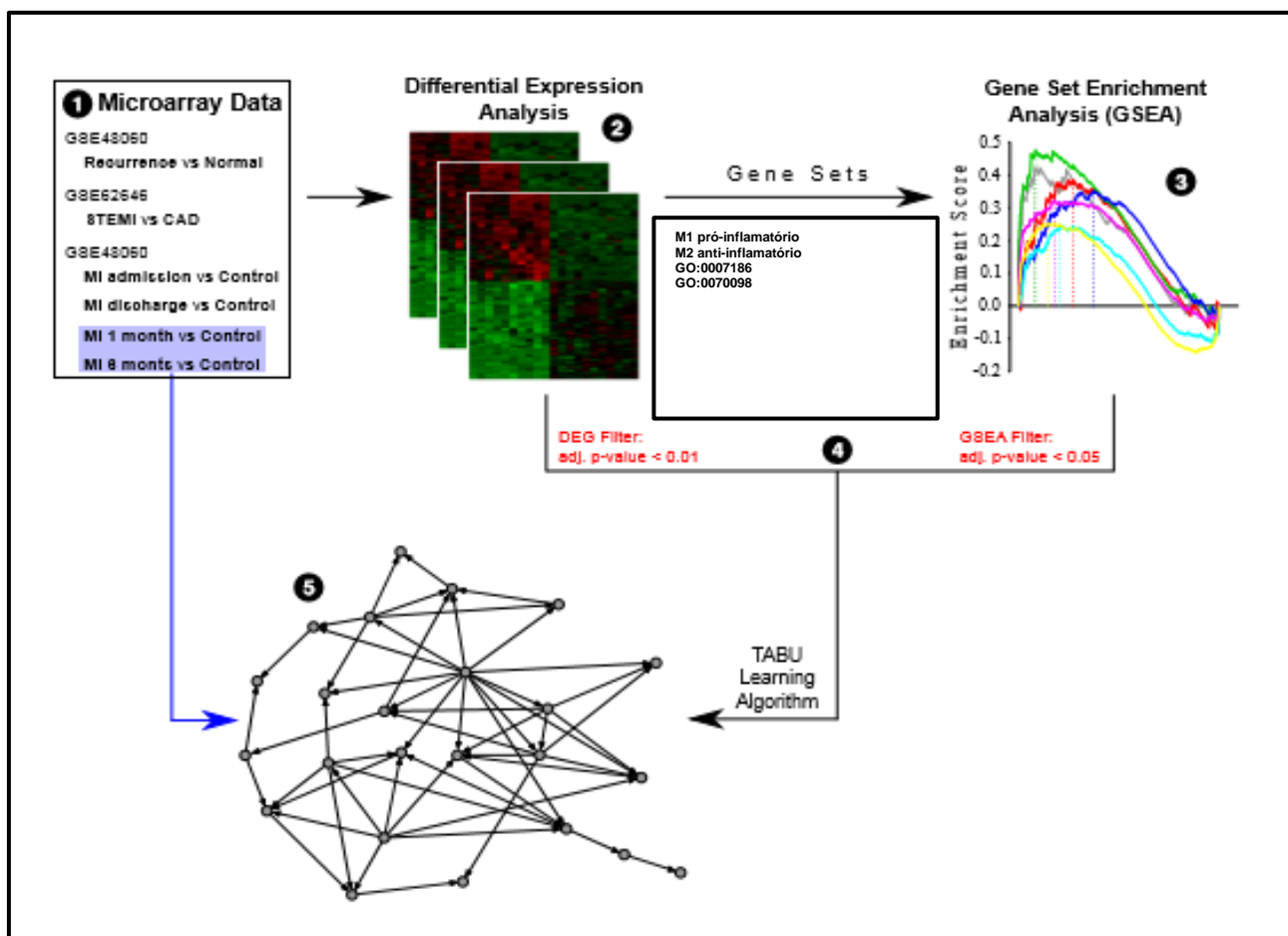


Figura 1 Esquema representativo da inferência de redes Bayesianas. (1) Dados de expressão e comparações de interesse foram selecionados utilizando o repositório GEO. Em seguida, análise de expressão diferencial (2) e GSEA de grupos de genes de interesse (3) foram realizadas a partir dos dados coletados e comparações desejadas. Os genes diferencialmente expressos para os grupos de genes avaliados foram filtrados (4) e submetidos ao procedimento de inferência de Redes Bayesianas (5).

3.2 Análise de enriquecimento gênico e perfil inflamatório

A partir do estudo A foram feitos dois sets de enriquecimento, nos quais confrontamos os transcritos da fase aguda (1 mês pós-IAM) e da fase crônica (6 meses pós-IAM) com os basais (Figura 2A e B). Na fase aguda houve predomínio do fenótipo pró-inflamatório, enquanto que na fase crônica do pós-IAM a assinatura da condição anti-inflamatória prevaleceu. Não encontramos associação na análise de enriquecimento dos estudos B e C nas condições analisadas (dados não apresentados).

Com base no enriquecimento realizado sobre o estudo A, foram filtrados quatro genes referentes à assinatura pró-inflamatória; *IL15*, *IRF7*, *ITGB7* e *XRN1* e quatro genes referentes à assinatura anti-inflamatória; *CARD9*, *ESPNL*, *FZD2*, *OSBPL7* (Tabela 1).

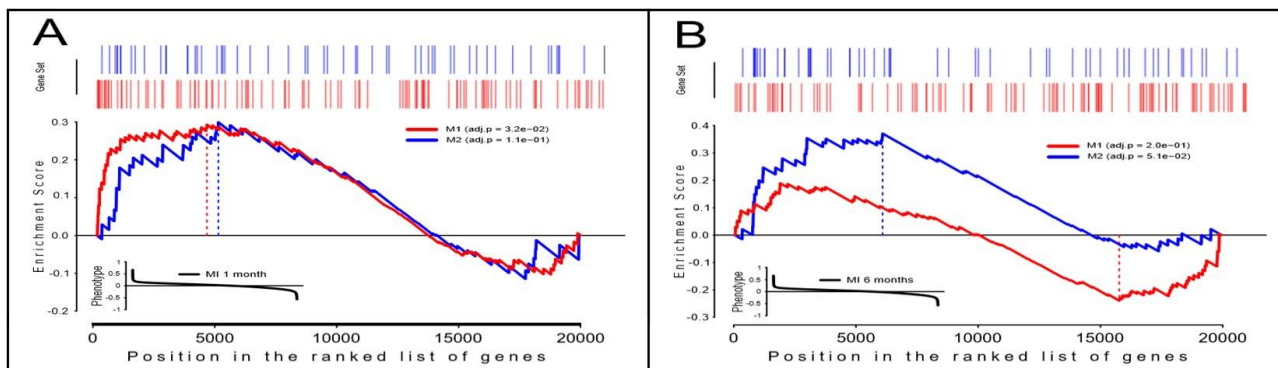


Figura 2 Análises de enriquecimento do conjunto de genes. GSEA a partir das assinaturas dos perfis de ativação de macrófagos polarizados (Becker et al 2015) e dos transcritos obtidos do estudo de Maciejak e cols (2015). Enriquecimento das assinaturas M1(IFN γ + LPS, TNF α) e M2 (IL-4, IL-13) fase aguda, 1 mês pós-IAM (A) e fase crônica, 6 meses (B) * $p < 0,05$.

Tabela 1 Genes filtrados do GSE 59867 desafiados com as assinaturas macrocíticas M1/M2.

| Genes e função biológica | Fase aguda | Fase crônica | p** |
|---|---------------------------------|------------------|-------|
| | Assinatura pró-inflamatória M1 | | |
| | logFC* | logFC | |
| IL15 - estimula a produção de linfócitos | -0,16934137986270 | -0,1845965872184 | <0,01 |
| IRF7 - Regulador da transcrição da família interferon, atua na imunidade inata, responde a danos no DNA e defesa contra RNA virais | 0,18521283981693 | 0,1495255500261 | <0,01 |
| ITGB7 - Associado a adesão de linfócitos e a tradução de proteínas de adesão endotelial (VCAM-1) | 0,19717041647597 | 0,2001342325825 | <0,01 |
| XRN1 - Atua na resposta ao dano no DNA e defesa contra RNA viral | -0,12793573455377 | -0,1340593452069 | <0,01 |
| | Assinatura anti-inflamatória M2 | | |
| CARD9 - Participa de vias regulatórias da apoptose e correlaciona-se ao aumento de linfócitos T17-helpers | 0,15319881693364 | 0,1421239418543 | <0,01 |
| ESPNL - Participa da imunidade adaptativa. Processos ainda pouco estudados | 0,09786455606407 | 0,0923321870088 | <0,01 |
| FZD2 - Participa nas vias canônicas da beta-cadeína, sendo intermediário da PKC, envolvido com o remodelamento tecidual via WNT | 0,15674281235698 | 0,1511628732320 | <0,01 |
| OSBPL7 - Participa do metabolismo de lipídios, associado a danos na membrana celular | 0,13427717391304 | 0,1521056076479 | <0,01 |

IL-15=interleucina-15, IRF7= *Interferon regulatory factor-7*, ITGB7= *Integrin beta-7*, XRN1=5'-3' exoribonuclease-1, CARD9= *Caspase recruitment domain-containing protein-9*, ESPNL= *Espin-like protein*, FZD2= *Frizzled-2*, OSBPL7= *Oxysterol-binding protein-related protein-7*, logFC=log fold change, VCAM-1=*vascular cell adhesion molecule-1*, PKC=proteína quinase C.

3.3 Redes Bayesianas da interação entre os genes associados à ativação do eixo SDF-1/CXCR4 e à resposta imune inflamatória nas condições aguda e crônica

Para construção das RB, os transcritos associados ao eixo SDF-1/CXCR4 foram filtrados, de acordo com a sua expressão diferencial nos estudos avaliados, sendo selecionados 20 transcritos associados ao termo GO:0007186 e 1 transcrito associado ao termo GO:0070098.

A figura 3 mostra as RB pró-inflamatória nas fases aguda (A) e crônica (B). É possível observar um padrão de conectividade entre as moléculas CXCR4, TRPA1, AKT1, ITGB7 e IL-15 nos contextos avaliados, inclusive no sentido dos arcos de interação. Contudo, ocorreu maior conectividade na fase aguda do infarto e uma redução na força das suas conexões na fase crônica.

Nas redes de interações das moléculas que fazem parte da assinatura anti-inflamatória com aquelas associadas ao eixo nas fases aguda (A) e crônica (B), observam-se as conexões entre AKT1, TRPA1, CXCR4, GPR162, OSBPL7, CARD9 e FZD2. Há uma diferença no padrão de conectividade entre estas moléculas nos tempos avaliados onde a força de interação entre seus arcos apresenta-se superior na fase crônica após o infarto. Também foi evidente a troca de sentido dos arcos de interação entre os genes que fazem parte das RB deste cenário. A molécula CARD9, evidenciada na RB gerada no contexto anti-inflamatório, apresenta especial destaque, na fase aguda interage com o CXCR4 (A) e esta interação não está evidenciada de



maneira direta na fase crônica após o IAM (B). Adicionalmente, a CARD9 interage com dois transcritos envolvidos na sinalização de receptores acoplados a proteína G, GNB3 e GPR162, nos dois tempos avaliados (A e B).

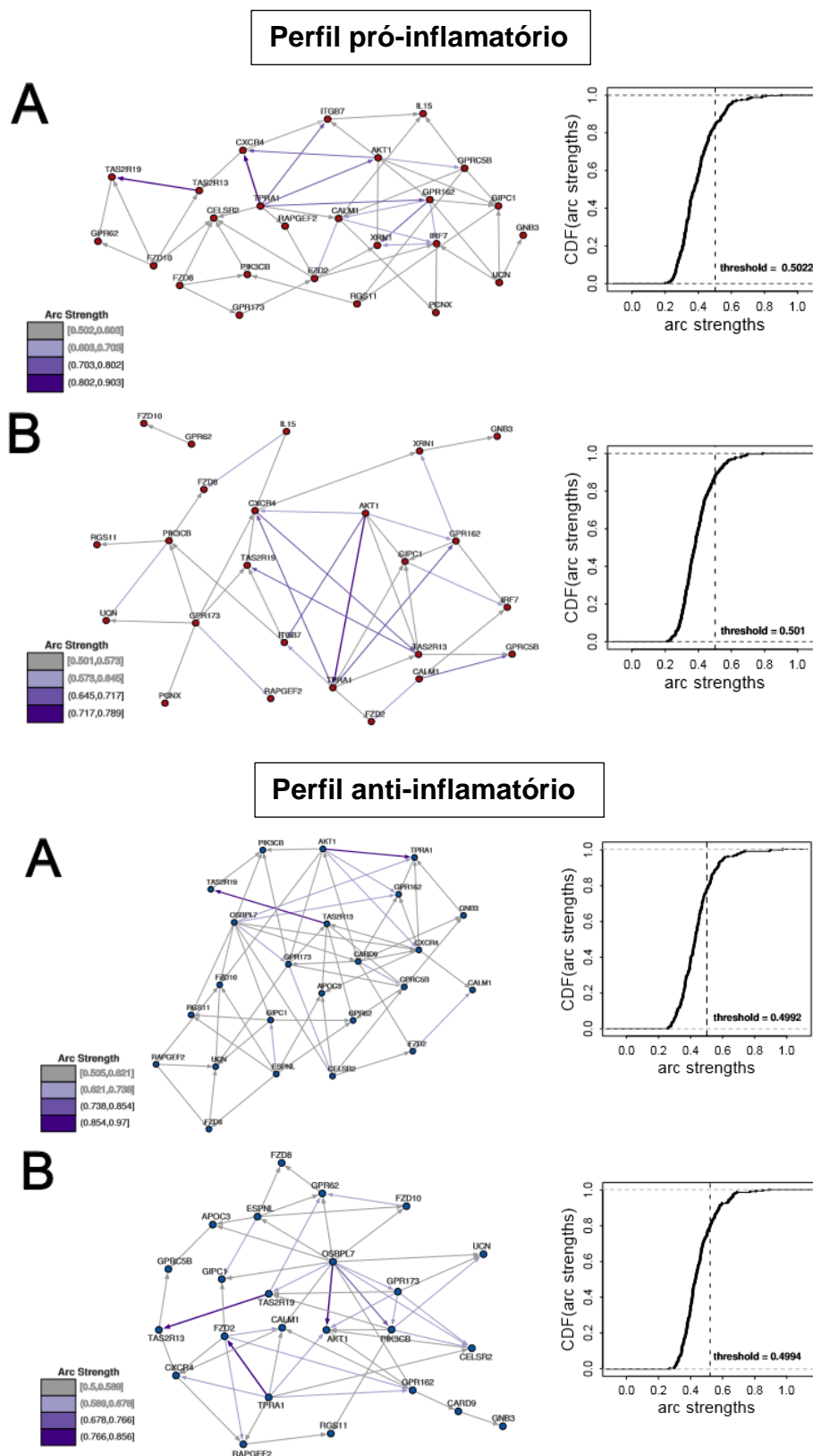


Figura 3 Redes Bayesianas do perfil pró-inflamatório e anti-inflamatório pós-IAM. Formadas a partir das assinaturas pró-inflamatória (M1) e anti-inflamatória (M2), e genes anotados nos termos associados ao eixo SD-1/CXCR4 nas fases aguda (A) e crônica (B) do infarto agudo do miocárdio, limiar probabilístico dos arcos das RB, $p < 0,001$.



3.4 Perfil de expressão gênica dos transcritos selecionados a partir das Rede Bayesianas em amostras de PBMC de pacientes com STEMI

A tabela 2 apresenta os dados demográficos dos grupos amostrais. Pacientes com STEMI submetidos a intervenção coronária percutânea foram arrolados neste estudo, sendo a maioria deles do sexo masculino ($p=0,013$) e com idade média de 55 anos. Observamos maior prevalência de dislipidemias no grupo controle ($p=0,014$), que foi constituído por sujeitos sem lesão nas coronárias. Na seção da terapia farmacológica utilizada pode-se constatar que os grupos eram heterogêneos entre si.

Tabela 2 Características clínicas dos grupos amostrais.

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

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

Com o objetivo de avaliar o comportamento temporal da expressão das moléculas investigadas nas análises de bioinformática, determinamos os níveis de expressão dos transcritos ITGB7, TPRA1, FZD2, CARD9, CXCR4 e AKT1 (Figura 4), em PBMC de pacientes com STEMI.

Os níveis do CXCR4 mostraram diminuição na expressão comparados nos momentos admissão vs. alta hospitalar ($p=0,006$), aumento após 6 meses do IAM ($p=0,023$) (Figura 4A). Com relação ao TPRA1, verificou-se diminuição da expressão na admissão à alta hospitalar ($p=0,028$) e após 6 meses do evento ($p=0,001$); aumento após 1 mês do pós-IAM e diminuição após 6 meses ($p=0,043$) (Figura 4B). A AKT1 apresentou maior expressão na admissão comparada a alta hospitalar ($p=0,011$) e na admissão comparada aos 6 meses após IAM ($p=0,012$) (Figura 4C).

O ITGB7 apresentou maior expressão na admissão hospitalar comparado aos 6 meses após IAM ($p=0,004$); no dia 3 após evento comparado à alta hospitalar ($p=0,020$) e aos 6 meses após evento ($p=0,013$) também houve aumento dos níveis de expressão. Também, observou-se diferença na expressão do ITGB7 na comparação 1 mês e 6 meses após o IAM ($p=0,009$) (Figura 4D).

Com relação às moléculas anotadas na assinatura anti-inflamatória, FZD2 apresentou maior expressão na admissão quando comparada à alta hospitalar ($p=0,033$) e aos 6 meses do pós-IAM ($p=0,001$), voltando a aumentar após 1 mês após o IAM (valor significativo quando comparado a 6 meses, $p=0,012$) (Figura 4E). Comportamento similar foi observado para CARD9, que apresentou maior expressão na admissão quando comparada a alta hospitalar ($p=0,002$) e aos 6 meses após o evento ($p=0,002$) (Figura 4F).

Assumindo-se que o eixo SDF-1/CXCR4 associa-se funcionalmente às moléculas projetadas pelas RB, avaliamos a possibilidade de correlação da expressão gênica do CXCR4 com as moléculas do perfil pró e anti-inflamatório (Tabela 3). Nesta análise, verificamos correlação positiva do CXCR4 no momento da admissão hospitalar com as moléculas ITGB7, TRPA1, AKT1, FZD2 e CARD9. Este padrão de correlação do CXCR4 foi mantido 3 dias após IAM com ITGB7, AKT1, FZD2 e CARD9. Na alta hospitalar, a correlação do CXCR4 manteve-se com as moléculas ITGB7, TRPA1 e AKT1. Aos 6 meses após evento de IAM observamos correlação positiva do CXCR4 com TRPA1 e CARD9.

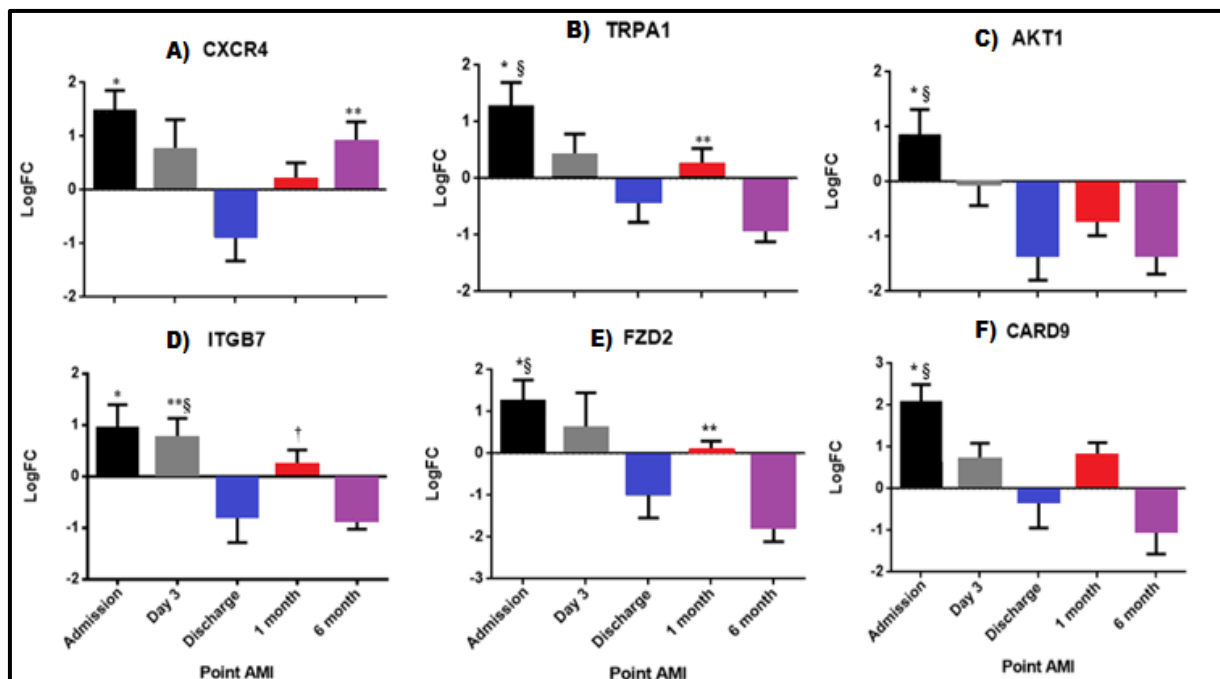


Figura 4 Níveis de expressão das moléculas selecionadas de acordo com as interações nas Redes Bayesianas. Expressão relativa mRNA calculada por $2^{\Delta\Delta Ct}$ {log(2)FC}, média e erro padrão para duplicatas. Níveis aumentados da expressão do mRNA (A) do CXCR4 na admissão vs. alta hospitalar (*p=0,006) e na alta hospitalar vs. 6 meses (**p=0,023), (B) TRPA1 na admissão vs. alta hospitalar (*p=0,028), na admissão vs. 6 meses após IAM (§p=0,001) e 1 mês vs. 6 meses após evento (**p=0,043), (C) AKT1 na admissão vs. alta hospitalar (*p=0,011) e na admissão vs. 6 meses após IAM, (D) ITGB7 na admissão vs. 6 meses após IAM (*p=0,004), 3º dia após IAM vs. alta hospitalar (**p=0,020), 3º dia vs. 6 meses (§p=0,013) e 1 mês vs. 6 meses após evento (†p=0,009). (E) FZD2 na admissão vs. alta hospitalar (*p=0,033), na admissão vs. 6 meses (§p=0,001) e 1 mês vs. 6 meses após IAM (**p=0,012), (F) CARD9 na admissão vs. alta hospitalar (*p=0,002) e na admissão vs. 6 meses (§p=0,002).

Tabela 3 Análise de correlação do perfil de expressão gênica do CXCR4 com o perfil das moléculas pró- e anti-inflamatórias no seguimento avaliado.

| Moléculas inflamatórias | Admissão hospitalar | | Dia 3 pós-IAM | | Alta hospitalar | | 1 mês pós-IAM | | 6 meses pós-IAM | |
|-------------------------|---------------------|--------|---------------|--------|-----------------|--------|---------------|-------|-----------------|--------|
| | r | p | r | p | r | p | r | p | r | p |
| ITGB7 | 0,808 | 0,001* | 0,881 | 0,049* | 0,948 | 0,014* | 0,673 | 0,143 | 0,697 | 0,123 |
| TRPA1 | 0,769 | 0,003* | 0,834 | 0,078 | 0,895 | 0,04* | 0,482 | 0,333 | 0,877 | 0,022* |
| AKT1 | 0,788 | 0,002* | 0,947 | 0,014* | 0,956 | 0,011* | 0,643 | 0,166 | 0,774 | 0,710 |
| FZD2 | 0,914 | 0,001* | 0,923 | 0,025* | 0,493 | 0,399 | 0,279 | 0,592 | 0,521 | 0,290 |
| CARD9 | 0,772 | 0,003* | 0,952 | 0,012* | 0,291 | 0,635 | 0,124 | 0,815 | 0,964 | 0,002* |

Teste estatístico utilizado Correlação de Pearson (r = coeficiente de relação). IAM=Infarto agudo do miocárdio, ITGB7 = *Integrin beta-7*, TRPA1 = *Transmembrane protein adipocyte-associated-1*, AKT1 = *Serine/threonine-protein kinase-1*, FZD2 = *Frizzled-2*, CARD9 = *Caspase recruitment domain-containing protein-9*.

4. Discussão

Neste estudo investigamos a interação de genes associados à polarização de macrófagos com aqueles relacionados ao eixo SDF-1/CXCR4, no sentido de investigar a possível modulação dos efeitos promovidos por esta interação, segundo o perfil imunológico, no contexto pós-IAM. Na análise de enriquecimento de genes observamos que o enriquecimento das assinaturas pró-inflamatórias está relacionado com o pós-IAM em condição aguda e a resposta anti-inflamatória com a fase crônica do IAM. Estes resultados corroboram com os achados clínicos da literatura e evidenciam proporcionalidade entre a ativação da resposta pró e anti-inflamatória, essencial para o início dos mecanismos fisiológicos de reparo ativados em seus tempos específicos (Marchant et al 2012).



As RB foram utilizadas para evidenciar, do ponto de vista mecanístico, a comunicação entre a resposta imune e a ativação do eixo SDF-1/CXCR4 em diferentes tempos pós-IAM. Nas RB do perfil pró-inflamatório, destacamos a interação entre AKT1, TPRA1, CXCR4, ITGB7 e IL-15, em condição aguda pós-IAM sugerindo que a ativação do eixo pode favorecer o estabelecimento da resposta pró-inflamatória característica do pós-infarto. O padrão de conectividade e a direção entre os arcos de interação destas moléculas, reforça uma possível modulação da resposta inflamatória via SDF-1/CXCR4 na fase aguda do infarto (Liehn et al 2011).

Um dos mecanismos pelos quais o eixo SDF-1/CXCR4 exerce papel cardioprotetor é a ativação diferenciada da AKT1, via PI3K/AKT, promovendo redução da formação de tecido cicatricial, estímulo à neovascularização e inibição da morte de cardiomiócitos (Yu et al 2010). No contexto da inflamação, a PI3K/AKT atua como mediador inflamatório em diferentes tipos celulares (Okkenhaug et al 2013). O ITGB7 exerce influência sobre a expressão de moléculas de adesão celular, como VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) e apresenta ação mediadora da migração e infiltração de leucócitos após lesão (Anderson et al 2014). A interação entre a IL-15 e o ITGB7 evidenciada na RB, sugere que pode haver uma intensificação no recrutamento e produção de linfócitos e, portanto, na dinâmica da formação do infiltrado leucocitário. Desta maneira, de acordo com os níveis do transcrito do ITGB7 nos momentos iniciais após o infarto agudo, sugerimos uma possível intensificação nas interações entre proteínas de adesão e de matriz extracelular, consideradas reguladoras chave da atividade inflamatória, por interferência na expressão gênica de mediadores inflamatórios (Dobaczewski et al 2010), aumentando a infiltração de leucócitos, fenômeno característico da atividade pró-inflamatória (Frangogiannis 2015).

Nas RB do perfil anti-inflamatório, as conexões sugeridas entre FZD2, TPRA1 e CXCR4 propõem que a ativação do eixo SDF-1/CXCR4 pode contribuir para mudanças morfofisiológicas teciduais. Particularmente no contexto crônico, estas mudanças são promovidas principalmente pela via de transdução de sinal ativada por FZD2. O FZD2 pertence a família de receptores que ativam genes relacionados a sinalização Wnt, via estruturalmente relacionada aos receptores acoplados à proteína G (Schulte et al 2007), fato que pode explicar a relação de causalidade na RB do FZD2 com moléculas associadas a sinalização SDF-1/CXCR4. Estudos demonstraram regulação positiva dos componentes da sinalização Wnt/FZD em células progenitoras endoteliais e leucócitos, sugerindo papel importante desta via no reparo cardíaco e na resposta inflamatória após o infarto (Barandon et al 2011). Ativação da via Wnt, através do aumento na expressão de seus componentes contribui para o controle do remodelamento cardíaco (Hermans et al 2012) Contudo, verificamos que os níveis do mRNA do FZD2 apresentaram-se aumentados nas fases iniciais após evento de IAM, na qual predomina o perfil favorável à inflamação. Por outro lado, os níveis reduzidos de expressão desta molécula ao 3º dia após infarto e na fase crônica seguinte, poderiam sugerir comprometimento na ativação da sinalização Wnt e, portanto, no remodelamento do tecido cardíaco.

Na RB do cenário anti-inflamatório e fase crônica pós-IAM, destacamos a conexão entre OSBPL7, AKT1 e PI3KCB. A possível influência exercida pelo receptor intracelular OSBPL7 (nível de expressão não avaliado neste estudo) sobre duas vias efetoras importantes envolvidas na sinalização SDF-1/CXCR4, PI3K e AKT1 (Wang et al 2012) poderia refletir em processos metabólicos geradores de energia celular (Raychaudhuri and Prinz 2010). Este efeito é importante para a sobrevivência, bem como para a mobilização celular, mecanismos essenciais para adaptação tecidual após lesão (Zheng et al 2007).

Evidenciamos a presença da molécula CARD9 nas redes do perfil anti-inflamatório na fase aguda e crônica. Os níveis do mRNA da CARD9 nos momentos iniciais após IAM, de fato relacionam-se com a fase pró-inflamatória, corroborando dados da literatura (Ren et al 2011). Esta proteína desempenha importante papel na apoptose celular, ativação de processos inflamatórios e na regulação da fibrose cardíaca, sua ativação foi observada na doença isquêmica cardíaca, na qual a inflamação sistêmica e parácrina estão presentes (Frangogiannis 2012). Por esta razão, a inibição de CARD9 tem sido objeto de pesquisas visando determinação de potencial alvo terapêutico na cardiologia (Peterson et al 2016). Destacamos ainda, interações entre CARD9 e transcritos envolvidos na sinalização de receptores acoplados a proteína G, como o próprio CXCR4, além de GNB3 e GPR162. A proteína GNB3 é importante para a efetiva transdução do sinal via receptor CXCR4 (Neves et al 2002). Assim, podemos sugerir que no contexto da sinalização SDF-1/CXCR4, a conectividade destes transcritos, juntamente com os níveis de expressão gênica da CARD9 e do CXCR4, cujos resultados evidenciam associação positiva entre estas duas moléculas, poderiam interferir na ativação do eixo nos momentos iniciais após IAM. O GPR162 também codifica receptores acoplados à Proteína G (GPCR). Considerando que GPCR são alvos dominantes para descoberta de drogas, estima-se que 40-50% de todas as drogas modernas são direcionadas a esta superfamília de receptores e por sua interação com AKT1, TPRA1 e CARD9, a função do GPR162 no cenário inflamatório do pós-IAM merece ser melhor investigada.

Com base nas informações obtidas a partir das RB, a ativação do eixo SDF-1/CXCR4 proporciona modulações e interações moleculares importantes que podem atuar na intensificação de mecanismos direcionados ao reparo tecidual após o IAM. Também, fundamentados no pressuposto de que as RB representam hipóteses causais de associação entre as variáveis avaliadas (Ni et al 2018), sugerimos que a troca de direção dos arcos de interação, no contexto crônico e agudo após IAM, pode indicar uma capacidade da resposta imune em modular a ativação do eixo SDF-1/CXCR4.

A associação positiva entre CXCR4, moléculas anotadas na assinatura inflamatória e moléculas envolvidas na sinalização SDF-1/CXCR4, na fase aguda pós-IAM, sugere o favorecimento da resposta pró-inflamação inicial após evento, corroborando evidências da literatura (Dobaczewski et al 2010) e favorecendo a posterior transição da resposta imune. Esta transição gradual para uma resposta anti-inflamatória é fundamental para uma melhor adaptação do tecido ao processo isquêmico, uma vez

que o reparo cardíaco é dependente, entre outros fatores, de uma resposta inflamatória bem orquestrada, que além de favorecer a “limpeza” da área afetada, também fornece sinais moleculares para acionamento de funções reparadoras (Frangogiannis 2015).

Indicamos que após o estabelecimento de uma resposta anti-inflamatória crônica, a ativação do eixo SDF-1/CXCR4 e suas vias de transdução de sinal poderiam levar à manutenção das funções vitais do tecido, por mecanismos como remodelamento e fibrose reativa e reparativa do miocárdio, que também dependem da qualidade do reparo cardíaco e estão associado a um mau prognóstico em pacientes que sobrevivem a um IAM. Embora inicialmente o remodelamento configure uma adaptação para manter a função cardíaca, prejudicada pelo infarto, o remodelamento progressivo inevitavelmente ocasiona prejuízo a função cardíaca (Pfeffer and Braunwald 1990).

5. Conclusões

De acordo com os nossos achados, podemos observar que os efeitos promovidos pela interação SDF-1/CXCR4 podem ser modulados de acordo com o perfil inflamatório. Após o IAM, esta modulação é temporalmente dependente e pode influenciar diretamente os efeitos adaptativos e cardioprotetores proporcionados por esta via, com possíveis reflexos na evolução da doença isquêmica. Por fim, potenciais alvos terapêuticos, como CARD9 e WNT/FZD2 que emergem com a resposta inflamatória ocasionada pelo IAM podem atuar como essenciais no reparo cardíaco.

Limitações: Dados de transcriptômica, mesmo obtidos de repositório de alta credibilidade, são inevitavelmente incompletos, em termos da totalidade dos possíveis fatores biológicos, portanto, devem ser julgados nesse contexto e não considerados de maneira isolada. Outra limitação é o tamanho amostral utilizado na etapa de análise da expressão gênica das moléculas selecionadas. As RB apresentam limitações quanto a interpretações no contexto biológico, utiliza toda a informação capaz de avaliar as associações entre seus elementos, fato que é inviável na prática.

Declaração de conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Financiamento

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) - bolsa de doutorado de Melissa Kristochek da Silva. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

- Anderson LR, Owens TW, Naylor MJ (2014) Structural and mechanical functions of integrins. *Biophys Ver.* DOI: 10.1007/s12551-013-0124-0
- Ashburner M, Ball C, Blake J, et al. (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet.* DOI: 10.1038/75556
- Barandon L, Casassus F, Leroux L, Moreau C, Allières C, Lamazière JM, Dufourcq P, Couffinal T, Duplâa C (2011) Secreted frizzled-related protein improves postinfarction scar formation through a modulation of inflammatory response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.232280
- Becker M, De Bastiani MA, Parisi MM, Guma FTRC, Markoski MM, Castro MAA, Kaplan MH, Barbé-Tuana FM & Klamt F (2015) Integrated Transcriptomics Establish Macrophage Polarization Signatures and have Potential Applications for Clinical Health and Disease. *Scientific Reports.* DOI: 10.1038/srep13351
- Dobaczewski M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG (2010) The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* DOI: 10.1016/j.yjmcc.2009.07.015
- Flower DR (1999) Modelling G-protein-coupled receptors for drug design. *Biochim Biophys Acta.* DOI: 10.1016/s0304-4157(99)00006-4
- Frangogiannis NG and Rosenzweig A (2012) Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res.* DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.243162
- Frangogiannis NG (2015) Inflammation in cardiac injury, repair and regeneration. *Curr Opin Cardiol.* DOI: 10.1097/HCO.0000000000000158
- Frantz S, Nahrendorf M (2014) Cardiac macrophages and their role in ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res.* DOI:10.1093/cvr/cvu025
- Gordon S, Martinez FO (2010) Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity.* DOI: 10.1016/j.immuni.2010.05.007
- Hermans KC, Daskalopoulos EP and Blankesteyn WM (2012) Interventions in Wnt signaling as a novel therapeutic approach to improve myocardial infarct healing. *Fibrogenesis Tissue Repair.* DOI: 10.1186/1755-1536-5-16
- Hu X, Dai S, Wu WJ, Tan W, Zhu X, Mu J, Guo Y, Bolli R, and Rokosh G (2007) Stromal cell derived factor-1 alpha confers protection against myocardial ischemia/reperfusion injury: role of the cardiac stromal cell derived factor-1 alpha CXCR4 axis. *Circulation.* DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.672451
- Kiliszek M, Burzynska B, Michalak M, Gora M, Winkler A, Maciejak A, Leszczynska A, Gajda E, Kochanowski J, Opolskit G (2012) Altered gene expression pattern in peripheral blood mononuclear cells in patients with acute myocardial infarction. *PLoS One.* DOI: org/10.1371/journal.pone.0050054
- Lachtermacher S, Esporcatté BL, Montalvão F, Costa PC, Rodrigues DC, Belem L, Rabischoffsky A, Faria Neto HC, Vasconcellos R, Iacobas S, Iacobas DA, Dohmann HF, Spray DC, Goldenberg RC, Campos-de-Carvalho AC (2010) Cardiac gene expression and systemic cytokine profile are complementary in a murine model of post-ischemic heart failure. *Braz J Med Biol Res.* DOI: 10.1590/s0100-879x2010007500014
- Liehn EA, Tuchscheerer N, Kanzler I, Drechsler M, Fraemohs L, Schuh A, Koenen RR, Zander S, Soehnlein O, Hristov M, Grigorescu G, Urs AO, Leabu M, Bucur I, Merx MW, Zerneck A, Ehling J, Gremse F, Lammers T, Kiessling F, Bernhagen J, Schober A, Weber C (2011) Double-edged role of the CXCL12/CXCR4 axis in experimental myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* DOI: 10.1016/j.jacc.2011.08.033
- Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) method. *Methods.*



DOI: 10.1006/meth.2001.1262

Maciejak A, Kiliszek M, Michalak M, Tulacz D, Opolski G, Matlak K, Dobrzycki S, Segiet A, Gora M, Burzynska B (2015) Gene expression profiling reveals potential prognostic biomarkers associated with the progression of heart failure. *Genome Med.* DOI: 10.1186/s13073-015-0149-z

Marchant DJ, Boyd JH, Lin DC, Granville DJ, Garmaroudi FS, McManus B (2012) Inflammation in myocardial diseases. *Circ Res.* DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.243170

Neves SR, Ramand PT and Iyengar RR (2002) G protein pathways. *Science.* DOI: 10.1126/science.107155

Ni Y, Müller P, Wei L, Ji Y (2018) Bayesian graphical models for computational network biology. *BMC Bioinformatics.* DOI: 10.1186/s12859-018-2063-z

Okkenhaug K (2013) Signaling by the phosphoinositide 3-kinase family in immune cells. *Annu Rev Immunol.* DOI: 10.1146/annurev-immunol-032712-095946

Peterson MR, Haller SE, Ren J, Nair S, He G (2016) CARD9 as a potential target in cardiovascular disease. *Drug Des Devel Ther.* DOI: 10.2147/DDDT.S122508.

Pfeffer MA, Braunwald E (1990) Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation.* DOI: 10.1161/01.cir.81.4.1161

Raychaudhuri S, Prinz WA (2010) The diverse functions of oxysterol-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* Doi: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113334

Ren J, Yang M, Qi G, Zheng J, Jia L, Cheng J, Tian C, Li H, Lin X, Du J (2011) Proinflammatory protein CARD9 is essential for infiltration of monocytic fibroblast precursors and cardiac fibrosis caused by Angiotensin II infusion. *Am J Hypertens.* DOI: 10.1038/ajh.2011.42

Saxena A, Fish JE, White MD, Yu S, Smyth JW, Shaw RM, DiMaio JM, Srivastava D (2008) Stromal cell-derived factor-1alpha is cardioprotective after myocardial infarction. *Circulation.* DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.694992

Schulte G, Bryja V (2007) The Frizzled family of unconventional G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci.* DOI: 10.1016/j.tips.2007.09.001

Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* DOI: 10.1073/pnas.0506580102

Suresh R, Li X, Chiriac A, Goel K, Terzic A, Perez-Terzic C, Nelson TJ (2014) Transcriptome from circulating cells suggests dysregulated pathways associated with long-term recurrent events following first-time myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* DOI: 10.1016/j.yjmcc.2014.04.017

Wang K, Zhao X, Kuang C, Qian D, Wang H, Jiang H, Deng M, Huang L (2012) Overexpression of SDF-1 α enhanced migration and engraftment of cardiac stem cells and reduced infarcted size via CXCR4/PI3K pathway. *PLoS One.* DOI: 10.1371/journal.pone.0043922

Yu J, Li M, Qu Z, Yan D, Li D, Ruan Q (2010) SDF-1/CXCR4-mediated migration of transplanted bone marrow stromal cells toward areas of heart myocardial infarction through activation of PI3K/Akt. *J Cardiovasc Pharmacol.* DOI: 10.1097/FJC.0b013e3181d7a384

Zheng H, Fu G, Dai T, Huang H (2007) Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1alpha/CXCR4 via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway. *J Cardiovasc Pharmacol.* DOI: 10.1097/FJC.0b013e318093ec8f

