

ADRIANO BASQUES FERNANDES

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES HEMOSTÁTICOS E
PRÓ-INFLAMATÓRIO NA DOENÇA ARTERIAL
CORONARIANA**

BELO HORIZONTE

FACULDADE DE FARMÁCIA DA UFMG

2007

ADRIANO BASQUES FERNANDES

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES HEMOSTÁTICOS E
PRÓ-INFLAMATÓRIO NA DOENÇA ARTERIAL
CORONARIANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria das Graças Carvalho

Co-orientador: Prof. Vicente de Paulo Coelho Peixoto de Toledo

Colaboração: Prof^a Tânia Mara Pinto Dabés Guimarães

Prof^a Dr^a. Marinez de Oliveira Sousa

Belo Horizonte

Faculdade de Farmácia da UFMG

2007



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Farmácia
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS



FOLHA DE APROVAÇÃO

"Avaliação dos marcadores hemostáticos e pró-inflamatório na doença arterial coronariana"

ADRIANO BASQUES FERNANDES

Dissertação defendida e aprovada em 11/12/2007 pela
Comissão Examinadora constituída pelos seguintes
membros:

Carmen Aparecida de Paula
Profa. Dra. Carmen Aparecida de Paula
Departamento de Análises Clínicas da Escola de Farmácia da UFOP

Fernando Botoni
Prof. Dr. Fernando Antônio Botoni
Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UFMG

Vicente de Paulo Coelho Peixoto de Toledo
Prof. Dr. Vicente de Paulo Coelho Peixoto de Toledo (Co-orientador)
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG

Maria das Graças Carvalho
Profa. Dra. Maria das Graças Carvalho (Orientadora)
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG

Instituições Participantes

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais

Departamento de Hemodinâmica do Hospital Socor - Belo Horizonte, Minas Gerais

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, pela incrível tarefa da criação e pela alegria de viver que me foi concedida. Por sua luz, que me ilumina, em todos os momentos de minha vida.

Aos meus Pais Orlando Fernandes dos Santos Júnior e Elizabeth de Almeida Basques Fernandes pela árdua tarefa de minha criação e de minha educação. Hoje, também no papel de Pai, consigo reconhecer todos os esforços que não foram medidos para garantir a educação que vocês me deram. Ensinarão-me a ser correto e digno, e a reconhecer os valores de um ser humano. Obrigado por tudo.

À minha amada esposa Raquel, que conheci como menina e hoje tenho a felicidade de dividir minha vida com essa grande mulher. Você me ensinou a reconhecer valores antes desconhecidos por mim, me ensinou a superar meus limites e a me tornar uma pessoa melhor. Obrigado pela linda família que construímos juntos, e pela alegria de estar com vocês todos os dias. Te amo sempre.

Às minhas lindas filhas, Clara e Cecília, que a cada dia me fazem querer superar todos os limites possíveis. Obrigado pelo amor incondicional que nos une. Agradeço a compreensão pelos momentos em que estive ausente, mas vale a pena escutar PAPAI ou PAPAIÊ sempre que chego em casa após horas de ausência. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria das Graças Carvalho, por sua atenção quase maternal, pelo seu apoio, compreensão, companheirismo em todos os momentos de nossa caminhada. Obrigado por tornar todos os momentos deste trabalho agradáveis, mesmo aqueles em que pensávamos que não teríamos saída. Admiro seu profissionalismo e sua sabedoria de vida que faz com que todos queiram sempre estar um pouquinho perto de você. Obrigado por tudo e espero continuar meus caminhos paralelos aos seus.

À Profa. Dra. Marinez de Oliveira Sousa pelo estímulo e incentivo profissional. Obrigado por tornar possível a realização deste projeto, concebido e agraciado por você. Obrigado por tudo

À grande colega Luciana Moreira Lima, que junto a Dra. Marinez, tornaram possível a realização deste projeto. Admiro sua sabedoria e seu profissionalismo. Obrigado por ter tornado este trabalho possível de acontecer.

Ao Prof. Dr. Vicente de Paulo Coelho Peixoto Toledo pelo incansável trabalho na padronização de determinações imunológicas. Admiro seu profissionalismo e agradeço toda atenção que me foi concedida. Obrigado por tudo.

À Profa. Dra. Tânia Mara Pinto Dabés Guimarães pelo apoio na padronização de determinações imunológicas.

À Profa. Dra. Ana Paula Salles Moura pelo apoio e incentivo em todas as etapas deste projeto.

Ao Prof. Dr. Lauro Mello Vieira e Profa. Dra. Luci Maria Sant'Ana Dusse pelo apoio, convivência e exemplo de profissionalismo.

Ao Prof. Dr. Amintas Fabiano S. Figueiredo pelo apoio e orientação durante o estágio em docência.

A todos os professores e funcionários da Faculdade Farmácia da UFMG pelo convívio, colaboração e incentivo profissional.

À secretária do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG Nilce das Chagas Ferreira pela colaboração, respeito, disponibilidade e constante colaboração.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFMG nas figuras dos professores Dr. Ricardo Jose Alves, Dr. Márcio Matos Coelho, Dr. Tasso Moraes e Santos, Dra. Luci Maria Sant'Ana Dusse e as secretárias Rosemary Alves Guimarães e Jurema Renna de Negreiros Figueiredo pela disponibilidade e apoio.

À funcionária Geralda de Fátima Guerra Lage por tornar exeqüível todos os projetos no laboratório de hematologia da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Às colegas de Pós-graduação Cláudia, Luciana e Anna Letícia pelo apoio na execução das dosagens envolvidas neste projeto.

À bibliotecária Simone Aparecida dos Santos pela atenção na revisão da formatação dos textos.

Ao Departamento de Hemodinâmica do Hospital Socor por tornar possível a realização deste projeto.

Aos médicos Dr. José Carlos Faria Garcia, Dr. Cirilo Pereira Fonseca Neto e Dr. Jamil Abdala Saad do departamento de Hemodinâmica do Hospital Socor pela triagem dos pacientes e toda contribuição para a realização deste projeto.

Ao suporte estatístico prestado por Ricardo Vilela.

Ao Prof. Dr. Luis Carlos C. Afonso, da Universidade Federal de Ouro Preto, e colaboradores pelo apoio técnico e disponibilidade no uso da infra-estrutura

laboratorial e dos bio-ensaios para a detecção de citocinas.

Aos colegas do laboratório Geraldo Lustosa pelo companheirismo, atenção e apoio.

Ao Dr. Geraldo Lustosa pelos ensinamentos e profissionalismo. Obrigado pela convivência que tivemos que me ensinaram a reconhecer o valor da profissão e o humanismo que envolve esta árdua tarefa de se trabalhar com a saúde em nosso País.

À Dra. Eliane Lustosa Cabral Gomez pelo exemplo profissional, sabedoria e a oportunidade para o meu crescimento pessoal e profissional. Obrigado.

Ao Dr. Fernando Valadares Basques pelo exemplo profissional e pelo apoio.

Aos colegas e amigos André Godoy e Fernando pelo companheirismo.

Aos primos e irmãos pelo apoio e por acreditarem em meu potencial.

Às empresas Biotécnica[®] e In Vitro[®] pelo fornecimento do conjunto reagente para a determinação da PCRus.

SUMÁRIO

| | |
|---|------------|
| LISTA DE TABELAS..... | x |
| LISTA DE FIGURAS..... | xi |
| LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS..... | xii |
| RESUMO..... | xiv |
| ABSTRACT..... | xv |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 4 |
| 2.1 Doença Arterial Coronariana (DAC)..... | 5 |
| 2.2 Doença Arterial Coronariana e Aterosclerose..... | 7 |
| 2.3 Diagnóstico e estratificação de risco para DAC..... | 11 |
| 2.4 O sistema hemostático e seu papel na Doença Arterial Coronariana..... | 13 |
| 2.5 Papel da fibrinólise na Doença Arterial Coronariana..... | 18 |
| 2.6 O endotélio vascular e Doença Arterial Coronariana..... | 24 |
| 2.7 Inflamação e Doença Arterial Coronariana..... | 26 |
| 3 OBJETIVOS..... | 29 |
| 3.1 Objetivo geral..... | 30 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 30 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS..... | 31 |
| 4.1 Casuística..... | 32 |
| 4.2 Critérios de inclusão e exclusão adotados..... | 33 |
| 4.3 Amostras biológicas..... | 34 |
| 4.4 Delineamento experimental..... | 34 |
| 4.5 MÉTODOS..... | 35 |
| 4.5.1 Fatores de risco..... | 35 |
| 4.5.2 Angiografia coronariana..... | 35 |
| 4.5.3 Parâmetros hemostáticos..... | 37 |
| 4.5.4 Parâmetro pró-inflamatório..... | 40 |
| 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 41 |
| 5 RESULTADOS..... | 42 |
| 5.1 Caracterização dos grupos quanto aos fatores de risco..... | 43 |
| 5.2 Parâmetros hemostáticos..... | 44 |
| 5.3 Parâmetro pró- inflamatório..... | 55 |
| 5.4 Correlações..... | 59 |
| 6 DISCUSSÃO..... | 60 |
| 7 CONCLUSÕES..... | 71 |
| 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 73 |
| 9 ANEXOS..... | 82 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|-----------|--|
| Tabela 1- | Caracterização dos grupos estudados |
| Tabela 2- | Caracterização dos grupos quanto aos fatores de risco e presença de síndrome coronariana aguda (SCA) |
| Tabela 3- | Parâmetros hemostáticos |
| Tabela 4- | Parâmetros hemostáticos considerando estenose $\leq 70\%$ ou $> 70\%$ |
| Tabela 5- | Parâmetros hemostáticos considerando número de artérias acometidas em pacientes com estenose superior a 70% |
| Tabela 6- | Níveis séricos de proteína C reativa (PCR) |
| Tabela 7- | Níveis séricos de proteína C reativa (PCR) considerando estenose $\leq 70\%$ ou $> 70\%$ |
| Tabela 8- | Níveis séricos de proteína C reativa (PCR) considerando número de artérias acometidas em pacientes com estenose superior a 70% |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Sistema arterial coronariano
- Figura 2- Evolução da placa aterosclerótica
- Figura 3- Representação esquemática da cascata da coagulação
- Figura 4- Representação esquemática do sistema fibrinolítico
- Figura 5- Representação esquemática do mecanismo de inibição da fibrinólise
- Figura 6- Representação esquemática do mecanismo de inibição da fibrinólise - TAFI
- Figura 7- Marcadores de lesão endotelial
- Figura 8- Angiografia coronariana
- Figura 9- Níveis plasmáticos de D-DI nos grupos AnN, ALM e AG
- Figura 10- Níveis plasmáticos de PAI-1 nos grupos AnN, ALM e AG
- Figura 11- Níveis plasmáticos de TAFI nos grupos AnN, ALM e AG
- Figura 12- Níveis plasmáticos de TM nos grupos AnN, ALM e AG
- Figura 13- Níveis plasmáticos de D-DI considerando estenose $\leq 70\%$ ou $> 70\%$
- Figura 14- Níveis plasmáticos de PAI-1 considerando estenose $\leq 70\%$ ou $> 70\%$
- Figura 15- Níveis plasmáticos de TAFI considerando estenose $\leq 70\%$ ou $> 70\%$
- Figura 16- Níveis plasmáticos de TM considerando estenose $\leq 70\%$ ou $> 70\%$
- Figura 17- Níveis séricos de PCRus nos grupos AnN, ALM e AG
- Figura 18- Níveis séricos de PCRus considerando estenose $\leq 70\%$ ou $> 70\%$

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|------------------|---|
| AG | Ateromatose grave |
| ALM | Ateromatose leve/moderada |
| AnN | Angiograficamente normal (artérias lisas) |
| ANOVA | Análise de variância |
| Ca ⁺⁺ | Íons cálcio |
| C3 | Complemento C3 |
| C5 | Complemento C5 |
| DAC | Doença arterial coronariana |
| DAOP | Doença arterial obstrutiva periférica |
| D-Di | Dímero D |
| ELFA | Ensaio imunoenzimático fluorescente |
| ELISA | Ensaio Imunoenzimático |
| FPA | Fibrinopeptídeo A |
| F1+2 | Fragmento 1+2 da protrombina |
| HDL | Lipoproteína de alta densidade |
| IAM | Infarto agudo do miocárdio |
| IFN | Interferon |
| IL | Interleucina |
| IMC | Índice de massa corporal |
| LDL | Lipoproteína de baixa densidade |
| Lp(a) | Lipoproteína (a) |
| MCP | Proteína quimiotática para monócitos |
| µg/mL | Micrograma por mililitro |
| mg/dL | Miligramma por decilitro |
| ng/dL | Nanograma por decilitro |
| nmol/L | Nanomol por litro |
| PAI | Inibidor do ativador do plasminogênio |
| PCRus | Proteína C reativa ultra-sensível |
| PDF | Produtos de degradação da fibrina |
| RPM | Rotações por minuto |
| SCA | Síndrome coronariana aguda |

| | |
|------|---|
| SUS | Sistema Único de Saúde |
| TAT | Complexo trombina-antitrombina |
| TAFI | Inibidor da fibrinólise ativado pela trombina |
| TFPI | Inibidor da via do fator tissular |
| TM | Trombomodulina |
| TNF | Fator de necrose tumoral |
| t-PA | Ativador do plasminogênio tipo tissular |
| VS | Versus |
| u-PA | Ativador do plasminogênio tipo uroquinase |

RESUMO

As doenças cardiovasculares constituem a principal causa de morte no mundo, justificando assim numerosas investigações sobre o assunto.

O presente estudo teve como objetivo investigar a associação de parâmetros hemostáticos e proteína C reativa (PCR) com a gravidade da doença arterial coronariana (DAC) em 123 pacientes submetidos à angiografia coronariana distribuídos em três grupos: a) angiograficamente normais (AnN, n=35); b) ateromatose leve/moderada (ALM, n=31) e c) ateromatose grave (AG, n=57), sendo este último grupo subdividido de acordo com o número de artérias acometidas pelo processo aterosclerótico. Os parâmetros hemostáticos incluíram a avaliação dos níveis plasmáticos do dímero D (D-DI), do inibidor do ativador do plasminogênio tipo1 (PAI-1), do inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI) e da trombomodulina (TM). A PCR foi também avaliada como um marcador de processo inflamatório. A análise e interpretação dos resultados permitiram concluir que o sistema fibrinolítico se mostrou pouco eficiente no grupo com ateromatose grave considerando os níveis significativamente mais elevados de PAI-1 ($p < 0.001$) neste grupo em comparação aos outros grupos de pacientes. Este fato sinaliza para um paralelismo entre os níveis deste inibidor e o grau de estenose das artérias, embora o número de artérias acometidas não tenha influenciado os resultados. Quanto aos outros parâmetros avaliados, nenhum apresentou diferença significativa com o agravamento do processo aterosclerótico, exceto a PCR, cujos resultados foram superiores nos grupos com ateromatose leve/moderada e grave em relação ao grupo angiograficamente normal. O presente estudo fornece evidências que confirmam achados prévios referentes ao comprometimento do sistema fibrinolítico, bem como o envolvimento de processo inflamatório nas doenças ateroscleróticas. Todavia, o número de artérias acometidas, dado até agora não explorado, parece não contribuir para elevar os níveis plasmáticos dos marcadores avaliados.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases constitute the main cause of death in worldwide justifying a number of investigations on this matter. The present study aimed to investigate the association between hemostatic parameters and reactive C protein (CRP), and the coronary artery disease (CAD) severity in 123 patients submitted to coronary angiography scored in three groups: a) normal angiographically (AnN, n=35; b) with mild/moderate atheromatosis (MA, n=31) and c) with severe atheromatosis (SA, n=57). The last group was divided into subgroups according to the number of affected vessels by the atherosclerotic process. Hemostatic parameters have included assessment of plasma levels of D dimer (D-DI), plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1), thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and thrombomodulin (TM). CRP was also assessed as a marker of inflammatory process. Analysis and interpretation of the results allowed concluding that the fibrinolytic system showed to be deficient in patients from the group with severe atheromatosis considering the levels significantly higher of PAI-1 ($p < 0.001$) in this group comparing to other patients groups. This fact indicates a parallelism between the levels of this inhibitor and the degree of stenosis in the arteries, although the number of affected vessels did not influence the results. Concerning to the other parameters assessed, none of them showed levels significantly elevated as the atherosclerotic disease become more severe, except the CRP, whose results showed to be higher in both groups with mild/moderate and severe atheromatosis in comparison to the angiographically normal group. The present study provides evidence that confirm previous findings related to the hypofibrinolytic state, as well as the involvement of inflammatory process in atherosclerotic diseases. However, the number of affected vessels, an unexplored variable so far, seemed not to contribute for elevating plasma levels of the assessed markers.

1 INTRODUÇÃO

O estudo das doenças cardiovasculares ocupa um espaço de grande importância devido ao número de mortes crescentes associadas no mundo e por ser a principal causa de morbidade e mortalidade no Brasil (Sociedade Brasileira de Cardiologia – SBC, 2001).

Diversos estudos foram conduzidos para a avaliação do processo inflamatório em pacientes com doença arterial coronariana, mas poucos correlacionam estes marcadores aos marcadores hemostáticos e aos resultados obtidos angiograficamente.

À luz do conhecimento obtido por meio de uma vasta revisão da literatura sobre o assunto, várias questões se levantam necessitando confirmação de achados anteriores e esclarecimentos adicionais.

Assim, a avaliação de marcadores hemostáticos e pró-inflamatórios, bem como a correlação destes com dados angiográficos, torna relevante a realização deste trabalho, contribuindo para ampliar nossos conhecimentos na área e para obter respostas mais fidedignas e adequadas para a nossa população.

A participação de processos inflamatório e hemostático no desencadeamento de um episódio cardiovascular agudo é bem estabelecida, o que parece ocorrer prioritariamente através da produção de citocinas pró-inflamatórias, ativação das plaquetas e deposição de fibrina intravascular. Sabe-se também que os níveis do inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1) estão elevados em indivíduos que sofreram infarto, atestando deficiência no sistema fibrinolítico e, portanto, favorecendo a formação do coágulo de fibrina em doenças cardiovasculares. Além do mais, crescentes evidências têm revelado o papel crucial do endotélio na hemostasia vascular, ocorrendo ativação da coagulação quando há injúria endotelial.

Diante do contexto acima, surgem várias questões para serem investigadas, confirmadas ou respondidas, como por exemplo:

- Os níveis plasmáticos de PAI-1, principal inibidor do sistema fibrinolítico, correlacionam-se à gravidade do processo aterosclerótico?

- O crescimento da placa ateromatosa (formas mais graves) está relacionado a marcadores pró-inflamatórios, rotineiramente utilizados na clínica médica. Será que estes podem prever a evolução da doença coronariana em nosso meio?
- O grau de estenose pode estar associado aos níveis plasmáticos do dímero-D, um marcador de depósito de fibrina que reflete o balanço entre a ativação da coagulação e a atividade do sistema fibrinolítico?
- O grau de estenose pode estar relacionado à ocorrência de lesão endotelial avaliada por meio de um marcador plasmático?
- Outros inibidores da fibrinólise mais recentemente descritos, como o TAFI (inibidor da fibrinólise ativado pela trombina) poderia ter alguma importância como preditor do agravamento da doença arterial coronariana (DAC)? Haveria correlação deste com o inibidor do ativador do plasminogênio tipo1 (PAI-1)? A falta de competência do sistema fibrinolítico estaria relacionada à gravidade da doença nos pacientes analisados?

Uma análise recente da literatura sobre o desempenho do TAFI nas doenças cardiovasculares revelou resultados conflitantes ou inconsistentes necessitando estudos adicionais. Além disso, torna-se relevante a confirmação para a nossa população de achados prévios na literatura, considerando suas características étnicas e outras bem distintas daquelas próprias dos indivíduos objeto de estudos internacionais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA (DAC)

As doenças cardiovasculares constituem as principais causas de morte no mundo. Nos próximos 15 anos, especula-se que estas atingirão prevalência ainda maior nos países desenvolvidos e em desenvolvimento. Observa-se que a elevação da mortalidade relacionada a esta patologia tem ocorrido em países em desenvolvimento, dentre os quais o Brasil é um dos representantes (Sociedade Brasileira de Cardiologia – SBC, 2001). Estima-se que 17 milhões de pessoas morrem por ano devido às doenças cardiovasculares, sabendo-se que o risco de desenvolver doença cardiovascular aumenta com a idade (World Health Organization - WHO, 2006).

Desta forma, é possível fazer algumas ilações com base em dados obtidos em outros países. Na Europa, estima-se que existam aproximadamente 30.000 indivíduos com angina de peito para cada milhão de habitantes, o que significa um número em torno de 8 milhões de pessoas. Nos estados Unidos da América, a estimativa varia de 6 a 16 milhões de indivíduos com angina, considerando-se bastante razoável o número de 12 milhões, com a ocorrência anual de pelo menos 150.000 novos casos. Utilizando os mesmos cálculos para o Brasil, temos pelo menos, 900.000 brasileiros com angina de peito e cerca de 18.000 novos casos da doença por ano, baseados num total de 30 casos de angina estável para cada caso de infarto agudo hospitalizado em um ano (SBC, 2004).

A doença arterial coronariana (DAC) é responsável por 38% das mortes na América do Norte, sendo a principal causa de morte entre homens com menos de 65 anos na Europa e a segunda maior causa de morte entre as mulheres. A DAC constitui a causa mais importante de morbidade e mortalidade no Brasil (SBC, 2001) e atinge principalmente indivíduos em idade de alta produtividade, gerando perdas econômicas significativas. A DAC constitui uma doença multifatorial e a prevenção desta passa pela identificação e controle, não só das dislipidemias, mas do conjunto de fatores de risco, hereditários e adquiridos. A contribuição dos fatores de risco tradicionais para DAC na população em geral surgiu dos estudos da cidade de Framingham (WILSON *et al.*, 1998). Porém, cerca de 35% dos eventos ateroscleróticos ocorrem na ausência dos denominados fatores de risco clássicos (American Heart Association - AHA, 2004). Tal fato permite sugerir a possível

contribuição de outros fatores de risco responsáveis nos eventos vasculares, até então desconhecidos. Todos esses fatores mostram a importância do estudo das doenças cardiovasculares e o esclarecimento sobre sua patogênese, prevenção e novas abordagens terapêuticas (HANSON, 2005).

A doença cardiovascular consiste em um distúrbio que acomete a função do coração e dos vasos sanguíneos. Dentre os eventos vasculares mais importantes estão o infarto agudo do miocárdio (IAM), o acidente vascular cerebral, a isquemia transitória e a doença arterial obstrutiva periférica (DAOP) (WHO, 2006). Outra forma de síndrome coronariana é a morte súbita coronariana, que em 70 % dos casos em jovens está associada à trombose coronariana. Os eventos ateroscleróticos estão associados a indivíduos mais idosos que a indivíduos jovens (FUSTER *et al.*, 1992).

As placas de ateroma podem afetar qualquer vaso sanguíneo, mas os principais alvos são as coronárias (Figura 1) e os sistemas arterial cerebral e periférico. As placas apresentam grande conteúdo lipídico, capa fibrótica delgada e sinais de inflamação com infiltração de leucócitos. Há frequentemente uma leve invasão para o lúmen do vaso sanguíneo que pode sofrer remodelamento para acomodar a camada lipídica. A placa aterosclerótica sofre com frequência ruptura ou erosão e são classificadas como placas instáveis ou vulneráveis (FUSTER *et al.*, 1992; MOHANTY *et al.*, 2004). As síndromes coronarianas agudas estão mais relacionadas com a ruptura da placa que com a progressão gradual da mesma (GARCIA-PALMIERI, 1977).

Nas coronárias, quando a obstrução que se forma é total e não existe circulação colateral nas proximidades, a consequência é a falta de oxigenação e a necrose do miocárdio. A trombose coronariana total é responsável por grande parte dos infartos do miocárdio, e a trombose parcial é responsável por um grande número de casos de angina instável (HANSON, 2005).

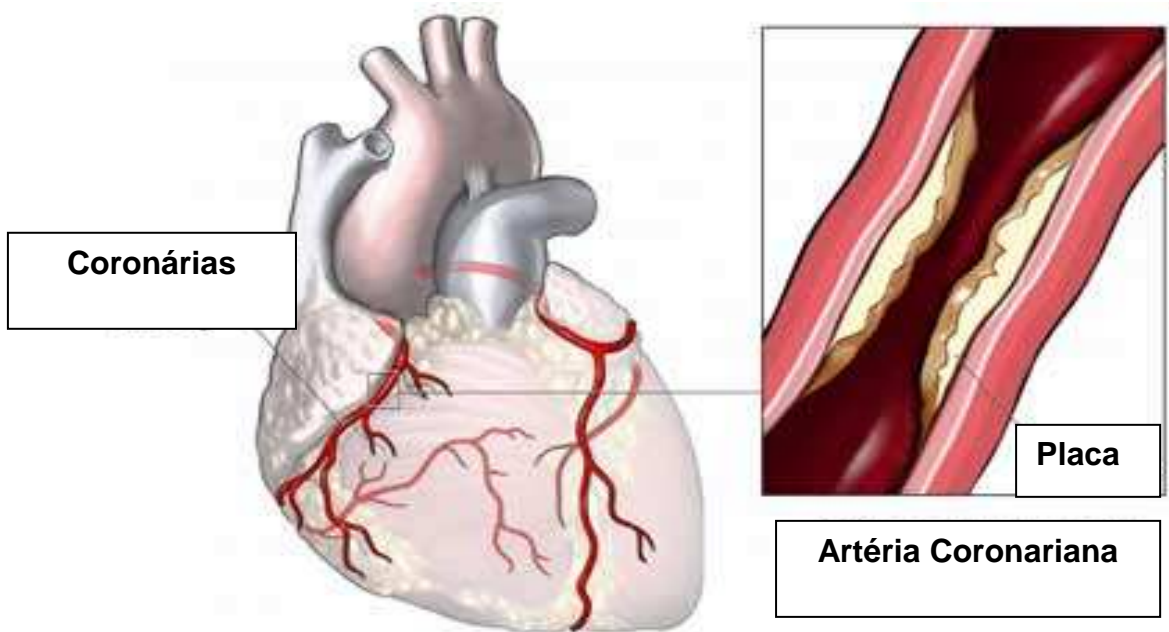


Figura-1 Sistema arterial coronariano

À direita, em destaque, representação esquemática mostrando estreitamento da artéria coronariana pela presença de placa ateromatosa.

Fonte: disponível em:

http://www.cnehomehealth.org/healthGate/images/si1480_ma.jpg

2.2 DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA E ATEROSCLEROSE

A principal hipótese sobre a origem da aterosclerose é que esta consiste em uma resposta inflamatória a diferentes formas de lesão da parede vascular. As principais causas para a agressão do endotélio vascular são: hipercolesterolemia, principalmente associada a altos níveis de LDL, radicais livres gerados pelo fumo, hipertensão, *diabetes mellitus*, alterações genéticas, níveis elevados de homocisteína, processos infecciosos e a associação destes fatores (RUSSEL, 1999). A aterosclerose e as doenças cardiovasculares são processos fisiopatológicos complexos. Muitos mecanismos bioquímicos envolvidos nestes processos são os mesmos que ocorrem durante a defesa contra agressores externos, incluindo coagulação, inflamação e resposta imune. A partir desta análise, começa-se a compreender que estes processos estão intrinsecamente ligados e, ao mesmo tempo, independentes. (TRACY, 2003).

A inflamação desempenha um importante papel nas lesões iniciais da aterosclerose e em sua progressão (FISMAN *et al.*, 2006; BOEKHOLDT *et al.*, 2004;

TENTOLOURUS *et al.*, 2004; CESARI *et al.*, 2003; RIDKER *et al.*, 2000; YUDKIN *et al.*, 2000). A patogênese da aterosclerose envolve vários fatores de crescimento, citocinas e outras substâncias produzidas pelas células endoteliais, células musculares lisas, macrófagos e linfócitos T, que regulam a atividade inflamatória e a proliferação celular (REAPE, *et al.*, 1999; RUSSEL, 1999), resultando em uma resposta fibroproliferativa.

A lesão aterosclerótica (Figura 2) é definida como o espessamento da camada íntima das artérias constituída por células, principalmente macrófagos e células musculares lisas, tecido conectivo e lipídeos, sendo que substâncias inflamatórias e células imunológicas são importantes no desenvolvimento e agravamento da lesão (RIDKER *et al.*, 2000).

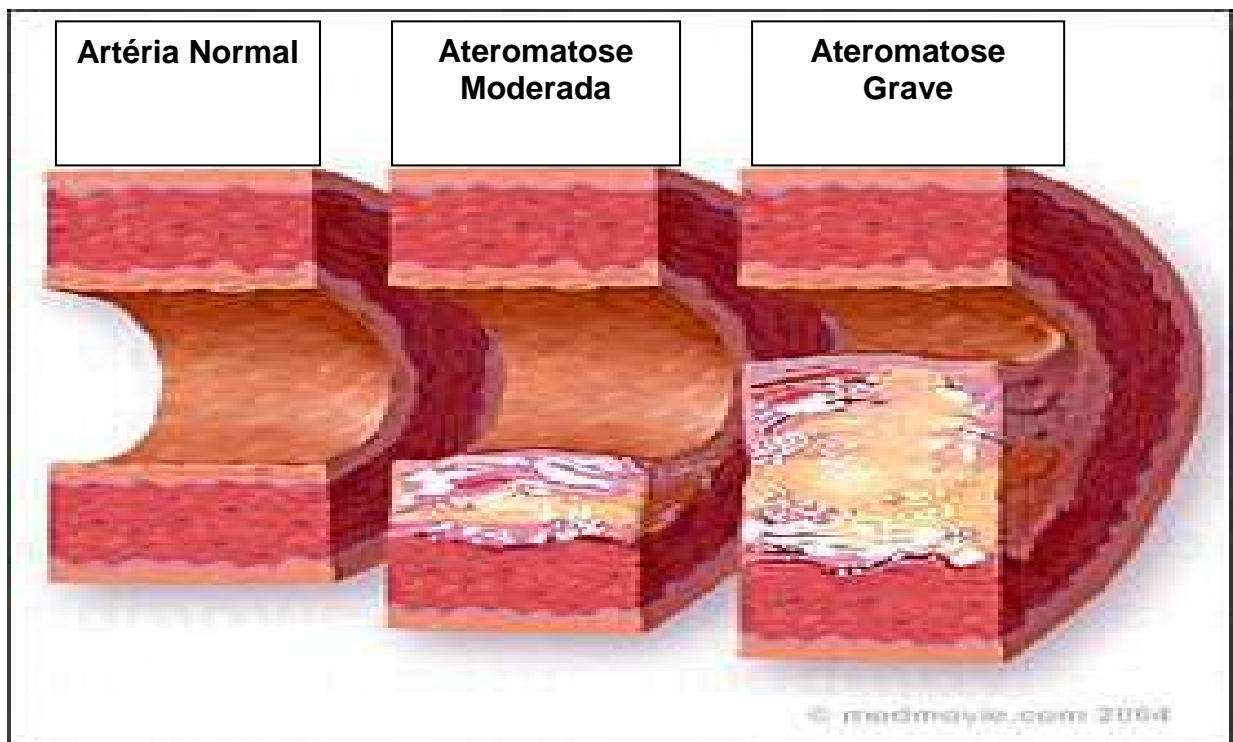


Figura-2 Evolução da placa aterosclerótica

À esquerda, representação esquemática de uma artéria normal; ao centro, uma artéria com placa ateromatosa causando redução do diâmetro intraluminal inferior a 70% (ateromatose moderada); e à direita, uma artéria com placa ateromatosa causando redução do diâmetro intraluminal superior a 70% (ateromatose grave).

Fonte: disponível em:

<http://www.surrey.ac.uk/SBMS/MicrobialSciences/images/atherosclerosis-1.jpg>

O início da lesão ateromatosa ocorre com a formação de uma estria gordurosa pelo acúmulo de lípidos abaixo do endotélio vascular. A maior parte das células presentes nesta estria gordurosa são os macrófagos e os linfócitos T (STEPPICH, *et al.*, 2006; HANSON, 2005). A proteína quimiotática para monócitos tipo1 (MCP-1) desempenha um papel importante em vários estágios da aterosclerose, pela atração dos monócitos aos sítios de inflamação, infiltração na parede vascular e diferenciação a macrófagos. A atividade desta proteína é regulada pelos níveis de TNF α e IL-1 β , culminando em um aumento da resposta inflamatória (BERRAHMOUNE *et al.*, 2006).

O acúmulo de lípidos no espaço subendotelial, principalmente lipoproteína de baixa densidade (LDL) pode sofrer oxidação formando uma partícula mais aterogênica, a LDL oxidada, que atua como fator quimiotático para monócitos e células musculares lisas. Após diferenciação a macrófagos, estes fagocitam as partículas de gordura e passam a ser chamados de células espumosas. No interior da placa ateromatosa células espumosas e lipoproteínas extracelulares constituem a região central, circundada por células musculares lisas e colágeno que formam uma capa fibrosa que delimita o ateroma. A LDL oxidada é um dos muitos fatores que contribuem para perda de células musculares lisas na placa aterosclerótica, bem como a secreção de metaloproteinases por macrófagos ativados causando distúrbio no colágeno e enfraquecendo a placa, tornando-a susceptível à ruptura. Acredita-se que todas as etapas da aterogênese envolvem citocinas e células características do processo inflamatório (PEARSON *et al.*, 2003). As citocinas inflamatórias apresentam papel importante no enfraquecimento da capa fibrosa da placa ateromatosa que pode levar a sua ruptura e a síndrome coronariana aguda (LIND, 2003).

As lesões ateroscleróticas podem ser classificadas de acordo com suas características histológicas (STARY *et al.*, 1994) em:

a) Lesões iniciais

Tipo I: São caracterizadas pelo aumento do número de macrófagos e surgimento de células espumosas na íntima vascular. Estas lesões são detectáveis mesmo antes do primeiro ano de vida.

Tipo II: São compostas por macrófagos, células musculares lisas e pequenos grãos de gordura extracelular. As lesões do tipo II podem ser subdivididas em IIa e IIb, sendo as lesões do subtipo “a” menos freqüentes, porém, com maior número de macrófagos, maior celularidade e maior quantidade de matriz extracelular. Estas tendem a progredir mais rápido para formas mais complicadas. As lesões do tipo II são encontradas antes da terceira década de vida.

b) Lesões intermediárias

Tipo III: Consistem no pré-ateroma, que se originam principalmente de lesões do tipo IIa e diferem dessas por possuir maior quantidade de lipídeos extracelulares, formando pequenos núcleos lipídicos. É uma fase de transição para o tipo IV.

c) Lesões avançadas

Tipo IV: São denominadas ateroma. Possui um núcleo lipídico individualizado, formado pela fusão das ilhotas de gordura das lesões do tipo III, bem como uma grande quantidade de restos celulares.

Tipo V: São caracterizadas pela presença de tecido fibroso envolvendo o núcleo lipídico. Pode ser dividida em três subtipos:

Va: Fibroateroma: Presença de capa fibrótica envolvendo o núcleo lipídico.

Vb: Placa calcificada: Presença de cálcio no componente fibrótico ou mesmo núcleo lipídico.

Vc: Placa fibrótica ou tecido fibrótico com ausência de núcleo lipídico.

Tipo VI: É a placa complicada por trombo, fissura, ruptura, hemorragia ou erosão, constituindo a causa dos eventos coronarianos isquêmicos agudos e geralmente são oriundas de placas tipo IV ou V.

É sabido que fatores metabólicos podem interferir no processo aterosclerótico. Assim, pacientes com síndrome metabólica e obesidade produzem citocinas inflamatórias, principalmente IL-6 e TNF α , chamadas de adipocinas. O tecido adiposo produz quantidades substanciais de IL-6 e esta secreção contribui em 10% a 30% dos níveis circulantes (GUERRE-MILLO, 2004). Para o esclarecimento da

patogênese da aterosclerose, a identificação e medida de substâncias pró-inflamatórias como a LDL oxidada, lipoproteínas e citocinas (IL-1, IL-6, TNF α), moléculas de adesão e produtos de estimulação hepática, como fibrinogênio e a proteína C reativa, são de suma importância (PEARSON *et al.*, 2003).

2.3 DIAGNÓSTICO E ESTRATIFICAÇÃO DE RISCO PARA DAC

A angina é uma síndrome clínica caracterizada por dor ou desconforto em qualquer das seguintes regiões: tórax, epigástrio, mandíbula, ombro, dorso ou membros superiores, sendo tipicamente desencadeada ou agravada com atividade física ou estresse emocional e atenuada com o uso de nitroglicerina e derivados. A angina usualmente acomete portadores de DAC com comprometimento de, pelo menos, uma artéria epicárdica. Entretanto, podem ocorrer também em casos de doença cardíaca valvar, cardiomiopatia hipertrófica e hipertensão não controlada. Pacientes com coronárias normais e isquemia miocárdica relacionada ao espasmo ou disfunção endotelial também podem apresentar angina. Além desta, há várias situações de dor torácica que possuem outras causas, tais como alterações relacionadas ao esôfago, estômago, pulmões, mediastino, pleura e parede torácica. Vários são os adjetivos utilizados pelos pacientes na descrição da angina: “sufocamento, queimação, opressão, peso”, entre outros. Não é raro os pacientes se referirem apenas aos sintomas de “desconforto” e “dor” pré-cordial. Quase nunca a angina é referida como dor “em pontada” e, usualmente, não tem relação com a respiração e nem com o decúbito (SBC, 2004).

Tipicamente o episódio de angina dura alguns minutos. Um desconforto repentino, fugaz, ou então contínuo, com duração de várias horas, raramente é angina. A angina usualmente incide sobre a região retroesternal, sendo comum a irradiação para o pescoço, mandíbula, epigástrio ou membros superiores (SBC, 2004).

A angina é também classificada como estável e instável. Pessoas com angina estável, ou angina estável crônica, têm episódios de desconforto de peito que são usualmente previsíveis (após atividade física ou estresse emocional). A angina instável, a dor de peito é imprevisível e pode ocorrer no repouso. O desconforto pode ser mais longo que a angina típica ou ser a primeira vez que a pessoa

apresenta angina de peito. A angina instável é uma síndrome coronariana aguda e deve ser tratada como emergência (SBC, 2004).

O exame clínico é um dos mais importantes passos para a avaliação do paciente com dor torácica. A DAC significativa é definida angiograficamente pela presença de estenose \geq que 70% do diâmetro, de pelo menos um segmento de uma das artérias epicárdicas maiores, ou estenose \geq que 50% do diâmetro do tronco da coronária esquerda. Apesar de lesões com menor grau de estenose causar angina, estas têm pouco significado clínico.

Durante a avaliação clínica, fatores de risco importantes para DAC devem ser avaliados, como tabagismo, hiperlipidemia, diabetes, hipertensão arterial, história familiar de DAC precoce (< 55 anos para homens e < 65 anos para mulheres) e antecedentes pessoais de DAC ou doença cérebro-vascular.

Clinicamente, a angina de peito pode ser classificada como:

a) Angina típica (definitiva), caracterizada por:

a.1) desconforto ou dor retroesternal

a.2) desencadeado por atividade física

a.3) aliviada com repouso ou nitroglicerina

b) Angina atípica, caracterizada por:

Presença de somente 2 fatores acima

c) Dor torácica não cardíaca, caracterizada por:

Presença de somente um ou nenhum dos fatores acima

Em todos os pacientes, especialmente naqueles com angina típica, as doenças associadas (simultâneas) que possam precipitar a angina “funcional” (isto é, isquemia miocárdica na ausência de obstrução coronariana anatômica significativa) devem ser consideradas. Geralmente são doenças que causam isquemia miocárdica por aumentar o consumo de oxigênio ou por diminuir sua oferta para o

miocárdio que podem ser o hipertireodismo, hipertermia, uso de simpatomiméticos, anemia, hiperviscosidade sanguínea ou hipertensão (SBC, 2004).

2.4 O SISTEMA HEMOSTÁTICO E SEU PAPEL NA DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA

Devido ao papel da trombose coronariana nas síndromes coronarianas agudas, marcadores de ativação da hemostasia têm sido utilizados para estudos da fisiopatologia, diagnóstico e prognóstico das síndromes agudas e para monitorar o tratamento com drogas antitrombóticas. Porém, poucos estudos tentaram relacionar os resultados obtidos com a sensibilidade e especificidade diagnóstica (VAN DER PUTTEN *et al.*, 2006).

Em contraste a alguns marcadores hemostáticos, a avaliação de proteínas liberadas no processo de lesão de células musculares como troponina e creatina quinase fração MB (CKMB) está estabelecida para uso na clínica médica. No entanto, o tempo de liberação destes marcadores na corrente sanguínea ocorre de 3 a 6 horas após a síndrome coronariana aguda. Como a trombose precede a morte celular na síndrome coronariana aguda, marcadores hemostáticos podem preencher esta lacuna diagnóstica (VAN DER PUTTEN *et al.*, 2006).

O processo de coagulação envolve uma etapa primária, na qual as plaquetas desempenham importante papel, e uma etapa secundária, na qual estão envolvidas proteases que na forma de uma cascata de reações levam a formação do coágulo de fibrina (Figura 3). Segundo o modelo clássico, a hipótese de cascata proposta por Macfarlane em 1964, divide o esquema da coagulação em duas vias denominadas via extrínseca e intrínseca. A via extrínseca é iniciada quando o fator tissular forma um complexo com o fator VII plasmático, o qual ativará o fator X. Por outro lado, a via intrínseca é ativada mediante a ativação do fator XII sanguíneo quando este entra em contato com uma superfície contendo cargas elétricas negativas. Tal ativação requer outros componentes plasmáticos como a pré-caliceína e cininogênio de alto peso molecular. O fator XII ativado, por sua vez, ativa o fator XI, o qual ativa o fator IX. O fator IX forma um complexo com o fator VIII ativado, íons cálcio e fosfolípidos de carga negativa (complexo tenase) que ativa o fator X. A partir

da ativação do fator X, seja pela via intrínseca ou pela via extrínseca, haverá a formação do complexo protrombinase (Fator X ativado, Fator V ativado, íons cálcio e fosfolípidos de carga negativa), o qual exerce seu efeito sobre a protrombina (fator II) transformando-a em trombina e subsequente formação de monômeros de fibrina a partir da clivagem do fibrinogênio. Em condições normais, os polímeros de fibrina formados serão quebrados em fragmentos denominados dímeros-D pela ação do sistema fibrinolítico, o qual é ativado pelos ativadores do plasminogênio tipo tissular (t-PA) ou uroquinase (u-PA) e fator XII ativado (Figura 4). Tanto o sistema de ativação da coagulação como o sistema fibrinolítico é regulado por inibidores ou anticoagulantes naturais. Os mecanismos reguladores da coagulação sanguínea incluem as proteínas C e S (PC e PS) a antitrombina (AT) e o inibidor da via do fator tissular (TFPI), enquanto os mecanismos reguladores do sistema fibrinolítico incluem principalmente o inibidor do ativador do plasminogênio tipo1 (PAI-1), a α 2-antiplasmina, α 1-antitripsina e α 1-macroglobulina (Figura 5).

Quanto ao mecanismo da anticoagulação natural mediado pelas proteínas C e S, este se inicia quando a PC se liga ao seu receptor endotelial (EPCR) tornando-se ativada (PCa), após ligação da trombina à trombosmodulina (TM) expressa na superfície da célula endotelial. Uma vez ativada, a PCa se une a PS e inibe a formação de fibrina por inativar os fatores V e VIII ativados (Figura 3). A antitrombina, por sua vez, exerce o seu efeito anticoagulante por inibir não apenas diretamente a trombina, mas também os fatores XI, IX e X ativados. O efeito inibitório da antitrombina é potencializado por moléculas de sulfato de heparan presentes também na superfície da célula endotelial. Quanto ao TFPI, este exerce seu efeito inibitório sobre a coagulação por se ligar ao fator X ativado e inibindo o complexo do fator tissular com o fator VII, limitando assim a ativação dos fatores IX e X. Com referência aos inibidores do sistema fibrinolítico, estes atuam sobre os ativadores do plasminogênio (PAI-1), bem como diretamente sobre a plasmina (α 2-antiplasmina, α 1-antitripsina e α 1-macroglobulina) ou ainda por dificultar a fibrinólise (TAFI – inibidor da fibrinólise ativado pela trombina).

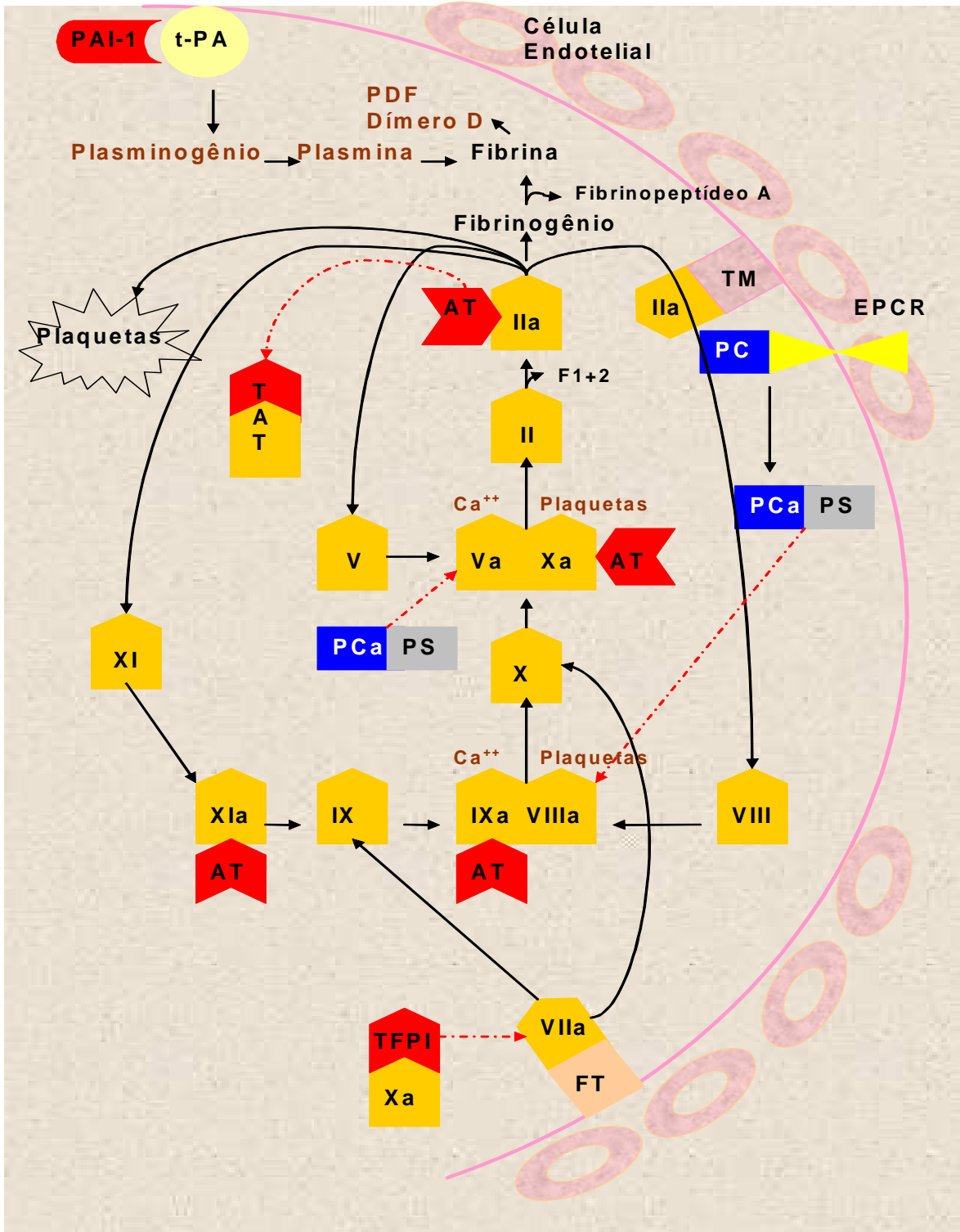


Figura-3 Representação esquemática da Cascata da coagulação.

Representação esquemática do processo de coagulação sanguínea (formação da fibrina) e posterior lise pelo sistema fibrinolítico até a formação de dímero-D

Legenda:

TAT= Complexo trombina-antitrombina; EPCR= Receptor endotelial da Proteína C; AT= Antitrombina; PC= Proteína C; PS= Proteína S; t-PA= Ativador do plasminogênio-tissular; PAI-1= Inibidor do ativador do plasminogênio tipo1; TFPI= Inibidor da via do fator tissular; TM= Trombomodulina; PDF= Produtos de degradação da fibrina; FT= Fator tissular. As figuras e setas em vermelho indicam as vias de inibição.

Em uma visão mais atualizada do complexo sistema hemostático, cumpre ressaltar que *in vivo* a vias intrínseca e extrínseca parecem não ser independentes como descrito anteriormente. Assim, o complexo formado entre o fator tissular e o fator VII ativa não somente o fator X, mas também o fator IX (Figura 3), posicionado tradicionalmente como componente da via intrínseca. Em condições fisiológicas, evidências mostram que o mecanismo hemostático está associado a três complexos procoagulantes, a saber: serinoproteases dependentes de vitamina K (fatores II, VII, IX e X), cofatores associados (V e VIII) e superfície celular rica em fosfolípidos de carga negativa (COLMAN *et al.*, 2001).

A etapa de formação da fibrina é precedida pela conversão da protrombina em trombina, na qual é liberado no plasma fragmentos 1 e 2 da protrombina (F1+2) e que pode ser utilizado como marcador da geração de trombina. Estudos reportam concentrações elevadas de F1+2 nas síndromes coronarianas agudas, mas nenhuma correlação com o desempenho diagnóstico foi observada (VAN DER PUTTEN *et al.*, 2006).

O processo da coagulação sanguínea é compreendido pelo balanço entre coagulação e anticoagulação, contrabalanceado pela fibrinólise e antifibrinólise (JUHAN-VAGUE *et al.*, 2002). A interpretação que se faz é que o grau da aterosclerose e do dano vascular causa alteração na coagulação.

A participação dos mecanismos da hemostasia na formação da placa de ateroma é bem conhecida, através da deposição de fibrina e ativação das plaquetas. O primeiro componente celular a interagir com o endotélio são as plaquetas através das glicoproteínas Ib, IIb e IIIa (HANSON, 2005). A presença de fibrina no ateroma decorre dos efeitos graduais da ativação da coagulação, das plaquetas e da redução da fibrinólise. A trombina não é responsável somente pela clivagem do fibrinogênio resultando na formação de fibrina, mas também se apresenta como forte agonista para a agregação plaquetária e acredita-se que a mesma também desempenha um papel crucial no crescimento do agregado plaquetário. O crescimento da placa ateromatosa causa o estreitamento da luz arterial, causando turbilhonamento do sangue, o que aumenta o “stress” endotelial, ativando a expressão de moléculas de adesão para leucócitos (VCAM, ICAM e E-Selectina) (HANSON, 2005).

Uma vez estabelecida a lesão aterosclerótica, plaquetas, fatores da coagulação e da fibrinólise atuam para produzir o trombo (SHIN *et al.*, 2003; FUSTER *et al.*, 1992).

O principal iniciador da via extrínseca da coagulação é o fator tissular, constituindo o receptor e cofator para os fatores de coagulação VII e VIIa. A ligação do fator VII ao fator tissular resulta na geração de fator Xa e subsequente trombina. Em condições fisiológicas, o fator tissular é expresso em sítios extravasculares. No entanto, o fator tissular é expresso em monócitos e células endoteliais em resposta a citocinas como IL-6 e IL-8. Uma vez ativados, o processo inflamatório e o de coagulação interagem entre si. No Infarto agudo do miocárdio, a ruptura da placa aterosclerótica expõe células que expressam fator tissular, além da presença de monócitos circulantes que expressam fator tissular, iniciando o processo de coagulação e como consequência a oclusão da luz coronariana. Um inibidor endógeno do fator tissular consiste no inibidor da via do fator tissular (TFPI) que se liga ao fator Xa inativando-o. Este complexo se liga e inativa o fator VIIa. Níveis elevados de TFPI refletem elevação de fator Xa ou do próprio TFPI (BUSCH *et al.*, 2005).

2.5 PAPEL DA FIBRINÓLISE NA DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA

A fibrinólise consiste no mecanismo de dissolução enzimática do coágulo de fibrina (Figura 4) que se forma no local de lesão do endotélio vascular. A dissolução da fibrina ocorre ao mesmo tempo em que o endotélio vascular se recompõe. A célula endotelial participa da fibrinólise por meio da secreção de enzimas denominadas ativadoras do plasminogênio (PA), que podem ser do tipo u-PA (uroquinase) e t-PA (tissular). O t-PA é uma enzima da família das serino-proteases e possui baixa afinidade pelo plasminogênio e sua atividade é aumentada na presença de fibrina. O t-PA e plasminogênio se ligam ao coágulo de fibrina formando um complexo ternário importante para a geração de plasmina (HANDIN, 1995).

O plasminogênio é uma proenzima circulante que é transformada em plasmina, a qual além de promover a dissolução do coágulo de fibrina, pode também clivar fibrinogênio, fator V e fator VIII, além de ativar cininas do sistema do complemento. O dímero-D é um produto estável resultante da proteólise do polímero estável de fibrina, cujos níveis encontram-se elevados quando a produção de fibrina está aumentada e o sistema fibrinolítico funcionalmente ativo. Vários mecanismos podem ser utilizados para a avaliação da atividade fibrinolítica, sendo a avaliação dos níveis de dímero-D o mais empregado. Com o envelhecimento do indivíduo, o nível de dímero-D se eleva sendo esta avaliação capaz de prever o aparecimento de doenças cardiovasculares, o que não é relatado em indivíduos jovens e saudáveis (DANESH *et al.*, 2001). Outros marcadores de atividade procoagulante como fragmento 1 + 2 da protrombina (F1+2), complexo trombina-antitrombina (TAT) ou atividade coagulante do fator VII, não apresentam a mesma potencialidade do dímero-D em prever eventos cardiovasculares (LOWE *et al.*, 2001).

O próprio endotélio controla a síntese dos ativadores do plasminogênio por meio da síntese de inibidores específicos do sistema fibrinolítico (LORENZI, 2003). O principal inibidor da fibrinólise é o inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1), o inibidor primário dos ativadores fisiológicos do plasminogênio (Figura 5). O PAI-1 foi o primeiro a ser descoberto, e é estabilizado no plasma ligando-se à proteína S e à vitronectina, uma glicoproteína plasmática de adesão (COLEN, 1991), enquanto a ação do PAI-1 pode ser neutralizada pela PCa (VAN de WOUWER *et al.*, 2003). O aumento dos níveis de PAI-1 tem sido relatado em indivíduos após infarto agudo do

miocárdio, em relação à população em geral, e este aumento se correlaciona à recorrência do infarto (MARTINEZ, 2003). O aumento dos níveis de PAI-1 pode comprometer o sistema fibrinolítico e favorecer a permanência do coágulo de fibrina. Sabe-se que a deficiência na fibrinólise está associada a doenças cardiovasculares, já que níveis elevados do PAI-1 estão presentes em portadores de tais doenças. Um possível papel para o PAI-1 na parede arterial está associado à baixa celularidade das placas instáveis. A migração das células para a região da placa depende da ação de enzimas com atividade colagenase que é desempenhada pela plasmina. Como o PAI-1 inibe a formação da plasmina, este inibidor contribui para a baixa celularidade da placa resultando em instabilidade (SOBEL, 1999).

A trombina também é responsável pela modulação da fibrinólise, através da ativação do Inibidor da Fibrinólise ativado pela Trombina (TAFI) atuando como um regulador (inibitório) da fibrinólise com implicações importantes nas doenças cardiovasculares (JUHAN-VAGUE *et al.*, 2002). O TAFI ativado (TAFIa), também chamado de carboxipeptidase B, carboxipeptidase U ou carboxipeptidase R, inibe a fibrinólise pela remoção dos resíduos de arginina e lisina carboxiterminais da fibrina, os quais são importantes para a interação do t-PA e plasminogênio com o polímero de fibrina no processo de formação da plasmina.

O TAFI é uma proteína de peso molecular de aproximadamente 60.000 Da, que pode ser clivada pela trombina no resíduo de arginina 92, resultando na formação da enzima ativa de peso molecular de aproximadamente 35.000 Da (BOFFA; KOSCHINSKY, 2007).

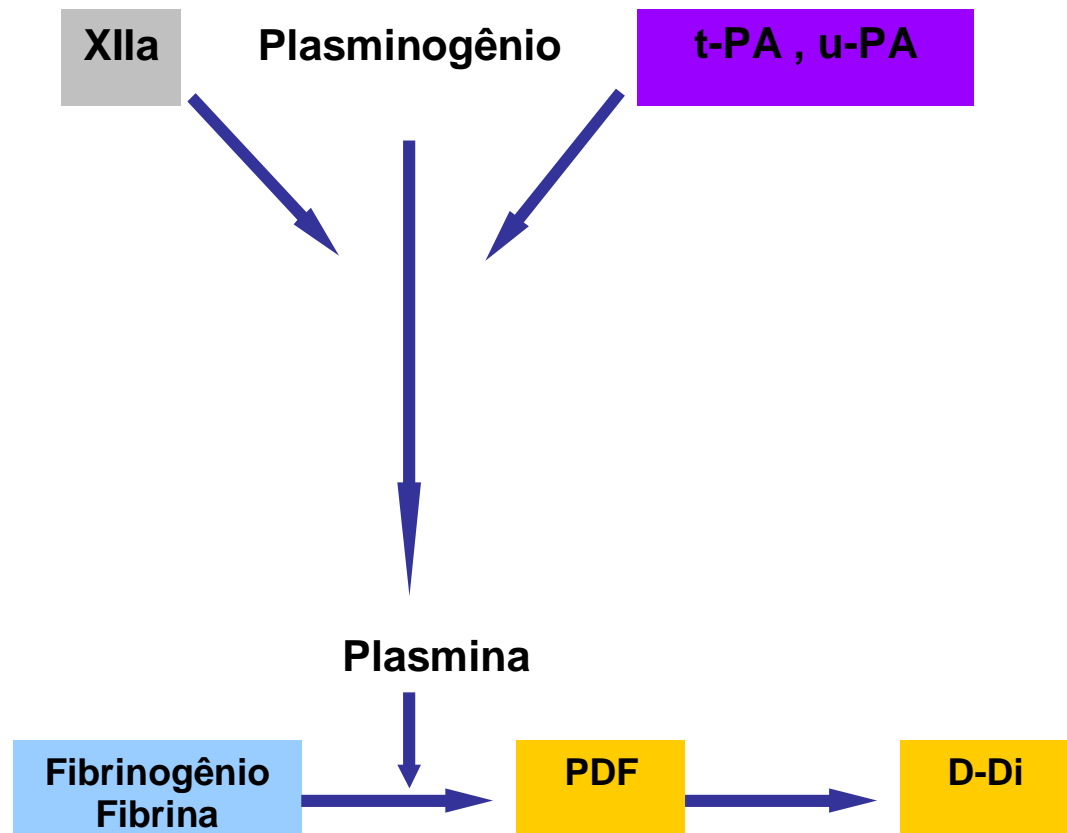


Figura-4 Representação esquemática do sistema fibrinolítico

Legenda:

Via Comum da Coagulação

Via Intrínseca

Via Extrínseca

Produtos de degradação
Fibrina/Fibrinogênio

A figura representa a via de ativação enzimática do plasminogênio à plasmina, culminando na degradação enzimática dos polímeros de fibrina, levando à formação de produtos de degradação da fibrina (PDF) e à formação de um produto estável, o dímero-D (D-Di).

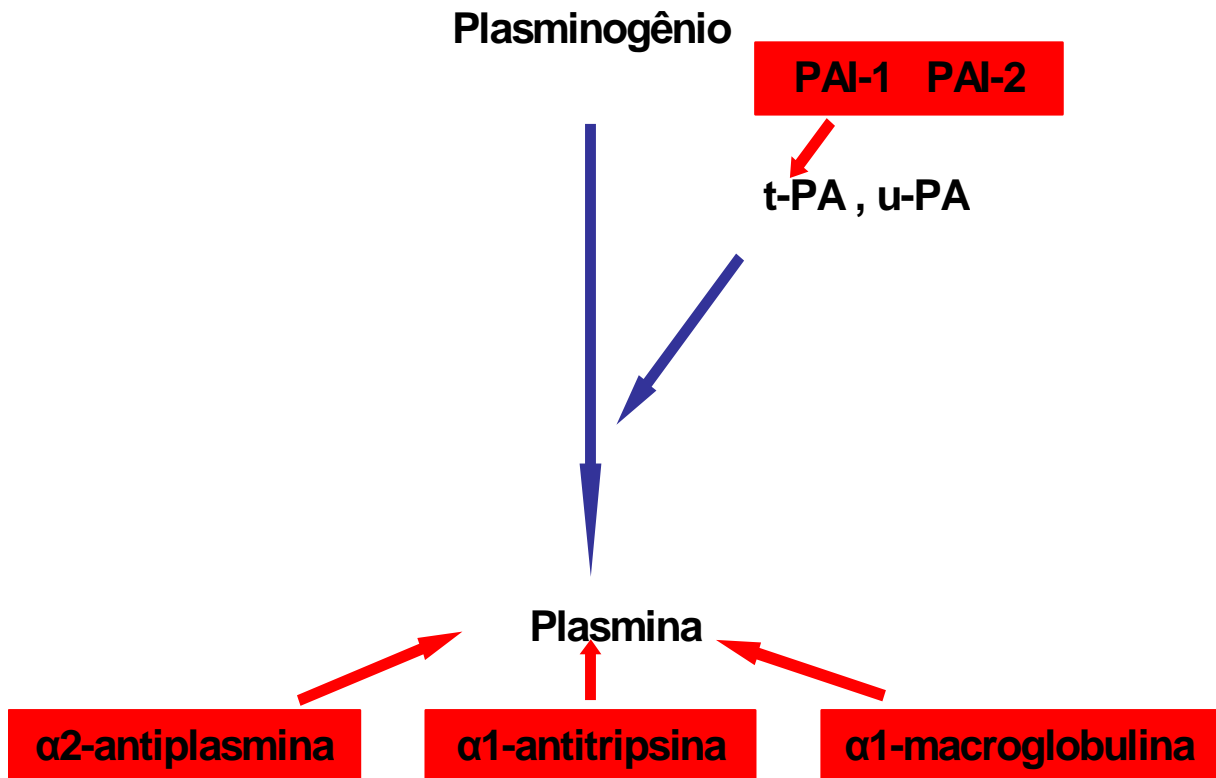


Figura-5 Representação esquemática do mecanismo de inibição da fibrinólise

Legenda:

PAI = Inibidor do Ativador do Plasminogênio

t-PA = Ativador do Plasminogênio - tissular

u-PA = Ativador do Plasminogênio - uroquinase

Inibidores da fibrinólise

Representação esquemática dos mecanismos de inibição da fibrinólise através dos inibidores diretos dos ativadores do plasminogênio ou pela inibição da ação da plasmina.

O TAFI pode ser ativado pela tripsina, plasmina ou trombina. A ativação ocorre pela clivagem na Arginina-92, resultando na liberação de um peptídeo glicosilado. A ativação do TAFI pela trombina é um processo relativamente ineficiente e é estimulado cerca de 1250 vezes pela interação da trombina com o receptor da célula endotelial, a trombomodulina (VAN TILBUR *et al.*, 2000).

A ativação do TAFI pela trombina mostra o papel do sistema de coagulação na regulação da fibrinólise (Figura 6). Quantidades pequenas de trombina são insuficientes para a ativação do TAFI. A formação de trombina estimulada pela via intrínseca da coagulação, através da ativação do fator XI pela trombina e o poder de amplificação dos complexos tenase e protrombinase, garantem altas concentrações de trombina para a ativação do TAFI. Pode-se inferir que a via extrínseca garante trombina para a formação do coágulo de fibrina, enquanto a via intrínseca garante trombina para a proteção do coágulo contra a ação do sistema fibrinolítico. Com a inativação dos fatores Va e VIIIa pela proteína C ativada, a formação de trombina fica prejudicada, reduzindo a ativação do TAFI (VAN TILBUR *et al.*, 2000).

Evidências *in vivo* do papel do TAFI na fibrinólise foram obtidas de estudo em modelos experimentais de trombose. Estudos utilizando a inibição do TAFIa aumentam a trombólise induzida por t-PA (VAN TILBUR *et al.*, 2000).

A geração exacerbada de trombina com conseqüente proteção indesejada do coágulo de fibrina pode causar distúrbios trombóticos. Então, a ativação exacerbada de TAFI pode contribuir para um estado pró-trombótico. Níveis elevados de TAFI *in vitro* se correlacionam bem com o aumento da atividade do TAFIa e favorecem o estado anti-fibrinolítico. No estudo de trombofilia de Leiden (LETS), o aumento dos níveis plasmáticos de TAFI se mostrou associado a um leve risco de trombose venosa (VAN TILBUR *et al.*, 2000).

O TAFIa é capaz de converter a bradicinina em um composto inativo e inibir a hipotensão causada pela bradicinina. As anafilotoxinas C3a e C5a são importantes mediadores inflamatórios e potentes quimiotáticos para leucócitos. TAFIa inativa C3a e C5a por hidrólise do resíduo de arginina carboxiterminal, reduzindo seus efeitos pró-inflamatórios (BOUMA, 2004).

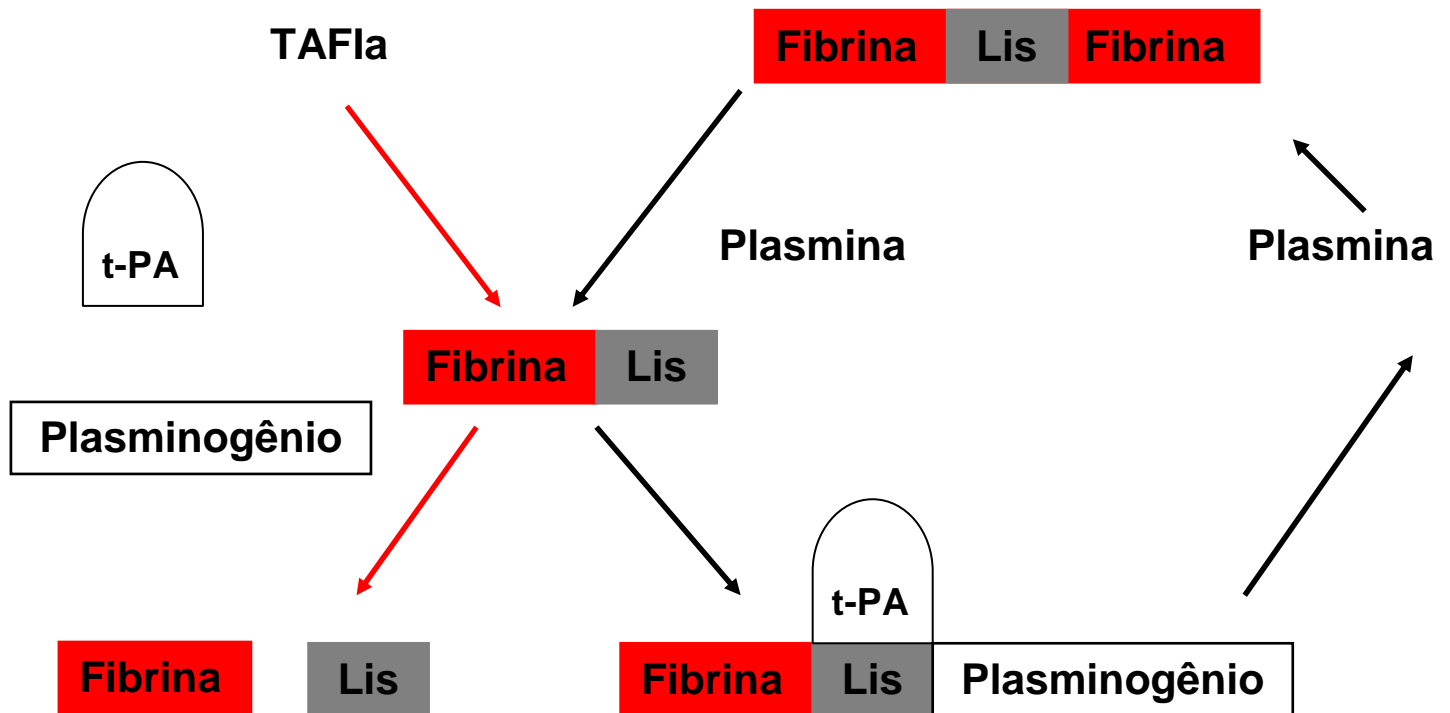


Figura-6 Representação esquemática do mecanismo de inibição da fibrinólise pelo inibidor da fibrinólise ativado pela trombina - TAFI

O processo de formação da plasmina é favorecido pela presença de fibrina, uma vez que o t-PA possui baixa afinidade pelo plasminogênio, ocorrendo a formação de um complexo ternário fibrina/plasminogênio/t-PA. As setas em vermelho representam o mecanismo de ação do TAFIa, através da remoção dos resíduos de lisina carboxiterminal da molécula de fibrina impedindo a formação do complexo fibrina/plasminogênio/t-PA, comprometendo a formação de plasmina.

2.6 O ENDOTÉLIO VASCULAR E DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA

O endotélio desempenha papel importante na hemostasia vascular. A célula endotelial por si está diretamente relacionada à aterosclerose (WU *et al.*, 2003). É de grande importância identificar e determinar marcadores biológicos da função endotelial *in vivo*, pois podem fornecer informações importantes sobre a evolução e prognóstico das doenças vasculares.

O endotélio é uma camada de células que regula a troca de água e pequenas partículas, bem como o tônus vasomotor, coagulação e fibrinólise nos vasos sanguíneos. Em condições fisiológicas, as células endoteliais liberam várias moléculas, incluindo óxido nítrico (NO), prostaciclina (PGI₂), fator hiperpolarizante derivado de endotélio, trombospondina e ativador do plasminogênio tissular (tPA). Estas moléculas facilitam a vasodilatação, fibrinólise, inibe a agregação plaquetária e a coagulação (CONSTANS, 2006). Além disso, o endotélio participa ativamente dos mecanismos de anticoagulação natural mediados pela proteína C e S, através da ativação da proteína C pela trombina ligada à trombospondina.

A disfunção endotelial (Figura 7) pode ser caracterizada como alteração no fenótipo endotelial, ou seja, sua atividade anticoagulante, antiagregante plaquetária, pró-fibrinolítica e vasorelaxante para um endotélio pró-coagulante, ativador de plaquetas, antifibrinolítico e vasoconstritor. Nestas condições as células endoteliais liberam baixos níveis destas moléculas já descritas e liberam altos níveis de endotelina-1, angiotensina II, PAI-1 e fator von Willebrand (CONSTANS, 2006).

A proteína C (PC) é uma glicoproteína plasmática, vitamina K dependente, sintetizada no fígado. É transformada em sua forma ativa, PCa pela clivagem de resíduo N-terminal mediada pela trombina. Conforme mencionado anteriormente, a ativação efetiva da PC pela trombina requer a glicoproteína constitutiva do endotélio, a trombospondina (TM) amplificando o evento mais de 1000 vezes. A trombina quando complexada com a TM tem sua atividade pró-coagulante (clivagem do fibrinogênio, ativação dos fatores V e VIII, agregação plaquetária) reduzida. A ativação da PC pelo complexo trombina-trombospondina é amplificada cerca de 20 vezes quando ligada ao receptor endotelial para PC (EPCR) (VAN de WOUWER *et al.*, 2004).

A trombomodulina pode ser liberada na lesão endotelial na forma solúvel (TMs). Níveis elevados de trombomodulina solúvel parecem estar associados com a severidade da doença arterial coronariana, infarto e doença arterial oclusiva periférica, enquanto baixos níveis de trombomodulina predizem eventos cardiovasculares em indivíduos saudáveis (CONSTANS, 2006). Embora controverso, estudos sugerem que níveis de TM são inversamente relacionados à doença arterial coronariana, implicando que a forma solúvel da TM pode desempenhar um efeito vasoprotetor (WU *et al.*, 2003).

Marcadores de lesão endotelial

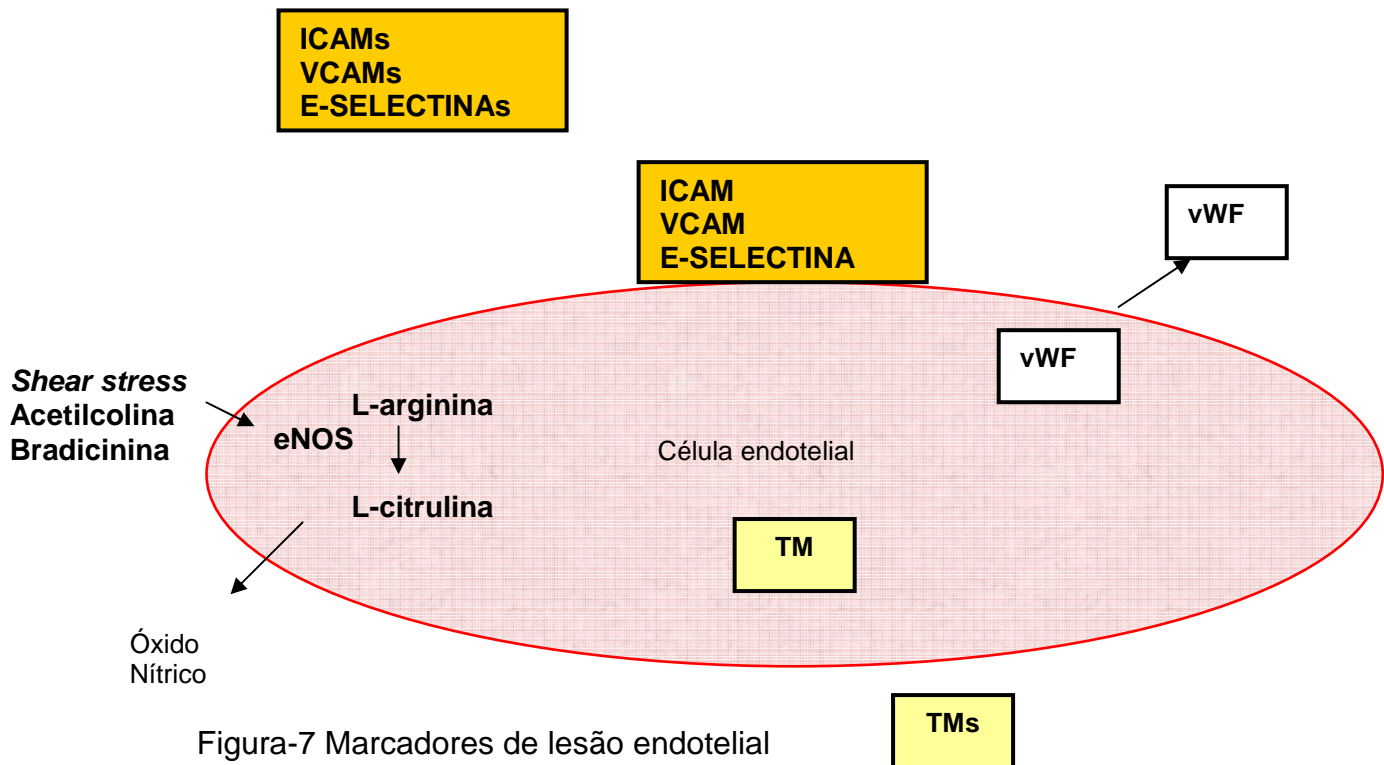


Figura-7 Marcadores de lesão endotelial

Legenda:

TM: Trombomodulina; TMs: Forma solúvel; eNOS: Óxido Nítrico Sintase endotelial; vWF: Fator de von Willebrand; ICAM: Molécula de adesão intercelular; ICAMs: Forma solúvel; VCAM: Molécula de adesão celular vascular; VCAMs: Forma solúvel; E-Selectina e E-Selectina s (forma solúvel)

A figura representa alterações do fenótipo da célula endotelial: expressão de moléculas de adesão para leucócitos (ICAM, VCAM e E-Selectina), agregante plaquetário (fator de von Willebrand), perda de moléculas constitutivas (Trombomodulina) e ação vasoconstritora (redução da síntese de óxido nítrico)

2.7 INFLAMAÇÃO E DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA

As citocinas são proteínas que possuem propriedades modificadoras da resposta biológica, cuja produção é imediata em resposta a um estímulo celular, não sendo estocadas nas células que as sintetizam.

O Fator de Necrose Tumoral tipo α (TNF α) consiste em uma citocina produzida por macrófagos, monócitos, células NK e linfócitos ativados. Atua sobre o endotélio vascular estimulando-o a expressar moléculas de adesão para leucócitos, aumenta a adesividade de neutrófilos ao endotélio e estimula a liberação de outras citocinas (IL-1 e em menor proporção a IL-6). A produção crônica e em baixas concentrações de TNF α leva ao remodelamento tecidual por ação de metaloproteinases e reduz a contratilidade do miocárdio através da ativação de óxido nítrico sintase, produzindo o óxido nítrico, com conseqüente relaxamento da musculatura vascular (STEFAN *et al.*, 2000). As metaloproteinases são endopeptidases zinco-dependentes que desempenham importante papel no remodelamento fisiológico e patológico da matriz extracelular em vários tecidos e doenças. A expressão das metaloproteinases pode ser estimulada por citocinas pró-inflamatórias como o TNF α e IL-1 β (KADEN *et al.*, 2003).

A proteína C reativa (PCR) é definida como um reator de fase aguda sensível, mas não específico, cuja concentração se eleva no plasma mais de 25% em resposta a um estímulo inflamatório. A PCR está apenas associada a IL-6 e TNF α e não ao IL-1 β (MAAT *et al.*, 2002; HADDY *et al.*, 2003). Sua produção não está restrita somente ao fígado, podendo ser sintetizada por outros tecidos, como a placa aterosclerótica, células musculares lisas das artérias coronarianas, célula endotelial aórtica e adipócitos (GOTTO, 2007). Isso sugere que o aumento dos níveis de PCR após infarto agudo do miocárdio é proveniente do tecido lesado (YASOJIMA *et al.*, 2001).

Estudos prospectivos demonstram a associação entre marcadores da inflamação como fibrinogênio e PCR e doenças cardiovasculares (HANSSON, 2005). A elevação dos níveis plasmáticos de fibrinogênio, fator VIII e muitas outras proteínas encontradas em abundância no plasma constituem marcador de risco, pois refletem inflamação crônica e, em indivíduos sadios, predizem eventos cardiovasculares. Em geral, estas proteínas são conhecidos como reatores de fase aguda, que são

proteínas secretadas principalmente pelo fígado, que respondem a estímulos inflamatórios via citocinas pró-inflamatórias conseqüente ao dano celular ou infecção (TRACY, 2003). Utilizando o fibrinogênio como exemplo, o mecanismo pelo qual este aumenta a formação do coágulo envolve sua participação nas ligações entre as plaquetas, que é essencial para a formação do coágulo de fibrina e aumenta a viscosidade sanguínea (TRACY, 2003).

Níveis elevados de IL-6, PCR e fibrinogênio estão relacionados com a desestabilização da placa aterosclerótica nas síndromes coronarianas agudas (ZAIRIS *et al.*, 2006). Estudos demonstraram a capacidade de altas concentrações plasmáticas da PCR em predizer eventos coronarianos em mulheres, após ajuste de fatores de riscos utilizados na pontuação de risco de Framingham, porém demonstraram pobre correlação com resultados de testes que quantificam a extensão da aterosclerose (PEARSON *et al.*, 2003). Dados epidemiológicos sugerem que a atividade inflamatória sistêmica associa-se à incidência de doenças cardiovasculares em populações de indivíduos saudáveis e portadores de doença aterosclerótica (PEARSON *et al.*, 2003).

A PCR tem sido amplamente utilizada, pois pode ser adotada como fator de risco adicional para doença cardiovascular, porém, estudos realizados após o ano de 2000 mostraram que a PCR apresenta uma aplicação moderada em predizer doença arterial coronariana (DANESH *et al.*, 2004), devendo ser adotada com cautela na avaliação clínica, tornando-se essencial avaliar inicialmente os fatores de risco clássicos para DAC e o cálculo de risco para DAC em 10 anos (PEARSON *et al.*, 2003).

Todavia, mais recentemente no estudo SHAPE (Screening for Heart Attack Prevention and Education), sugeriu-se que pacientes com níveis de PCR ultrasensível superiores a 4 mg/L fossem classificados como “alto risco”, requerendo uma intervenção mais agressiva (NAGHAVI *et al.*, 2006).

Recentemente, uma proteína denominada CXCL16 foi identificada, e esta, combina funções de citocinas pró-inflamatórias e de receptores *scavenger*. A CXCL16 é uma proteína transmembrânica, cujo domínio extracelular exerce a função de quimiocina, capaz de se ligar a células que expressam receptores CXCR6 (linfócitos T)

tornando-as ativadas. Este domínio extracelular pode sofrer ação de metaloproteinases gerando CXCL16 solúvel.

Sua ação de receptor *scavenger* facilita a captação de moléculas de LDL oxidada, favorecendo a formação de células espumosas. A proteína CXCL16 é expressa em macrófagos e células musculares lisas aórticas, e sua expressão está aumentada nas placas ateroscleróticas. Estudos mostram que a CXCL16 solúvel está aumentada em pacientes com doença arterial coronariana crônica e síndrome coronariana aguda, apontando como uma variável independente para DAC, mostrando-se superior à PCR (LEHRKE *et al.*, 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a associação entre parâmetros hemostáticos e pró-inflamatório e a gravidade da doença arterial coronariana em indivíduos submetidos à angiografia coronariana.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar os níveis plasmáticos de dímero-D (D-DI).
- Determinar os níveis plasmáticos do inibidor do ativador do plasminogênio tipo1 (PAI-1).
- Determinar os níveis plasmáticos do Inibidor de fibrinólise ativado pela trombina (TAFI).
- Determinar os níveis plasmáticos de trombomodulina (TM).
- Determinar os níveis de Proteína C reativa (PCR).
- Correlacionar os parâmetros estudados entre si.
- Correlacionar todos os parâmetros acima com a gravidade da doença arterial coronariana.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Os indivíduos participantes do projeto foram selecionados no setor de Hemodinâmica do Hospital Socor, caracterizados como pacientes crônicos para doença arterial coronariana, com diagnóstico estabelecido por angiografia, com idade compreendida entre 35 e 65 anos, de ambos os sexos e nível sócio-econômico similar.

Foram selecionados 123 pacientes classificados de acordo com os resultados angiográficos:

- 1- Grupo Angiograficamente normais (AnN): 35 pacientes angiograficamente normais
- 2- Grupo Ateromatose Leve/Moderada (ALM): 31 pacientes com ateromatose leve ou moderada determinada pela angiografia
- 3- Grupo Ateromatose Grave (AG): 57 pacientes com ateromatose grave determinada pela angiografia

A classificação dos participantes nos três grupos acima foi realizada por cardiologistas especializados na leitura e interpretação de imagens obtidas por meio de angiografia coronariana.

O presente estudo recebeu parecer favorável sob o ponto de vista ético e formal pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Socor (Anexo1) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Anexo2), como parte integrante de um projeto de pesquisa intitulado “Caracterização bioquímica, hemostática e molecular da doença arterial coronariana”. Os pacientes selecionados para participar do projeto foram esclarecidos sobre o objetivo do presente estudo e aqueles que estiveram de acordo, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Anexo3). Foram registrados todos os dados dos pacientes em uma ficha clínica (Anexo4) a qual foi preenchida em todos os casos.

Tabela 1 - Caracterização dos grupos estudados

| | AnN | ALM | AG | p |
|---------------------|------------|------------|------------|----------|
| n (M/F) | 35 (16/19) | 31 (17/14) | 57 (31/26) | ns |
| Homens | 16 (45,7%) | 17 (54,8%) | 31 (54,4%) | ns |
| Idade (anos) | 59,0 ± 7,5 | 59,5 ± 9,0 | 60,5 ± 8,8 | ns |
| IMC | 25,3 ± 4,1 | 26,8 ± 4,7 | 25,8 ± 3,5 | ns |

Caracterização quanto ao n (tamanho da amostra), M (sexo masculino) e F (sexo feminino), idade e IMC (índice de massa corporal). Valores descritos como média e desvio padrão ou percentual de pacientes. AnN= angiograficamente normais; ALM= ateromatose leve/moderada; AG= ateromatose grave.

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO ADOTADOS

Critérios de inclusão

Idade entre 35 e 65 anos

Os pacientes foram selecionados no setor de Hemodinâmica do Hospital Socor com diagnóstico estabelecido por angiografia.

Os pacientes do grupo Angiograficamente Normais são pacientes que foram admitidos pelo serviço apresentando sintomas sugestivos e que, no entanto, não apresentaram alterações à angiografia.

Critérios de exclusão

Pacientes com história prévia de doença síndrome coronariana aguda nos 3 meses que antecederam a coleta ou que estavam em uso de anticoagulantes orais, estatinas ou estrogênios.

Pacientes com níveis de triglicérides acima de 400 mg/dL.

Pacientes apresentando doenças intercorrentes como distúrbios da coagulação, doenças renais, hepáticas, auto-imunes e câncer.

4.3 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Foram coletadas amostras de sangue dos pacientes após jejum de 12 a 14 horas, os quais foram orientados a não ingerir bebida alcoólica nas 72 horas que antecedem a coleta e a não fazer atividade física nas 24 horas anteriores a coleta de sangue.

A coleta de sangue foi realizada utilizando tubos de coleta do sistema Vacuette® (Greiner Bio-one), sendo 5 mL em citrato de sódio para obtenção do plasma e 5 mL em tubo sem anticoagulante para a obtenção do soro. As amostras de sangue obtidas foram rapidamente centrifugadas a 2500 rpm por 20 minutos para separação do plasma e soro, que foram divididos em várias alíquotas e estocados à -70° C até o momento da realização dos testes.

4.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os parâmetros avaliados neste estudo foram:

Parâmetros hemostáticos

Dímero-D (D-DI)

Inibidor do ativador do plasminogênio -1 (PAI-1)

Inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI)

Trombomodulina (TM)

Parâmetro inflamatório

Proteína C reativa ultra-sensível (PCRus)

4.5 MÉTODOS

4.5.1 Fatores de risco

A avaliação dos fatores de risco como tabagismo, sedentarismo e história familiar para DAC, foi baseada nas recomendações das III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Prevenção de Aterosclerose (SBC, 2001). Foram considerados tabagistas os indivíduos com consumo regular de qualquer quantidade de cigarros por um período superior a seis meses até o mês anterior ao preenchimento da ficha clínica. Foram considerados sedentários os pacientes que não praticavam exercícios físicos regularmente, com frequência mínima de três vezes por semana por um tempo de 40 minutos. Foram considerados portadores de história familiar para DAC aqueles pacientes que apresentaram parentes de primeiro grau com menos de 55 anos para homens e 65 anos para mulheres com DAC diagnosticada. Foram considerados hipertensos os pacientes com diagnóstico prévio de hipertensão arterial que faziam uso regular de medicamentos anti-hipertensivos. Portadores de SCA anterior a três meses da entrevista foram considerados para o trabalho, incluindo aqueles que apresentaram quadro de infarto agudo do miocárdio ou angina instável.

4.5.2 Angiografia coronariana

A angiografia coronariana (Figura 8) é um exame utilizado para explorar as artérias coronarianas através de raios-X seriados, realizada juntamente com a cateterização cardíaca. Previamente ao exame, o paciente recebe um sedativo suave. O médico especialista insere o cateter por uma pequena incisão na artéria braquial ou diretamente na artéria femoral, após a desinfecção e aplicação de anestésico local. O cateter é cuidadosamente guiado até o coração e acompanhado por imagens de raios-X, denominadas fluoroscopias. Após este procedimento, injeta-se um contraste iodado (Telebrix[®] ou Hexabrix[®]) que permite visualizar as artérias coronarianas. O complexo coração e artérias coronarianas são então filmados e gravados enquanto o coração bate.

A angiografia coronariana foi realizada por médicos especialistas do Departamento de Hemodinâmica do Hospital Socor e os filmes obtidos foram examinados por três cardiologistas experientes. Os laudos foram apresentados conforme critérios definidos pela redução dos diâmetros intraluminais: até 30% de estenose foi classificada como ateromatose leve; de 30 a 70% de estenose foi classificada como ateromatose moderada, e, acima de 70% de estenose foi classificada como ateromatose grave e descrito se em uma ou mais coronárias afetadas. Os pacientes com ausência de ateromatose nas coronárias foram classificados como portadores de coronárias isentas de ateromatose (coronárias lisas).

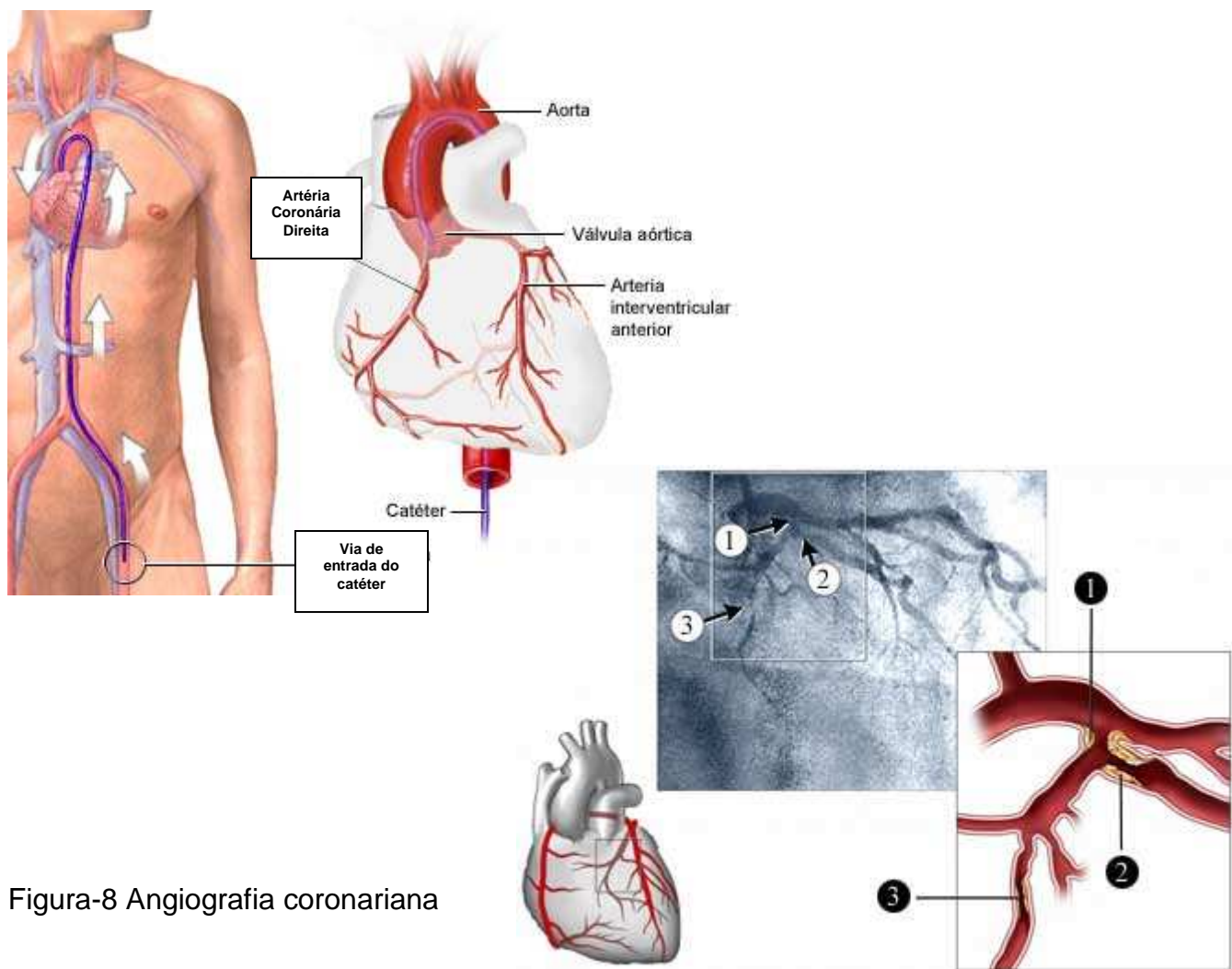


Figura-8 Angiografia coronariana

À esquerda, representação esquemática do processo de cateterização cardíaca. O cateter é inserido através de uma incisão na artéria femoral e guiado até o coração (figura amplificada à direita). No quadrante inferior à direita, representação esquemática de uma imagem angiográfica mostrando os pontos de estenose das artérias coronarianas representados pelos números 1, 2 e 3. Fonte disponível em: <http://www.walgreens.com/library/graphics/images/es/18129.jpg>

4.5.3 Parâmetros hemostáticos

a) Dímero D (D-DI)

A determinação quantitativa do D-DI foi realizada em plasma citratado utilizando o conjunto diagnóstico VIDAS® D-Dimer Exclusion™ (bioMérieux® – França), cujo princípio analítico é o ensaio imunoenzimático fluorescente (ELFA), seguindo rigorosamente as instruções fornecidas pelo fabricante. O ensaio foi realizado utilizando-se o equipamento MiniVidas® (bioMérieux®) em sistema completamente automatizado.

O princípio do teste associa o método imunoenzimático por sanduíche com uma detecção final em fluorescência. Na primeira etapa a amostra é incubada com o anticorpo monoclonal anti-D-DI marcados com fosfatase alcalina. A mistura amostra/conjugado é aspirada para o interior de um cone que possui anticorpos monoclonais anti-D-DI fixos em sua superfície, formando assim um sanduíche. Os anticorpos não ligados são removidos por sucessivas lavagens. Na segunda etapa o substrato (4-metil-umbeliferil fosfato) é adicionado ao sistema e a fosfatase alcalina catalisa a reação de hidrólise deste substrato, formando um produto fluorescente (4-metil-umbeliferona) cuja leitura é realizada a 450nm. A intensidade da fluorescência é proporcional á concentração do D-DI na amostra.

A curva de calibração foi realizada utilizando-se dois calibradores fornecidos no conjunto diagnóstico e dois plasmas controles foram utilizados para verificar o desempenho do ensaio.

Valor de referência: até 500 ng/mL

b) Inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI)

A determinação quantitativa do TAFI foi realizada em plasma citratado utilizando o conjunto diagnóstico Visualize™ TAFI Antigen Kit (AFFINITY BIOLOGICALS INC. – Canadá), cujo princípio analítico é o ensaio imunoenzimático (ELISA) de captura, seguindo rigorosamente as instruções fornecidas pelo fabricante.

O fundamento do teste ELISA baseia-se na especificidade da ligação entre antígenos e anticorpos. No teste ELISA uma placa para imunoenensaio apresenta anticorpos policlonais anti-TAFI humano fixados em sua superfície. Os antígenos presentes na amostra se ligam aos anticorpos fixos, e o restante da amostra que não se liga é removida após lavagens sucessivas. Em seguida, anticorpos monoclonais contra o TAFI, marcados com uma enzima (peroxidase), se ligam ao TAFI em outro sítio de ligação. Os anticorpos que não se ligam são removidos após lavagens sucessivas. Na última etapa, adiciona-se o substrato (TMB) para peroxidase gerando um produto colorido. A reação é interrompida e a intensidade da cor produzida, cuja leitura é realizada a 450nm, é diretamente proporcional à concentração do TAFI na amostra.

A leitura da reação foi realizada utilizando-se o leitor de microplacas BIO-RAD 550-USA.

A curva de referência foi realizada utilizando-se o padrão fornecido pelo fabricante obtendo-se os pontos de 6.8, 3.4, 1.7, 0.850, 0.425 e 0.213 µg/mL. Dois plasmas controles fornecidos no conjunto diagnóstico foram utilizados para verificar o desempenho do ensaio.

A concentração do TAFI nas amostras foi obtida através da equação:

$$\text{Log (y)} = A + B \times \text{Log (x)}$$

Valor de referência: 5.8 a 10.0 µg/mL

c) Trombomodulina (TM)

A determinação quantitativa da TM foi realizada em plasma citratado utilizando o conjunto diagnóstico IMUBIND® Thrombomodulin ELISA Kit (american diagnostica inc. - USA), cujo princípio analítico é o ensaio imunoenzimático (ELISA) de captura, seguindo rigorosamente as instruções fornecidas pelo fabricante.

O fundamento do teste ELISA baseia-se na especificidade da ligação entre antígenos e anticorpos. No teste ELISA uma placa para imunoenensaio apresenta

anticorpos monoclonais anti-TM humano fixados em sua superfície. Os antígenos presentes na amostra se ligam aos anticorpos fixos, e o restante da amostra que não se liga é removida após lavagens sucessivas. Em seguida, anticorpos monoclonais contra TM, marcados com uma enzima (peroxidase), se ligam a TM em outro sítio de ligação. Os anticorpos que não se ligam são removidos após lavagens sucessivas. Na última etapa, adiciona-se o substrato (TMB) para a peroxidase gerando um produto colorido. A reação é interrompida e a intensidade da cor produzida, cuja leitura é realizada a 450nm, é diretamente proporcional à concentração da TM na amostra.

A leitura da reação foi realizada utilizando-se o leitor de microplacas BIO-RAD 550-USA.

A curva de referência foi realizada utilizando-se o padrão fornecido pelo fabricante obtendo-se os pontos de 10.0, 5.0, 2.5, 1.25, 0.625, 0 ng/mL, e, o plasma controle fornecido no conjunto diagnóstico foi utilizado para verificar o desempenho do ensaio.

A concentração da TM nas amostras foi obtida através da equação:

$$y = A + Bx + Cx^2$$

Valor de referência:

Homens: 4.00 a 5.35 ng/mL

Mulheres: 2.73 a 4.79 ng/mL

d) Inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1)

A determinação quantitativa do PAI-1 foi realizada em plasma citratado utilizando o conjunto diagnóstico IMUBIND[®] Plasma PAI-1 ELISA Kit (american diagnostica inc. - USA), cujo princípio analítico é o ensaio imunoenzimático (ELISA) de captura, seguindo rigorosamente as instruções fornecidas pelo fabricante.

O fundamento do teste ELISA baseia-se na especificidade da ligação entre antígenos e anticorpos. No teste ELISA uma placa para imunoenensaio apresenta anticorpos monoclonais anti-PAI-1 humano fixados em sua superfície. Os antígenos presentes na amostra se ligam aos anticorpos fixos, e o restante da amostra que não se liga é removida após lavagens sucessivas. Em seguida, anticorpos monoclonais contra o PAI-1, marcados com uma enzima (peroxidase), se ligam ao PAI-1 em outro sítio de ligação. Os anticorpos que não se ligam são removidos após lavagens sucessivas. Na última etapa, adiciona-se o substrato (TMB) para a peroxidase gerando um produto colorido. A reação é interrompida e a intensidade da cor produzida, cuja leitura é realizada a 450nm, é diretamente proporcional à concentração do PAI-1 na amostra.

A leitura da reação foi realizada utilizando-se o leitor de microplacas BIO-RAD 550-USA.

A curva de referência foi realizada utilizando-se o padrão fornecido pelo fabricante obtendo-se os pontos de 50, 25, 12.5 e 0 ng/mL, e, o plasma controle fornecido no conjunto diagnóstico foi utilizado para verificar o desempenho do ensaio.

A concentração do PAI-1 nas amostras foi obtida através da equação:

$$y = 0.0323X + 0.152$$

Valor de referência: 2 a 47 ng/mL

4.5.4 Parâmetro pró-inflamatório

a) Proteína C reativa Ultra-sensível (PCRus)

A determinação quantitativa da PCRus foi realizada em soro utilizando o conjunto diagnóstico BIOTÉCNICA[®] PROTEÍNA C-REATIVA TURBIDIMETRIA, cujo princípio analítico é o método turbidimétrico com látex aprimorado, seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante. A presença da PCR na amostra causa a aglutinação das partículas do látex cobertas com anticorpos anti PCR. O grau de aglutinação é proporcional à concentração da PCR na amostra. Este processo baseia-se na

detecção ótica de partículas muito pequenas suspensas em meio líquido. Quando o anticorpo e antígeno são misturados forma-se imunocomplexos. A mistura adquire turbidez, que é proporcional à quantidade de antígeno. Este método é chamado de homogêneo, pois não possui fase sólida.

O ensaio foi realizado utilizando-se o equipamento Cobas Mira Plus[®] em sistema completamente automatizado aumentando o volume de amostra para 50 µL e usando o calibrador diluído 1:10 com água deionizada. As amostras foram acondicionadas no equipamento e os resultados impressos diretamente após o término da análise. Foi utilizado o soro controle SERODOS[®] (IN VITRO[®] DIAGNÓSTICA) para verificar o desempenho do ensaio.

Valor de referência: 0.1 a 2.5 mg/L

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento estatístico utilizado no presente estudo foi inteiramente casualizado.

Para a comparação entre os grupos, foi empregado o teste de análise de variância (ANOVA) para os parâmetros que apresentaram distribuição normal e homocedasticidade. O teste de análise de variância Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn, foi aplicado para os testes que não apresentaram distribuição normal e/ou homocedasticidade. A diferença entre as médias de duas variáveis foi calculada pelo teste de *t* de Student ou teste de Mann-Whitney quando aplicável. Foi realizado o teste de correlação *Pearson* considerando todos os indivíduos estudados. O nível de significância adotado foi de 0.05.

Os programas *Sigma Stat* versão 1.0 e *Prism* versão 3.0 foram utilizados para realizar as análises e plotar os gráficos, respectivamente.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS QUANTO AOS FATORES DE RISCO

Os dados obtidos referentes à presença de fatores de risco associados à aterosclerose e evento de síndrome coronariana aguda (SCA), ocorrido três meses antes da entrevista são apresentados na Tabela 2, descrito como número de pacientes (n) e percentual da variável presente nos integrantes dos grupos angiograficamente normais (AnN), ateromatose leve/moderada (ALM) e ateromatose grave (AG).

Tabela 2 – Caracterização dos grupos quanto aos fatores de risco e presença de síndrome coronariana aguda (SCA)

| | AnN | ALM | AG | p |
|----------------------------------|------------|-------------------------|-------------------------|--|
| n | 35 | 31 | 57 | - |
| Tabagismo | 6 (17,1%) | 8 (25,8%) | 23 (40,4%) ^a | p ^a = 0,020 |
| Hipertensão arterial | 31 (88,6%) | 25 (80,6%) | 48 (84,2%) | ns |
| Sedentarismo | 33 (94,3%) | 23 (74,2%) ^A | 43 (75,4%) ^a | p ^a = 0,021 p ^A = 0,023 |
| História familiar | 14 (40,0%) | 18 (58,1%) | 29 (50,8%) | ns |
| Diabetes mellitus | 5 (14,3%) | 7 (22,6%) | 8 (14,0%) | ns |
| SCA anterior à entrevista | 7 (20,0%) | 12 (38,7%) | 35 (61,4%) ^a | p ^a < 0,0001 |

Número de pacientes (n) e porcentagem da presença do fator de risco e SCA nos grupos estudados. Foram observadas diferenças significativas entre a presença de tabagismo, representada pela letra a= vs AnN; sedentarismo, representada pela letra a/A= vs AnN e a presença de SCA, representada pela letra a= vs AnN

5.2 PARÂMETROS HEMOSTÁTICOS

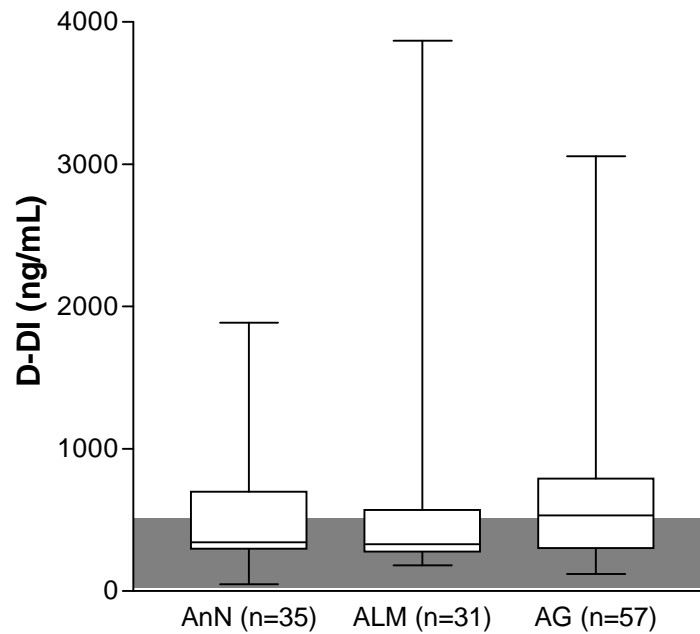
Os resultados dos parâmetros hemostáticos encontram-se na Tabela 3. Os dados estão apresentados como mediana acompanhada de valores do 1º e 3º quartis (para dados que não apresentaram distribuição normal) ou média e desvio padrão (para dados que apresentaram distribuição normal) obtido para grupos angiograficamente normal (AnN), ateromatose leve/moderada (ALM) e ateromatose grave (AG).

Tabela 3 – Parâmetros hemostáticos

| | AnN | ALM | AG | p |
|--------------|-----------------------------|-----------------------------|---|----------|
| n | 35 | 31 | 57 | - |
| D-DI | 342,79 (292,26; 654, 26) | 328,79 (272,66; 557, 37) | 531,40 (299,78; 770, 66) | ns |
| PAI-1 | 34,90 (27,86; 42,43) | 40,50 (34,24; 51,83) | 66,60 ^{a, b} (44,70; 91,65) | p< 0,001 |
| TAFI | 5,71 ± 1,73 | 5,21 ± 1,42 | 4,97 ± 1,41 | ns |
| TM | 3,29 (2,83; 4,21) | 3,72 (3,09; 4,64) | 3,43 (2,96; 4,19) | ns |

Número de pacientes (n); AnN= angiograficamente normais; ALM= ateromatose leve/moderada; AG= ateromatose grave; D-DI= Dímero D; PAI-1= Inibidor do ativador do plasminogênio 1; TAFI= Inibidor da fibrinólise ativado pela trombina; TM= Trombomodulina. Foram observadas diferenças significativas entre as medianas dos níveis de PAI-1, representada pela letra a: vs AnN e b: vs ALM. Valores expressos em média e desvio padrão ou mediana acompanhada do 1º e 3º quartis.

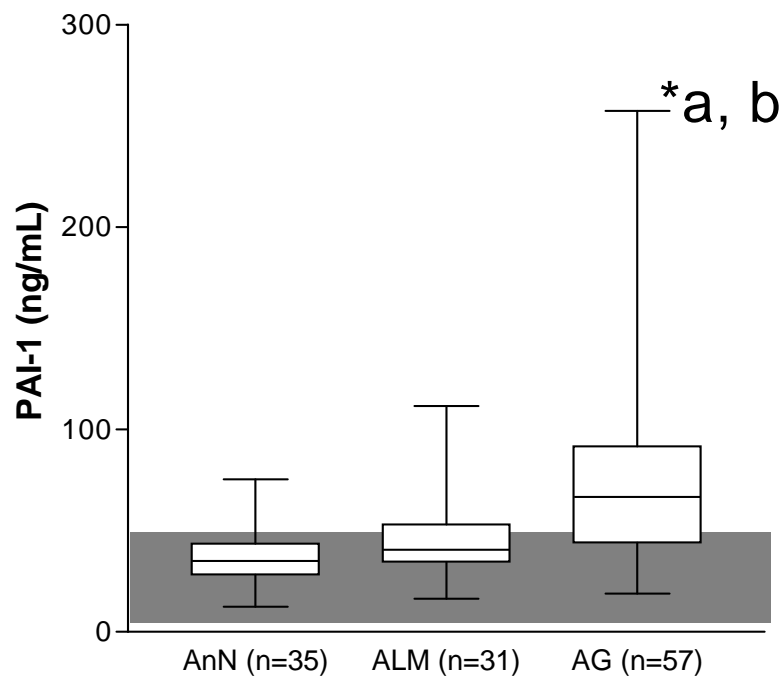
A Figura 9 representa os dados referentes aos níveis plasmáticos do dímero D (D-DI) expressos em ng/mL. Não foi encontrada diferença significativa entre as medianas dos três grupos.



Níveis plasmáticos de D-DI nos grupos AnN, ALM e AG

Valores expressos em ng/mL para os grupos AnN= angiograficamente normais; ALM= ateromatose leve/moderada; AG= ateromatose grave. A área sombreada corresponde aos valores de referência (até 500ng/mL) para os níveis plasmáticos do D-DI.

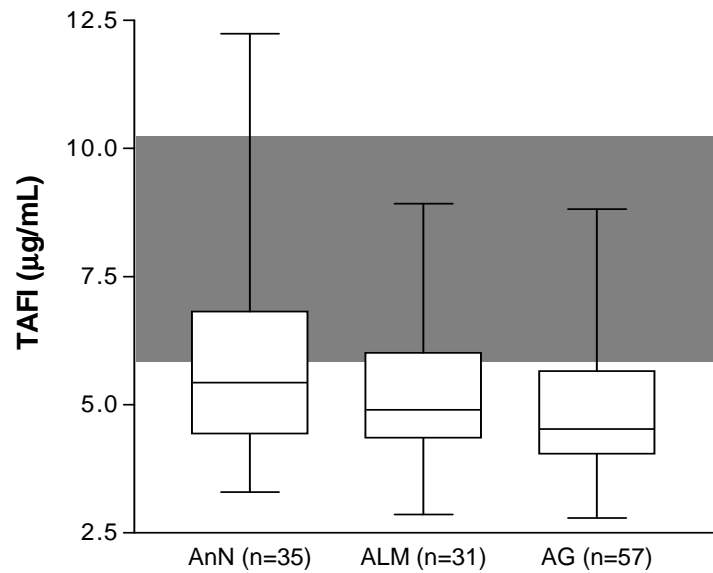
A Figura 10 representa os dados referentes aos níveis plasmáticos de PAI-1 expressos em ng/mL. Foram observadas diferenças significativas entre as medianas dos níveis de PAI-1, representada pela letra a: versus AnN e b: versus ALM.



Níveis plasmáticos de PAI-1 nos grupos AnN, ALM e AG

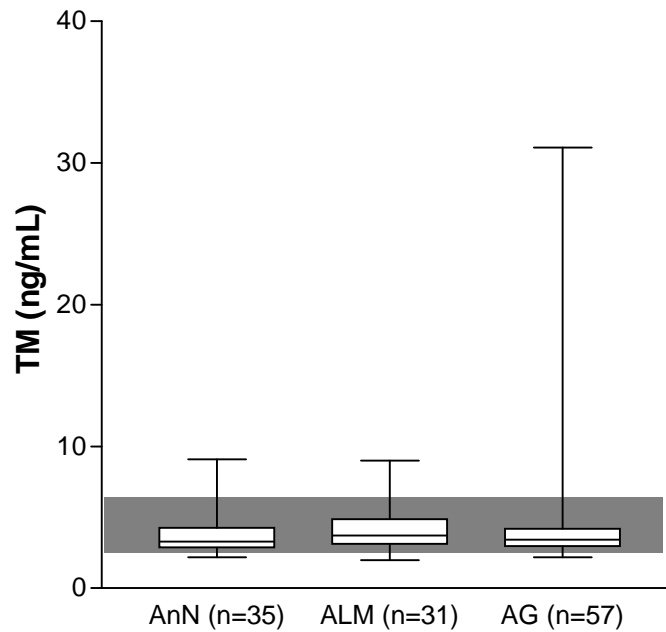
Valores expressos em ng/mL para os grupos AnN= angiograficamente normais; ALM= ateromatose leve/moderada; AG= ateromatose grave. A área sombreada corresponde aos valores de referência (2 a 47 ng/mL) para os níveis plasmáticos do PAI-1.

A Figura 11 representa os dados referentes aos níveis plasmáticos do TAFI expressos em $\mu\text{g/mL}$. Não foi encontrada diferença significativa entre as medianas dos três grupos.



Níveis plasmáticos de TAFI nos grupos AnN, ALM e AG
Valores expressos em $\mu\text{g/mL}$ para os grupos AnN= angiograficamente normais; ALM= ateromatose leve/moderada; AG= ateromatose grave. A área sombreada corresponde aos valores de referência (5.8 a 10.0 $\mu\text{g/mL}$) para os níveis plasmáticos do TAFI.

A Figura 12 representa os dados referentes aos níveis plasmáticos do trombomodulina (TM) expressos em ng/mL. Não foi encontrada diferença significativa entre as medianas dos três grupos.



Níveis plasmáticos de TM nos grupos AnN, ALM e AG

Valores expressos em ng/mL para os grupos AnN= angiograficamente normais; ALM= ateromatose leve/moderada; AG= ateromatose grave. A área sombreada corresponde aos valores de referência (2.73 a 5.35 ng/mL) para os níveis plasmáticos do TAFI.

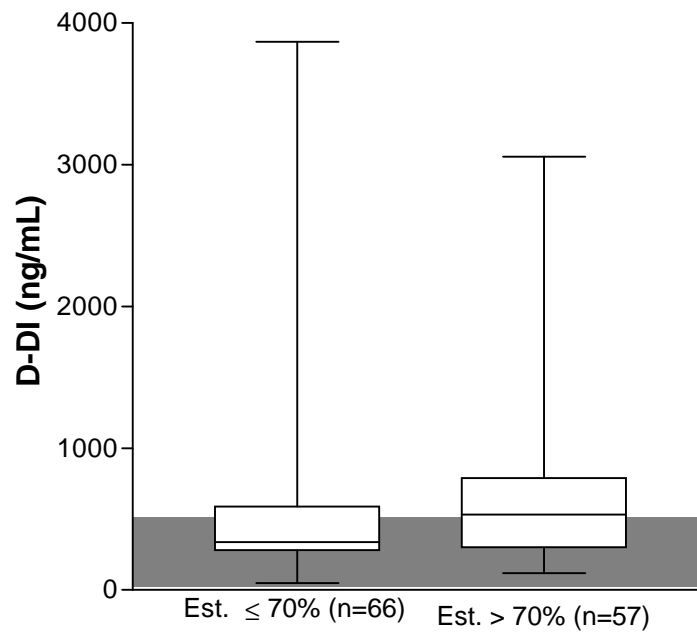
O grau de estenose acima de 70% é considerado obstrutivo e exige intervenção. Dessa forma, julgou-se procedente submeter os dados a uma nova análise cujos resultados se encontram na Tabela 4, os quais foram redistribuídos considerando estenose $\leq 70\%$ ou estenose $> 70\%$. Os dados estão apresentados como mediana acompanhada de valores do 1º e 3º quartis.

Tabela 4 – Parâmetros hemostáticos considerando estenose $\leq 70\%$ ou $> 70\%$

| | ESTENOSE $\leq 70\%$ | ESTENOSE $> 70\%$ | p |
|--------------|--|--|----------|
| n | 66 | 57 | - |
| D-DI | 337,32 (281,20; 571,94) | 531,40 (299,78; 770, 66) | ns |
| PAI-1 | 37,55 (30,90; 49,20) | 66,60 ^a (44,70; 91,65) | p< 0,001 |
| TAFI | 5,20 (4,37; 6,31) | 4,53 ^a (4,04; 5,63) | p=0,04 |
| TM | 3,29 (2,77; 4,21) | 3,43 (2,96; 4,19) | ns |

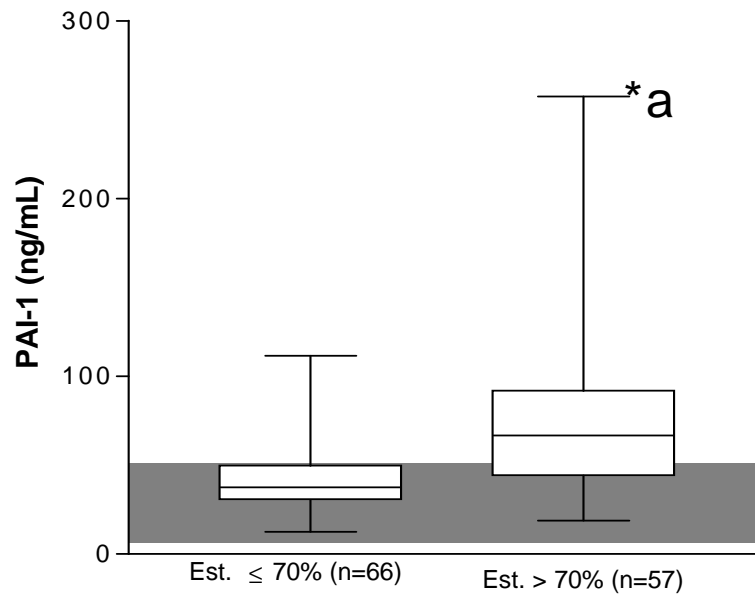
Número de pacientes (n); D-DI= Dímero D; PAI-1= Inibidor do ativador do plasminogênio 1; TAFI= Inibidor da fibrinólise ativado pela trombina; TM= Trombomodulina. Foram observadas diferenças significativas entre as medianas dos níveis de PAI-1e TAFI, representada pela letra a: vs Estenose $\leq 70\%$.

A Figura 13 representa os dados referentes aos níveis plasmáticos do dímero D (D-DI) expressos em ng/mL. Não foi encontrada diferença significativa entre as medianas dos grupos.



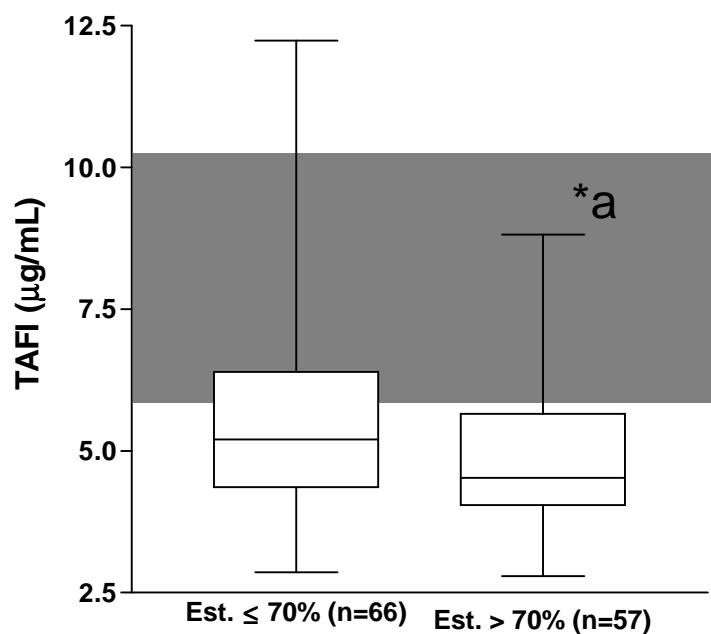
Níveis plasmáticos de D-DI considerando estenose $\leq 70\%$ e estenose $> 70\%$
Valores expressos em ng/mL. A área sombreada corresponde aos valores de referência (até 500ng/mL) para os níveis plasmáticos do D-DI.

A Figura 14 representa os dados referentes aos níveis plasmáticos de PAI-1 expressos em ng/mL. Foi observada diferença significativa entre as medianas dos níveis de PAI-1, representada pela letra a.



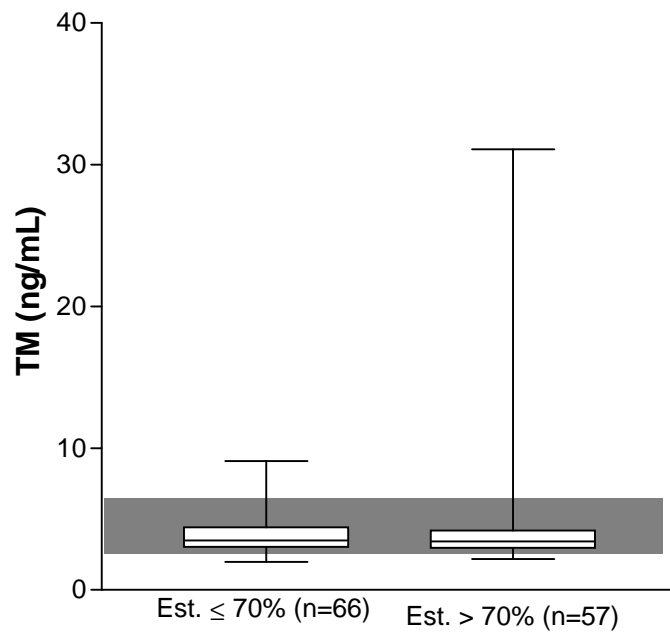
Níveis plasmáticos de PAI-1 considerando estenose $\leq 70\%$ e estenose $> 70\%$
Valores expressos em ng/mL. A área sombreada corresponde aos valores de referência (2 a 47 ng/mL) para os níveis plasmáticos do PAI-1.

A Figura 15 representa os dados referentes aos níveis plasmáticos do TAFI expressos em $\mu\text{g/mL}$. Foi observada diferença significativa entre as medianas dos níveis de TAFI, representada pela letra a.



Níveis plasmáticos de TAFI considerando estenose $\leq 70\%$ e estenose $> 70\%$
Valores expressos em $\mu\text{g/mL}$. A área sombreada corresponde aos valores de referência (5.8 a 10.0 $\mu\text{g/mL}$) para os níveis plasmáticos do TAFI.

A Figura 16 representa os dados referentes aos níveis plasmáticos da trombomodulina (TM) expressos em ng/mL. Não foi encontrada diferença significativa entre as medianas dos grupos.



Níveis plasmáticos de TM considerando estenose ≤ 70% e estenose > 70%
Valores expressos em ng/mL. A área sombreada corresponde aos valores de referência (2.73 a 5.35 ng/mL) para os níveis plasmáticos do TAFI.

Os níveis plasmáticos dos marcadores hemostáticos e da PCR foram também avaliados de acordo com o número de artérias acometidas. Na Tabela 5 encontram-se os dados para os parâmetros hemostáticos em relação ao número de artérias acometidas considerando apenas os pacientes com estenose superior a 70%, ou seja, somente aqueles cuja gravidade da doença exige intervenção. Quando os dados do grupo com estenose superior a 70% foram redistribuídos em subgrupos com uma artéria acometida (1A), duas artérias acometidas (2A) e três ou mais artérias acometidas (3A), os mesmos se mostraram com distribuição normal, sendo então, os três subgrupos comparados por meio do teste ANOVA. Os dados estão apresentados na tabela abaixo como média e desvio padrão, exceto para a TM (apresentada como mediana acompanhada de valores do 1º. e 3º. quartis).

Tabela 5 – Parâmetros hemostáticos considerando número de artérias acometidas em pacientes com estenose superior a 70%

| | 1A | 2A | 3A | p |
|--------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------|
| n | 16 | 13 | 28 | - |
| D-DI | 555,09 ± 379,85 | 449,62 ± 228,11 | 702,39 ± 568,79 | ns |
| PAI-1 | 92,79 ± 60,45 | 71,83 ± 39,29 | 62,15 ± 31,97 | ns |
| TAFI | 5,31 ± 1,52 | 4,75 ± 1,16 | 4,87 ± 1,46 | ns |
| TM | 3,37 (2,88; 4,01) | 3,09 (2,83; 4,09) | 3,49 (2,29; 4,84) | ns |

Número de pacientes (n); 1A= uma artéria acometida; 2A= duas artérias acometidas; 3A= três ou mais artérias acometidas; D-DI= Dímero D; PAI-1= Inibidor do ativador do plasminogênio 1; TAFI= Inibidor da fibrinólise ativado pela trombina; TM= Trombomodulina. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos.

5.3 PARÂMETRO PRÓ-INFLAMATÓRIO

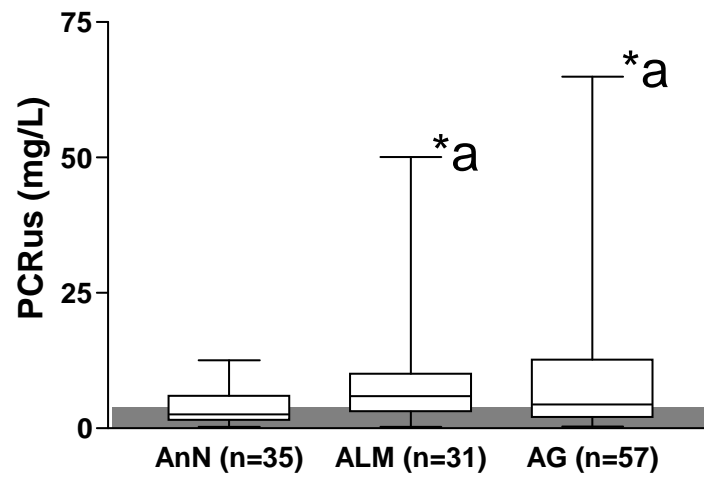
Os resultados para PCR encontram-se na Tabela 6. Os dados estão apresentados como mediana acompanhada de valores do 1º e 3º quartis obtidos para os grupos angiograficamente normal (AnN), ateromatose leve/moderada (ALM) e ateromatose grave (AG).

Tabela 6 – Níveis séricos de proteína C reativa (PCR)

| | AnN | ALM | AG | p |
|--------------|----------------------|-----------------------------------|------------------------------------|---------|
| n | 35 | 31 | 57 | - |
| PCRus | 2,50 (1,38; 5,58) | 5,90 ^a (3,10; 9,33) | 4,40 ^a (2,05; 12,38) | p=0,015 |

Número de pacientes (n); AnN= angiograficamente normais; ALM= ateromatose leve/moderada; AG= ateromatose grave; PCRus= Proteína C reativa ultra-sensível. Foi observada diferença significativa entre as medianas dos níveis de PCRus, representada pela letra a: vs AnN.

A Figura 17 representa os dados referentes aos níveis séricos de PCRus expressos em mg/L. Foi observada diferença significativa entre as medianas dos níveis de PCRus, representada pela letra a: versus AnN.



Níveis séricos de PCRus nos grupos AnN, ALM e AG

Valores expressos em mg/L para os grupos AnN= angiograficamente normais; ALM= ateromatose leve/moderada; AG= ateromatose grave. A área sombreada corresponde aos valores de referência (0,1 a 2,5 mg/L) para os níveis séricos de PCRus.

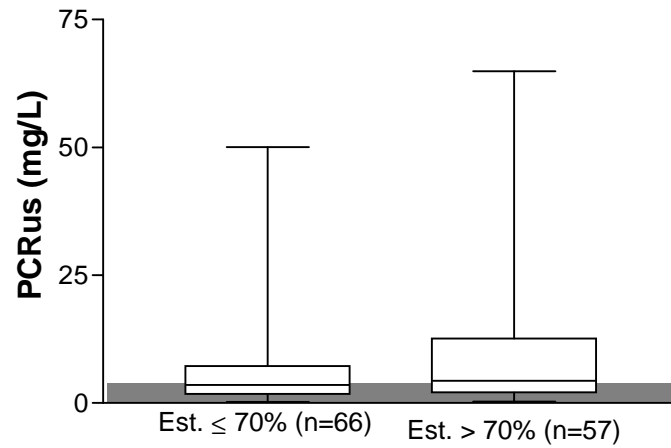
O grau de estenose acima de 70% é considerado obstrutivo e exige intervenção. Os resultados da PCR que se encontram na Tabela 7 foram redistribuídos considerando estenose $\leq 70\%$ ou estenose $> 70\%$. Os dados estão apresentados como mediana acompanhada de valores do 1º e 3º quartis.

Tabela 7 – Níveis séricos de proteína C reativa (PCR) considerando estenose $\leq 70\%$ ou $> 70\%$

| | ESTENOSE $\leq 70\%$ | ESTENOSE $> 70\%$ | p |
|--------------|--|--|----------|
| n | 66 | 57 | - |
| PCRus | 3,60 | 4,40 | ns |
| | (1,70; 7,20) | (2,05; 12,38) | |

Número de pacientes (n); PCRus= Proteína C reativa ultra-sensível. Não foi observada diferença significativa entre as medianas dos níveis de PCRus.

A Figura 18 representa os dados referentes aos níveis séricos de PCRus expressos em mg/L. Não foi encontrada diferença significativa entre as medianas dos grupos.



Níveis séricos de PCRus considerando estenose $\leq 70\%$ e estenose $> 70\%$
Valores expressos em mg/L. A área sombreada corresponde aos valores de referência (0,1 a 2,5 mg/L) para os níveis séricos de PCRus.

A gravidade da doença arterial coronariana pode ser avaliada de acordo com o número de artérias acometidas. Na Tabela 8 encontram-se os dados referentes aos níveis séricos de PCR segundo o número de artérias acometidas no grupo de pacientes com gravidade da doença requerendo intervenção, ou seja, estenose superior a 70%. Os dados estão apresentados como média e desvio padrão para os subgrupos com uma artéria acometida (1A), duas artérias acometidas (2A) e três ou mais artérias acometidas (3A).

Tabela 8 – Níveis séricos de proteína C reativa (PCR) considerando o número de artérias acometidas em pacientes com estenose superior a 70%

| | 1A | 2A | 3A | p |
|--------------|-------------|--------------|----------------|----|
| n | 16 | 13 | 28 | - |
| PCRus | 8,9 ± 12, 3 | 7, 37 ± 9,56 | 12,01 ± 15, 19 | ns |

PCRus= Número de pacientes (n); 1A= uma artéria acometida; 2A= duas artérias acometidas; 3A= três ou mais artérias acometidas; PCRus= Proteína C reativa ultra-sensível. Não foram observadas diferenças significativas.

5.4 CORRELAÇÕES

Após a avaliação da correlação entre os marcadores propostos neste trabalho, não se observou qualquer relação significativa entre os mesmos ($p > 0.05$).

6 DISCUSSÃO

6.1 CARACTERÍSTICAS DOS GRUPOS ESTUDADOS E FATORES DE RISCO PARA DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA

Os grupos estudados, angiograficamente normais (AnN), ateromatose leve/moderada (ALM) e ateromatose grave (AG) apresentam homogeneidade quanto ao sexo dos participantes, idade em anos e índice de massa corporal (IMC), uma vez que o risco de desenvolver doença cardiovascular acomete mais homens que mulheres e aumenta com a progressão da idade (WHO, 2006). A avaliação do IMC permitiu garantir a ausência de obesidade, reduzindo assim a influência dos fatores metabólicos. A influência da idade e do sexo sobre os parâmetros estudados foi também minimizada, considerando o cuidado na seleção dos componentes dos grupos, visando obter homogeneidade entre os mesmos.

Quanto à caracterização dos fatores de risco, foram observadas diferenças entre os grupos estudados. Em relação ao tabagismo, foi encontrada diferença significativa entre o grupo AG (40,4%) e o grupo AnN (17,1%). A doença arterial coronariana prematura está relacionada ao tabagismo, além de sua ação sinérgica com os demais fatores de risco. O tabagismo é um grande problema de saúde pública, e sua redução poderia reduzir o aparecimento da DAC em pelo menos uma década (KHOT *et al.*, 2003).

A presença de hipertensão arterial, fator de risco independente para DAC, foi altamente prevalente nos três grupos, mas sem diferença significativa entre os mesmos. Tais resultados refletem a alta prevalência da doença. A estimativa de hipertensão arterial na população brasileira adulta de acordo com o Ministério da Saúde (1991) foi de 15%. Entretanto, resultados mais elevados foram encontradas nas cidades do Rio de Janeiro e São Paulo (25%) (SBC, 2007).

A história familiar, fator agravante de risco para doença arterial coronariana (SBC, 2001) não mostrou diferença significativa entre os grupos estudados, assim como a presença de *diabetes mellitus*.

A atividade física constitui uma medida preventiva e tratamento auxiliar da doença arterial coronariana (SBC, 2001). O sedentarismo mostrou alta prevalência nos três grupos estudados, apresentando maior prevalência no grupo AnN com diferença significativa em relação aos grupos ALM e AG. Uma tentativa para explicar a alta

prevalência do sedentarismo nos participantes do estudo seria o nível sócio-econômico, uma vez que todos foram encaminhados ao hospital Socor pelo Sistema Único de Saúde. Apesar disto, os grupos com ateromatose grave e leve/moderada apresentaram um percentual menor de pacientes sedentários (75,4% e 74,2%, respectivamente), provavelmente por uma tentativa de mudança no estilo de vida por alguns pacientes que adotaram atividades físicas no intuito de reduzir as chances de doença cardiovascular.

A presença de SCA anterior à entrevista está associada à gravidade da doença, apresentando diferença significativa em relação ao grupo AnN.

6.2 PARÂMETROS HEMOSTÁTICOS E DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA

A avaliação dos níveis plasmáticos de D-DI permite a avaliação como um todo do sistema hemostático, cujos níveis representam o balanço entre a ativação do mecanismo da coagulação e a eficiência do sistema fibrinolítico em lisar o coágulo de fibrina (DANESH, 2001). O D-DI, o menor fragmento oriundo da fibrina, é um produto estável gerado durante a degradação do polímero estável de fibrina pela plasmina. A medida dos níveis plasmáticos de D-DI tornou-se ferramenta essencial no diagnóstico de trombose venosa profunda (TVP) e embolia pulmonar, sendo o marcador de escolha para exclusão destes eventos trombóticos (HEIM *et al.*, 2004). A síndrome coronariana aguda é caracterizada pela ruptura da placa vulnerável e subsequente formação do trombo intraluminal, o que fortalece o conceito da contribuição da fibrina intravascular na aterotrombogênese (KOENIG *et al.*, 2001), sugerindo que a fibrina possa ser um marcador útil de risco cardiovascular, independente dos fatores de risco convencionais (MORANGE *et al.*, 2006).

Vários estudos tentam relacionar os níveis de D-DI com a doença arterial coronariana, porém, os estudos que tentaram relacionar a gravidade da doença através do número de coronárias atingidas e do percentual de estenose, não demonstraram associação com os níveis de D-DI (KOENIG *et al.*, 2001), em concordância com os achados deste estudo. No presente estudo, foi observada apenas uma tendência à elevação dos níveis de D-DI para o grupo AG, sem diferença significativa entre os grupos. Uma possível explicação para o resultado

encontrado seria uma produção mais baixa do polímero de fibrina no processo de formação da placa aterosclerótica quando comparada ao evento de trombose venosa profunda, situação em que se observa elevada produção do polímero de fibrina, resultando em níveis elevados de D-DI. Por outro lado, os níveis de PAI-1 nos processos ateroscleróticos são mais elevados do que aqueles observados na TVP. Este fato pode estar contribuindo para reduzir a atividade do sistema fibrinolítico nas doenças que cursam com aterosclerose justificando o achado de níveis não elevados de D-DI.

O principal inibidor da fibrinólise é o PAI-1, que é o inibidor primário dos ativadores fisiológicos do plasminogênio (t-PA e u-PA). O aumento dos níveis de PAI-1 tem sido relatado em indivíduos após infarto agudo do miocárdio, em relação à população em geral, e este aumento se correlaciona à recorrência do infarto (MARTINEZ, 2003). O aumento dos níveis de PAI-1 pode comprometer o sistema fibrinolítico e favorecer a permanência do coágulo de fibrina. A deficiência da fibrinólise devido ao aumento dos níveis de PAI-1 está associada a doenças cardiovasculares (KOENIG *et al.*, 2001). Um possível papel para o PAI-1 na parede arterial é que placas instáveis são caracterizadas por baixa celularidade. A migração das células para a região da placa depende da ação de enzimas com atividade colagenase que é desempenhada pela plasmina. Assim, quando o PAI-1 inibe a formação da plasmina contribui para a baixa celularidade da placa e por conseqüência, formação de uma placa instável (SOBEL, 1999). Alterações no sistema fibrinolítico estão presentes em pacientes com doença arterial coronariana, como resultado da elevação dos níveis plasmáticos de PAI-1 (THOGERSEN *et al.*, 1998; KOENIG *et al.*, 2001). Em relação aos níveis de PAI-1 observados no presente estudo, estes apresentaram elevação significativa em pacientes do grupo AG em relação aos grupos AnN e ALM, permitindo concluir que os níveis plasmáticos de PAI-1 se relacionam à gravidade da doença. Porém, a tentativa de se relacionar os níveis de PAI-1 com a gravidade da doença através do número de artérias atingidas, não demonstrou associação com os níveis de PAI-1.

A trombina também é responsável pela modulação da fibrinólise, através da ativação do inibidor da fibrinólise ativado pela trombina (TAFI), o qual, quando ativado, atua como um regulador (inibidor) da fibrinólise com implicações importantes nas doenças

cardiovasculares (JUHAN-VAGUE *et al.*, 2002). Não foi encontrada diferença significativa para os níveis de TAFI entre os grupos estudados. Contrariamente ao esperado, foi observada uma tendência a resultados mais baixos com o aumento da gravidade da doença. Considerando o grau de estenose acima de 70% como fator decisivo para intervenção, observa-se redução significativa entre os níveis de TAFI do grupo com estenose > 70% e o grupo com estenose < 70%, se relacionando com a gravidade da doença.

Uma busca na literatura a respeito dos níveis plasmáticos de TAFI nas doenças cardiovasculares, revela resultados contraditórios, possivelmente pelas características dos pacientes investigados, bem como dos métodos aplicados para a avaliação laboratorial deste biomarcador. Vários estudos demonstraram a elevação dos níveis de TAFI nas doenças cardiovasculares (SILVEIRA *et al.*, 2000; SCHROEDER *et al.*, 2002; SANTAMARIA *et al.*, 2004). Porém, contraditoriamente, Juhan-Vague *et al.* (2002) demonstraram níveis reduzidos de TAFI na população estudada. Durante a fase aguda da doença arterial coronariana, não foram encontradas diferenças significativas entre os níveis de TAFI (CELLAI *et al.*, 2006).

Acredita-se que os níveis de TAFI variam durante as fases da doença arterial coronariana e, além disso, diferenças entre os resultados obtidos por diferentes ensaios também corroboram para a grande variabilidade de resultados obtidos na avaliação deste marcador. Um estudo importante conduzido para comparação de métodos disponíveis para a quantificação do TAFI mostrou que ensaios que medem a atividade do TAFI, apresentaram resultados elevados de TAFI na DAC, enquanto os ensaios que medem o TAFI antígeno total não detectaram diferenças entre os níveis plasmáticos de TAFI na DAC e controles ou podem apresentar resultados

ligeiramente mais baixos na mesma amostra estudada (SKEPPHOLM *et al.*, 2007). Uma explicação para estes resultados é a reatividade imunológica para as diferentes isoformas do TAFI, podendo mascarar as elevações de TAFI encontradas por outros métodos.

Alterações no gene que codifica o TAFI resultam na substituição de 2 aminoácidos: alanina por treonina na posição 147 e isoleucina por treonina na posição 325, sendo a substituição da isoleucina na posição 325 (ILE325) menos reativa para alguns ensaios imunológicos (BOFFA; KOSCHINSKY, 2007). Alterações na posição 147 não afetam a ativação do TAFI ou sua estabilidade, o que não é observado para a substituição na posição 325.

O TAFI ativado decai sua atividade espontaneamente à temperatura corporal (meia vida de aproximadamente 10 minutos). A instabilidade intrínseca do TAFI ativado é o mecanismo de regulação de sua atividade. A presença de ILE325 confere maior estabilidade térmica ao TAFI ativado (meia vida de aproximadamente 15 minutos), representando uma atividade antifibrinolítica de 30 a 60% maior que a substituição de treonina na mesma posição (SCHNEIDER *et al.*, 2002). Uma vez que o polimorfismo do TAFI na posição 325 afeta sua meia vida funcional, vários ensaios para sua determinação têm demonstrado ser, em parte, dependente do genótipo, e com isso, níveis de TAFI antígeno em pacientes com isoforma ILE325 podem estar subestimados, dependendo do ensaio (ZEERLEDERS *et al.*, 2006). Estudos importantes realizados por BAJZAR e colaboradores em 1996, mostraram que a meia vida de inibição máxima da lise do coágulo de fibrina pelo TAFI ativado é atingida com uma concentração de aproximadamente 1nM, e que esta concentração é menor que 2% da concentração plasmática de TAFI. Isto mostra que, mesmo uma

pequena extensão de ativação do TAFI pode ser suficiente para exercer um significativo efeito sobre a fibrinólise. Os dados encontrados no presente estudo mostraram níveis plasmáticos de TAFI para o grupo com estenose superior a 70% de 4,53 µg/mL (aproximadamente 76 nM de TAFI antígeno) quantidade esta superior ao mínimo necessário para a ação do TAFI ativado (1 nM) (BOFFA; KOSCHINSKY, 2007). Isto sugere que a redução dos níveis de TAFI (uma vez que após sua ativação sua meia vida funcional é de aproximadamente 10 minutos) é resultante do seu consumo durante a coagulação (ZEERLEDERS *et al.*, 2006).

Então, a redução dos níveis de TAFI nos pacientes com a forma mais grave da doença, pode ter ocorrido devido à maior ativação da coagulação e conseqüente maior ativação do TAFI. Pode-se também aventar a hipótese de que níveis reduzidos deste inibidor em pacientes do grupo com ateromatose grave, possam ocorrer devido aos níveis elevados de PAI-1, em uma tentativa de restaurar a competência do sistema fibrinolítico.

O endotélio desempenha um papel importante na hemostasia vascular. A célula endotelial por si só está diretamente relacionada à aterosclerose (WU *et al.*, 2003). A trombomodulina pode ser liberada conseqüente à lesão endotelial na forma solúvel (TMs). Níveis elevados de trombomodulina solúvel estão associados com a severidade de doença arterial coronariana, infarto e doença arterial oclusiva periférica, enquanto baixos níveis de trombomodulina predizem eventos cardiovasculares em indivíduos saudáveis (WEILER, 2003; CONSTANS, 2006). Embora controverso, estudos sugerem que o nível de TM é inversamente relacionado à doença arterial coronariana, implicando que a forma solúvel da TM pode desempenhar um efeito vasoprotetor (WU *et al.*, 2003). Neste estudo não foi observada diferença significativa entre os grupos estudados, tendo sido o mesmo encontrado quando se tentou relacionar a gravidade da doença (estenose superior a 70% e número de artérias atingidas) com os níveis plasmáticos da TM. No estudo prospectivo PRIME (The Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction),

o qual envolveu aproximadamente 10000 indivíduos, buscou-se a associação entre marcadores de lesão endotelial e eventos cardiovasculares (infarto agudo do miocárdio, angina estável e instável) não sendo observadas diferenças significativas para TM em qualquer dos eventos cardiovasculares (MORANGE *et al.*, 2004), em concordância com os resultados observados no presente estudo.

Nos estudos enfocando doenças arteriais coronarianas, observa-se a utilização de múltiplos marcadores hemostáticos para tentar explicar as bases fisiológicas do desenvolvimento desta doença, uma vez que a DAC é determinada pela perda do balanço entre fatores trombóticos e antitrombóticos, fatores pró-coagulantes e fibrinolíticos. Partindo desta premissa, o presente estudo no qual foram avaliados moduladores do sistema fibrinolítico (PAI-1 e TAFI), o dímero-D e a trombotomodulina está em consonância com os atuais estudos, o qual visou contribuir para o esclarecimento dos múltiplos fatores envolvidos no desenvolvimento da DAC em nosso meio.

6.2 PARÂMETRO PRÓ-INFLAMATÓRIO (PCR) E DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA

A inflamação desempenha um importante papel nas lesões iniciais da aterosclerose, e em sua progressão (FISMAN *et al.*, 2006; BOEKHOLDT *et al.*, 2004; TENTOLOURUS *et al.*, 2004; CESARI *et al.*, 2003; RIDKER *et al.*, 2000).

Estudos prospectivos demonstram a associação entre marcadores da inflamação como fibrinogênio e PCR e doenças cardiovasculares (HANSSON, 2005). Níveis elevados de IL-6, PCR e fibrinogênio estão relacionados com a desestabilização da placa aterosclerótica nas síndromes coronarianas agudas (ZAIRIS *et al.*, 2006). Vários autores tentam demonstrar a capacidade de altas concentrações da PCR em prever eventos coronarianos em mulheres após ajuste de fatores de riscos utilizados na pontuação de risco de Framingham, porém demonstram pobre correlação com resultados de testes que quantificam a extensão da aterosclerose (PEARSON *et al.*, 2003). Dados epidemiológicos demonstram que a atividade inflamatória sistêmica associa-se à incidência de doenças cardiovasculares em

populações de indivíduos saudáveis e portadores de doença aterosclerótica (PEARSON *et al.*, 2003).

A PCRus tem sido amplamente utilizada, pois pode ser adotada como fator de risco adicional para doença cardiovascular. Porém, estudos realizados após o ano de 2000, mostraram que a PCRus possui uma aplicação moderada em predizer doença arterial coronariana (DANESH *et al.*, 2004), devendo ser então adotada com cautela na avaliação clínica. Portanto, a avaliação dos fatores de risco clássicos para DAC e o cálculo de risco para DAC em 10 anos devem ter prioridade (PEARSON *et al.*, 2003).

No presente estudo, os dados obtidos mostraram diferença significativa para os níveis séricos de PCRus entre os grupos com ALM e AG e o grupo AnN. A elevação dos níveis de PCRus se relacionaram com a gravidade da doença, porém, essa diferença desaparece quando se tentou relacionar com a estenose superior a 70% e número de artérias atingidas, em concordância com achados na literatura (RIFFAI, *et al.*, 1999).

A aterosclerose é a principal causa de doenças cardiovasculares, e tem sido postulada como uma doença inflamatória. Isto sugere que marcadores de inflamação podem predizer a progressão da doença. A PCRus é um marcador de fase aguda e deve ser interpretado na ausência de lesões não ateroscleróticas. De acordo com a IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose, considera-se como fator agravante de risco de doença aterosclerótica níveis séricos de PCRus superiores a 3 mg/L. Portanto, para pacientes com exames de imagem revelando risco moderado para aterosclerose, o achado de níveis de PCRus superiores a 3mg/L sugere que estes pacientes devam ser reclassificados como de alto risco para aterosclerose, sendo necessária intervenção mais agressiva. Como o grupo ALM envolve pacientes que possuem estenose de 30 a 70%, o uso da PCRus poderia ser impactante na reclassificação destes pacientes, de acordo com o estabelecido pela IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose.

Com base no que se observa na literatura, pode-se admitir a necessidade do desenvolvimento de estudos randomizados com intervenção baseada na redução dos níveis de PCRus para a melhora do prognóstico do paciente (GOTTO, 2007).

Quanto à intenção de se avaliar o perfil inflamatório nos 123 pacientes conforme descrito anteriormente, não foi possível alcançar os resultados esperados. Contrariamente a alguns relatos literários (KWAIJTAAL *et al.*, 2005; MAAT & KLUFT, 2002), que através de ensaios imunoenzimáticos tipo *sandwich* foram capazes de detectar diferentes citocinas pró-inflamatórias, dentre as quais o TNF- α no soro/plasma de pacientes com doença arterial coronariana, não foi obtido o mesmo resultado no presente estudo para o mesmo tipo de amostra biológica, utilizando um sistema comercial de detecção (Biosource) ou através de bio-ensaios (utilizando anticorpos monoclonais gentilmente cedidos pelo Dr. Luis Carlos C. Afonso – UFOP). Somente mostraram-se reativas 9 amostras do total analisado pelo método do bio-ensaio. Dessa forma, com a sensibilidade atual dos métodos imunoenzimáticos disponíveis destinados a esse tipo de detecção, conclui-se que a avaliação do perfil de citocinas pró-inflamatórias em nossas condições, não permite investigar a associação de tais parâmetros inflamatórios com a progressão da doença nos grupos de pacientes envolvidos nesse estudo, conforme foi proposto inicialmente. Entretanto, em abordagens futuras, poder-se-á propor em outros estudos a avaliação intracelular dessas moléculas por citometria de fluxo em leucócitos de sangue periférico. Alternativamente, a avaliação sérica de citocinas pró-inflamatórias na DAC, utilizando o sistema automatizado DPC Immulite (SIEMENS), poderá também ser proposta.

Desta forma, cumpre ressaltar que o número crescente de doenças cardiovasculares ateroscleróticas no mundo e em nosso meio, conseqüente ao envelhecimento da população e dos hábitos pouco saudáveis de vida, deve motivar o desenvolvimento de estudos adicionais delineados para se entender melhor a fisiopatologia destas doenças e seus marcadores de evolução. Assim, medidas estratégicas de prevenção e de tratamento poderão ser adotadas em favor da qualidade de vida e redução de custos dispendidos no manejo de tais pacientes. O processo aterosclerótico, considerado até recentemente como progressivo e irreversível, à luz do conhecimento atual se apresenta com novas e promissoras perspectivas que

poderão desacelerar, interromper ou mesmo reverter o processo de formação de placas ateroscleróticas (IBANEZ *et al.*, 2007).

Portanto, estudos adicionais enfocando o assunto em tela são não apenas plenamente justificáveis como também necessários para um melhor entendimento e equacionamento desta importante condição mórbida e, freqüentemente, fatal.

7 CONCLUSÕES

- O grupo com aterosmatose grave (AG) não apresentou diferença significativa para os níveis de D-DI quando comparado aos outros dois grupos (AnN e ALM), embora uma tendência de aumento tenha sido observada com o agravamento da forma clínica.

- Níveis significativamente mais elevados de PAI-1 foram observados no grupo com aterosmatose grave (AG), em comparação aos outros dois grupos (AnN e ALM), sinalizando um comprometimento da eficiência do sistema fibrinolítico, portanto, favorecendo uma crescente obstrução do vaso. O mesmo não foi observado para os níveis plasmáticos de TAFI, um outro inibidor do sistema fibrinolítico recentemente descrito.

-Quando os parâmetros hemostáticos foram avaliados segundo o grau de estenose (\leq ou $>$ 70%), os níveis plasmáticos dos inibidores do sistema fibrinolítico apresentaram resultados opostos, ou seja, níveis significativamente elevados para o PAI-1 ($p < 0,001$) ou significativamente reduzidos para o TAFI ($p = 0,04$), em função do agravamento da doença.

- Quanto à avaliação da PCR, esta se mostrou significativamente mais elevada nos grupos com aterosmatose leve/moderada (ALM) e grave (AG), compatível com o esperado nos processos ateroscleróticos.

- Nenhuma diferença foi observada para os parâmetros hemostáticos e PCR quando se avaliou o número de artérias acometidas em pacientes com estenose superior a 70%.

Nenhuma correlação significativa foi encontrada entre os parâmetros hemostáticos entre si, e entre estes e a PCR. Todavia, os níveis de PAI-1 mostraram aumento progressivo à medida do agravamento do processo aterosclerótico, confirmando prévios achados referentes ao comprometimento do sistema fibrinolítico nas doenças ateroscleróticas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN HEART ASSOCIATION. NCEP Report: Implications of recent Clinical Trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III Guidelines. **Circulation**, v.110, p.227-39, 2004.

AMERICAN HEART ASSOCIATION/CDC Scientific Statement: Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease. **Circulation**, v.107, p.499-511, 2003.

BERRAHMOUNE, H. *et al.* Association between TNF and IL-1 bloc polymorphisms and plasma MCP-1 concentration. **Atherosclerosis**, p.1-6, 2006.

BOEKHOLDT, S. M. *et al.* IL-8 Plasma Concentrations and the Risk of Future Coronary Artery Disease in Apparently healthy Men and Women. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.24, p. 1503-8, 2004.

BOFFA, M. B.; KOSCHINSKY, M. L. Curiousier and curiousier: Recent advances in measurement of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) and in understanding its molecular genetics, gene regulation and biological roles. **Clin Biochem**, v.40, p.431-42, 2007.

BOUMA, B.N.; MOSNIER, L.O. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) at the interface between coagulation and fibrinolysis. **Pathophysiol Haemos Thromb**, v.33, p.375-81, 2004.

BUSCH, G. *et al.* Coagulation factor Xa stimulates interleukin-8 release in endothelial cells and mononuclear leukocytes: Implications in acute myocardial infarction. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.25, p.461-66, 2005.

CELLAI, A. P. *et al.* TAFI activity and antigen plasma levels are not increased in acute coronary artery disease patients admitted to a coronary care unit. **Thromb Res**, v.118, p.495-500, 2006.

CESARI, M. *et al.* Inflammatory markers and onset of cardiovascular events: Results from the health ABC study. **Circulation**, v.108, p.2317-22, 2003.

COLLEN, D.; LIJNEN, H.R. Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. **Blood**, v. 72 (12), p. 3114-24, 1991.

COLMAN, R.W.; CLOWES, A.W.; GEORGE, J.N.; HIRSH, J.; MARDER, V.J. Overview of haemostasis. In: COLMAN, R.W.; HIRSH, J.; MARDER, V.J.; CLOWES, A.W.; GEORGE, J.N. **Haemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice**. 4.ed, Philadelphia: Lippincott; Williams and Wilkins, 2001.p.3-16.

CONSTANS, J.; CONRI, C. Circulating markers of endothelial function in cardiovascular disease. **Clin Chim Acta**, v.368, p.33-47, 2006.

DANESH, J. *et al.* Fibrin D-dimer and coronary heart disease: prospective study and meta-analysis. **Circulation**, v.103, p.2323-27, 2001.

DANESH, J. *et al.* C-Reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. **N Engl J Med**, v.350 (14), p.1387-97, 2004.

FISMAN, E. Z. *et al.* Interleukin-6 and the Risk of Future Cardiovascular Events in Patients with Angina Pectoris and/or Healed Myocardial Infarction. **Am J Cardiol**, v.98, p.14-8, 2006.

FUSTER, V. *et al.* The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes(1). **N Engl J Med**, v.326, p.242-50, 1992.

FUSTER, V. *et al.* The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes(2). **N Engl J Med**, v.326, p.310-18, 1992.

GARCIA-PALMIERI, M.R The endothelium in health and cardiovascular disease. **P R Health Sci J**, v.16(2), p. 36-41, 1977.

GOTTO, A. M. J. Role of C-reactive protein in coronary risk reduction: focus on primary prevention. **Am J Cardiol**, v.99(5), p.718-25, 2007.

GUERRE-MILLO, M. Adipose tissue and adipokines: for better or worse. **Diabetes Metab**, v.30, p.13-9, 2004.

HADDY, N. *et al.* IL-6, TNF α and atherosclerosis risk indicators in a healthy family population: The STANISLAS cohort. **Atherosclerosis**, v.170(2), p.277-83, 2003.

HANSSON, G. K. Immunity and atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.25, p.17, 2005.

HANDIN, R. I.; LUX, S. E.; STOSSEL, T. P. **Blood**: Principles and practice of hematology. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1995. 2305p.

HANSSON, G.K. Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease. **N Engl J Med**, v.352, p.1685-95, 2005.

HEIM, S.W.; SCHECTMAN, J.M.; SIADATY, M.S.; PHILBRICK, J.T. D-dimer testing for deep vein thrombosis: a metaanalysis. **Clin Chem**, v.50, p.1136-47, 2004.

IBANEZ, B.; VILAHUR, G.; BADIMON, J.J. Plaque progression and regression in atheromatosis. **J Thromb Haemostas**, v.5(1), p.292-9, 2007.

JUHAN-VAGUE, I. *et al.* Plasma thrombin activatable fibrinolysis inhibitor antigen concentration and genotype in relation to myocardial infarction in the north and south of Europe. **Artheroscler Thromb Vasc Biol**, v.22, p. 867-73, 2002.

KADEN, J. J. *et al.* Interleukin-1 beta promotes matrix metalloproteinase expression and cell proliferation in calcific aortic valve stenosis. **Atherosclerosis**, v.170, p.205-11, 2003.

KHOT, U.N. *et al.* Prevalence of conventional risk factors in patients with coronary heart disease events. **JAMA**, v.290, p.898-904, 2003.

KOENIG, W.; ROTHENBACHER, D.; HOFFMEISTER, A.; GRIESSHAMMER, M.; BRENNER, H. Plasma fibrin d-dimer levels and risk of stable coronary artery disease: results of a large case-control study. **Artheroscler Thromb Vasc Biol**, v.21, p.1701-05, 2001.

KWAIJTAAL, M. *et al.* Inflammatory markers predict late cardiac events in patients who are exhausted after percutaneous coronary intervention. **Atherosclerosis**, v.182, p.341-8, 2005.

LEHRKE, M. *et al.* CXCL16 is a marker of inflammation, atherosclerosis, and acute coronary syndromes in humans. **J Am Col Cardiol**, v.49, p.442-9, 2007.

LIND, L. Circulating markers of inflammation and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v.169(2), p.203-14, 2003.

LORENZI, T. F. **Manual de hematologia-Propedêutica e clínica**, Rio de Janeiro: Medsi, 2003. 655p.

LOWE, G. D. *et al.* Fibrin D-dimer, markers of coagulation activation and the risk of major ischaemic heart disease in the caephilly study. **Thromb Haemost**, v.86, p.822-27, 2001.

MAAT, M. P. M.; KLUFT, C. The association between inflammation markers, coronary artery disease and smoking. **Vasc Pharmacol**, v.39, p.137-9, 2002.

MARTINEZ, T. L. R. **Manual de condutas clínicas em dislipidemias**, Rio de Janeiro: Medline, 2003. 392p.

MOHANTY, D.; GHOSH, K.; KHARE, A.; KULKARNI, B. Thrombophilia in coronary artery disease: A double jeopardy. **Indian J Med Res**, v.120, p.13-23, 2004.

MORANGE, P.E. *et al.* Endothelial cell markers and the risk of coronary heart disease. **Circulation**, v.109, p.1343-48, 2004.

MORANGE, P.E. *et al.* Haemostatic factors and the risk of cardiovascular death in patients with coronary artery disease: The atheroGene study. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.26, p.2793-99, 2006.

NAGHAVI, M. *et al.* From vulnerable plaque to vulnerable patient- part III: executive summary of the Screening for Heart Attack Prevention and Education (SHAPE) Task force report. **Am J Cardiol**, v.98, p.2H-15H, 2006.

PEARSON, T.A. *et al.* Markers of inflammation and cardiovascular disease. Application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and American Heart Association. **Circulation**, v.107, p.499-511, 2003.

REAPE, T. J.; GROOT, P. H. E. Chemokines and atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v.147(2), p.213-25, 1999.

RIDKER, P. M.; RIFAI, N.; STAMPFER, M. J.; HENNEKENS, C. H. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. **Circulation**, v.101, p.1767-72, 2000.

RIFFAI, N. *et al.* Inflammatory markers in men with angiographically documented coronary heart disease. **Clin Chem**, v.45(11), p.1967-73, 1999.

RUSSEL, R. Atherosclerosis, an inflammatory disease., *N Engl J Med*, v.340(2), p.115-26, 1999.

SANTAMARIA, A.; MARTINEZ-RUBIO, A.; BORRELL M.; MATEO J.; ORTIN R.; FONTCUBERTA J. Risk of acute coronary artery disease associated with functional thrombin activatable fibrinolysis inhibitor plasma levels. **Haematologica**, v.89, p.880-1, 2004.

SCHNEIDER, M. *et al.* Two naturally occurring variants of TAFI (thr-325 and ile-325) differ substantially with respect to thermal stability and antifibrinolytic activity of the enzyme. **J Biol Chem**, v.277, p.1021-30, 2002.

SCHROEDER, V. *et al.* Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) levels in patients with coronary artery disease investigated by angiography. **Thromb Haemost**, v.88, p.1020-5, 2002.

SHIN, J.; EDELBERG, J. E.; HONG, M. K. Vulnerable atherosclerotic plaque: clinical implications. **Curr Vasc Pharmacol**, v.1(2), p.183-204, 2003.

SILVEIRA, A. *et al.* Plasma procarboxipeptidase U in men with symptomatic coronary artery disease. **Thromb Haemost**, v,84, p.364-8, 2000.

SKEPPHOLM, M. *et al.* Comparison of two immunochemical assay for measuring thrombin activatable fibrinolysis inhibitor concentration with a functional assay in patients with acute coronary syndrome. **Thromb Res**, 2007, disponível em: 10.1016/j.thromres.2007.03.021. Acesso em : 26 jun. 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretrizes de Prevenção de Aterosclerose. **Arq Bras Cardiol**, v.77, p.1-48, 2001.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Arteriosclerose. **Arq Bras Cardiol**, v.88, p.1-19, 2007.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. Diretriz de Angina Estável, **Arq Bras Cardiol**, v.83, p.1-43, 2004.

SOBEL, B.E. Coronary artery disease and fibrinolysis: from the blood to the vessel wall. **Thromb Haemost**, v.82, p. 8S-13S, 1999.

SOBEL, B.E. Increased plasminogen activator inhibitor-1 and vasculopathy: a reconcilable paradox. **Circulation**, v.99, p. 2496-98, 1999.

STARY, H.C. *et al.* A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and histological classification of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Atherosclerosis, American Heart Association. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.14, p.840-56, 1994.

STEFAN, P.S.; MARKLUND, L. Multiple cytokines regulate the expression of extracellular superoxide dismutase in human vascular smooth muscle cells. **Atherosclerosis**, v.151(2), p.433-41, 2000.

STEPPICH, B. A. *et al.* Cytokine profiles and T cell function in acute coronary syndromes. **Atherosclerosis**, p.1-9, 2006.

TENTOLOURIS, C.; TOUSOULIS, D.; ANTONIADES, C.; BOSINAKOU, E.; KOTSOPOULOU, M.; TRIKAS, A.; TOUTOUZAS, P.; STEFANADIS, C. Endothelial function and proinflammatory cytoquines in patients with ischemic heart disease and dilated cardiomyopathy. **Int J Cardiol**, v.94, p.301-5, 2004.

THOGERSEN, A.M *et al.* High plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator levels in plasma precede a first acute myocardial infarction in both men and women: evidence for the fibrinolytic system as an independent primary risk factor. **Circulation**, v.98, p.2241-47, 1998.

TRACY, R. P. Thrombin, inflammation, and cardiovascular disease: An epidemiologic perspective. **Chest**, v.124(suppl.3), p.49S-57S, 2003.

VAN de WOUWER, M.; COLLEN, D.; CONWAY, E.M. Thrombomodulin-protein C-EPCR system integrated to regulate coagulation and inflammation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.21, p.1374-83, 2004)

VAN DER PUTTEN, R. F. M.; GLATZ, J. F. C.; HERMES, W. T. Plasma markers of activated hemostasis in the early diagnosis of acute coronary syndromes. **Clin Chim Acta**, v.371, p.37-54, 2006.

VAN TILBUR, N. H.; ROSENDAAL, F.R; BERTINA, R.M. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor and the risk for deep vein thrombosis. **Blood**, v.95, p.2855-59, 2000.

WEILER, H.; ISERMANN, B.H. Thrombomodulin. **J Thromb Haemost**, v.1, p.1515-24, 2003.

WILSON, P.W.; AGOSTINI, R.B.; LEVY, B. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. **Circulation**, v.97, p.1837-47, 1998.

World Health Organization http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/; Acesso em: 21 set. 2007.

WU, K. K. *et al.* Interaction between soluble thrombomodulin and intercellular adhesion molecule-1 in predicting risk of coronary heart disease. **Circulation**. v.107, p.1729-32, 2003.

YASOJIMA, *et al.* Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaque. **Am J Pathol**, v.158, p.1039-51, 2001.

YUDKIN, J. S.; KUMARI, M.; HUMPHRIES, S. E.; MOHAMED-ALI, V. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link. **Atherosclerosis**, v.148(2), p.209-14, 2000.

ZAIRIS, M. N. *et al.* The impact of hs C-reactive protein and other inflammatory biomarkers on long term cardiovascular mortality in patients with acute coronary syndromes. **Atherosclerosis**, p.1-6, 2006.

ZEERLEDER, S. *et al.* TAFI and PAI-1 levels in human sepsis. **Thromb res**, v.118, p.205-12, 2006.

9 ANEXOS



HOSPITAL GERAL

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP) - HOSPITAL SOCOR
BELO HORIZONTE - MINAS GERAIS

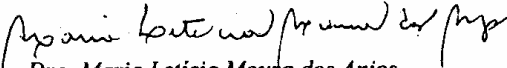
Belo Horizonte, 26 de março de 2004.

Prezada Dra. Maria das Graças Carvalho
Pesquisadora principal

Cordiais saudações,

Comunicamos que o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Socor analisou e aprovou o "Estudo da Caracterização Bioquímica Hemostática e Molecular da Doença Arterial Coronariana", no dia 5/março/2004.

Atenciosamente,



Dra. Maria Leticia Moura dos Anjos
Coordenadora do CEP - Hospital SOCOR

UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP

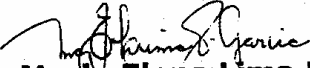
Parecer nº. ETIC 137/04

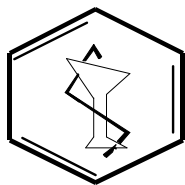
Interessada: Profa. Dra. Maria das Graças Carvalho
Faculdade de Farmácia - UFMG

DECISÃO

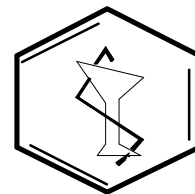
O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP, aprovou após cumprida as solicitações à diligência no dia 15 de junho de 2004 o projeto de pesquisa intitulado « **Caracterização Bioquímica, Hemostática e Molecular da Doença Arterial Coronariana.** » e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profa. Dra. Maria Elena Lima Perez Garcia
Presidente do COEP/UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPTO. ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA

NOME DO PACIENTE: _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: _____ SEXO: M F

DATA DE NASCIMENTO: ___/___/___

ENDEREÇO: _____

BAIRRO: _____ CIDADE: _____

CEP: _____ TELEFONE: DDD () _____

II – DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

- 1- TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: “CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA, HEMOSTÁTICA E MOLECULAR DA DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA”

PESQUISADOR: Prof^a. Dr^a. Maria das Graças Carvalho

CARGO/FUNÇÃO: Professora de Hematologia Clínica

UNIDADE DA UFMG: Faculdade de Farmácia

- 2- AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO RISCO MÍNIMO X RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO RISCO MAIOR

- 3- DURAÇÃO DA PESQUISA: Cinco anos

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE SOBRE A PESQUISA, CONSIGNADO:

A pesquisa que o senhor(a) está sendo convidado a participar tem o objetivo de estudar quais são os fatores laboratoriais que fazem com que um indivíduo tenha mais ou menos chance de apresentar uma doença do coração. Nesta pesquisa cada participante deve responder a um questionário, que será aplicado pela equipe da pesquisa, e retirar uma amostra de sangue que será enviada para os Laboratórios da Faculdade de Farmácia da UFMG. Da amostra enviada para o laboratório será extraído o seu DNA (material genético) que ficará armazenado. É nesse DNA que pesquisaremos características genéticas que podem influenciar no desenvolvimento das doenças do coração. Seu sangue será centrifugado para obtenção do soro ou plasma, materiais que serão usados nos testes bioquímicos e hemostáticos. Durante nenhum momento desse estudo, as pessoas que estarão trabalhando com seu material saberão que ele é seu, garantindo o sigilo de seus dados. Toda informação obtida nessa pesquisa será divulgada em eventos acadêmicos, congressos e revistas especializadas, não revelando a sua identidade, que é confidencial. Sua participação é totalmente voluntária. Você poderá solicitar à equipe o seu desligamento do estudo a qualquer momento. Caso você queira se informar de mais detalhes sobre a pesquisa agora ou no futuro, poderá entrar em contato com a pesquisadora principal, professora Maria das Graças Carvalho, no telefone (31)3499-6881, ou com as outras pesquisadoras, professora Marinez de Oliveira Sousa, no telefone (31)3499-6896 ou a aluna de doutorado Luciana Moreira Lima, no telefone (31)3464-0357. É através desse tipo de pesquisa que esperamos poder aumentar o nosso conhecimento sobre os riscos de desenvolver doenças do coração. Sua participação poderá ajudar outras pessoas que tenham doenças do coração.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

- 1- Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
- 2- Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isso traga prejuízo ao seu tratamento.
- 3- Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
- 4- Disponibilidade de assistência no Laboratel, por eventuais danos à saúde, decorrentes da punção venosa na obtenção da amostra de sangue.

V – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

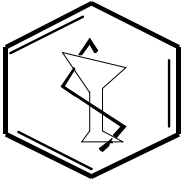
Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

Belo Horizonte, ____/____/____

assinatura do sujeito da pesquisa

assinatura do pesquisador

(carimbo ou nome legível)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPTO. ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS



FICHA CLÍNICA

Projeto de Pesquisa “Caracterização Bioquímica, Hemostática e Molecular da Doença Arterial Coronariana”

I – IDENTIFICAÇÃO:

- 1.Nome: _____
 2.Data de nascimento: ____/____/____
 3.Endereço: _____
 4.Telefone: _____ 5. CEP: _____
 6.Data da entrevista/coleta de sangue: ____/____/____ 7.Jejum: _____

II – DADOS DEMOGRÁFICOS:

- 1.Sexo: M F
 2.Estado conjugal: Solteiro Casado Separado Viúvo Divorciado
 3.Você fuma atualmente? Não Sim (quantos cigarros por dia, em média? _____)
 4.Você é ex-fumante? Não Sim (quanto tempo você fumou? _____ Que ano você parou de fumar? _____)
 5.Você tem pressão alta? Não Sim
 6.Você pratica alguma atividade física regular? Não Sim
 7.Já lhe foi dito por um médico ou outro profissional de saúde que você tem colesterol alto? Não Sim
 8.Qual o seu peso atual? _____ Qual sua altura? _____
 9.Você tem diabetes? Não Sim
 10.Você já teve Síndrome Coronariana Aguda? Não Sim (quando? _____) com Supra ST? Não Sim Não se aplica
 11.Você já teve Doença Vascular Periférica? Não Sim (quando? _____)
 12.Você já teve Acidente Vascular Cerebral? Não Sim
 13.Medicamentos em uso:
 - Hipolipemiante oral Não Sim

- Terapia de reposição hormonal Não Sim Não se aplica
 - Anticoncepcional Não Sim Não se aplica
 - Anticoagulantes orais Não Sim
 - Antiagregante Plaquetário Não Sim
 - Outros medicamentos: _____
-

III – HISTÓRIA FAMILIAR:

1. Etnia: Caucasiano Mestiço (mulato, pardo) Negro Índio Asiático
 Outros Mestiços
2. Seu pai tem/tinha alguma doença? Não Sim (Qual? _____)
3. Sua mãe tem/tinha alguma doença? Não Sim (Qual? _____)
4. Algum filho seu tem alguma doença? Não Não se aplica Sim
(Qual? _____)
5. Existe alguma doença presente em mais de uma pessoa de sua família (incluindo tios, tias, primo, avós, sobrinhos)? Não Sim (Qual e membros afetados? _____)

IV – ANGIOGRAFIA CORONARIANA

1. ____ Coronárias angiograficamente normais.
2. ____ Ateromatose leve.
3. ____ Ateromatose moderada.
4. ____ Ateromatose grave: ____ Uniarterial
____ Biarterial
____ Triarterial ou mais
Descendente anterior: Sim Não

Observação: _____

Médico responsável
(carimbo e assinatura)