



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FARMÁCIA**



MARIANA DE MENEZES PEREIRA

**PERFIL DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS ENVOLVIDAS NA
IMUNOPATOGENIA E REGULAÇÃO IMUNE DA
ATEROSCLEROSE EM UMA POPULAÇÃO DE
SALVADOR-BAHIA**

Salvador
2011

MARIANA DE MENEZES PEREIRA

**PERFIL DE CITOCINAS E QUIMIOCIAS ENVOLVIDAS NA
IMUNOPATOGENIA E REGULAÇÃO IMUNE DA
ATEROSCLEROSE EM UMA POPULAÇÃO DE
SALVADOR-BAHIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Ajax Mercês Atta

Salvador
2011

Sistema de Bibliotecas - UFBA

Pereira, Mariana de Menezes.

Perfil de citocinas e quimiocinas envolvidas na imunopatogenia e regulação imune da aterosclerose em uma população de Salvador-Bahia / Mariana de Menezes Pereira. - 2011.

58 f. : il.

Inclui anexos.

Orientador: Prof. Dr. Ajax Mercês Atta.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Salvador,



Universidade Federal da Bahia
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Farmácia - PPGFAR
www.ppgfar.ufba.br
Rua Barão de Jeremoabo s/nº, Ondina, CEP 40170115 Salvador-BA
ppgfar@ufba.br / Tel : (71) 3283-6920

TERMO DE APROVAÇÃO

MARIANA DE MENEZES PEREIRA

PERFIL DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS ENVOLVIDAS NA IMUNOPATOGENIA E REGULAÇÃO IMUNE DA ATEROSCLEROSE EM UMA POPULAÇÃO DE SALVADOR-BAHIA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia (nível Mestrado Acadêmico) da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmácia.

Aprovada em 22 de agosto de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Ajax Mercês Atta
Universidade Federal da Bahia
Orientador

Dr. Edgar Marcelino de Carvalho Filho
Universidade Federal da Bahia

Dr. Luiz Carlos Santana Passos
Universidade Federal da Bahia

Apoio Financeiro:

Durante a realização do mestrado em Farmácia a autora foi bolsista do CNPq (Auxílio 551585/2009-9). Recursos financeiros necessários à realização do trabalho experimental foram obtidos do Projeto CNPq 620.219/2008-4 "Cooperação e consolidação de pesquisas entre os Programas de Pós-Graduação em Farmácia (mestrado) da Universidade Federal da Bahia (UFBA) e Programa de Pós-Graduação em Farmácia – Análises Clínicas, da Universidade de São Paulo (USP)".

AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre presente, por guiar meus passos.

Aos meus pais, Antônio Francisco e Rita Pereira, pelo amor incondicional, pelo ânimo e pelas palavras de conforto. Vocês são TUDO pra mim.

A meus irmãos por todo carinho que sempre tivemos. Nossa família é linda!

Ao Guilherme Macedo, compreensão e paciência foram essenciais nesta fase. Sempre acreditando e incentivando o meu crescimento.

Ao meu orientador, Professor Ajax Mercês Atta pela oportunidade e contribuição com o início de minha formação científica. Desejo expressar minha gratidão por toda a atenção a mim atribuída.

À Professora Maria Luiza Brito de Sousa Atta pelos ensinamentos em todos esses anos de convivência.

Ao Dr. Roque Aras por gentilmente ter contribuído com este trabalho.

À senhora Roseli Pereira Santiago, secretária da Direção Técnica do Hospital Ana Nery pelo o auxílio na captação dos pacientes.

À Família DILDA/ LAPIM pelos belos e bons anos de convivência.

À Milena Santana Cabral pelo companheirismo e incentivo nos estudos.

À Taciana Pereira Sant'Ana Santos, pelo apoio na parte experimental e por nossas idas à coleta das amostras que nos permitiu nos conhecermos mais.

À Isabela Silva de Oliveira por todo auxílio durante a pesquisa.

Ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Ana Nery C-HUPES, UFBA.

Ao Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia da UFBA.

Ao Professor Ricardo David Couto pela colaboração.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFBA.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFBA.

Aos pacientes que tão solidariamente permitiram a realização do estudo.

A todos os meus amigos, em especial as amigas de Ilhéus, pela amizade e momentos de distração.

**“ De tudo ficaram três coisas:
a certeza de estarmos sempre
começando...
a certeza de que é preciso
continuar...
a certeza de que podemos ser
interrompidos antes de terminar...”**

**Portanto devemos:
Fazer da interrupção um caminho
novo...
da queda, um passo de dança...
do medo, uma escada...
do sonho, uma ponte...
da procura, um encontro...”**
**(Fernando Sabino, “O encontro
marcado”)**

PEREIRA, Mariana de Menezes. Citocinas e quimiocinas envolvidas na imunopatogenia e regulação imune da aterosclerose em pacientes de Salvador-Bahia (Brasil). Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

RESUMO

A aterosclerose é uma importante causa de morbidade e mortalidade no mundo. Contudo, informações do envolvimento de componentes responsáveis pela homeostasia humana nesta doença inflamatória são recentes, principalmente no que se refere à participação de mediadores participantes da defesa imunológica inata e adaptativa. **OBJETIVOS:** Foram investigados os mecanismos envolvidos na patogênese da doença cardiovascular aterosclerótica de pacientes de um serviço público de cardiologia de Salvador-Bahia, incluindo fatores de risco, parâmetros bioquímicos e os mediadores imunológicos envolvidos na imunopatogênese e regulação imune da atividade inflamatória. **CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS:** Foram incluídos 162 pacientes, 80 mulheres e 82 homens, usuários de estatina e na sua maioria etnicamente afrodescendentes. Trinta doadores de banco de sangue, 15 homens e 15 mulheres, foram os controles. Informações sobre riscos cardiovasculares foram obtidos dos pacientes e relatórios médicos. A dislipidemia foi avaliada através de determinações bioquímicas de colesterol total e frações LDL-C, HDL-C, VLDL-C e triglicérides. Os níveis séricos de apolipoproteína-A, apolipoproteína-B e PCR foram determinados por nefelometria. As citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1 e TNF- α , e anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β , foram determinadas por imunoenaios enzimáticos. Os resultados foram expressos em mediana. **RESULTADOS:** Os fatores de risco encontrados foram hipercolesterolemia (100%), hipertensão (85,8%), história familiar de doença cardiovascular (63,6%), sedentarismo (48,1%), diabetes (32,1%), tabagismo (11,1%) e obesidade (4,9%). Níveis de LDL-C (< 70 mg/dL) compatíveis com as metas para terapêutica preventiva estabelecidas pela IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemia e Prevenção de Aterosclerose não foram encontrados nos pacientes em estudo. Níveis de proteína C-reativa acima de 3 mg/L foram observados em 29/82 (35%) homens e 43/80 (54%) mulheres. Os níveis de PCR foram semelhantes nos subgrupos clínicos, em ambos os gêneros. Os níveis de IL-8 e TNF- α nos controles femininos foram 14,7 pg/mL e 9,5 pg/mL, respectivamente, enquanto nas pacientes foi 9,2 pg/mL e 6,4 pg/mL ($P < 0,05$). Nos controles masculinos os níveis foram 27,3 pg/mL e 11,4 pg/mL, respectivamente, enquanto nos pacientes foram IL-8 = 9,4 pg/mL e TNF- α = 6,9 pg/mL ($P < 0,0001$ e $P < 0,01$, respectivamente). A citocina TGF- β mostrou um comportamento inverso, sendo que os controles apresentaram níveis inferiores desta citocina em relação aos pacientes, em ambos os gêneros ($P < 0,05$). Os níveis das citocinas IL-8 (15,9 pg/mL) e TNF- α (9,5 pg/mL) foram mais altos no grupo de mulheres com história clínica de IAM quando comparado com o grupo de mulheres sem IAM (IL-8 = 8,2 pg/mL e TNF- α = 5,7 pg/mL) ($P < 0,05$), enquanto os níveis de IL-10, que foram reduzidos nas mulheres do primeiro grupo (IAM pos: 5,4 pg/mL) em relação às do segundo grupo (IAM neg: 6,3 pg/mL) ($P < 0,05$). **CONCLUSÕES:** A prevalência dos fatores de riscos cardiovasculares na

população estudada assemelha-se àquela descrita em outros estudos populacionais. O achado de níveis aumentados de PCR em mulheres baianas sem aterosclerose pode estar associado à etnia afrodescendente das mesmas, contudo os níveis séricos de IL-8, TNF- α e IL-10 devem ser considerados no acompanhamento clínico de mulheres com história prévia de IAM.

Palavras-chaves: aterosclerose, dislipidemia, inflamação, citocina, quimiocina, estatina.

PEREIRA, Mariana de Menezes. Cytokines and chemokines involved in the immunopathogenesis and immune regulation of atherosclerosis in patients living in Salvador-Bahia (Brazil). Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

ABSTRACT

Atherosclerosis is an important cause of morbidity and mortality worldwide. However, the involvement of components of human homeostasis in this inflammatory disease has been more recently investigated, mainly the mediators of the innate and adaptive immune defense. **OBJECTIVES:** Were investigated the mechanisms involved in the pathogenesis of atherosclerosis in patients of a cardiology reference center of Salvador-Bahia (Brazil), and determined risk factors, biochemical parameters, and the serum levels of some immunological mediators involved in the immunopathogenesis and immune regulation of the inflammatory activity of this disease. **CASUISTIC, MATERIAL AND METHODS:** One hundred and sixty-two patients, 80 women and 82 men, mostly African descents were included. Thirty blood donors, 15 men and 15 women, were the controls. Information of cardiovascular risks and/or cardiovascular diseases was obtained from the patients and also from their medical files. Dyslipidemia was investigated through determination of cholesterol and its fractions LDL-C, HDL-C, VLDL-C and triglycerides. Apolipoprotein-A, apolipoprotein-B and PCR levels were determined by nephelometry. Proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1 and TNF- α , and anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF- β , were determined by enzyme immunoassay. Results were expressed as median. **RESULTS:** The cardiac risks were hypercholesterolemia (100%), hypertension (85.8%), history of cardiovascular disease in the family (63.6%), physical inactivity (48.1%), diabetes (32.1%), smoking (11.1%) and obesity (4.9%). LDL < 70 mg/dL consistent with the goals established for preventive therapy by IV Brazilian Guidelines on Dyslipidemia and Atherosclerosis Prevention were not found in patients in the study. C-reactive protein levels above 3.0 mg/L were observed in 29/82 (35%) men and 43/80 (54%) women from the target group. The presence of atherosclerosis or IAM history did not influence RCP levels. IL-8 and TNF- α levels in female controls were 14.7 pg/mL and 9.5pg/mL, respectively, while for female patients were 9.2 pg/mL and 6.4 pg/mL ($P < 0.05$). In the male healthy controls these levels were 27.3pg/mL and 11.4 pg/mL, respectively, whereas in the patients of the same gender were IL-8 = 9.4 pg/mL and TNF- α = 6.9 pg/mL ($P < 0.0001$ and $P < 0.01$, respectively). An inverse behavior was observed for TGF- β , presenting the controls lower levels of this cytokine than patients in both genders ($P < 0.05$).The levels of IL-8 (15.9 pg/mL) and TNF- α (9.5 pg/mL) were higher in the women with IAM history when they were compared with those without such a history (IL-8 = 8.2 pg/mL and TNF- α = 5.7 pg/mL) ($P < 0.05$). However, the levels of IL-10 were reduced in the women of the first group (IAM, 5.4 pg/mL) in comparison with those of the second group (without IAM, 6.3 pg/mL) ($P < 0.05$). **CONCLUSIONS:** The prevalence of cardiovascular risks factors in the population studied is similar to that described in other population studies. The finding of slightly increased levels of CRP in women

without atherosclerosis living in Bahia can be associated with their ethnic background. Nonetheless, the association of high serum levels of IL-8 and TNF- α with reduced IL-10 levels should be evaluated in the clinical follow-up of women having a previous history of IAM.

Keywords: atherosclerosis, dyslipidemia, inflammation, cytokine, chemokine, statin

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Frequência da distribuição dos níveis de PCR em pacientes e controles	38
Figura 2 Distribuição dos níveis séricos de PCR nos pacientes separados por gênero	39
Figura 3 Níveis séricos de IL-8 em pacientes com e sem história de IAM	42
Figura 4 Níveis séricos de TNF- α em pacientes com e sem história de IAM	43
Figura 5 Níveis séricos de IL-10 em pacientes com e sem história de IAM	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Características clínicas dos pacientes	36
Tabela 2 Perfil lipídico dos grupos clínicos de acordo com o gênero	37
Tabela 3 Níveis séricos das citocinas nos controles e pacientes femininos	40
Tabela 4 Níveis séricos das citocinas nos controles e pacientes masculinos	41
Tabela 5 Níveis séricos das citocinas em grupos clínicos femininos	41
Tabela 6 Níveis séricos das citocinas nos pacientes masculinos	42

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
Apo-A	Apolipoproteína A
Apo-B	Apolipoproteína B
AVC	Acidente Vascular Cerebral
CA neg	Grupo de pacientes com cianocoronariografia normal
CA pos	Grupo de pacientes com cianocoronariografia anormal
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> ou grupo de diferenciação
CXCL8	Interleucina 8
DAC	Doença Arterial Coronariana
DP	Desvio Padrão
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
HCl	Ácido Clorídrico
hsp60	Proteína de choque térmico 60Kda
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
IAM neg	Grupo de pacientes sem histórico de IAM
IAM pos	Grupo de pacientes com histórico de IAM
ICAM	Molécula de adesão intracelular
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular 1
IFN- γ	Interferon tipo gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IQR	Intervalo interquartílico
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LT- β	Linfotoxina beta
MCP	Proteína quimiotática para monócito
M-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófago
NF κ B	Fator nuclear kappa B
NK	Células natural killer
OMS	Organização Mundial de Saúde

PBS	Salina fosfatada
PCR	Proteína C-reativa
TGF- β	Fator Transformador de Crescimento tipo beta
Th	Células T auxiliadora (T helper)
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase
TLRs	Receptores Toll-like
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral tipo alfa
Treg	Células T regulatórias
VCAM	Molécula de adesão vascular
VCAM-1	Molécula de adesão vascular 1
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
β 2GPI	β 2-Glicoproteína I

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	A PLACA ATEROSCLERÓTICA	19
1.2	ATEROSCLEROSE E RESPOSTA IMUNE	20
1.3	MARCADORES IMUNOLÓGICOS NA ATEROSCLEROSE	22
1.3.1	Proteína C-reativa (PCR)	22
1.3.2	Citocinas e quimiocinas	23
2	RELEVÂNCIA	29
	Hipótese	29
3	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVO GERAL	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4	METODOLOGIA	31
4.1	CASUÍSTICA	31
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.2.1	Amostras biológicas	31
4.2.2	Determinação do Perfil Lipídico	32
4.2.3	Determinação dos Níveis da Proteína C-reativa	33
4.2.4	Determinação dos Níveis Séricos das Citocinas	33
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
5	RESULTADOS	35
5.1	CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS INVESTIGADOS	35
5.2	AVALIAÇÃO LABORATORIAL	36
5.2.1	Perfil Lipídico	36
5.2.2	Proteína C-Reativa	37
5.2.3	Citocinas	39
5.3	CITOCINAS E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	41
6	DISCUSSÃO	45

7	CONCLUSÕES	50
	REFERÊNCIAS	51
	ANEXO A	57
	ANEXO B	58

1 INTRODUÇÃO

A aterosclerose é um problema de saúde pública mundial, representando a principal causa de morbidade e mortalidade do mundo ocidental (MATSUURA et al., 2005, BATUCA et al., 2009). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que esta doença seja a principal causa de morte a nível mundial nos próximos 15 anos, face ao rápido aumento da prevalência da aterosclerose nos países em desenvolvimento e ao acúmulo de fatores de riscos metabólicos, incluindo a crescente incidência de obesidade e diabetes (HANSSON et al., 2006; AUKRUST et. al., 2008).

A aterosclerose é a principal causa da maioria das doenças cardiovasculares, incluindo doença arterial coronariana (DAC), infarto agudo do miocárdio (IAM), acidente vascular cerebral (AVC), aneurisma de aorta abdominal e muitos casos de insuficiência cardíaca (HANSSON et al., 2006; KUIPER et al. 2007). Dados do Ministério da Saúde do Brasil mostram que mais de dois milhões de pessoas morreram na última década em decorrência de doenças cardiovasculares (DATASUS, 2008). No Brasil, muitos fatores de risco que contribuem para a manifestação desta doença têm sido bem caracterizados, principalmente o tabagismo, obesidade, diabetes melito, hipertensão, hipercolesterolemia, história familiar de DAC e a falta de atividade física (FRANCO; MATOS, 2005).

O termo aterosclerose é usado para descrever a lesão representada pela placa vascular de aspecto tipo papa (*athero*), formada por uma região necrótica coberta por uma capa fibrosa rígida (*scleros*) (GOTTLIEB et al, 2005). Várias teorias procuraram explicar a fisiopatologia da aterosclerose. Primariamente, em seu conceito clássico, a aterosclerose era tida como uma desordem metabólica com deposição de lipídios, considerada como uma doença degenerativa relacionada ao envelhecimento (FILHO et al., 2003). No entanto, nos conceitos atuais, a aterosclerose corresponde a uma doença inflamatória crônica multifatorial. Embora o conceito da aterosclerose como doença inflamatória não seja mais controverso, a regulação dos processos inflamatórios e suas consequências patogênicas ainda não estão totalmente elucidadas (AUKRUST et. al., 2008; LUNDBERG; HANSSON, 2010).

Estudos experimentais, clínicos e epidemiológicos têm confirmado o importante papel da inflamação na aterosclerose, revelando sua associação com o

metabolismo lipídico. Essa associação diferencia a aterosclerose de outras desordens inflamatórias crônicas (HANSSON et al, 2006; AUKRUST et. al., 2008).

A patogênese da aterosclerose é multifatorial. Embora a hipercolesterolemia seja o fator patogênico essencial no início e progressão da lesão aterosclerótica, há evidências que o processo inflamatório e a resposta imune desempenham papéis relevantes na aterogênese (AMIR; BINDER, 2010).

1.1 A PLACA ATEROSCLERÓTICA

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica que evolui com a formação de placas no interior das artérias de médio e grande calibre. A lesão é constituída pela placa aterosclerótica consistindo de um núcleo necrótico, regiões calcificadas, lipídios modificados acumulados, células musculares lisas, células endoteliais, leucócitos e células espumosas. Estas características demonstram ser a aterosclerose uma doença complexa com o envolvimento de componentes vasculares, metabólicos e do sistema imune (GALKINA; LEY, 2009).

A aterosclerose resulta de uma disfunção endotelial associada ao aumento de níveis plasmáticos das lipoproteínas, principalmente a fração LDL, que favorece a infiltração e retenção local das lipoproteínas na íntima da artéria. Essas partículas são depositadas nos vasos, ocorrendo à oxidação da LDL com formação de LDLox, favorecendo a ativação das células endoteliais. Em consequência desta ativação, moléculas de adesão intracelular (ICAM-1) e moléculas de adesão vascular (VCAM-1) são expostas nas superfícies endoteliais (HANSSON, 2001; KÁDÁR; GLASZ, 2001; HANSSON et al., 2006).

Atraídos por proteínas quimiotáticas, com o auxílio das moléculas de adesão, os monócitos migram para o espaço subendotelial e se diferenciam em macrófagos sob a ação do fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF). Através de receptores “scavenger”, os macrófagos captam as lipoproteínas modificadas e se transformam em células espumosas (HANSSON, 2001; ANDERSSON et al., 2010).

A placa aterosclerótica é precedida cronologicamente por estrias gordurosas, que são sítios de acúmulo de células espumosas e células imunes, tais como linfócitos T, células dendríticas e mastócitos (FAN; WANTANABE, 2003; HANSSON et al., 2006). Esta placa quando desenvolvida é também conhecida como

ateroma, possuindo uma estrutura mais complexa do que as estrias gordurosas. O crescimento do ateroma ocorre amplamente através do recrutamento contínuo de macrófagos, linfócitos e pela migração e proliferação de células musculares lisas (HARVEY; RAMJI, 2005). A sua região central é composta das células espumosas e restos de lipídios, sendo circundada por uma matriz rica em colágeno e células musculares lisas. Outros tipos celulares também estão presentes no ateroma como as células dendríticas, os mastócitos, linfócitos B e células natural killer T (NKT).

Na região de crescimento da placa e na interface entre a capa e o núcleo há um acúmulo de linfócitos T e macrófagos. Com o tempo, a placa pode evoluir para uma lesão ainda mais complexa e o núcleo lipídico torna-se um espaço pluricelular de depósitos de colesterol rodeado por uma cápsula fibrosa de espessura variável. Esta cápsula fibrosa impede o contato entre o sangue e o material prótrombótico, contudo o rompimento da placa pode causar trombose e muitos efeitos clínicos adversos associados à aterosclerose (HANSSON; LIBBY, 2006).

1.2 ATEROSCLEROSE E RESPOSTA IMUNE

No componente inflamatório do processo aterosclerótico observa-se a participação das respostas imunes inata e adaptativa. Na resposta imune inata tem-se o envolvimento dos monócitos e macrófagos, que respondem à captação de lipoproteínas modificadas em excesso. Já a resposta imune adaptativa envolve células T antígeno-específicas (KUIPER et al., 2007).

A resposta imune inata na aterosclerose é iniciada pela resposta das células endoteliais arteriais às lipoproteínas modificadas, o que leva a sua ativação. Essa ativação causa o recrutamento de leucócitos, vasopermeabilidade, edema e outros eventos da inflamação (HANSSON et al., 2002). Uma vez que essas lipoproteínas são captadas pelos macrófagos, estes se transformam em células espumosas e produzem quimiocinas e citocinas. A produção local desses mediadores imunológicos reforça o influxo de células imunes, assessoradas pela indução da expressão de moléculas de superfície, promovendo a progressão da placa aterosclerótica. (KUIPER et al., 2007).

A imunidade inata tem papel central na patogênese da aterosclerose, representando o recrutamento de monócitos/macrófagos como um importante

aspecto na sua imunopatogenia (HANSSON et al., 2002; AMIR; BINDER, 2010). Os macrófagos expressam receptores “scavengers” e receptores “Toll-like”. Os receptores “scavengers” são responsáveis pela endocitose das lipoproteínas modificadas e degradação destas no lisossomo. Enquanto, os seus receptores “Toll-like” (TLRs) induzem a ativação da via NFκB que leva a expressão de uma série de citocinas e moléculas co-estimulatórias, as quais auxiliam o processo inflamatório. A ativação da via NFκB produzem sinais que favorecem o início da imunidade adaptativa (HANSSON et al., 2002; BAIDYA; ZENG, 2005; LUNDBERG; HANSSON, 2010).

A resposta imune adaptativa é complexa, não se restringindo à lesão aterosclerótica. Nesta resposta há o envolvimento de linfócitos T e linfócitos B que têm a capacidade de reconhecer vários antígenos, resultando nas suas ativações. No entanto, os linfócitos T são maioria nas lesões ateroscleróticas, tanto nas fases iniciais como nas mais avançadas (FROSTERGAD et al., 1999; HANSSON, 2001). E muitos dos linfócitos T são do tipo auxiliador (Th), importantes reguladores do sistema imune. A ativação de linfócitos Th resulta na produção e liberação de citocinas e na proliferação e diferenciação dos linfócitos Th em células efetoras que desempenham um papel no desenvolvimento da resposta imune celular e humoral (KUIPER et al., 2007; BAIDYA; ZENG, 2005).

As células T ativadas entram na lesão e podem reconhecer autoantígenos como LDL-ox, proteína de choque térmico (hsp60), e β2 glicoproteína I (β2GPI) (SZODORAY et al., 2006; KUIPER et al., 2007). A LDL-ox, quando captada pelos macrófagos, é um provável antígeno associado à progressão da placa aterosclerótica (SHOENFELD et al., 2004; BAIDYA; ZENG, 2005). Outro possível autoantígeno é a proteína hsp60 resultante da injúria celular (BAIDYA; ZENG, 2005). Por sua vez, embora a β2GPI possua propriedades que podem ter relevância para a progressão da aterosclerose, seu envolvimento na imunopatogênese ainda não é claro (GEORGE et al., 1999; RANZOLIN et al., 2004).

Outra forma de participação da resposta adaptativa na aterogênese é através da produção de anticorpos pelos linfócitos B, em cooperação com as células T auxiliaadoras (T helper, Th) ou de forma independente (KUIPER et al., 2007).

Atualmente, admite-se que tanto a resposta imune pró-inflamatória Th1 e a antiinflamatória Th2 desempenham importante papel na modulação do desenvolvimento da aterosclerose, sendo a mesma considerada uma doença com

padrão de resposta Th1, devido à sua natureza inflamatória (KUIPER et al., 2007; SZODORAY et al., 2006).

1.3 MARCADORES IMUNOLÓGICOS NA ATEROSCLEROSE

Por ser a aterosclerose considerada uma doença inflamatória, diferentes biomarcadores plasmáticos associados com inflamação podem estar envolvidos na sua patogenia ou ser preditores de doenças cardiovasculares.

1.3.1 Proteína C-reativa (PCR)

A proteína C-reativa (PCR) é um tipo especial de proteína cuja síntese ocorre primariamente nos hepatócitos sob a influência de citocinas pró-inflamatórias, principalmente a interleucina-6. É uma das proteínas plasmáticas de fase aguda que se eleva especialmente em processos inflamatórios e infecciosos (PEARSON et al., 2003). Algumas propriedades biológicas da PCR, como a sua meia-vida de aproximadamente 18 horas e ausência de variações diurnas, fazem desta uma proteína relativamente estável quando comparados a outros marcadores de inflamação (SANTOS et al., 2003; SCIRICA; MORROW, 2006).

Esta proteína parece ser uma participante ativa na aterosclerose, no entanto, seu efeito na aterogênese não é bem compreendido e há controvérsias quanto a sua atividade, tanto inflamatória quanto pró-inflamatória. Pode ser encontrada dentro da placa aterosclerótica, atuando na modulação de funções endoteliais e das atividades biológicas dos leucócitos (SING et al., 2006).

A PCR é capaz de ativar o sistema complemento ao ligarem-se as lipoproteínas nos estágios iniciais do processo de formação da placa aterosclerótica. Atua também induzindo a expressão de moléculas de adesão, estimula a expressão de fator tecidual pelos monócitos nas placas ateroscleróticas (SANTOS et al., 2003) e aumenta a proliferação e migração das células musculares lisas. Inversamente, tem atividade anti-inflamatória ao impedir a adesão de neutrófilos às células endoteliais através da inibição da expressão de L-selectina e impossibilitando a produção de superóxido pelos neutrófilos (SCIRICA; MORROW, 2006).

Estudos têm demonstrado uma significativa associação entre a elevação da concentração sérica da PCR e o risco de doenças cardiovasculares recorrentes

entre aqueles com doenças estabelecidas ou a incidência dos primeiros eventos cardiovasculares (VERMA et al. 2006; SING et al., 2006; SCIRICA; MORRROW, 2006). Sua determinação parece ser útil na estratificação do risco de eventos coronarianos. Os níveis de PCR podem ser categorizados de acordo com o risco de desenvolvimento das doenças cardiovasculares. Níveis desta proteína menores que 1 mg/L estão relacionados com o baixo risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, o risco médio para estas doenças corresponde aos níveis entre 1 a 3mg/L, enquanto o alto risco está associado aos níveis superiores a 3 mg/L de PCR (WILSON et al., 2008; SCIRICA; MORRROW, 2006).

1.3.2 Citocinas e quimiocinas

Nos últimos anos, grande ênfase tem sido dada à participação das citocinas no mecanismo da aterosclerose. As citocinas são glicoproteínas bioativas envolvidas na comunicação intercelular; atuam modulando aspectos da inflamação vascular, alterando a proliferação, diferenciação e função de uma variedade de tipos celulares. Estes produtos das células imunes ou não são especialmente importantes na regulação de respostas imunes e inflamatórias e atuam em diversas etapas da imunidade inata e adaptativa (GIRN et al., 2007; GALKINA; LEY, 2009).

As citocinas são secretadas por variados tipos celulares, incluindo células vasculares e inflamatórias, sendo os macrófagos a principal fonte de citocinas nas placas ateroscleróticas. Observa-se a participação das citocinas como mediadores de ações autócrina, Parácrina e justácrina na aterogênese (LIBBY et al., 1995; TEDGUI; MALLAT, 2006; BIASILLO et al., 2010).

Atualmente, as citocinas têm sido associadas com quatro tipos de respostas imunes, cujo elemento central é a célula T CD4+ helper ou auxiliadora (Th). Com base no perfil de citocinas produzidas, a resposta imune T helper 1 (Th1) é principalmente definida pela produção de Interferon tipo gama (IFN- γ), além da produção de outras citocinas pró-inflamatórias como o Fator de Necrose Tumoral tipo alfa (TNF- α) e induzida conjuntamente por IL-12 e IL-18. Polarizando com a resposta imune Th1, aparece a resposta imune T helper 2 (Th2), associada principalmente com a produção das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13. Este tipo de resposta é característica da alergia mediada por anticorpos IgE e das doenças parasitárias causadas por helmintos e algumas espécies de protozoários. Mais recentemente,

um terceiro tipo de resposta imune auxiliadora foi descrita, denominada T helper 17 (Th17), representada pela produção das citocinas da família IL-17, IL-21 e IL-22 através da ação do Fator Transformador de Crescimento tipo beta (TGF- β) e IL-6. Além dessas respostas, existe ainda a resposta T regulatória (Treg), associada com a produção das citocinas TGF- β e IL-10 por células CD4+CD25+ (FROSTEGARD et al., 1999; HANSSON et al, 2006).

Com base em diferentes estudos, tem sido sugerido que as citocinas poderiam ser classificadas quanto ao seu envolvimento na aterosclerose em citocinas pró-aterogênicas e citocinas anti-aterogênicas. Dentro do primeiro grupo, estariam as citocinas que apresentam semelhanças estrutural, agrupadas em famílias, com comprovado envolvimento na reação inflamatória em diferentes condições clínicas, conforme já demonstrado em doenças imunológicas diversas, como a artrite reumatóide (IL-1, IL-17 e TNF- α) ou na síntese de proteínas da resposta de fase aguda (IL-6). Assim, tem sido propostas as seguintes citocinas aterogênicas: IL-1 e IL-18 (família IL-1); IL-2 na família IL-2/IL-4; IL-6 e IL-12 (família IL-6); IL-17, membro da família de mesmo nome; IFN- γ (família IFN), além de TNF- α e TNF- β e a Linfotóxina- β (LT- β) todos da família do Fator de Necrose Tumoral (GIRN et al., 2007; TEDGUI; MALLAT, 2006; GALKINA; LEY, 2009). As citocinas anti-aterogênicas agrupam as citocinas com atividades anti-inflamatórias, como: IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β . Acredita-se que estas citocinas estejam envolvidas na aterosclerose diminuindo a extensão do processo inflamatório (TEDGUI; MALLAT, 2006).

Uma das primeiras citocinas envolvidas com o início da inflamação e lesão vascular é a IL-1. Esta citocina promove o recrutamento e transmigração de leucócitos e estabelece um microambiente adequado ao desenvolvimento da inflamação do vaso (GALKINA; LEY 2009). Por sua vez, uma das formas da IL-1, a IL-1 β causa o aumento na expressão de moléculas de adesão celular sobre a superfície endotelial, contribuindo para a adesão e transmigração dos leucócitos no endotélio. Em adição, a IL-1 contribui para o desenvolvimento do dano vascular por estimular a proliferação e diferenciação celular (LIBBY et al.,1995; KLEEMANN et al., 2008).

Incertezas ainda existem quanto ao papel desenvolvido pelos membros da família IL-2 na aterosclerose. Como descrito por Kleemann e colaboradores (2008), a IL-2 é uma citocina pró-inflamatória produzida pelas células Th1. No entanto,

novos estudos são necessários para avaliar o papel da IL-2 associada às células Treg e no metabolismo de lípidios (GALKINA; LEY, 2009). Assim, enquanto a presença da IL-2 na lesão aterosclerótica não pode ser definitivamente associada com a formação da placa, as citocinas IL-4 e o GM-CSF ainda esperam inclusão em alguma das duas categorias, pró-aterogênica ou protetoras. Contudo, durante a síndrome coronariana aguda tem sido evidenciada a elevação da IL-4, que também predomina em aneurismas aórticos humanos e em modelos experimentais. O GM-CSF tem sido associado com diminuição dos níveis plasmáticos de colesterol em pacientes portadores de doenças hematológicas submetidos à imunoterapia com esta citocina, evidenciado por decréscimo nos sinais eletrocardiográficos de isquemia cardíaca (SEILER et al., 2001; HAMILTON; ANDERSON, 2004; SZODORAY et al., 2006; GIRN et al., 2007).

Na família Interferon, o IFN- γ possui diversas funções, bem como uma variedade de atividades imunomodulatórias e inflamatórias. Contribuindo com a progressão da aterosclerose, a INF- γ desempenha papel importante na indução da expressão de ICAM-1, VCAM-1 e selectinas por células endoteliais e musculares lisas, além de promover a adesão leucocitária na lesão vascular (GIRN et al., 2007). Também, propicia o recrutamento de células T e macrófagos para a placa e a migração e proliferação de células musculares lisas. A produção da IFN- γ durante a inflamação é controlada pela liberação das citocinas IL-12 e IL-18. Esta citocina é bem expressada em placas ateroscleróticas instáveis, desestabilizando a capa fibrosa e promovendo a apoptose de células espumosas (GHUNG et al., 2002; LEON et al., 2005; HARVEY; RAMJI, 2005; ROBERTSON; HANSSON, 2006;).

O Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) também estimula a expressão de selectinas e moléculas de adesão por células endoteliais, células musculares lisas e macrófagos (TEDGUI; MALLAT, 2006). Através da interação entre o endotélio, leucócitos e plaquetas, o TNF- α cria um ambiente pró-inflamatório e favorece a trombose. Em contribuição, estimula a produção de radicais de oxigênio, sendo assim potencialmente pró-aterogênica. Seu envolvimento na patogênese da aterosclerose é fundamentado em sua presença nas placas ateroscleróticas (ROBERTSON; HANSSON, 2006; GIRN et al., 2007). Semelhante à IL-1, esta citocina modula a morfologia da placa e está associada com a sua ruptura. Adicionalmente, O TNF- α aumenta a expressão do Fator Tecidual por células espumosas e células endoteliais, assim como aumenta a produção de outras

citocinas, como IL-1 e IL-6. (BARATH et al., 1990; TAUBAN, 1997; GIRN et al., 2007).

A IL-6 é caracterizada por seus efeitos pleiotrópicos e regula vários aspectos da resposta imune, reações de fase aguda e hematopoiese (KLEEMANN et al., 2008). Esta interleucina pode contribuir com o desenvolvimento da aterosclerose através de mecanismos da coagulação, metabólicos, endoteliais e imunológicos. Além disso, tem papel central na regulação do processo inflamatório. Dentre algumas de suas ações, a IL-6 contribui para o aumento da expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e musculares lisas, as quais auxiliam a migração de leucócitos para a região da lesão ateromatosa. Também age nos hepatócitos estimulando a síntese de proteínas de fase aguda, tal como a PCR (STENVINKEL et al., 2002; GIRN et al., 2007). Apresenta uma forte relação com TNF- α e Proteína-C reativa, moléculas bioativas associadas com a progressão do processo aterosclerótico e forte risco para acidentes cardiovasculares.

Um grupo de citocinas também atuante no processo aterosclerótico são as quimiocinas. Família de moléculas sinalizadoras com atividade na manutenção do sistema imune. A maioria das quimiocinas atuam quimioatraindo leucócitos com variação da especificidade da quimiocina para os diferentes leucócitos (MOSEDALE et al., 2005; AUKRUST et al., 2008; APOSTOLAKIS et al., 2009). Entre as quimiocinas, duas tem sido mais estudadas por seu envolvimento na aterosclerose: a proteína quimioatraente de monócitos (MCP-1) e a IL-8.

A MCP-1 é expressa na placa aterosclerótica e desempenha importante papel na promoção de um ambiente pró-inflamatório e trombótico. Esta quimiocina desempenha um papel crucial no recrutamento de monócitos para a lesão aterosclerótica (DEO et al., 2004). Em adição, favorece o aumento da proliferação de células musculares lisas e a expressão de integrinas. Além disso, ativa monócitos a expressar fator tecidual e ânion superóxido, que pode contribuir com a instabilidade da placa e o desenvolvimento da síndrome coronariana (BOISVERT, 2004; AUKRUST et al., 2008).

A IL-8, também conhecida como CXCL8, é quimiotrante para neutrófilos. A IL-8 além de intervir potencializando a interação neutrófilo-endotélio na aterogênese, participa ativamente da progressão aterosclerótica inicial, promovendo a adesão e infiltração de monócitos ao endotélio vascular. Esta quimiocina também suprime a expressão do inibidor tecidual de metaloproteinase (TIMP) em

macrófagos, favorecendo a atividade enzimática, além de atuar sobre a proliferação de células musculares lisas (SHIN et al., 2002; BOISVERT, 2004; APOSTOLAKIS et al, 2009).

Contrastando com este considerável número de citocinas pró-aterogênicas, exercendo, portanto, uma função protetora, encontram-se as citocinas anti-aterogênicas. Dentre elas, IL-10 e TGF- β são as mais relevantes, as quais podem inibir macrófagos e funções de linfócitos. Além de estimular a geração de células Treg aumentando ainda mais a produção celular de IL-10 e TGF- β .

A IL-10 é uma citocina com atividade inibitória sobre a ativação de células Th1 e Th2, com importante função da regulação da inflamação sistêmica e da resposta imune (GIRN et al., 2007; GALKINA; LEY, 2009). Em modelos experimentais com camundongos nocauteados para IL-10, tem sido possível demonstrar a importância desta citocina em reduzir o acúmulo de colesterol e modulação negativa da placa aterosclerótica, diminuindo a possibilidade de ruptura da placa (TEDGUI; MALLAT, 2006). Adicionalmente, tem sido verificado que a administração de IL-10 diminui a aterosclerose murina experimental. A IL-10 inibe a aderência de monócitos a células endoteliais aórticas e poderia interferir na resposta de monócitos mediadas pela interação entre CD40 e seu ligante CD40L. Finalmente, ao suprimir a expressão de citocinas aterogênicas como MCP-1, IL-6, IL-12 e IFN- γ entre outras, a IL-10 poderia exercer um efeito protetor na aterogênese (TEDGUI; MALLAT, 2006; GIRN et al, 2007; ANDERSSON et al., 2010).

A TGF- β é uma citocina pluripotente secretada por células T regulatórias, macrófagos, células dendríticas, células endoteliais e musculares lisas. Esta citocina ateroprotetora é secretada na forma inativa e torna-se ativa após clivagem proteolítica (GRAINGER, 2004; HANSSON et al, 2006). Seu papel protetor é bem demonstrado experimentalmente, em camundongos heterozigotos para a expressão desta citocina. Vários estudos sugerem que TGF- β regula a aterosclerose através da ação inibitória sob a migração e proliferação das células musculares lisas e células endoteliais, bem como pelos efeitos imunomodulatórios na regulação dos linfócitos T (GRAINGER, 2004; GIRN et al., 2007; GALKINA; LEY, 2009). A IL-10 e TGF- β atuam em conjunto para estabilizar a aterosclerose e assim, inibir a sua progressão.

O envolvimento das citocinas e das proteínas de fase aguda, tal como a PCR, na aterosclerose leva a considerá-las como potenciais marcadores inflamatórios. Estes indicadores inflamatórios em potencial poderiam auxiliar na

detecção de indivíduos com riscos à complicações ateroscleróticas ou até mesmo sugerir novos alvos terapêuticos. Estes conhecimentos podem ser usados para melhorar a detecção precoce, prevenção e tratamento da aterosclerose.

2 RELEVÂNCIA

O aumento na incidência do número de casos das doenças cardiovasculares justifica a busca por maiores conhecimentos sobre a imunopatogenia da aterosclerose. Torna-se necessário investigar novas estratégias para prevenção e tratamento, bem como para a predição de risco das doenças.

A escolha de uma opção terapêutica apropriada para pacientes sob o risco de desenvolver doença cardiovascular e aterotrombótica é de grande importância. Da mesma forma, a descoberta de novos biomarcadores os quais evidenciem um bom prognóstico. Assim, o conhecimento da regulação imune da aterosclerose, através do estudo das citocinas envolvidas na sua imunopatogenia, poderá elucidar aspectos desta doença na população baiana em estudo, predominantemente afrodescendente. Tal característica, tem sido correlacionada com maior expressão de manifestações clínicas de certas doenças autoimunes, como o lúpus eritematoso sistêmico, além de diferenças na resposta terapêutica a diversos medicamentos.

Hipótese

Ho: Portadores de aterosclerose em tratamento com estatina possuem níveis de biomarcadores inflamatórios semelhantes aos indivíduos saudáveis.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os mecanismos envolvidos na patogênese da doença cardiovascular aterosclerótica em pacientes de um serviço público de cardiologia de Salvador-Bahia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o perfil lipídico;
- Investigar os níveis séricos de mediadores imunológicos envolvidos na aterosclerose;
- Avaliar a relação dos biomarcadores investigados com as características clínicas dos indivíduos incluídos no estudo.

4 METODOLOGIA

4.1 CASUÍSTICA

A população alvo do estudo foi constituída por 162 indivíduos (80 mulheres e 82 homens) atendidos no Serviço de Cardiologia do Hospital Ana Nery do Complexo Hospitalar Professor Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia. Todos foram avaliados clinicamente pela equipe sob a coordenação do cardiologista Prof. Dr. Roque Aras.

Os indivíduos incluídos apresentaram diagnóstico de hipercolesterolemia associado a fatores de risco para doença arterial coronariana. Muitos destes também tinham diagnóstico de doença cardiovascular associada à aterosclerose conforme a presença do resultado da cineangiocoronariografia anormal (CA pos). Os fatores de risco para doenças cardiovasculares baseados em relatórios médicos foram cuidadosamente registrados, tendo sido realizado entrevista e testes laboratoriais com os pacientes.

Foram excluídos do estudo indivíduos com histórico e/ou diagnóstico de neoplasias, tuberculose, hepatites virais B e C, infecção pelo HIV, além de gestantes, portadores de doenças autoimune e doença de Chagas.

Para contrastar com o grupo em questão, 30 amostras de doadores de banco de sangue representaram o grupo controle.

Todos os participantes foram previamente informados sobre o projeto, os objetivos da pesquisa, e tiveram as suas participações confirmado após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme previsto na Res. CNS 196/96, e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira do Complexo Hospitalar Professor Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia – CEP/COM/UFBA.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Amostras Biológicas

O material biológico utilizado no presente estudo foi o soro dos indivíduos incluídos, obtidos após um jejum de 12 horas antes da colheita. O soro foi obtido

após a coagulação do sangue colhido com sistema a vácuo, em tubo sem anticoagulante. Após a separação do coágulo por centrifugação, as amostras de soro foram separadas em seis alíquotas, posteriormente usadas para a determinação do perfil lipídico, dosagem dos níveis séricos da proteína-C reativa e determinações das citocinas.

As amostras de soro do grupo controle foram oriundas de banco de sangue. As dosagens bioquímicas para determinação do perfil lipídico foram realizadas com amostras recém-colhidas, enquanto aquelas para as dosagens de citocinas foram realizadas em amostras armazenadas no freezer -70°C e descongeladas no momento necessário para a realização dos imunoenaios.

4.2.2 Determinação do Perfil Lipídico

As concentrações séricas do colesterol total (CT), HDL-C e triglicérides (TG) foram determinadas em analisador bioquímico automatizado LABMAX 240 (Labtest Diagnóstica S.A, Brasil). As concentrações de CT, HDL-C e TG foram obtidas pelo método enzimático, utilizando conjuntos diagnósticos comerciais Labtest. As determinações do CT e do TG foram efetuadas pelo método colorimétrico enzimático de Trinder, em uma reação de ponto final. O método utilizado para a obtenção dos níveis de HDL-C usou a precipitação seletiva das lipoproteínas de baixa e muito baixa densidade (LDL e VLDL) com ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio. As concentrações de LDL-C foram calculadas pela fórmula de Friedewald: $\text{LDL-C} = \text{CT} - (\text{HDL-C} + \text{TG}/5)$ para valores de TG até 400mg/dL. Na avaliação do perfil lipídico da população alvo e controles foram usados valores de referência para a população brasileira: CT < 200 mg/dL, LDL-C < 130 mg/dL, HDL-C > 40mg/dL e TG <150 mg/dL.

Os níveis séricos das apolipoproteínas Apo-A1 e Apo-B (Apo-B100) foram determinados através de imunonefelometria com o imunoanalisador automatizado IMMAGE[®] (BeckmanCoulter, USA). Os valores de referência foram APO-A (90-170 mg/dL; 107-214 mg/dL) e APO-B (56-162 mg/dL; 51-171mg/dL), para mulheres e homens, respectivamente.

4.2.3 Determinação dos Níveis da Proteína C-reativa

Os níveis séricos da PCR foram determinados através do método de imunonefelometria, utilizando o imunoanalisador acima citado. Amostras com níveis de PCR inferior a 1 mg/L foram reavaliadas utilizando kit ultrasensível para determinação de PCR. Conforme preconizado internacionalmente para risco coronariano, o valor de referência utilizado para esta proteína neste estudo foi inferior a 3 mg/L.

4.2.4 Determinação dos Níveis Séricos das Citocinas

Na determinação dos níveis séricos das citocinas foram usados testes imunoenzimáticos heterogêneos de ELISA de captura de antígeno, através de conjuntos de reagentes imunológicos disponíveis comercialmente (eBioscience, San Diego, CA, USA e BenderMedSystems, Vienna, Austria, Europe). Todos os imunoenaios foram realizados em duplicata no imunoanalisador automatizado para ELISA da marca BRIO (Radim, Itália).

As determinações das citocinas IL-1, IL-6, IL-10, MCP-1, TNF- α , TGF- β seguiram as instruções fornecidas pelos fabricantes. Poços de poliestireno distribuídos em tiras (MAXSORP, NUNC, Denmark) foram usados na adsorção de anticorpo monoclonal específico para cada citocina (100 μ L/poço) na concentração adequada. Esta etapa de sensibilização foi realizada "overnight" a 4°C e concluída após cinco lavagens dos poços com solução de lavagem fornecida pelo fabricante. A segunda etapa referiu-se ao bloqueio dos sítios livres residuais dos poços de poliestireno com 200 μ L/poço de diluente de trabalho durante 1 hora a 22°C. Os poços foram novamente lavados por cinco vezes e então, incubados "overnight" a 4°C com 100 μ L/poço das amostras e padrões correspondentes a cada citocina. Novo ciclo de lavagem foi processado, seguindo-se a adição de 100 μ L/poço do anticorpo de detecção conjugado com biotina e incubação por uma hora à temperatura ambiente. Seguindo novas lavagens, os poços foram incubados com 100 μ L/poço de conjugado formado por estreptavidina marcada com peroxidase por 30 minutos a 22°C. Após novo ciclo de lavagens, as reações foram reveladas com 100 μ L/poço de substrato (solução de tetrametilbenzidina contendo peróxido de hidrogênio), durante 15 minutos à temperatura de 22°C. Após parar a reação com

solução 2N de HCl, as absorbâncias foram lidas a 450nm-620nm, em leitora de ELISA. As concentrações das citocinas séricas foram determinadas em pg/mL, utilizando as curvas-padrões previamente estabelecidas com quantidades conhecidas das citocinas: IL-1 (3,9 pg/mL - 500pg/mL); IL-6(1,6 pg/mL - 200pg/mL); IL-10 (2 pg/mL - 300pg/mL); TNF- α (3,9 pg/mL - 500pg/mL); TGF- β (31,2 pg/mL - 4.000pg/mL) e MCP-1(7,8 pg/mL - 1000pg/mL).

As determinações das sete citocinas citadas acima seguiram o mesmo protocolo. Apenas uma etapa adicional existiu no ensaio da citocina TGF- β , cujas amostras antes de serem pipetadas nos poços de ELISA foram acidificadas e em seguida, neutralizadas para ativar o TGF- β latente para a forma imunorreativa. Desta forma, foi realizada uma diluição 1:5 do soro em PBS e, então, adicionou-se 20 μ L de HCL 1N e dez minutos após neutralizou-se a mesma com 20 μ L de NaOH 1N.

A dosagem da IL-8 também seguiu o protocolo do fabricante (BenderMedSystems), diferindo das determinações das outras citocinas pela incubação de 50 μ L das amostras diluídas a 1:2 misturadas com 50 μ L de conjugado biotilado nos poços previamente sensibilizados com anticorpos monoclonais anti-IL-8 por duas horas a 22°C, sob agitação. A curva padrão para esta citocina variou de 7,8 pg/mL a 1000 pg/mL.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A distribuição das variáveis contínuas foi analisada pelo teste de D'Agostino e Pearson, com os resultados expressos em média \pm DP ou mediana e intervalo interquartil Q1-Q3 (percentil 25% – percentil 75%), a depender da mesma. A diferença entre as medianas de dois grupos foi determinada pelo teste de Mann-Whitney, enquanto os subgrupos clínicos dos pacientes foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis. A associação entre grupos categóricos foi realizada pelo teste exato de Fisher. Foram considerados estatisticamente significativos os resultados das análises com o valor de $P < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas com o programa Prism versão 5.1 (GraphPad Software Inc., USA).

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS INVESTIGADOS

Neste estudo foram incluídos 162 indivíduos hipercolesterolêmicos, sendo 82 (51%) homens e 80 (49%) mulheres. A idade da população em estudo variou entre 30 - 85 anos, tendo média de idade de 60 ± 9 anos (Tabela 1). Baseado nas informações clínicas presentes nos formulários de dispensação de medicamentos para tratamento da dislipidemia e nos relatórios médicos, este grupo foi representado por 100/162 (62%) indivíduos com aterosclerose comprovada pelo exame de cineangiocoronariografia. Dentro do grupo total existiam 67 indivíduos com histórico de IAM, 48 com diagnóstico de angina e 23 com AVC. Outras morbidades cardíacas também estiveram presentes em menor prevalência, como a insuficiência cardíaca, doença obstrutiva da carótida, isquemia mitral, doença arterial periférica.

Dentro das características clínicas da população amostral, avaliou-se a presença de fatores de risco cardiovascular. Todos os pacientes eram hipercolesterolêmicos (100%), 139/162 (85,8%) hipertensos, 103/162 (63,6%) tinham história familiar de doença cardiovascular, 78/162 (48,1%) relataram ser sedentários, 52/162 (32,1%) tinham o diagnóstico de diabetes melito, 18/162 (11,1%) relataram ser tabagistas e 13/162 (8,0%) eram obesos (Tabela 1). Adicionalmente, todos os indivíduos incluídos faziam uso de estatina, sendo que 138/162 (85,2%) encontravam-se fazendo uso de sinvastatina e 24/162 (14,8%) utilizavam atorvastatina. No entanto, todos os participantes do estudo estavam fazendo a inscrição no programa estadual de medicamentos de alto custo para adquirirem atorvastatina mensalmente.

Tabela 1: Características clínicas e dados demográficos dos pacientes

	Feminino (n = 80)	Masculino (n = 82)	Total (n = 162)
Idade	62 ± 10	59 ± 8	60 ± 9
Tabagismo	5 (6%)	13 (16%)	18 (11%)
Obesidade	8 (10%)	5 (6%)	13 (8%)
Diabetes	29 (36%)	23 (28%)	52 (32%)
Sedentarismo	40 (50%)	38 (46%)	78 (48%)
Hist. Familiar	52 (65%)	51 (62%)	103 (64%)
Hipertensão	71 (89%)	68 (83%)	139 (86%)
Sinvastatina	69 (86%)	69 (84%)	138 (85%)
Atorvastatina	11 (14%)	13 (16%)	24 (15%)

Fonte: Ilustração da autora.

O grupo controle foi representado por 30 doadores de banco de sangue, 15 homens e 15 mulheres. A idade média deste grupo foi $32,8 \pm 8,4$ anos, variando entre 20 - 53 anos. Todos os integrantes deste grupo possuíam o perfil lipídico normal.

5.2 AVALIAÇÃO LABORATORIAL

5.2.1 Perfil Lipídico

Os resultados obtidos do perfil lipídico dos grupos subdivididos por gênero estão demonstrados na Tabela 2. As dosagens de colesterol total, LDL-C e Apo-B foram estatisticamente diferentes nos grupos femininos controles e pacientes (CT, $P < 0,01$; LDL-C, $P < 0,01$ e Apo-B, $P < 0,01$). Controles e pacientes masculinos apresentaram níveis semelhantes de todos os parâmetros avaliados no lipidograma ($P > 0,05$). Confrontados com o valor de referência adotado na população brasileira, pacientes do sexo masculino apresentaram níveis medianos de HDL-C baixos (38 mg/dL, V.R. = 40 mg/dL) e níveis medianos de TG acima do limite superior aceitável (180,5 mg/dL; V.R. = 150 mg/dL).

Na análise estatística realizada com os subgrupos CA neg, CA pos, IAM neg e IAM pos, foi verificado que pacientes feminino sem e com alterações na cineangiocoronariografia tinham diferenças estatísticas nos seus níveis de CT (CA neg = 213 mg/dL e CA pos = 186 mg/dL, $P < 0,01$), LDL-C (CA neg = 128,6 mg/dL e CA pos = 116,8 mg/dL, $P < 0,05$) e HDL-C, (CA neg = 49 mg/dL e CA pos = 40 mg/dL, $P < 0,05$). Nos pacientes deste gênero sem e com relato de IAM, existiram

diferenças estatísticas nos níveis de CT (IAM neg = 199 mg/dL e IAM pos = 186 mg/dL, $P < 0,05$) e HDL-C (IAM neg = 50 mg/dL e IAM pos = 39 mg/dL, $P < 0,01$).

Nos pacientes masculinos, comparados CA neg e CA pos, existiram diferenças nos níveis de CT (CA neg = 180 mg/dL e CA pos = 154 mg/dL, $P < 0,05$) e LDL-C (CA neg = 100,4 mg/dL e CA pos = 76,0 mg/dL, $P < 0,05$), enquanto em relação à ocorrência ou não de IAM, não foram observadas diferenças estatísticas nos níveis de qualquer dos parâmetros avaliados nos lipidogramas dos dois grupos.

Tabela 2: Perfil lipídico dos grupos de acordo com o gênero.

	Feminino (n=80)	Controle (n = 15)	Masculino (n = 82)	Controle (n=15)
CT	193,0 (156,0 - 244,5)	156,0 (138,0 - 182,0)	168,5 (129,8 - 192,3)	169,0 (141,0 - 190,0)
LDL-C	122 (74,6 - 158,4)	82,00 (55,8 - 99,2)	87,4 (60,3 - 116,7)	93,4 (74,2 - 109,2)
HDL-C	43,50 (38,0 - 54,7)	50,0 (41,0 - 65,0)	37 (33,0 - 44,2)	40,0 (33,0 - 49,0)
TG	144,0 (110,5 - 208,3)	126,0 (79,0 - 164,0)	180,5 (133,0 - 237,8)	146,0 (109,0 - 196,0)
Apo-A	150,0 (131,3 - 165,0)	138,0 (126,0 - 170,0)	135,0 (119,8 - 154,3)	129,0 (112,0 - 145,0)
Apo-B	94,5 (69,6 - 119,5)	67,4 (61,2 - 80,8)	77,10 (61,2 - 97,1)	74,6 (65,7 - 89,7)

Valores representam as medianas em mg/dL e seus respectivos IQR 25% - 75%.

Fonte: Ilustração da autora.

5.2.2 Proteína C-Reativa

Os níveis séricos da PCR não mostraram variações entre os pacientes (mediana 2,7 mg/L, IQR 1,4 mg/L – 5,8 mg/L) e o grupo controle (mediana 2,3 mg/L, IQR 1,6 mg/L – 3,9 mg/L). Separando os valores em grupos de baixo risco (PCR < 3 mg/L) e de alto risco (PCR > 3 mg/L), verificou-se que os pacientes do grupo de baixo risco eram representados por 56% (90/162) destes indivíduos, enquanto o de alto risco correspondeu a 44% (72/162). Nos controles, o grupo de baixo risco foi constituído por 63% (19/30) e o de alto risco por 37% (11/30) (Figura 1).

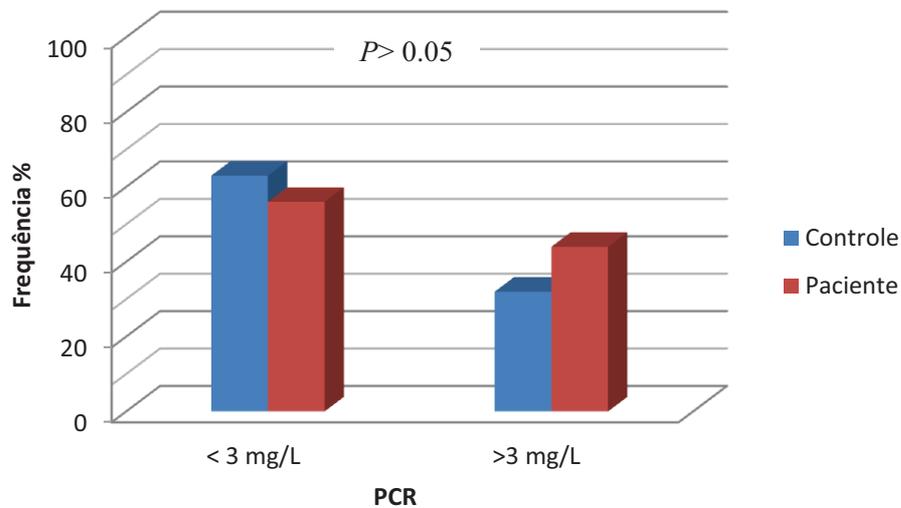


Figura 1: Frequência da distribuição dos níveis de PCR em pacientes e controles.
 Nota: Associação entre os grupos categóricos, investigada pelo teste exato de Fisher.
 Fonte: Ilustração da autora.

Houve diferença estatística nos níveis de PCR dos pacientes separados por gênero ($P < 0,01$). Os homens apresentaram uma mediana menor do nível de PCR (2,4mg/L, IQR = 1,2 – 5,0 mg/L) quando comparada à mediana das mulheres (3,5 mg/L, IQR = 1,8 – 6,4 mg/L) (Figura 2, $P < 0,05$). Proteína C-reativa acima de 3 mg/L foi observada em 29/82 (35%) homens e 43/80 (54%) mulheres (dado não ilustrado). Não foram observadas diferenças nos níveis séricos quando os subgrupos clínicos baseados na ocorrência de alterações cineangiocoronariográficas e IAM foram comparados, em ambos os gêneros.

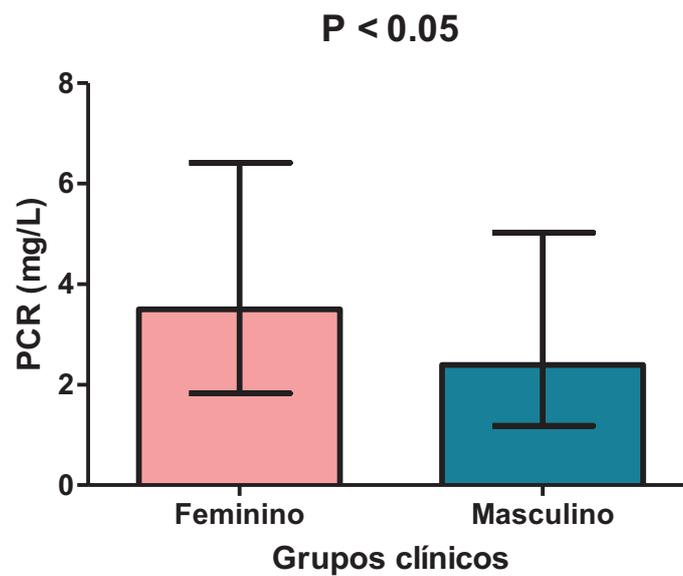


Figura 2: Distribuição dos níveis séricos de PCR nos pacientes por gênero
 Nota: Feminino, mediana 3,5 mg/L, IQR 1,8 – 6,4 mg/L; masculino, mediana 2,4 mg/L, IQR 1,2 – 5,0 mg/L). Teste de Mann-Whitney, $P < 0.05$. Fonte: Ilustração da autora.

5.2.3 Citocinas

A investigação conduzida com as sete citocinas deste estudo, mostrou algumas diferenças entre as medianas dos pacientes e dos controles dos gêneros masculino e feminino. No grupo feminino os níveis das medianas de duas citocinas pró-aterogênicas, IL-8 e TNF- α , foram mais elevados nos controles (IL-8 = 14,7 pg/mL e TNF- α = 9,5 pg/mL) quando comparados com os pacientes (IL-8 = 9,2 pg/mL; TNF- α = 6,4 pg/mL). A citocina anti-inflamatória, TGF- β , mostrou um comportamento inverso, sendo a mediana do controle (127,4 pg/mL) menor do que a mediana dos pacientes (213,7 pg/mL) (Tabela 3).

Tabela 3: Níveis séricos das citocinas nos controles e pacientes femininos

	Controles (n = 15)	Pacientes (n = 80)	Nível de Significância(P)
MCP-1	143,4 (119,0 – 166,9)	98,4 (54,4 – 155,8)	> 0.05
IL-1β	5,1 (3,9 – 5,9)	4,7 (4,0 – 5,4)	> 0.05
TNF-α	9,5 (7,5–12,7)	6,4 (4,8 – 10,2)	< 0.05
IL-8	14,7 (13,1 – 12,0)	9,2 (8,1 – 13,6)	< 0.05
IL-6	3,4 (2,2–3,7)	2,1 (1,8 – 3,3)	> 0.05
IL-10	7,3 (5,8–8,6)	6,1 (5,1 – 7,4)	> 0.05
TGF-β	127,4 (76,9–188,6)	213,7 (146,4 – 295,9)	< 0.05

Valores representados por mediana e IQR (percentil 25% - percentil 75%).
 Teste Mann-Whitney. Fonte: Produção da autora

No grupo masculino, as citocinas pró-inflamatórias, MCP-1, IL-8 e TNF- α , exibiram níveis medianos mais elevados no grupo controle (242,3 pg/mL; 27,3 pg/mL; 11,4 pg/mL, respectivamente) quando comparados com as medianas dos níveis destes mediadores nos pacientes (125,3 pg/mL; 9,4 pg/mL, 6,9 pg/mL, respectivamente) (Tabela 4).

Entre as citocinas com ação anti-inflamatória, houve diferença entre a mediana de TGF- β dos controles (131,0 pg/mL) quando comparada àquela dos pacientes (196,3 pg/mL), sendo mais elevada nestes últimos ($P < 0,001$). O nível da IL-10 (6,3 pg/mL) foi menor nestes indivíduos quando comparado com os controles (8,4 pg/mL) (Tabela 4).

Tabela 4: Níveis séricos das citocinas nos controles e pacientes masculinos

	Controles (n = 15)	Pacientes (n =82)	Nível de Significância(P)
MCP-1	242,3 (169,0 – 296,1)	125,3 (74,5 – 183,2)	< 0,001
IL-1β	7,9 (5,5 – 11,5)	6,1 (4,7 – 7,9)	> 0,05
TNF-α	11,4 (8,4 – 17,8)	6,9 (4,9 – 10,6)	< 0,01
IL-8	27,3 (17,2 – 73,4)	9,4 (8,3 – 12,0)	< 0,0001
IL-6	2,2 (1,8 – 2,7)	1,9 (2,2 – 30,7)	> 0,05
IL-10	8,4 (7,1 – 10,2)	6,3 (5,1 – 7,9)	< 0,01
TGF-β	131,0 (78,6 – 182,9)	196,3 (144,8 – 288,7)	< 0,001

Valores representados por mediana e IQR (percentil 25% - percentil 75%).
Grupos comparados pelo teste de Mann-Whitney. Fonte: Produção da autora

5.3 CITOCINAS E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

As tabelas 5 e 6 apresentam os níveis das citocinas MCP-1, IL-1 β , TNF- α , IL-8, IL-6, IL-10 e TGF- β dos controles e dos pacientes femininos e masculinos, respectivamente, agrupados com base nos resultados da cineangiocoronariografia e da história de IAM.

Tabela 5: Níveis séricos das citocinas em grupos clínicos femininos

	CA neg (n = 39)	CA pos (n = 41)	IAM neg (n = 53)	IAM pos (n = 27)	P
MCP-1	126,5 (68,6–143,1)	85,6 (50,2–169,3)	126,5 (71,9–180,7)	75,5 (44,1–117,7)	>0,05
IL-1	4,6 (3,9–5,1)	4,8 (4,2–5,6)	4,6 (3,9–4,9)	5,1 (4,3–6,7)	>0,05
TNF-α	5,7 (5,1–7,6)	7,5 (4,7–11,6)	5,7 (4,6–7,6)	9,5 (6,1–19,9)	>0,05
IL-8	9,2 (8,1–12,1)	9,9 (8,1–26,3)	8,2 (8,0–11,5)	15,9 (8,9–37,5)	>0,05
IL-6	1,9 (1,8–3,2)	2,4 (1,9–3,0)	2,1 (1,8–3,3)	2,2 (1,9–2,5)	>0,05
IL-10	6,3 (5,6–8,1)	5,5 (5,1–7,1)	6,3 (5,4–8,1)	5,4 (4,9–6,6)	>0,05
TGF-β	219,5 (138,2– 277,1)	205,9 (149,2–315,8)	154,6 (114,0– 261,0)	227,3 (155,7–298,4)	>0,05

Valores representados por mediana e IQR (percentil 25% - percentil 75%).
Fonte: Produção da autora

Tabela 6. Níveis séricos das citocinas em grupos clínicos masculinos

	CA neg (n = 23)	CA pos (n = 59)	IAM neg (n = 42)	IAM pos (n = 40)	P
MCP-1	127,3 (68,4–159,5)	123,2 (75,0–190,4)	114,9 (70,3–171,9)	129,4 (80,3–188,5)	>0,05
IL-1	4,4 (3,6–8,4)	6,1 (5,0–7,9)	5,8 (4,1–9,6)	6,5 (5,3–7,9)	>0,05
TNF-α	7,3 (5,3–11,7)	6,8 (4,9–10,7)	7,2 (5,1–10,7)	6,6 (4,9–10,7)	>0,05
IL-8	9,2 (8,3–14,1)	9,9 (8,3–11,9)	10,3 (8,4–13,3)	8,9 (8,3–12,0)	>0,05
IL-6	2,4 (1,7–2,8)	1,9 (1,7–3,7)	2,4 (1,8–3,4)	1,9 (1,6–2,3)	>0,05
IL-10	6,5 (5,3–8,6)	6,2 (5,1–7,6)	6,4 (5,3–8,5)	6,2 (5,0–7,4)	>0,05
TGF-β	182,9 (141,9–275,0)	200,1 (149,2–303,5)	192,4 (141,9–288,7)	201,1 (153,4–300,4)	>0,05

Valores representados por mediana e IQR (percentil 25% - percentil 75%).

Fonte: Produção da autora

Nos pacientes do gênero feminino foi verificado que os níveis de IL-8 e TNF- α eram mais altos nas mulheres com história clínica de IAM quando comparados com aquelas sem este histórico (Figura 3 e 4).

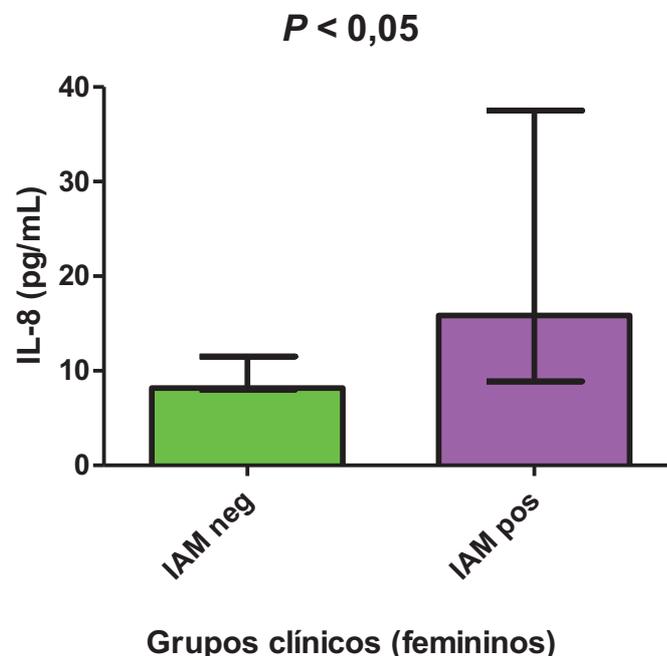


Figura 3 – Níveis séricos de IL-8 em pacientes com e sem história de IAM

Nota: Estão representadas as medianas e os intervalos interquartílicos 25% e 75%. Grupos comparados pelo teste de Mann-Whitney. Fonte: Ilustração da autora.

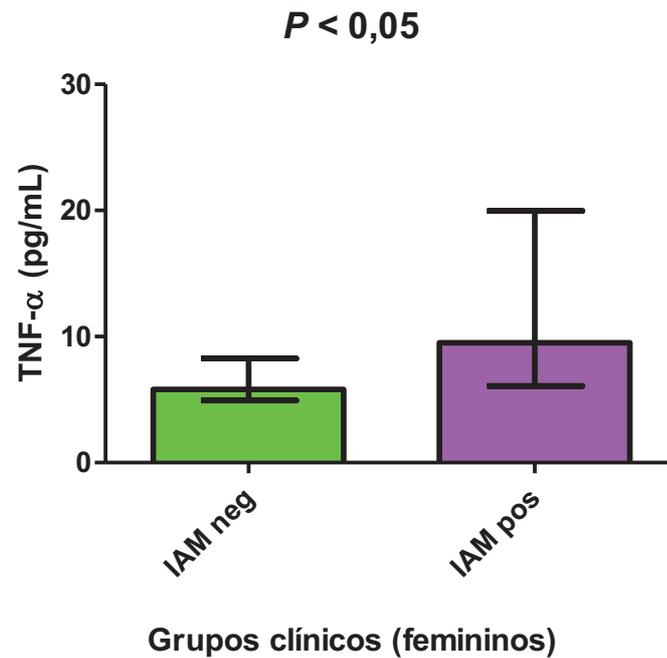


Figura 4 – Níveis séricos de TNF- α em pacientes com e sem história de IAM
Nota: Estão representadas as medianas e os intervalos interquartilicos 25% e 75%. Grupos comparados pelo teste de Mann-Whitney. Fonte: Ilustração da autora.

Diferente comportamento foi observado para a citocina IL-10, cujos níveis foram menores nas pacientes que tiveram IAM e mais altos naquelas classificadas como IAM negativo (Figura 5). Pacientes masculinos não apresentaram diferenças nos níveis das citocinas quando foram avaliados os grupos clínicos, usando os parâmetros acima descritos para o gênero feminino.

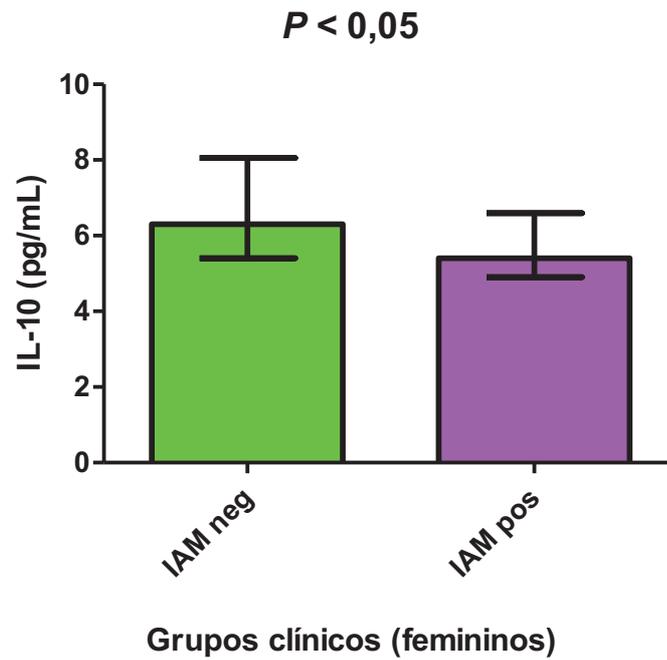


Figura 5 – Níveis séricos de IL-10 em pacientes com e sem história de IAM
Nota: Estão representadas as medianas e os intervalos interquartilicos 25% e 75%. Grupos comparados pelo teste de Mann-Whitney. Fonte: Ilustração da autora.

6 DISCUSSÃO

A atividade inflamatória na aterosclerose tem sido extensivamente pesquisada. Contudo, os mecanismos pelos quais os lipídios induzem inflamação vascular e os mecanismos da inflamação em todos os estágios da aterosclerose permanecem, em grande parte, desconhecidos. De forma semelhante, a identificação de marcadores inflamatórios preditores de doenças cardiovasculares poderia auxiliar na detecção precoce, prevenção e tratamento da aterosclerose.

O presente estudo investigou os níveis séricos de PCR e citocinas classificadas como pró e anti-aterogênicas em indivíduos hipercolesterolêmicos com fatores de risco cardiovasculares e diagnóstico de doenças coronarianas, todos tratados com estatinas. Os pacientes foram classificados para a avaliação por gênero em virtude das diferenças já documentadas na doença aterosclerótica em homens e mulheres no que se refere aos parâmetros bioquímicos e biomarcadores inflamatórios. A média de idade dos indivíduos participantes da população alvo foi relativamente alta, porém comparável àquela presente na maioria dos estudos relacionados às doenças cardiovasculares (RIDKER et al., 2001; NICHOLLS et al., 2007). A prevalência dos fatores de risco como hipertensão arterial, história familiar de doença cardiovascular, sedentarismo, diabetes, tabagismo e obesidade foi similar à encontrada em outros estudos (RIDKER et al., 2001; MOUCO et al., 2006; NICHOLLS et al., 2007), diferindo apenas para diabetes e tabagismo. Na população estudada, existiu uma maior prevalência de portadores de diabetes tipo 2 (32%) e menor para tabagismo (11%). Tal fato pode refletir a crescente incidência do diabetes no Brasil, causada por mudanças nos hábitos alimentares, constituindo-se atualmente em importante fator de risco para a ocorrência de doenças cardiovasculares.

A maioria dos parâmetros determinados no perfil lipídico dos pacientes de ambos os gêneros se encontraram dentro dos valores referenciais estabelecidos para a população brasileira, com exceção de HDL-C e TG no grupo de pacientes masculinos. Os níveis de CT, LDL-C e Apo-B foram mais elevados nos pacientes do gênero feminino do que nos seus respectivos controles, embora estivessem dentro do valor de referência adotado. Porém, no gênero masculino, pacientes e controles não apresentaram diferenças entre os parâmetros lipídicos.

Diferenças estatísticas foram observadas em alguns parâmetros do perfil lipídico quando os pacientes foram classificados em grupos clínicos em relação às alterações na cineangiocoronariografia e ocorrência de IAM. Excetuando os pacientes masculinos com e sem relato de IAM, os demais grupos clínicos apresentaram diferenças estatísticas envolvendo CT e as frações LDL-C e HDL-C. Contudo, o significado biológico destas diferenças estatísticas, nos níveis destes analitos, só poderá ser elucidado em estudos prospectivos focando a ocorrência de futuros eventos cardiovasculares nos indivíduos que constituem os mesmos.

Apesar de todos os pacientes fazerem uso de estatina, níveis de LDL-C (< 70 mg/dL) compatíveis com as metas para terapêutica preventiva estabelecidas pela IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemia e Prevenção de Aterosclerose (SPOSITO et al., 2007) não foram encontrados nos pacientes em estudo. Tratando-se de pacientes cuja medicação antilipemiente é fornecida pelo SUS, no mesmo serviço de atenção farmacêutica, tal achado pode estar associado a não aderência dos pacientes ao tratamento. Nos pacientes com doença aterosclerótica, a obtenção do nível de LDL-C igual ou inferior a 70 mg/dL reduz a incidência de eventos cardiovasculares (SPOSITO et al., 2007).

Por sua vez, as amostras dos controles, oriundas de doadores de banco de sangue, tinham todos os parâmetros lipídicos investigados nos limites de referência, caracterizando seus doadores como indivíduos não dislipidêmicos. Desta forma, puderam ser usadas como controles na comparação dos níveis de PCR e de citocinas dos pacientes.

A estatina, principalmente sinvastatina, é um medicamento que inibe a atividade da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), baixando os níveis de colesterol e diminuindo a produção da LDL-C. Tal medida terapêutica deve-se à necessidade de prevenção primária e secundária de eventos cardiovasculares nestes indivíduos. Contudo, além da redução do colesterol, a estatina tem efeitos pleiotrópicos, modulando a resposta imune e inflamatória na doença aterosclerótica (ROMANO et al., 2000; LI et al., 2005; PASTERKAMP; VAN LAMMEREN 2010).

Neste estudo foi observada uma semelhança entre os valores de PCR dos pacientes e do grupo controle, sendo observado que uma importante proporção dos indivíduos do grupo alvo tinham níveis de PCR maior que 3mg/dL, caracterizando-os como portadores de alto risco para desenvolver doenças cardiovasculares de acordo

com os padrões internacionais (WILSON et al., 2008). Embora os níveis de PCR nos pacientes do gênero feminino tenham sido maiores do que naqueles do gênero masculino, nem as alterações angiocoronariográficas nem o histórico IAM influenciaram os níveis de PCR em ambos os gêneros. Tem sido reportado que indivíduos com perfil lipídico normal e altos níveis da PCR são suscetíveis a IAM, AVC e morte por doenças cardiovasculares, enquanto níveis de PCR acima de 3 mg/L durante o uso de estatina estão relacionados a uma pior evolução de pacientes com doenças cardiovasculares (RIDKER et al., 2005, RIDKER et al., 2010). No entanto, um trabalho recente relatou diferenças nos níveis de PCR em mulheres de acordo com a etnia, tendo sido verificado em 875 mulheres afrodescendentes uma mediana de 3,2 mg/L de PCR (KELLEY-HEDGEPEETH et al., 2008).

Além da PCR, outros mediadores imunológicos, principalmente citocinas, têm sido estudados para identificar novos biomarcadores de risco de doença cardiovascular, possibilitando a classificação destes mediadores imunológicos em pró e anti-inflamatórias (SANTOS et al., 2003; SCIRICA; MORROW, 2006).

As citocinas pró-inflamatórias desempenham papéis importantes na patologia da aterosclerose, agravando a progressão da placa aterosclerótica. Adicionalmente, as citocinas pró-inflamatórias estão aumentadas em diferentes tipos de doenças cardiovasculares, incluindo IAM, AVC, angina e insuficiência cardíaca (TUTTLE et al., 2004; EL-MENYAR, 2008).

Os níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias IL-8, TNF- α apresentaram-se diminuídos nos dois gêneros de pacientes. Entretanto, seus níveis de IL-1 β e IL-6 foram semelhantes, enquanto os níveis da citocina MCP-1 mostraram-se diminuídos apenas nos pacientes do gênero masculino quando comparados aos controles sadios.

Tais resultados de IL-8 e TNF- α estão de acordo com os efeitos inibitórios das estatinas sobre a expressão e produção das citocinas pró-inflamatórias em pacientes hipercolesterolêmicos (REZAIE-MAJD et al., 2002; LINDHOLM; NILSSON, 2006; ABLES; PILINGER, 2006). Estes medicamentos atuam sobre a produção de IL-8, MCP-1 e TNF- α alterando as condições de migração dos leucócitos para o local da inflamação, além de inibir o acúmulo de macrófagos em áreas de aterosclerose (GU et al., 1998; REZAIE-MAJD et al., 2002; ABLES; PILINGER, 2006; VEILLARD et al., 2006).

As observações sobre IL-1 β e IL-6 aqui apresentadas mostraram que o efeito supressor da estatina sobre os níveis destas duas citocinas na população avaliada não é tão intenso quanto ao observado para IL-8, TNF- α e MCP-1, apenas normalizando a produção destes mediadores imunológicos. Entretanto, existem estudos mostrando que a terapia com estatina também diminui os níveis séricos de IL-1 β e IL-6 em pacientes com hipercolesterolemia (REZAIIE-MAJD et al., 2002; LINDHOLM; NILSSON, 2006; ABLES; PILINGER, 2006). Por outro lado, não pode ser descartada a possibilidade de que estes dados resultaram da baixa concentração destas citocinas no soros dos pacientes e controles, dificultando a avaliação das mesmas em todos os pacientes incluídos por questão de sensibilidade analítica dos imunoenaios usados.

O resultado verificado com a citocina MCP-1 nos pacientes masculinos sugere uma maior sensibilidade dos indivíduos deste gênero à ação anti-inflamatória de estatina sobre esta citocina. Tal sugestão pode ser corroborada pelo relato de Inadera e colaboradores (1999) de que os níveis de MCP-1 tendem a serem maiores em homens do que em mulheres.

Os níveis de IL-10 apresentaram-se diminuídos tanto em pacientes masculinos como femininos. A observação de que apenas pacientes do gênero feminino com histórico clínico de IAM, possuíam níveis mais altos de IL-8 e TNF- α , com redução nos níveis de IL-10, quando comparados àqueles sem tal histórico, sugere que estes dois subgrupos podem possuir diferenças nos mecanismos de regulação imune. Adicionalmente, está de acordo com a documentação de que reduzido nível de IL-10 não apenas constitui-se em marcador da instabilidade da placa aterosclerótica, como indica um prognóstico ruim após ocorrência de isquemia aguda (HEESCHEN et al, 2003). Assim, a inexistência de relato de IAM recente entre estas pacientes (dados de prontuário) fortalece a possibilidade de eventos cardíacos futuros, principalmente porque as doenças cardiovasculares são a principal causa de morbi-mortalidade nas brasileiras acima de 50 anos de idade, existindo um risco seis vezes maior de morte pelas mesmas do que por câncer de mama (FERNANDES et al., 2008).

Alguns mecanismos têm sido sugeridos na estabilização da placa aterosclerótica, através de duas citocinas principais, IL-10 e TGF- β . Enquanto a citocina IL-10 é um dos principais responsáveis pelo controle da resposta inflamatória na aterosclerose (VON DER THUSEN et al., 2003; LI et al., 2005), a

TGF- β atua como inibidor da molécula de adesão envolvida no recrutamento de leucócitos, além de regular a ativação de linfócitos T (OS et al., 2002; GRAINGER, 2007, ROBERTSON et al., 2003). Neste estudo, foi verificado importante aumento nos níveis de TGF- β dos pacientes de ambos os gêneros, o qual pode estar provavelmente associado aos efeitos da medicação anti-lipemiente usada por estes indivíduos.

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados aqui apresentados, as seguintes conclusões podem ser produzidas:

- 7.1 Pacientes assistidos no Serviço de Cardiologia do Hospital Ana Nery do C-HUPES apresentam fatores de risco para doenças cardiovasculares semelhantes àqueles observados em outras populações de diferentes etnias.
- 7.2 O perfil lipídico destes indivíduos, embora de acordo com os valores referenciais populacionais, não atendem satisfatoriamente às recomendações da IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemia e Prevenção de Aterosclerose – Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia para indivíduos em uso de terapia antilipemiante.
- 7.3 A investigação de aterosclerose em pacientes do gênero feminino do Estado da Bahia deve considerar a possibilidade do achado laboratorial de níveis aparentemente elevados de PCR, os quais são compatíveis com a afrodescendência prevalente na população baiana.
- 7.4 Foi observado que a estatina possui além do efeito hipolipemiante, uma ação reguladora na produção de citocinas envolvidas com a imunopatogênese e regulação imune da aterosclerose.
- 7.5 A possibilidade de ocorrência de novos eventos cardiovasculares em mulheres com níveis aumentados das citocinas pró-inflamatórias IL-8 e TNF- α e redução nos níveis da citocina imunorregulatória IL-10, hipótese que deve ser confirmada em futuros estudos, principalmente naquelas com história pregressa de IAM e em uso de estatina.

REFERÊNCIAS

- ABLES A M; PILLINGER. Statins as Antiinflammatory and Immunomodulatory Agents. **Arthritis e Rheumatism** 54 (2): 393-407, 2006.
- AMIR S, BINDER C J. Experimental immunotherapeutic approaches for atherosclerosis. **Clinical Immunology** 134: 66-79, 2010.
- ANDERSSON J, LIBBY P, HANSSON G K. Adaptive immunity and atherosclerosis. **Clinical Immunology** 134: 33-46, 2010.
- APOSTOLAKIS S, VOGIATZI K, AMANATIDOU V, SPANDIDOD D A. Interleukin 8 and cardiovascular disease. **Cardiovascular Research** 84: 353-360, 2009.
- AUKRUST P et al.. Chemokines and Cardiovascular Risk. **Arteroscler Thromb Vasc Biol** 28: 1909-1919, 2008.
- BAIDYA S G, ZENG Q-T. Helper T cells and atherosclerosis: the cytokine web. **Postgrad Med J** 81: 746-752, 2005.
- BARATH P et al. Detection and localization of tumor necrosis factor in human atheroma. **Am J Cardiol** 65: 297-302, 1990.
- BATUCA J R, AMARAL M C, ALVES J D. Humoral Mechanisms of Atherogenesis. **Annals of the New York Academy of Sciences** 1173: 401-408, 2009.
- BIASILLO G, LEO M, BONA R D, BIASUCCI L M. Inflammatory biomarkers and coronary heart disease: from bench to bedside and back. **Inter Emerg Med** 5: 225-233, 2010.
- BOISVERT W A. Modulation of Atherogenesis by Chemokines. **Trends Cardiovascular Med** 14: 161-165, 2004.
- CHUNG H K et al. Statin inhibits interferon-gamma induced expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in vascular endothelial and smooth muscle cells. **Exp Mol Med** 34: 451-461, 2002.
- DEO R et al. Association Among Plasma Levels of Monocyte Chemoattractant Protein-1, Traditional Cardiovascular Risk Factors, and Subclinical Atherosclerosis. **Journal of the American College of Cardiology** 44(9):1812-1818, 2004.
- EL-MENYAR A. Cytokines and Coronary Artery Disease. **Critical Pathways in Cardiology** 7(2):139-151, 2008.
- FAN J, WATANABE T. Inflammatory in the Pathogenesis of Atherosclerosis. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis** 10 (2): 63-71, 2003.
- FERNANDES CE, PINHO-NETO JSL, GEBARA OCE. I Diretriz Brasileira sobre Prevenção de Doenças Cardiovasculares em Mulheres Climatéricas e a Influência da Terapia de Reposição Hormonal (TRH) da Sociedade Brasileira de Cardiologia

(SBC) e da Associação Brasileira do Climatério (SOBRAC). **Arq Bras Cardiol** 91(1 supl.1):1-23, 2008.

FILHO AC et al. Inflamação e Aterosclerose: Integração de Novas Teorias e Valorização dos Novos Marcadores. **Bras Cardiol Invas** 11(3): 14-19, 2003.

FRANCO FGM; MATOS LDNJ. Exercício físico e perfusão miocárdica. In: *Cardiologia do exercício: do atleta ao cardiopata*. **Manole**: São Paulo 179-259, 2005.

FROSTEGARD J et al. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. **Atherosclerosis** 145: 33-43, 1999.

GALKINA E, LEY K. Immune and Inflammatory Mechanisms of Atherosclerosis. **Annu.Rev. Immunol** 27: 97-165, 2009.

GEORGE J et al. Immunolocalization of β 2-Glycoprotein I (Apolipoprotein H) to Human Atherosclerotic Plaques: Potential Implications for Lesion Progression. **Circulation** 99: 2227-2230, 1999.

GIRN H R S, ORSI N M, HOMER-VANNIASINKAM S. An overview of cytokine interactions in atherosclerosis and implications for peripheral arterial disease. **Vascular Medicine** 12: 299-309, 2007.

GOTTLIEB M G V, BONARDI G, MORIGUCHI E H. Fisiopatologia e aspectos inflamatórios da aterosclerose. **Scientia Medica** 15 (3): 203-207, 2005.

GRAINGER D J. TGF- β and atherosclerosis in man. **Cardiovascular Research** 74: 213-222, 2007.

GRAINGER D J. Transforming Growth Factor β and Atherosclerosis: So Far, So Good for the Protective Cytokine Hypothesis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 24: 399-404, 2004.

GU L et al. Absence of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Reduces Atherosclerosis in Low Density Lipoprotein Receptor-Deficient Mice. **Molecular Cell** 2: 275-281, 1998.

HAMILTON J A, ANDERSON G P. GM-CSF biology. **Growth Factors** 22: 225-231, 2004.

HANSSON G K, LIBBY P, SCHONBECK U, YAN Z Q. Innate and Adaptive Immunity in the Pathogenesis of Atherosclerosis. **Circ Res** 91: 281-291, 2002.

HANSSON G K. Immune Mechanisms in Atherosclerosis. **Atheroscler Thromb Vasc Biol** 21: 1876-1890, 2001.

HANSSON GK, ROBERTSON AKL, SÖDERBERG-NAUCLÉR C. Inflammation and Atherosclerosis. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.** 1: 297-329, 2006.

HANSSON KK, LIBBY P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. **Nature reviews immunology** 6: 508-519, 2006.

HARVEY E J, RAMJI D P. Interferon- γ and atherosclerosis: Pro- or anti-atherogenic?. **Cardiovascular Research** 67: 11-20, 2005.

HEESCHEN C et al. Serum Level of the Antiinflammatory Cytokine Interleukin-10 Is an Important Prognostic Determinant in Patients With Acute Coronary Syndromes. **Circulation** 107: 2109-2114, 2003.

INADERA H et al. Increase in Circulating Levels of Monocyte Chemoattractant Protein-1 with Anging. **Journal of Interferon and Cytokine Research** 19: 1179-1182, 1999.

KÁDÁR A, GLASZ T. Development of atherosclerosis and plaque biology. **Cardiovascular Surgery** 9 (2): 109-121, 2001.

KELLEY-HEDGEPEETH A et al. Ethnic Differences in C-Reactive Protein Concentrations. **Clinical Chemistry** 54 (6): 2-11, 2008.

KLEEMANN R, ZADELAAR S, KOOISTRA T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. **Cardiovascular research** 2008.

KUIPER J et al. Immunomodulation of inflammatory response in atherosclerosis. **Current Opinion in Lipidology** 2007, 18: 521-526.

LEON M L, ZUCKERMAN S H. Gamma interferon: a central mediator in atherosclerosis. **Inflamm Res** 54: 395-411, 2005.

LI J et al. Effects of Sinvastatin on Anti-inflammatory Cytokine IL-10 in Patients with Unstable Angina within Two Weeks. *Heart* published online 2005.

LIBBY P, SUKHOVA G, LEE R T, GALIS Z S. Cytokines regulate vascular functions related to stability of the atherosclerotic plaque. **J Cardiovasc Pharmacol** 25 (2): 9-12, 1995.

LINDHOLM M W, NILSSON J. Sinvastatin stimulates macrophage interleukin-1 β secretion through a isoprenylation-dependent mechanism. **Vascular Pharmacology** 46: 91-96, 2007.

LUNDBERG AM, HANSSON GK. Innate immune signals in atherosclerosis. **Clinical Immunology** 134: 5-24, 2010.

MATSUURA E, KOBAYASHI K, INOUE K, LOPEZ LR, SHOENFELD Y. Oxidized LDL/ β 2-glycoprotein I complexes: new aspects in atherosclerosis. **Lupus** 14: 736-741, 2005.

MORROW D A, LEMOS J A, SABATINE M S, WIVIOTT S D, BLAZING M A, SHUI A, RIFAI N, CALIFF R M, BRAUNWALD E. Clinical Relevance of C-Reactive Protein

During Follow-Up of Patients With Acute Coronary Syndromes in the Aggrastat-to-Zocor Trial. **Circulation** 114: 281-288, 2006.

MOSEDALE D E et al. Circulating levels of MCP-1 and eotaxin not associated with presence of atherosclerosis or previous myocardial infarction. *Atherosclerosis* 183: 268–274, 2005.

MOUCO O M C C et al. Análise de Marcadores de Estabilização da Placa Aterosclerótica após Evento Coronariano Agudo. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia** 87 (1): 28-36, 2006.

NICHOLLS A J et al. Statins, High-Density Lipoprotein Cholesterol, and Regression of Coronary Atherosclerosis. **JAMA** 297: 499-508, 2007.

OS I, DJUROVIC S, SELJEFLOT I, BERG K. Transforming growth factor (TGF)-beta1 inversely related to vascular cell adhesion molecule-1 in postmenopausal women with coronary artery disease. A possible mechanism for the putative cardioprotective role of TGF-beta1? **Journal of Internal Medicine** 251: 223-227, 2002.

PASTERKAMP G, VAN LAMMEREN G W. Pleiotropic effects of statins in atherosclerotic disease. **Expert Reviews Cardiovascular** 8 (9): 1235-1237, 2010.

PEARSON T A et al. Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease Application to Clinical and Public Health Practice: A Statement for Healthcare Professionals From the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. **Circulation** 107: 499-511, 2003.

RANZOLIN A et al. Anticorpos Contra Beta2-Glicoproteína I como Fatores de Risco para Infarto Agudo do Miocárdio. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia** 83 (2): 137-140, 2004.

REZAIIE-MAJD A et al. Simvastatin Reduces Expression of Cytokines Interleukin-6, Interleukin-8, and Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Circulating Monocytes from Hypercholesterolemic Patients. **Atherosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology** 22: 1194-1199, 2002.

RIDKER P M et al. C-Reactive Protein Levels and Outcomes after Statin Therapy. *The New England Journal of Medicine* 352: 20-28, 2005.

RIDKER P M et al. Relation of Baseline High-Sensitivity C-Reactive Protein Level to Cardiovascular Outcomes With Rosuvastatin in the Justification for Use of Statins in Prevention: An Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin (JUPITER). **The American Journal of Cardiology** 106: 204-209, 2010.

RIDKER P M, STAMPFER M J, RIFAI N. Novel Risk Factors for Systemic Atherosclerosis. A Comparison of C-Reactive Protein, Fibrinogen, Homocysteine, Lipoprotein(a), and Standard Cholesterol Screening as Predictors of Peripheral Arterial Disease. **JAMA** 285: 2481-2485, 2001.

ROBERTSON A K L, HANSSON G K. T Cells in Atherogenesis. For Better or For Worse?. **Atheroscler Thromb Vasc Biol** 26: 2421-2432, 2006.

ROBERTSON AKL et al. Disruption of TGF- β signaling in T cells accelerates atherosclerosis. **J Clin Invest** 112: 1342-50, 2003.

ROMANO M, et al. Inhibition of Monocyte Chemotactic Protein-1 Synthesis by Statins. **Laboratory Investigation** 80 (7): 1095-1100, 2000.

SANTOS W B et al. Proteína-C-Reativa e Doença Cardiovascular. As Bases da Evidência Científica. **Arq Bras Cardiol** 80(4): 452-456, 2003.

SCIRICA B M, MARROW D A. Is C-reactive protein an innocent bystander or proatherogenic culprit?. **Circulation** 113: 2118-2151, 2006.

SEILER C et al. Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Circulation** 104: 2012-2017, 2001.

SHIN WS, SZUBA A, ROCKSON S G. The role of cytokines in human cardiovascular pathology: enhanced biological insights. **Atherosclerosis** 160: 91-102, 2002.

SHOENFELD Y, WU R, DEARING L D, MATSUURA E, LINDA D. Are Anti-Oxidized Low-Density Lipoprotein Antibodies Pathogenic or Protective. **Circulation** 110: 2552-2558, 2004.

SING H U et al. C-Reactive Protein Decreases Interleukin-10 Secretion in Activated Human Monocyte-Derived Macrophages via Inhibition of Cyclic AMP Production. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 26: 2469-2475, 2006.

SPOSITO A C; CARAMELLI B; FONSECA F A H et al. IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq Bras Cardiol** 88, Suplemento I, Abril 2007.

STENVINKEL P et al. Mortality, malnutrition, and atherosclerosis in ESRD: What is the role of interleukin-6?. **Kidney International** 61 (80): 103-108, 2002.

SZODORAY P et al. Th1/Th2 Imbalance, Measured by Circulating and Intracytoplasmic Inflammatory Cytokines – Immunological Alterations in Acute Coronary Syndrome and Stable Coronary Artery Disease. **Scandinavian Journal of Immunology** 64: 336-344, 2006.

TAUBMAN M B et al. Tissue factor in the pathogenesis of atherosclerosis. **Thromb Haemost** 78: 200-204, 1997.

TEDGUI A, MALLAT Z. Cytokines in Atherosclerosis: Pathogenic and Regulatory Pathways. **Physiol Rev** 86: 515-581, 2006.

TUTTLE H A et al. Proinflammatory cytokines are increased in type 2 diabetic women with cardiovascular disease. **Journal of Diabetes and Its Complications** 18: 343-351, 2004.

VEILLARD N R et al. Sinvastatin modulates chemokine and chemokine receptor expression by geranyl isoprenoid pathway in human endothelial cells and macrophages. **Atherosclerosis** 188: 51-58, 2006.

VERMA S, DEVARAJ S, JIALAL I. C-Reactive Protein Promotes Atherothrombosis. **Circulation** 113: 2135-2151, 2006.

VON DER THUSEN JH et al. Interleukins in atherosclerosis: molecular pathways and therapeutic potential. **Pharmacol Rev** 55: 133-66, 2003.

WEATERVELD H T et al. Apolipoprotein B and Coronary Artery Disease in Women : A Cross-sectional Study in Women Undergoing Their First Coronary Angiography. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 18:1101-1107, 1998.

WILSON P W F et al. C-Reactive Protein and Reclassification of Cardiovascular Risk in the Framingham Heart Study. **Circ Cardiovasc Qual Outcomes** 1:92-97, 2008.

ANEXO A
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Através deste documento, declaro a minha participação voluntária no estudo **Perfil de citocinas e quimiocinas envolvidas na imunopatogenia e regulação imune da aterosclerose em uma população de Salvador – Bahia** coordenado pelo Dr. Ajax Mercês Atta, Professor Titular de Imunologia Clínica e Chefe do Laboratório de pesquisa em Imunologia (LAPIM) do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, com endereço á Rua Barão de Jeremoabo, s/n°, bairro de Ondina (tel.: 71 – 3283-6972, e-mail: dilda.lapim@ig.com.br), que tem como objetivo investigar os mecanismos envolvidos na patogênese da doença obstrutiva coronária crônica, vascular cerebral e/ou renal crônica, da qual sou portador (a). Com essa finalidade, consinto que seja retirada uma pequena quantidade do meu sangue, equivalente a 25 mililitros, através de colheita realizada em uma das veias do meu antebraço, para que seja usada nesta investigação. Sei, e também fui informado (a) que esta colheita do meu sangue não oferece nenhum risco para minha saúde, assim como não poderá causar nenhuma reação adversa futura ao meu organismo. Nesta mesma oportunidade, fui esclarecido (a), que serão realizados exames de laboratório no meu sangue cujos resultados serão apenas conhecidos pela equipe que os realizou e também pela equipe médica que me acompanha, coordenada pelo Professor Dr. Roque Aras, Chefe do Serviço de Cardiologia do Hospital Ana Nery do Complexo Hospitalar Hospital Universitário Prof. Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia, aos quais terei acesso se for minha vontade, e serão mantidos em total sigilo, preservando a minha identidade e privacidade. Além disso, fui também informado (a) que a minha recusa em não participar do estudo, não causara nenhum prejuízo para minha assistência médica e terapêutica, como também não receberei nenhum auxilio financeiro por esta minha atitude de participar da pesquisa. O único benefício que terei será a avaliação laboratorial, sem nenhum custo a qual poderá ou não causar novas condutas clínicas e/ou tratamentos pela equipe médica responsável que me acompanha. Finalmente declaro que sou sabedor que os resultados obtidos neste estudo (de todos os pacientes juntos, sem que nenhum seja identificado individualmente) serão publicados em congressos e revistas médicas, o que permitira significativa contribuição científica sobre a imunopatogênese e regulação imune da aterosclerose, ajudando outros pacientes como eu.

Salvador, ____/____/____

Nome: _____ RG: _____

Assinatura: _____

ANEXO B
SERVIÇO DE CARDIOLOGIA HOSPITAL ANA NERY
LABORATÓRIO DE PESQUISA EM IMUNOLOGIA
FACULDADE DE FARMÁCIA - UFBA

FORMULÁRIO DE PESQUISA

Paciente nº: _____

IDENTIFICAÇÃO

NOME: _____

SEXO: () FEMININO () MASCULINO COR: _____

DATA DE NASCIMENTO: ____ / ____ / ____ IDADE: _____

ENDEREÇO: _____

NATURALIDADE: _____ TELEFONE: _____

DIAGNÓSTICO

Hipercolesterolemia () Hipertrigliceridemia () Diabetes Mellitus ()

IAM () Angina () AVC () DAP ()

LÚPUS () Doença da tireóide () HEPATITE C () Anemia Falciforme ()

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

FATORES DE RISCO

() Hereditariedade

() Diabetes

() Tabagismo

() Sedentarismo

() Obesidade

() Hipertensão arterial

Anotações: _____

EXAMES COMPLEMENTARES

Teste	Resultado	Data
Colesterol Total		
HDL-C		
LDL-C		
Triglicérides		
Glicemia		
Creatinina		
Uréia		
TGO		
TGP		

Tipo de Exame	Normal	Anormal
Eletrocardiograma		
Teste Ergométrico		
Cintilografia		
Cineangiocoronariografia		
Doppler de artéria periférica		
CT ou RNM de Crânio		

