



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



ANA KARINA SOUZA LEAL

**AVALIAÇÃO PLASMÁTICA, HISTOLÓGICA E
IMUNOHISTOQUÍMICA DE
BIOMARCADORES DA ATEROSCLEROSE
HUMANA PRECOCE E CRÔNICA**

Salvador
2013

ANA KARINA SOUZA LEAL

**AVALIAÇÃO PLASMÁTICA, HISTOLÓGICA E
IMUNOHISTOQUÍMICA DE
BIOMARCADORES DA ATEROSCLEROSE
HUMANA PRECOCE E CRÔNICA**

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

Orientador: Prof. Dr. Ricardo David Couto

Salvador
2013

Sistema de Bibliotecas - UFBA

L435 Leal, Ana Karina Souza.

Avaliação plasmática, histológica e imunohistoquímica de biomarcadores da aterosclerose humana precoce e crônica/ Ana Karina Souza Leal. - 2013.
55 f. : il. + anexos.

Inclui apêndice.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo David Couto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, 2013.

1. Aterosclerose. 2. Imunohistoquímica. 3. Plasma sanguíneo – Análise e química.
I. Couto, Ricardo David. II. Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia.
III. Título.

CDU – 616.13-004.6

CDD – 616.136

*Dedico esta dissertação aos meus filhos
Anna Renata e Vitor Renato
Por toda compreensão, paciência, carinho e estímulo,
fonte de inspiração nos meus estudos e na vida.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, o grande arquiteto do Universo!

Ao Professor Dr. Ricardo David Couto, meu orientador e grande incentivador desta pesquisa, por ter me aberto portas, acreditado e oportunizado a realização deste estudo com muita paciência e compreensão, sem perder a motivação durante todo o percurso.

Ao Professor Dr. Moisés Sandisburg, co-orientador deste estudo, por ter colaborado efetivamente realizando comigo as análises microscópicas dos cortes histológicos, sempre de forma muito solícita.

Aos funcionários do centro cirúrgico e do laboratório do Hospital Ana Nery (HAN), pelo apoio e todo o suporte para a concretização deste experimento, em especial a Juciene e Vladimir.

Aos integrantes do Laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Farmácia UFBA, pelo apoio nos momentos em que precisei.

A todos os familiares e amigos que me apoiaram, me ouviram, me aconselharam e me tranquilizaram em momentos de incertezas.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFBA, em especial ao professor Ajax pela compreensão e incentivo.

Aos colegas do nosso grupo de pesquisa em Dislipidemia, em especial a Ana Paula Caíres, pela colaboração intensa na fase final da dissertação.

A Eni, aluna de iniciação científica pela dedicação e apoio na identificação dos pacientes e busca das amostras.

Aos colegas, em especial Elizabete por ter compartilhado os momentos mais difíceis durante o curso, sempre uma amiga incentivadora e muito solícita.

Aos pacientes que permitiram a realização do estudo, pela contribuição à ciência.

Ao meu maravilhoso esposo Renato Santos Leal pelo companheirismo e incentivo.

Em especial, aos meus filhos, Anna Renata e Vitor Renato, pelos momentos em que não pude estar presente, obrigada por estarem sempre ao meu lado, pelo carinho, pela força,

pelo apoio, pelo incentivo constante e principalmente pela força motivadora maior o
Amor!

*“Quando a gente acha que tem todas as respostas,
vem a vida e muda todas as perguntas...”*

Luis Fernando Verissimo

LEAL, Ana Karina Souza. **Avaliação plasmática, histológica e imunohistoquímica de biomarcadores da aterosclerose humana precoce e crônica.** 55 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

RESUMO

Introdução. Embora as doenças cardiovasculares (DCV) geralmente se manifestem na vida adulta, o processo aterosclerótico inicia-se na infância. Estudos mostram que indivíduos portadores de modificações ateroscleróticas precoces e mais graves possuem um ou mais fatores e marcadores equivalentes de risco cardiovascular na vida adulta como, dislipidemia, hipertensão, obesidade e hiperglicemia. **Objetivos.** Identificar marcadores plasmáticos, histológicos e imunohistoquímicos de gênese e progressão da aterosclerose humana precoce e crônica em amostras de plasma e fragmentos vasculares de pacientes submetidos à revascularização miocárdica. **Casística e Métodos.** Foram avaliadas amostras de plasma e tecido vascular de 23 pacientes de ambos os gêneros, 44 a 73 anos, em dois grupos > 56 e < 56 anos, da Unidade de Cirurgia de Revascularização Miocárdica (RM) /Hospital Ana Nery/UFBA, com indicação de RM, entre Dez/2009 e Jun/2012. Foi determinado perfil lipídico, calculados indicadores de risco cardiovasculares e marcações para os receptores LDL-r, CD36 e CD68 em fragmentos de aorta e torácica interna. **Resultados.** Os dados do perfil lipídico entre os grupos dito crônico (> 56 anos) e dito precoce (< 56 anos) foram diferentes ($p < 0,05$). Os índices calculados no grupo < 56 anos estavam acima dos valores de referência. Em ambos os grupos, o índice de Gazziano (TG/HDL-C) indicou presença de LDL pequenas e densas. O grupo < 56 anos, mostra valores de tamanho de LDL inferiores ($7,1 \pm 1,4$ vs $4,15 \pm 2,9$) quando comparados ao grupo > 56 anos, respectivamente. O não-HDL-C mostrou-se mais graves no grupo < 56 anos em função da hipertrigliceridemia (234 ± 58 mg/dL; $p=0,0006$). Nos estudos histológicos e imunohistoquímicos, observou-se aterosclerose discreta e marcações com diferentes intensidades entre os dois grupos para LDL-r, CD36 e CD68. Nos < 56 anos, observou-se estrias lipídicas, macrófagos degenerados, cristais de colesterol, basofilia de fibras elásticas e pontos hemorrágicos. A marcação para LDL-r nos >56 anos, mostrou-se difusa. Na torácica interna, as marcações foram focais e de baixa intensidade, porém, menos intensas do que nos < 56 anos. A marcação CD36 na torácica interna foi intensa nos pacientes < 56 anos, quando comparada com os cortes dos > 56 anos. A marcação para CD68 nos cortes de aorta foi intensa em ambos os grupos, porém, nos cortes de torácica interna a marcação foi tênue independente do grupo avaliado. Para o CD36, os dados apontam para risco em < 56 anos, em função da marcação intensa observada, esse receptor está implicado na gênese do processo aterosclerótico. **Conclusões.** Pode-se conceber que existe interação importante entre os marcadores plasmáticos e teciduais atuando no evento aterogênico, sendo mais graves em pacientes com menos de 56 anos.

Palavras-chave: Aterosclerose precoce. LDL-r. CD36. CD68. Imunohistoquímica.

LEAL, Ana Karina Souza. **Plasmatic, histological and immunohistochemical evaluation of biomarker from early and cronic human atherosclerosis.** 55f. Master Dissertation – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, 2013.

ABSTRACT

Introduction. Although cardiovascular disease (CVD) often manifest in adulthood, the atherosclerotic process begins in childhood. Studies show that individuals with early atherosclerotic changes possess one or more equivalent factors and markers of cardiovascular risk in adult life as dyslipidemia, hypertension, obesity and hyperglycemia. **Objective.** Identify plasma markers, histological and immunohistochemical features of the genesis and progression of atherosclerosis in early human plasma samples and fragments of vascular patients undergoing myocardial revascularization. **Casuistic and Methods.** Samples of plasma and vascular tissue from 23 patients of both genders, 44 to 73 years, in two groups >56 and <56 years, from Myocardial Revascularization (MR) Surgery Unit / Ana Nery's Hospital / UFBA, indicated to MR, between Dec/2009 Jun/2012. Lipid profile, calculated indices of cardiovascular risk markers and receptors for LDL-r, CD36 and CD68 in fragments and internal thoracic aorta was determined. **Results.** Lipid profile data between groups said as chronic (> 56 years) and said as precocious (<56 years) were different ($p < 0.05$). The indices in the group <56 years were above the reference values. In both groups, the rate of Gazziano (TG / HDL-C) indicates the presence of small, dense LDL. The group <56 years, shows lower LDL size values (7.1 ± 1.4 vs 4.15 ± 2.9) when compared to > 56 years group, respectively. The non-HDL-C was more severe in the group <56 years due to hypertriglyceridemia (234 ± 58 mg/dL, $p = 0.0006$). In histological and immunohistochemical studies, were observed discrete atherosclerosis and marks with different intensities between the two groups for LDL-r, CD36 and CD68. In <56 years, were observed lipid streaks, degenerate macrophages, cholesterol crystals, basophilia of elastic fibers and bleeding points. The markup for LDL-r in > 56 years was diffused. In internal thoracic, the tissue marks were of low intensity and focally localized, but less intense when compared to <56 years group. The internal mammary CD36 mark was high in patients <56 years, when compared with > 56 years. The marks for CD68 in aorta was intense in both groups, however, in internal thoracic was tenuous independent of evaluated group. For CD36, the data point to risk from <56 years, due to the intense labeling observed, this receptor is really implicated in the pathogenesis of atherosclerosis. **Conclusion.** It is conceivable that there is significant interaction between the plasma and tissue markers acting in atherogenic event, being most severe in patients younger than 56 years.

Keywords: Early atherosclerosis. LDL-R. CD36. CD68. Immunohistochemistry

LISTA DE FIGURAS

- Figure 1-** Progressão da lesão aterosclerótica. Endothelial cell: célula endotelial; Lumen: lúmen; Media: camada média; Fibrous cap: capa fibrosa; Thrombus: trombo; Macrophage foam cell: células espumosas; Smooth muscle cell: células musculares lisas; Dendritic cell: células dendríticas; Extracellular matrix: matriz extra-celular; T cell: células T; ApoB-LP: lipoproteínas contendo apoB..... 15
- Figure 2-** A retenção de ApoB-LP promove recrutamento de monócitos com subsequente formação de células espumosas. Monocyte: monócito; Macrophage foam cell: células espumosas; Smooth muscle cell: células musculares lisas; Dendritic cell: células dendríticas; Extracellular matrix: matriz extra-celular; T cell: células T; ApoB-LP: lipoproteínas contendo apoB; Chemokine: quimiocina..... 17
- Figura 3-** Representação esquemática do efeito da ligação da LDLox nos macrófagos via receptor scavenger CD36. OxLDL: LDL oxidada; Transcription factor PPAR γ : fator de transcrição PPAR γ ; NF κ B: fator nuclear κ B; IL: interleucinas; kinases: Lyn, MEKK2, JNK1 e JNK2..... 20
- Figura 4-** Protocolo experimental - coletas das amostras de sangue e recebimento dos fragmentos vasculares recuperados..... 24
- Figura 5-** Marcações imunohistoquímicas para CD36, CD68 e LDL-r usando peroxidase. 1. A. reações negativas para CD36, 2.A. CD68 e 3.A LDL-r (o corte 1.A foi utilizado para as marcações negativas de CD36 e LDL-r). As reações positivas para CD36, CD68 e LDL-r são mostrados por 1.B, 2.B e 3.B em fragmentos de t. interna, aorta e t. interna, respectivamente. Microscopia de luz, aumento 100 e 400 vezes..... 30
- Figura 6-** Marcação para LDL-r usando fosfatase alcalina. 4. A. reação negativa para aorta e 4.B. reação positiva para aorta, respectivamente. Fb = fibroblastos, N= neutrófilos. Microscopia de luz, aumento 400 vezes..... 31

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Concentração de colesterol total, frações e triglicérides das lipoproteínas dos pacientes do estudo estratificados em função da idade (média \pm sd)..... 29
- Tabela 2** - Tipo de tecido, intensidade de marcação mais prevalente para os receptores e determinantes antigênicos avaliados..... 32

LISTA DE ABREVIATURAS

Apo	Apolipoproteína
CAM	Molécula de adesão vascular
CE	Colesterol esterificado
CETP	Proteína de transferência de colesterol esterificado
CL	Colesterol livre
CT	Colesterol total
DAC	Doença arterial coronária
DIC	Doença isquêmica cardíaca
DCV	Doença cardiovascular
EC	Colesterol esterificado
FACFAR	Faculdade de Farmácia
HCT	Hipercolesterolemia
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HDL-C	Colesterol da lipoproteína de alta densidade
HTG	Hipertrigliceridemia
ICAM -1	Molécula de adesão intercelular -1
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
KDa	Kilodaltons
LCAT	Lecitina-colesterol-acil transferase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-C	Colesterol da lipoproteína de baixa densidade
LDL-r	Receptor de LDL

NaCl	Cloreto de sódio
NO	Óxido nítrico
NORMO	Normolipidêmico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PL	Fosfolípides
PLTP	Proteína de transferência de fosfolípides
QM	Quilomícron
RM	Revascularização Miocárdica
SD	Desvio padrão
SR-B1	<i>“Scanveger receptor B1”</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TG	Triglicérides
TRC	Transporte reverso do colesterol
VCAM-1	Molécula de adesão vascular- 1
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
VLDL-C	Colesterol da lipoproteína de densidade muito baixa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 DOENÇAS CARDIOVASCULARES.....	15
1.2 MECANISMOS DA ATEROSCLEROSE E FATORES ASSOCIADOS À FORMAÇÃO DO ATEROMA.....	16
1.3 ATEROSCLEROSE PRECOCE.....	18
1.4 BIOMARCADORES PLASMÁTICOS E ATEROSCLEROSE.....	19
1.5 RECEPTORES CELULARES IMPLICADOS NA ATEROSCLEROSE.....	20
2. RELEVÂNCIA.....	22
3. OBJETIVOS.....	21
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
4. METODOLOGIA.....	24
4.1 DESENHO DE ESTUDO E CASUÍSTICA.....	24
4.1.1 Critério de Inclusão.....	24
4.2 PROTOCOLO DE ESTUDO.....	24
4.3 DETERMINAÇÕES PLASMÁTICAS.....	25
4.4 PREPARO E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DOS FRAGMENTOS...26	
4.5 TÉCNICA IMUNOHISTOQUÍMICA.....	26
4.6 ESTIMATIVA DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS DE LDL.....	29
4.7 BIOSSEGURANÇA.....	29
4.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	29
5. RESULTADOS.....	30
5.1. MARCADORES PLASMÁTICOS	30
5.2. MARCADORES TECIDUAIS.....	30

6. DISCUSSÃO.....	34
7. LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....	38
8. CONCLUSÕES.....	39
9. REFERÊNCIAS.....	41
ANEXOS.....	45
ANEXO I - TABELA DE PACIENTES.....	45
ANEXO II - TERMO DE CONSENTIMENTO – TCLE.....	49
ANEXO III - PROTOCOLO (TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA).....	53

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇAS CARDIOVASCULARES

As doenças cardiovasculares representam a principal causa de morte em nosso país, correspondendo a aproximadamente 30% dos óbitos (DATASUS, 2010; ROVER, 2010). Dados oriundos do estudo de Framingham, MRFIT e PROCAM mostram o papel das dislipidemias (LDL-colesterol elevado e HDL-colesterol diminuído), hipertensão arterial sistêmica (HAS), fumo, idade e diabetes como fatores de risco independentes para a aterosclerose (REDDY, 2002; ROVER et al, 2010). Além desses, uma série de outros fatores de risco são descritos e potencializam os fatores independentes; esses são denominados fatores predisponentes. Dentre os fatores predisponentes temos: história familiar precoce de doença isquêmica cardíaca (DIC), obesidade – principalmente a do tipo central, sedentarismo e fatores psicossociais.

Outro grupo de fatores de risco, cujo papel na aterogênese é provável, contudo ainda não totalmente demonstrado, é denominado grupo de fatores/biomarcadores condicionais. Nesse grupo encontram-se a concentração de triglicérides, lipoproteína (a), homocisteína, LDL pequena e densa, fibrinogênio, fatores inflamatórios e de infecção tanto viral quanto bacteriana. A idade avançada e algumas variações fisiológicas estão associadas ao aumento da quantidade de placas ateroscleróticas estabelecidas (GRUNDY et al, 1999; VACCARINO, 1999; KALELA, 2002). Segundo Collins et al (1990), quanto maior a quantidade de placas maior o risco de DIC. Identificar e controlar alguns fatores de risco independentes reduz significativamente a morbidade e a mortalidade secundária à aterosclerose. A redução do LDL-colesterol em cerca de 30% diminuiu o risco de infarto do miocárdio em 33%, o AVC em 29% e a mortalidade cardiovascular em 28% (HEBERT et al, 1997). A abstenção do fumo pode diminuir o risco de mortalidade em até 70% em indivíduos já portadores de DIC (HERMANSON et al, 1988).

Entretanto, apesar da disponibilidade de meios para se identificar e controlar os fatores de risco independentes, dados de estudos mostram que nos últimos 20 anos a queda da morbidade e mortalidade por doenças cardiovasculares nos EUA (AHA, 2011) tem diminuído em menor ritmo face as possibilidades de prevenção.

1.2 MECANISMOS DA ATEROSCLEROSE E FATORES ASSOCIADOS À FORMAÇÃO DO ATEROMA

Vários fatores estão relacionados como o remodelamento do endotélio vascular, fatores pró-angiogênicos e fatores reguladores das funções celulares, desses podemos citar tanto estados fisiológicos quanto patológicos como a cicatrização, processos inflamatórios e a própria formação do ateroma durante o processo de aterosclerose (VAN HINSBERGH, 2008). A ação desses fatores desencadeia o recrutamento de células associadas ao processo inflamatório, que secretam interleucinas, citocinas, moléculas de adesão, enzimas necessárias ao remodelamento vascular, i.e., proteinases de matriz entre outras, para mediar em particular a inflamação seguida da aterosclerose (PEREIRA; BORBA, 2008, GALKINA; LEY, 2009).

A aterosclerose pode ser desencadeada por ação celular e humoral (anticorpos, interleucinas e quimiocinas), atividade de enzimas proteolíticas que levam a instabilidade de placa, podendo resultar em trombose, e estenose que contribui para eventos isquêmicos como infartos do miocárdio (PEREIRA-BORBA, 2008) (Figura 1).

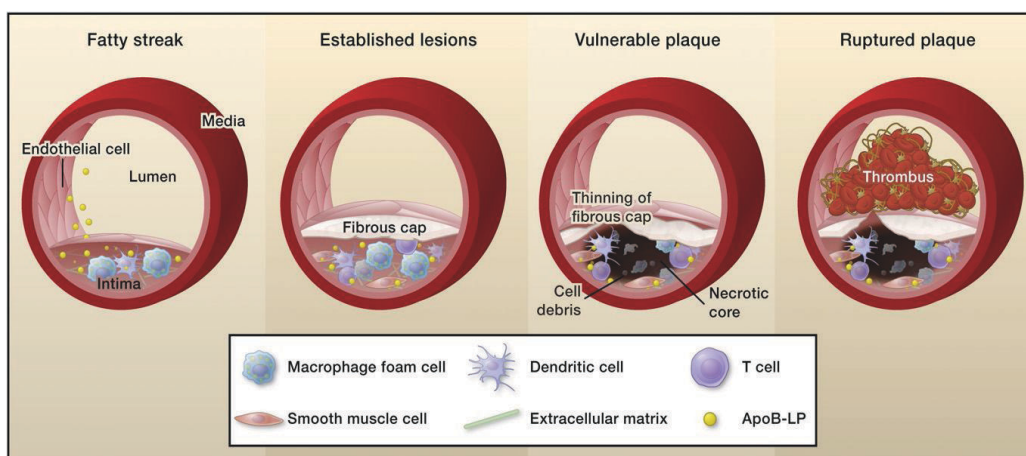


Figura 1. Progressão da lesão aterosclerótica. Endothelial cell: célula endotelial; Lumen: lúmen; Media: camada media; Fibrous cap: capa fibrosa; Thrombus: trombo; Macrophage foam cell: células espumosas; Smooth muscle cell: células musculares lisas; Dendritic cell: células dendríticas; Extracellular matrix: matriz extra-celular; T cell: células T; ApoB-LP: lipoproteínas contendo apoB.

Fonte: Moore; Tabas, 2011.

A aterosclerose é uma doença crônica evolutiva que tem a sua gênese a partir do dano endotelial das artérias (LIMA; COUTO, 2006; COUTO et al, 2007; CORRÊA-CAMACHO et al, 2007; FERRAZ, 2008; GALKINA; LEY, 2009). O termo “disfunção endotelial” é empregado quando o endotélio perde sua propriedade vasoprotetora, situação essa que determina a etapa inicial para vários processos de lesão vascular como os associados a dano mecânico, inflamação local e difusa em função de hipertensão arterial sistêmica, arteriosclerose e aterosclerose, respectivamente (DOMAS et al, 2010). Vários agentes podem desencadear a lesão endotelial, como as dislipidemias, produtos derivados da glicação protéica avançada, compostos químicos, amins vasoativas circulantes, complexos imunológicos e infecções tanto bacterianas como virais. Além disso, outros agentes, como físicos, tipo hipertensão arterial em função das forças de cisalhamento do sangue na parede vascular, causando também modificação/deformação e lesão endotelial (LEAL et al, 2002, FERRAZ, 2008). Nas dislipidemias, lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (LDLox) penetram no endotélio vascular lesado ou disfuncional. A presença de LDLox, força de cisalhamento e alteração no fluxo hemodinâmico exercem papel inicial para o recrutamento de monócitos por indução da expressão de moléculas de adesão celular (CAM) [molécula de adesão intercelular-1- ICAM-1 e molécula de adesão celular vascular-1 - VCAM-1 (adesina), além de citocinas, selectinas (P-selectina), integrinas, quimiocinas (CAF-1)] no endotélio vascular. No caso específico da lesão arterial, incluindo a aterosclerose, o desencadeamento do processo é normalmente devido à captação de LDL (lipoproteína de baixa densidade) modificada em altas concentrações, por receptores localizados na íntima dos vasos, levando em seguida a quimiotaxia de neutrófilos, linfócitos e monócitos e de outros mediadores implicados na aterosclerose (TORZEWSKI et al, 2004; GALKINA; LEY, 2009) (Figura 2).

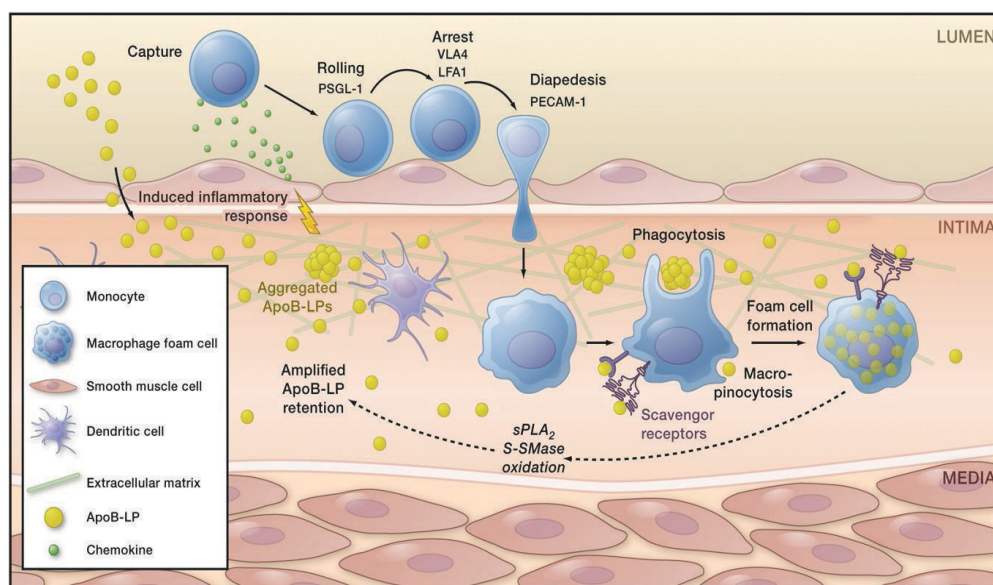


Figura 2. A retenção de ApoB-LP promove recrutamento de monócitos com subsequente formação de células espumosas. Monocyte: monócito; Macrophage foam cell: células espumosas; Smooth muscle cell: células musculares lisas; Dendritic cell: células dendríticas; Extracellular matrix: matriz extra-celular; T cell: células T; ApoB-LP: lipoproteínas contendo apoB; Chemokine: quimiocina.

Fonte: Moore; Tabas, 2011.

1.3 ATEROSCLEROSE PRECOCE

A presença de placas ateroscleróticas pode ser identificada a partir da primeira década de vida, estando a sua progressão dependente da presença de fatores e marcadores (externos, plasmáticos e teciduais, respectivamente) tanto primários quanto secundários e/ou da ação dos dois, concomitantemente, gerando assim candidatos emergentes à doença aterosclerótica, doença precoce e a doença aterosclerótica que habitualmente se manifesta em idades mais avançadas. A importância de distúrbios das lipoproteínas plasmáticas e anormalidades no metabolismo lipídico caracterizadas por dislipidemias como etiologia (hipótese lipídica) para o desenvolvimento da doença cardiovascular e arterial coronária, síndromes isquêmicas potenciais, vêm sendo cada vez mais apoiadas por estudos populacionais e epidemiológicos (LIMA; COUTO, 2006; VIEIRA et al, 2011). O processo aterosclerótico caracterizado pela redução da luz vascular, estenose vascular, em função da presença de placas de ateroma podem evoluir para síndromes isquêmicas como o infarto agudo do miocárdio (IAM). Embora seja o IAM um evento que habitualmente acomete

peessoas mais velhas, acima dos 45 anos, elevado número de pessoas tem sido acometidas precocemente. A predominância de doença vascular em pacientes jovens sugere que o IAM prematuro provavelmente resulte de evento rápido e progressivo como trombose, ruptura de placa, do que processo de evolução gradativa, como a aterosclerose (ALKHIARY, 2011). Não se sabe por certo se a incidência do IAM em idades precoces incorpora prognóstico ruim ou diferente dos pacientes em idades mais avançadas (ALKHIARY, 2011). Ainda, não se sabe se o IAM precoce tem comportamento autônomo ou é oriundo de processo aterosclerótico prematuramente acelerado em relação ao evento observado em população com idade mais avançada. Segundo Alkhiary (2011), a função hemostática, caracterização de agentes de estresse e a inflamação são alvos importantes de pesquisas.

1.4 MARCADORES PLASMÁTICOS E ATEROSCLEROSE

Outrora concebida como processo passivo de acumulação lipídica, a aterosclerose atualmente é aceita como processo de ativação de células vasculares, inflamação e trombose (KINLAY; EGIDO, 2006). Eventos clínicos geralmente apresentam-se após ruptura da intima aterosclerótica devido a mudanças na composição celular arterial. A inflamação é o passo inicial para o início da aterosclerose, sendo exacerbada por quase todos os marcadores de risco cardiovasculares identificados em estudos epidemiológicos, e em particular naqueles relativos à elevação do colesterol da lipoproteína de densidade baixa (LDL-C). A associação entre a alta concentração de LDL-C e o risco de desenvolver doença coronária está bem estabelecida na literatura científica. A *American Heart Association* em sua V conferência (1998) sugeriu a utilização de estratégias para identificação de pacientes com alto risco cardiovascular, que necessitam de prevenção primária. Entre as estratégias discutidas, foi sugerida a utilização de marcadores plasmáticos de inflamação, como o método de Proteína C Reativa de alta sensibilidade (PCR-as); a Albumina Amilóide Sérica (SAA); o fibrinogênio, tamanho de partícula de LDL e/ou estimativas com valor preditivo diagnóstico (VIEIRA et al, 2011). O estudo de Libby e Ridker (1999) mostra também o fibrinogênio, molécula de adesão intercelular solúvel – 1 (sICAM-1), interleucina-6 (IL-6) e PCR-as além da sua associação com índices gerados a partir de razões obtidas do perfil lipídico como, CT/HDL-C, LDL-C/HDL-C e TG/HDL-C que podem ser utilizadas como marcadores associados de risco

cardiovascular global e/ou estimativas com valor preditivo estabelecidos para utilização clínica.

1.5 RECEPTORES CELULARES IMPLICADOS NA ATEROSCLEROSE

As lesões ateroscleróticas são caracterizadas pelo acúmulo de lipídios em células espumosas, oriundas de macrófagos, células da musculatura lisa e fibroblastos. Existem vários receptores que contribuem com a transferência de lipoproteínas para o interior celular, como, por exemplo, o LDL-r, VLDL-r e o *LDL related protein* (LRP) que são capazes de intermediar a remoção/captação de lipoproteínas nativas e minimamente modificadas. O papel do LDL-r na regulação da concentração do colesterol plasmático já está bem estabelecido, entretanto, o LDL-r não parece ter função importante na gênese da aterosclerose, pois, observa-se progressão rápida em pacientes com hipercolesterolemia familiar homozigótica, assim como no modelo animal, em coelhos *Watanabe heritable hyperlipidemic* WHHL, e camundongos LDL-r *knockout* (HILTUNEN et al, 1998) Por outro lado, dentre os receptores conhecidamente associados à gênese da aterosclerose, está a família de receptores “Scavenger receptor’s” (SRs), i.e., CD 36, presentes em plaquetas, monócitos/macrófagos, células endoteliais e da musculatura lisa (COLLOT-TEIXEIRA et al, 2007), receptores esses implicados na formação das células espumosas em resposta ao dano extracelular, e transmigração de lipoproteínas para o espaço subendotelial, entre outros definidos como receptores de superfície de membrana, que ligam lipoproteínas quimicamente modificadas, tais como LDL acetilada (AcLDL), LDL nitrada, LDL oxidada (OxLDL) entre outros possíveis tipos de modificação. Inicialmente a atividade do receptor *scavenger* foi identificada por Brown e Goldstein et al (1983) a partir do desenvolvimento in vitro de modelo para deposição de colesterol da LDL em macrófagos localizados nas paredes das artérias durante o estágio inicial da formação da placa aterosclerótica. Ainda, Endemann et al (1993), identificaram pela primeira vez o CD36 como receptor potencial de OxLDL (Figura 3).

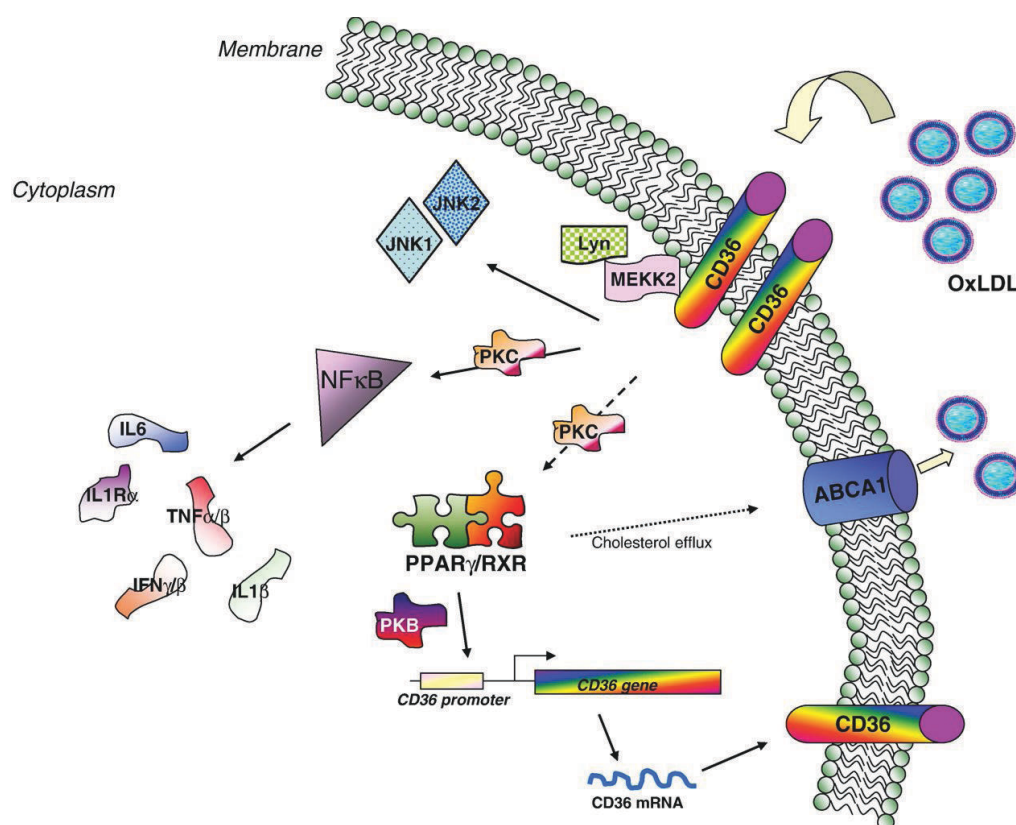


Figura 3. Representação esquemática do efeito da ligação da LDLox nos macrófagos via receptor *scavenger* CD36. OxLDL: LDL oxidada; Transcription factor PPAR γ : fator de transcrição PPAR γ ; NF κ B: fator nuclear κ B; IL: interleucinas; kinases: Lyn, MEKK2, JNK1 e JNK2.

Fonte: Teixeira et al.,2007.

Nos últimos 25 anos o CD36 tem sido definido como receptor multiligante envolvido em adesão celular, transporte de lipídeos e ácidos graxos, utilização, armazenamento e apresentação antigênica, clearance de células apoptóticas e fotorreceptores. Existem novas perspectivas visando o entendimento dos mecanismos e funções do CD 36, principalmente, para desenvolver e nortear protocolos/estratégias terapêuticas que possam alterar o curso de doenças associadas à aterosclerose. Temos ainda o CD 68, receptor pertencente à família de glicoproteínas lisossomais (LGP)/proteínas lançadeiras de membrana que participam ativamente na endocitose e/ou tráfego lisossomal. O CD68 é fortemente expresso em grânulos citoplasmáticos, e fracamente na superfície de macrófagos, monócitos, neutrófilos, basófilos, e células Natural-Killer (NK-cells). O CD68 pode também ser encontrado no citoplasma de células do tecido não-hematopoético, especialmente no fígado, glomérulo e túbulos renais (GOYERT, 1997).

2. RELEVÂNCIA

Embora a aterosclerose seja descrita como evento multifatorial associado a diversas hipóteses, como a lipídica, infecciosa, autoimune, inflamatória, traumática e associada a eventos hemodinâmicos, entre outras, atualmente, a aterosclerose vem sendo enfrentada como doença inflamatória crônica de origem multifatorial que ocorre em resposta à agressão endotelial, acometendo principalmente a camada íntima de artérias de médio e grande calibre (IV DIRETRIZES, SBCA, 2007). As doenças cardiovasculares representam a maior causa de morte em países em desenvolvimento, como o Brasil (III DIRETRIZES, SBCA, 2001), e tem se tornado rapidamente a principal causa de mortalidade no mundo, respondendo por um quinto de todas as mortes (COLIN, 2009). Desta forma, avaliamos variáveis importantes relacionadas às síndromes isquêmicas, neste caso específico a doença arterial coronária, valorizando as hipóteses gerais relativas à propensão e produção de lesões no endotélio e parede vascular de pacientes submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica, através da recuperação de fragmentos vasculares que são habitualmente removidos durante o procedimento cirúrgico e de amostras de sangue, soro e plasma coletados. Sendo assim, a proposta desse estudo foi realizar a avaliação histológica, citoquímica e imunohistoquímica dos tecidos recuperados, a avaliação do perfil lipídico (efeito da lipemia) e cálculo de indicadores de risco cardiovascular.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar marcadores plasmáticos, histológicos e imunohistoquímicos de gênese e progressão da aterosclerose humana em fragmentos vasculares das artérias aorta e torácica interna normalmente retirados e descartados durante a cirurgia de revascularização miocárdica, correlacionando-os com marcadores plasmáticos de risco cardiovascular.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Realizar a citoquímica (H.E.);

3.2.2 Realizar a imunohistoquímica para identificação de CD36, CD68, e LDL-r.

3.2.3 Realizar a determinação de marcadores plasmáticos do perfil lipídico para cálculo de indicadores de risco cardiovascular comparando os dados obtidos das amostras dos indivíduos do estudo.

4. METODOLOGIA

4.1 DESENHO DE ESTUDO E CASUÍSTICA

Foi realizado estudo observacional, transversal, seccional onde participaram 23 pacientes de ambos os gêneros, faixa etária 44 a 73 anos, oriundos da Unidade de Cirurgia de Revascularização Miocárdica (RM) do Hospital Ana Nery/UFBA, eletivamente selecionados para RM, amostragem de conveniência, no período de Dez/2009 e Jun/2012. Desses foram selecionados 15 pacientes de ambos os gêneros, faixa etária de 44 a 56 anos com diagnóstico de doença precoce (<56 anos) e, oito pacientes com doença crônica (>56 anos) previamente diagnosticada por cineangiocoronariografia (Anexo I). Amostra de soro e plasma foram colhidas antes do procedimento cirúrgico em função das alterações já conhecidas no perfil lipídico após intervenções agudas, por outro lado, os fragmentos vasculares de aorta e torácica interna dos participantes do estudo foram recuperados imediatamente após cirurgia. Todos os pacientes foram informados dos riscos e benefícios do estudo e assinaram termo de consentimento livre e pré-esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Maternidade Climério de Oliveira, conforme parecer/resolução aditiva nº 049/2009 (CEPIRB00004123) (Anexo II).

4.1.1 Critérios de Inclusão

- Ambos os Sexos;
- Idade entre 40 e 75 anos;
- Termo de Consentimento Livre e Pré-esclarecido (TCLE) assinado;
- Pacientes do Hospital Ana Nery submetidos a cirurgia eletiva de revascularização miocárdica;

4.2 PROTOCOLO DE ESTUDO

Nosso protocolo de estudo (Figura 4) avaliou o comportamento de marcadores de risco cardiovascular tanto plasmáticos quanto teciduais de pacientes com doença arterial coronária precoce e crônica (conforme casuística) que foram submetidos eletivamente à cirurgia de revascularização miocárdica, sendo os fragmentos das artérias aorta e torácica

interna, habitualmente descartados, recuperados após procedimento cirúrgico para análise histológica e imunohistoquímica (Anexo III).

<p><i>Protocolo Experimental</i></p> <ol style="list-style-type: none">1. Identificação dos pacientes programados para cirurgia de RM2. Esclarecimento e assinatura do termo de consentimento3. Recuperação dos dados em prontuários4. Coleta das amostras no Centro Cirúrgico5. Encaminhamento das amostras para a anatomia patológica do Complexo HUPES6. Cortes utilizados para HE e silanização das lâminas com montagem dos cortes para imunohistoquímica - FACFAR7. Padronização da técnica imunohistoquímica: marcação para CD36, CD68 e LDL-r - FACFAR8. Realização da imunohistoquímica e determinações plasmáticas – FACFAR e Lab HAN, respectivamente9. Análise de dados

Figura 4- Protocolo experimental - coletas das amostras de sangue e recebimento dos fragmentos vasculares recuperados.

4.3 DETERMINAÇÕES PLASMÁTICAS

As determinações plasmáticas foram realizadas no laboratório do Hospital Ana Néri – UFBA, para se manter o processamento das amostras em tempo inferior a 4h. As amostras foram mantidas sob refrigeração anterior a realização dos marcadores plasmáticos utilizados para avaliação do risco cardiovascular conforme protocolo recomendado para determinação do perfil lipídico, marcadores de função renal, hepática e hemostasia por métodos convencionais. Os dados foram utilizados para cálculo de estimativas de risco cardiovascular.

4.4 PREPARO E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DOS FRAGMENTOS

Os fragmentos vasculares após recuperação foram imediatamente fixados e acondicionados em formaldeído tamponado a 10%. Os fragmentos recuperados foram limpos e orientados para proporcionar a visualização das túnicas íntima, média e adventícia. Após orientação, os fragmentos foram incluídos em parafina e então seqüencialmente cortados em micrótomo (Leica, modelo RM2125, Alemanha) para confecção dos cortes histológicos com 05µm de espessura. Os cortes foram aderidos a lâminas de vidro (02 cortes/lâmina para 05 lâminas/fragmento) conforme protocolo do Laboratório de Anatomia Patologia do Hospital Universitário Professor Edgar Santos (Complexo HUPES) (ANEXO II). Os cortes para imunohistoquímica foram aderidos em lâminas previamente silanizadas com organo silano a 5% (Sigma-Aldrich Brasil, código 000010 A3648-500ML EA SIAL Carrier-pass air 3-AMINOPROPILTRIETOXISILANO).

A análise histopatológica foi realizada por microscopia dos cortes aderidos às lâminas contendo os fragmentos vasculares após fixação (álcool absoluto) e coloração usual pela eosina-hematoxilina (HE). O exame dos cortes histológicos nas lâminas foi supervisionado por Anatomopatologista experiente.

4.5 TÉCNICA IMUNOHISTOQUÍMICA

Para a realização da técnica imunohistoquímica foram realizados cortes de 05µm de espessura a partir do material emblocado em parafina. Os cortes foram, então, estendidos em lâminas de vidro previamente tratadas e preparadas com adesivo a base de organosilano 3-aminopropiltriétoxi-silano Sigma A 3648, St Louis, MO, USA e desparafinizados em dois banhos de xilol por 10 minutos/cada. Em seguida, foram re-hidratados em álcool absoluto por duas vezes/dois minutos cada. E por fim foram lavados em água corrente. Após a lavagem, etapa final da desparafinização, as lâminas foram acondicionadas em cubas de vidro, preenchidas com solução de citrato pH 6,0. Logo após o aquecimento dessa solução, em banho-maria, até temperatura constante de 90 °C, logo em seguida as lâminas ficaram imersas na solução para recuperação antigênica por trinta minutos.

Após o processo de recuperação antigênica, os cortes foram resfriados a temperatura ambiente de 18 a 20°C por vinte minutos, e foi então adicionado peróxido a 10% por 25 minutos para bloqueio da peroxidase endógena. Após bloqueio, foram feitas três lavagens em água corrente e colocados em PBS entre 5-10 minutos por duas vezes (Anexo II).

As lâminas foram secas com papel absorvente e então demarcadas com lápis de cera. Antes de incubar com o anticorpo primário foi realizado o bloqueio com solução bloqueadora, a base de albumina bovina a 1%, entre 5-10 minutos, em seguida foi desprezada a solução vertendo-a para adicionar o anticorpo primário (anti-CD36, CD68 e LDL-r em seus respectivos protocolos).

Os anticorpos primários foram diluídos previamente com solução diluente (DAKO®, cód. S3022) em tubos eppendorfs, sendo adicionados 50µl em cada corte e, logo em seguida, secado o perímetro dos mesmos cuidadosamente. As lâminas foram acondicionadas em câmara úmida por no mínimo uma hora a temperatura ambiente (T.A.) ou *overnight* (média de 18 horas) a 4 °C. Seguida da segunda e terceira etapas do sistema DAKO LSAB®, peroxidase, pronto para uso por 1h a 37 °C. Após cada incubação, os cortes foram lavados com PBS por 5 minutos.

A padronização das concentrações dos anticorpos para as marcações imunohistoquímicas dos receptores CD36, CD68 e LDL-r foi realizada utilizando cortes de fígado humano (5µm de espessura), que em seguida, foram utilizados como controles positivos para as marcações. Os controles negativos foram obtidos a partir da não utilização dos anticorpos primários, adicionando tampão PBS, dando seguimento a reação conforme acima descrito.

Para a marcação do CD36, após fixação, seguida da reação de bloqueio com albumina bovina a 1% entre 5-10 minutos, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário monoclonal anti CD36 humano (Serotec Product®, isotipo IgM, clone SM0, camundongo), com título 1:20, *overnight* (média de 18 horas) a 4 °C. Seguida da segunda e terceira etapas do sistema DAKO LSAB®, peroxidase, pronto para uso por 1h a 37°C. Após cada incubação, os cortes foram lavados com PBS por 5 minutos.

Para verificar a presença do CD68, após fixação, seguida da reação de bloqueio com albumina bovina a 1% por 30 minutos, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário monoclonal anti CD68 humano (DAKO®, isotipo IgG, clone kp1, camundongo), com título 1:200, *overnight* (média de 18 horas) a 4 °C, seguida da segunda e terceira etapas do sistema DAKO LSAB®, peroxidase, pronto para uso por 1h a 37 °C. Após cada incubação, os cortes foram lavados com PBS por 5 minutos.

Para verificar a presença dos LDL-r, após fixação, seguida da reação de bloqueio com solução de bloqueio por 30 minutos, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário monoclonal anti-receptor humano de LDL (Oncogene™, classe e subclasse IgG2ak, clone 15C8, camundongo) na concentração de 3 g/mL por 18h, *overnight*, a 4 °C, Seguida da segunda e terceira etapas do sistema DAKO LSAB®, peroxidase, pronto para uso por 1h a 37 °C. Após cada incubação, os cortes foram lavados com PBS por 5 minutos.

A presença de receptores para LDL (LDL-r) nos paciente com idade superior a 56 anos também foi investigada, porém, apenas em fragmentos vasculares de tecido aórtico proveniente de pacientes com doença aterosclerótica coronária através da reação da fosfatase alcalina, utilizando como cromógenos o FAST RED *substrate system* (DAKO®, USA), com a finalidade de diferenciar as marcações.

A revelação das marcações foi determinada utilizando-se DAKO LSAB®, peroxidase, pronto para uso. Para evidenciar as marcações imunohistoquímicas os cortes foram contracolorados com solução de hematoxilina de Gill, N. 03 (ACCUSTAIN®, Sigma-Aldrich, Cód. GHS-3, Lot. 073k4357) por 15 segundos. Em seguida, os cortes foram lavados em água corrente por seis vezes, desidratados em álcool absoluto em duas etapas de dois minutos/cada, seguindo ainda de xilol em duas etapas de dois minutos/cada. Para montar as lâminas foi utilizado Entellan (MERCK, Alemanha) e lamínula para análise por microscopia de luz para 100, 400 vezes, (NIKON ECLIPSE E200), tendo sido fotografadas com câmara fotográfica (Olympus C-5050).

Após a realização da técnica imunohistoquímica, a marcação positiva para os receptores pesquisados foi atribuída utilizando o seguinte critério: a classificação foi feita segundo a intensidade de marcação nos tecidos, em função do tipo de marcação, ou seja, membrana e/ou citoplasmática, por campo avaliado. Relativamente à intensidade, a classificação foi feita em “-” (coloração nula), “+”, “++” e “+++” (intensidade crescente). Os dados obtidos das avaliações microscópicas foram tratados estatisticamente utilizando o teste de coincidência (Kappa) para avaliar a concordância entre observadores.

4.6 ESTIMATIVA DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS DE LDL

Foram calculadas as razões TG/HDL-C (índice de Gazziano) para estimar o tamanho da partícula de LDL. Razão maior que dois é indicativo da presença de LDL pequena e densa (≤ 25.5 nm) (MARUYAMA et al, 2003).

4.7 BIOSSEGURANÇA

Foi utilizado equipamento individual de proteção adequado para o manuseio do DAB devido ao seu caráter carcinogênico. Toda a vidraria exposta ao reagente foi lavada com hipoclorito de sódio a 1%.

4.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi realizada análise matemática para verificação da distribuição dos dados a partir da estatística descritiva e inferencial. A significância estatística foi atribuída a níveis críticos (p) inferiores a 0,05 (5%), para análises comparativas e/ou associativas entre as variáveis do estudo. Para os dados de perfil lipídico, em função do tipo de distribuição, foi utilizado o teste t não pareado com correção de *Welch*, para intervalo de confiança de 95%.

As estimativas dos indicadores de risco estão representadas como média \pm erro padrão da média. Foi realizado teste de Kaplan para análise histológica, ou seja, avaliação de concordância entre avaliadores. A análise estatística foi realizada com a utilização do software GraphPad Prism 5.01 (USA).

5. RESULTADOS

5.1 MARCADORES PLASMÁTICOS

A tabela 1 mostra os valores da concentração de colesterol e triglicérides das lipoproteínas plasmáticas dos pacientes.

TABELA 1 - Concentração de colesterol total, frações e triglicérides das lipoproteínas dos pacientes do estudo estratificados em função da idade (média \pm sd).

<i>Determinações Laboratoriais</i>	<i>Concentrações</i> mg/dL	<i>Indicadores de risco cardiovascular</i>	<i>Concentrações</i> mg/dL	<i>Indicadores de risco cardiovascular</i>	<i>Nível descritivo</i> (Perfil lipídico)	<i>Nível descritivo</i> (ind. de risco)
n=23	(>56 anos)	(>56 anos)	(<56 anos)	(<56 anos)	(<i>p</i>)	(<i>p</i>)
Colesterol						
Total	204 \pm 12	CT/HDL-C= 4,98 \pm 1,4	226 \pm 53	CT/HDL-C= 6,85 \pm 1,3	0.0712	0.1934
LDL	129 \pm 11	LDL-C/HDL-C= 3,15 \pm 1,3	147 \pm 43	LDL-C/HDL-C= 4,4 \pm 1,0	0.0716	0.2309
HDL	41 \pm 3	TG/HDL-C= 4,15 \pm 2,7	33 \pm 11	TG/HDL-C= 7,1 \pm 1,4	0.0083	0.1465
VLDL	34 \pm 5		47 \pm 6		0.0001	
Triglicérides	170 \pm 23		234 \pm 58		0.0006	

Legenda: LDL = Lipoproteína de baixa densidade, HDL = Lipoproteína de alta densidade, VLDL = Lipoproteína de densidade muito baixa. ^a No momento da coleta sanguínea os pacientes estavam utilizando estatinas há pelo menos três semanas. Teste t não pareado com correção de *Welch*, para intervalo de confiança de 95%. As estimativas dos indicadores de risco estão representadas como média \pm erro padrão da média.

O cálculo dos indicadores de risco CT/HDL-C, LDL-C/HDL-C e TG/HDL-C foram realizados e comparados entre os grupos, porém, não foram significativos para o nível descritivo estabelecido ($p > 0,05$) (Tabela 1).

5.2 MARCADORES TECIDUAIS

Estudos Histológicos e Imunohistoquímicos

A figura 5 mostra as marcações imunohistoquímicas para identificação do CD 36, CD 68 e LDL-r em fragmentos de tecido vascular recuperados após descarte. Os fragmentos foram sequencialmente cortados para confecção dos cortes histológicos com 5µm de espessura e orientados para proporcionar a visualização das túnica íntima, média e adventícia.

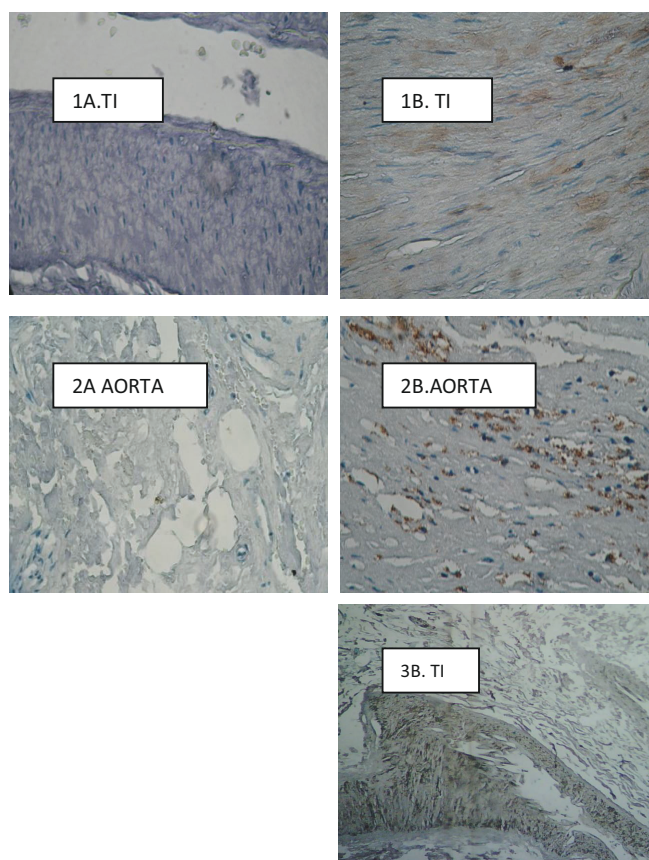


Figura 5- Marcações imunohistoquímicas para CD36, CD68 e LDL-r usando peroxidase. **1.A.** reações negativas para CD36 e LDL-r, **2.A.** CD68. As reações positivas para CD36, CD68 e LDL-r são mostrados por **1.B**, **2.B** e **3.B** em fragmentos de t. interna, aorta e t. interna, respectivamente. Microscopia de luz, aumento 100 e 400 vezes.

Este tipo de marcação específica observada nos cortes positivos (1.B, 2.B e 3.B) mostram a presença dos CD36, CD68 e LDL-r em células musculares lisas (1.B) e neutrófilos (2.B e 3.B), respectivamente, presentes nos cortes histológicos analisados. As células marcadas foram identificadas a partir de suas características morfológicas e tipo de localização tecidual. A figura 6 mostra as marcações imunohistoquímicas para identificação de LDL-r em fragmentos de aorta – pacientes com mais de 56 anos – recuperados após descarte. Os fragmentos foram sequencialmente cortados para confecção

dos cortes histológicos com 5µm de espessura e orientados para proporcionar a visualização das túnicas íntima, média e adventícia.

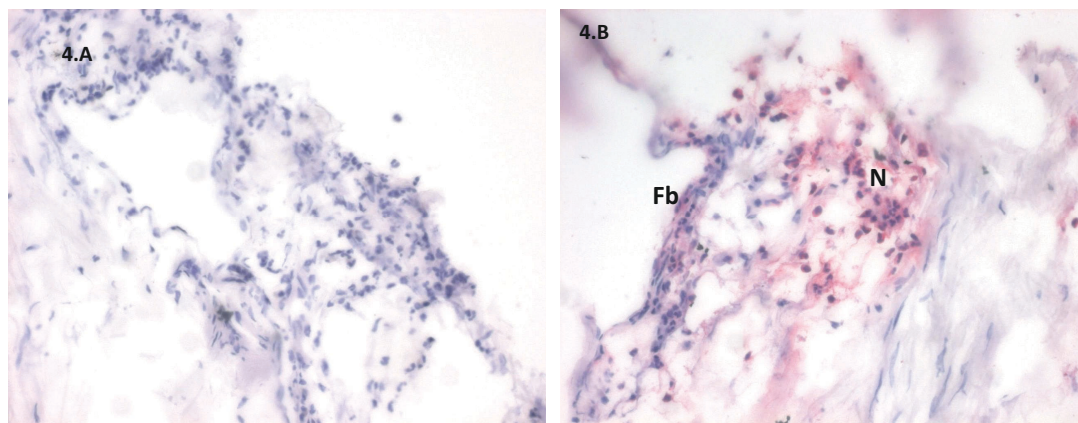


Figura 6- Marcação para LDL-r usando fosfatase alcalina. **4.A.** reação negativa para aorta e **4.B.** reação positiva para aorta, respectivamente. **Fb** = fibroblastos, **N**= neutrófilos. Microscopia de luz, aumento 400 vezes.

Um ponto importante destes resultados imunohistoquímicos foi o tipo de marcação e intensidade observadas entre os fragmentos dos indivíduos que foram revascularizados precocemente (< 56) e aqueles revascularizados com idade média > 56 anos, evento isquêmico característico e associado a DAC em relação aos cortes de aorta. Nos fragmentos dos pacientes com idade superior a 56 anos foram evidenciados infiltrados mielomonocíticos com presença de ateromatose discreta mais intensa do que a observada nos cortes de aorta dos pacientes com idade inferior a 56 anos. Entretanto, foi observado nos cortes de aorta presença de tecido gorduroso permeando os segmentos vasculares, de cor rosa - amarelada de aspecto adiposo, podendo ser vacúolos, macrófagos degenerados, basofilia de fibras elásticas ou pontos hemorrágicos. A intensidade da marcação observada por tipo de tecido e marcação é mostrada na tabela 2.

TABELA 2 - Tipo de tecido e intensidade de marcação mais prevalente para os receptores e determinantes antigênicos avaliados.

Marcação	Aorta (>56 anos)	T. Interna (> 56 anos)	Aorta (<56 anos)	T. Interna (<56 anos)
LDL-r	+++	++	+	+
CD36	+	+	*	+++
CD68	+++	+	+++	-

Legenda: + = marcação focal, ++ = marcação intensa, +++ = marcação intensa difusa, - = ausência de marcação e * = marcação não realizada. Os sinais utilizados para medir a intensidade das marcações representam a impressão média diagnóstica da equipe após avaliação dos cortes.

6. DISCUSSÃO

As partículas lipoproteicas sofrem diversos tipos de modificação como oxidação, nitratação, acetilação, glicações entre outras (LIMA; COUTO, 2006), sendo então captadas por receptores não fisiológicos presentes em macrófagos, células musculares lisas e fibroblastos, essas células possuem “*scavenger receptors*”, receptores da família CD36. A captação desordenada, sem “*down regulation*”, leva a formação subsequente de células espumosas e infiltrados lipídicos - estrias gordurosas - as quais são o ponto de partida para a formação das placas ateroscleróticas evidenciadas na parede vascular (BOYLE, 2005). Embora as doenças cardiovasculares (DCV) geralmente se manifestem na vida adulta, o processo aterosclerótico inicia-se na infância (Expert panel on integrated guidelines for cardiovascular health and risk reduction in children and adolescents: summary report. Pediatrics 2011). Na maioria das crianças, as mudanças ateroscleróticas vasculares são mínimas e podem ser reduzidas ou prevenidas com mudanças no estilo de vida e nutricionais. Entretanto, em algumas crianças, o processo é acelerado em função de fatores de risco identificáveis (ex., obesidade e hipertensão) e/ou a presença de doenças específicas que são associadas a DCV prematura (American Academy of Pediatrics. Cardiovascular risk reduction in high-risk pediatric populations. Pediatrics, 2007).

Estudos subsequentes, mostram que indivíduos portadores de modificações ateroscleróticas precoces e mais graves mostraram ter um ou mais fatores e marcadores equivalentes de risco cardiovascular na vida adulta como, dislipidemia, hipertensão, obesidade e hiperglicemia (MCMAHAN et al, 2006) Sendo assim, a partir da avaliação dos dados do perfil lipídico dos pacientes dos grupos > 56 e < 56 anos foram evidenciadas diferenças significativas ($p < 0,05$). Os valores determinados nas amostras dos pacientes com menos de 56 anos - ditos com doença precoce - mostram valores acima do preconizado para valores de normalidade (SPOSITO *et al.*, 2007) superiores aos valores obtidos das amostras dos pacientes do grupo > 56 anos - ditos com doença crônica - ou seja, CT (204 ± 12 - 226 ± 53 mg/dL, teste t, $p = 0,0712$), VLDL-C (34 ± 5 - 47 ± 6 , teste t, $p = 0,0001$), LDL-C (129 ± 11 - 147 ± 43 , teste t, $p = 0,0716$), HDL-C (41 ± 3 - 33 ± 11 , teste t, $p = 0,0083$) e TG (170 ± 23 - 234 ± 58 , teste t, $p = 0,0006$), valores representados para os grupos > 56 e < 56 anos, respectivamente (Tabela 1).

Modificações no metabolismo lipídico estão associadas ao desenvolvimento da aterosclerose. As dislipidemias estão classicamente associadas ao processo aterogênico,

sendo esses os marcadores de risco mais importantes associados à aterosclerose e DAC. As dislipidemias são representadas por distúrbios no metabolismo das lipoproteínas, decorrentes de alterações fisiológicas que resultam em valores séricos acima ou abaixo do desejável para CT (colesterol total), LDL-C (colesterol de LDL), TG (triglicérides), relações CT/HDL-C e LDL-C/HDL-C e para a fração não-HDL-C (colesterol não-HDL), ou, principalmente, abaixo do desejável no caso do HDL-C (colesterol de HDL) (VACCARINO; SANTOS, 2001; REDDY, 2002; GIULIANO et al, 2005; ROVER et al, 2010).

Associados às dislipidemias, há outros fatores envolvidos no desenvolvimento da aterosclerose e DAC como obesidade, dieta, sedentarismo, alcoolismo, tabagismo, síndrome metabólica, diabetes mellitus, hipertensão arterial, desnutrição do neonato entre outros (SANTOS, 2001; ROVER et al, 2010). Em relação ao papel dessas partículas como indicadores de risco cardiovascular, Kawamoto et al (2005) afirmaram que o colesterol não-HDL é um dos indicadores mais promissores para determinar risco de aterosclerose, principalmente em pacientes com hipertrigliceridemia e doença aterogênica precoce (GIANTURCO; BRADLEY, 1988). Por sua vez, Gardener et al (2009) propuseram os mesmos indicadores de Kawamoto et al (2005), incluindo os níveis de apoB e destacando a razão CT/HDL-C. Também determinaram que o aumento dos índices de CT, LDL-C, não-HDL-C, apoB, CT/HDL-C, LDL-C/HDL-C e apoB/apoA-I estão associados com a presença de placa aterosclerótica. No nosso estudo, a comparação dos índices calculados não foram significantes, embora os valores para o grupo dito precoce (< 56 anos) estejam bem acima dos valores de referência considerados para normalidade (Castelli I, homens < 5, e mulheres < 4,4; Castelli II, homens < 3,3, e mulheres < 2,9) (Tabela x1) (PESARO *et al.*, 2012.). Em ambos os grupos, em relação ao índice de Gazziano (TG/HDL-C) os valores encontrados apontam para tamanhos de partícula estimados de LDL inferiores a 25,5nm, ou seja, compatíveis com a presença de LDL pequenas e densas (MARUYAMA et al, 2003; VIEIRA et al, 2011). O grupo dito precoce, mostra valores estimados de tamanho de LDL bastante inferiores ($7,1 \pm 1,4$ vs $4,15 \pm 2,9$; Tabela 1) quando comparados ao grupos ditos crônicos, precoces e crônicos, respectivamente, mostrando assim maior gravidade em relação a riscos múltiplos e equivalentes de doença cardiovascular no grupo < 56 anos.

Para o colesterol não-HDL, com base no escore de risco de Framingham et al., (2009) ou seja, múltiplos riscos (≥ 2), tendo como referência não-HDL-C < 160mg/dL (BERGMANN, 2012) os valores encontrados foram superiores aos valores recomendados,

porém, não significantes ($p > 0,05$). Por outro lado, mostram-se mais graves para o grupo dito precoce em função da hipertrigliceridemia importante ($234 \pm 58 \text{mg/dL}$) e extremamente significativa ($p=0,0006$), ratificada com os valores das concentrações de VLDL-C ($p=0,0001$), embora encontrem-se também no grupo dito crônico acima dos valores preconizados ($170 \pm 23 \text{mg/dL}$) (Tabela 1) (SPOSITO *et al.*, 2007 ou IV DIRETRIZ). Quanto à HDL-C, Seon *et al* (2011) afirmaram que o aumento dos níveis de HDL-C está associado com a diminuição do espessamento da íntima média vascular em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 e aterosclerose. Kablak–Ziembicka *et al.*, (2011) relataram que vários fatores estão associados com o espessamento vascular e aterosclerose, como diabetes, hiperlipidemia, tabagismo, infarto prévio do miocárdio e ou isquemia, bem como altos níveis de IL6, TNF- α , PCR, creatinina e glicose séricas, que também estariam relacionados com o aumento da estenose segundo exames de ultrassonografia com doppler, aliados a níveis elevados de LDL-C, CT e baixos níveis de HDL-C, os quais também são citados por Balanescu *et al.*, (2010). Situação semelhante é exposta por Maki *et al.*, (2012) que expuseram a associação do aumento de risco de doença coronária com o aumento do colesterol total e TG, aumento da proporção de partículas de LDL pequena e densa, e redução dos níveis de HDL-C. Para Bosevski *et al* (2007) a análise multivariada mostrou que o colesterol não-HDL (OR 1,374; IC95% 1,035 a 1,825) e a glicemia (OR 1,214; IC95% 1,022 a 1,442) são indicadores preditivos independentes da presença de placa. Ainda em relação ao colesterol não-HDL, Bergmann (2012) reafirmou a utilidade do não-HDL-C como marcador de risco de doença cardiovascular, sendo que o não-HDL-C está mais relacionado com a apoB do que com a LDL-C, tendo o mesmo valor preditivo dessas moléculas (apoB). Não foi possível determinar as concentrações de apo A-1 e apo B em nossa casuística, pois, houve importante perda de segmento dos pacientes alocados no estudo.

Em relação aos estudos histológicos e imunohistoquímicos, evidenciamos presença de aterosclerose discreta, principalmente nos casos crônicos, e marcações com diferentes intensidades nos cortes histológicos entre os dois grupos, ditos precoce e crônico, para as marcações LDL-r, CD36 e CD68 mostradas na figura 5. Nos casos ditos precoces, foi observada a presença de tecido adiposo permeando o tecido vascular, ou seja, presença de estrias lipídicas (células espumosas) caracterizadas pela presença de cor rosa – amarelada e elementos figurados participes do processo aterogênico como macrófagos degenerados, cristais de colesterol, basofilia de fibras elásticas e pontos hemorrágicos. França (2006) cita que as células espumosas constituem a primeira lesão por depósito de lipídeos no

espaço intimal química e microscopicamente identificada. Posteriormente, monócitos continuam a ser atraídos e há migração e multiplicação de células musculares lisas para o espaço subendotelial, que também acumulam gotículas de gordura podendo ser visíveis macroscopicamente como estrias gordurosas. Os estudos histológicos e imunohistoquímicos nos fragmentos vasculares dos pacientes ditos crônicos e precoces permitiram a identificação (marcação positiva) do LDL-r em neutrófilos e linfócitos presentes nos cortes histológicos analisados. O papel do LDL-r na regulação dos níveis plasmáticos de colesterol das lipoproteínas está bem estabelecido. Entretanto, é pouco provável que o LDL-r esteja implicado de forma importante no processo aterogênico da parede arterial, pois, as lesões desenvolvem rapidamente em pacientes com hipercolesterolemia familiar hemozigótica assim como em modelos animais relacionados, coelhos *Watanabe Heritable Hyperlipidemic* (WHHL) e em modelo knockout para LDL-r murinico (HILTUNEN et al, 1998).

Embora cada fragmento analisado tenha apresentado peculiaridades características em relação aos tipos celulares mais prevalentes em cada túnica, vários parâmetros foram utilizados para identificação das células a partir de suas características morfológicas, localização tecidual e marcação imunohistoquímica. Um achado imunohistoquímico importante foi o tipo de marcação observada para o LDL-r nos casos ditos crônicos (>56 anos), ou seja, uma marcação difusa pouco convencional, como se o receptor estivesse sendo expresso também em células adjacentes. Segundo Hiltunen et al (1998), a forma proteica do LDL-r e seu mRNA são apenas encontrados em células musculares lisas medianas e em células da camada adventícia. Não foram ainda descritas outras formas de expressão para o LDL-r diferentes das formas de membrana e citoplasmática. Provavelmente, este padrão de marcação difusa represente a expressão do receptor em células sob ação de mediadores solúveis como citocinas, interleucinas e fatores de crescimento secretados em situações de estresse (GIERENS et al, 2000). Esta marcação localizada nos infiltrados de aorta pode estar evidenciando papel importante do LDL-r ainda não associado ao mecanismo clássico da aterogênese. Em relação à torácica interna (artéria mamária) que é bastante utilizada como enxerto vascular, por ser ótimo enxerto a médio e longo prazo, as marcações observadas foram focais e de baixa intensidade para o LDL-r, porém, foram menos intensas ainda nos casos ditos precoces (++ vs + de intensidade, tabela 2). Por outro lado, a marcação para CD36 nos cortes de torácica interna foram intensos nos pacientes ditos precoces (+++ vs +, tabela 2), quando comparados com os cortes de pacientes ditos crônicos. A presença do CD36 está associada com a doença

aterogênica precoce, principalmente, no lúpus eritematoso sistêmico (SLE), com mau prognóstico (ALLISON et al., 2009). Ainda na tabela 2, pode-se verificar que a marcação para CD68 nos cortes de aorta foi bastante intensa para ambos os grupos (< e >56 anos), porém, nos cortes de torácica interna foi observada marcação tênue independente do grupo avaliado. Segundo Mohammadi (2008), a superioridade do enxerto com artéria torácica interna na revascularização miocárdica tem sido amplamente aceita e documentada em função dos excelentes resultados em longo prazo, provavelmente conforme nossos achados a discreta intensidade da marcação para CD68 seja, entre outras características, um importante fator de proteção contra a aterogênese. Em relação ao CD36 e CD68, estas marcações representam moléculas de superfície que identificam os receptores “scavengers” e marcação para macrófagos, respectivamente, marcadores relacionados à progressão da aterosclerose.

Em relação ao CD36, nossos dados apontam para risco no grupo precoce, primeiro em função da marcação intensa observada, e segundo, por estar esse receptor diretamente implicado com o processo aterogênico (SIAMAK et al., 2008). Cojocarú et al., (2012) tiveram resultados semelhantes aos nossos achados, ou seja, a marcação para CD68 foi intensa em zonas de infiltrado nas lesões ateroscleróticas de aorta para ambos os grupos (> e < 56 anos). Desrumaux et al., (2003) correlacionaram a marcação positiva para o CD68 com o aumento da expressão da PLTP por RT-PCR. A PLTP é uma proteína de transferência importantíssima associada ao metabolismo da HDL e ao transporte reverso do colesterol (TRC), atuando também no efluxo de colesterol celular (HUUSKONEN et al., 2001). Segundo Ogier et al., (2007), experimentos em modelo murino com PLTP de macrófagos, com pouca ação da PLTP sistêmica, mostrou que a ação da PLTP dos macrófagos pode ser ateroprotetora *in vivo*. Em outras palavras, a consequência da ação da PLTP na aterosclerose em modelo animal resulta da combinação entre o efeito antiaterogênico da PLTP dos macrófagos com a ação pro - aterogênica da PLTP sistêmica plasmática (OGIER et al., 2007). Dessa forma, pode-se conceber que existe interação importante entre marcadores plasmáticos e teciduais atuando concomitantemente no evento aterogênico.

7. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

As limitações deste estudo consistem na escassez de casos, perda de fragmentos recuperadas durante o ato cirúrgico dos fragmentos de aorta e dos enxertos de artéria torácica interna.

8. CONCLUSÕES

Os valores determinados nas amostras dos pacientes com menos de 56 anos (ditos com doença precoce) mostram valores acima do preconizado para valores de normalidade e significativamente superiores aos valores obtidos das amostras dos pacientes do grupo com mais de 56 anos - ditos com doença crônica.

Os valores dos índices de Castelli (I e II) para o grupo dito precoce (< 56 anos) estão acima dos valores de referência considerados para normalidade.

Em ambos os grupos, em relação ao índice de Gazziano (TG/HDL-C) os valores encontrados apontam para tamanhos de partícula estimados de LDL inferiores a 25,5nm, ou seja, compatíveis com a presença de LDL pequenas e densas.

O grupo dito precoce mostra valores estimados de tamanho de LDL bastante inferiores quando comparados ao grupo ditos crônicos, mostrando assim maior gravidade em relação a riscos equivalentes de doença cardiovascular no grupo < 56 anos.

Para o colesterol não-HDL, com base no escore de risco de Framingham, ou seja, múltiplos riscos (≥ 2), tendo como referência não-HDL-C < 160mg/dL os valores encontrados foram superiores aos valores recomendados em ambos grupos estudados, porém, mais importantes para o risco cardiovascular no grupo dito precoce.

Em relação a avaliação histológica e imunohistoquímica dos fragmentos de aorta e torácica interna, evidenciamos presença de aterosclerose discreta e marcações com diferentes intensidades nos dois grupos, ditos precoce e crônico, para as marcações LDL-r, CD36 e CD68.

Nos casos ditos precoces, foi observada a presença de tecido adiposo permeando o tecido vascular, ou seja, presença de estrias lipídicas (células espumosas) caracterizadas pela presença de cor rosa – amarelada e elementos figurados participes do processo aterogênico como macrófagos degenerados, cristais de colesterol, basofilia de fibras elásticas e pontos hemorrágicos.

Os estudos histológicos e imunohistoquímicos nos fragmentos vasculares dos pacientes ditos crônicos e precoces permitiram a identificação (marcação positiva) do LDL-r em neutrófilos e linfócitos presentes nos cortes histológicos analisados.

Um achado imunohistoquímico importante foi o tipo de marcação observada para o LDL-r nos casos ditos crônicos (>56 anos), ou seja, marcação difusa pouco convencional, como se o receptor estivesse sendo expresso também em células adjacentes.

Em relação à torácica interna (artéria mamária) que é bastante utilizada como enxerto vascular, as marcações observadas foram focais e de baixa intensidade para o LDL-r, porém, foram menos intensas ainda nos casos ditos precoces. Por outro lado, a marcação para CD36 nos cortes de torácica interna foram intensos nos pacientes ditos precoces, quando comparados com os cortes de pacientes ditos crônicos.

A marcação para CD68 nos cortes de aorta foi bastante intensa para ambos os grupos (< e >56 anos), porém, nos cortes de torácica interna foi observada marcação tênue independente do grupo avaliado.

Em relação ao CD36, nossos dados apontam para risco no grupo precoce, primeiro em função da marcação intensa observada, e segundo, por estar esse receptor diretamente implicado com o processo aterogênico.

Dessa forma, pode-se conceber que existe interação importante entre os marcadores plasmáticos e teciduais atuando concomitantemente no evento aterogênico, sendo mais graves nos pacientes do grupo < 56 anos.

9. REFERÊNCIAS

AHA (American Heart Association). VÉRONIQUE L. Roger et al.(org.). Heart and Stroke Statistical Update 2012. **Circulation**, p.e11-e221, 15.dez.2011.

ALLISON, B. R. et al. Enhanced CD36 Scavenger Receptor Expression in THP-1 Human Monocytes in the Presence of Lupus Plasma: Linking Autoimmunity and Atherosclerosis. **Exp Biol Med**, v. 234, p. 354-360, 2009.

American Academy of Pediatrics. Cardiovascular risk reduction in high-risk pediatric populations. **Pediatrics**, v. 119, p. 618, 2007.

BALANESCU, S. et al. Systemic Inflammation and Early Atheroma Formation: Are They Related? **Maedica a Journal of Clinical Medicine**, v. 5, p. 292-301, 2010.

BERGMANN, K. Non-hdl cholesterol and evaluation of cardiovascular disease risk. **The Journal of International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 21, 2012.

BERGMANN, A. et al. Method for risk stratification in stable coronary artery disease. Disponível em: <<http://www.freepatentsonline.com/y2012/0122233.html>>. Acesso em:

BOSEVSKI, M. et al. Endothelial dysfunction correlates with plasma fibrinogen and HDL cholesterol in type 2 diabetic patients with coronary artery disease. **Bratisl Lek Listy**, v. 108, p. 297-300, 2007.

BOYLE, J. J. Macrophage activation in atherosclerosis: pathogenesis and pharmacology of plaque rupture. **Curr Vasc Pharmacol.**, v. 3, p. 63-68, 2005.

BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 52, p. 223-261, 1983.

COJOCARU, E. et al. Immunohistochemical expression of anti- CD68 antibody atherosclerotic plaque. **Rom J Morphol Embryol**, v. 53, p. 61-66, 2012.

COLLINS R., Peto R.; MACMAHON S., et al. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 2: Short-term reductions in blood pressure: overview of randomized drug trials in their epidemiological context. **Lancet**, v.335, p.827-38, 1990.

COLLOT-TEIXEIRA, S. et al. CD36 and macrophages in atherosclerosis. **Cardiovascular Research**, v. 75, p. 468-477, 2007.

CORRÊA-CAMACHO; Camila R.; Luciane A. DIAS-MELICIO; Ângela M.V.C. SOARES. Aterosclerose, uma resposta inflamatória. **Arq Ciênc Saúde**, v.14, n.1, p.41-48, 2007.

COUTO RD, DALLAN LA, LISBOA LA, MESQUITA CH, VINAGRE CG, MARANHÃO RC. Deposition of free cholesterol in the blood vessels of patients with

coronary artery disease: a possible novel mechanism for atherogenesis. **Lipids**. 2007;42(5):411-8.

DATASUS. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php>. Acessado em: 17.abr.2010.

DESRUMAUX, C. M. et al. Phospholipid transfer protein is present in human atherosclerotic lesions and is expressed by macrophages and foam cells. **Journal of Lipid Research**, v. 44, p.1453-1461, 2003.

Expert Panel on Integrated Guidelines for Cardiovascular Health and Risk Reduction in Children and Adolescents, National Heart, Lung, and Blood Institute. Expert panel on integrated guidelines for cardiovascular health and risk reduction in children and adolescents: summary report. **Pediatrics**, v. 128, Suppl 5, p. S213, 2011.

FRAMINGHAM et al. Predicting the 30-Year Risk of Cardiovascular Disease The Framingham Heart Study. **Circulation**, v. 119, p. 3078-3084, 2009.

FRANÇOSO, L. A.; COATES, V. From Infancy to Adolescence: Atherosclerosis Risk Factors and Prevention. **New Research on Atherosclerosis**, New York: Leon V.Clark, p. 63-74, 2006.

GALKINA, Elena e LEY, Klaus. Immune and Inflammatory Mechanisms of Atherosclerosis. **Annu Rev Immunol**, v.27, p.165–197, 2009.

GARDENER, Hannah; David Della MORTE; Mitchell SV ELKIND; Ralph L SACCO; Tatjana RUNDEK. Lipids and carotid plaque in the Northern Manhattan Study (NOMAS). **BMC Cardiovascular Disorders**, v.9, p.e55, 2009.

GIERENS, H. et al. Interleukin-6 Stimulates LDL Receptor Gene Expression via Activation of Sterol-Responsive and Sp1 Binding Elements. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 20, p. 1777-1783, 2000.

GIANTURCO, S. H; BRADLEY, W. A. Lipoprotein-mediated cellular mechanisms for atherogenesis in hypertriglyceridemia. **Semin Thromb Hemost**, v. 14, p. 165-169, 1988.

GIULIANO, I. C. B. et al. Lípidos Séricos em Crianças e Adolescentes de Florianópolis, SC – Estudo Floripa Saudável 2040. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 85, p. 85-91, 2005.

GOYERT, S. M. CD68 workshop panel report. In: KISHIMOTO, T. et al. **Leucocyte typing VI. White cell differentiation antigens**. Proceedings of the 6th International Workshop and Conference; 1996 Nov 10-14; Kobe, Japan. New York, London: Garland Publishing Inc.; 1997. p. 1015-1016.

GRUNDY S. M. Age as a risk factor: you are old as your arteries. **Am J Cardiol**. v.83, p.1455-7, 1999.

GRUNDY, S.M.; PASTERNAK, R.; GREENLAND, P.; SMITH, JR. S.; FUSTER, V. Assessment of cardiovascular risk by use of multiple-risk-factor assessment equations: A

statement for health-care professionals from the American Heart Association and the American College of Cardiology. **Circulation**, v.100, p.1481-92, 1999.

HILTUNEN, T. P. et al. Expression of LDL Receptor, VLDL Receptor, LDL Receptor-Related Protein, and Scavenger Receptor in Rabbit Atherosclerotic Lesions Marked Induction of Scavenger Receptor and VLDL Receptor Expression During Lesion Development. **Circulation**, v. 97, p. 1079-1086, 1998.

HUUSKONEN, J. et al. The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on HDL metabolism. **Atherosclerosis**, v. 155, p. 269-281, 2001.

KABLAK-ZIEMBICKA, A. et al. Carotid intima-media thickness, hs-CRP and TNF- α are independently associated with cardiovascular event risk in patients with atherosclerotic occlusive disease. **Atherosclerosis**, v. 214, p. 185-190, 2011.

MOORE, K.J; TEBAS, I, Macrophages in the Pathogenesis of Atherosclerosis. **Cell press**, v.145, p.341-355, 2011.

KAWAMOTO, R. et al. Non-HDL cholesterol as a predictor of carotid atherosclerosis in the elderly. **J of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 12, p. 143-148, 2005.

LIBBY, P.; RIDKER; P.M. MASERI; A. Inflammation and atherosclerosis. **Circulation**, v.105, p.1135-1143, mar.2002.

LIMA, E. S.; COUTO, R. D. Estrutura, metabolismo e funções fisiológicas da lipoproteína de alta densidade. **Journ Bras Patol Med Lab**, v. 42, n. 3, p. 169-178, 2006.

MAKI K, C. et al. Indicators of the atherogenic lipoprotein phenotype measured with density gradient ultracentrifugation predict changes in carotid intima-media thickness in men and women. **Vascular Health and Risk Management**, v. 8, p. 31-38, 2012.

MARUYAMA, C. et al. Assessment of LDL particle size by Triglyceride/HDL-C ratio in non-diabetic, healthy subjects without proeminent hyperlipidemia. **J Ather Thromb**, v. 10, n. 3, p. 186-191, 2003.

MCMAHAN, C. A. et al. Pathobiological determinants of atherosclerosis in youth risk scores are associated with early and advanced atherosclerosis. **Pediatrics**, v. 118, p.1447, 2006.

MOHAMMADI, S. et al. Age cut-off for the loss of benefit from bilateral internal thoracic artery grafting. **Europ Journ of Cardio-thoracic Surgery**, v. 33, p. 977- 982, 2008.

MONTY, K. Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. **J. Clin. Invest.**, v. 108, p. 793-797, 2001.

OGIER, N. et al. Cholesterol Accumulation Is Increased in Macrophages of Phospholipid Transfer Protein-Deficient Mice - Normalization by Dietary Alpha-Tocopherol Supplementation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 27, p. 2407-2412, 2007.

- PESARO, A. E. P. et al. Pleiotropic effects of ezetimibe/simvastatin vs. high dose simvastatin. **International Journal of Cardiology**, v. 158, p. 400-404, 2012.
- PEREIRA I.A e BORBA E.F. The role of inflammation, humoral and cell mediated autoimmunity in the pathogenesis of atherosclerosis. **Swiss Med Wkly.**, v.138, n.37-38, p.534-539, 20.set.2008.
- REDDY, K. S. **Cardiovascular diseases. The Nutrition Transition**. California: Elsevier, 2002. p. 192-194.
- ROVER, M. R. M. et al. Perfil lipídico e sua relação com fatores de risco para aterosclerose para crianças e adolescentes. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 42, p. 191-195, 2010.
- SANTOS, R. D. et al. (Coord.). III Diretrizes Brasileiras sobre dislipidemias e Diretriz de Prevenção de aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq Bras Cardiol**, v. 77, p. 1-48, 2001.
- SEON, C. S. et al. Cardiovascular Risk Assessment with Vascular Function, Carotid Atherosclerosis and the UKPDS Risk Engine in Korean Patients with Newly Diagnosed Type 2 Diabetes. **Diabetes & Metabolism Journal**, v. 35, p. 619-627, 2011.
- SPOSITO, C. A. et al. (Coord.). IV Diretrizes Brasileiras sobre dislipidemias e Diretriz de Prevenção de aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Arq Bras Cardiol**, v. 88, p. 1-19, 2007.
- TEIXEIRA, S.C. et al. CD36 and macrophages in atherosclerosis. **Cardiovascular Research**, p.468-477, 2007.
- TORZEWSKI M; SURIYAPHOL P; PAPROTKA K; SPATH L; OCHSENHIRT V; SCHMITT A; HAN SR; HUSMANN M; GERL VB; BHAKDI S; LACKNER KJ. Enzymatic modification of low-density lipoprotein in the arterial wall: a new role for plasmin and matrix metalloproteinases in atherogenesis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, v.24, n.11, p.2130-6, nov.2004.
- VACCARINO, V. et al. Sex-Based Differences in Early Mortality after Myocardial Infarction. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, p. 217-225, 1999.
- VIEIRA, E. A. et al. Razão triglicérides/HDL-C e proteína C reativa de alta sensibilidade na avaliação do risco cardiovascular. **J Bras Patol Med Lab**, v. 47, p. 113-118, 2011.

ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA



FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

PACIENTES DO PROJETO DA ORIENTANDA DO PROF. RICARDO -

ANA KARINA SOUZA LEAL

NOME PACIENTE	IDADE	PRONT.	AMOSTRA	CIRURGIÃO	MACRO	MICROSCOPIA
						HE
1.1 -ANTONIO JOSÉ FERREIRA				Dr. Bianca Dr. Agenor	RD-11 segmento de tecido adiposo, tendo de perneio estrutura vascular medindo 1x0,6x0,4cm .Secções 3 (TMI)	Ramificações de artérias;Veia Plexo vascular de pequeno e médio calibre (periférico)
1.2- ANTONIO JOSÉ FERREIRA					RD-12 segmento de tec. adiposo medindo 2,5 x 1,5 x 0,4 cm tendo de perneio segmento de tec. vascular que mede 0,6x0,3x0,3 cm. Secções 4.	Artérias e veias de pequeno calibre; Tecido adiposo
2.1-.EDNALDO DOS SANTOS SOUZA				Dr.Jehorvan Dr. Giorgio	RD-6 segmento de vaso sanguineo medindo 0,5 x 0,2 x 0,2cm. 2 secções (TMI)	Parede de artéria elástica, espaços vazios. Segmento de artéria
2.2-.EDNALDO DOS SANTOS SOUZA					RD-10 segmento de tec. fibro-adiposo medindo 1,3x0,6x0,5cm .Secções	Vasos Plexo vascular de pequeno

3.1-.MARINALVA DE JESUS MONTEIRO				Dr.Agenor, Dr.Gustavo Dr.Breno	3 (TMI) RD-8 dois segmentos de vaso sanguineo medindo respectivaente 0,5x0,1x0,1cm. 2 Secções. (TMI)	calibre Parede de artéria elástica,espaços vazios, cristais de colesterol
3.2-.MARINALVA DE JESUS MONTEIRO					RD-9 segmento de tecido adiposo entremeado por tecido vascular,medindo 1,24x 1, x 0,6 com. 4 secções. (TMI)	Tecido muscular esquelético
4.1-AGNALDO NASCIMENTO DE JESUS				Dr. Cueva	RD-1 dois segmentos irregulares de tecido adiposo,tendo de permeio, estrutura de aspecto vascular medindo respectivamente 2,5x0,8x0,7 e 2x1,5x0,8cm .10secções (TMI)	Plexo vascular periférico
5.1-LUIZ CARLOS ALVES DOS SANTOS				Dr.Jehorvan	RD-2,dois segmentos de tecido .adiposo entremeado por tec fibroso medindo respectivamente 2,8x1x0 e 3x1x0,6cm.12secções (TMI).	Tecido muscular estriado esquelético Vasos pequenos normais
5.2-LUIZ CARLOS ALVES DOS SANTOS					RD-3 ,segmento de tec. tubular medindo 0,9x0,3x0,3cm. 2 secções (TMI)	Vaso periférico
6.1-JOSÉ EDILSON CAIRES CARDOSO				Dr. Gustavo	RD-4 segmento de tec. de aspecto vascular, envolvido por tecido adiposo,medindo 1,2x0,4x0,4cm.4secções (TMI)	
6.2-JOSÉ EDILSON CAIRES CARDOSO					RD-7 dois segmentos de vaso sanguineo medindo respectivamente 0,8x0,3x0,3 e 0,7x0,25x0,25 cm. 4 secções (TMI).	
7.EDSON CRUZ DAMIÃO				Dr. Cueva	RD-5 Um segmento de tec. de aspecto tubular medindo 0,4 x 0,3 x	Plexo vascular periférico

8.MANOEL LOPES MORAIS				Dr. Bianca Dr.Gustavo	0,3. 1secção (TMI) RD -14 segmento de tec. da cor rosa amarelada de aspecto adiposo medindo 1,5 x1,2x0,4 cm. Nota-se de permeio pequeno segmento vascular que mede 1x0,3 cm. 1secção (TMI)	Artéria elástica pode ser coronária,intima vacúolos pode ser macrófagos degenerados,basofi-lia de fibras elásticas.Pontos hemorrágicos.
9. LAURO MARQUES BRITO				Dr. Cuevas	RD-13 pequeno segmento de tecido de cor amarelada,medino 0,4 x 0,2 x 0,15cm.01 secção (TMI)	Artéria elástica, vasos de pequeno calibre na intima macrófagos. vaso vasorum (pode ser coronária). Tampão de elástica coronariana.
10.AURELINDA OLIVEIRA DE ALMEIDA				Dr. Jehorvan Carvalho	RD-16 segmento de tecido vascular medindo 0,6 x 0,2 cm. 1 secção.TM	Tecido muscular de pequeno calibre
11. ISAAC DA SILVA BARROS				Dr. Bianca Dr. Roque Aras	RD-17 segmento de tecido medindo 3 x 0,7 x 0,7 cm,tendo de permeio segmento vascular 6 secções	
12.1- FLORISVALDA CORREIA BITTENCOURT				Dr. Gustavo	RD-15 dois segmentos de tecido adiposo,tendo de permeio segmentos vasculares, medindo respectivamente 2x0,7x0,7cm e 1,8x0,6x 0,6 cm.7 secções.	Tecido adiposo, tec.fibroso, segmento de artéria
12.2- FLORISVALDA CORREIA BITTENCOURT				Dr. Gustavo	Rd-18 três segmentos de tecido de cor amarelada, de aspecto tubuliforme, vascular,	Vaso plexo vascular

					medindo respectivamente 3,5 x 0,3 ; 2 x 0,3 e 0,7 x 0,4 cm. Secções 13 (TMI).	periférico
13.1- MANOEL ALBERTO ALVES XAVIER				Dr. Gustavo	RD- 19 Segmento de tec. de cor amarelada medindo 0,4 x 0,3 cm. Secções duas (TMI).	
13.2- MANOEL ALBERTO ALVES XAVIER				Dr. Gustavo	RD- 20 dois segmentos tubulares de tecido de cor amarelo de aspecto vascular, medindo respectivamente 0,6 x 0,1 cm e 0,5 x 0,3 cm. Secções 4 (TMI)	
14. 1-ANTONIO ROCHA SANTOS				Dr. Georvan	RD-21 três segmentos de tecido vascular medindo respectivamente 0,9 x 0,2 x 0,4 x 0,2 cm e 1,2 x 0,1 cm. Secções 6 (TMI)	
14.2- ANTONIO ROCHA SANTOS				Dr. Georvan	RD- 22 um segmento de tecido castanho de aspecto vascular medindo 1,5 x 0,9 x 0,6 cm. Secções 4 (TMI).	
15.1- RAIMUNDA MARIA DE JESUS				Dr. Gustavo	RD- 23 segmento de tecido, de cor castanha que mede 1,4 x 1 x 1 cm. Secção 10 (TMI).	
15.2- RAIMUNDA MARIA DE JESUS					RD-24 um segmento de tecido que mede 0,5 x 0,3 x 0,2 cm. Secção 2 (TMI)	

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E PRÉ-ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no final deste)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

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

ENDEREÇO Nº APTO:.....

BAIRRO:.....CIDADE:.....

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

2. RESPONSÁVEL LEGAL:.....

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

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M F

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

ENDEREÇO: Nº
APTO:.....

BAIRRO:.....CIDADE:

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

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

Avaliação plasmática e histológica de biomarcadores de gênese e progressão da aterosclerose humana precoce: perfil lipoproteico, concentração da LDL-Ox, atividade de MPO no plasma e em fragmentos vasculares recuperados após revascularização miocárdica.

PESQUISADORES: (1) **PROF. DR. RICARDO DAVID COUTO (Orientador)**, (2) **PROF. DR. MOYSES SADIGURSKY (PESQUISADOR)**, (3) **PROF. DR. ROQUE**

ARAS (PESQUISADOR), (4) PROFA. ANA KARINA SOUZA LEAL (PESQUISADORA)

CARGO/FUNÇÃO: (1) PROFESSOR ADJUNTO II DO DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS DA FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA, (2) PROFESSOR ASSOCIADO DA FACULDADE DE MEDICINA DA UFBA, (3) PROFESSOR ADJUNTO IV DA FACULDADE DE MEDICINA DA UFBA, DIRETOR MÉDICO DO HOSPITAL ANA NERI, (4) PROFESSORA AUXILIAR DA UFBA, MESTRANDA DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA, ÁREA: INVESTIGAÇÃO LABORATORIAL DE DOENÇAS.

UNIDADE: FACULDADE DE FARMÁCIA-UFBA/Complexo HAN-UFBA

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO

RISCO MÍNIMO

RISCO MÉDIO

RISCO BAIXO

RISCO MAIOR

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4 .DURAÇÃO DA PESQUISA: 2 ANOS E SEIS MESES (DEZEMBRO 2009 – JUNHO 2012)

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. Justificativa e os objetivos da pesquisa ;
2. procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais;
3. desconfortos e riscos esperados;
4. benefícios que poderão ser obtidos;
5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.

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. **Sim**
2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência. **Sim**
3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade. **Sim**

4. Disponibilidade de assistência no Laboratório de Análises Clínicas – FAR-UFBA, determinações Bioquímicas e exames de rotina e pesquisa relacionados ao metabolismo de lipídeos e suas frações. **Sim**

V. INFORMAÇÕES DE NOME, E TELEFONES DO RESPONSÁVEL PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Prof. Dr. Ricardo David Couto

Orientador - Contatos: Tel.xx71-3283-6952, 3339-6309, Cel. xx71-9963-8131

Prof. Dr. Moyses Sadigursky

Pesquisador – Contato: xx71-3339-6291

Prof. Dr. Roque Aras Junior

Pesquisador – Contato: Tel. xx71-3117-1826

Profª. Ana Karina Souza Leal, Mestranda – Farmácia/UFBA.

Pesquisadora – Contato: Tel. xx71- 3283-6900, Cel.xx 71 8779-1438

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII - 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

Salvador, de de 2009.

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

Assinatura do pesquisador

(carimbo ou nome legível)

INSTRUÇÕES PARA PREENCHIMENTO

(Resolução Conselho Nacional de Saúde 196, de 10 outubro 1996)

1. Este termo conterà o registro das informações que o pesquisador fornecerá ao sujeito da pesquisa, em linguagem clara e acessível, evitando-se vocábulos técnicos não compatíveis com o grau de conhecimento do interlocutor.
2. A avaliação do grau de risco deve ser minuciosa, levando em conta qualquer possibilidade de intervenção e de dano à integridade física do sujeito da pesquisa.
3. O formulário poderá ser preenchido em letra de forma legível, datilografia ou meios eletrônicos.
4. Este termo deverá ser elaborado em duas vias, ficando uma via em poder do paciente ou seu representante legal e outra deverá ser juntada ao prontuário de pesquisa do paciente.
5. A via do Termo de Consentimento Pós-Informação submetida à análise da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CEP, deverá ser idêntica àquela que será fornecida ao sujeito da pesquisa.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
SETOR DE IMUNOHISTOQUÍMICA

PROTOCOLO (TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA)

Colocar o tampão (PBS) no BM a temp. de 90°C, enquanto isso realiza os seguintes procedimentos:

1) Desparafinização:

As lâminas devem ser acondicionadas em cubetas de vidro ou recipiente onde estas estejam de forma a possibilitar uma total contato entre lâmina e substância.

- Xilol 1: 10' minutos;
- Xilol 2: 10' minutos;
- Álcool Absoluto: 2' minutos;
- Álcool Absoluto: 1' minuto;
- Lavar em água corrente.

2) Recuperação Antigênica:

Após lavar as lâminas em água, colocá-las em grades para lâminas ou em cubetas de plástico;

Acondicionar as lâminas no tampão de recuperação (Citrato pH6,0) em Banho Maria 30' à temperatura inicial de 90° C. QUANDO RETIRAR DO BM, COLOCAR 20' PARA ESFRIAR NA BANCADA.

3) Bloqueio da Peroxidase Endógena

- Peróxido a 10% por 25' minutos;
- Lavar em água corrente;
- Colocar em PBS entre 5 - 10' minutos 2x.

ANTES DE INCUBAR COM O AC PRIMÁRIO, FAZER UM CÍRCULO E COLOCAR A PROTEINA BLOQUEADORA 5-10'. A quantidade de AC em cada corte em média 5-10'. Depois verter e procedimentos secundário.

4) Incubação com o anticorpo primário

- Diluição individual de cada anticorpo (ver prospecto);
- Diluir em Diluente, em tubos eppendorfs;
- Padronizar a depender do tamanho do corte 100µl p/ cada lâmina;
- Secar com cuidado o perímetro do corte, tendo cuidado para não retirar áreas importantes do fragmento;
- Utilizar a caneta hidrofóbica ao redor do corte, com a finalidade de concentrar a solução com o anticorpo sobre o tecido, para que não escorra e gere background;
- Acondicionar as lâminas em câmara úmida;
- Incubar por no mínimo 1 (uma) hora a temp. ambiente ou overnight a 4° C.

5) Incubação com anticorpo secundário

- Retirar as lâminas da câmara e colocá-las em solução de PBS entre 5 - 10' minutos 2x ;
- Colocar sobre os cortes após secagem breve de 2 – 3 gotas do anticorpo;
- Incubar por 20 – 25' minutos a 25°C.
-

6) Aplicação do complexo Streptavidina

- Após a incubação com o anticorpo secundário, lavar as lâminas em PBS ou TRIS SALINA entre 5 – 10' minutos;
- Colocar de 2 – 3 gotas do complexo sobre cada corte após breve secagem;
- Incubar por 20 – 25' minutos a 25° C;

7) Revelação da Reação

* Utilização do kit DAB + Cromógeno :

- Lavar as lâminas em PBS entre 5 – 10' minutos;
- Preparar a solução DAB + cromógeno: 1 gota para cada 1ml ;
- Adicionar 100 µl (a depender do corte) sobre cada lâmina;
- Observar a mudança de cor para marrom, quando isto acontecer ou se basear no controle +;
- Colocar as lâminas em água destilada ou PBS;
- Lavar em água corrente.

8) Contracoloração

- Expor as lâminas por 15'' segundos (a depender da concentração) em Hematoxilina de Mayer;
- Lavar em água corrente;
- Colocar em álcool 1 por 2' minutos;
- Colocar em álcool 2 por 2' minutos;
- Colocar em xilol 1 por 2 minutos;
- Colocar em xilol 2 por 2 minutos;
- Montagem das lâminas com montagem aquosa (1 gota).