



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



TACIANA PEREIRA SANT'ANA SANTOS

**ANTICORPOS ANTIFOSFOLÍPIDES EM PACIENTES COM
DOENÇA CARDIOVASCULAR DE SALVADOR-BAHIA**

Salvador
2012

TACIANA PEREIRA SANT'ANA SANTOS

**ANTICORPOS ANTIFOSFOLÍPIDES EM PACIENTES COM
DOENÇA CARDIOVASCULAR DE SALVADOR-BAHIA**

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

Orientador: Prof. Dr. Ajax Mercês Atta

Salvador
2012

Sistema de Bibliotecas - UFBA

Santos, Taciana Pereira Sant'Ana.

Anticorpos antifosfolípides em pacientes com doença cardiovascular de Salvador-Bahia /
Taciana Pereira Sant'Ana Santos. - 2012.
69 f. : il.

Inclui anexos.

Orientador: Prof. Dr. Ajax Mercês Atta.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Salvador,
2012.

1. Aterosclerose. 2. Sistema cardiovascular - Doenças. 3. Acidente vascular cerebral.
4. Reações antígeno-anticorpo. 5. Fosfolípídios. I. Atta, Ajax Mercês. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD - 616.136
CDU - 616.13-004.6



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

TERMO DE APROVAÇÃO

TACIANA PEREIRA SANT'ANA SANTOS

ANTICORPOS ANTIFOSFOLÍPIDES EM PACIENTES COM DOENÇA
CARDIOVASCULAR DE SALVADOR-BAHIA

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

Aprovada em 11 de maio de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Ajax Mercês Atta
Universidade Federal da Bahia
Orientador

Dr. Mittermayer Barreto Santiago
Escola Baiana de Medicina e Saúde Pública

Dr. Roberto Meyer
Universidade Federal da Bahia

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida e pelas oportunidades a mim oferecidas;

Aos meus pais, Esmeraldo e Lindnalva, pelo amor e apoio constantes e pelo incansável comprometimento em favor dos meus estudos;

A minha irmã, Juliana, pelo amor e amizade;

A Igor pelo amor, companheirismo e compreensão;

Aos meus padrinhos, Wilson e Estelita, que não mediram esforços desde o início da minha jornada;

A todos os familiares e amigos que torceram por minha vitória e se comprometeram, muitas vezes, para que eu a alcançasse;

A meu orientador, Prof. Dr. Ajax Mercês Atta, pela confiança em mim depositada e plena disponibilidade;

À família DILDA/LAPIM pelo pronto acolhimento: Profa. Dra. Maria Luiza B. S. Atta, MSc. Isabela Oliveira, MSc. Milena Cabral, MSc. Rodrigo Oliveira, Jonatas Rodrigues, João Paulo Machado, Elisângela (Liu), Atailza (Isa), e em especial a MSc. Mariana Pereira, pela parceria nos projetos e amizade construídas ao longo desses dois anos de pós-graduação;

Agradeço ainda ao Hospital Ana Nery, Dr. Roque Aras e sua secretária Rosely Pereira Santiago, pela total disponibilidade e acolhimento durante a captação dos pacientes; e aos funcionários do laboratório desta mesma instituição, que dispuseram do seu tempo e não mediram esforços para ajudar na coleta das amostras;

Ao Laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Farmácia, em especial ao Prof. Dr. Ricardo David Couto pela colaboração;

Aos colegas e professores do Programa de Pós-Graduação em Farmácia, pelos encontros tão produtivos para troca de conhecimentos, experiências e também risadas, especialmente às colegas Ana Paula Caires, Débora Laranjeira, Milena Lima e Vanessa Meneses;

Aos pacientes pela total disponibilidade na participação do projeto;

Agradeço também a Universidade Federal da Bahia e a Faculdade de Farmácia pelos sete anos de acolhimento;

E às instituições financeiras CNPq e Capes, pelo apoio e estímulo à pesquisa.

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já têm a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos”.

Fernando Pessoa

SANTOS, Taciana Pereira Sant'Ana. *Anticorpos antifosfolípides em pacientes com doença cardiovascular de Salvador-Bahia*. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia – UFBA, Salvador, 2012.

RESUMO

A aterosclerose é a principal causa das doenças cardiovasculares, as quais constituem um grupo de entidades clínicas responsável por elevada morbimortalidade em todo mundo. A presença de anticorpos antifosfolípides (aPLs) tem sido investigada nestas desordens, tendo sido associados com infarto agudo do miocárdio e acidente vascular cerebral (AVC). O objetivo deste trabalho foi investigar a presença de aPLs em 150 (79 homens e 71 mulheres) indivíduos dislipidêmicos, usuários de estatina com diagnóstico ou risco de doença cardiovascular atendidos em um serviço público de cardiologia de Salvador. Sessenta indivíduos sadios foram utilizados como grupo controle, 30 do sexo feminino e 30 do masculino. Os dados sobre fatores de risco cardiovascular foram obtidos através de entrevistas e busca em prontuários médicos. A dislipidemia foi avaliada através das determinações de colesterol total (CT) e frações e triglicérides (TG). Os níveis séricos de apolipoproteína-A (Apo-A), apolipoproteína-B (Apo-B) e PCR foram determinados por nefelometria. Anticorpos IgA, IgG e IgM anti β 2 glicoproteína I (a- β 2GPI) e anticardiolipina (aCL), IgG e IgM antianexina (a-ANX), antifosfatidilserina (aFS) e antiprotrombina (aPTR) foram determinados através de ensaios imunoenzimáticos. A média de idade dos pacientes diferiu significativamente dos controles (60 ± 9 e 34 ± 9 anos, respectivamente; $P < 0,0001$), mas não entre os gêneros nos pacientes (59 ± 8 anos para homens, 61 ± 10 anos para mulheres, $P = 0,093$) e controles (33 ± 10 anos para homens, 34 ± 9 anos para mulheres, $P = 0,602$). Dentre os parâmetros do perfil lipídico observados foram encontradas diferenças nos níveis de CT e LDL-C em pacientes e controles do sexo masculino ($P = 0,020$ e $P = 0,014$, respectivamente) e para o gênero feminino, as mulheres apresentaram medianas de HDL-C inferiores a dos controles e superiores de Apo-B ($P = 0,004$ e $P = 0,035$, respectivamente). Vinte e quatro (16%) de 150 pacientes foram soropositivos para anticorpos IgA a β 2GPI e ≤ 1 para IgM e IgG a β 2GPI. Para as demais especificidades de aPLs, 7 (5%) foram soropositivos para IgM a-ANX, dois (1%) para IgG a-ANX, quatro (3%) para IgG aPTR, dois (1%) para IgM aPTR, apenas um ($< 1\%$) paciente foi soropositivo para IgM aCL e nenhum tinha anticorpos aPS. Cinco (8%) de 60 controles apresentaram soropositividade para IgA a β 2GPI, um (2%) para IgG a β 2GPI e cinco (8%) para IgM a β 2GPI. Foram soropositivos para IgA e IgM aCL dois (3%) controles, 3 (5%) para IgG a-ANX e 6 (10%) para IgM a-ANX. Nenhum controle foi soropositivo para aPTR e aFS. A frequência de IgA a β 2GPI não diferiu entre pacientes e controles ($P = 0,433$), porém, associou-se com história de AVC nos primeiros ($P = 0,047$). Esta associação ocorreu de forma independente do perfil lipídico dos pacientes. Estes resultados sugerem que a anticorpos IgA a β 2GPI podem ser considerados fatores de risco para ocorrência de AVC na população estudada.

Palavras-chave: aterosclerose; doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral; anticorpos antifosfolípides; anticorpos IgA a β 2GPI.

SANTOS, Taciana Pereira Sant'Ana. *Antiphospholipids antibodies in patients with cardiovascular disease from Salvador-Bahia*. 2012. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia – UFBA, Salvador, 2012.

ABSTRACT

Atherosclerosis is the main cause of cardiovascular diseases worldwide. The presence of antiphospholipid antibodies (aPLs) has been investigated in these disorders and has been associated with acute myocardial infarction and stroke. The aim of this research was to screen the seroprevalence of antiphospholipid autoantibodies in 150 (79 men and 71 women) dyslipidemic individuals that were taking statin and having risk or a previous history of cardiovascular disease. Sixty healthy individuals (30 men and 30 women) were the control group. The presence of cardiovascular risk factors was obtained through patient interview and using their medical files. Dyslipidemia was previously documented by patient levels of cholesterol, fractions LDL and HDL and triglycerides. Apolipoprotein-A, Apolipoprotein-B and C-reactive protein levels were determined by nephelometry. IgA, IgG and IgM antibodies against β 2 glycoprotein I (a β 2GPI) and cardiolipin (aCL), IgG and IgM against annexin (a-ANX), phosphatidylserine (aFS) and prothrombin (aPTR) were investigated by enzyme-linked immunosorbent assays. The mean age of patients and controls was different (60 ± 9 and 34 ± 9 years respectively; $P < 0.0001$), but it was similar in female and male patients (61 ± 10 and 59 ± 8 years, respectively; $P = 0,093$) and also in controls (33 ± 10 years and 34 ± 9 years, respectively; $P = 0,602$). The median levels of CT and LDL were different when male patients and male controls were compared ($P = 0,020$ and $P = 0,014$, respectively). Female patients had lower median level of HDL than female controls ($P = 0,004$), whereas their median levels of Apo-B were higher ($P = 0,035$). Twenty four out of 150 (16%) patients were seropositive for IgA a β 2GPI antibodies. IgM and IgG a β 2GPI and IgM aCL were rarely found ($\leq 1\%$). Four out of 150 individuals (3%) had IgG aPTR, 2 (1%) IgG a-ANX and 7 (5%) had IgM ANX. aFS antibodies were not detected in this study. In the control group, five out of 60 (8%) individuals were seropositive for IgA a β 2GPI, 5 (8%) for IgM a β 2GPI and only one subject (2%) had IgG a β 2GPI. Two of them (3%) were positive for IgA and IgM aCL, three (5%) had IgG a-ANX e six (10%) IgM a-ANX. PTR and FS antibodies were not detected in the control group. No difference was observed in the prevalence of IgA a β 2GPI between patients and controls ($P = 0,433$). IgA a β 2GPI was associated with a history of stroke in the patients ($P = 0,047$), which was not associated with the lipid profile from these individuals. These results suggest that IgA a β 2GPI antibodies are a stroke risk factor in the population studied.

Key-words: atherosclerosis; cardiovascular diseases; stroke; antiphospholipid antibodies; IgA a β 2GPI antibodies.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Esquema de formação da célula espumosa a partir do imunocomplexo anticorpo-LDLox/ β 2GPI. (A) Formação do complexo LDLox/ β 2GPI a partir da interação entre as funções carboxila e resíduos de lisina da β 2GPI com LDLox. (B) Mecanismo de formação da célula espumosa a partir da interação dos imunocomplexos formados entre anticorpo e LDLox/ β 2GPI com os receptores de Fc presentes no macrófago..... 32**
- Figura 2 – Anormalidades lipídicas individuais e combinadas nos pacientes. Metas lipídicas estabelecidas pela IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. LDL-C=colesterol de LDL; HDL-C=colesterol de HDL; TG=triglicéides. 40**
- Figura 3 – Soroprevalência de anticorpos antifosfolípides (aPLs) em pacientes e controles; aCL=anticardiolipina; a β 2GPI=anti β 2GPI; a-ANX= antianexina; aPTR=antiprotrombina; aFS=antifosfatidilserina. 41**
- Figura 4 – Associação entre história de AVC e soropositividade para IgA a β 2GPI; Teste exato de Fisher; IgA a- β 2GPI - = soronegativos para IgA anti β 2 glicoproteína I; IgA a- β 2GPI + = soropositivos para IgA anti β 2 glicoproteína I; AVC neg = pacientes sem história de AVC; AVC pos = pacientes com história clínica de AVC. 42**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características clínicas e demográficas dos pacientes.....	37
Tabela 2 – Perfil lipídico de pacientes e controles.....	38
Tabela 3 – Perfil lipídico de pacientes e controles de acordo com o gênero.....	39
Tabela 4 – Diferenças entre os títulos de anticorpos a β 2GPI e a-ANX de pacientes e controles soropositivos para ambos aPLs.....	41
Tabela 5 – Diferenças entre as medianas do perfil lipídico de pacientes soropositivos e soronegativos para IgA a β 2GPI.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a-ANX	Anticorpo antianexina
a β 2GPI	Anticorpo anti β 2 glicoproteína I
aCL	Anticorpo anticardiolipina
aFS	Anticorpo antifosfatidilserina
antiLDLox	Anticorpo antiLDL oxidada
ANXs	Anexinas
APL	Unidade Fosfolipídica de IgA
aPLs	Anticorpos antifosfolípides
Apo-A	Apolipoproteína A-1
Apo-B	Apolipoproteína B-100
aPTR	Anticorpo antiprotrombina
AVC	Acidente Vascular Cerebral
β 2GPI	β 2 glicoproteína I
B/E	Receptor Natural de LDL
CT	Colesterol Total
DAC	Doença Arterial Coronária
DAP	Doença ArterialPeriférica
DCVs	Doenças Cardiovasculares
DM	Diabete Melito
DP	Desvio-padrão
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
GPL	Unidade Fosfolipídica de IgG
HAN	Hospital Ana Nery
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HDL-C	Colesterol de HDL
HSPS	Proteínas do Choque Térmico
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio

IC	Insuficiência Cardíaca
ICAM-1	Moléculas de Adesão Intercelular 1
IFN- γ	Interferon-gama
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-1	Interleucina 1
IL-4	Interleucina 4
IL-12	Interleucina 12
IL-15	Interleucina 15
IL-18	Interleucina 18
IQR	Intervalo Interquartil
kDa	Kilodaltons
LAC	Anticoagulante Lúpico
LAPIM	Laboratório de Pesquisa em Imunologia
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LDL-C	Colesterol de LDL
LDLox	Lipoproteína de Baixa Densidade oxidada
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
MCP-1	Proteína Quimiotática para Monócitos
M-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos
MDA	Malondialdeído
MHC II	Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe II
MPL	Unidade Fosfolipídica de IgM
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Salina Tampão-fosfato
PCR	Proteína C Reativa
PLs	Fosfolipídios
PTR	Protrombina

SAF	Síndrome de Anticorpos Antifosfolípides
SAU	Unidade Padrão de IgA
TG	Triglicérides
SMU	Unidade Padrão de IgM
SGU	Unidade Padrão de IgG
SMU	Unidade Padrão de IgM
TLRs	Receptores <i>toll-like</i>
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
Treg	Linfócitos T reguladores
VCAM-1	Moléculas de Adesão Vascular 1
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 RELEVÂNCIA	17
1.2 OBJETIVOS	17
1.2.1 Objetivo Geral	17
1.2.2 Objetivos Específicos	18
1.3 HIPÓTESES	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 DOENÇAS CARDIOVASCULARES	19
2.1.1 Epidemiologia	19
2.1.2 Classificação	20
2.1.3 Etiopatogenia	20
2.2 ATEROGÊNESE	21
2.2.1 Autoimunidade e aterogênese	23
2.3 ANTÍGENOS ENVOLVIDOS NA IMUNOPATOGENIA DA ATROSCLEROSE	24
2.3.1 LDL oxidada	24
2.3.2 β2 glicoproteína I	25
2.3.4 Protrombina	27
2.4 FOSFOLÍPIDIOS E ANTICORPOS ANTIFOSFOLÍPIDES	27
2.4.1 Anticorpos antifosfolípidos na aterogênese	29
2.4.2 Complexos LDLox/β2GPI e anticorpos antiLDLox/β2GPI	30
3. PACIENTES, MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 PACIENTES	33
3.2 DETERMINAÇÕES LABORATORIAIS	33
3.2.1 Imunoensaios para detecção dos autoanticorpos	34
3.2.2 Outras determinações	35
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
4. RESULTADOS	37
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO AMOSTRAL	37
4.2 ANÁLISE DOS DADOS LABORATORIAIS	38
4.2.1 Perfil lipídico e outras determinações	38
4.2.2 Anticorpos antifosfolípidos (aPLs)	40
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÕES	51

REFERÊNCIAS	52
APÊNDICES.....	68
APÊNCIDE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	68
APÊNCIDE B – FORMULÁRIO DE PESQUISA	69

1. INTRODUÇÃO

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial, que ocorre na camada íntima de artérias de médio e grande calibre em resposta à agressão endotelial. É a principal causa das doenças cardiovasculares (DCVs), as quais constituem um grupo de entidades clínicas responsável por elevada morbimortalidade em todo mundo (BRASIL, 2009; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007).

O envolvimento dos sistemas imune inato e adaptativo na aterosclerose tem sido demonstrado por resposta imune celular e humoral para antígenos expressos no endotélio (GALKINA; LEY, 2009; PEREIRA; BORBA, 2008). Como prova disto, anticorpos dirigidos contra a lipoproteína de baixa densidade oxidada (LDLox) são encontrados na circulação sanguínea de seres humanos e também nas placas de ateroma (PALINSKI et al., 1989; SALONEN et al., 1992).

Os anticorpos antifosfolípides (aPLs), família heterogênea de imunoglobulinas que reconhecem fosfolípidios, proteínas ligadoras ou ambos associados (LEVINE; BRANCH; RAUCH, 2002), estão relacionados com uma síndrome clínica bem definida (Síndrome de Anticorpos Antifosfolípides, SAF), caracterizada principalmente por trombozes arterial e venosa, perda fetal recorrente e trombocitopenia (GEZER, 2003; WILSON et al., 1999).

Alguns grupos de pesquisa têm investigado a participação de aPLs na aterosclerose. Os anticorpos anticardiolipina (aCL) foram os primeiros a serem associados com alguns tipos de acidentes cardiovasculares como infarto agudo do miocárdio (IAM) (BILI et al., 2000; HAMSTEN, et al., 1986; MATTILA et al., 1989; VAARALA et al., 1995; WU et al., 1997; ZUCKERMAN et al., 1996) e acidente vascular cerebral (AVC) (BREY et al., 2001; TUHRIM et al., 1999). Entretanto, outros trabalhos exibiram resultados conflitantes (AHMED et al., 2000; ERKKILÄ et al., 2005; MUIR et al., 1994; PHADKE, et al., 1993; SLETNES et al., 1992).

Atualmente, sabe-se que anticorpos aPLs gerados nas doenças autoimunes e que estão relacionados aos eventos tromboembólicos são específicos contra as

proteínas plasmáticas que se ligam aos fosfolípidios. Dentre estas, a mais importante é a β 2 glicoproteína I (β 2GPI).

O papel dos anticorpos anti β 2GPI (a β 2GPI) na aterosclerose foi evidenciado pela demonstração da formação de complexos estáveis de LDLox e β 2GPI. Estes complexos interagem com imunoglobulinas que reagem cruzadamente com os mesmos, aumentando a fagocitose de LDL nos macrófagos e com subsequente formação de células espumosas (KOBAYASHI et al., 2003; MATSUURA et al., 2006; MATSUURA et al., 2010).

A população baiana, em especial a soteropolitana, cuja etnia apresenta forte afrodescendência, tem sido objeto de estudos imunológicos por nosso grupo de pesquisa (LAPIM). Tal característica está sendo correlacionada com maior expressão de manifestações clínicas de certas doenças autoimunes, com diferenças na resposta terapêutica a diversos medicamentos, bem como na importante prevalência de anticorpos IgA a β 2GPI (ATTA et al., 2008, 2010; GALRÃO et al., 2007). Ademais, a participação de outros aPLs com diferentes especificidades, antianexina (a-ANX), antifosfatidilserina (aFS) e antiprotrombina (aPTR), raramente investigados na rotina diagnóstica para doenças autoimunes, é ainda pouco documentada na aterosclerose, exigindo maiores investigações a este respeito (GHARAVI et al., 1987; MIYAKIS et al., 2006; WILSON et al., 1999).

Este estudo objetivou conhecer o envolvimento de anticorpos aPLs na aterosclerose, usando um grupo alvo de indivíduos atendidos em um centro público de referência em doenças cardiovasculares de Salvador. Assim, espera-se ao final do estudo real contribuição para o conhecimento de alguns mecanismos envolvidos nesta doença na população alvo, permitindo a adoção de novas avaliações laboratoriais no diagnóstico e seguimento dos portadores desta enfermidade. Adicionalmente, os resultados deste estudo poderão contribuir na escolha de opção terapêutica apropriada para pacientes sob risco de desenvolver doença cardiovascular e aterotrombótica, além de possibilitar novas informações sobre os mecanismos imunológicos envolvidos na imunopatogenia da aterosclerose na população estudada.

1.1 RELEVÂNCIA

As DCVs são a principal causa de morte no mundo, tendo sido responsável por 30% das mortes ocorridas em 2006 no Brasil. Por outro lado, a investigação sobre o envolvimento de anticorpos aPLs na imunopatogenia da aterosclerose poderá contribuir para elucidar vários aspectos da imunopatogenia destas doenças na população atendida no centro de referência em doença cardiovascular do Hospital Ana Nery (HAN) em Salvador, e complementar os resultados do estudo sobre citocinas e quimiocinas realizado recentemente pelo grupo de pesquisa LAPIM com a mesma população. A afrodescendência tem sido correlacionada em outros grupos populacionais pela maior expressão de manifestações clínicas de certas doenças autoimunes como o lúpus eritematoso sistêmico (LES) e a SAF, além de estar associada com diferenças na resposta terapêutica a diversos medicamentos. Em estudos recentes realizados por este mesmo grupo em portadores do vírus HIV e da hepatite C residentes na Bahia (ATTA et al., 2008 e 2010; GALRÃO et al., 2007), observou-se importante prevalência de anticorpos IgA a β 2GPI nestes indivíduos corroborando com o achado desta imunoglobulina em outras populações afrodescendentes, o que poderia estar associado com a carga genética e também com fatores ambientais. Assim, a investigação de aPLs em portadores de aterosclerose, juntamente com outros resultados que têm sido obtidos pelo grupo LAPIM sobre diferentes aspectos imunológicos da aterogênese, poderá propiciar novos conhecimentos à clínica médica local e nacional para o entendimento deste importante problema de Saúde Pública, além de auxiliar na escolha de opção terapêutica apropriada para pacientes sob risco de desenvolver doença cardiovascular e aterotrombótica.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Investigar os mecanismos envolvidos na imunopatogênese da doença cardiovascular aterosclerótica de pacientes de um centro público de referência em doença cardiovascular de Salvador-Bahia.

1.2.2 Objetivos Específicos

1. Investigar os níveis séricos de anticorpos dos isotipos IgA, IgG e IgM anti β 2GPI e anticardiolipina, IgG e IgM antianexina, antifosfatidilserina e antiprotrombina em indivíduos dislipidêmicos, usuários de estatina com diagnóstico ou risco de doença cardiovascular.
2. Associar a soropositividade e níveis destes anticorpos com os achados clínicos dos pacientes.

1.3 HIPÓTESES

O desenvolvimento deste objetivo baseou-se nas seguintes hipóteses:

H₀: Não existem diferenças entre pacientes com doença ou risco cardiovascular e controles sadios sem indicadores laboratoriais ou história clínica de doença cardiovascular quanto à prevalência de anticorpos antifosfolípidos.

H₁: Pacientes com doença ou risco cardiovascular apresentam maior soroprevalência de anticorpos antifosfolípidos em relação aos controles sadios.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇAS CARDIOVASCULARES

2.1.1 Epidemiologia

As DCVs são a principal causa de morte no mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que os 17,3 milhões de óbitos ocorridos em 2008 foram decorrentes delas, o que representou vinte e nove por cento (29%) do total de mortes desse ano. Deste percentual global, a doença arterial coronária (DAC) foi responsável por 7,3 milhões e o AVC por 6,2 milhões (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). No Brasil, em 2006, cerca de trezentas mil pessoas morreram por DCVs, praticamente trinta por cento (30%) de todos os óbitos ocorridos neste período no país (BRASIL, 2009).

Embora tenha sido observada uma redução da mortalidade por causas cardiovasculares nos últimos trinta anos nos países desenvolvidos, observa-se o contrário nos países em desenvolvimento (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). Contudo, um estudo realizado pelo Ministério da Saúde durante os anos de 1996 a 2006, revelou uma redução de 20,5% no número de óbitos decorrentes de DCVs nas regiões Sul e Sudeste, em detrimento do Nordeste, que mostrou aumento da mortalidade por estas causas. Observou-se ainda, que os jovens de 20 a 39 anos estão morrendo menos por estas doenças: para as mulheres jovens a queda anual foi de 3,6%, enquanto que para os homens foi de 3,3% (BRASIL, 2009).

Mesmo diante da redução na incidência destes acidentes em determinados locais, a projeção para 2030 é de 23,6 milhões de óbitos por DCVs. Isto reafirma a tendência de aumento e a persistência destas doenças no mundo, que pode ser justificada pela alta prevalência dos fatores de risco para as mesmas, principalmente na população ocidental, como diabetes, hipertensão arterial, tabagismo, obesidade e dislipidemias (BRASIL, 2009; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011).

2.1.2 Classificação

As DCVs constituem um grupo de desordens e má-formações congênitas que afetam o sistema circulatório. Elas são divididas em: DAC ou doença isquêmica do coração, onde estão inclusos o IAM, a angina pectoris, a insuficiência cardíaca (IC), a cardiomiopatia, a fibrilação atrial; doença cerebrovascular representada pelo AVC; as doenças de aorta e artérias como hipertensão e a doença vascular periférica (DAP); além das má-formações congênitas das artérias, doenças reumáticas do coração, cardiomiopatias e arritmias (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2009; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011).

2.1.3 Etiopatogenia

Os principais desfechos clínicos das doenças cardiovasculares como o IAM, a isquemia de membros inferiores e o AVC são atribuídos ao processo aterosclerótico (AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2003; GEORGE et al., 2000).

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre (SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2007, p. 4).

Esta se caracteriza por ser uma doença lenta e complexa que se inicia na infância e progride, silenciosamente, até a vida adulta. Para alguns indivíduos ela avança rapidamente ainda na terceira década de vida e quando há ocorrência dos eventos cardiovasculares, estes são normalmente mais graves (AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2003).

Os estudos sobre aterosclerose têm contribuído bastante para os conhecimentos acerca dos mecanismos etiopatogênicos e também das estratégias de tratamento, porém ainda há muito que se desvendar. A “hipótese lipídica” proposta por Rudolf Virchow (STEINBERG, 2006), que por muito tempo atribuiu somente aos elevados níveis de colesterol o início e a progressão da aterosclerose, tem sido substituída pela teoria da inflamação crônica e imunológica (ROSS, 1999).

A participação dos sistemas imune local e sistêmico é parte integral deste processo, onde diferentes componentes celulares e mediadores atuam na defesa e patogênese da doença (GALKINA; LEY, 2009; GROVER et al., 2006). Além disso, outros fatores de risco como radicais livres, micro-organismos patogênicos, especialmente *Chlamydia pneumoniae*, *Herpes simplex virus* e *Cytomegalovirus*, hipertensão arterial (HA), diabetes, toxinas do tabaco, dentre outros, ou a combinação destes, também contribuem para a disfunção endotelial presente nesta condição patológica (ROSS, 1981, 1999; STOLL; BENDSZUS, 2006).

2.2 ATEROGÊNESE

Nos estágios iniciais do processo aterosclerótico, em situações onde há aumento da permeabilidade vascular, partículas de lipoproteína de baixa densidade (LDL) podem penetrar no espaço subendotelial. Neste local, interagem com a matriz de proteoglicanos, diminuindo sua mobilidade e favorecendo pequenas modificações por agentes oxidantes e espécies reativas de oxigênio (BOREN et al., 1998; SKÅLÉN et al., 2002). Adicionalmente, a presença de lipoproteínas pequenas e densas no plasma contribui para o acúmulo do colesterol na íntima arterial (TABAS; WILLIAMS; BÓREN, 2007).

A LDL, agora minimamente modificada, pode ativar células endoteliais estimulando-as à secreção de quimiocinas, tal qual a proteína quimiotática para monócitos (MCP-1) e à expressão de moléculas de adesão como as moléculas de adesão vascular 1 (VCAM-1) e de adesão intercelular 1 (ICAM-1), importantes mediadores do processo inflamatório que promovem o extravasamento leucocitário para o interior da íntima (CYBULSKY; GIMBRONE, 1991; NAKASHIMA et al., 1998).

Os monócitos infiltrados diferenciam-se em macrófagos sob a presença do fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF). Estas células fagocitam a LDL apresentada sob forma não fisiológica, pois esta, depois de modificada, tem baixa afinidade pelo seu receptor natural (B/E), passando a ser reconhecida pelos receptores *scavenger* CD36 ou SR-A presentes no macrófago (FEBBRAIO et al., 2000; PODREZ et al., 2000). Estes receptores não sofrem retroalimentação negativa, ou seja, o conteúdo citoplasmático de colesterol não diminui sua captação.

Além disso, muitos ligantes como a própria LDL oxidada (LDLox), proteínas do choque térmico (hsps) e proteínas nucleares podem ativar os receptores *toll-like* (TLRs), os quais alteram os transportadores do colesterol e seu tráfego intracelular, contribuindo para o seu acúmulo no citoplasma do macrófago (EDFELDT et al., 2002; ROSS, 1981).

Sobrecarregados destas partículas lipídicas modificadas, os macrófagos transformam-se em células espumosas (*foam cells*), cujo acúmulo forma as estrias lipídicas. Células musculares lisas, provavelmente provenientes da camada média, migram ao redor deste core lipídico. Estas, por sua vez, diferenciam-se em miofibroblastos que secretam a matriz que compõe a capa fibrosa da placa aterosclerótica. Até este momento, a resposta inflamatória tenta neutralizar ou remover o “agressor”. No entanto, havendo continuidade da inflamação, ocorre o espessamento da artéria, contudo, não existe ainda alteração do diâmetro do lúmen, caracterizando uma lesão inicial e reversível (ROSS, 1981, 1999).

A persistência da inflamação amplifica a aterogênese, com aumento no número de macrófagos e linfócitos. Estes dois tipos celulares, em especial os primeiros, secretam enzimas hidrolíticas, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento que levam ao dano e posterior necrose tecidual (JONASSON et al., 1986; ROSS, 1999). Desta forma, os ciclos de deposição, migração, proliferação e morte celular caracterizam uma lesão já avançada da placa de ateroma, a qual não mais sofre remodelamento, alterando, portanto, o lúmen arterial (ROSS, 1999).

A estabilidade da placa e as complicações clínicas que dela podem surgir, eventos coronários agudos mediados por trombos, dependem do equilíbrio entre mediadores pró e anti-inflamatórios, os quais podem modular a apoptose, a produção de colágeno e o conteúdo de células musculares lisas (LIBBY, 2008). Em torno disto, nos limites da lesão e na camada adventícia, são encontrados vários tipos celulares como linfócitos T auxiliares (TCD4⁺), células dendríticas, células natural *killer* (NK), alguns poucos linfócitos TCD8⁺ citotóxicos, assim como depósitos de anticorpos, proteínas do complemento, proteína C reativa (PCR), dentre outros elementos (GROYER et al., 2006; HANSSON; HOLM; JONASSON, 1989).

Em animais usados em estudos experimentais de aterosclerose, tem sido observado que os linfócitos podem ser ativados em resposta a determinados antígenos como LDLox e antígenos microbianos, produzindo citocinas pró-

inflamatórias tais como o interferon-gama (IFN- γ), as interleucinas 1 (IL-1), 12 (IL-12), 15 (IL-15), 18 (IL-18) e o fator de necrose tumoral (TNF). Estas, principalmente o IFN- γ , têm o papel de amplificar a resposta inflamatória, contribuindo para a progressão da placa aterosclerótica (ANDERSSON; LIBBY; HANSSON, 2010; HANSSON; HOLM; JONASSON, 1989).

Embora predomine o perfil Th1, algumas células produzem citocinas do tipo Th2 como a IL-4 (FROSTEGARD et al., 1999; PEREIRA; BORBA, 2008). Acredita-se que esse balanço Th1/Th2 seja controlado por linfócitos T reguladores (Treg), os quais mantêm a tolerância imunológica. Alguns trabalhos evidenciam que a deficiência em células Treg seja uma das causas da inflamação (AIT-OUFELLA et al., 2006; MALLAT et al., 2003; SAKAGUCHI et al., 2006).

Recente trabalho realizado em nosso laboratório, demonstrou níveis aumentados das citocinas pró-inflamatórias IL-8 e TNF- α e redução da citocina imunorregulatória IL-10 em mulheres portadoras de aterosclerose, levantando a possibilidade de ocorrência de novos eventos cardiovasculares nesta população (PEREIRA, 2011).

2.2.1 Autoimunidade e aterogênese

Muitas são as condições que dão início ao processo autoimune: falhas nos mecanismos de indução de tolerância no timo; alterações na depuração de células apoptóticas; disfunção das células Treg; e deficiências dos agentes responsáveis pela sinalização celular (ROSEN, 2009; VELDHONEN, 2009). Conseqüentemente, em situações de indução de autoimunidade decorrentes do mimetismo molecular entre antígenos de patógenos e autoantígenos, há uma amplificação do sinal que foi iniciado pelo compartilhamento de epítopos, concomitante à expressão do autoantígeno envolvido e de suas propriedades adicionais, resultando uma resposta autoimune adaptativa, a qual provoca aumento na expressão antigênica e do dano celular (ROSEN, 2009).

Da mesma forma que já está documentado o envolvimento dos sistemas imune inato e adaptativo na aterosclerose, muitas evidências sugerem a existência de uma resposta celular e humoral contra antígenos expressos no endotélio (GALKINA; LEY,

2009; PEREIRA; BORBA, 2008). Como prova disto, anticorpos antilipoproteína de baixa densidade oxidada (aLDLox) são encontrados na circulação sanguínea de portadores de aterosclerose e também nas placas de ateroma (PALINSKI et al., 1989; SALONEN et al., 1992).

Embora a LDLox ou modificada seja o principal autoantígeno frequentemente implicado na imunopatogenia da aterogênese, outras moléculas também podem provocar uma resposta imune, a exemplo de antígenos microbianos e outras proteínas próprias como a β 2GPI e a protrombina (PTR) (ANDERSSON; LIBBY; HANSSON, 2010).

2.3 ANTÍGENOS ENVOLVIDOS NA IMUNOPATOGENIA DA ATEROSCLEROSE

2.3.1 LDL oxidada

A LDL é uma partícula esférica de núcleo apolar constituído de colesterol esterificado, triglicérides e antioxidantes envolvidos por uma camada anfipática de fosfolípidios, na qual está localizada a apolipoproteína B-100 (Apo-B) (SCANU; WISDOM, 1972; WITZTUM, 1994). Sua forma nativa pode sofrer uma variedade de alterações físicoquímicas através de distintos mecanismos: oxidação, glicação não enzimática, enriquecimento em ácidos graxos não esterificados, modificações enzimáticas por fosfolipases, dentre outras (SÁNCHEZ-QUESADA; BENÍTEZ; ORDÓÑEZ-LLANOS, 2004).

Não se sabe exatamente porque a geração de LDL modificada está aumentada em pacientes com DAC, mas de acordo com Yologlu e colaboradores (2005), em indivíduos dislipidêmicos, esta partícula lipoprotéica está mais propensa à oxidação. Ademais, sabendo-se que a LDL modificada apresenta menor afinidade pelo seu receptor, a depuração desta partícula está diminuída, ou seja, há um aumento do tempo de residência plasmática desta lipoproteína, favorecendo mais modificações em sua estrutura (MELLO et al., 2011).

Durante sua modificação, que se inicia nos ácidos graxos da superfície dos fosfolípidos e se propaga para o core lipídico, muitas moléculas biologicamente

ativas são geradas como o malondialdeído (MDA), o 4-hidroxinonenal e a lisofosfatidilcolina (PALINSKI et al., 1994; WITZTUM, 1994). Estes resíduos se ligam às lisinas presentes na Apo-B e agem como novos epítomos que podem ser reconhecidos pelos macrófagos e apresentados às células B para geração de anticorpos (HANSSON; HOLM; JONASSON, 1989; PALINSKI et al., 1994; SALONEN et al., 1992; WITZTUM, 1994). Fato este comprovado por Stemme e colaboradores (1995), onde cerca de dez por cento (10%) de todas as células de placas ateromatosas humanas observadas reconheciam LDLox via Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe II (MHC II).

A imunogenicidade da LDLox é comprovada também pela ocorrência de anticorpos contra epítomos específicos de LDLox no plasma humano e de animais (PALINSKI et al., 1989; SALONEN et al., 1992). No entanto, o papel destas imunoglobulinas na patogenia da aterosclerose é complexo e permanece não totalmente elucidado. Alguns trabalhos mostram uma associação positiva entre estes anticorpos e DCVs (LOPES-VIRELLA et al., 1999; SALONEN et al., 1992), enquanto outros estudos exibem resultados contraditórios, reportando a correlação entre níveis elevados de anticorpos aLDLox com redução da placa aterosclerótica (HULTHE et al., 2001; KARVONEN et al., 2003; SHOENFELD et al., 2004; WU et al., 1999).

2.3.2 β 2 glicoproteína I

Também denominada de apolipoproteína H, a β 2GPI tem 43 kilodaltons e está no plasma em uma concentração de aproximadamente 200 μ g/mL. É constituída de 326 aminoácidos dispostos em 5 domínios curtos (LOZIER; TAKAHASHI; PUTNAM, 1984; SHENG et al., 2001). Os primeiros quatro domínios contêm 60 aminoácidos cada, enquanto o quinto tem resíduos adicionais de lisina, uma extensão C-terminal com 19 aminoácidos. Estes últimos conferem à proteína uma carga positiva, o que justifica sua ligação a fosfolípidos aniônicos (BOUMA et al., 1999) e a outras moléculas carregadas negativamente como heparina, ácido desoxirribonucleico, LDLox (HASUNUMA et al., 1997; KOBAYASHI et al., 2003) e células apoptóticas (PITTONI et al., 2000).

A β 2GPI é considerada hoje um anticoagulante natural, pois inibe a atividade da protrombinase (NIMPF et al., 1986), a ativação do fator XII (SHOUSBOE; RASMUSSEN, 1995) e pode modular a agregação plaquetária dependente de adenosina difosfato (ADP) (NIMPF; WURM; KOSTNER, 1985). No entanto, também apresenta função pró-coagulante por reduzir a ativação da proteína C (MORI et al., 1996).

2.3.3 Anexinas

As anexinas (ANXs) são uma família de 12 proteínas que atuam em várias funções celulares: no tráfico vesicular, na sinalização do cálcio, na divisão e regulação do crescimento celular e apoptose (MOSS; MORGAN, 2004). Como característica comum tais proteínas apresentam ligação a fosfolipídios dependente de cálcio, cujo motivo responsável por esta afinidade está presente na porção C-terminal, e que é altamente conservado entre estas proteínas (HAYER; MOSS, 2004; IACCARINO et al., 2011; MOSS; MORGAN, 2004). As ANXs têm sido associadas com várias doenças humanas tais como o câncer, desordens cardiovasculares, diabetes, doenças inflamatórias e autoimunes (IACCARINO et al., 2011).

A distribuição das diferentes isoformas de anexinas é bastante ampla no organismo humano, a exemplo das ANXs I, II, IV, V, VI, VII e XI. Porém, algumas são mais encontradas em determinados órgãos ou tipos celulares como ANX II nos neutrófilos, V na pele e placenta. Outras são restritas, IX na língua, X no estômago e XII no intestino delgado (MOSS; MORGAN, 2004).

Algumas destas proteínas podem ser expressas na superfície celular mesmo na ausência de sinal, a exemplo da ANX I que passa do citosol à superfície após exposição celular a glicocorticóides (SOLITO; NUTI; PARENTE, 1994) e a ANX II que é constitutivamente expressa no endotélio vascular exercendo função regulatória na coagulação sanguínea (BROWNSTEIN et al., 2001).

As ANXs I, II, V, VI e VII são as isoformas mais bem estudadas quanto as suas funções biológicas através de estudos com camundongos *knockout*. Hannon e colaboradores (2003) verificaram que a ausência de ANX I ocasionou alterações na

resposta inflamatória e na ação de glicocorticóides. Ling e colegas (2004) observaram que a perda de ANX II prejudicava a neovascularização e a homeostase de fibrina. Já a ausência de ANX VII nestes animais demonstrou sua importante participação no desenvolvimento embrionário (SRIVASTAVA et al., 1999) e na homeostase de cálcio (HERR et al., 2001). Os trabalhos com as isoformas V e VI não foram conclusivos, mas acredita-se que a primeira desempenhe papel na anticoagulação, ligação do colágeno e desenvolvimento ósseo (BRACHVOGEL et al., 2003; HAWKINS et al., 1999).

2.3.4 Protrombina

Também denominada de fator II, a protrombina (PTR) é uma glicoproteína de cadeia simples de 72 kDa presente a uma concentração sérica de aproximadamente 100 µg/mL (CHOW et al., 1991). Participa da cascata de coagulação sanguínea, onde após sua conversão em trombina pelo complexo protrombinase (fator X ativado, fator V, cálcio e fosfolipídios), converte o fibrinogênio em fibrina (MANN et al., 1990). Exerce também atividade anticoagulante quando se liga à trombosmodulina presente na superfície das células endoteliais ativando a proteína C.

No fígado, a protrombina sofre γ -carboxilação dos seus resíduos de glutamato pela vitamina K, gerando resíduos de γ -carboxiglutamato, chamados domínios Gla. Estes normalmente estão envolvidos na ligação de cálcio e é essencial para a ligação da protrombina à fosfatidilserina (CHOW et al., 1991).

2.4 FOSFOLIPÍDIOS E ANTICORPOS ANTIFOSFOLÍPIDES

Os fosfolipídios (PLs), glicerofosfolipídios e esfingolipídios, são os principais constituintes das membranas biológicas. Caracterizam-se por serem macromoléculas anfipáticas, polares, constituídas por uma “cabeça” polar ligada por ponte fosfodiéster a uma “cauda” ou grupo apolar (NELSON; COX, 2007).

Os glicerofosfolipídios são os principais constituintes lipídicos das membranas celulares. Contêm em sua estrutura glicerol, ácidos graxos e um grupo fosfato

esterificado a um álcool. Os principais são a fosfatidilcolina ou lecitina, a fosfatidilserina, a fosfatidiletanolamina ou cefalina, o fosfatidilglicerol ou cardiolipina e o fosfatidilinositol, variando somente quanto ao tipo de álcool presente (NELSON; COX, 2007).

A cardiolipina, fosfatidilserina e o fosfatidilinositol são fosfolípidios aniônicos, enquanto a fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina são neutros (SCHULTZ, 1997). A ocorrência de cardiolipina é restrita à membrana mitocondrial, diferentemente de outros PLs como a fosfatidilserina e fosfatidilcolina que são amplamente distribuídos no organismo (HOUTKOOPE; VAZ, 2008).

Os anticorpos aPLs são imunoglobulinas que se caracterizam por ser uma família heterogênea de anticorpos que reconhecem PLs, proteínas ligadoras (ou cofatores - β 2GPI, anexina e protrombina), ou ambos associados (GHARAVI et al., 1987). Variam em especificidade, isotipo, subclasse, título e mecanismo de ação (GHARAVI et al., 1987; LEVINE; BRANCH; RAUCH, 2002).

Estão relacionados a um estado de hipercoagulabilidade denominado de Síndrome de Anticorpos Antifosfolípidos (SAF), que pode ser classificada em SAF primária, sem nenhuma outra evidência de doença autoimune, e SAF secundária, presente em pacientes com LES. É uma condição clínica representada por trombose venosa e/ou arterial, morbidade obstétrica recorrente e trombocitopenia (GEZER, 2003; WILSON et al., 1999). Todavia, o mecanismo exato pelo qual os anticorpos aPLs promovem trombose não está completamente elucidado.

Sabe-se atualmente que anticorpos aPLs gerados nas doenças autoimunes, e relacionados aos eventos tromboembólicos, antes considerados como aCL, são específicos contra as proteínas plasmáticas que se ligam aos fosfolípidios (MATSUURA et al., 1992). Diferentemente do que ocorre nas infecções, onde os anticorpos aPLs não são específicos. Dentre os cofatores, a β 2GPI é considerada o mais importante. Por isso, os testes comumente utilizados na rotina laboratorial para diagnóstico de SAF em doenças autoimunes investigam anticorpos aCL dependente de β 2GPI.

Os anticorpos aPLs que são específicos para β 2GPI não a reconhecem livre em solução. Ao invés disso, após sua ligação a superfícies aniônicas, ocorre uma mudança conformacional em sua estrutura que expõe epítomos crípticos, os quais são reconhecidos pelos primeiros (HASUNUMA et al., 1997; MATSUURA et al., 1994).

Segundo o Consenso Internacional para o diagnóstico de SAF, fazem parte dos critérios laboratoriais os anticorpos das classes IgG e IgM aCL, o anticoagulante lúpico (LAC) e mais recentemente, tem sido incluído os anticorpos a β 2GPI (MIYAKIS et al., 2006; WILSON et al., 1999). Embora alguns pesquisadores contestem esta Diretriz mostrando que não existem diferenças significativas na ligação entre aPLs a cardiolipina ou a outros PLs carregados negativamente (GHARAVI et al., 1987), os autores da mesma justificam esta restrição pela inexistência de padronização internacional para os métodos de detecção destes aPLs e diferentes isotipos de anticorpos como a IgA (MIYAKIS et al., 2006; WILSON et al., 1999). Além disso, mesmo sendo frequentes na população, os anticorpos aFS, antifosfatidilinositol, aPTR e anticomplexo fosfatidilserina/protrombina não são específicos para SAF e as suas associações com eventos trombóticos ainda não são conclusivas (MIYAKIS et al., 2006).

Anticorpos a-ANX I, II, V e IX também têm sido identificados em doenças reumáticas autoimunes, mas o seu papel clínico e as possíveis correlações clínicas ainda permanecem controversas. Autoanticorpos a-ANX I foram associados com LES, lúpus eritematoso cutâneo e artrite reumatóide (GOULDING et al., 1989; KRETZ et al., 2010). Anticorpos a-ANX II e V interferem na ligação da anexina com fosfolípidios de membranas contribuindo para ocorrência de trombose e perda fetal em pacientes com LES ou SAF (CESARMAN-MAUS et al., 2006; MATSUDA et al., 1994; SALLE et al., 2008). Além disso, acredita-se que a anexina II pode mediar a ligação da β 2GPI à superfície endotelial, desempenhando um papel importante na ativação destas células através dos anticorpos a β 2GPI (MA et al., 2000). No entanto, nenhuma associação definitiva foi encontrada entre estes anticorpos e características clínicas e sorológicas.

2.4.1 Anticorpos antifosfolípidos na aterogênese

As doenças autoimunes sistêmicas cursam com inflamação vascular crônica e estresse oxidativo aumentado. Pacientes com tais desordens, por sua vez, exibem elevada morbimortalidade cardiovascular, o que sugere um papel da autoimunidade na aterogênese (FROSTEGARD et al., 2005; SHERER; SHOENFELD, 2006).

Aterosclerose acelerada tem sido detectada em pacientes com doenças autoimunes mesmo na ausência de outros fatores de risco (HARRIS et al., 1983). O

primeiro relato de títulos aumentados de aPLs em indivíduos com IAM foi reportado por Hamsten e colegas (1986). Eles encontraram níveis elevados de autoanticorpos aCL em vinte e um por cento (21%) dos pacientes, os quais também apresentaram uma taxa maior de acidentes cardíacos subsequentes.

Vaarala e colaboradores (1995) verificaram em coorte prospectiva de 4081 pacientes, que a soropositividade em altos títulos para aCL era um fator de risco independente de IAM ou morte. Já em outro estudo, multicêntrico prospectivo envolvendo 1000 pacientes com SAF, foi observado que um quarto deles apresentou eventos aterotrombóticos (IAM, AVC) e um terço os desenvolveu durante a evolução da doença (CERVERA et al., 2002).

As primeiras evidências da associação entre lipoproteínas e aPLs na aterogênese vêm também dos estudos de Vaarala e colaboradores (1993) em indivíduos com LES. Foi observada importante prevalência de anticorpos aCL e 80% de positividade para anticorpos aLDLox. Observou-se ainda que estes primeiros poderiam reagir cruzadamente com LDLox inibindo a reação do anticorpo com a cardiolipina, evidenciando um possível papel destas imunoglobulinas na imunopatogenia da aterogênese.

Outros grupos continuaram buscando avaliar a participação de aPLs na aterosclerose, tendo encontrado associação de anticorpos aCL com alguns tipos de acidentes cardiovasculares como IAM (BILI et al., 2000; MATTILA et al., 1989; VAARALA et al., 1995; ZUCKERMAN et al., 1996) e AVC (BREY et al., 2001; TUHRIM et al., 1999). Entretanto, existem trabalhos com resultados conflitantes na literatura (AHMED et al., 2000; MUIR et al., 1994; SLETNES et al., 1992).

2.4.2 Complexos LDLox/ β 2GPI e anticorpos antiLDLox/ β 2GPI

Um grupo de pesquisadores demonstrou a formação de complexos entre β 2GPI e LDLox *in vitro* (KOBAYASHI et al., 2003; MATSUURA et al., 2006). Assim como George e colaboradores (1999) evidenciaram a colocalização destes dois elementos na placa aterosclerótica junto com linfócitos imunorreativos.

A β 2GPI também é imunogênica, tendo sido observado que a imunização de camundongos deficientes para receptor de LDL com β 2GPI induz o processo

aterosclerótico, enquanto a administração oral desta proteína nestes animais previne a aterosclerose (GEORGE et al., 1999; HARATS; GEORGE, 2001).

Inicialmente, a LDLox interage, *in vitro*, com a β 2GPI através de forças eletrostáticas fracas entre o grupo ω -carboxil e os resíduos de lisina presentes na segunda. Posteriormente, durante a sua permanência no plasma em pH normal, a ligação entre as duas torna-se mais estável através da formação de uma base de Schiff (Figura 1A) (MATSUURA et al., 2005).

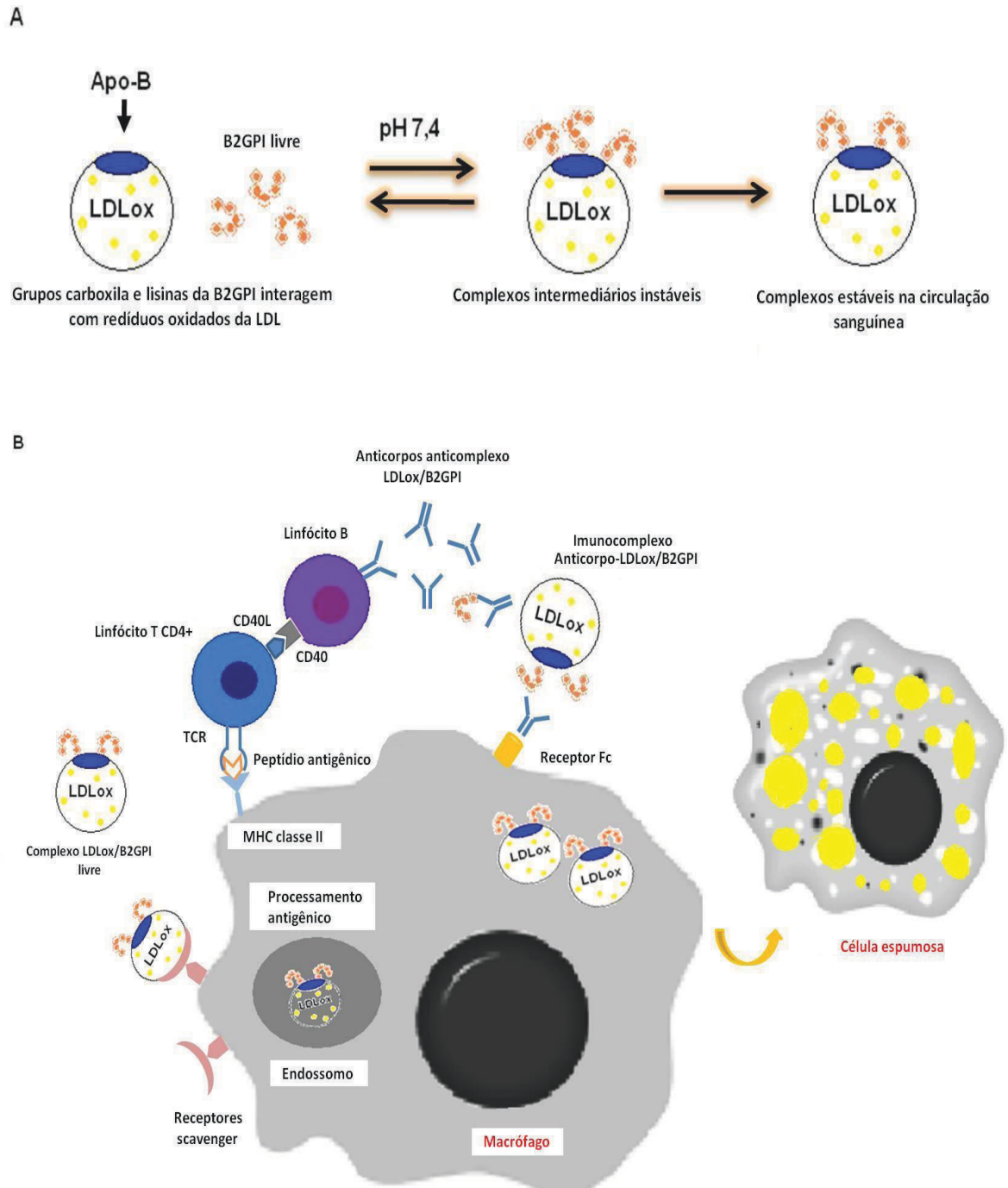
Especula-se que estes complexos estáveis de LDLox/ β 2GPI desempenhem função antioxidante por impedir as ações deletérias da lipoproteína modificada (KOBAYASHI et al., 2003; MATSUURA et al., 2010). Além disso, têm sido encontrados em portadores de doenças autoimunes (LOPEZ et al., 2005), doenças inflamatórias crônicas como no diabetes, e ainda em pacientes com IAM (HASUNUMA et al., 1997; KOBAYASHI et al., 2003).

Desta forma, a reatividade cruzada, *in vitro*, entre aPLs (VAARALA et al., 1993) e LDLox, a imunolocalização da β 2GPI na placa aterosclerótica (GEORGE et al., 1999) e a sua interação com LDLox (KOBAYASHI et al., 2003) associam fortemente os primeiros, em especial os anticorpos a β 2GPI, com a aterogênese.

Um novo mecanismo de formação de células espumosas foi proposto a partir da interação entre o complexo LDLox/ β 2GPI com imunoglobulinas que reagem contra ele, como podemos observar na Figura 1B. Estudos *in vitro* mostraram que este imunocomplexo promove a expressão de receptores *scavenger* e Fc γ nos macrófagos, contribuindo para o acúmulo de LDL intracelular e conseqüentemente, participando na progressão da placa aterosclerótica (KAJIWARA; YASUDA; MATSUURA, 2007; KOBAYASHI et al., 2001, 2007; LIU et al., 2002; YAMAGUCHI et al., 2001).

Ademais, anticorpos a β 2GPI podem promover a ligação desta proteína da coagulação a células endoteliais e contribuir para a aderência de monócitos ao endotélio através da estimulação de moléculas de adesão, selectinas, VCAM-1 e ICAM-1, favorecendo o início da aterogênese (DEL PAPA et al., 1995; SIMANTOV et al., 1995).

Figura 1 – Esquema de formação da célula espumosa a partir do imunocomplexo anticorpo-LDLox/ β 2GPI. (A) Formação do complexo LDLox/ β 2GPI a partir da interação entre as funções carboxila e resíduos de lisina da β 2GPI com LDLox. (B) Mecanismo de formação da célula espumosa a partir da interação dos imunocomplexos formados entre anticorpo e LDLox/ β 2GPI com os receptores de Fc presentes no macrófago.



Fonte: modificado de MATSUURA et al., 2010.

3. PACIENTES, MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PACIENTES

Foram selecionados 150 indivíduos maiores de 18 anos, 79 do sexo masculino e 71 do feminino, atendidos no Serviço de Cardiologia do Hospital Ana Nery (HAN) do Complexo Hospitalar Professor Edgar Santos (HUPES) da Universidade Federal da Bahia, para inscrição no programa de medicamentos de alto custo para uso de atorvastatina.

A população de estudo foi composta de indivíduos dislipidêmicos, todos usuários de sinvastatina, em transição para atorvastatina, com diagnóstico ou risco de DCV comprovada por alterações eletrocardiográficas, angiocoronariografia e/ou testes laboratoriais. A avaliação clínica dos pacientes foi realizada pela equipe médica coordenada pelo Professor Dr. Roque Aras. O grupo controle foi formado por 60 doadores sadios de banco de sangue de Salvador, 30 homens e 30 mulheres, sem indicadores laboratoriais ou história clínica de DCV.

Os dados históricos, clínicos e demográficos foram obtidos através de entrevistas e busca em prontuários médicos. As características de risco consideradas foram idade, sexo, etnia, histórico familiar de DCV, sedentarismo, hipertensão, tabagismo, DAC, DM e dislipidemia. Os critérios de exclusão foram gestantes, indivíduos portadores de doenças autoimunes sistêmicas, neoplasias e sem história de infecções bacterianas, virais e parasitárias.

Todos foram previamente informados sobre a pesquisa e tiveram sua participação confirmada após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O projeto foi aprovado 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).

3.2 DETERMINAÇÕES LABORATORIAIS

As amostras sanguíneas foram obtidas em tubo seco, sem anticoagulante, pela manhã após jejum de 12 horas. A seguir, foram centrifugadas imediatamente para

obtenção do soro e separação de alíquotas. Estas foram estocadas em freezer a -70°C para a realização de enzimaímunosaios ou utilizadas para as demais determinações bioquímicas.

3.2.1 Imunoensaios para detecção dos autoanticorpos

Os anticorpos aPLs (aCL, a β 2GPI, a-ANX, aFS e aPTR) foram determinados por *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) indireto, usando conjuntos diagnósticos comerciais (INOVA Diagnostics, Inc., San Diego, CA, USA, Quanta Lite™ Microwell ELISA; e ORGENTEC Diagnostika GmbH, Alemanha). As determinações foram realizadas em analisador automatizado BRIO® (“Basic Radim Immunoassay Operator”, Itália).

As amostras foram submetidas primeiramente a ensaios de triagem para pesquisa de anticorpos aCL e a β 2GPI e, posteriormente, apresentando valores acima dos pontos de corte (*cut-offs*) previamente estabelecidos pelos fabricantes dos reagentes (20 U/mL para aCL e 10 U/mL para a β 2GPI), foram determinados os isotipos A, G e M específicos para cada um dos antígenos. Para os anticorpos a-ANX, aPTR e aFS foram pesquisados somente os isotipos G e M.

Resumidamente, microplacas de poliestireno sensibilizadas com cardiolipina, β 2GPI, anexina V, fosfatidilserina ou protrombina foram incubadas com 100 μ L do soro do paciente diluído 1:100, por 30 minutos à 22° – 25°C. Em seguida, as microplacas foram lavadas três vezes com salina tampão fosfato (PBS) e depois incubadas com 100 μ L de anticorpo anti-IgA, IgG ou IgM humana conjugado com peroxidase durante 15 minutos. Posteriormente, seguiu-se o mesmo procedimento de lavagem para adição de 100 μ L do substrato cromogênico, peróxido de hidrogênio mais tetrametilbenzidina (TMB), por mais 15 minutos no escuro à 22° - 25°C. Por fim, foi adicionada solução de parada, ácido sulfúrico 0,344 M, e as absorvâncias lidas a 450 e 620 nm em leitora de ELISA. As concentrações dos anticorpos foram calculadas a partir da medida da intensidade de cor de padrões de concentração conhecida (curva padrão).

Os títulos de aCL e aFS foram reportados como unidades fosfolipídicas de IgA (APL), IgG (GPL) e IgM (MPL) e para anticorpos a β 2GPI, a-ANX e aPTR, os títulos

foram reportados como unidades padrão de IgA (SAU), IgG (SGU) e IgM (SMU). No ensaio de aCL foram consideradas positivas as amostras com títulos acima ou iguais a 10 APL ou GPL e 7 MPL e para aFS foram consideradas positivas as amostras acima ou iguais a 10 GPL ou MPL. Nos demais ensaios foram consideradas positivas amostras acima ou iguais a 8 SGU, SMU ou SAU para a β 2GPI, 8 SGU SMU para a-ANX e acima ou iguais a 10 SGU ou SMU para aPTR.

3.2.2 Outras determinações

O perfil lipídico foi definido pelas determinações bioquímicas de colesterol total (CT), colesterol ligado à HDL ou HDL-colesterol (HDL-C), triglicérides (TG) e do colesterol ligado à LDL ou LDL-colesterol (LDL-C). As concentrações séricas do CT, HDL-C e TG foram determinadas em analisador bioquímico automatizado LABMAX 240 (Labtest Diagnóstica S.A, Brasil).

As determinações de CT e TG foram realizadas através do método colorimétrico enzimático de Trinder, cuja reação é de ponto final. A obtenção dos níveis de HDL-C foram mensurados através da precipitação seletiva de lipoproteínas de baixa e muito baixa densidade (LDL e VLDL) com ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio. O LDL-C foi calculado pela equação de Friedewald ($LDL-C = CT - HDL-C - TG/5$), onde TG/5 representa o colesterol ligado à VLDL para concentrações de TG de até 400 mg/dL.

Os níveis séricos das apolipoproteínas A1 (Apo-A) e B-100 (Apo-B) foram determinados por imunonefelometria utilizando sistema automatizado IMMAGE[®] (Beckman Coulter, USA). Foram considerados como valores de referência para homens níveis de Apo-A de 90 a 170 mg/dL e para as mulheres de 107 a 214 mg/dL. Já os valores de Apo-B considerados normais foram para homens de 56 a 162 mg/dL e mulheres de 51 a 171 mg/dL.

Os níveis séricos da PCR foram determinados através de sistema automatizado de imunonefelometria, o IMMAGE[®] (Beckman Coulter, USA). As amostras com concentrações menores que 1 mg/L foram reavaliadas utilizando metodologia ultrassensível. Valores de PCR menores que 3 mg/L foram considerados normais.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A distribuição das variáveis contínuas foi analisada pelo teste de D'Agostino-Pearson e a depender da mesma, os resultados foram expressos em média \pm desvio-padrão (DP) ou mediana e intervalo interquartil Q1-Q3 (percentil 25% – percentil 75%). A diferença entre as medianas de dois grupos foi determinada pelo teste de Mann-Whitney e entre médias através do teste t de Student não pareado com correção de Welch. O teste exato de Fisher foi utilizado para avaliar a associação entre grupos categóricos. Foram considerados estatisticamente significativos os resultados das análises com o nível de significância de 5% ($P < 0.05$). As análises estatísticas foram realizadas com o programa Prism versão 5.0 (GraphPad Software Inc., USA).

4. RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO AMOSTRAL

Participaram deste estudo 150 pacientes (79 homens e 71 mulheres) dislipidêmicos com idade média de 60 ± 9 anos (59 ± 8 para homens e 61 ± 10 para mulheres, $P= 0,093$), variando de 30 a 85 anos e um grupo controle de 60 indivíduos cuja média de idade foi significativamente inferior a dos pacientes ($P<0,0001$), 34 ± 9 anos com idade mínima de 18 e máxima de 54 anos. No grupo controle, as médias de idade também não diferiram entre os gêneros (33 ± 10 anos para homens, 34 ± 9 anos para mulheres, $P= 0,602$).

Noventa e sete (65%) dos 150 pacientes tiveram DAC comprovada por angiocoronariografia, 53 (35%) possuíam alterações no eletrocardiograma, 13 (9%) apresentavam ecocardiograma anormal, 24 (16%) com cintilografia anormal, 25 (17%) tiveram alterações no teste ergométrico, dois (1%) foram diagnosticados através de tomografia computadorizada e ressonância magnética. Dentre os eventos cardiovasculares diagnosticados estão IAM em 64/150 (43%) dos pacientes, angina em 57/150 (38%), AVC em 21/150 (14%), insuficiência cardíaca (IC) em 10/150 (7%) e doença arterial periférica (DAP) em 7/150 (5%). As características clínicas e de risco apresentadas por esta população amostral encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Características clínicas e demográficas dos pacientes.

	Masculino (n = 79)	Feminino (n = 71)	Total (n = 150)
Idade	59 ± 8	61 ± 10	60 ± 9
Hipertensão	66 (83%)	62 (87%)	128 (85%)
Hist. familiar de DCV	50 (63%)	49 (69%)	98 (66%)
Sedentarismo	37 (47%)	36 (51%)	74 (49%)
Diabetes	24 (30%)	26 (37%)	50 (33%)
Obesidade	7 (9%)	10 (14%)	17 (11%)
Tabagismo	4 (5%)	1 (1%)	5 (3%)
Hist. tabagismo	30 (38%)	14 (20%)	44 (29%)

Idade expressa em média \pm desvio-padrão; Demais dados expressos em números de indivíduos (%); n=número de indivíduos.

4.2 ANÁLISE DOS DADOS LABORATORIAIS

4.2.1 Perfil lipídico e outras determinações

O perfil lipídico dos pacientes e controles, representado pelas medianas e intervalo interquartil (IQR) do CT e frações, TG, Apo-A e Apo-B pode ser observado na Tabela 2. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as medianas do perfil lipídico de pacientes e controles, exceto para os níveis séricos de HDL-C (40 e 45 mg/dL respectivamente; P= 0,001) e Apo-B (86 e 82 mg/dL respectivamente; P= 0,006). Quando estes dois grupos foram comparados de acordo com o gênero, observamos diferenças entre as medianas de CT e LDL-C no sexo masculino, sendo superiores nos controles, e HDL-C e Apo-B no feminino (Tabela 3). Para estes dois últimos parâmetros no gênero feminino, o grupo controle exibiu medianas de HDL-C maiores que das pacientes e inferiores para os níveis séricos de apo-B. As medianas de todos os parâmetros do perfil lipídico diferiram entre pacientes homens e mulheres, sendo superiores neste último gênero: CT (P=0,001), LDL-C (P<0,001), HDL-C (P=0,001), TG (P=0,026), Apo-A (P=0,001) e Apo-B (P=0,002).

Tabela 2 – Perfil lipídico de pacientes e controles.

	Pacientes (n=150)	Controles (n=60)	P	Valores de Referência
CT (mg/dL)	176 (137-220)	191 (157-277)	0,217	< 200
LDL-C (mg/dL)	96 (67-134)	108 (81-128)	0,399	< 160
HDL-C (mg/dL)	40 (34-51)	45 (40-59)	0,001*	≥ 50 mulheres ≥ 40 homens
TG (mg/dL)	166 (124-219)	138 (100-196)	0,100	< 150
Apo-A (mg/dL)	139 (125-161)	144 (129-169)	0,476	107-214 mulheres 90-170 homens
Apo-B (mg/dL)	86 (64-106)	82 (67-96)	0,006*	51-171 mulheres 56 -162 homens

Valores representados por mediana e IQR (percentil 25% - percentil 75%); n=número de indivíduos; CT=colesterol total; LDL-C=colesterol de LDL; HDL-C=colesterol de HDL; TG=triglicérides; Apo-A=apolipoproteína A; Apo-B=apolipoproteína B; * P<0,05.

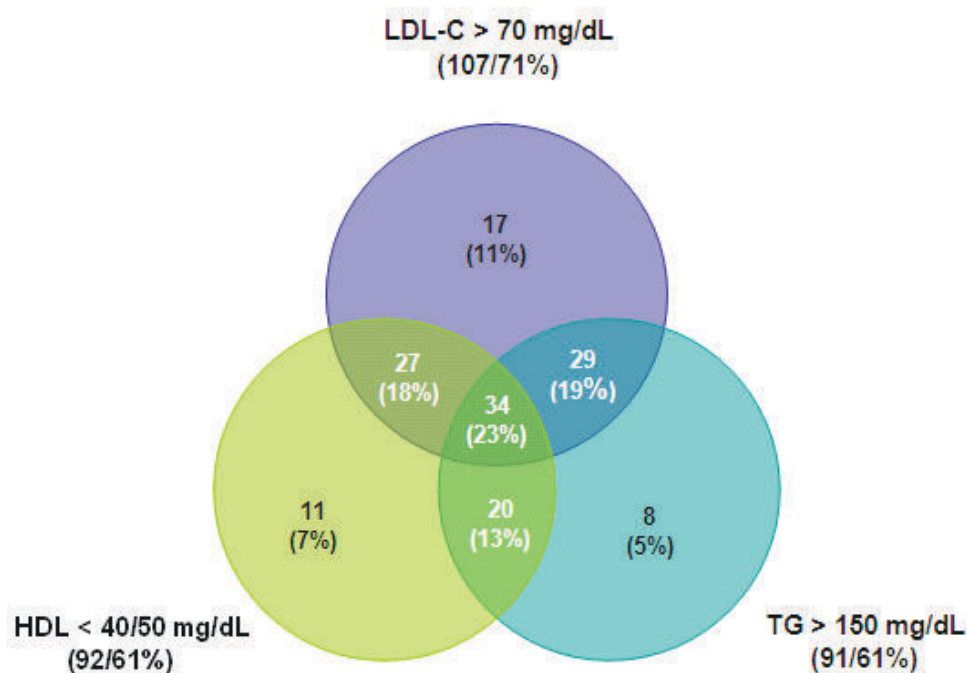
Tabela 3 – Perfil lipídico de pacientes e controles de acordo com o gênero.

	Masculino		P	Feminino		P
	Pacientes (n=79)	Controles (n=30)		Pacientes (n=71)	Controles (n=30)	
CT (mg/dL)	167 (129-191)	190 (162-212)	0,020*	193 (154-243)	196 (151-215)	0,528
LDL-C (mg/dL)	83 (58-112)	108 (84-120)	0,014*	122 (74-159)	105 (79-128)	0,191
HDL-C (mg/dL)	37 (33-44)	41 (34-49)	0,125	45 (37-55)	55 (44-64)	0,004*
TG (mg/dL)	182 (144-240)	159 (105-243)	0,500	145 (110-197)	126 (93-170)	0,066
Apo-A (mg/dL)	134 (119-152)	129 (112-145)	0,539	149 (131-165)	157 (138-173)	0,209
Apo-B (mg/dL)	77 (59-96)	75 (66-90)	0,828	94 (70-115)	82 (65-99)	0,035*

Valores representados por mediana e IQR (percentil 25% - percentil 75%); Teste de Mann-Whitney; n=número de indivíduos; CT=colesterol total; LDL-C=colesterol de LDL; HDL-C=colesterol de HDL; TG=triglicérides; Apo-A=apolipoproteína A; Apo-B=apolipoproteína B; * P < 0,05.

Considerando os valores ideais do perfil lipídico preconizado pela IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (2007), praticamente todos os pacientes (147/97%) apresentaram LDL-C > 70 mg/dL e/ou HDL-C < 40 mg/dL para homens e < 50 mg/dL para mulheres e/ou TG > 150 mg/dL. Estas anormalidades lipídicas individuais e combinadas estão mostradas na Figura 2.

Figura 2 – Anormalidades lipídicas individuais e combinadas nos pacientes. Metas lipídicas estabelecidas pela IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. LDL-C=colesterol de LDL; HDL-C=colesterol de HDL; TG=triglicéides.



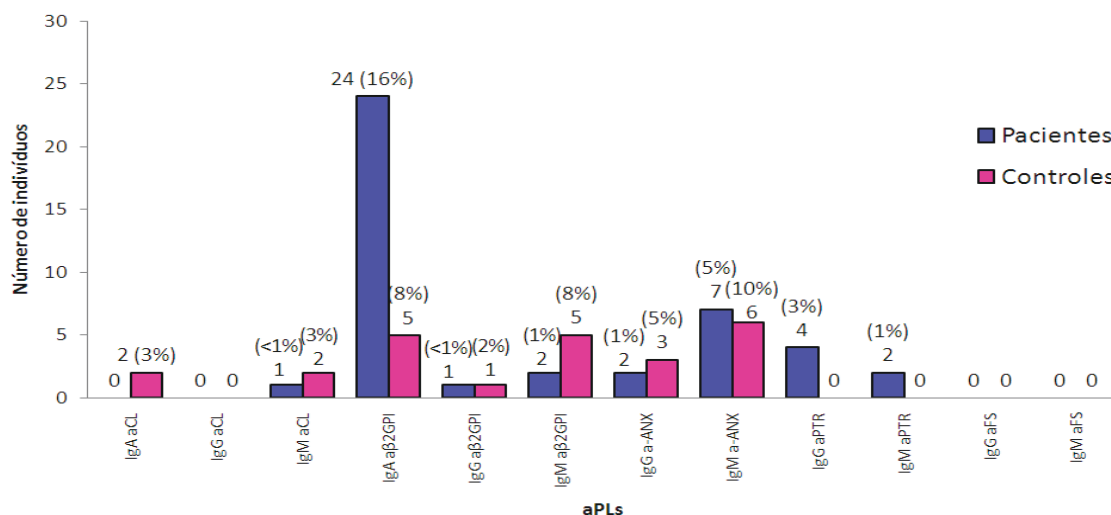
Foram também determinados os valores séricos de PCR em pacientes e controles, mas não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as duas medianas que foram, respectivamente, 3 mg/dL (IQR: 1-6 mg/dL) e 2 mg/dL (IQR: 2-4 mg/dL, $P=0,394$). Entretanto, da mesma maneira que as determinações do perfil lipídico, houve diferença entre pacientes homens (2 mg/dL, IQR: 1-5 mg/dL) e mulheres (3 mg/dL, IQR: 2-6 mg/dL), $P=0,0083$, e também entre controles (2,2 mg/dL, IQR: 1,5-3) e pacientes do sexo masculino (2,3 mg/dL, IQR: 1,1-5), $P=0,008$.

4.2.2 Anticorpos antifosfolípides (aPLs)

Nos ensaios imunoenzimáticos de determinação de aPLs, vinte e quatro (16%) dos 150 pacientes foram soropositivos para IgA $\alpha\beta 2\text{GPI}$, dois (1%) para IgM $\alpha\beta 2\text{GPI}$ e um (<1%) para IgG $\alpha\beta 2\text{GPI}$. Para os demais anticorpos, apenas um (<1%) paciente foi soropositivo para IgM αCL , dois (1%) para IgM αPTR , quatro (3%) para

IgG aPTR, dois (1%) para IgG a-ANX, sete (5%) para IgM a-ANX e nenhum tinha anticorpos aPS. A soroprevalência dos aPLs de pacientes e controles pode ser observada na Figura 3.

Figura 3 – Soroprevalência de anticorpos antifosfolípides (aPLs) em pacientes e controles; aCL=anticardiolipina; aβ2GPI=antiβ2GPI; a-ANX=antianexina; aPTR=antiprotrombina; aFS=antifosfatidilserina.



As maiores frequências de positividade foram de anticorpos aβ2GPI e a-ANX. No entanto, quando comparadas com os controles não exibiram diferenças estatisticamente significativas (Tabela 4).

Tabela 4 – Diferenças entre os títulos de anticorpos aβ2GPI e a-ANX de pacientes e controles soropositivos para ambos aPLs.

	Pacientes	Controles	P
IgA aβ2GPI	12 (10-43)	19 (14-66)	0,433 [†]
IgG a-ANX	21 ±2,5	16 ±3,5	0,365 [‡]
IgM a-ANX	10 ± 0,8	11 ± 0,7	0,705 [‡]

Valores representados por mediana e IQR (percentil 25% - percentil 75%) ou média ±desvio-padrão; [†] Teste de Mann-Whitney; [‡] Teste t de Student não pareado; aβ2GPI=anticorpo antiβ2GPI; a-ANX= anticorpo antianexina.

Não foram encontradas diferenças entre as medianas do perfil lipídico em pacientes soropositivos para IgA aβ2GPI quando comparados com pacientes soronegativos para este anticorpo (Tabela 5).

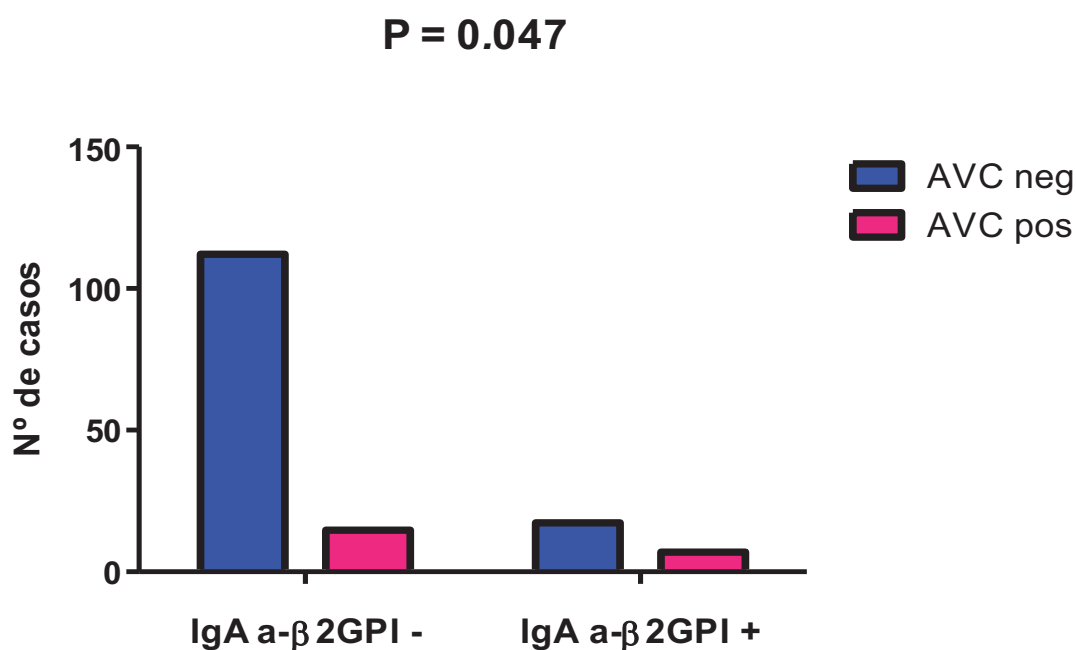
Tabela 5 – Diferenças entre as medianas do perfil lipídico de pacientes soropositivos e soronegativos para IgA aβ2GPI.

ANALITO	IgA aβ2GPI n	IgA aβ2GPI p	P
CT (mg/dL)	176 (134 – 215,3)	192 (149,5 – 193)	0,344
LDL-C (mg/dL)	92,4 (66,9 – 132)	110,8 (58,6 – 160,8)	0,481
HDL-C (mg/dL)	39,5 (33 – 49,5)	41,5 (37,2 - 54, 7)	0,119
TG (mg/dL)	164,5 (123,8 – 219)	181,5 (124,5 – 256)	0,628
APO-A (mg/dL)	137 (124 – 161,5)	148,5 (132,5 – 157)	0,216
APO-B (mg/dL)	86,5 (64,5 – 105)	82,9 (62,6 -115,5)	0,897

Valores representados por mediana e IQR (percentil 25% - percentil 75%); Teste de Mann-Whitney; IgA aβ2GPI n = soronegativos para IgA aβ2GPI; IgA aβ2GPI p = soropositivos para IgA aβ2GPI.

A avaliação da possível associação da soropositividade de anticorpos IgA aβ2GPI com as manifestações clínicas de DCVs (IAM, AVC, angina e DAP) e com fatores de risco para estas doenças apresentadas por este grupo de pacientes, revelou uma única e importante associação com história clínica de AVC nestes indivíduos (Figura 4).

Figura 4 – Associação entre história de AVC e soropositividade para IgA aβ2GPI; Teste exato de Fisher; IgA a-β2GPI - = soronegativos para IgA antiβ2 glicoproteína I; IgA a-β2GPI + = soropositivos para IgA antiβ2 glicoproteína I; AVC neg = pacientes sem história de AVC; AVC pos = pacientes com história clínica de AVC.



5. DISCUSSÃO

O presente estudo caso-controle avaliou a soropositividade de anticorpos antifosfolípidos em 150 indivíduos atendidos em um serviço público de cardiologia de Salvador, usuários de sinvastatina em transição para atorvastatina, tendo como referência 60 indivíduos controles sadios doadores de banco de sangue. Adicionalmente, investigou-se a associação entre a presença destes anticorpos com os achados clínicos dos pacientes.

A média de idade no grupo caso foi semelhante à de outros estudos, também com indivíduos sob alto risco cardiovascular, história de doença cardiovascular e usuários de estatina (GONZÁLEZ-JUANATEY et al., 2010; MOREIRA et al., 2006; ROSENDO et al., 2010). Entre pacientes e controles a média da idade foi diferente, tendo sido maior nos primeiros (60 ± 9 anos e 39 ± 9 anos, respectivamente), resultado já esperado por se tratar de doadores de sangue.

Considerando a média de idade por gênero no grupo caso, não foi encontrada diferença estatística (59 ± 8 anos para homens e 61 ± 10 anos para mulheres). No entanto, sabe-se que nos homens a aterosclerose tende a manifestar-se mais cedo, por volta dos 55 anos, e nas mulheres mais tarde, aos 65 anos, devido à proteção pelos estrógenos (GRUNDY et al., 1999).

No presente estudo, a procura pelo Centro de Referência em DCV para inscrição no Programa de Medicamentos de Alto Custo foi ligeiramente maior para o gênero masculino (79/53%) que para o feminino (71/47%), e neste último grupo a idade foi superior (61 ± 10 e 59 ± 8). Resultado semelhante foi encontrado numa população espanhola recentemente estudada (GONZÁLEZ-JUANATEY et al., 2011).

As doenças cardiovasculares são desordens de origem multifatorial, mas os fatores de risco que contribuem para a sua ocorrência são bem estabelecidos. Um trabalho de revisão sobre estudos de prevalência dos fatores de risco para hipertensão arterial verificou que as taxas de obesidade no País variaram de 7,9% a 20,8%, a prevalência geral de diabetes melito foi de 2,3% a 36,2%, a de tabagismo ficou em torno de 20% a 30% e mais de dois terços dos indivíduos das populações estudadas não praticavam atividades físicas regulares de forma adequada,

principalmente as mulheres (BLOCH; RODRIGUES; FISZMAN, 2006). Observou-se na população amostral do presente estudo uma frequência de hipertensão arterial sistêmica de 85% (128), história familiar de DCV de 66% (98), 33% (50) de diabetes melito, 11% (17) de indivíduos obesos, além de relatos de sedentarismo (74/49%) e tabagismo (5/3%).

Um estudo baseado no banco de dados do Projeto de Monitoramento das Doenças Cardiovasculares e do Diabetes Melito (MONIT) realizado em Salvador-Bahia de 1999 a 2000 mostrou uma prevalência total de HAS de 29,9%, sendo 31,7% em mulheres e 27,4% nos homens (LESSA et al., 2006). Outro trabalho avaliou a frequência de fatores de risco cardiovasculares em 160 indivíduos de uma comunidade rural da Bahia, relatando que 36,5% da população apresentaram HAS, 4% tinham diabetes e obesidade abdominal foi observada em 41,3%, sendo 57,7% em mulheres. Além disso, não foi observado alto percentual de sedentarismo, devido à frequência de atividade física de alto gasto calórico realizada por 56,5% da população (MATOS; LADEIA, 2003). Deve-se considerar, no entanto, as diferenças entre as duas populações estudadas uma urbana e a outra rural e suas características demográficas, sociais, e de risco.

No período de 2006 a 2008 em Salvador foi verificado um percentual de 9,5 a 11,5% de fumantes na população, sendo que a frequência de adultos ex-fumantes foi maior no gênero masculino (SALVADOR, 2010). O número de fumantes no presente estudo foi bastante reduzido, porém, a taxa de ex-fumantes foi elevada (44/29%), sugerindo a participação do tabagismo na etiologia das desordens cardiovasculares apresentadas por estes indivíduos.

As dislipidemias são os principais determinantes de risco cardiovascular e ao avaliar este parâmetro nestes pacientes, foi observado que os valores do perfil lipídico, exceto para TG e HDL-C, encontraram-se normais quando comparados aos valores de referência. Entretanto, a IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose (2007) preconiza para indivíduos com alto risco de desenvolver doença cardiovascular aterotrombótica e em uso de estatinas níveis séricos de LDL-C \leq 70 mg/dL. Praticamente nenhum paciente obteve os níveis ideais do perfil lipídico. Outros estudos com outras populações corroboram com este resultado, sugerindo que o tratamento desses indivíduos tem promovido a redução do colesterol a valores normais, mas os limites ideais não são alcançados de acordo

com as diretrizes estabelecidas para cada população (GONZÁLEZ-JUANATEY et al., 2011; MOREIRA et al., 2006; ROSENDO et al., 2010). Desta forma, fica claro que existem diferenças entre as recomendações das diretrizes e a prática clínica, devendo-se, pois, intensificar o cuidado aos indivíduos sob alto risco cardiovascular, baseando-se não somente na redução dos níveis de CT ou LDL-C, mas também no acompanhamento do TG e HDL-C.

Os indivíduos do grupo controle também apresentaram valores do perfil lipídico dentro dos limites referenciais, contudo, os homens deste grupo exibiram medianas de CT e LDL-C mais elevadas que pacientes deste mesmo gênero. Já para o sexo feminino, os controles apresentaram níveis mais elevados de HDL-C e menores de Apo-B. Todos os parâmetros do perfil lipídico foram diferentes entre pacientes do gênero masculino e feminino. Sabe-se que as estatinas, classe de fármacos utilizada pelos pacientes, reduzem os níveis de colesterol pela inibição da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase, responsável por sua síntese (BESTEHORN et al., 1997).

Os níveis séricos da apolipoproteína B refletem o número de partículas aterogênicas circulantes, constituindo uma importante ferramenta para avaliação de risco (FORTI; DIAMENT, 2007). Neste estudo, os pacientes apresentaram valores séricos de apo-B dentro dos limites de referência, porém, a mediana da concentração de apo-B dos pacientes (86 mg/dL) foi estatisticamente maior que a dos controles (82 mg/dL). Este fato é coerente com o perfil do grupo caso que é de risco e mesmo sob tratamento hipolipemiante apresenta maior número de partículas aterogênicas que indivíduos normais.

Entre os marcadores inflamatórios utilizados como preditores de eventos cardiovasculares em indivíduos com ou sem história de DCV estabelecida, está a proteína C reativa, um biomarcador da resposta de fase aguda produzida no fígado durante processos infecciosos ou inflamatórios (BALLANTYNE; NAMBI, 2005). No presente estudo, os pacientes não apresentaram diferenças entre as medianas dos níveis de PCR em relação aos controles (3 e 2 mg/dL, respectivamente), o que poderia ser justificado pelo uso das estatinas pelos primeiros. Esta classe de fármacos exibe, além da ação primária de redução da secreção hepática do colesterol, efeitos pleiotrópicos, cuja atividade anti-inflamatória é importante (RIBOLDI; GEROSA; MERONI, et al., 2005).

A presente investigação do perfil completo de anticorpos anti β 2GPI, anticardiolipina, antianexina, antifosfatidilserina e antiprotrombina, indicou, no geral, uma baixa frequência destas imunoglobulinas na população atendida no Centro de Referência em DCV de Salvador. Porém, uma soroprevalência isolada de títulos aumentados (24/16%) de IgA anti β 2GPI foi encontrada no grupo caso.

Anticorpos antifosfolípidos têm sido associados com eventos aterotrombóticos, principalmente com acidentes isquêmicos e a recorrência destes episódios. As primeiras evidências desta relação surgiram a partir de estudos em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, onde foram encontrados títulos aumentados de anticorpos anticardiolipina associados com trombose venosa e arterial (HARRIS et al., 1983). Trabalhos posteriores encontraram associação com acidentes isquêmicos inclusive em indivíduos sem manifestações autoimunes (BILI et al., 2000; BREY et al., 2001; HAMSTEN, et al., 1986; KLEMP et al., 1988; MATTILA et al., 1989; TUHRIM et al., 1999; VAARALA et al., 1995; WU et al., 1997; ZUCKERMAN et al., 1996). Contudo, existem resultados discordantes na literatura, onde anticorpos anticardiolipina não foram bons preditores de eventos cardíacos isquêmicos (AHMED et al., 2000; ERKKILÄ et al., 2005; PHADKE et al., 1993; SLETNES et al., 1992). No entanto, deve-se considerar que estes trabalhos adotaram diferentes desenhos de estudo e alguns deles utilizaram metodologia não padronizada internacionalmente.

Em nosso estudo, a presença de anticorpos anticardiolipina foi raramente detectada. Observou-se somente um (<1%) paciente positivo para IgM aCL, o qual também apresentou IgA, IgG e IgM a β 2GPI; dois (3%) indivíduos controles foram soropositivos para IgA aCL e o mesmo foi encontrado para IgM aCL neste grupo. Achados de outros trabalhos realizados no Brasil em diferentes grupos de doenças: IAM (RANZOLIN et al., 2004), síndrome metabólica (BORGES et al., 2003) e acidente vascular cerebral (STAUB et al., 2003), confirmaram nosso resultado. De maneira similar, a frequência de IgA, IgG e IgM aCL foi bastante baixa ou inexistente para cada um dos isotipos de anticorpos em cada estudo, não exibindo diferenças entre casos e controles.

Existem muitas evidências *in vitro* sobre a participação da β 2GPI na aterosclerose: reatividade cruzada entre anticorpos antifosfolípidos e LDLox (VAARALA et al., 1993), cuja importância na aterogênese é bem estabelecida;

imunolocalização da β 2GPI na placa aterosclerótica (GEORGE et al., 1999); formação de complexos com LDLox que podem ser fagocitados pelos macrófagos (KOBAYASHI et al., 2003). Ademais, do elenco de anticorpos antifosfolípidos importantes na associação com eventos trombóticos, os anticorpos anti β 2GPI tem sido reportado como os mais específicos para doenças autoimunes (MATSUURA et al., 1992).

Assim como para os anticorpos anticardiolipina, há muita controvérsia sobre a participação dos anticorpos anti β 2GPI nas DCVs. Brey e colaboradores (2001) avaliaram uma série de indivíduos que participavam de um estudo prospectivo sobre doenças coronarianas e AVC em americanos com descendência japonesa (*The Honolulu Heart Program*). Eles encontraram uma associação positiva entre anticorpos anticardiolipina dependentes de β 2GPI com IAM e AVC isquêmico, mas a frequência desses anticorpos foi significativa somente com história de AVC quando comparado com os controles. Outro grupo de pesquisadores encontrou uma alta prevalência de IgG anti β 2GPI em pacientes portadores de angina com ou sem história prévia de IAM (FARSI et al., 1999).

A ocorrência de IgG e IgM anti β 2GPI nos pacientes deste estudo foi mínima, somente um foi soropositivo para IgG e dois para IgM, sendo que o primeiro apresentou também positividade para os três isotipos de anticorpos anti β 2GPI e IgM aCL. Embora contradiga aos primeiros trabalhos analisados anteriormente, estes resultados foram suportados por outros estudos com população brasileira (BORGES et al., 2003; RANZOLIN et al., 2004; STAUB et al., 2003), finlandesa (VAARALA et al., 1996) e alemã (KAHLES et al., 2005).

Atualmente, anticorpos IgA anti β 2GPI têm despertado atenção de alguns pesquisadores também por sua associação com eventos trombóticos. Verificou-se elevada frequência e títulos desta imunoglobulina em portadores de LES e de SAF concomitantemente aos outros isotipos IgG e IgM (FANOPOULOS et al., 1998). O consenso internacional para diagnóstico de SAF não inclui anticorpos IgA anti- β 2GPI pela inexistência de uma padronização internacional para a determinação dos mesmos na época em que foi elaborado o documento (WILSON et al., 1999). No entanto, hoje já é possível comparar resultados de diferentes laboratórios pela disponibilidade de conjuntos diagnósticos bem validados no mercado.

A soropositividade para anticorpos antifosfolípidos nos pacientes investigados foi representada principalmente por anticorpos IgA anti β 2GPI (24/16%). Esta prevalência não se refletiu em alterações no perfil lipídico dos pacientes, ou seja, a sua participação é independente deste último. A análise da associação deste autoanticorpo com IAM, AVC, angina e doença arterial periférica, achados clínicos encontrados nestes indivíduos, guardou uma relação exclusiva com história prévia de AVC. Esta observação está de acordo com outros trabalhos sugerindo um papel dos anticorpos IgA anti β 2GPI na etiologia do AVC (KAHLES et al., 2005; STAUB et al., 2003). A possibilidade de que estes anticorpos sejam fatores de risco independentes de IAM (RANZOLIN et al., 2004), trombozes (SHEN et al., 2008), DAP (FRANCK et al., 2007) e SM (BORGES e., 2011) tem sido proposta por diferentes grupos.

A soroprevalência de IgA anti β 2GPI não diferiu de forma estatisticamente significativa entre pacientes e controles, contudo, as especificidades das imunoglobulinas encontradas nos dois grupos podem ser diferentes. Um estudo desenvolvido com dois grupos de pacientes, um com síndromes isquêmicas agudas e outro com SAF, mostrou um perfil de anticorpos antifosfolípidos bastante semelhante ao nosso, representado por pacientes soronegativos para anticorpos anticardiolipina e elevada positividade para anticorpos IgA anti β 2GPI. A investigação do domínio da β 2GPI reconhecido pelos anticorpos demonstrou que se tratava de diferentes regiões na molécula da proteína: o domínio 4 era responsável pela especificidade dos anticorpos IgA anti β 2GPI nos indivíduos com desordens ateroscleróticas e o domínio 1 nos pacientes com SAF (IVERSON et al., 2006).

Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa em portadores do vírus HIV (GALRÃO et al., 2007) e hepatite C na Bahia (ATTA et al., 2008 e 2010), mostraram também importante prevalência de anticorpos IgA anti β 2GPI, de forma semelhante ao relato de outro trabalho envolvendo americanos portadores de LES com descendência africana (CUCURULL et al., 1999). A afrodescendência desses indivíduos tem sido associada com determinadas características clínicas destas doenças e na resposta terapêutica a diversos medicamentos. Deste modo, tem sido sugerido que a imunoglobulina IgA desempenhe outros papéis que não somente de proteção contra agentes infecciosos nas mucosas, mas também de importância na imunopatogenia de eventos ateroscleróticos.

A hipótese da participação dos anticorpos IgA a β 2GPI na patogênese da aterosclerose, além de ser sugerida pelo número considerável de estudos caso-controle envolvendo um número significativo de indivíduos, pode ser explicada pelo mecanismo de formação de célula espumosa a partir do imunocomplexo formado pela imunoglobulina e o complexo LDLox/ β 2GPI. Este último, após ser reconhecido pelos receptores *scavenger* nos macrófagos, podem ser apresentados seus epítopos para linfócitos T, que por sua vez promovem uma resposta humoral específica através da participação de linfócitos B para produção de autoanticorpos antiLDLox/ β 2GPI (MATSUURA et al., 2010). Segundo Shen (1992), receptores para IgA na superfície de fagócitos poderiam capturar complexos de IgA antiLDLox/ β 2GPI e causar a formação das células espumosas.

No grupo dos anticorpos antifosfolípidos pouco investigados nas DCVs estão os anticorpos antianexina, antifosfatidilserina e antiprotrombina. A frequência destas imunoglobulinas foi baixa neste estudo, observando-se que somente dois pacientes foram soropositivos para IgM antiprotrombina (1%), quatro para anticorpos IgG contra esta mesma proteína (3%), dois para anticorpos IgG antianexina (1%) e sete para anticorpos IgM com esta especificidade (5%). Anticorpos antifosfatidilserina não foram encontrados neste estudo.

Títulos elevados de anticorpos antiprotrombina têm sido implicados com o risco de trombose venosa profunda, embolia pulmonar e IAM em homens de meia-idade (PALOSUO et al., 1997; VAARALA et al., 1996). Anticorpos a-anexina têm emergido como novos marcadores de doenças autoimunes, independente da presença de anticorpos anticardiolipina e anti β 2GPI. Acredita-se que anticorpos a-ANX II e V interferem na ligação da anexina com fosfolípidios de membrana contribuindo para ocorrência de trombose e perda fetal em pacientes com LES ou SAF (KRETZ et al., 2010; SALLE et al., 2008). Alguns poucos trabalhos têm sugerido a associação dos anticorpos antifosfatidilserina com AVC e IAM, a maioria em portadores de LES (KAHLES et al., 2005; OKUMA; KITAGAWA; TAKAGI, 2010). No entanto, estes estudos não são conclusivos quanto à participação destes anticorpos antifosfolípidos com os eventos aterotrombóticos, necessitando de maiores investigações em indivíduos sem evidência de autoimunidade.

A observação de que os anticorpos IgA anti β 2GPI podem ser prováveis fatores de risco para trombose deve ser comprovada. Para isto, outras etapas devem ser

realizadas: caracterização da especificidade do anticorpo, qual domínio da β 2GPI é o alvo em pacientes e controles; e a realização de análises prospectivas através do acompanhamento do título de antifosfolípidos em pacientes no momento e após o evento aterotrombótico. Tendo em vista o desenho do estudo, corte transversal, os resultados aqui apresentados são significativos e podem contribuir para o melhor entendimento da imunopatogenia da aterogênese e alguns eventos clínicos importantes associados à aterosclerose.

6. CONCLUSÕES

Uma baixa prevalência de anticorpos antifosfolípidos pode ser observada na população atendida no Centro de Referência em DCV de Salvador-Bahia para inscrição no Programa de Medicamentos de Alto Custo.

Anticorpos antifosfolípidos com especificidade para cardiolipina, anexina, fosfatidilserina e protrombina não são fatores de risco para ocorrência de eventos aterotrombóticos em indivíduos sem evidências de doença autoimune na população estudada. No entanto, uma importante soroprevalência de IgA anti β 2 glicoproteína I foi encontrada, a qual se associou unicamente com história prévia de acidente vascular cerebral nestes pacientes.

Anticorpos IgA anti β 2GPI representam um fator de risco para ocorrência de acidentes aterotrombóticos em indivíduos usuários de estatina, com história de DCV e presença de outros fatores de risco para estas doenças. Este achado é corroborado por outros estudos em populações distintas e de mesma origem, o que chama atenção para a importância da etnia na prevalência, isotipo e significância clínica de anticorpos antifosfolípidos.

REFERÊNCIAS

AHMED, E.; STEGMAYR, B.; TRIFUNOVIC, J.; WEINEHALL, L.; HALLMANS, G.; LEFVERT, A. K. Anticardiolipin antibodies are not an independent risk factor for stroke: an incident case-referent study nested within the MONICA and Västerbotten cohort project. *Stroke*, v.31, n. 6, p. 1289-1293, 2000.

AIT-OUFELLA, H.; SALOMON, B. L.; POTTEAUX, S.; ROBERTSON, A. K.; GOURDY, P. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nature Medicine*, v. 12, p. 178–80, 2006.

AMERICAN HEART ASSOCIATION (A.H.A.). *Heart and stroke facts*. 1992–2003. Disponível em: <http://www.americanheart.org/download/heart>. Acesso em 11/01/2011.

ANDERSSON, J.; LIBBY, P.; HANSSON, G. K. Adaptative immunity and atherosclerosis. *Clinical Immunology*, v. 134, p. 33-46, 2010.

ATTA, A. M.; ESTEVAM, P.; PARANÁ, R.; PEREIRA, C. M.; LEITE, B. C.; SOUSA-ATTA, M. L. Antiphospholipid antibodies in Brazilian hepatitis C virus carriers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 41, p. 489-492, 2008.

ATTA, A. M.; OLIVEIRA, I. S.; SOUSA, G. M.; PARANÁ, R.; ATTA, M. L. Serum cytokine profile in hepatitis C virus carriers presenting cryoglobulinaemia and non-organ-specific autoantibodies. *Microbial pathogenesis*, v. 48, p. 53-56, 2010.

BALLANTYNE, C. M.; NAMBI, V. Markers of inflammation and their clinical significance. *Atherosclerosis Supplements*, v. 6, p. 21-29, 2005.

BESTEHORN, H. P.; RENSING, U. F.; ROSKAMM, H.; BETZ, P.; BENESCH, L.; SCHEMEITAT, K.; BLÜMCHEN, G.; CLAUS, J.; MATHES, P.; KAPPENBERGER, L.; WIELAND, H.; NEISS, A. The effect of simvastatin on progression of coronary artery disease. The Multicenter coronary Intervention Study (CIS). *European Heart Journal*, v.18, n. 2, p. 226-234, 1997.

BILI, A.; MOSS, A. J.; FRANCIS, C. W.; ZAREBA, W.; WATELET, L. F. M.; SANZ, I. Anticardiolipin antibodies and recurrent coronary events: a prospective study of 1150 patients. *Circulation*, v. 102, p. 1258-1263, 2000.

BLOCH, K. V.; RODRIGUES, C. S.; FISZMAN, R. Epidemiologia dos fatores de risco para hipertensão arterial – uma revisão crítica da literatura brasileira. *Revista Brasileira de Hipertensão*, v.13, n. 2, p. 134-143, 2006.

BOREN J.; OLIN, K.; LEE, I.; CHAIT, A.; WIGHT, T. N.; INNERARITY, T. L. Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 101, p.2658–2664, 1998.

BORGES, R. B. K.; BODANESE, L. C.; von MÜHLEN, C. A.; REPETTO, G.; VIEHE, M.; NORMAN, G. L.; STAUB, H. L. Autoanticorpos Anti- β 2-glicoproteína I e Síndrome Metabólica. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 96, n. 4, p. 272-276, 2011.

BOUMA, B.; de GROOT, P. G.; van den ELSEN, J. M.; RAVELLI, R. B.; SCHOUTEN, A.; SIMMELINK, M. J.; DERKSEN, R. H.; KROON, J.; GROS, P. Adhesion mechanism of human beta(2)-glycoprotein I to phospholipids based on its crystal structure. *EMBO Journal*, v. 18, n. 19, p. 5166-5174, 1999.

BRACHVOGEL, B.; DIKSCHAS, J.; MOCH, H.; WELZEL, H.; VON DER MARK, K.; HOFMANN, C.; POSCHL, E. Annexin A5 is not essential for skeletal development. *Molecular and Cellular Biology*, v. 23, p. 2907-2913, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Ciência e Tecnologia. *ELSA Brasil / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Ciência e Tecnologia*. Brasília: Ministério da Saúde, 2007.

BRASIL, Ministério da Saúde. *Mortes por doenças cardiovasculares caem 20,5% no Brasil*. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id_area=124&CO_NOTICIA=10817. Acesso em 11/01/2011.

BREY, R. L.; ABBOTT, R. D.; CURB, J. D.; SHARP, D. S.; ROSS, G. W.; STALLWORTH, C. L.; KITTNER, S. J. β 2-Glycoprotein 1-Dependent Anticardiolipin Antibodies and Risk of Ischemic Stroke and Myocardial Infarction: The Honolulu Heart Program. *Stroke*, v.32, p. 1701-1706, 2001.

BROWNSTEIN, C.; FALCONE, D. J.; JACOVINA, A.; HAJJAR, K. A. A mediator of cell surface-specific plasmin generation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 947, p.143-155, 2001.

CERVATO, A. M.; MAZZILLI, R. N.; MARTINS, I. S.; MARUCC, M. F. N. Dieta habitual e fatores de risco para doenças cardiovasculares. *Revista de Saúde Pública*, v.31, n.3, p. 227-235, 1997.

CERVERA, R.; PIETTE, J. C.; FONT, J., KHAMASHTA, M. A.; SHOENFELD, Y.; CAMPS, M. T.; et al. Antiphospholipid syndrome. Clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis & Rheumatism*, v. 46, p. 1019–1027, 2002.

CESARMAN-MAUS, G.; RIOS-LUNA, N. P.; DEORA, A. B.; HUANG, B.; VILLA, R.; CRAVIOTO, M. D. C.; ALARCÓN-SEGOVIA, D.; SÁNCHEZ-GUERRERO, J.; HAJJAR, K. A. Autoantibodies against the fibrinolytic receptor, annexin 2, in antiphospholipid syndrome. *Blood*, v. 107, p. 4375–82, 2006.

CHOW, B. K.; TING, V.; TUFARO, F.; MACGILLIVRAY, R. T. A. Characterization of a novel liver-specific enhancer in the human prothrombin gene. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 266, p. 18927– 18933, 1991.

CUCURULL, E.; GHARAVI, A. E.; DIRI, E.; MENDEZ, E.; KAPOOR, D.; ESPINOZA, L. R. IgA anticardiolipin and anti-beta2-glycoprotein I are the most prevalent isotypes in African American patients with systemic lupus erythematosus. *The American Journal of the Medical Sciences*, v. 8, n. 1, p. 55-60, 1999.

CYBULSKY, M. A.; GIMBRONE, J. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*, v. 251, p. 788-791, 1991.

DEL PAPA, N.; GUIDALI, L.; SPATOLA, L.; BONARA, P.; BORGHI, M. O.; TINCANI, A.; BALESTRIERI, G.; MERONI, P. L. Relationship between anti-phospholipid and anti-endothelial cell antibodies III: beta 2 glycoprotein I mediates the antibody binding to endothelial membranes and induces the expression of adhesion molecules. *Clinical and Experimental Rheumatology*, v. 13, n. 2, p.179-85, 1995.

EDFELDT, K.; SWEDENBORG, J.; HANSSON, G. K.; YAN, Z. Q. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation*. v. 105, n. 10, p. 1158-1161, 2002.

ERKKILÄ, A. T.; NÄRVÄNEN, O.; LEHTO, S.; UUSITUPA, M. I. J.; YLÄ-HERTTUALA, S. Antibodies against oxidized LDL and cardiolipin and mortality in patients with coronary heart disease. *Atherosclerosis*, v. 183, p. 157–162, 2005.

FANOPOULOS, D.; TEODORESCU, M. R.; VARGA, J.; TEODORESCU, M. High frequency of abnormal levels of IgA anti-beta2-glycoprotein I antibodies in patients with systemic lupus erythematosus: relationship with antiphospholipid syndrome. *Journal of Rheumatology*, v. 25, n. 4, p. 675-680, 1998.

FARSI, A.; DOMENEGHETTI, M. P.; FEDI, S.; CAPANNI, M.; GIUSTI, B.; MARCUCCI, R.; GIURLANI, L.; PRISCO, D.; PASSALEVA, A.; GENSINI, G. F.; ABBATE, R. High prevalence of anti-beta2GPI antibodies in patients with ischemic heart disease. *Autoimmunity*, v. 30, p. 93-98, 1999.

FORTI, N.; DIAMENT, J. Apolipoproteínas B e A-1: fatores de risco cardiovascular? *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 53, n.3, p. 276-282, 2007.

FEBBRAIO, M.; PODREZ, E. A.; SMITH, J. D.; HAJJAR, D. P.; HAZEN, S. L.; HOFF, H. F.; SHARMA, K.; SILVERTEIN, R. L. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 105, n. 8, p. 1049-1056, 2000.

FRANCK, M.; STAUB, H. L.; PETRACCO, J. B.; NORMAN, G. L.; LASSEN, A. J.; SCHIAVO, N.; BORGES, R. B.; von MÜHLEN, C. A. Autoantibodies to the atheroma component beta2-glycoprotein I and risk of symptomatic peripheral artery disease. *Angiology*, v. 58, n. 3, p. 295-302, 2007.

FROSTEGARD, J.; SVENUNGSSON, E.; WU, R.; GUNNARSSON, I.; LUNDBERG, I. E.; KLARESKOG, L.; HÖRKKÖ, S.; WITZTUM, J. L. Lipid peroxidation is enhanced in patients with systemic lupus erythematosus and is associated with arterial and renal disease manifestations. *Arthritis and Rheumatism*, v. 52, p. 192–200, 2005.

FROSTEGARD, J.; ULFGREN, A. K.; NYBERG, P.; HEDIN, U.; SWEDENBORG, J.; ANDERSSON, U.; HANSSON, G. K. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis*, v.145, p. 33–43, 1999.

GALKINA, E.; LEY, K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. *Annual Review of Immunology*, v. 27, p. 165-197, 2009.

GALRÃO, L.; BRITES, C.; ATTA, M.; L.; ATTA, A.; LIMA, I.; GONZALEZ, F.; MAGALHÃES, F.; SANTIAGO, M. Antiphospholipid antibodies in HIV-positive patients. *Clinical Rheumatology*, v. 26, p.1825-1830, 2007.

GEORGE, J.; AFEK, A.; GILBURD, B.; HARATS, D.; SHOENFELD, Y. Autoimmunity in atherosclerosis: lessons from experimental models. *Lupus*, v. 9, p. 223-227, 2000.

GEORGE, J.; HARATS, D.; GILBURD, B.; AFEK, A.; LEVY, Y.; SCHNEIDERMAN, J.; BARSHACK, I.; KOPOLOVIC, J.; SHOENFELD, Y. Immunolocalization of β 2-glycoprotein I (apolipoprotein H) to human atherosclerotic plaques: potential implications for lesion progression. *Circulation*, v. 99, p. 2227–2230, 1999.

GEZER, S. Antiphospholipid syndrome. *Disease a Month*, v. 49, n. 12, p. 691-742, 2003.

GHARAVI, A. E; HARRIS, E. N.; ASHERSON, R. A.; HUGHES, G. R. Anticardiolipin antibodies: isotype distribution and phospholipid specificity. *Annals of the Rheumatic Diseases*, v.46, n. 1, p. 1-6, 1987.

GONZÁLEZ-JUANATEY, J. R.; MILLÁN, J.; ALEGRÍA, E.; GUIJARRO, C.; LOZANO, J. V.; VITALE, G. C. Prevalence and characteristics of lipid abnormalities in patients treated with statins in primary and secondary prevention in Spain. DYSIS-Spain Study. *Revista Espanhola de Cardiologia*, v.64, n. 4, p. 286–294, 2011.

GOULDING, N. J.; PODGORSKI, M. R.; HALL, N. D.; FLOWER, R. J.; BROWNING, J. L.; PEPINSKY, R. B.; MADDISON, P. J. Autoantibodies to recombinant lipocortin-1 in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Annals of the rheumatic diseases*, v.48, p.843–50, 1989.

GROYER, E.; CALIGIURI, G.; LASCHET-KHALLOU, J.; NICOLETTI, A. Immunologic aspects of atheroma. *Le Presse Médicale*, v. 35, p. 475-486, 2006.

GRUNDY, S. M.; PASTERNAK, R.; GREENLAND, P.; JR SMITH, S.; FUSTER, V. Assessment of cardiovascular risk by use of multiplier-risk-factor assessment equations: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. *Circulation*, v. 100, p. 1481-1492, 1999.

HAMSTEN, A.; NORBERG, R.; BJORKHOLM, M.; DE FAIRE, U.; HOLM, G. Antibodies to cardiolipin in young survivors of myocardial infarction: an association with recurrent cardiovascular events. *Lancet*, v. 1, p. 113-116, 1986.

HANNON, R.; CROXTALL, J. D.; GETTING, S. J.; ROVIEZZO, F.; YONA, S.; PAUL-CLARK, M. J.; GAVINS, F. N.; PERRETTI, M.; MORRIS, J. F. BUCKINGHAM, J. C.;

FLOWER, R. J. Aberrant inflammation and resistance to glucocorticoids in annexin 1-/- mouse. *The FASEB Journal*, v. 17, p. 253-255, 2003.

HANSSON, G.K.; HOLM, J.; JONASSON, L. Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. *American Journal of Pathology*, v. 135, p. 169–175, 1989.

HARATS, D.; GEORGE, J. B2GPI and atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology*, v. 12, p. 543-546, 2001.

HARRIS, E. N.; GHARAVI, A. E.; BOEY, M. L.; PATEL, B. M.; MACKWORTH-YOUNG, C. G.; LOIZOU, S.; HUGHES, G. R. Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet*, v. 2, n. 8361, p. 1211-1214, 1983.

HASUNUMA, Y.; MATSUURA, E.; MAKITA, Z.; KATAHIRA, T.; NISHI, S.; KOIKE, T. Involvement of beta 2-glycoprotein I and anticardiolipin antibodies in oxidatively modified low-density lipoprotein uptake by macrophages. *Clinical & Experimental Immunology*, v.107, n. 3, p. 569-573, 1997.

HAYER, M. J.; MOSS, S. E. Annexins and disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 322, p. 1166-1770, 2004.

HAWKINS, T. E.; ROES, J.; REES, D.; MONKHOUSE, J.; MOSS, S. E. Immunological development and cardiovascular function are normal in annexin VI null mutant mice. *Molecular and Cellular Biology*, v. 19, p. 8028-8032, 1999.

HERR, C.; SMYTH, N.; ULLRICH, S.; YUN, F.; SASSE, P.; HESCHELER, J.; FLEISCHMANN, B.; et al. Loss of annexin A7 leads to alterations in frequency-induced shortening of isolated murine cardiomyocytes. *Molecular and Cellular Biology*, v. 21, p. 4119-4128, 2001.

HOUTKOOOPER, R. H.; VAZ, F. M. Cardiolipin, the heart of mitochondrial metabolism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 65, p. 2493 – 2506, 2008.

IACCARINO, L.; GHIRARDELLO, A.; CANOVA, M.; ZEN, M.; BETTIO, S.; NALOTTO, L.; PUNZI, L.; DORIA, A. Anti-annexins autoantibodies: their role as biomarkers of autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*, v. 10, p. 553–558, 2011.

IVERSON, G. M.; von MÜHLEN, C. A.; STAUB, H. L.; LASSEN, A. J.; BINDER, W.; NORMAN, G. L. Patients with atherosclerotic syndrome, negative in anti-cardiolipin assays, make IgA autoantibodies that preferentially target domain 4 of β 2GPI. *Journal of Autoimmunity*, v. 27, p. 266-271, 2006.

JONASSON, L.; HOLM, J.; SKALLI, O.; BONDJERS, G.; HANSSON, G. K. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis*, v. 6, n. 2, p. 131-138, 1986.

KAJIWARA, T.; YASUDA, T.; MATSUURA, E. Intracellular trafficking of b2-glycoprotein I complexes with lipid vesicles in macrophages: Implications on the development of antiphospholipid syndrome. *Journal of Autoimmunity*, v. 29, p. 164-173, 2007.

KAHLES, T.; HUMPICH, M.; STEINMETZ, H.; SITZER, M.; LINDHOFF-LAST, E. Phosphatidylserine IgG and beta-2-glycoprotein I IgA antibodies may be a risk factor for ischaemic stroke. *Rheumatology*, v.44, p. 1161–1165, 2005.

KLEMP, P.; COOPER, R. C.; STRAUSS, F. J.; JORDAAN, E. R.; PRZYBOJEWSKI, J. Z. Anticardiolipin antibodies and ischaemic heart disease. *Clinical of Experimental Immunology*, v. 74, p. 254 –257, 1988.

KOBAYASHI, K.; KISHI, M.; ATSUMI, T.; BERTOLACCINI, M. L.; MAKINO, H.; SAKAIRI, N.; et al. Circulating oxidized LDL forms complexes with beta2-glycoprotein I: implication as an atherogenic autoantigen. *Journal of Lipid Research*, v. 44, n. 4, p. 716-726, 2003.

KOBAYASHI, K.; MATSUURA, E.; LIU, Q.; FURUKAWA, J. I.; KAIHARA, K.; INAGAKI, J.; ATSUMI, T.; SAKAIRI, N.; YASUDA, T.; VOELKER, D. R.; KOIKE, T. A specific ligand for b2-glycoprotein I mediates autoantibody-dependent uptake of oxidized low density lipoprotein by macrophages. *Journal of Lipid Research*, v. 42, p. 697–709, 2001.

KOBAYASHI, K.; TADA, K.; ITABE, H.; UENO, T.; LIU, P. H.; TSUTSUMI, A.; KUWANA, M.; YASUDA, T.; SHOENFELD, Y.; DE GROOT, P. G.; MATSUURA, E. Distinguished effects of antiphospholipid antibodies and antioxidantized LDL antibodies on oxidized LDL uptake by macrophages. *Lupus*, v. 16, n. 12, p. 929-938, 2007.

KRETZ, C. C.; NORPO, M.; ABELER-DÖRNER, L.; LINKE, B.; HAUST, M.; EDLER, L.; KRAMMER, P. H.; KUHN, A. Anti-annexin 1 antibodies. A new diagnostic marker in the serum of patients with discoid lupus erythematosus. *Experimental Dermatology*, v.19, p.919–21, 2010.

LESSA, I.; MAGALHÃES, L.; ARAÚJO, M. J.; FILHO ALMEIDA, N.; AQUINO, E.; OLIVEIRA, M. M. C. Hipertensão arterial na população adulta de Salvador (BA) - Brasil. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 87, n.6, p. 747-756, 2006.

LEVINE, J. S.; BRANCH, D. W.; RAUCH, J. The antiphospholipid syndrome. *The New England Journal of Medicine*, v. 346, n. 10, p. 752-763, 2002.

LIBBY, P. The molecular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis. *Journal of Internal Medicine*, v. 263, n.5, p. 517–527, mai.-2008.

LING, Q.; JACOVINA, A. T.; DEORA, A.; FEBBRAIO, M.; SIMANTOV, R.; SILVERSTEIN, R. L.; HEMPSTEAD, B.; MARK, W. H.; HAJJAR, K. A. Annexin II regulates fibrin homeostasis and neoangiogenesis *in vivo*. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 113, p. 38-48, 2004.

LIU, Q.; KOBAYASHI, K.; INAGAKI, J.; FURUKAWA, J. I.; SAKAIRI, N.; IWADO, A.; YASUDA, T.; KOIKE, T.; VOELKER, D. R.; MATSUURA, E. ω -carboxyl variants of 7-ketocholesteryl esters are ligands for b2-glycoprotein I and mediate antibody-dependent uptake of oxidized LDL by macrophages. *Journal of Lipid Research*, v. 43, p. 1486–1495, 2002.

LOPEZ, L. R.; SIMPSON, D. F.; HURLEY, B. L.; MATSUURA, E. OxLDL/b2GPI complexes and autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus, systemic sclerosis and antiphospholipid syndrome. Pathogenic implications for vascular involvement. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1051, p. 313–322, 2005.

LOZIER, J.; TAKAHASHI, N.; PUTNAM, F. W. Complete amino acid sequence of human plasma beta 2-glycoprotein I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 81, n. 12, p. 3640-3644, 1984.

MA, K.; SIMANTOV, R.; ZHANG, J. C.; SILVERSTEIN, R.; HAJJAR, K. A.; MCCRAE, K. R. High affinity binding of β 2-glycoprotein I to human endothelial cells is mediated by annexin II. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 275, p.15541–15548, 2000.

MALLAT, Z.; GOJOVA, A.; BRUN, V.; ESPOSITO, B.; FOURNIER, N. Induction of a regulatory T cell type 1 response reduces the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation*, v. 108, p. 1232–37, 2003.

MANN, K. G.; NESHEIM, M. E.; CHURCH, W. R.; HALEY, P.; KRISHNASWAMY, S. Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Blood*, v. 76, p. 1–16, 1990.

MATOS, A. C.; LADEIA, A. M. Avaliação de fatores de risco cardiovascular em uma comunidade rural da Bahia. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 81, n. 3, p. 291–296, 2003.

MATSUDA, J.; GOTOH, M.; SAITOH, N.; GOHCH, K.; TSUKMOTO, M.; YAMAMOTO, T. Anti-annexin V antibodies sera of patients with habitual foetal loss or preeclampsia. *Thrombosis Research*, v.75, p.105–6, 1994.

MATSUURA, E.; IGARASHI, Y.; FUJIMOTO, M.; ICHIKAWA, K.; SUZUKI, T.; SUMIDA, T.; YASUDA, T.; KOIKE, T. Heterogeneity of anticardiolipin antibodies defined by the anticardiolipin cofactor. *Journal of Immunology*, v.148, p. 3885–3891, 1992.

MATSUURA, E.; IGARASHI, Y.; YASUDA, T.; TRIPLETT, D. A.; KOIKE, T. Anticardiolipin antibodies recognize beta 2-glycoprotein I structure altered by interacting with an oxygen modified solid phase surface. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 179, n. 2, p.457-462, 1994.

MATSUURA, E.; KOBAYASHI, K.; INOUE, K.; LOPEZ, L. R.; SHOENFELD, Y. Oxidized LDL/b2-glycoprotein I complexes: new aspects in atherosclerosis. *Lupus*, v.14, p. 736–741, 2005.

MATSUURA, E.; KOBAYASHI, K.; TABUCHI, M.; LOPEZ, L. R. Oxidative modification of low-density lipoprotein and immune regulation of atherosclerosis. *Progress of Lipid Research*, v. 45, p. 466-486, 2006.

MATSUURA, E.; SHEN, L. .; MATSUNAMI, Y.; QUAN, N. .; MAKAROVA, M. .; GESKE, F. J. .; BOISEN, M. .; YASUDA, S.; KOBAYASHI, K. .; LOPEZ, L. R. Pathophysiology of b2-glycoprotein I in antiphospholipid syndrome. *Lupus*, v. 19, p. 379–384, 2010.

MATTILA, K.; VAARALA, O.; PALOSUO, T.; MALKAMÄKI, M.; VALTONEN, V.; NIEMINEN, M.; AHO, K. Serologic response against cardiolipin and enterobacterial common antigen in young patients with acute myocardial infarction. *Clinical Immunology and Immunopathology*, v. 51, p. 414–418, 1989.

MELLO, A. P. Q.; SILVA, I. T.; ABDALLA, D. S. P.; DAMASCENO, N. R. T. Eletronegative low-density lipoprotein: origin and impact on health and disease. *Atherosclerosis*, v. 215, p. 257-265, 2011.

MOREIRA, R. O.; SANTOS, R. D.; MARTINEZ, L.; SALDANHA, F. C.; PIMENTA, J. L. A. C.; FEIJOO, J.; JAHNKE, N.; MANGILE, O. C.; KUPFER, R. Perfil lipídico de pacientes com alto risco para eventos cardiovasculares na prática clínica diária. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, v. 50, n. 3, p. 481-489, 2006.

MORI, T.; TAKEYA, H.; NISHIOKA, J.; GABAZZA, E. C.; SUZUKI, K. Beta 2-Glycoprotein I modulates the anticoagulant activity of activated protein C on the phospholipid surface. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 75, n.1, p.49-55, 1996.

MOSS, S. E.; MORGAN, R. O. The annexins. *Genome Biology*, v. 5, p. 219, 2004.

MUIR, K. W.; SQUIRE, I. B.; ALWAN, W.; LEES, K. R. Anticardiolipin antibodies in an unselected stroke population. *Lancet*, v. 344, n. 8920, p. 452-456, 1994.

MIYAKIS, S.; LOCKSHIN, M. D.; ATSUMI, T.; BRANCH, D. W.; BREY, R. L.; CERVERA, R.; et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 4, n 2, p. 295-306, 2006.

NAKASHIMA, Y.; RAINES, E.W. ; PLUMP, A.S. ; BRESLOW, J.L.; ROSS, R. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, v. 18, p. 842–851, 1998.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (N.I.H.). *Morbidade e mortalidade: 2009 chart book on cardiovascular, lung, and blood diseases*. Disponível em: <http://www.nhlbi.nih.gov/resources/docs>. Acesso em 11/01/2011

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger*. Principles of Biochemistry. 4. ed. Cap. 10. Lipids. New York: W.H. Freeman and Company, 2007., p. 343- 368.

NIMPF, J.; BEVERS, E. M.; BOMANS, P. H.; TILL, U.; WURM, H.; KOSTNER, G. M.; ZWAAL, R. F. Prothrombinase activity of human platelets is inhibited by beta 2-glycoprotein-I. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 884, p. 142-149, 1986.

NIMPF, J.; WURM, H.; KOSTNER, G. M. Interaction of beta 2-glycoprotein-I with human blood platelets: influence upon the ADP-induced aggregation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 54, n. 2, p. 397-401, 1985.

OKUMA, H.; KITAGAWA, Y.; TAKAGI, S. Investigation of antiphosphatidyl-serine antibody and antiphosphatidyl-inositol antibody in ischemic stroke patients. *Clinical and Developmental Immunology*, v. 2010, p. 1-4, 2010.

PALINSKI, W.; ORD, V. A.; PLUMP, A. S.; BRESLOW, J. L.; STEINBERG, D.; WITZTUM, J. L. ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 14, n. 4, p. 605-616, 1994.

PALINSKI, W.; ROSENFELD, M. E.; YIÄ-HERTTUALA, S.; GURTNER, G. C.; SOCHER, S. S.; BUTLER, S. W.; PARTHASARATHY, S.; CAREW, T. E.; STEINBERG, D.; WITZUM, J. L. Low density lipoprotein undergoes oxidative modification *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 86, p. 1372-1376, 1989.

PALOSUO, T.; VIRTAMO, J.; HAUKKA, J.; TAYLOR, P. R.; AHO, K.; PUURUNEN, M.; VAARALA, O. High antibody levels to prothrombin imply a risk of deep venous thrombosis and pulmonary embolism in middle-aged men--a nested case-control study. *Thrombosis and Haemostasis*, v.78, p. 4, p.1178-1182, 1997.

PEREIRA, I. A.; BORBA, E. F. The role of inflammation, humoral and cell mediated autoimmunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Swiss Medical Weekly*, v. 138, n. 37-38, p. 534-539, 2008.

PEREIRA, M. M. *Perfil de citocinas e quimiocinas envolvidas na imunopatogenia e regulação imune da aterosclerose em uma população de Salvador-Bahia*. 2011. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal da Bahia – UFBA, Salvador, 2011.

PHADKE, K. V.; PHILLIPS, R. A.; CLARKE, D. T. R.; JONES, M.; NAISH, P.; CARSON, P. Anticardiolipin antibodies in ischaemic heart disease: marker or myth? *British Heart Journal*, v. 69, p. 391-394, 1993.

PITTONI, V.; RAVIRAJAN, C. T.; DONOHOE, S.; MACHIN, S. J.; LYDYARD, P. M.; ISENBERG, D. A. Human monoclonal anti-phospholipid antibodies selectively bind to membrane phospholipid and beta2-glycoprotein I (beta2GPI) on apoptotic cells. *Clinical and Experimental Immunology*, v.119, n. 3, p. 533-543, 2000.

PODREZ, E. A.; FEBBRAIO, M.; SHEIBANI, N.; SCHMITT, D.; SILVERSTEIN, R. L.; HAJJAR, D. P.; COHEN, P. A.; FRAZIER, W. A.; HOFF, H. F.; HAZEN, S. L. Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *The Journal of Clinical Investigation*, v.105, n. 8, p. 1095-1108, 2000.

RANZOLIN, A.; BOHN, J. M.; NORMAN, G. L.; MANENTI, E.; BODANESE, L. C.; VON MÜHLEN, C. A.; STAUB, H. L. Anti-beta2-glycoprotein I antibodies as risk factors for acute myocardial infarction. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 83, p. 141-144, 2004.

RIBOLDI, P.; GEROSA, M.; MERONI, P. L. Statins and autoimmune diseases. *Lupus*, v. 14, p. 765-768, 2005.

ROSEN, A. Systemic immune diseases: mechanisms of autoimmunity. In: RICH, R. R.; FLEISHER, T. A.; SHEARER, W. T.; SCHROEDER, H. W.; FREW, A. J.; WEYAND, C. M. *Clinical Immunology: Principles and Practice*. 3 ed. MOSBY, 2009, cap. 6.

ROSENDO, A. B.; LIMA, L. O.; DAL-PIZZOL, F.; ALMEIDA, S. Lipid and C-reactive protein levels, cardiovascular disease risk factors and simvastatin treatment in brazilian individuals. *Inflammation*, v. 33, n. 4, p. 244-250, 2010

ROSS, R. Mechanisms of Disease: Atherosclerosis - An Inflammatory Disease. *The New England Journal of Medicine*, v. 340, n. 2, p. 115-126, jan.,1999.

_____. Atherosclerosis - a problem of the biology of arterial wall cells and their interactions with blood components. *Arteriosclerosis*, v.1, p. 293-311,1981.

SAKAGUCHI, S.; ONO, M.; SETOGUCHI, R.; YAGI, H.; HORI, S. Foxp3+CD25+CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunology Reviews*, v. 212 p. 8–27, 2006.

SALLE, V.; MAZIÈRE, J. C.; SMAIL, A.; CÉVALLOS, R.; MAZIÈRE, C.; FUENTES, V.; TRAMIER, B.; MAKDASSI, R.; CHOUKROUN, G.; VITTECOQ, O.; GOËB, V.; DUCROIX, J. P. Anti-annexin II Antibodies in Systemic Autoimmune Diseases and Antiphospholipid Syndrome. *Journal of Clinical Immunology*, v. 28, p. 291–297, 2008.

SALONEN, J. T.; YLA-HERTTUALA, S.; YAMAMOTO, R.; BUTLER, S.; KORPELA, H.; SALONEN, R.; NYSSONEN, K.; PALINSKI, W.; WITZTUM, J. L. Autoantibody against oxidized LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet*, v. 339, p. 883-887, 1992.

SALVADOR. Prefeitura Municipal de Salvador. Secretaria Municipal de Saúde. *Plano Municipal de Saúde 2010-2013*. Salvador: Secretaria Municipal de Saúde, 2010.

SANCHEZ-QUESADA, J. L.; BENITEZ, S.; ORDONEZ-LLANOS, J. Electronegative low-density lipoprotein. *Current Opinion in Lipidology*, v. 15, p. 329-335, 2004.

SCANU, A. M.; WISDOM, C. Serum lipoproteins structure and function. *Annual Review of Biochemistry*, v. 41, p. 703-730, 1972.

SCHOUSBOE, I.; RASMUSSEN, M. S. Synchronized inhibition of the phospholipid mediated autoactivation of factor XII in plasma by b2-glycoprotein I and anti- b2-glycoprotein I. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, v. 73, p. 798–804, 1995.

SCHULTZ, D. R. Antiphospholipid antibodies: basic immunology and assays. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, v. 126, n. 5, p. 724-739, 1997.

SHEN, L. Receptors for IgA in phagocytic cells. *Immunological Research*, v. 11, p. 273-282, 1992.

SHEN, Y. M.; LEE, R.; FRENKEL, E.; SARODE, R. IgA antiphospholipid antibodies are an independent risk factor for thromboses. *Lupus*, v. 17, n. 11, p. 996-1003, 2008.

SHENG, Y.; REDDEL, S. W.; HERZOG, H.; WANG, Y. X.; BRIGHTON, T.; FRANCE, M. P.; ROBERTSON, S. A.; KRILIS, S. A. Impaired thrombin generation in β 2-

glycoprotein I null mice. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, p. 13817–13821, 2001.

SHERER, Y.; SHOENFELD, Y. Mechanisms of disease: atherosclerosis in autoimmune diseases. *Nature Clinical Practice*, v. 2, n. 2, p. 99-106, 2006.

SIMANTOV, R.; LASALA, J. M.; LO, S. K.; GHARAVI, A. E.; SAMMARITANO, L. R.; SALMON, J. E.; SILVERSTEIN, R. L. Activation of Cultured Vascular Endothelial Cells by Antiphospholipid Antibodies. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 96, p. 2211-2219, 1995.

SKÅLÉN, K.; GUSTAFSSON, M.; RYDBERG, E. K.; HULTÉN, L. M.; WIKLUND, O.; INNERARITY, T. L.; BORÉN, J. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature*, v. 417, n. 6890, p. 750-754, 2002.

SLETNES, K. E.; SMITH, P.; ABDELNOOR, M.; ARNESEN, H.; WISLOFF, F. Antiphospholipid antibodies after myocardial infarction and their relation to mortality, reinfarction, and non-haemorrhagic stroke. *Lancet*, v. 339, p. 451– 453, 1992.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA (S.B.C.). Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 88, sup. I, 2007.

SOLITO, E.; NUTI, S.; PARENTE, L. Dexamethasone-induced translocation of lipocortin (annexin) 1 to the cell membrane of U-937 cells. *British Journal of Pharmacology*, v. 112, p. 347-348, 1994.

SRIVASTAVA, M.; ATWATER, I.; GLASMAN, M.; LEIGHTON, X.; GOPING, G.; CAO HUY, H.; MILLER, G.; PICHEL, J.; WESTPHAL, H.; MEARS, D.; ROJAS, E.; POLLARD, H. B. Defects in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor expression, Ca(2+) signaling, and insulin secretion in the *anx7(+/-)* knockout mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 96, p. 13783-13788, 1999.

STAUB, H. L.; NORMAN, G. L.; CROWTHER, T.; CUNHA, V. R.; POLANCZYK, A.; BOHN, J. M.; FERNANDES, J. G.; CHAHADE, W. H.; von MÜHLEN, C. A. Antibodies to the atherosclerotic plaque components beta2-glycoprotein I and heat-shock proteins as risk factors for acute cerebral ischemia. *Arquivos de Neuropsiquiatria*, v. 61, n. 3-B, p. 757-763, 2003.

STEINBERG, D. Thematic review series: the pathogenesis of atherosclerosis. An interpretive history of the cholesterol controversy, part IV: The discovery of the statins and the end of the controversy. *Journal of Lipid Research*, v. 47, n. 7, p. 1339–1351, 2006.

STEMME, S.; FABER, B.; HOLM, J.; WIKLUND, O.; WITZTUM, J. L.; HANSSON, G. K. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 92, p. 3893-3897, 1995.

STOLL, G.; BENDSZUS, M. Inflammation and atherosclerosis: novel insights into plaque formation and destabilization. *Stroke*, v.37, n.7, p.1923-32, 2006.

TABAS, I.; WILLIAMS, K. J.; BÖREN, J. Subendothelial lipoprotein retentions as the initiating process in atherosclerosis. Update and therapeutic implications, *Circulation*, v. 109, sup. II, p. 1832-1844, 2007.

TUHRIM, S.; RAND, J. H.; WU, XIAO-XUAN.; WEINBERGER, J.; HOROWITZ, D. R.; GOLDMAN, M. E.; GODBOLD, J. H. Elevated anticardiolipin antibody titer is a stroke risk factor in a multiethnic population independent of isotype or degree of positivity. *Stroke*, v. 30, p.1561-1565, 1999.

VAARALA, O.; GEORG, A.; JAUHAINEN, M.; LEIRISALO-REPO, M.; AHO, K.; PALOSUO, T. Crossreaction between antibodies to oxidised low-density lipoprotein and to cardiolipin in systemic lupus erythematosus. *Lancet*, v. 341, n. 8850, p. 923-925, 1993.

VAARALA, O.; MÄNTTÄRI, M.; MANNINEN, V.; TENKANEN, L.; PUURUNEN, M.; AHO, K.; PALOSUO, T. Anti-cardiolipin antibodies and risk of myocardial infarction in a prospective cohort of middle-aged men. *Circulation*, v. 91, p. 23-27, 1995.

VAARALA, O.; PUURUNEN, M.; MÄNTTÄRI, M.; MANNINEN, V.; AHO, K.; PALOSUO, T. Antibodies to prothrombin imply a risk of myocardial infarction in middle-aged men. *Thrombosis and Haemostasis*, v. 75, p. 456-459, 1996.

VELDHOEN, M. The role of T helper subsets in autoimmunity and allergy. *Current Opinion in Immunology*, n. 21, p. 606–611, 2009.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. *Fundamentos de Bioquímica*. Porto Alegre: Artmed, 2000, p. 195-298.

WILSON, W. A.; GHARAVI, A. E.; KOIKE, T.; LOCKSHIN, M. D.; BRANCH, D. W.; PIETTE, J-C.; BREY, R.; DERKSEN, R.; HARRIS, E. N.; HUGHES, V. R. G.; TRIPLETT, D. A.; KHAMASHTA, M. A. International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. Report of an international workshop. *Arthritis & Rheumatism*, v. 42, n. 7, p. 1309–1311, 1999.

WITZTUM, J. L. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet*, v. 344, n. 8925, p. 793-795, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (W.H.O.). *Global Atlas on Cardiovascular Disease Prevention and Control*. MENDIS, S.; PUSKA, P.; NORRVING, B. World Health Organization, Geneva 2011.

WU, R.; NITYANAND, S.; BERGLUND, L.; LITHELL, H.; HOLM, G.; LEFVERT, A. K. Antibodies against cardiolipin and oxidatively modified LDL in 50-year-old men predict myocardial infarction. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, v.17, p. 3159 –3163, 1997.

YAMAGUCHI, Y.; SETA, N.; KABURAKI, J.; KOBAYASHI, K.; MATSUURA, E.; KUWANA, M. Excessive exposure to anionic surfaces maintains autoantibody response to b2-glycoprotein I in patients with antiphospholipid. *Blood*, v. 110, p. 4312-4318, 2007.

YOLOGLU, S.; SEZGIN, A. T.; SEZGIN, N.; OZDEMIR, R.; YESILADA, E.; TOPAL, E. Determination of risk factors in obese and non-obese patients with coronary artery disease. *Acta Cardiologica*, v. 60, n. 6, p. 625-629, 2005.

ZUCKERMAN, E.; TOUBI, E.; SHIRAN, A.; SABO, E.; SHMUEL, Z.; GOLAN, T. D.; ABINADER, E.; YESHURUN, D. Anticardiolipin antibodies and acute myocardial infarction in nonsystemic lupus erythmatosus patients: a controlled prospective study. *The American Journal of Medicine*, v.101, p. 381–386, 1996.

APENDICES

APÊNCIDE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Através deste documento, declaro a minha participação voluntária no estudo **Investigação do perfil de citocinas e quimiocinas envolvidas na imunopatogenia e regulação imune da aterosclerose em uma população de Salvador - Bahia** coordenado pelo Drº 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/nº, 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 auxílio 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: _____

APÊNCIDE B – FORMULÁRIO DE PESQUISA

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 () DRVA ()

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

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

FATORES DE RISCO

() Hereditariedade

() Diabetes

() Tabagismo

() Sedentarismo

() Obesidade

() Hipertensão arterial

Anotações: _____

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

EXAMES COMPLEMENTARES

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