



Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – CPqGM
Curso de Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa

ÁLVARO LUÍS MÜLLER DA FONSECA

**METALOPROTEINASES DE MATRIZ E INCORPORAÇÃO DE
COLESTEROL NA LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE (HDL) NA
DOENÇA CAROTÍDEA**

Salvador
Janeiro, 2012

ÁLVARO LUÍS MÜLLER DA FONSECA

**METALOPROTEINASES DE MATRIZ E INCORPORAÇÃO DE
COLESTEROL NA LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE (HDL) NA
DOENÇA CAROTÍDEA**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, para obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo David Couto

Salvador
Janeiro, 2012

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

F676m Fonseca, Álvaro Luís Muller da
Metaloproteinases de matriz e incorporação de colesterol na lipoproteína de alta
densidade (HDL) na doença carotídea . [manuscrito] / Álvaro Luís Muller da
Fonseca. - 2012.
93 f.; 30 cm

Datilografado (fotocópia).

**Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia -
Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Pós-
Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, 2012.**

Orientador: Dr. Ricardo David Couto, Laboratório de Patologia e Biointervenção
- LPBI.

1. Metaloproteinases de matriz extracelular 2. Incorporação de colesterol na
HDL. 3. Doença Carotídea Aterosclerótica. I.Título.

CDU 577.122

ÁLVARO LUÍS MÜLLER DA FONSECA

**METALOPROTEINASES DE MATRIZ E INCORPORAÇÃO DE
COLESTEROL NA LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE (HDL) NA
DOENÇA CAROTÍDEA**

Aprovada em: 13 de abril de 2012.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dra. Fernanda Washington de Mendonça Lima – UFBA
Examinadora

Prof. Dr. Roque Aras Júnior – UFBA
Examinador

Prof. Dr. Daniel Abensur Athanázio – CPqGM – FIOCRUZ
Examinador

Salvador, abril de 2012

Para Andréia, Luana e Rafaela.

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente à minha esposa Andréia e filhas Rafaela e Luana pelo amor e carinho constantes.

Também agradeço a todas as pessoas que participaram da minha trajetória profissional e contribuíram para meu aperfeiçoamento profissional.

Aos meus pais Elza e Natal pelo afeto, confiança e incentivo, e, em especial, a minha tia Elba, sem esquecer meus demais familiares.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo David Couto pela oportunidade, ensinamentos, ajuda e amizade.

Ao Prof. Dr. Lain Pontes de Carvalho pela incansável ajuda, orientação e amizade.

À Profa. Dra. Fernanda Lima pelo apoio técnico, gentileza e orientação.

Ao Prof. Dr. Ajax Mercedes Atta pelo apoio técnico.

Ao Dr. Alberto Dutra e a Profa. Dra. Luciana Cardoso pelas contribuições e discussões científicas.

À Sílvia Oliveira, Ana Paula Santos, Magda Seixas e Rogério Oliveira pelo auxílio técnico, opiniões e coleguismo.

Aos amigos Karine Oliveira, Fabiana Nonato, Matheus Sá, Fábio D. Couto e George Santos, entre outros, pela ajuda e companheirismo nos momentos mais necessários.

Aos colegas da UNEB, Marton, Arapiraca, Fátima, Raimundo e Rita pela convivência fraternal e discussões animadas durante nossa lida e viagens, bem como a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para meus estudos e realização desta tese.

Sou grato à UNEB, à UFBA e à FIOCRUZ pelo apoio técnico e financeiro.

Atolavam-se na ilusão da felicidade que extraíam dos bens possuídos. Ora, a felicidade o que é senão o calor dos atos e o contentamento com o que se faz, com o que se cria?

(Antoine de Saint-Exupéry)

FONSECA, Álvaro Luís Müller da. **Metaloproteinases de Matriz e Incorporação de Colesterol na Lipoproteína de Alta Densidade (HDL) na Doença Carotídea**. 93f., il. Tese (Doutorado). Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2012.

RESUMO

Introdução. As doenças cardiovasculares são a maior causa de morbimortalidade nos países emergentes, consistindo em doença arterial central, cerebral e periférica, em especial, a coronária e a carotídea. Dentre os diversos fatores e marcadores de risco que atuam no desenvolvimento e no agravamento dessas doenças, encontram-se os relacionados com a aterosclerose. Este estudo avaliou a concentração sérica e a atividade de metaloproteinases de matriz (MMP-1, 2, 8, 9 e 12), a incorporação de colesterol livre na HDL, a atividade da paraoxonase e associação com outros fatores em pacientes com doença carotídea aterosclerótica. **Métodos.** Este estudo de corte transversal avaliou, em população de 65 indivíduos portadores (32) e não (34) de DCA (doença carotídea aterosclerótica), determinada por ecografia vascular com doppler, ambos os sexos, idade média de 51,1 (\pm 6,7) anos, a existência de diferenças entre de fatores associados à aterogênese, sua relação com o remodelamento do endotélio vascular e transporte reverso do colesterol. Foram padronizados e utilizados métodos com marcadores isotópicos, ELISA e zimografia por SDS-PAGE para determinação, identificação e verificação da atividade proteolítica. **Resultados.** Foi constatado que as amostras de soro dos pacientes portadores de DCA incorporaram menos colesterol livre triciado ($CL\text{-}^3H$) quando comparados aos pacientes NDCA (não portadores de DCA) e, também, que os índices e demais parâmetros de avaliação do metabolismo lipídico corroboram o fenômeno (HDL-C, $r=-0,330$; $p=0,0606$, Pearson), mostrando uma tendência (HDL-C/apoA, $r=0,511$; $p=0,0254$) e relação positiva no grupo NDCA. Foram observadas correlações positivas entre MMP-1 e HDL-C ($r=0,6175$; $p=0,002$, Pearson) e MMP-1 com MMP-9 ($r=0,5109$; $p=0,0215$; Pearson) e MMP-1 com CMV-IgG ($r=0,619$; $p=0,0012$; Pearson) e correlação negativa entre MMP-9 e apoB no grupo DCA. Por ELISA foram evidenciadas, no grupo DCA, menores densidades ópticas (DO) de MMP-2 e MMP-9. Contudo, essas mesmas MMP (2 e 9) apresentaram maior atividade proteolítica no zimograma do grupo DCA. **Conclusão.** A menor incorporação de $CL\text{-}^3H$ no grupo DCA indica deficiência no transporte reverso do colesterol, essa alteração prejudica os mecanismos de proteção contra a aterogênese. Aliado a isso, observou-se redução das mensurações séricas das MMP no grupo DCA, a qual pressupõe a participação dessas MMP no remodelamento vascular, principalmente, nas placas e/ou lesões ateroscleróticas. As MMP e outros marcadores avaliados nos DCA mostraram que o evento não tem participação somente de moléculas relacionadas ao transporte lipídico, mas também, aquelas relacionadas à infecção por CMV (citomegalovírus), evidenciadas pela presença de correlação positiva entre MMP-1 e CMV-IgG. A menor incorporação de $CL\text{-}^3H$, baixa DO de MMP-2 e 9, maior atividade proteolítica no zimograma e a MMP-1 associada à infecção por CMV são fatores a serem avaliados para utilização na predição de risco cardiovascular em pacientes com DCA. As menores DO de MMP-2 e 9 nos DCA em contraposição à maior atividade dessas proteinases suscita a participação de fatores reguladores (e.g. TIMP) da atividade dessas proteinases, atuando de forma distinta daquela dos NDCA.

Palavras-chave: aterosclerose, dislipidemia, doença carotídea arterial, metaloproteinases, zimografia.

ABSTRACT

Matrix Metalloproteinase and Cholesterol Incorporation to High Dense Lipoprotein (HDL) in Carotid Disease

Introduction. The cardiovascular diseases are the biggest cause of morbimortality in evidence in the emerging countries; they consist into central, cerebral and peripheral arterial diseases, mainly coronary and carotid. Among the several risk factors and markers that contribute to the development and severity of those diseases, there are that related to atherosclerosis. This study evaluates the serum concentration and activity of matrix metalloproteinases (MMP-1, 2, 8, 9 e 12), the paraoxonase activity and the association with others factors in patients with carotid atherosclerotic disease (DCA). **Methods.** It was done a transversal study to evaluate, in a population of 65 individuals with (31) and without DCA (34), indicated by vascular echography with doppler, both genders, average age 51.1 (\pm 6.7) years, the occurrence of differences between clinical laboratory markers and their relationship with vascular endothelium remodeling and reverse cholesterol transport. It was standardized and executed methods with isotopic markers, ELISA and SDS-PAGE zymography to the determination, identification and verification of proteolytic activity. **Results.** From the incorporation, it was verified that the DCA patients' serum samples assume little free cholesterol when compares to NDCA (no DCA carrier patients). Also, regarding the data of CL-³H incorporation, it was verified that the index and parameters of lipid metabolism evaluation corroborate the event (HDL-C, $r=-0.330$; $p=0.0606$, Pearson), which shows a tendency (HDL-C/apoA, $r=0.511$; $p=0.0254$) and positive relationship in the NDCA group. Besides, positive correlations between MMP-1 and HDL-C ($r=0.6175$; $p=0.002$, Pearson) and MMP-1 with MMP-9 ($r=0.5109$; $p=0.0215$; Pearson) and MMP-1 with CMV-IgG ($r=0.619$; $p=0.0012$; Pearson) and negative correlation between MMP-9 and apoB in the DCA group were observed. The ELISA demonstrates lower MMP-2 and MMP-9 optic density (DO) in DCA group. Otherwise, these same MMP (2 and 9) shows bigger digestive activity at zymogram assay in the DCA group when compared to NDCA. **Conclusion.** The lower incorporation of CL-³H in the DCA group drives to reverse cholesterol transport deficiency, these alterations disables the protection mechanisms against the atherosclerosis. Join to this, it was observed the serum measures reduction of MMP in DCA group that presume the participation of these MMP in the vascular remodeling process, mainly on the plates or/and atherosclerotic lesions. The MMP and others markers evaluated in DCA reveal that the event does not have solely participation of molecules related to lipid transport, but also that ones related with infection with CMV (cytomegalovirus) exposed by positive correlation between MMP-1 and CMV-IgG marker. Thus, the small CL-³H incorporation, the lowest MMP-2 and 9 DO, biggest digestion of the polyacrylamide gel copolymerized with gelatin and MMP-1 when associated to CMV infection are markers that must be evaluated to predict the cardiovascular risk in DCA patients. The lower DO of MMP-2 and 9 in DCA group in opposition to the bigger activity of these proteinases give raise to participation of regulatory factors (e.g. TIMP) that run in a distinct way from NDCA group.

Key-words: atherosclerosis, carotid disease, dyslipidemia, metalloproteinase, zymography.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Características e Histórico patológico progressivo.....	48
Tabela 02 – Distribuição de pacientes segundo faixa etária e sexo.....	49
Tabela 03 – Perfil dos grupos DCA e NDCA.....	88
Tabela 04 – Grau de estenose segundo classificação de NASCET.....	49
Tabela 05 – Relação de grau de estenose e nível de HDL-C.....	50
Tabela 06 – Dados da análise de correlação linear entre a contagem por minuto (CPM) de incorporação de CL- ³ H, perfil lipídico, apoproteínas de risco cardiovascular e índices calculados no grupo NDCA.....	51
Tabela 07 – Dados da análise de correlação linear entre a contagem por minuto (CPM) de incorporação de CL- ³ H, perfil lipídico, apoproteínas de risco cardiovascular e índices calculados no grupo NDCA.....	52
Tabela 08 – Dados da análise de correlação linear entre a contagem por minuto (CPM) de incorporação de CL- ³ H, PON1 e MMP no grupo NDCA.....	52
Tabela 09 – Dados da análise de variância e teste de comparação múltipla entre os parâmetros de avaliação de risco cardiovascular utilizados nesse estudo para os grupos DCA e NDCA.....	53
Tabela 10 – Dados da análise de variância e teste de comparação múltipla entre as densidades ópticas (ABS) obtidas dos testes de ELISA das metaloproteinases para os grupos DCA e NDCA.....	55
Tabela 11 – Parâmetros diagnósticos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e razão de chances.....	89
Tabela 12 – Estimativa de centralidade e dispersão do ELISA para MMP (leitura de absorbância a 450 nm) de DCA e NDCA.....	89
Tabela 13 – Risco relativo entre metaloproteinases e grau de estenose.....	62
Tabela 14 – Estimativa de centralidade e dispersão das contagens de fótons por minuto entre DCA e NDCA.....	89

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 – Estrutura de uma artéria calibrosa normal, mostrando a íntima revestida de células endoteliais que cobrem a camada de fibras elásticas e colágenas (MEC), lâmina elástica, seguida da camada média de células musculares lisas e da camada adventícia. Fonte: Lusic (2000, fig.1).....	22
Figura 02 – A – Pequena placa aterosclerótica assimétrica com placa fibrosa e núcleo necrótico de um homem de 32 anos. Fonte: Frink (2002, fig.5). B – Placa aterosclerótica na artéria coronária proximal anterior esquerda de um homem de 53 anos. Fonte: Frink (2002, fig.4).....	23
Figura 03 – Processo de desenvolvimento da aterosclerose. LDL – lipoproteína de baixa densidade, VSMC – célula muscular lisa vascular. Fonte: Rodríguez <i>et al.</i> (2007).....	24
Figura 04 – Lesão inicial na aterosclerose. Os locais preponderantes da lesão são determinados pelas forças hemodinâmicas e delineamento vascular, que afetam a permeabilidade endotelial, a expressão gênica, a síntese de óxido nítrico e promovendo a retenção de LDL e outras lipoproteínas carreadoras de apoB, dando início à inflamação da íntima por intermédio de espécies reativas de oxigênio e lipoxigenases que oxidam a LDL e seus componentes. Esse processo oxidativo é inibido pela HDL que contém a paraoxonase. Fonte: Lusic (2000, fig.3).....	26
Figura 05 – Transporte reverso do colesterol. Fonte: Rader e Daugherty (2008).....	30
Figura 06. Interação entre metaloproteinases (MMP) e seus reguladores (ativadores e inibidores) durante a síntese e da degradação da matriz extracelular (MEC) no processo aterogênico e vascularização. TIMP – inibidores teciduais de metaloproteinases. AVC – acidente vascular cerebral.....	33
Figura 07 – Incorporação de CL para HDL.....	51
Figura 08 – Razão TG/HDL.....	54
Figura 09 – Razão LDL/apoB.....	54
Figura 10 – Razão HDL/apoA.....	55
Figura 11 – Razão apoB/apoA.....	90
Figura 12 – Atividade da paraoxonase.....	90
Figura 13 – Comparação da ABS por ELISA para MMP-2 entre os grupos DCA e NDCA em função do ponto de corte.....	56
Figura 14 – Comparação da ABS por ELISA para MMP-9 entre os grupos DCA e NDCA em função do ponto de corte.....	57

Figura 15 – Comparação da ABS por ELISA para MMP-1 entre os grupos DCA e NDCA em função do ponto de corte.....	57
Figura 16 – Comparação da ABS por ELISA para MMP-8 entre os grupos DCA e NDCA em função do ponto de corte.....	58
Figura 17 – Comparação da ABS por ELISA para MMP-12 entre os grupos DCA e NDCA em função do ponto de corte.....	58
Figura 18 – Curva ROC entre DCA e NDCA para MMP-1.....	59
Figura 19 – Curva ROC entre DCA e NDCA para MMP-2.....	60
Figura 20 – Curva ROC entre DCA e NDCA para MMP-8.....	60
Figura 21 – Curva ROC entre DCA e NDCA para MMP-9.....	61
Figura 22 – Curva ROC entre DCA e NDCA para MMP-12.....	64
Figura 23 – Zimografia em gel de poliacrilamida 10% copolimerizado com gelatina 0,1% comparando pacientes NDCA e DCA.	63
Figura 24 – Zimografia em gel de poliacrilamida 10% copolimerizado com gelatina 0,1% do grupo DCA.	64
Figura 25 – Zimografia em gel de poliacrilamida 10% copolimerizado com gelatina 0,1% do grupo NDCA.	65
Figura 26 – Análise da área digerida por zimografia por densiometria.....	65
Quadro 01 – Caracterização do grupo DCA por sexo e idade.....	87
Quadro 02- Caracterização do grupo NDCA por sexo e idade.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCA1	Cassete transportador A1 de ligação ao ATP
ABCG1	Cassete transportador G1 de ligação ao ATP
ABS	Absorbância óptica
ADAM	Desintegrinas e Metaloproteinases
ADAMTS	ADAMS que contêm cadeias polipeptídicas similares à trombospondina
AHA	<i>American Heart Association</i>
AIT	Ataque Isquêmico Transitório
apoA	Apolipoproteína A
apoB	Apolipoproteína B
ATV FÍSICA	Atividade física
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BSA	Albumina de Soro Bovino
CAD	<i>Carotid Atherosclerotic Disease</i>
CAF	Fator de Adesão Quimioatraente
CAM	Molécula de Adesão Celular
CETP	Proteína de Transferência de Ésteres de Colesterol
CL- ³ H	Colesterol Livre Tritiado
CMV-IgG	Imunoglobulina G específica para Citomegalovírus
CPM	Contagens por Minuto
CT	Colesterol Total
CTP	Fosfocolina Citidiltransferase Alfa
DAB	Diaminobenzidina
DAC	Doença Arterial Coronariana
DATASUS	Banco de Dados do Sistema Único de Saúde

DC	Doença de Chagas
DCA	Doença Carotídea Aterosclerótica
DIC	Doença Isquêmica do Coração
DISLIP.	Dislipidemia
DM	Diabetes Mellitus
EC	Éster de Colesterol
EDTA	Ácido Etilo-diamino-tetracético
EGF	Fator de Crescimento Endotelial
ELISA	Teste de ligação imuno-enzimática
Erg-1	Proteína de resposta precoce ao crescimento 1
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HDL-COL	HDL-Colesterol
HGF	Fator de Crescimento de Hepatócitos
HIPOTIR.	Hipotireoidismo
ICAM	Molécula de Adesão Intercelular
IL	Interleucina
IRC	Insuficiência Renal Crônica
LCAT	Lecitina Colesterol Aciltransferase
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LDL-C	LDL-Colesterol
LDLox	LDL oxidada
LDLR	Receptor de LDL
MCP	Proteína Quimiotática Monocitária
M-CSF	Fator Estimulante da Colônia de Macrófagos
MEC	Matriz Extracelular
MMP	Metaloproteinase de Matriz

MRFIT	Estudo “ <i>Multiple Risk Factor Intervention Trial</i> ”
MRP	Proteína Relacionada Mieloide
MT-MMP	Metaloproteinases de Membrana
NASCET	Estudo “ <i>North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial</i> ”
NDCA	Sem Doença Carotídea Aterosclerótica
NO	Óxido Nítrico
OPN	Osteopontina
PBS	Tampão Bicarbonato de Sódio e Fosfato
PBS-T	PBS com Tween
PCR	Proteína C Reativa
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PLTP	Proteína Transportadora de Fosfolipídios
PNCQ	Programa Nacional de Controle de Qualidade
PON1	Paraoxonase 1
PROCAM	Estudo “ <i>Prospective Cardiovascular Munster</i> ”
ROC	Curva de Característica de Operação de Recepção (<i>Receiver Operating Characteristic</i>)
SAA	Albumina Amilóide Sérica A
SDS	Sódio Dodecilsulfato
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS
SMC	Células Musculares Lisas
SRB1	Receptor Coletor (<i>Scavenger</i>) Membro da Classe B -1
TCB	Tampão Carbonato Bicarbonato
TG	Triglicérides
TGF	Fator Transformador do Crescimento
TIMP	Inibidores Teciduais de Metaloproteinases
TNF	Fator de Necrose Tumoral

TRC	Transporte Reverso do Colesterol
VCAM	Molécula de Adesão Celular Vascular
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

SUMÁRIO

1 Apresentação.....	19
2 Introdução.....	20
2.1 Doenças cardiovasculares.....	20
2.2 Mecanismos da aterosclerose e fatores associados à formação do ateroma.....	21
2.3 Dislipidemias.....	27
2.4 Transporte do colesterol.....	29
2.5 A paraoxonase e sua ação anti-inflamatória na aterosclerose.....	30
2.6 A matriz extracelular e as características das metaloproteinases de matriz.....	31
2.6.1 A ação das metaloproteinases na aterosclerose e no ateroma.....	32
2.7 Justificativa.....	39
3 Metodologia.....	41
3.1 Desenho do Estudo e Casuística.....	41
3.2 Protocolo Inicial.....	41
3.2.1 Critérios de inclusão.....	41
3.2.2 Critérios de exclusão.....	42
3.3 Avaliação clínica e de imagem.....	42
3.3.1 Anamnese.....	42
3.3.2 Metodologia de ultrassonografia de carótidas.....	42
3.3.3 Classificação das lesões estenóticas.....	43
3.4 Determinações Laboratoriais.....	43
3.4.1 Laboratório Clínico.....	43
3.4.2 Laboratório de Pesquisa.....	44
3.4.2.1 Incorporação de Colesterol Livre (CL) na HDL.....	44

3.4.2.2 Determinação da Atividade de Paraoxonase.....	44
3.4.2.3 Determinação da concentração de apoA e apoB.....	45
3.4.2.4 Zimografia (Eletroforese em gel de acrilamida copolimerizado com gelatina).....	45
3.4.2.4.1 Estimativa da área digerida por zimografia.....	46
3.4.2.5 ELISA (Ensaio de ligação imunoenzimático).....	46
3.5 Análise estatística.....	47
4 Resultados.....	48
5 Discussão.....	66
5.1 Limitações do estudo.....	73
6 Conclusões.....	74
7 Perspectivas Futuras.....	75
8 Referências.....	76
9 Apêndices.....	87

1 Apresentação

As doenças cardiovasculares representam a maior parte da morbidade e mortalidade no mundo ocidental (LUSIS, 2000; REDDY, 2002; FERRAZ, 2008; ROVER *et al.*, 2010), tornando-se uma epidemia da qual destacam-se a aterosclerose e a doença arterial coronária (DAC). Há uma grande diversidade de fatores associados ao desenvolvimento e ao agravamento dessas doenças. Pesquisas que investigam exaustivamente essas doenças contribuem para adoção de medidas remediadoras, bem como a determinação de novos indicadores de riscos associados. Dessa forma, neste estudo pretendeu-se avaliar a concentração plasmática de metaloproteinases de matriz e a incorporação de colesterol nas lipoproteínas plasmáticas (*in vitro*) como indicadores de risco cardiovasculares em pacientes com doença carotídea aterosclerótica (DCA).

A relevância desta pesquisa é justificada pela possibilidade de confirmar a utilização da determinação das metaloproteinases, do perfil e incorporação de colesterol na HDL como potenciais marcadores de risco, os quais poderiam ser utilizados na avaliação do processo multifatorial da aterosclerose, bem como determinar a associação entre metaloproteinases de matriz e a presença de ateroma.

Marcadores inflamatórios como PCR (proteína C reativa), nitrito, nitrato, paraoxonase, SAA (albumina amiloide sérica) e as metaloproteinases (MMP), podem refletir a presença de inflamação no processo aterogênico da parede vascular. Tais marcadores podem ser considerados como medidas indiretas de doença cardiovascular aterosclerótica. As metaloproteinases são biomarcadores que estão intimamente relacionados direta ou indiretamente à modificação/remodelamento da parede vascular e outros tecidos (OLIVEIRA e SILVA, 2002; BORGES, 2006; LIMA e COUTO, 2006; COUTO *et al.*, 2007, CORRÊA, 2009) e são o foco principal de pesquisa neste estudo. Para tanto, usou-se uma abordagem distinta de outros estudos e foram analisadas as metaloproteinases 1, 2, 8, 9 e 12, por serem as que apresentam maior destaque na literatura em relação às doenças cardíacas e aterosclerose, além de serem expressas pela maioria das células envolvidas nessas doenças, tentando estabelecer sua correlação com as condições clínicas e laboratoriais de indivíduos com DCA (Doença Carotídea Aterosclerótica). Conjuntamente, foi analisada a incorporação de moléculas lipídicas na HDL (lipoproteína de alta densidade) em pacientes cuja presença de aterosclerose, ou não, nas carótidas extracranianas foi determinada por exames de imagem – ecografia vascular com doppler.

2 Introdução

2.1 Doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares representam a principal causa de morte em nosso país, correspondendo cerca de 30% dos óbitos (DATASUS, 2010; SANTOS, 2001; SOUZA, *et al.*, 2001; ROVER, 2010). Por sua vez, a aterosclerose é responsável pelo maior índice de mortalidade no Brasil (23% a 25% em todas as faixas etárias) (GUS, FISCHMANN e MEDINA, 2002; CORRÊA-CAMACHO *et al.*, 2007, FERRAZ, 2008). Segundo dados obtidos a partir dos atestados de óbito, o acidente vascular cerebral (AVC) foi a primeira causa de morte seguido da doença isquêmica do coração (DIC) (dados relativos às doenças cardiovasculares no Brasil em 2010, [DATASUS, 2010]). Na maior parte dos casos, tanto o AVC como a DIC têm etiologia conhecida e fatores de risco bem estabelecidos. Dados dos estudos de Framingham, MRFIT e PROCAM demonstraram indiscutivelmente o papel das dislipidemias, i.e., LDL-colesterol elevado e HDL-colesterol diminuído, hipertensão arterial sistêmica (HAS), fumo, idade e diabetes mellitus (DM) como fatores de risco independentes para a aterosclerose e, conseqüentemente, para a DIC (GRUNDY *et al.*, 1999; VACCARINO e KRUMHOLZ, 1999; REDDY, 2002; ROVER *et al.*, 2010). Na etiologia do AVC, a HAS – principalmente a hipertensão sistólica – é o mais importante fator de risco. Além desses, uma série de outros fatores de risco foram descritos e potencializam os fatores independentes; esses são denominados fatores predisponentes. Dentre os fatores predisponentes temos: história familiar precoce de DIC, obesidade – principalmente a do tipo central –, sedentarismo, etnia e fatores psicossociais. Um terceiro 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 marcadores de infecção tanto viral quanto bacteriana. A idade avançada e algumas variações metabólicas (fisiológicas) estão associadas ao aumento da quantidade de placas ateroscleróticas estabelecidas (GRUNDY *et al.*, 1999; GRUNDY, 1999; VACCARINO e KRUMHOLZ, 1999; KALELA, 2002). Segundo Collins *et al.* (1990), quanto maior a quantidade de placas maior o risco de DIC. O controle de alguns dos fatores de risco independentes reduz significativamente a morbimortalidade secundária à

aterosclerose, como, por exemplo, o controle da HAS diminuiu o AVC cerca de 42% e a DIC em 15%. 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 norte americanos mostram que nos últimos 20 anos a queda da morbimortalidade por doenças cardiovasculares nos EUA (AHA, 2011) vem diminuindo, ou seja, a morbimortalidade continua em queda, mas em ritmo muito menor. Uma das explicações para esse achado está na diferença entre teoria e a prática, ou seja, fatores e marcadores de risco apesar de conhecidos e da disponibilidade de meios para controlá-los, não são tratados de forma adequada.

2.2 Mecanismos da aterosclerose e fatores associados à formação do ateroma

Algumas patologias, assim como alguns estados fisiológicos, tipo cicatrização, crescimento tumoral, aumento da demanda de nutrientes e de oxigênio nos tecidos, inflamação, neovascularização e, inclusive, a formação do ateroma durante o processo de aterosclerose são induzidos por fatores pró-angiogênicos e fatores reguladores das funções celulares (van HINSBERGH e KOOLWIJK, 2008). A ação desses fatores é acompanhada pelo recrutamento de células inflamatórias, que provem os fatores necessários, como citocinas, moléculas de adesão, proteinases entre outras, para mediar esses processos, em particular de arteriogênese, inflamação e aterosclerose (ROSS, 1999; PEREIRA e BORBA, 2008; PACKARD e LIBBY, 2008; GALKINA e LEY, 2009).

Até meados do século passado, achava-se que a aterosclerose era um simples problema de obstrução das artérias, mas hoje se sabe que há diversos complicadores envolvidos, como a ação celular e humoral (anticorpos, citocinas, quimocinas) e atividade enzimática que levam ao estado de instabilidade da placa do ateroma, podendo resultar em trombose, além de altas taxas de colesterol de LDL e da estenose que contribuem para eventos de isquemias e infartos do miocárdio entre outros problemas (ROSS, 1999; PEREIRA e BORBA, 2008; PACKARD e LIBBY, 2008).

A aterosclerose é uma doença crônico-degenerativa que evolui a partir do dano endotelial das artérias (LIMA e COUTO, 2006; COUTO *et al.*, 2007; CORRÊA-CAMACHO *et al.*, 2007, FERRAZ, 2008; GALKINA e LEY, 2009), (Figura 01). Vários agentes podem

desencadear a lesão endotelial, como as dislipidemias, produtos finais derivados da glicação proteica avançada no diabetes, compostos químicos do tabaco, aminas vasoativas circulantes, complexos imunológicos (autoanticorpos e antígenos próprios complexados) e infecções. Além disso, agentes físicos como a hipertensão arterial intensificam as forças de cisalhamento do sangue, causando também deformação e lesão endotelial (LEAL *et al.*, 2002, FERRAZ, 2008). Nas dislipidemias, lipoproteínas de baixa densidade oxidadas (LDLox) penetram através do endotélio lesado ou disfuncional. As LDLox, o estresse de cisalhamento e o fluxo turbulento exercem papel inicial no 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 normalmente é devido à captura de LDL (lipoproteína de baixa densidade), em altas taxas na corrente sanguínea (130 mg/dL segundo Packard e Libby [2008]), pela íntima endotelial dos vasos, seguida pelo recrutamento de neutrófilos, linfócitos e monócitos pela liberação de fatores inflamatórios e outros mediadores (TORZEWSKI *et al.*, 2004, KALELA, 2002; GALKINA e LEY, 2009) (Figuras 01, 02 e 03).

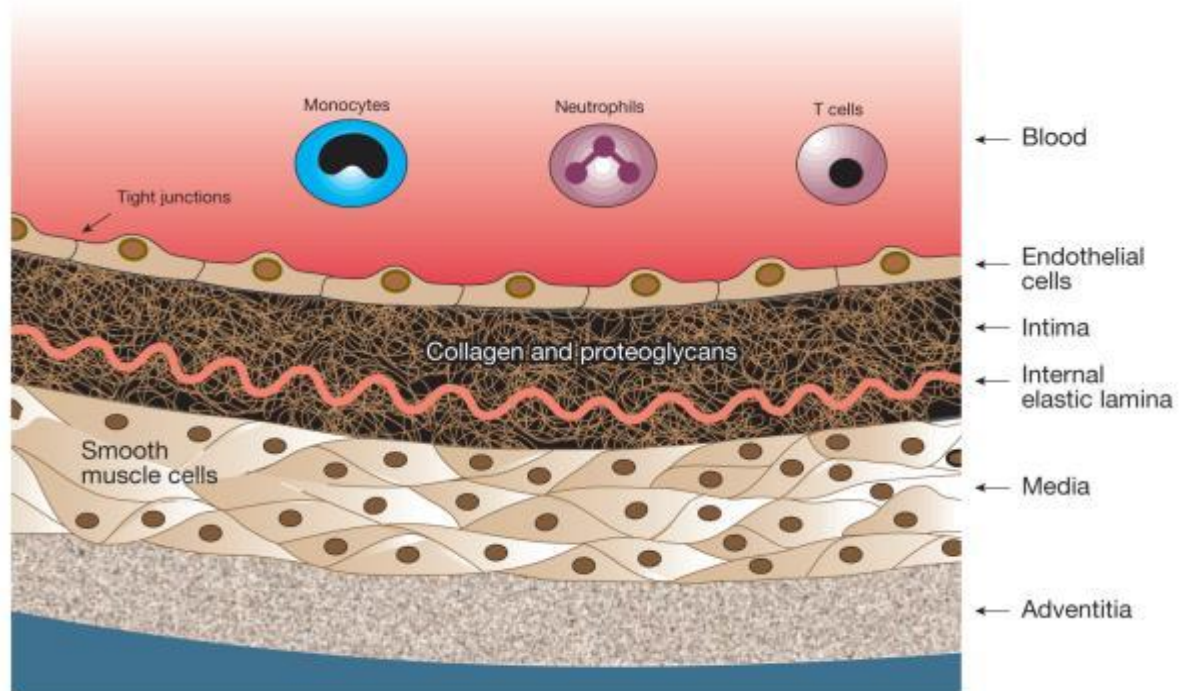


Figura 01 – Estrutura de uma artéria calibrosa normal, mostrando a íntima revestida de células endoteliais que cobrem a camada de fibras elásticas e colágenas (MEC), lâmina elástica, seguida da camada média de células musculares lisas e da camada adventícia. Fonte: Lysis (2000, fig.1).

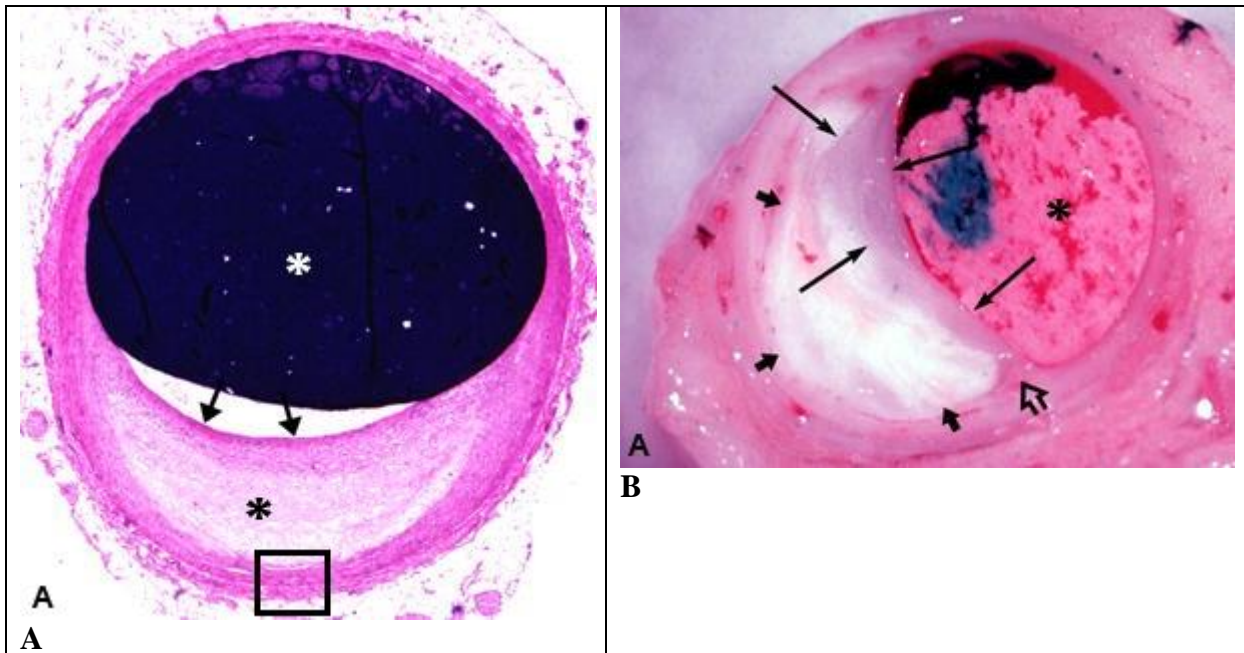


Figura 02 – A – Pequena placa aterosclerótica assimétrica estável com placa fibrosa e núcleo necrótico de um homem de 32 anos. Fonte: Frink (2002, fig.5). * Asterisco preto corresponde ao núcleo necrótico. * Asterisco branco indica a luz do vaso. Setas indicam a capa fibrosa. O retângulo corresponde a uma seção destacada em maior aumento, mas não é mostrada aqui.

B – Placa aterosclerótica instável na artéria coronária proximal anterior esquerda de um homem de 53 anos. Fonte: Frink (2002, fig.4). * Asterisco indica a mistura de corantes vermelho e azul injetados para contraste na luz do vaso; setas pequenas e pretas indicam material esbranquiçado que compõe a maior parte da placa consistindo no núcleo necrótico; setas longas indicam a capa fibrosa na porção mais espessa; seta pequena e aberta indica a porção mais delgada da capa fibrosa com aparente degradação. Coloração por MSB (*martius/scarlet/blue*) para tecidos conjuntivos.

Após a aderência dos monócitos, outras moléculas específicas, como a proteína quimiotática monocitária-1 (MCP-1) e o fator estimulante da colônia de macrófagos (M-CSF), atraem e ativam os monócitos no espaço subendotelial (LEAL *et al.*, 2002; FUSTER, 2005; LIBBY *et al.*, 2002, CORRÊA-CAMACHO *et al.*, 2007), havendo a liberação de uma série de metaloproteinases que atuam na modulação do processo de dissolução das fibras conjuntivas e possibilita a diapedese celular (ROSS, 1999; RAJAVASHISTH *et al.*, 1999; TORZEWSKI *et al.*, 2004; JÖNSSON-RYLANDER *et al.*, 2007; HINSBERGH e KOOLWIJK, 2008; CHARRIER-HISAMUDDIN *et al.*, 2008; VIRELLA e LOPES-VIRELLA, 2008; GALKINA e LEY, 2009) (Figura 04).

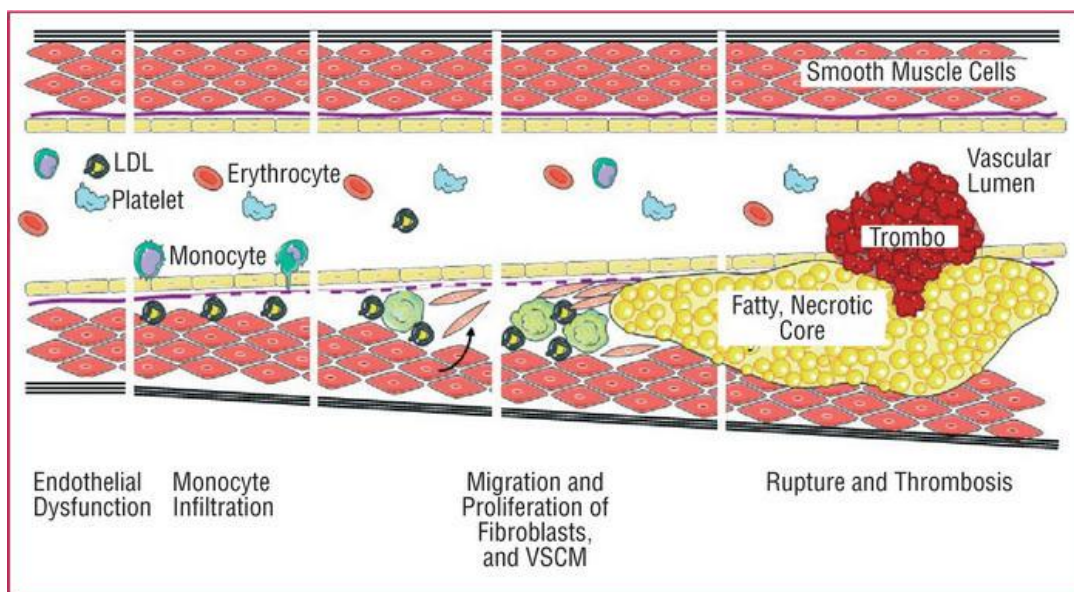


Figura 03 – Processo de desenvolvimento da aterosclerose. LDL – lipoproteína de baixa densidade, VSMC – célula muscular lisa vascular. Fonte: Rodríguez *et al.* (2007).

Uma vez que os monócitos tenham se diferenciado em macrófagos, estes iniciam a conversão de LDL levemente oxidadas em LDL altamente oxidadas que se ligam a receptores *scavengers* dos macrófagos e penetram nas células, transformando-as em células espumosas (LEAL *et al.*, 2002; KALELA, 2002, FUSTER, 2005;). As células espumosas (macrófagos modificados) são componentes importantes da placa aterosclerótica. O endotélio lesado libera fatores de relaxamento, como a prostaciclina e o óxido nítrico (NO), e fatores de contração, como a endotelina-1. Quando a célula endotelial desaparece como resultado do dano, a superfície de-endotelizada fica exposta às plaquetas e fatores de coagulação, resultando em trombose. As células espumosas mantêm a produção de citocinas pró-inflamatórias (*e.g.* interleucinas, VCAM-1) e promovem a migração, adesão e o sequestro de linfócitos T, os quais desencadeiam a resposta imune e secretam ainda mais citocinas adicionais (IL-1, TNF- α), bem como fatores de crescimento, moléculas de adesão e metaloproteinases de matriz que desencadeiam a proliferação de células musculares lisas (SMC) da íntima e reforçam o recrutamento de células inflamatórias. Nessas condições, as células musculares lisas e plaquetas liberam inúmeras citocinas, entre elas o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator transformador do crescimento beta (TGF- β) (LEAL *et al.*, 2002; LIBBY *et al.*, 2002; CORRÊA-CAMACHO *et al.*, 2007). As SMCs e as novas células inflamatórias também

auxiliam a progressão do processo inflamatório expressando (sintetizando) enzimas que degradarão a elastina e a colagenina (lipoproteinase-lipases, esfingomielinase, fosfolipase-A2), permitindo a migração dessas células na região lesada e expandindo o ateroma. O processo continua com a inibição da produção da síntese de colágenos e desencadeando a produção de colagenases pelos macrófagos na íntima. Isso enfraquece as paredes do endotélio, pela perda de elasticidade das paredes do vaso, e aumenta o tamanho do ateroma levando ao seu intumescimento. Ao mesmo tempo, os linfócitos T, entre outras células, aumentam a produção de fatores pró-coagulantes e, quando o ateroma rompe, fatores de sinalização inflamatória desencadeiam uma trombose que ocasiona as complicações agudas da aterosclerose (isquêmicas) – síndrome coronária aguda, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral (ROSS, 1999; OLIVEIRA e SILVA, 2002; KALELA, 2002; SCATENA, LIAW e GACHELLI, 2007; PEREIRA e BORBA, 2008; PACKARD e LIBBY, 2008, HINSBERGH e KOOLWIJK, 2008, GALKINA e LEY, 2009).

Aliada à ação celular, há diversos fatores plasmáticos e humorais associados à aterosclerose além da LDL e PCR (proteína C-reativa), tais como proteínas do sistema complemento, fibrinogênio, proteína amilóide-A (ALTMAN, 2003; PEREIRA e BORBA, 2008; MAAS e FURIE, 2009), metaloproteinases de matriz (MMP-1, MMP-3, MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-12, MMP-13) (TUOMAINEN *et al.*, 2007; TORZEWSKI *et al.*, 2004; CREEMERS *et al.*, 2001; MAAS e FURIE, 2009), ligante CD-40, adinopectina, MMP-9, citocinas (IL-1 α , IL-2, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, TFN- α) (RAJAVASHISTH *et al.*, 1999, ALTMAN, 2003; PEREIRA e BORBA, 2008, VIRELLA e LOPES-VIRELLA, 2008; MAAS e FURIE, 2009), selectinas (P-selectina), molécula de adesão vascular (VCAM-1), integrinas, fatores quimioatraentes (CAF-1) (PACKARD & LIBBY, 2008), desintegrinas e metaloproteinases de matriz (ADAM-1, ADAM-8, ADAM-15) (JÖNSSON-RYLANDER *et al.*, 2007; GÓMEZ-GAVIRO *et al.*, 2007; CHARRIER-HISAMUDDIN *et al.*, 2008, HINSBERGH & KOOLWIJK, 2008; MAAS e FURIE, 2009), osteopontina (OPN) (SCATENA, LIAW, GACHELLI, 2007; MAAS e FURIE, 2009), proteína de choque-térmico Hsp-60 e Hsp-65 (MAYR *et al.*, 2000; PEREIRA & BORBA, 2008; MAAS e FURIE, 2009), proteína associada à gravidez (PAPP-A) (PEREIRA & BORBA, 2008) (Figura 05).

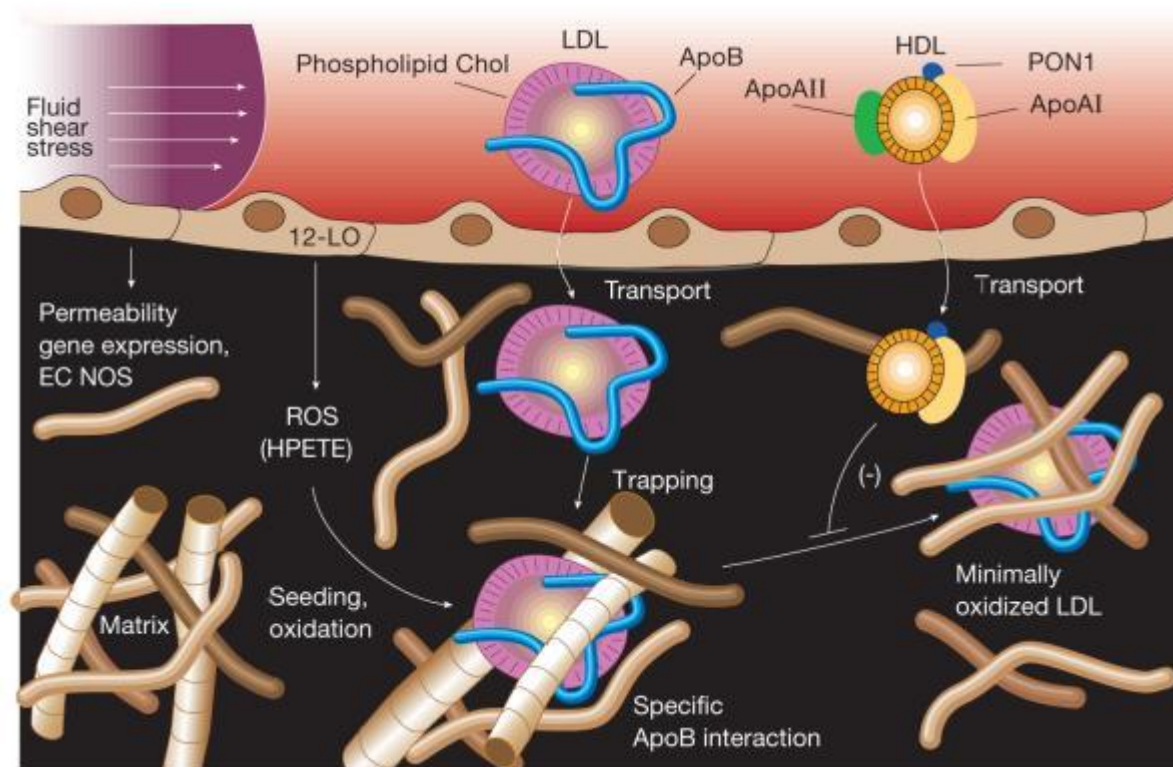


Figura 04 – Lesão inicial na aterosclerose. Os locais preponderantes da lesão são determinados pelas forças hemodinâmicas e delineamento vascular, que afetam a permeabilidade endotelial, a expressão gênica, a síntese de óxido nítrico e promovendo a retenção de LDL e outras lipoproteínas carreadoras de apoB, dando início à inflamação da íntima por intermédio de espécies reativas de oxigênio e lipoxigenases que oxidam a LDL e seus componentes. Esse processo oxidativo é inibido pela HDL que contém a paraoxonase. Fonte: Lusic (2000, fig.3).

Desses, os fatores preditivos mais usados são LDL e PCR nos exames clínicos (TORZEWSKI *et al.*, 2004; PACKARD e LIBBY, 2008). Esses mesmos autores consideram que são elegíveis como bons marcadores moleculares e possíveis fatores preditivos as metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9), as desintegrinas e metaloproteinases (ADAM-8 e ADAM-15), proteína ligante de CD40, anticorpo anti-Hsp-60, proteína mielóide relacionada (MRP), adipocinas, adinopectinas, fator de necrose tumoral (TNF), interleucinas (IL-1, IL-6, IL18) entre outros.

Por outro lado, alguns patógenos como *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori* e citomegalovirus (MAYR *et al.*, 2000) e doenças (diabetes, reumatite, hipertensão, obesidade mórbida) igualmente estão associados ao desenvolvimento da aterosclerose. Em relação ao citomegalovírus, Straat *et al.* (2009) determinaram que há correlação significativa entre a

inibição da expressão de MMP-9, bem como de sua atividade na medida em que esse vírus ativaria a expressão de TIMP-1, o que revelaria participação desse vírus na aterosclerose, pois a MMP-9 seria protetora segundo Straat *et al.* (*ib.*); Schwartz *et al.*, 2007; Murrow *et al.*, 2010; Newby, 2005; Gaubatz *et al.*; 2010. Por sua vez, Prochnau *et al.* (2011) afirmaram que a expressão de MMP-1 e MMP-3 pelas células musculares lisas de doentes ateroscleróticos seria aumentada pela infecção com citomegalovírus. Enquanto que Vlachopoulos *et al.* (2005) determinaram que há aumento da expressão de MMP-9 na inflamação induzida por *Salmonella typhi*.

2.3 Dislipidemias

Junto daqueles fatores já comentados, modificações no metabolismo dos lipídios estão associadas ao desenvolvimento da aterosclerose e outras doenças vasculares.

As dislipidemias são essencialmente críticas e inerentes ao processo aterogênico, sendo os fatores de risco mais importantes associados à aterosclerose e DAC. As dislipidemias constituem-se em quaisquer distúrbios metabólicos das lipoproteínas, decorrentes de alterações fisiológicas que resultem 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 e KRUMHOLZ, 1999; SANTOS, 2001; REDDY, 2002; ROVER *et al.*, 2010, GIULIANO *et al.*, 2005). Associados às dislipidemias, há outros fatores envolvidos no desenvolvimento da aterosclerose e DAC como obesidade, dieta aterogênica, sedentarismo, alcoolismo, tabagismo, síndrome metabólica, diabetes mellitus, hipertensão arterial, desnutrição do neonato (SANTOS, 2001; ROVER *et al.*, 2010).

Em relação ao papel dessas moléculas como indicadores de risco cardiovascular, Kawamoto *et al.* (2005) afirmaram que o colesterol não-HDL-C é um dos indicadores mais promissores para determinar risco de aterosclerose carotídea. O estudo determinou que há aumento do risco com o crescimento de LDL-C, não-HDL-C, CT, e maior razão CT/HDL-C tem relação linear positiva com a aterosclerose carotídea, assim como LDL-C, em especial em pacientes idosos. Por sua vez, Gardener *et al.* (2009) propuseram os mesmos indicadores de Kawamoto *et al.* (*ib.*), 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/HDL, e apoB/apoA-I estão associados com a presença de placa aterosclerótica. Quanto à HDL-C, Seon *et al.* (2011) afirmaram que o aumento dos níveis de HDL-C está associado ($p = 0,045$) com a diminuição do espessamento da íntima média de carótidas em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 e aterosclerose. Kablak–Ziembicka *et al.* (2011) relataram que vários fatores estão associados com o espessamento de carótidas e aterosclerose, como diabetes, hiperlipidemia, tabagismo, infarto prévio do miocárdio e ou isquemia, bem como altos níveis de IL6, TNF- α , de PCR, de creatinina e de 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, 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-C (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 carotídea. Ainda em relação ao colesterol não-HDL-C, 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 que dessas moléculas.

Para avaliação do tamanho de partícula de LDL, Vieira *et al.* (2011) consideram que o uso da razão TG/HDL-C (MARUYAMA *et al.* 2003) é mais significativo que outras razões (TC/HDL-C e LDL-C/HDL-C), ou seja, razões TG/HDL-C > 1,0 seriam uma estimativa confiável para a determinação da presença de partículas de LDL pequenas e densas, cujo aumento de concentração representariam risco aumentado de eventos cardiovasculares. Por sua vez, as razões TC/HDL-C e LDL-C/HDL-C são indicativas do risco de evento cardiovascular, sendo maior o risco quanto maior a razão se distanciar positivamente de 1,0. Já as razões HDL-C/apoA e LDL-C/apoB, estimam a concentração relativa de colesterol incorporada respectivamente no core da partícula de HDL e de LDL, sendo desejável uma maior incorporação em HDL e uma menor em LDL. Por fim, a razão apoA/apoB, estabelece a proporção entre as concentrações circulantes dessas apolipoproteínas, sendo desejável uma razão positiva maior do que 1,0, pois significa uma maior incorporação de colesterol na HDL, todavia, apesar de estimar um risco similar ao obtido pela razão TC/HDL-C, é inversamente proporcional a esta razão.

2.4 Transporte do colesterol

O transporte do colesterol e a incorporação de moléculas pelas partículas de lipoproteicas têm impacto direto no desenvolvimento das dislipidemias.

O transporte reverso do colesterol (TRC) é a via pela qual o colesterol nos tecidos periféricos é transferido através do plasma para o fígado. Onde pode ser reciclado ou excretado na bile e/ou utilizado como arcabouço para produção de hormônio (NOFER *et al.*, 2002; LIMA e COUTO, 2006). De acordo com Lima e Couto (*ib.*), para isso são necessários:

1. A transferência de fosfolipídios e colesterol de membranas celulares para partículas lipoproteicas ricas em proteínas e pobres em lipídios, através do espaço extracelular por processo dependente de ABCA-1 que resulta na formação das HDL discoidais;
2. A esterificação do colesterol mediada pela LCAT da HDL discoidal, transformando-a em partícula esférica;
3. A interação das HDL esféricas com a proteína transportadora de colesterol éster (CETP), que transfere o conteúdo de ésteres de colesterol (EC), ou parte dele, para VLDL e seus remanescentes; e
4. A recirculação do EC para o fígado, tanto pela remoção de β -VLDL por meio dos receptores da lipoproteína de baixa densidade quanto pela remoção de partículas de HDL pelos receptores da família SRB1, que removem seletivamente os EC das partículas de HDL e também de LDL para os hepatócitos e células produtoras de hormônios esteroidais, sem internalizar as proteínas da HDL, os fosfolipídios e as apolipoproteínas.

Embora os mecanismos nos quais ocorram dissociação de lipídios e lipoproteínas e incorporação dos EC nas membranas plasmáticas não estejam ainda totalmente elucidados, acredita-se que exista a formação de um canal hidrofóbico por onde o colesterol da HDL se difunde para a membrana plasmática. O processo realizado pelos receptores da família do receptor de LDL (LDL-r) ou *scavengers* classe A é diferente, ou seja, acontece a internalização das lipoproteínas via endossomos, seguida da fusão com lisossomos para degradação das partículas lipoproteicas. É importante enfatizar que o TRC é realizado por um conjunto de moléculas efetoras como apoproteínas, lipídios, proteínas de transferência, enzimas, entre outras, associadas ou não à HDL e suas subclasses, sendo esse um grande desafio para a lipidologia: entender como a relação influxo/efluxo do colesterol pode ser

modulada para prevenir a aterosclerose (GINSBERG e GOLDBERG, 1998; KWITEROVICH, 2000; LIMA e COUTO, 2006) (Figura 06).

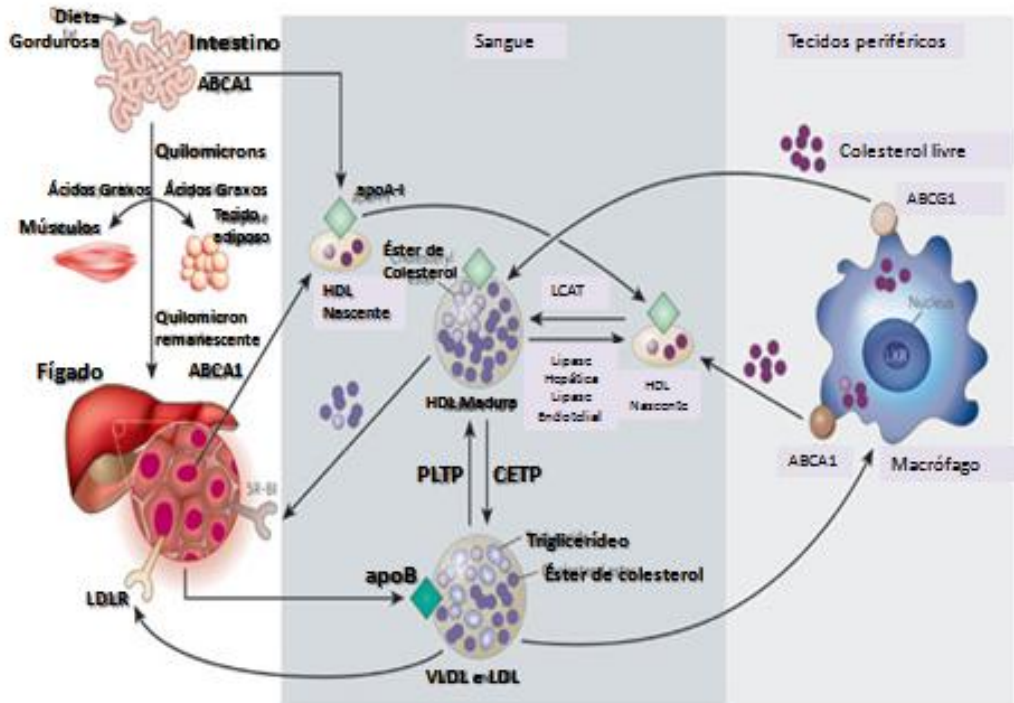


Figura 05 – Transporte reverso do colesterol. Fonte: Rader e Daugherty (2008).

Quanto ao papel da HDL como marcador de risco, um contraponto é apresentado por Khera *et al.* (2011), que questionam a eficácia do uso de terapias de aumento do nível de HDL para tratamento de pacientes ateroscleróticos e afirmam que a capacidade de efluxo de colesterol pelos macrófagos é um indicador preditivo inverso para a doença arterial coronária e sua verificação é essencial para avaliar a melhora dos pacientes, na medida em que reflete mais adequadamente o transporte reverso do colesterol do que outros fatores ou a simples determinação do nível de HDL ou de apoA, por exemplo.

2.5 A paraoxonase e sua ação anti-inflamatória na aterosclerose

A paraoxonase (PON1) é uma enzima, presente na HDL, que confere propriedade antioxidante a esse complexo molecular, resultando em efeito protetor contra a peroxidação da LDL. Essa enzima hidrolisa substratos organofosfatados e outros ésteres orgânicos como os hidroperóxidos de fosfolípídios (*e.g.* fosfatidilcolina), que oxida LDL e, por consequência,

igualmente protege contra a aterosclerose (STEIN e STEIN, 1999; DURRINGTON, MACKNESS e MACKNESS, 2001; RADER, 2002; FERRETTI *et al.*, 2004; CHARLTON-MENYS, LIU e DURRINGTON, 2006; MACKNESS *et al.*, 2006, LIMA e COUTO, 2006; LOSCALZO, 2008, GALKINA e LEY, 2009). Conforme Lima e Couto, 2006, a PON1 age catalisando a quebra de fosfolipídios oxidados na LDL, que estimulam a produção de citocinas que levam à adesão de monócitos no endotélio. Essa enzima também diminui o conteúdo de peróxidos lipídicos nas artérias coronárias, com redução de lesões na carótida.

Há baixa atividade de PON1 sérica em síndromes metabólicas (obesidade, dislipidemias, hipertensão, estresse oxidativo aumentado, aterosclerose) e doenças cardiovasculares (*e.g.* DAC), tornando a atividade da PON1 um indicador de risco e de condições clínicas para essas moléstias (DURRINGTON, MACKNESS e MACKNESS, 2001; FERRETTI *et al.*, 2004; MACKNESS *et al.*, 2006, LIMA e COUTO, 2006; GARIN, MOREN e JAMES, 2006).

2.6 A matriz extracelular e as características das metaloproteínases de matriz

A matriz extracelular (MEC) dos vasos sanguíneos é composta principalmente por colágeno, elastina e outras glicoproteínas e proteoglicanos produzidos em maior quantidade por fibroblastos e células musculares lisas, além disso, essas moléculas atuam na proliferação, migração, adesão celular, diferenciação e morfogênese (FERRAZ, 2008; LAXTON *et al.*, 2009; BORGES, 2006). Entre as proteínases responsáveis pela degradação e remodelação da MEC estão as metaloproteínases (MMP) e as serinoproteínases (BORGES, 2006).

As metaloproteínases (ou matrixinas) são endopeptidases dotadas de zinco e/ou cálcio no seu sítio ativo e capazes de degradar as proteínas da MEC. São conhecidas 28 metaloproteínases agrupadas em: colagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisinas, metaloproteínases de membrana e outras metaloproteínases; além de subgrupos denominados ADAMS (“*a desintegrin and metalloproteinase*”) e ADAMTS (ADAMS que contêm cadeias polipeptídicas similares à trombospondina), serralinas e astacinas. As colagenases degradam colágeno dos tipos I, II, III, VII, VIII e X, e dentre estas estão as MMP-1 (produzidas por células musculares lisas e endoteliais, queratinócitos) e MMP-8 (sintetizadas em neutrófilos). As gelatinases desintegram colágeno tipo IV, fibronectina, proteoglicanos, laminina e elastina, como, por exemplo, as MMP-2 e 9, sendo expressas por macrófagos, osteoblastos, fibroblastos, células polimorfonucleares e vasculares. As estromelinas desfazem

proteoglicanos, fibronectina, laminina e colágenos dos tipos III e IV. Neste grupo encontram-se as MMP-3, 10 e 11. As matrilisinas degradam versican, elastina, fibronectina, colágeno tipo IV e englobam as MMP-7 (expressas por células epiteliais glandulares) e MMP-26 (que provem do monócito em diferenciação). As metaloproteinases de membrana (MT-MMP) desintegram colágenos tipos I, II, e III e podem ativar outras MMP. Constituem as MMP-14, 15, 16, 17, 24 e 25 (expressas por leucócitos e outras células). Fora desses grupos, estão outras metaloproteinases como a MMP-12 (expressa por macrófagos) e que degrada elastina e outras proteínas da matriz. Neste conjunto também estão as MMP-19, 20, 22, 23 e 28. Todas as metaloproteinases são secretadas na forma inativa, sendo ativadas por outras enzimas como a plasmina e algumas MMP (1, 3, 7, 9, 13). A regulação e inibição das MMP são realizadas principalmente pelos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP 1, 2, 3, 4), alfa-2-macroglobulina e pelo próprio controle da expressão gênica (BORGES, 2006; MIYAGI, 2008; RAFFETTO e KHALIL, 2008; CORRÊA, 2009; KLEIN e BISCHOFF, 2011).

Ainda segundo Borges (2006), as principais alterações histopatológicas das aortas envolvem componentes da MEC, sendo que a fragmentação da elastina e a degradação do colágeno é consequência da ação das metaloproteinases, em especial as MMP-1, 2, 3, 7, 9 e 12.

2.6.1 A ação das metaloproteinases na aterosclerose e no ateroma

As metaloproteinases desempenham um papel importante no desencadeamento e desenvolvimento dos processos inflamatórios, em particular nos vasculares, embora de maneira ainda não completamente conhecida.

Na aterosclerose, a ação das metaloproteinases é desencadeada após o início do processo inflamatório de formação da placa do ateroma, quando células que atuam na infecção (em especial monócitos e as células espumosas) já se encontram no interior da íntima. Essas células passam a liberar citocinas e superoxidases que ativam metaloproteinases, bem como produzem collagenases que afetam a integridade da placa. Entre as principais metaloproteinases que medeiam esses processos, são reconhecidamente atuantes as metaloproteinases de matriz MMP-1, MMP-3, MMP-2, MMP-9, MMP-12, MMP-13 (TORZEWSKI *et al.*, 2004; CREEMERS *et al.*, 2001, KLEIN e BISCHOFF, 2011) e as desintegrinas e metaloproteinases de matriz (ADAM-1, ADAM-8, ADAM-15) (JÖNSSON-RYLANDER *et al.*, 2007; GÓMEZ-GAVIRO *et al.*, 2007; CHARRIER-HISAMUDDIN *et*

al., 2008, HINSBERGH & KOOLWIJK, 2008), juntamente com os inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP-1 e TIMP-2) (TUOMAINEN *et al.*, 2007; JÖNSSON-RYLANDER *et al.*, 2007; HINSBERGH & KOOLWIJK, 2008; CHARRIER-HISAMUDDIN *et al.*, 2008). Em resumo, além de estar envolvidas na invasão celular e de promover a progressão da lesão, as metaloproteinases atuam maximizando os efeitos da inflamação, levando ao maior recrutamento de células inflamatórias, migração de células musculares lisas e ao intumescimento do ateroma e consequente instabilidade da placa (KALELA, 2002; XIN *et al.*, 2004, JÖNSSON-RYLANDER *et al.*, 2007; GÓMEZ-GAVIRO *et al.*, 2007; CHARRIER-HISAMUDDIN *et al.*, 2008, HINSBERGH & KOOLWIJK, 2008) (Figura 07).

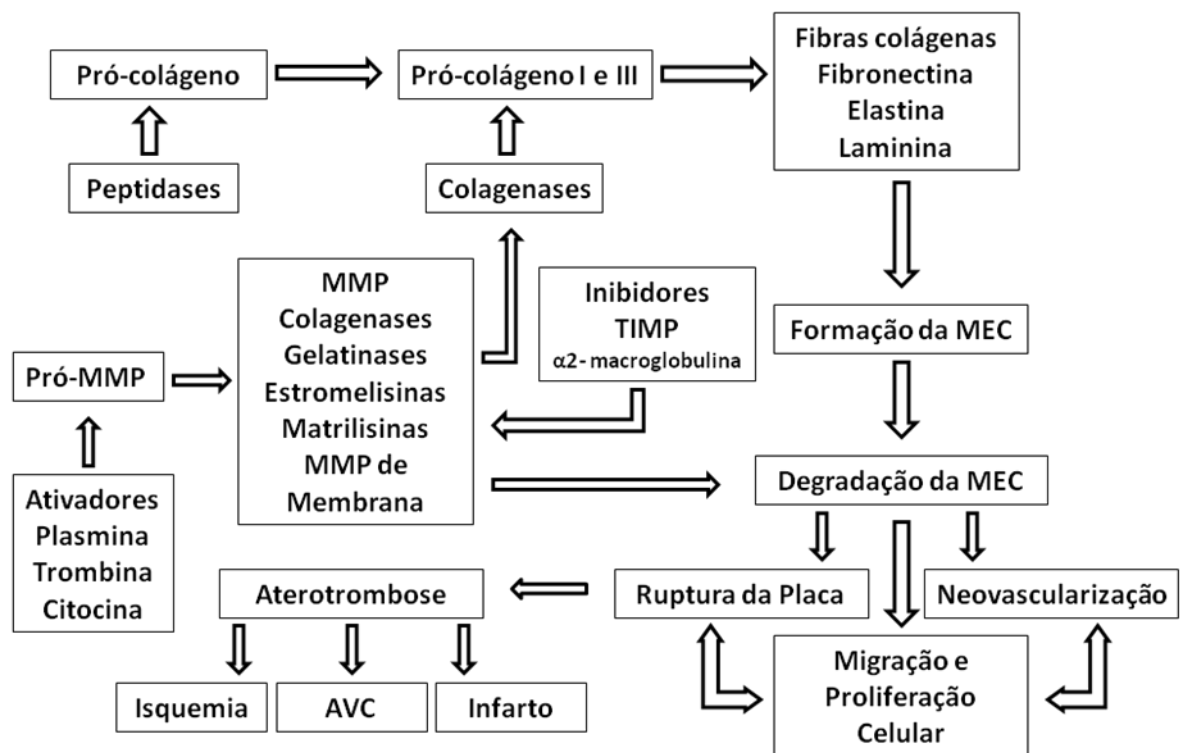


Figura 06 – Interação entre metaloproteinases (MMP) e seus reguladores (ativadores e inibidores) durante a síntese e da degradação da matriz extracelular (MEC) no processo aterogênico e vascularização. TIMP – inibidores teciduais de metaloproteinases. AVC – acidente vascular cerebral.

A MMP-1 é considerada uma das mais proeminentes metaloproteinases como indicadora de risco cardiovascular, sendo induzida por fatores de crescimento (HGF), trombina, VEGF e TNF- α e mediada e regulada por Erg-1 (fator de transcrição) e inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP-1, TIMP-2). A MMP-1 auxilia a célula a desintegrar, por ação colagenosa, a matriz de fibras teciduais (normalmente colaginosas), facilitando a

entrada da célula no tecido pela ativação de MMP-2, via inibição de TIMP-2, e de ativação subsequente de MMP-9, MMP-13, MMP-3, MMP-12, MMP-15 e ADTMS-1, o que permite o deslocamento de células no tecido, aumentando a extensão da degradação da matriz e da invasão (RAJAVASHISTH *et al.*, 1999; TORZEWSKI *et al.*, 2004; JÖNSSON-RYLANDER *et al.*, 2007; HINSBERGH & KOOLWIJK, 2008; CHARRIER-HISAMUDDIN *et al.*, 2008). Segundo Lehrke *et al.* (2009) a MMP-1 é indicador de risco de ruptura de placas calcificadas e não calcificadas, tendo correlação significativa positiva com MMP-9, PCR de alta sensibilidade, triglicérides séricos e índice de massa corpórea. Todavia, esses autores não acharam correlação com LDL-C ou HDL-C nem com outros indicadores de risco.

Mallat (2009) e Laxton *et al.* (2009) discorreram sobre a ação das MMP na aterosclerose, que seria atribuída a uma grande diversidade de processos biológicos concernentes à própria doença, os quais seriam controlados em parte por essas enzimas além de ter consequências divergentes sobre o desenvolvimento da lesão e sobre a estabilidade da capa fibrosa. Em relação à MMP-8, Mallat (2009) afirmou que esta MMP está precocemente envolvida no processo aterogênico, com elevação gradativa dos níveis séricos ao longo da progressão da doença. Além da MMP-9, as MMP-12 e 15 estão envolvidas na morfogênese e remodelamento tecidual e na progressão da instabilidade da placa, promovendo ruptura vascular seguida de trombose pela ativação da cascata de coagulação (CREEMERS *et al.*, 2001; SCATENA, LIAW, GACHELLI, 2007; PACKARD & LIBBY, 2008; CHARRIER-HISAMUDDIN *et al.*, 2008). Laxton *et al.* (2009) também afirmaram que a MMP-8 apresenta-se em concentrações elevadas associadas à presença de aterosclerose e eventos cardiovasculares desfavoráveis. Sendo que a inativação da MMP-8, em camundongos nocaute (MMP8^{-/-}/apoE^{-/-}), leva à redução da extensão da aterosclerose com diminuição da quantidade de macrófagos e aumento da quantidade de colágeno na lesão aterosclerótica, similar ao que ocorre com a inibição de MMP-1, 3, 13 e 14. Esses mesmos camundongos apresentaram baixos níveis de angiotensina-2 (Ang II) – molécula clivada pela MMP-8 e que é indutora da expressão de moléculas de adesão como a VCAM-1 –, baixa pressão sanguínea, diminuição da expressão de moléculas de adesão celular-1 (VCAM-1) e redução do recrutamento vascular de leucócitos. A análise funcional do gene da MMP-8, em uma população de pacientes com DAC (estudo prospectivo de coorte com n=2000, Estudo de Bruneck, Itália, 1990) demonstrou que há associação entre a variação do gene e a extensão da aterosclerose em DAC, bem como entre o nível de VCAM-1 plasmática e a progressão da aterosclerose.

Xin *et al.* (2004) disseram que a MMP-9 desempenha papel significativo no progresso da degradação da matriz em placas ateroscleróticas. Comprovaram que a expressão de MMP-9 em placas instáveis é muito maior do que nas estáveis, principalmente ao redor do núcleo lipídico onde há concentração de macrófagos e células espumosas. Schwartz *et al.* (2007) confirmaram que a MMP-9 tem participação crítica no rompimento da placa aterosclerótica e exposição do núcleo (dirupção), porém a participação da MMP-9, assim como a da MMP-3 e da 1, seria protetora, enquanto que a MMP-12 atuaria como desestabilizadora da placa. A ação da MMP-9 é protetora em determinada concentração e até determinado estágio de evolução do ateroma (embora os autores [XIN *et al.*, *ib.*] não informem estes valores), contudo, em um momento crítico, a concentração tecidual da MMP-9 aumenta e passa a promover a ruptura da placa. Já segundo Welsh *et al.* (2008) a lesão aterosclerótica induziria produção e ativação local da MMP-9 que, por sua vez, desencadearia a ruptura de placas vulneráveis. Essa MMP também modificaria a concentração local da interleucina-8 (IL-8), incentivando a infiltração celular e crescimento do núcleo necrótico. Esses eventos aumentariam as chances de uma isquemia trombótica devido à diminuição da força mecânica da capa fibrosa. O estudo Welsh *et al.* (*ib.*) determinou que os níveis séricos da MMP-9 estão associados ao maior risco de doença coronária (baixo risco de 70 a 555 ng/mL, médio de 358 a 872 ng/mL e alto risco de 873 a 3500 ng/mL). Yasmin *et al.* (2005) demonstraram que a MMP-9 e a 2 apresentam níveis séricos aumentados em doentes com hipertensão sistólica e/ou arteriosclerose arterial se comparado com indivíduos saudáveis. Concomitantemente, vários autores consideraram a MMP-9 um fator preditivo de doença cardiovascular provocada por aterosclerose, incluindo infarto do miocárdio, junto com MMP-1 e 2, TIMP-1 e 2 (YASMIN *et al.* (*ib.*), ALTMAN, 2003; BLANKENBERG *et al.*, 2003; LUBOS, *et al.*, 2006; CAVUSOGLU *et al.*, 2006; GARVIN *et al.*, 2008; LEHRKE *et al.*, 2009; MAAS e FURIE, 2009; JEFFERISA *et al.*, 2010; HANSSON *et al.*, 2011; GUTTE *et al.*, 2011; TANINDI *et al.*, 2011). Mas, Lubos *et al.* (2006) e Goldhammer *et al.* (2010) não foram capazes de determinar se haveria correlação entre os níveis de MMP-9 circulante e doença coronária obstrutiva ou morte por doença cardiovascular. Romero *et al.* (2008), por sua vez, estabeleceram que a elevação das taxas de MMP-9 circulante está associada com a grande prevalência de estenose de carótida (OR 1,71; $p = 0,032$), bem como a TIMP-1 em pacientes do estudo “*Framingham Offspring*” (EUA) examinados com uso de ultrassonografia duplex de carótidas.

Visando esclarecer a atuação da MMP-9, Murrow *et al.* (2010) verificaram que os níveis plasmáticos dessa MMP, em coortes com risco cardiovascular associado à

aterosclerose, são menores ($33,5 \pm 17,6$ ng/mL, $p < 0,001$) do que em indivíduos saudáveis ($82,4 \pm 40,6$ ng/mL, $p < 0,001$), independente da idade, provavelmente porque esta MMP estaria envolvida na preservação das condições arteriais e manutenção da saúde vascular. Já em casos de câncer da mama, os valores do ponto de corte para MMP-9 e TIMP-1 são respectivamente >50 e >230 ng/mL (WU *et al.*, 2008). Comentários similares foram feitos por Wilson *et al.* (2003), segundo os quais os níveis séricos de metaloproteinases circulantes seriam menores em doentes do que nos controles normais e precedem a formação de lesões em ratos, em particular no caso de aterosclerose, mas também em casos de doenças como hiperinsulinemia e resistência à insulina em ratos. E, dessa forma, concluíram que os níveis reduzidos de MMP levariam ao aumento do acúmulo de proteínas extracelulares de matriz e, então, contribuir para a formação de lesões vasculares precoces. Esses achados são condizentes com Gaubatz *et al.* (2010) que constataram que níveis de MMP específicas (MMP-1, 2, 3, 7, 8 e 9) e TIMP (TIMP 1, 2 e 4) estão associados com o remodelamento das paredes das carótidas e mudanças estruturais relacionadas à ruptura da placa em idosos. Assim como são consonantes com os estudos de Newby (2005), o qual afirma que as MMP-9 e 2 seriam protetoras por atuarem no remodelamento vascular, enquanto que as 1, 3, 7, 8 e 13 seriam danosas por atuarem na degradação da capa fibrosa e indução da ruptura da placa. Por sua vez, Inoue *et al.* (2003) relataram que a ruptura da placa e a trombose são a principal causa de síndrome coronária aguda e infarto do miocárdio. As metaloproteinases estão envolvidas no processo e contribuiriam para a instabilidade da placa aterosclerótica e sua vulnerabilidade. Dentre as metaloproteinases, as MMP-1 e 3 e TIMP-1 teriam especial desempenho nessas doenças e atuariam de forma independente do grau de severidade da doença arterial coronária. Analisando os níveis séricos dessas enzimas, obtiveram os seguintes resultados para amostras de sangue do sino coronário de 60 portadores de doença arterial coronária: MMP-1: $3,74 \pm 3,49$ ng/mL (um vaso), $4,06 \pm 3,36$ ng/mL (dois vasos), $2,78 \pm 2,06$ ng/mL (três vasos); MMP-3: $39,2 \pm 11,3$ ng/mL (um vaso), $36,8 \pm 21,6$ ng/mL (dois vasos), $37,2 \pm 21,9$ ng/mL (três vasos). Os dados demonstraram também que houve correlação significativa positiva entre os valores aferidos para TIMP-1 as MMP-1 e 3. Para essas mesmas MMP e também as 2 e 9, Karapanagiotidis *et al.* (2009) determinaram que os níveis séricos das metaloproteinases são indicadores úteis para doenças de aorta torácica e isquemia miocárdica, através de rápidos exames laboratoriais combinados com exames de imagem. Eles encontraram níveis significativos altos de MMP-3 em pacientes com isquemia aguda do miocárdio comparada à dissecação aguda da aorta ($17,33 \pm 2,03$ ng/mL versus $12,92 \pm 1,01$ ng/ml, $p < 0,05$), enquanto que em controles saudáveis havia baixos níveis de MMP-1 ($1,1 \pm 0,38$ ng/mL versus $2,97 \pm$

0,68 em dissecação aguda da aorta, $3,09 \pm 0,98$ em dissecação crônica, $3,16 \pm 0,51$ em aneurisma da aorta torácica e $4,58 \pm 1,04$ em isquemia aguda do miocárdio, $p < 0,05$). Para a MMP-2, verificaram aumentos significativos dos níveis séricos (dissecação aguda da aorta, $151,62 \pm 6,82$; dissecação crônica da aorta, $172,12 \pm 11,79$; aneurisma, $156,64 \pm 9,16$; isquemia do miocárdio, $180,94 \pm 15,49$; indivíduos saudáveis, $171,37 \pm 11,39$), bem como para a MMP-9 (dissecação aguda da aorta, $412,93 \pm 89,85$; dissecação crônica da aorta, $469,86 \pm 56,57$; aneurisma, $342,97 \pm 74,66$; isquemia do miocárdio, $409,74 \pm 83,35$; indivíduos saudáveis, $400,13 \pm 77,90$).

Ainda sobre a ação da MMP-9 em especial, Kalela (2002) mencionou que há indícios de que essa metaloproteinase participa do processo inflamatório da aterosclerose, lesões arteriais e doenças coronárias do coração, bem como de outras doenças como artrite, asma e câncer, com aumento considerável de suas taxas. No caso da DAC, haveria altas taxas de MMP-9 tanto no caso de placas estáveis como instáveis. No estudo de Kalela (*ib.*), com 80 pacientes (61 DAC e 19 controles), foram encontrados os seguintes índices de MMP-9: DAC II – $54,2 \pm 29,9$ ug/L; DAC III – $50,6 \pm 23,1$ ug/L (NS), porém, em pacientes com agravo da doença (DAC em 3 ou mais artérias) os níveis de MMP-9 se mostraram significativos ($57,3 \pm 39,1$ ug/L, $p = 0,001$) em relação aos controles ($32,2 \pm 16,1$ ug/L, $p = 0,007$). Kalela (*ib.*) concluiu que a concentração sérica de MMP-9 pode derivar da vasculatura e refletir a inflamação arterial, aventando a possibilidade de os índices de MMP-9 serem usados para aferir a extensão da inflamação arterial e da aterosclerose. Por seu lado, o estudo de Vlachopoulos *et al.* (2005) com uma população de indivíduos saudáveis ($n=100$) usou MMP-9 como marcador de inflamação induzida por vacinação com polissacarídeo capsular de *Salmonella typhi* e verificou (por ELISA) que houve aumento significativo na produção dessa metaloproteinase (135 ng/mL; $p < 0,01$, após 8h da vacinação) em relação ao grupo controle (vacinado com salina, 64 ng/mL; $p < 0,05$, após 8h).

Todavia, não há consenso entre diversos autores, sobre a validade ou não dos dados obtidos através de mensurações dos níveis de metaloproteinases obtidas de amostras de soro ou de plasma. Tanus-Santos e Gerlach (2005) disseram que, em estudos sobre arteriosclerose aórtica, não há correlação entre os níveis séricos e plasmáticos de MMP-9, e, embora as análises dos níveis plasmáticos dessa metaloproteinase, após a separação do plasma tratado com diferentes anticoagulantes e do soro, mostrem resultados significativos, isso seria devido a concentrações artificialmente aumentadas. Van der Watt e Berman (2005) verificaram que as condições pré-analíticas afetam a mensuração das concentrações (plasmáticas e séricas) de MMP-2 e MMP-9 circulantes, sendo que normalmente os anticoagulantes (EDTA, heparina e

citrato) aumentariam os níveis plasmáticos de MMP-9 e reduziriam os níveis de MMP-2. Após avaliações por ELISA, concluíram que o melhor anticoagulante a ser usado na coleta de plasma seria o citrato, pois evita a liberação de collagenases pelas células sanguíneas e reduz o efeito do tempo, mesma conclusão de Mannello (2008). Ferretti *et al.* (2006), em estudos sobre câncer, reforçam o paradigma de que não há correlação entre os níveis séricos e plasmáticos de MMP-9, além disso, esta metaloproteinase seria instável, grandemente variável na população e refletiria a liberação de proteinases pelos leucócitos durante a coleta do sangue. Ao mesmo tempo, consideram que mesmo que haja alguma correlação entre os valores séricos e plasmáticos de MMP-9, isso não implicaria necessariamente numa correlação com a atividade tecidual dessa collagenase.

Por outro lado, Nikkola *et al.* (2005) afirmaram que as MMP-1, 9 e 13 desempenham importantes papéis no desenvolvimento de diferentes fases do câncer de mama, e que os níveis séricos de MMP-9, em especial, teria alto valor clínico para identificar pacientes com alto risco de progressão. Também afirmam que há dezenas de publicações que confirmam que há correlação segura e significativa entre os níveis séricos e plasmáticos das MMP. Quanto às concentrações de MMP-9 que poderiam estar artificialmente aumentadas, o autor considera que o uso clínico dos valores séricos da MMP-9 seria muito útil para o acompanhamento clínico e individual do desenvolvimento da doença (câncer), apoiado em outros exames.

Vihinen (2005) respondeu às críticas feitas por Tanus-Santos e Gerlach (2005) e reafirmaram as conclusões de Nikkola *et al.* (2005). Porém, Gerlach *et al.* (2007) rebateram novamente e confirmaram que o nível sérico de MMP-9 é artificialmente maior nas amostras independentemente do tipo de anticoagulante que foi utilizado (EDTA, citrato ou heparina), embora haveria um aumento consideravelmente maior com o uso de EDTA. Esse aumento nos níveis de MMP-9 seria devido a sua liberação por parte de leucócitos e plaquetas durante a obtenção das amostras. Ao mesmo tempo, a avaliação dos níveis de MMP-9 por meio de zimografia realmente refletiria a ação da MMP-9 circulante. Por outro lado, recomendam que a mensuração dos níveis de MMP-9 seja feita com uso de plasma com heparina ou citrato e não recomendam o uso de soro porque os níveis dessa metaloproteinase seriam artificialmente maiores e não haveria correlação com as taxas plasmáticas, independente de quão rápida seja feita a separação entre soro e plasma. Essas conclusões corroboram Tanus-Santos e Gerlach (2005) e contradizem Nikkola *et al.* (2005) e Vihinen (2005).

Outras contraposições de ideias são apresentadas por Aharinejad *et al.* (2007) consideraram que no caso de transplantados cardíacos apresentam níveis séricos aumentados de MMP-8, MMP-9 e TIMP-1 após duas semanas decorridos do transplante, enquanto que o

aumento da MMP-1 é observado após três semanas. Dessa forma, concluem que essas metaloproteinases estão envolvidas nas reações ao transplante ou no processo imunológico de adaptação do receptor, mas que novos estudos são necessários para avaliar a relação entre os níveis séricos das MMP e TIMP e as condições clínicas pós-transplante. De encontro a essas postulações, Jung (2008) criticou o trabalho de Aharinejad (2007) e informou que as condições pré-analíticas interferem na mensuração das concentrações verdadeiras de MMP e TIMP circulantes no sangue periférico. No caso de amostras de coletas sem o uso de anticoagulantes adequados, normalmente há concentrações aumentadas para MMP-1, 8 e 9 e TIMP-1, se comparadas com aquelas tomadas com o uso de heparina e citrato adicionados ao plasma. Bem como o tempo entre a coleta e a centrifugação da amostra, também afetaria a mensuração, aumentando os valores das concentrações. Jung (2008), afirmou ainda que a liberação dessas enzimas por parte de leucócitos e plaquetas, sem o uso de anticoagulantes, resulta em níveis séricos aumentados das MMP e suas concentrações não corresponderiam à verdade. Respondendo às críticas de Jung (2008), Aharinejad (2008) assegurou que o método padrão usado para coleta da amostra (coletar o sangue e antes de 30min proceder à centrifugação do sangue por 15 min a 1000 G e estocagem das amostras de soro a -80° C), evita o aumento artificial da concentração sérica de MMP, bem como contesta a informação de que não haveria correlação entre os níveis sérico e plasmático de MMP porque outros autores (NIKKOLA *et al.*, 2005; SUZUKI *et al.*, 2008) asseguraram que essa correlação existe. Da mesma forma, Wu *et al.* (2008) acharam que há correlação significativa entre os níveis séricos e teciduais de MMP-9 e TIMP-1.

Fatás *et al.* (2008) também investigaram o impacto dos procedimentos pré-analíticos (em especial o método de coleta) na mensuração dos níveis séricos das MMP (1, 2, 3, 7, 8, 9, 12 e 13) conjugados e não conjugados com TIMP-1, com amostras preparadas e não preparadas com citrato, EDTA e heparina. Os autores concluíram que o uso de soro deve ser evitado para a avaliação de MMP-1, 8 e 9, mas é válido para MMP-2, 3 e 7, que apresentam valores similares com aqueles achados nas amostras de plasma com heparina ou citrato, sendo este último anticoagulante o mais indicado para o procedimento.

2.7. Justificativa

As doenças arteriais do coração, incluindo a doença carotídea aterosclerótica (DCA), apresentam evidente importância relacionada ao risco de AVC, outras isquemias e trombozes como o acidente isquêmico transitório e infarto agudo do miocárdio, bem como associação

com a aterosclerose coronária e de outras artérias, o que pode ser agravado pela presença de lipoproteínas aterogênicas provenientes de dislipidemias e modificações moleculares como acetilação, glicação, nitração e oxidação de componentes estruturais das partículas lipoproteicas. Essas alterações interferem no processo de remoção do colesterol dos tecidos, bem como do plasma, e nas vias de transferência e incorporação de colesterol nas lipoproteínas. Isso resulta no acúmulo de lipoproteínas modificadas no plasma, iniciadoras da aterosclerose por agressão endotelial, captura dessas moléculas e de complexos moleculares por diversos receptores (e.g. *scavengers*, CD36) relacionados ao processo aterogênico. As metaloproteinases desempenham papel importante no desenvolvimento desses processos inflamatórios vasculares, incluindo invasão celular no endotélio e a formação da placa do ateroma ao estimular a liberação de citocinas por células inflamatórias (macrófagos, linfócitos T), afetando a integridade da placa e sua estabilidade, promovendo sua ruptura em alguns casos.

Com base nisso, este estudo visou avaliar a concentração (relação com a absorbância) plasmática de metaloproteinases de matriz e a incorporação de colesterol nas lipoproteínas plasmáticas como indicadores de risco cardiovasculares em pacientes com e sem DCA determinada por exames de ecografia com doppler, relacionando os dados a outros fatores de risco tradicionalmente usados.

3 Metodologia

3.1 Desenho do Estudo e Casuística

A pesquisa baseou-se em estudo de corte transversal desenvolvido em cooperação entre o Hospital Naval de Salvador, os Laboratórios Especializado em Pesquisa da Faculdade de Farmácia e o Laboratório Central do Hospital Universitário Professor Edgar Santos da UFBA. A amostra populacional foi selecionada por conveniência no Hospital Naval de Salvador, composta inicialmente de 171 pessoas, moradores de Salvador, entre 18 e 80 anos. Destes, 65 pacientes iniciaram no estudo, sendo que o protocolo completo com realização de testes de ELISA e zimografia foi realizado em apenas 39 participantes devido à falta de amostras para concluir os experimentos. Todos os participantes foram informados e concordaram com o estudo, assinando o Termo de Consentimento Livre e Pré-Esclarecido.

3.2 Protocolo Inicial

Para identificação da presença de placa carotídea nos pacientes, foram realizados exames por imagem no serviço de Bio-imagem e ecografia vascular do Hospital Naval de Salvador, ainda com o intuito de classificar as placas e irregularidades ateroscleróticas. Os exames laboratoriais de rotina e especializados foram realizados nos Laboratórios de Bioquímica Clínica, SIDI e DILDA do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia e no Laboratório Central do Complexo HUPES – UFBA.

Para a seleção dos indivíduos atribuiu-se os seguintes critérios:

3.2.1 Critérios de inclusão

- Ambos os sexos;
- Pacientes do ambulatório do Hospital Naval de Salvador e não internados;
- Termo de consentimento assinado, após informação, em realizar o estudo;
- Realização do doppler de carótidas após determinação do perfil lipídico;

- Perfis lipídicos independentes dos valores normais de referência, mesmo em portadores de diabetes mellitus, hipertensão arterial, hipotireoidismo ou dislipidemia, em uso ou não de medicamentos.

3.2.2 Critérios de exclusão

- Pacientes hospitalizados por qualquer motivo;
- Presença de patologias de temporalidade aguda;
- Não consentimento em participar da pesquisa;
- Indivíduos portadores de disfunção renal (creatinina sérica > 2,0 mg/dl) e ou síndrome nefrótica (proteinúria > 3,0 g/l e albumina sérica < 3,0 g/l).
- Aqueles que por qualquer motivo não realizaram doppler vascular.
- Evidência clínica ou laboratorial de qualquer doença crônica como hepatopatia doenças do tecido conjuntivo e neoplasias.

3.3 Avaliação clínica e de imagem

3.3.1 Anamnese

A equipe médica do serviço de Bio-imagem e ecografia do Hospital Naval de Salvador realizou a anamnese por exame clínico padrão, registro e tempo decorrido das queixas, bem como avaliação da evolução da doença. Os pacientes foram questionados sobre doença coronária isquêmica, diabetes mellitus, acidentes vasculares cerebrais (AVC) e ataque isquêmico transitório (AIT), hipertensão arterial sistêmica, hipotireoidismo, insuficiência renal, dislipidemia, etilismo, tabagismo e atividade física, e ainda sobre quaisquer medicamentos de uso regular para uma das causas citadas. As informações foram dadas pelo próprio paciente ou pelo seu responsável direto.

3.3.2 Metodologia de ultrassonografia de carótidas

A equipe médica realizou o exame de ecografia vascular das artérias carótidas dispondo os pacientes deitados (posição supina), com a cabeça flexionada em 45° para o lado a ser examinado, junto ao aparelho. As artérias carótidas foram avaliadas bilateralmente, por

um único examinador, através de um aparelho de ultrassonografia de alta resolução no modo B (aparelho de ultrassom *Envisor C serie M2540A, PHILLIPS Medical Systems*) conectado a um transdutor linear de 7,5 Mhz, preferencialmente a profundidade padrão de 4 cm. O registro longitudinal das imagens foi obtido no nível da artéria carótida comum, sincronizada à diástole, especificamente na onda R do eletrocardiograma.

3.3.3 Classificação das lesões estenóticas

Adotaram-se as normas *North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial* (NASCET) (RANDOUX *et al.*, 2001, LEPORE *et al.*, 2001) para determinação do grau de estenose desenvolvido pelas placas de atheroma nas artérias carótidas, que se resumem em:

- Grau I (normal);
- Grau II ou estenose leve (entre 1% e 29%);
- Estenose moderada, nos graus III (entre 30% e 49%) e IV (entre 50% e 69%);
- Estenose grave, no grau V (entre 70% e 99%);
- Oclusão, no grau VI (100%).

3.4 Determinações Laboratoriais

3.4.1 Laboratório Clínico

No Laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Farmácia da UFBA foram determinadas, antes dos estudos de incorporação de CL-³H *in vitro*, as concentrações de colesterol total (CT), suas frações e triglicérides (TG), em amostras de soro obtidas após 12 horas de jejum, em tudo seco para soro e EDTA para o plasma após centrifugação em até 30 min após a coleta, por métodos enzimáticos (Labtest, Brasil). O HDL colesterol (HDL-C) foi determinado por método direto homogêneo (HDL-C Direto Labtest®, em equipamento automatizado *LabMax 240*, Labtest, Brasil.). As concentrações do colesterol de VLDL e LDL foram calculadas pela fórmula de Friedewald (1972) ($LDL-C = CT - (VLDL-C + HDL-C)$), em mg/dL para valores de TG até 150 mg/dL. Amostras com TG superior a 150 mg/dL tiveram suas determinações de LDL-C realizadas por método homogêneo. Os resultados foram validados através da utilização, durante cada determinação, de amostra controle fornecida

pelo Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ), da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas.

3.4.2 Laboratório de Pesquisa

3.4.2.1 Incorporação de Colesterol Livre (CL) na HDL

A incorporação de CL foi realizada utilizando-se o método de substrato exógeno (STENDER e HJEIMS, 1988; STOKKE e NORURN, 1971; FEITOSA-FILHO *et al.*, 2009), *in house* modificado. Biomoléculas marcadas radioativamente com colesterol livre (CL-³H), cerca de 5µL foram adicionadas a 500µL de plasma por 4 horas sob incubação à 37° C, gerando atividade isotópica final de 0,7 microCi/mL. Decorrido o tempo, as lipoproteínas contendo apoB foram precipitadas (sulfato de dextran 0,2%/ MgCl₂ 3M, v/v), seguido de centrifugação por 10 minutos a 3.000 rpm em centrífuga refrigerada (Sirius 4000, Sieger, Brasil) e, depois, foi feita a coleta do sobrenadante para determinação da radioatividade por cintilação líquida, utilizando alíquotas de 250µL do sobrenadante acrescida da solução cintiladora *Ultima Golg*, no aparelho *Multilabel Detectiton Plataform* (Hidex Chamaleon), para contagem de cintilação nas amostras. As incorporações de CL foram expressas como percentagem de CL-³H incorporados por hora na HDL, expresso em percentual CPM (%) incorporado/h em relação à radioatividade total adicionada.

3.4.2.2 Determinação da Atividade de Paraoxonase

Para determinação da atividade da PON1 foi utilizado o método descrito por Mackness *et al.* (1998) e Senti *et al.* (2003), que utiliza paraoxon, com algumas adaptações (CHARLTON-MENYS, LIU e DURRINGTON *et al.*, 2001). Adicionou-se 140µL de tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,05 contendo 2mMol/L de CaCl₂ e 1,1mMol/L de paraoxon (*Sigma Chemical Co.*) a 7µL de soro de cada amostra, distribuída em placa de 96 poços de fundo chato em duplicata. A leitura foi feita em comprimento de onda de 405nm e temperatura de 37°C utilizando leitora de microplacas (*Microplate Reader*, Benchmark, BioRad). Para cálculo da atividade, foram feitas seis leituras em intervalo de 1,0 minuto cada, sendo o resultado obtido multiplicando-se a média da variação das absorbâncias pelo fator.

Fator = VTR (mL)/ ε₄₀₅ x VA (mL) x E (cm) , onde:

- VTR - Volume total da reação
- VA - Volume da amostra
- E - Espessura da cubeta
- ϵ_{405} - $1805 \text{ L M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Logo, atividade da Paraoxonase é igual a: Fator x $\Delta\text{abs}/\text{min}$

3.4.2.3 Determinação da concentração de apoA e apoB

As concentrações de apoA e apoB foram determinadas por nefelometria cinética (WEINSTOCK *et al.*, 1981). Neste método determina-se a taxa de aumento da dispersão da luz causada por partículas em suspensão (numa solução) provenientes dos complexos formados durante uma reação antígeno-anticorpo. Utilizou-se o equipamento automatizado *Beckman Coulter – Image* (Beckman, EUA).

3.4.2.4 Zimografia (Eletroforese em gel de acrilamida copolimerizado com gelatina)

A capacidade proteolítica das enzimas séricas foi avaliada e caracterizada por SDS-PAGE, em gel a 10% (LAEMMLI, 1970) copolimerizados com gelatina a 0,1% (HEUSSEN e DOWDLE, 1980). A separação eletroforética dos soros dos pacientes foi executada pelo método de Laemmli (1970) com adaptações (SNOEK-van BEURDEN e Von den HOFF, 2005; LA ROCCA *et al.*, 2004), utilizando cubas verticais (*Electrophoresis Mini-Protean Tetra Cell System – BioRad*) e fonte (*PowerPac Universal HP Power Supply – BioRad*). Após a eletroforese, o gel foi lavado duas vezes com Triton X-100 a 2,5% em Tris-HCl 50 mM contendo CaCl_2 5mM, ZnCl_2 1 μM em pH 7,6 por 1h à temperatura ambiente, para eliminar o SDS e renaturar as proteínas. Depois, o gel foi incubado em Tris-HCL contendo CaCl_2 5mM, ZnCl_2 1 μM em pH 7,6 *overnight* ($\pm 12\text{h}$) a 37°C em estufa, para permitir a digestão enzimática da gelatina. Em seguida, o gel foi corado com *Coomassie blue G-2500* a 0,5% em metanol: ácido acético (30:10, v/v) por 1h30min e descorado com o mesmo solvente (*overnight*) sem o corante. A atividade proteásica foi visualizada como uma zona clara onde foi incorporado o substrato (*e.g.* gelatina) que indica digestão da proteína. O peso molecular foi estimado

usando padrões entre 180-6 kDa (Invitrogen – 10748-010, *BenchMark Pre-Stained Protein Ladder*) e entre 220-10 kDa (Invitrogen – 10747-012, *BenchMark Protein Ladder*).

3.4.2.4.1 Estimativa da área digerida por zimografia

Os géis foram fotografados digitalmente a partir do equipamento Lumix (Panasonic® DMC-FS3, Coreia) e analisados com o programa *ImagJ 1.41o* (Wayne Rasband, *National Institutes of Health, USA*), conforme procedimento segundo Fiotti *et al.* (2008), para cálculo da área digerida, por densiometria, no gel de zimografia para cada um dos pacientes estudados.

3.4.2.5 ELISA (Ensaio de ligação imunoenzimático)

Por meio de ELISA, avaliou-se a presença de metaloproteinases de matriz no soro dos pacientes. Analisaram-se as metaloproteinases 1, 2, 8, 9 e 12. As MMP-2 e MMP-9 foram usadas para o experimento porque são aquelas mais citadas na literatura; as MMP-1, 8 e 12, por causa da hipótese de participarem da ação remodeladora dos vasos ou de progressão da lesão aterosclerótica.

O método de ELISA tipo sanduíche foi adaptado de Prakobwong *et al.*, (2009) da seguinte forma: o anticorpo anti-MMP foi diluído em tampão TCB pH 9,6, aplicado em placa com 96 poços e mantido a 4°C *overnight*, em seguida, foi realizada a lavagem da placa com PBS-Tween (0,05%), aplicou-se 200µL de PBS+BSA (1%) por poço e incubou-se à temperatura ambiente por 2h, para então distribuir as amostras na placa para incubação por 2h a 37°C, lavou-se novamente com PBS-T e aplicou-se outra vez o anticorpo diluído em PBS+BSA 0,5%, com nova incubação por 1h a 37°C e lavagem com PBS-T. Após essas etapas, adicionou-se o anticorpo secundário *Biotinilated Link Universal* (DAKO) (*IgG anti-mouse* + enzima marcadora HRP - LSAB+System+HRP DAKO, antimouse, peroxidase), mantendo-se por 15 a 30min em temperatura ambiente, finalizando essa etapa, lavou-se com PBS-T e adicionou o conjugado Streptamindin-HRP (DAKO), após lavagem, acrescentou-se o substrato revelador DAB (*Liquid DAB* [diaminobenzidina] e substrato – *Chromogen System*, DAKO) na concentração 20µL/mL. Após 15min e a reação foi interrompida com solução ácida (H₂SO₄ 2N). A leitura da placa foi feita por espectrofotometria em absorbância a 450 nm na leitora de microplacas (*TP-Reader - ThermoPlate*).

3.5 Análise estatística

A análise descritiva dos dados foi realizada a partir da determinação das estimativas de centralidade e dispersão para obtenção de medidas resumo, seguida do teste de normalidade de *Kolmogorov-Smirnov*. Para início das análises estatísticas inferenciais foi realizado o teste de *Grubbs* para a detecção de *outliers*. A estatística inferencial foi seguida de testes paramétricos e/ou não paramétricos em função do tipo de distribuições dos dados em torno da média. Para todos os dados foram considerados significantes as diferenças com nível crítico (p) <0,05 (5%) para intervalo de confiança de 95%.

Os pontos de corte (*cut off*), quando necessários, foram utilizados para estabelecer os parâmetros de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo, a partir da área sob as curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*). O risco relativo (RR) foi calculado a partir de tabelas de contingência, teste de Fisher com aproximação de Katz. Análises de variância, correlação linear e associação também foram realizadas, quando necessário.

Para a análise dos dados foram utilizados os *Softwares GraphPad InStat v.3.05 e GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc., CA, USA)*.

4 Resultados

Apresentam-se, a seguir, os dados referentes à caracterização, histórico social e patológico, análise laboratorial clínica e de imagem, incorporação de partículas lipoproteicas, análise por ELISA e de zimografia em termos percentuais e absolutos, acompanhados das respectivas ilustrações.

Os dados de caracterização e histórico (social e patológico) são apresentados nas Tabelas 01.

TABELA 01 – CARACTERÍSTICAS E HISTÓRICO PATOLÓGICO PREGRESSO			
Característica	DCA n/N(%)	NDCA n/N(%)	Total n/N(%)
Sexo	F 14/31(45)	F 27/34(79)	F 41/65(63)
	M 17/31(55)	M 7/34(21)	M 24/65(37)
Dislipidemia	25/31(81)	20/34(59)	45/65(69)
Hipotireoidismo	6/31(19)	6/34(26)	15/65(23)
Diabetes	20/31(64)	6/34(18)	26/65(40)
Hipertensão	27/31(87)	15/34(44)	42/65(65)
Fumante	12/31(39)	8/34(23)	20/65(31)
Sedentário	19/31(61)	19/34(56)	38/65(58)
Etilismo	29/31(93)	4/34(12)	33/65(51)

DCA - Doença Carotídea Aterosclerótica (indivíduos doentes); n – número.

Os resultados de imagem por doppler dos 65 indivíduos analisados no estudo (Apêndices: Quadros 1 e 2) constituem 24 (36,9%) pessoas do sexo masculino e 41 (63,1%) do sexo feminino. Nestes, constata-se a prevalência de 31 (47,7%) indivíduos com doença carotídea (DCA), dos quais 17 (54,8%) são homens e 14 (45,2%) mulheres.

A composição da amostra por faixa etária, sexo e (Tabela 02) apresenta a maior concentração de indivíduos na faixa etária de 66 a 75 anos, sendo 15 (23%) do sexo feminino e nove do masculino (14%).

Houve maior prevalência de DCA (15 indivíduos) na faixa etária acima dos entre 66 e 75 anos (48%), sendo oito do sexo masculino. Observa-se maior prevalência de DCA nas faixas etárias mais elevadas, entre 45 e 75 anos (26 indivíduos, 84%), mas não houve qualquer indivíduo com DCA na faixa entre 18 e 35 anos. Entre os homens, a prevalência é ligeiramente maior 17 (55%), contra 14 (45%) mulheres, dentre os 31 doentes.

TABELA 02 - DISTRIBUIÇÃO DE PACIENTES SEGUNDO FAIXA ETÁRIA E SEXO

FAIXA ETÁRIA (anos)	M n (%)	F n (%)	TOTAL n (%)
18 – 35	3 (5)	6 (9)	9 (14)
36 – 45	4 (6)	4 (6)	8 (12,3)
46 – 55	3 (5)	9 (14)	12 (19)
56 – 65	3 (5)	5 (8)	8 (12)
66 – 75	9 (14)	15 (23)	24 (37)
80<	3 (5)	1 (2)	4 (6)
TOTAL	24 (37)	41 (63)	65 (100)

n – número de indivíduos; M – masculino; F – feminino.

O perfil clínico da população estudada apresenta os dados das características dos grupos DCA e NDCA quanto ao gênero, doenças preexistentes e hábitos sociais (Tabela 03 nos apêndices).

Dentre os 65 pacientes incluídos no estudo, seguindo os critérios III e IV das Diretrizes da Sociedade Brasileira de Dislipidemias e Aterosclerose (SANTOS, 2001: III DBSD/DPA; SPOSITO, 2007: IV DBSDPA) e o resultado do doppler de artérias carótidas, há 45 (69%) dislipidêmicos no total, dos quais 25 (81%) apresentam evidência com DCA (Tabela 05). Sendo que 26 (40%) tinham diabetes, dos quais 20 (65%) eram portadores de DCA. Quanto à hipertensão há 42 (65%), constituindo 27 (87%) dos indivíduos DCA. O exame com doppler também mostrou que entre os 65 pacientes, 15 (23%) apresentavam hipotireoidismo, sendo que 6 (19%) desses também apresentavam DCA.

Nesse estudo não foi evidenciada ocorrência de indivíduos com o grau V e/ou portadores de oclusão (grau VI), segundo o grau de estenose conforme NASCET (1991).

TABELA 04 – GRAU DE ESTENOSE SEGUNDO CLASSIFICAÇÃO DE NASCET

GRAU DE ESTENOSE	n	%
GRAU I (normal);	34	52
GRAU II (entre 1% e 29%);	16	25
GRAU III (entre 30% e 49%)	8	12
GRAU IV (entre 50% e 69%);	7	11
GRAU V (entre 70% e 99%);	0	0,0
GRAU VI (OCLUSÃO)	0	0,0
Total	65	100

Ao comparar a concentração de colesterol (HDL-C) e a classificação de estenose de carótidas segundo NASCET (Tabela 05), 48 (74%) dos pacientes participantes desta pesquisa tinham HDL-C no intervalo considerado protetor sendo que 34 (52%) estão incluídos no GRAU I (NDCA). Do total, 17 (26%) apresentavam HDL-C \leq 40mg/dl, dos quais 6 (35%) tinham DCA com prevalência no GRAU II. O GRAU III foi o que apresentou maior prevalência (75%) em todos os subgrupos de níveis de HDL-C. Todavia, não foi possível verificar se havia diferenças significativas para as concentrações de HDL-C em relação a grau de estenose devido à perda de seguimento.

TABELA 05- RELAÇÃO DE GRAU DE ESTENOSE E NÍVEL DE HDL-C

GRAU DE ESTENOSE	NÍVEL DE HDL COLESTEROL				TOTAL	
	\leq 40		>40		N = 65	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
GRAU I	6/34	18	28/34	82	34	52
GRAU II	6/16	38	10/16	62	16	25
GRAU III	2/8	25	6/8	75	8	12
GRAU IV	3/7	43	4/7	57	7	11
GRAU V	0	0	0	0	0	0,0
GRAU VI (OCLUÍDO)	0	0	0	0	0	0,0

A análise dos dados de incorporação de CL-³H na HDL (Figura 07) apresentou diferenças entre os grupos com desenvolvimento de DCA e NDCA indicado por doppler ($p = 0,0208$, teste T não pareado).

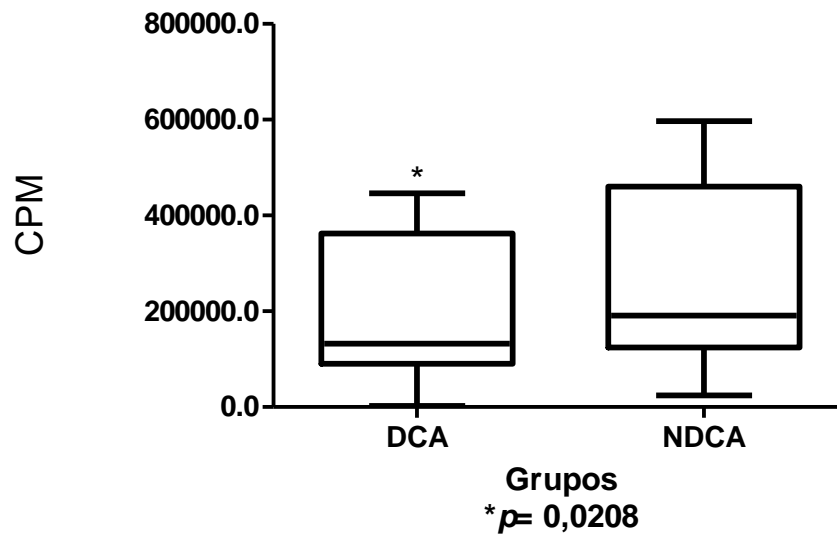


Figura 07 – Incorporação de CL na HDL

O resultado dos exames de doppler, avaliados junto à concentração de HDL-C, mostra que a concentração de HDL tem papel importante na DCA (Tabela 05). Dentre os 65 pacientes (100%), 31 (48%) apresentam DCA, dos quais 20 (65%) tinham índices de HDL-C considerados protetores enquanto que 11 (35%) tinham DCA com baixos níveis de HDL-C. Dentre os NDCA, 28 (82%) tinham índices protetores de HDL-C e seis (18%), não.

A análise de correlação linear foi significativa apenas para os dados de contagem por minuto (CPM) de incorporação de $CL^{-3}H$, HDL-C e a razão HDL-C/apoA no grupo NDCA (Tabelas 06 e 07 e Apêndices: Tabela 14).

TABELA 06 - DADOS DA ANÁLISE DE CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE A CONTAGEM POR MINUTO (CPM) DE INCORPORAÇÃO DE $CL^{-3}H$, PERFIL LIPÍDICO, APOPROTEÍNAS DE RISCO CARDIOVASCULAR E ÍNDICES CALCULADOS NO GRUPO NDCA.

CL-³H	apo A	apo B	HDL-C	TG	TG/HDL-C
(n)	19	19	34	34	34
r	-0,014	0,06	-0,330	0,09	0,022
P	NS	NS	0,0606*	NS	NS

* Correlação linear de Pearson; dados com distribuição paramétrica; foi realizado teste de *outlier* (teste de Grubbs) para os dados de $CL^{-3}H$.

TABELA 07 - DADOS DA ANÁLISE DE CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE A CONTAGEM POR MINUTO (CPM) DE INCORPORAÇÃO DE CL-³H, PERFIL LIPÍDICO, APOPROTEÍNAS DE RISCO CARDIOVASCULAR E ÍNDICES CALCULADOS NO GRUPO NDCA.

CL- ³ H	LDL-C	LDL-C/apoB	HDL-C/apoA	apoA/apoB	Não-HDL-C	LDL-C
(n)	34	18	19	19	28	34
r	0,157	-0,040	0,511	-0,3161	-0,204	0,157
P	NS	NS	0,0254*	NS	NS	NS

* Correlação linear de Pearson; dados com distribuição paramétrica; foi realizado teste de *outlier* (teste de Grubbs) para os dados de CL-³H.

A análise de correlação linear entre os dados de incorporação de CL-³H, PON1 e MMP não foi significativa (Tabela 08).

TABELA 08 - DADOS DA ANÁLISE DE CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE A CONTAGEM POR MINUTO (CPM) DE INCORPORAÇÃO DE CL-³H, PON1 E MMP NO GRUPO NDCA.

CL- ³ H	PON1	MMP1	MMP2	MMP8	MMP9	MMP12
(n)	18	17	17	17	17	17
r*	-0,262	-0,048	0,021	-0,100	0,129	-0,176
P	NS	NS	NS	NS	NS	NS

* Correlação linear de Pearson; dados com distribuição paramétrica; foi realizado teste de *outlier* (teste de Grubbs) para os dados de CL-³H.

A análise de correlação linear não foi significativa entre os dados de contagem por minuto (CPM) de incorporação de CL-³H e os parâmetros de avaliação de risco cardiovascular no grupo DCA. Por outro lado a análise de correlação linear foi positiva entre a MMP1 e HDL-C (n=22; r=0,6175; p=0,002, Pearson) e entre MMP9 (n=20; r=0,5104; p=0,0215, Pearson). Houve também correlação linear negativa entre MMP9 e apoB (n=20; r=-0,4574; p=0,0426, Pearson), e positiva com MMP1 (n=20; r=0,5104; p=0,0215, Pearson) e CMV-IgG (n=24; r=0,6196; p=0,0012, Pearson). Por outro lado não foram observados resultados de correlação linear significativa com os demais parâmetros de avaliação de risco cardiovascular estudados no grupo DCA.

No grupo NDCA, a análise de correlação linear foi significativamente negativa entre a MMP1 e TG (n=19; r=-0,4782; p=0,0383, Pearson). Não houve correlação linear entre a MMP1 e os parâmetros de avaliação de risco cardiovascular nesse grupo. Em relação a

MMP12 no grupo NDCA, foi observada correlação linear positiva com a MMP1 ($n=19$; $r=0,5193$; $p=0,0227$, Pearson).

A análise de variância seguida do teste de Tukey-Kramer foi utilizada para a comparação de parâmetros de avaliação de risco cardiovascular utilizados neste estudo para os grupos DCA e NDCA, conforme Tabela 09, após realização de análise descritiva, teste de normalidade e *outlier* (teste de Grubbs).

TABELA 09 - DADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA E TESTE DE COMPARAÇÃO MÚLTIPLA ENTRE OS PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DE RISCO CARDIOVASCULAR UTILIZADOS NESSE ESTUDO PARA OS GRUPOS DCA E NDCA.

CL- ³ H DCA vs CL- ³ H NDCA	apoA DCA vs apoA NDCA	apoB DCA vs apoB NDCA	HDL-C DCA vs HDL-C NDCA	TG DCA vs TG NDCA	TG/HDL-C DCA vs TG/HDL-C NDCA
*0,0549	**0,001	**0,001	NS	NS	NS

LDL-C DCA vs LDL-C NDCA	LDL-C/apoB vs LDL-C/apoB	HDL-C/apoA DCA vs HDL-C/apoA NDCA	apoA/apoB DCA vs apoA/apoB NDCA	não-HDL-C DCA vs não-HDL-C NDCA
NS	NS	NS	NS	*0,0632

* Valor exato do nível descritivo (p) e ** valor aproximado. Intervalo de confiança de 95%.

Para a estimativa de tamanho de partículas de LDL foi utilizada a razão TG/HDL-C (MARUYAMA *et al.* 2003). A análise mostrou diferença significativa entre os grupos (Figura 08) ($p = 0,0366$; teste T não pareado), todavia, a razão LDL-C/apoB (Figura 09) não mostrou diferença, assim como as razões HDL-C/apoA (Figura 10) e apoA/apoB (Figura 11 nos Apêndices).

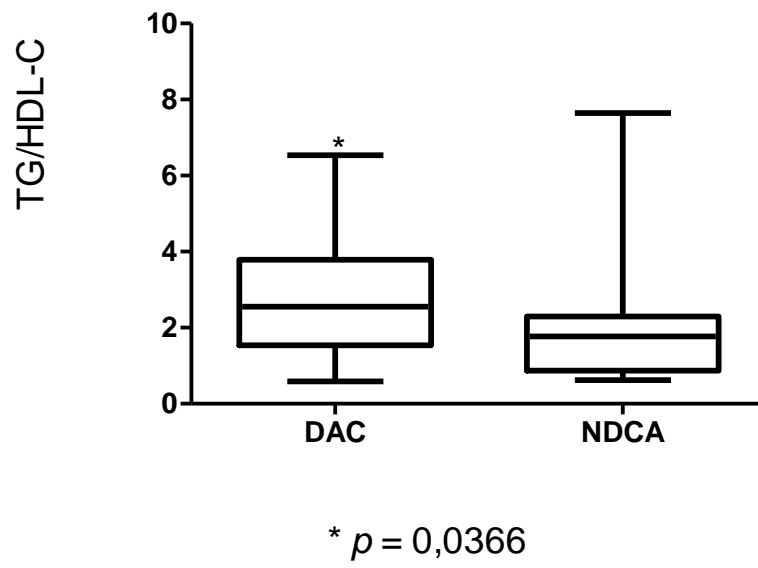


Figura 08 – Razão TG/HDL-C: estima que quanto maior o valor da razão, menor é o tamanho da partícula de LDL.

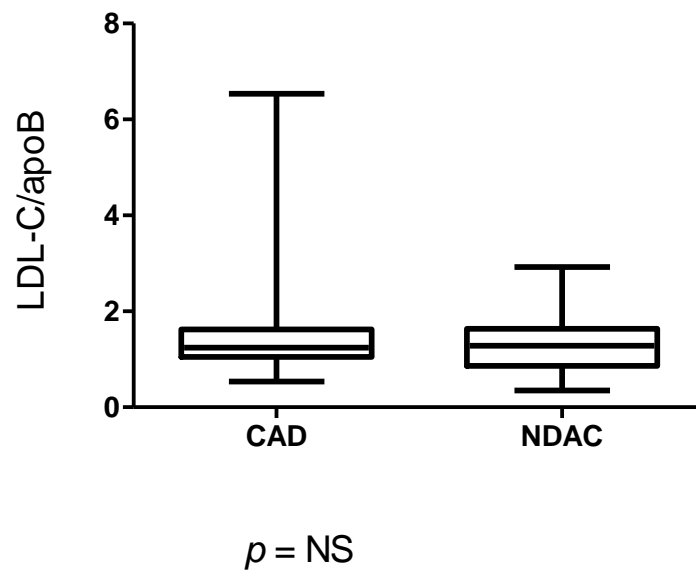


Figura 09 – Razão LDL-C/apoB

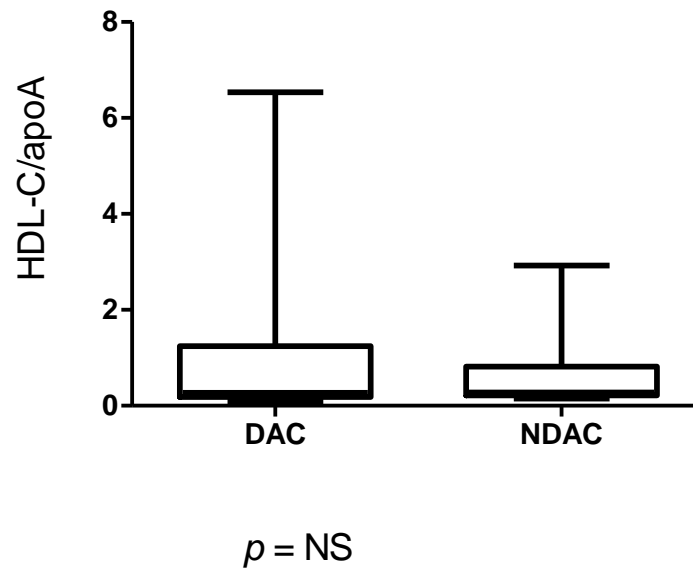


Figura 10 – Razão HDL-C/apoA

Avaliação da atividade da Paraoxonase

A comparação entre os dados obtidos da determinação da atividade da PON1 entre os grupos DCA (n=20) e NDCA (n=19) não diferiu ($p=0,7927$, teste t de Student) (Figura 12 nos Apêndices).

Análise das metaloproteínas de matriz por ELISA

Os dados da comparação múltipla entre as densidades ópticas (ABS) obtidas dos testes de ELISA das metaloproteínas são apresentados na Tabela 10.

TABELA 10 - DADOS DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA E TESTE DE COMPARAÇÃO MÚLTIPLA ENTRE AS DENSIDADES ópticAS (ABS) OBTIDAS DOS TESTES DE ELISA DAS METALOPROTEÍNASES PARA OS GRUPOS DCA E NDCA.

MMP1	MMP2	MMP8	MMP9	MMP12
NS	<0,01*	NS	<0,05*	NS

* Valor exato do nível descritivo (p). Intervalo de confiança de 95%. ABS – absorbância.

Os testes de ELISA mostraram que somente as MMP-2 e MMP-9 são significativas para a DCA, na casuística deste estudo. Os valores da densidade óptica (DO), mensurada pela absorvância (ABS), de MMP-2 ($p = 0,0246$ teste de Mann-Withney) e MMP-9 ($p < 0,0001$ teste de Mann-Withney) na amostra dos DCA são maiores do que nos NDCA (Figuras 13 e 14). Não houve diferenças significativas entre os grupos DCA e NDCA para as DO das MMP-1, 8 e 12 (Figuras 15, 16 e 17).

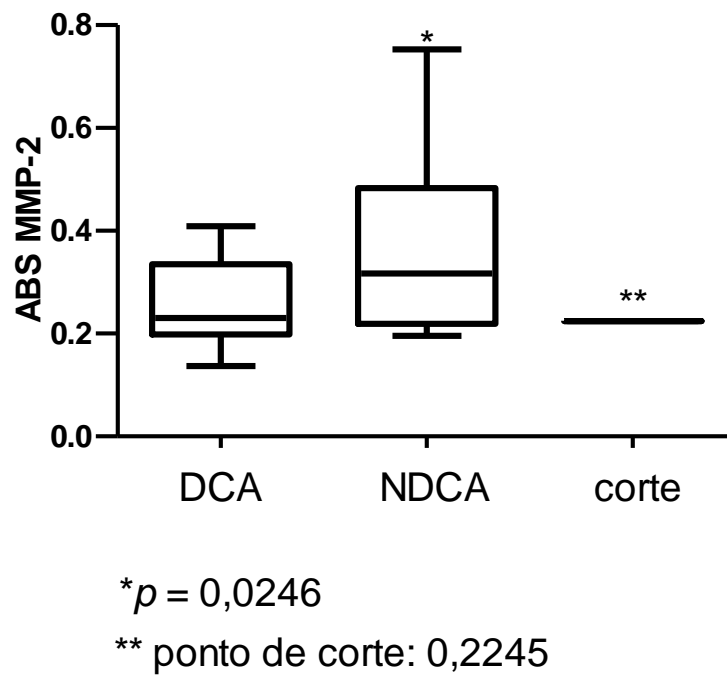


Figura 13 – Comparação da ABS por ELISA para MMP-2 entre os grupos DCA e NDCA em função do ponto de corte.

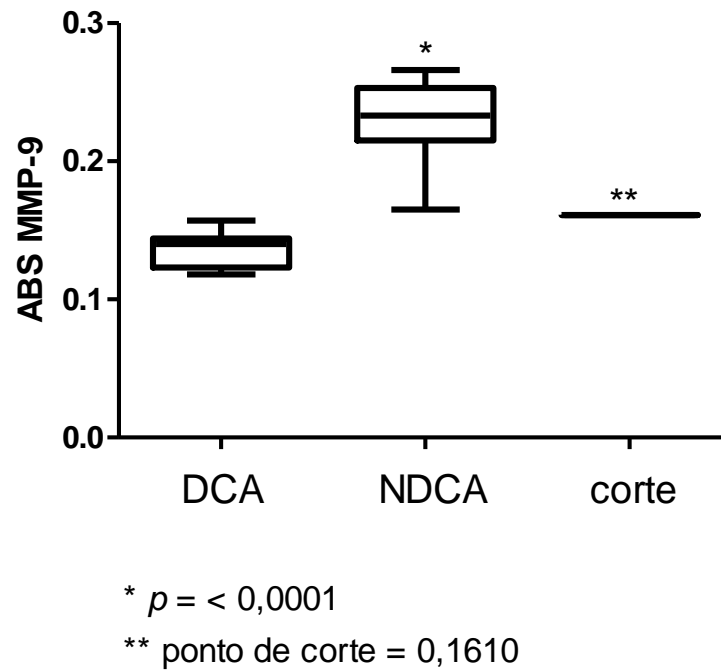


Figura 14 – Comparação da ABS por ELISA para MMP-9 entre os grupos DCA e NDCA em função do ponto de corte.

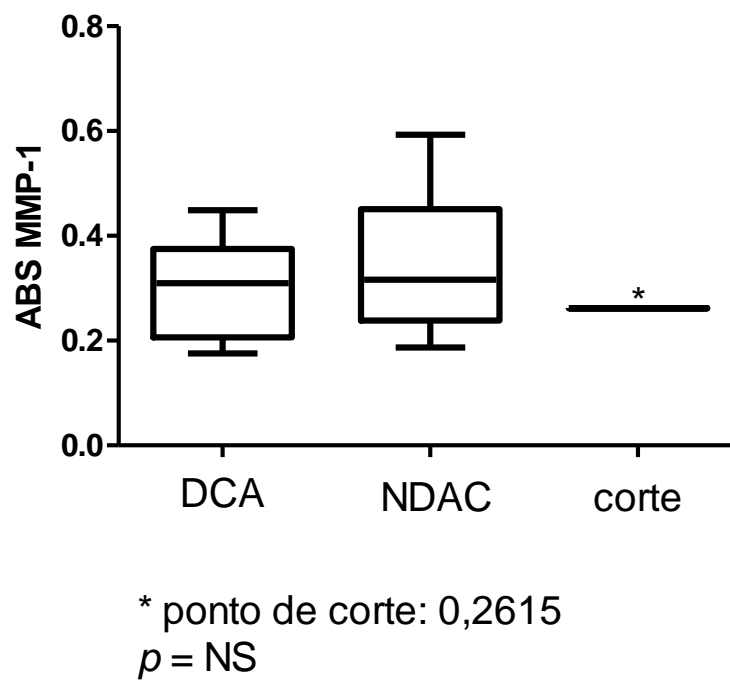


Figura 15 – Comparação da ABS por ELISA para MMP-1 entre os grupos DCA e NDCA em função do ponto de corte.

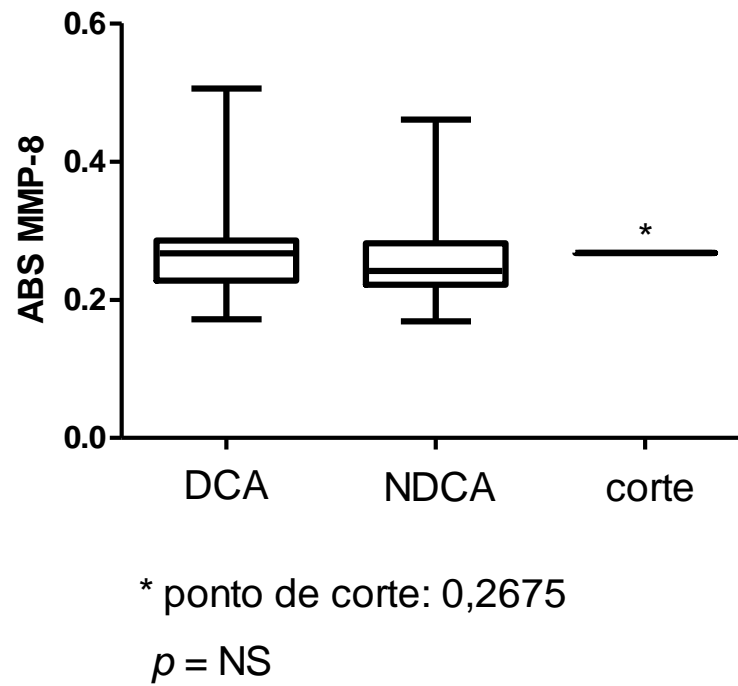


Figura 16 – Comparação da ABS por ELISA para MMP-8 entre os grupos DCA e NDCA em função do ponto de corte.

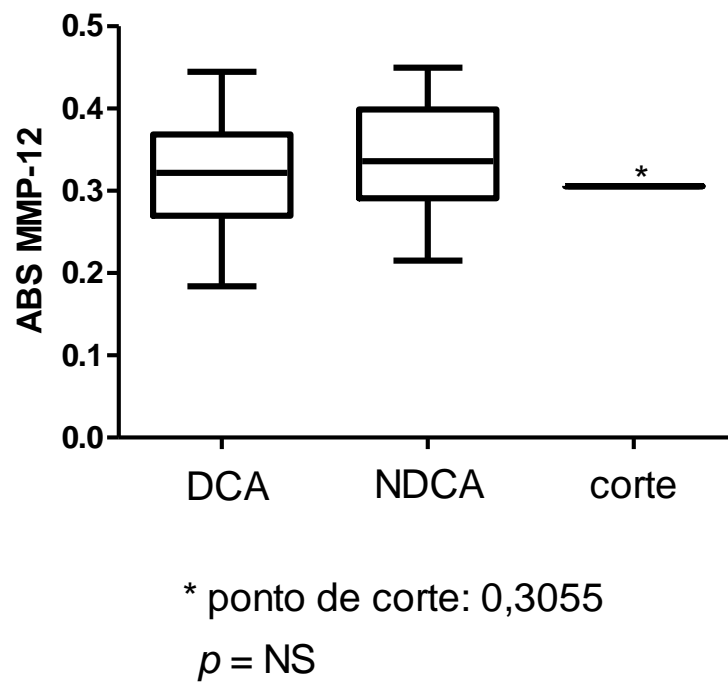


Figura 17 – Comparação da ABS por ELISA para MMP-12 entre os grupos DCA e NDCA em função do ponto de corte.

Os pontos de corte (*cut off*) utilizados para a seleção dos pacientes entre verdadeiros positivos, verdadeiros negativos, falsos positivos e falsos negativos, a partir dos resultados de ELISA (Tabela 11 em Apêndices) e dos grupos estratificados em DCA e NDCA, foram estabelecidos por meio de *Receiver Operating Characteristic* (curvas ROC), considerando como diagnóstico confirmatório de DCA a presença de placas ateroscleróticas por doppler.

Somado aos dados da curva ROC, foi utilizada uma tabela de contingência para o cálculo dos parâmetros diagnósticos [sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e razão das chances (*likelihood ratio* - LR)] conforme Tabela 12 (em apêndices).

As diferenças entre os resultados dos parâmetros diagnósticos calculados por ROC e por tabela de contingência não foram significativas ($p > 0,05$, *two-way* ANOVA). Os resultados dos parâmetros diagnósticos (curvas ROC) são mostrados nas Figuras 18, 19, 20, 21 e 22.

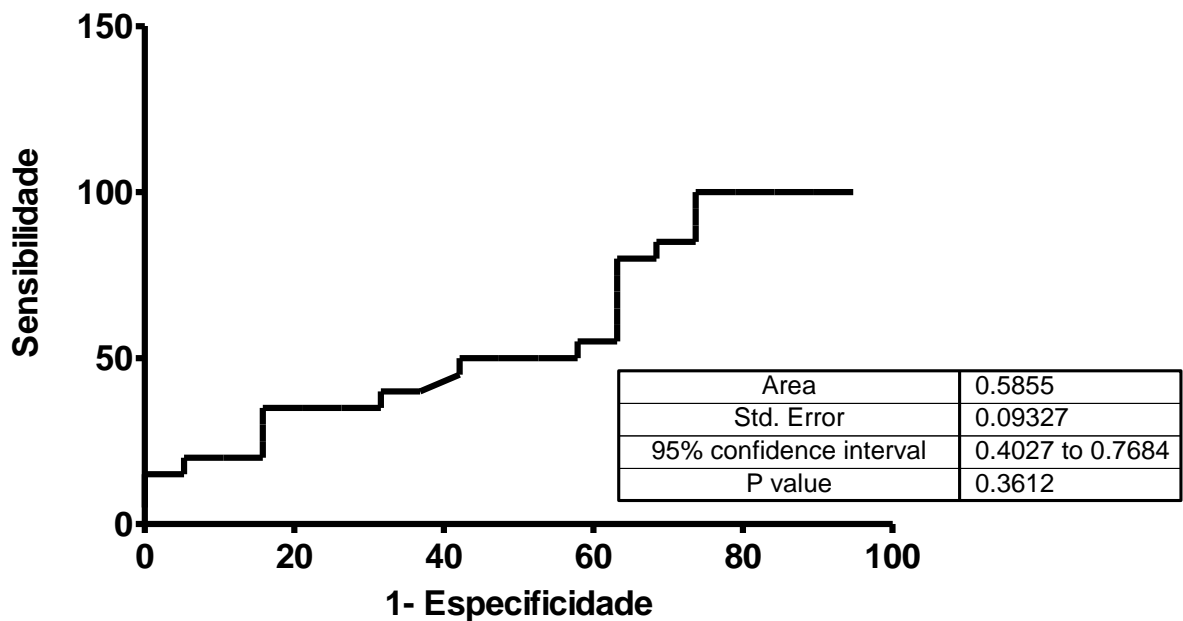


Figura 18 – Curva ROC entre DCA e NDCA para MMP-1

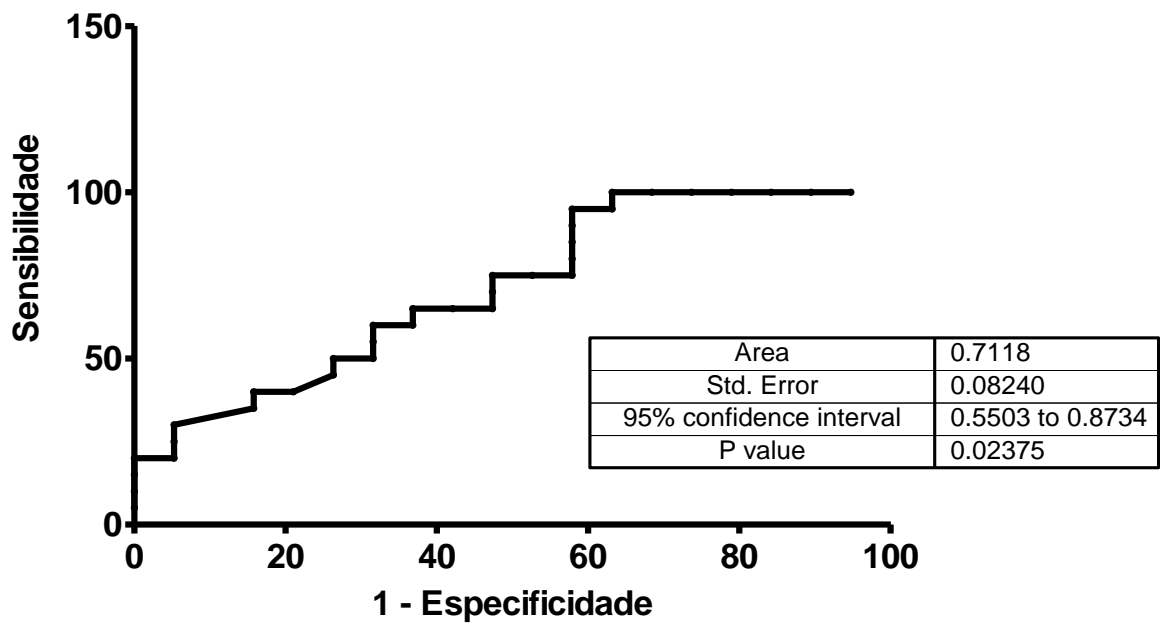


Figura 19 – Curva ROC entre DCA e NDCA para MMP-2

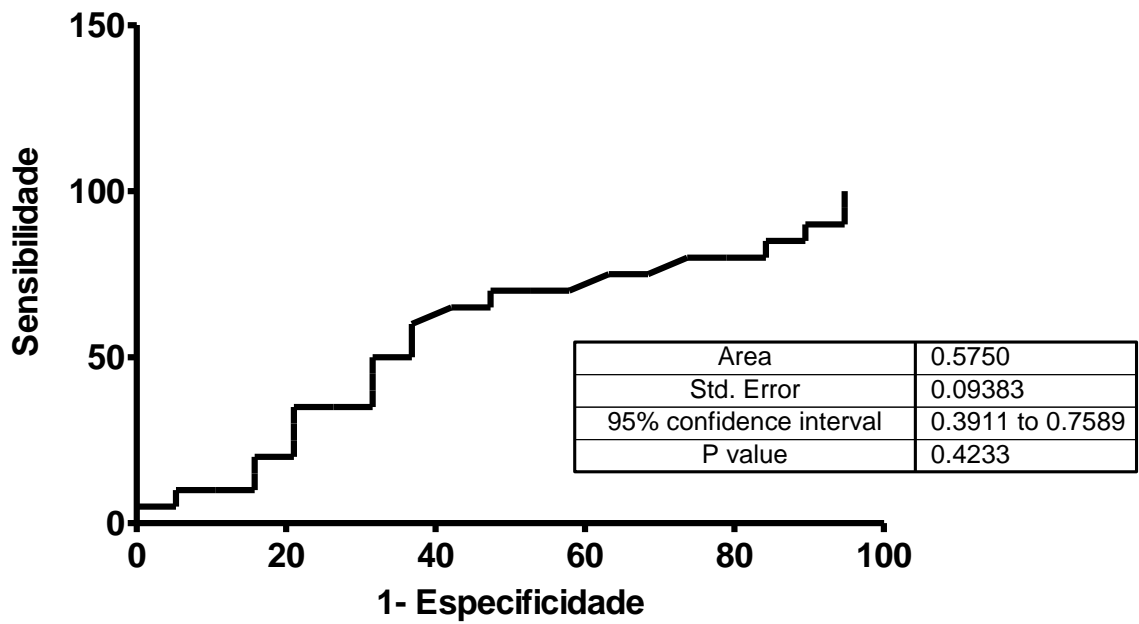


Figura 20 – Curva ROC entre DCA e NDCA para MMP-8

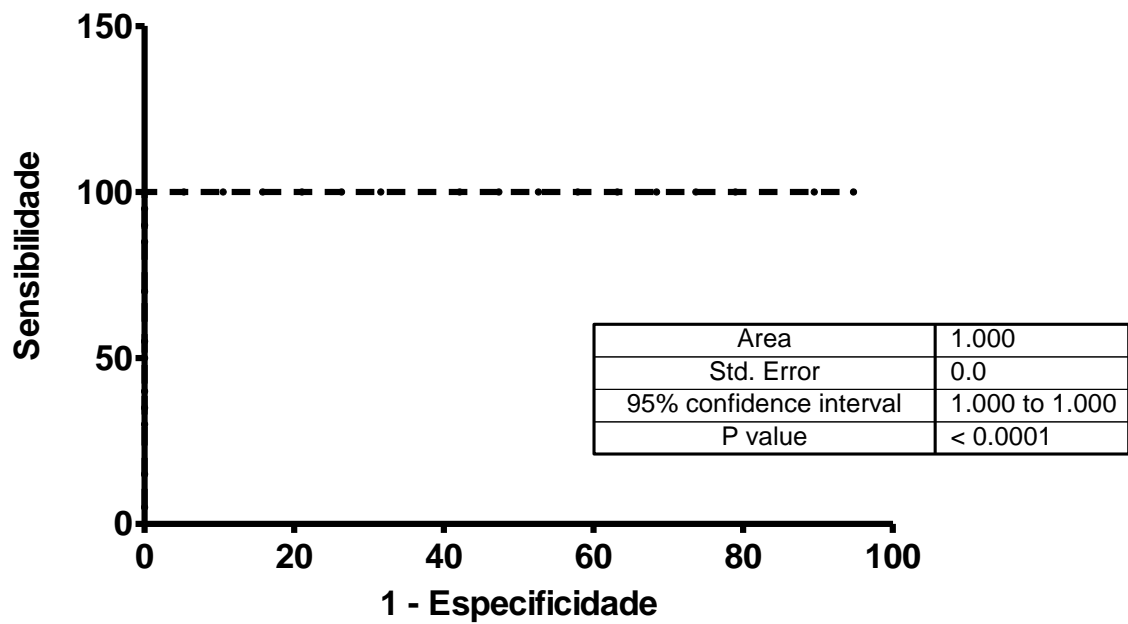


Figura 21 – Curva ROC entre DCA e NDCA para MMP-9

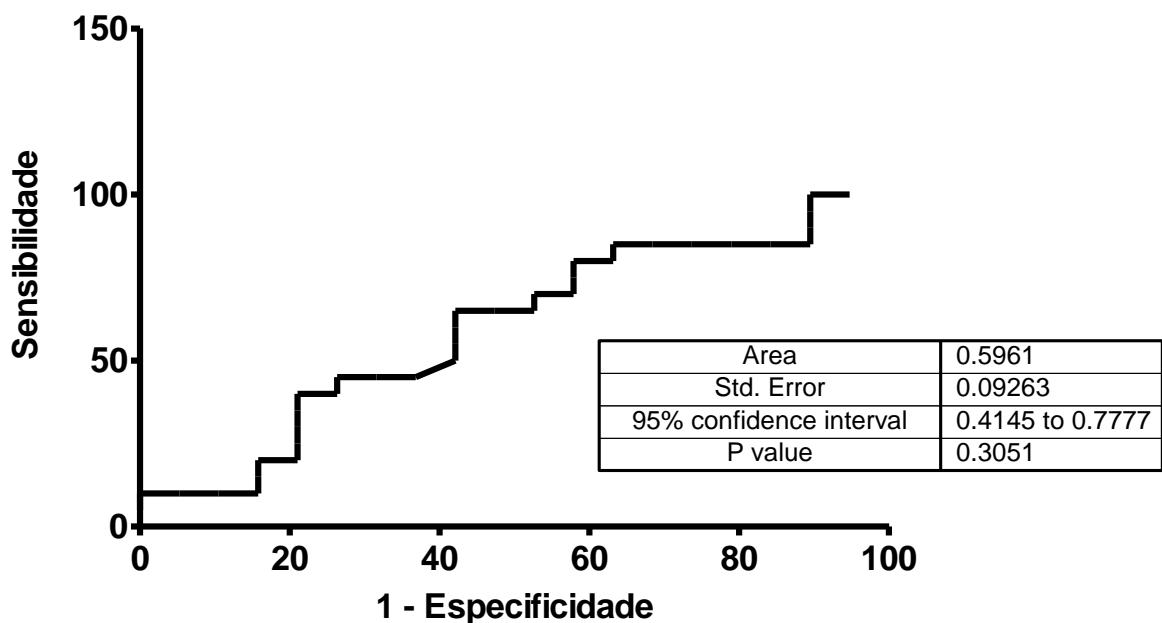


Figura 22 – Curva ROC entre DCA e NDCA para MMP-12

A Tabela 13 mostra o risco relativo (RR) entre a determinação das metaloproteinases e grau de estenose por doppler, calculado a partir de tabela de contingência. A seleção dos resultados de ELISA para cada MMP se deu em função dos cortes estabelecidos na curva ROC.

TABELA 13 – RISCO RELATIVO ENTRE METALOPROTEINASES E GRAU DE ESTENOSE.

GRAU ESTENOSE	MMP1		MMP2		MMP8		MM12	
	RR	IC95%	RR	IC95%	RR	IC95%	RR	IC95%
II	1,267	0,462 a 3,469	3,000	1,226 a 7,341	0,471	0,168 a 1,314	1,900	0,716 a 5,037
III	0,762	0,094 a 6,112	-	-	1,313	0,163 a 10,528	-	-
IV	1,778	0,448 a 7,042	3,667	1,111 a 12,106	0,562	0,142 a 2,228	3,556	0,802 a 15,751

MMP – metaloproteinase, RR – risco relativo

Os riscos relativos foram importantes para MMP1 em graus de estenose II e IV, MMP2, graus II e IV; MMP8 e grau II e, MMP12 graus II e IV.

Análise da atividade enzimática por zimografia

Os zimogramas resultantes do SDS-PAGE com gel de poliacrilamida copolimerizado com gelatina (Figuras 23, 24 e 25) mostraram que os soros do grupo DCA apresentaram maior atividade proteolítica (da gelatina) em relação ao grupo NDCA, evidenciado pela análise densiométrica da área de digestão (Figura 26), em milímetros quadrados, usando o programa *ImagJ* ($p < 0,0001$; teste T não pareado). Alguns pacientes do grupo NDCA apresentaram atividade proteolítica muito reduzida nos géis avaliados.

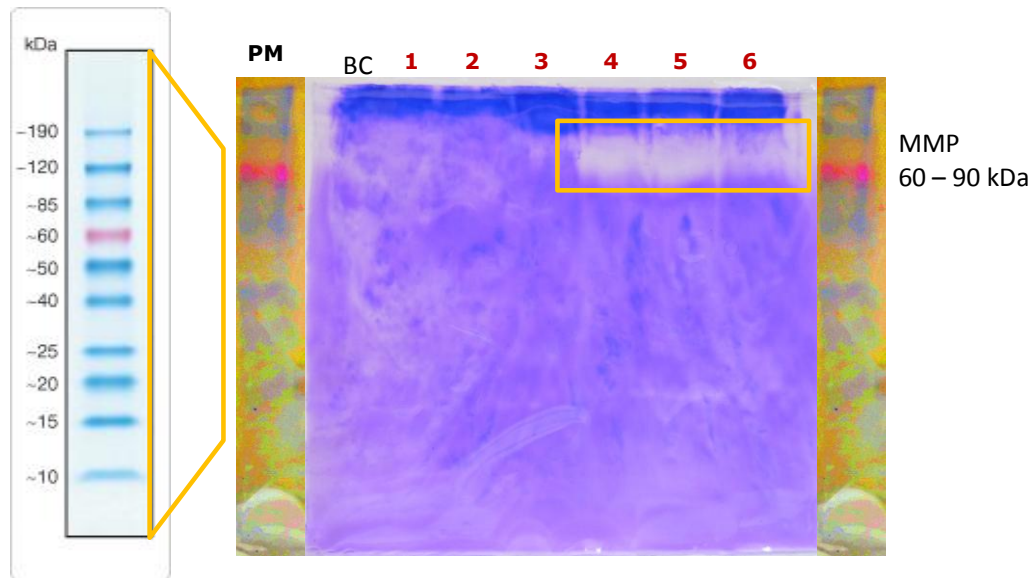


Figura 23 – Zimografia em gel de poliacrilamida 10% copolimerizado com gelatina 0,1% comparando pacientes NDCA e DCA. MMP = metaloproteinases, soros 1, 2 e 3 = NDCA, soros 4, 5 e 6 = DCA, BC – Branco; PM – Marcador de peso molecular.

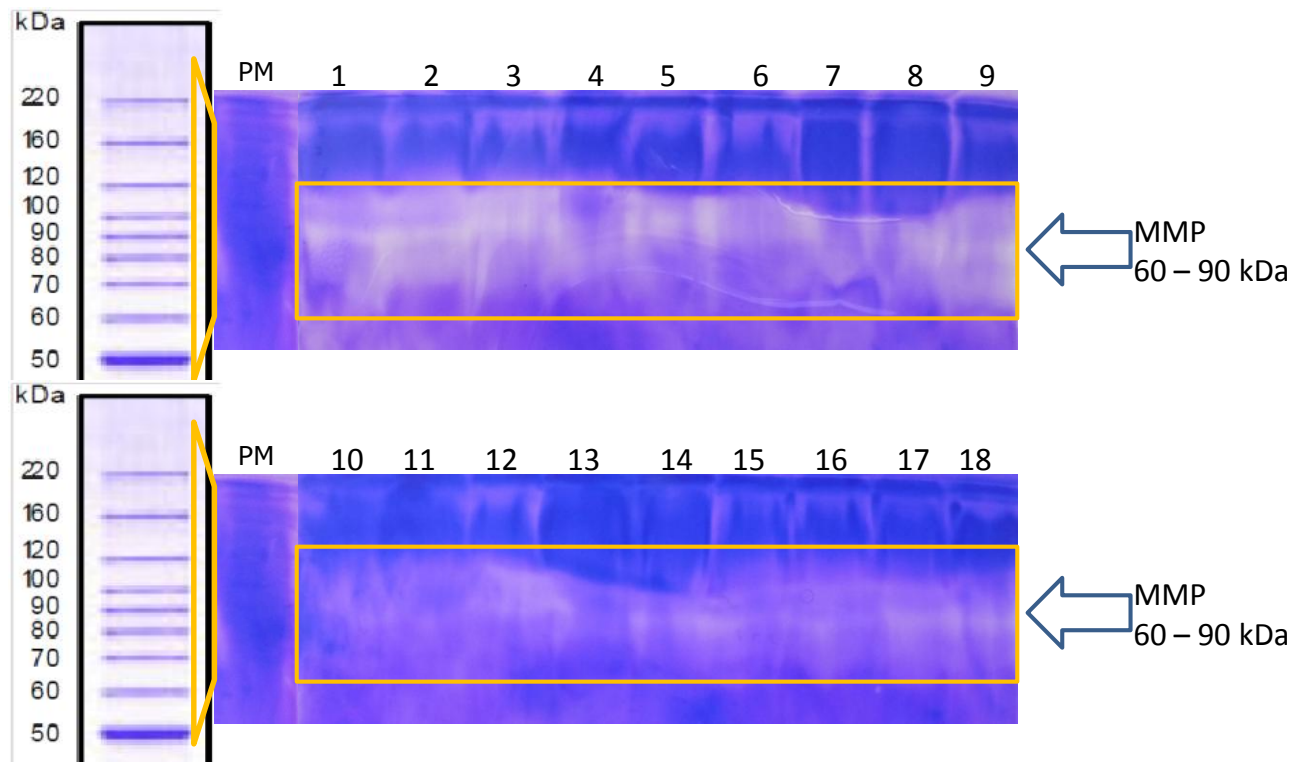


Figura 24 – Zimografia em gel de poliacrilamida 10% copolimerizado com gelatina 0,1% do grupo DCA. MMP = metaloproteinases, 1 a 18 = indivíduos DAC; PM = marcador de peso molecular.

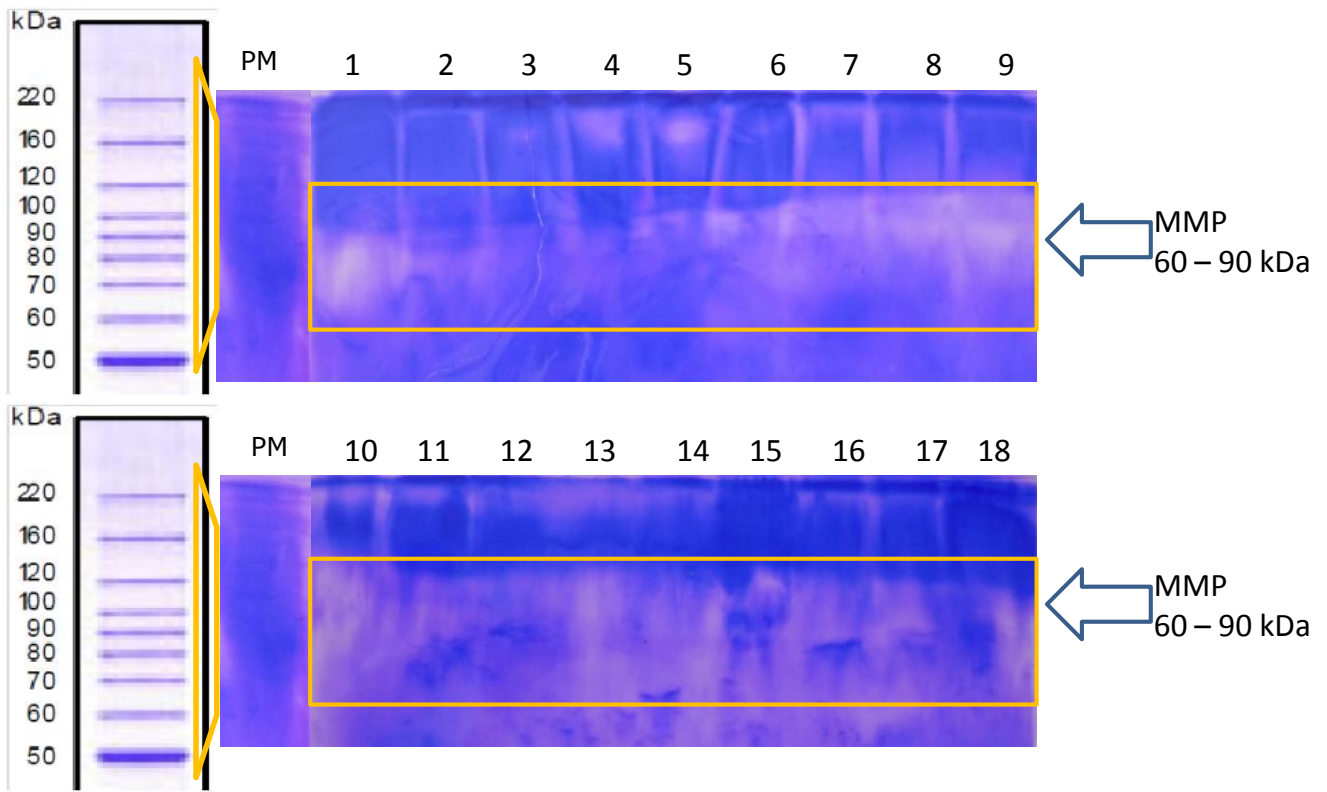


Figura 25 – Zimografia em gel de poliacrilamida 10% copolimerizado com gelatina 0,1% do grupo NDCA. MMP = metaloproteinasas, 1 a 18 = indivíduos NDCA; PM = marcador de peso molecular.

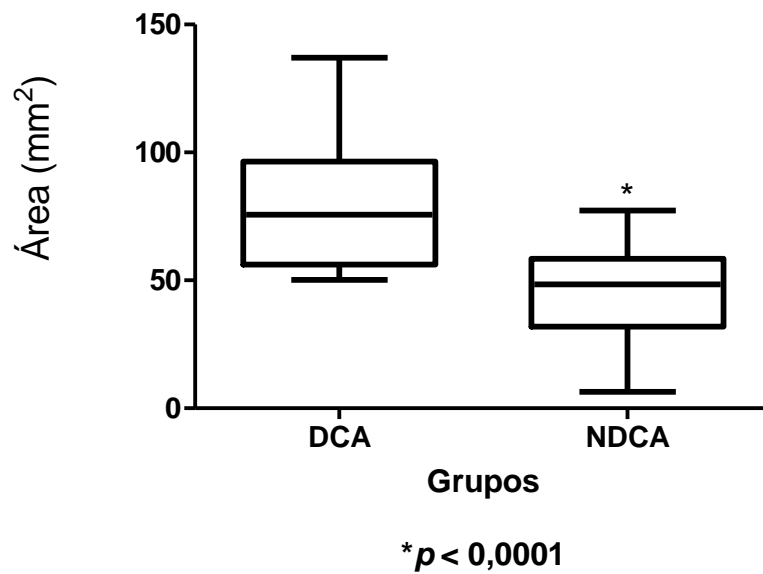


Figura 26 – Análise da área digerida por zimografia.

5 Discussão

A casuística apresentou características que são similares às de outros estudos, com maior prevalência de DCA nos indivíduos mais idosos, todavia, neste caso, houve uma maior prevalência no sexo feminino. Entre as doenças de base associadas ao risco de aterosclerose, as dislipidemias, a hipertensão e a diabetes são aquelas que apresentaram maior prevalência em relação à DCA. Esses dados são consistentes com os comentários de diversos autores (GRUNDY *et al.*, 1999; GRUNDY, 1999; VACCARINO e KRUMHOLZ, 1999; KALELA, 2002) que consideram que a aterosclerose está associada ao desenvolvimento de desequilíbrios metabólicos, em especial as dislipidemias e idade avançada.

O resultado dos exames de ecografia vascular com doppler não identificou, entre os pacientes DCA, ocorrência de grau de estenose V ou VI (oclusão) (NASCET, 1991 segundo RANDOUX *et al.*, 2001, LEPORE *et al.*, 2001), havendo maior concentração de indivíduos de ambos os sexos nos graus II e III. Em relação à HDL-C ≤ 40 , houve maior prevalência no grau III (75%) entre os indivíduos com DCA. Dos 65 indivíduos amostrados, 17 (26%) apresentavam HDL-C baixo, dos quais 11 eram DAC (35%), portanto, 48 apresentavam HDL-C em níveis protetores, dos quais 20 (65%) eram DAC. Os baixos níveis de HDL-C contribuem para a progressão da aterosclerose (VACCARINO e KRUMHOLZ, 1999; SANTOS, 2001; REDDY, 2002; ROVER *et al.*, 2010, GIULIANO *et al.*, 2005), associados a outros fatores e hábitos sociais de risco (SANTOS, 2001; ROVER *et al.*, 2010), contudo, neste estudo não foi possível verificar se havia diferenças significativas entre os subgrupos de graus de estenose em relação à HDL-C devido à perda de segmento.

Por outro lado, ao comparar os níveis de incorporação de CL-³H na HDL-C e os índices de HDL-C entre os grupos DCA e NDCA, houve diferença significativa ($p = 0,0208$), o que indica a importante ação protetora da HDL na aterosclerose, o que também é indicado pela razão HDL-C/apoA ($p = 0,0254$), sendo notável a maior incorporação de CL-³H no grupo NDCA, mostrando, dessa forma, a deficiência do transporte reverso do colesterol nos pacientes DCA (Figura 08). Além disso, os dados da análise de correlação linear entre incorporação de CL-³H e HDL-C ($r = -0,330$; $p = 0,0606$; Pearson) no grupo NDCA podem representar significância em função do aumento da amostra. Observa-se que a correlação linear foi negativa, ou seja, quanto menor a concentração de colesterol na partícula de HDL maior a capacidade de incorporação de colesterol livre, que será esterificado para o *core* da lipoproteína, onde será armazenado. Essa correlação negativa entre HDL-C e CL-³H pode ser

melhor interpretada das seguintes maneiras: (1) Quando há menor incorporação *in vitro*, o transporte reverso é menos eficiente, ou seja, menor incorporação significa remover menos colesterol dos tecidos periféricos para a partícula de HDL, conduzindo, assim, menos colesterol de volta ao fígado para recirculação e eliminação. (2) A menor incorporação *in vitro* poderia indicar, também, que a HDL estaria repleta de colesterol e o transporte reverso estaria funcionando bem, porém isso não ocorre exatamente dessa forma, pois, em condições ideais, ou seja, perfeitas condições estruturais e metabólicas da lipoproteína, existem partículas de HDL de diversos tamanhos (determinados a partir da concentração de colesterol esterificado no core da partícula). Sendo assim, menos colesterol facilita a captação/remoção tanto *in vivo* quanto *in vitro*. (3) A menor incorporação *in vitro* representaria HDL com menor concentração de colesterol, o que poderia refletir menor LDL circulante, todavia isso não é regra, pois além do descrito na situação 2 anterior, é necessário levar em conta todas as variáveis, inclusive genéticas, que podem afetar diretamente esse processo de TRC (Transporte Reverso de Colesterol).

Houve, também, correlação linear positiva entre incorporação de $CL-^3H$ e a razão HDL-C/apoA (marcador de remodelamento de partícula de HDL) ($r = 0,511$, $p = 0,0254$; Pearson). Esses achados mostram claramente que a incorporação é dependente do remodelamento e da concentração de colesterol na partícula, o que deve determinar as características biofísicas necessárias, assim como a ação de proteínas de transferência de colesterol (STANHOPE *et al.*, 2009). No grupo DCA, em relação aos mesmos marcadores avaliados, a incorporação de $CL-^3H$ não apresentou correlações lineares significativas. Apesar dos comentários de Khera *et al.* (2011), questionando a eficácia de tratamentos na aterosclerose que aumentem a concentração de colesterol da HDL e inferindo que a avaliação do influxo/efluxo de colesterol seria mais eficaz para avaliar a doença aterosclerótica, o HDL-C em si continua sendo um marcador confiável para avaliação do risco cardiovascular, o que é mostrado neste estudo quando se comparou os grupos DCA e NDCA (Figura 8), assim como é evidenciado pela tendência de menor risco cardiovascular nos indivíduos com maior índice de HDL-C (Tabela 7) e pela correlação linear positiva significativa entre HDL-C/apoA (Tabela 8), ainda que a relação influxo/efluxo do colesterol não esteja completamente entendida (GINSBERG e GOLDBERG, 1998; KWITEROVICH, 2000; LIMA e COUTO, 2006). Essa inferência é apoiada por Seon *et al.* (2011), que afirmam que o aumento do HDL-C está relacionado com o não espessamento (ou menor espessamento) da íntima média da carótida em pacientes com diabetes tipo 2 e aterosclerose, quando comparado ao maior espessamento observado em pacientes com HDL-C baixo.

Não houve correlações lineares significativas em relação aos parâmetros avaliados no grupo NDCA para incorporação de CL-³H, embora não seja possível afirmar a ausência de outros tipos de correlação e ou associações entre esses parâmetros, aqui não explorados (Tabela 09).

A análise de variância para comparação dos fatores de risco entre os grupos DCA e NDCA (Tabela 10) apresentou tendências para CL-³H ($p = 0,0549$) e não-HDL-C ($p = 0,0632$) e, significância para apoA ($p < 0,001$) e apoB ($p < 0,001$), inferindo-se que tenham papel preponderante no desenvolvimento da aterosclerose, como é relatado por Maki *et al.* (2012), Kawamoto *et al.* (2005), Gardner *et al.* (2009) e Bosevski *et al.* (2007) que comentam estar o LDL-C e o não-HDL-C diretamente associados ao aumento do risco de aterosclerose carotídea e aumento do espessamento da íntima-média das carótidas.

A estimativa de tamanho de partícula de LDL (razão TG/HDL-C, MARUYAMA *et al.* 2003) revelou diferenças significativas entre os grupos DCA e NDCA (Figura 09, $p = 0,0366$), sendo notável o menor tamanho de LDL em DCA, mesmo que as demais razões (LDL/apoB; HDL/apoA, apoA/apoB) não tenham mostrado diferenças significativas (VIEIRA *et al.*, 2011). Os dados de LDL-C são compatíveis com as diferenças significativas dos níveis de apoA e apoB entre DCA e NDCA e com as asserções de Maki *et al.* (2012) e Kablak-Ziembicka *et al.* (2011) acerca do papel desses fatores associados ao desenvolvimento da aterosclerose e aumento da estenose e do espessamento da íntima-média de carótidas.

A atividade de paraoxonase, também não apresentou diferença significativa entre os grupos DCA e NDCA. Apesar de muitos autores citarem a função protetora da ação da paraoxonase (STEIN e STEIN, 1999; DURRINGTON, MACKNESS e MACKNESS, 2001; RADER, 2002; FERRETTI *et al.*, 2004; CHARLTON-MENYS, LIU e DURRINGTON, 2006; MACKNESS *et al.*, 2006, LIMA e COUTO, 2006; LOSCALZO, 2008, GALKINA e LEY, 2009), o fato desta enzima não mostrar diferenças significativas entre os grupos DCA e NDCA provavelmente decorre da redução do número de amostras ao final deste estudo, haja vista que a paraoxonase é essencial para proteger a LDL da oxidação.

No grupo DCA, dentre os marcadores de risco avaliados, houve correlações positivas entre MMP-1 e HDL-C, apoB e CMV-IgG, assim como entre MMP9 e HDL-C. Já entre MMP-9 e apoB, a correlação foi negativa.

Chama a atenção, a correlação positiva entre MMP-1 e presença de CMV-IgG no grupo DCA, pois conforme mostrado por Prochnau *et al.* (2011) a infecção por CMV em doentes ateroscleróticos, induz o aumento da expressão de MMP-1 pelas células musculares

lisas, sugerindo a participação do vírus no processo inflamatório e de formação da placa na aterosclerose. Entretanto não foi observada correlação linear entre CMV-IgG e MMP-9, embora Vlachopoulos *et al.* (2005) tenham mostrado a participação significativa de MMP-9 em processos inflamatórios causados por bactéria (*Salmonella typhi*), ou seja, MMP-9 está relacionada com processos infecciosos causados por outros patógenos e, eventualmente, pode apresentar correlação com CMV (STRAAT *et al.* (2009), ainda que não seja o caso encontrado nesta casuística. Ao mesmo tempo, Straat *et al.* (*ib.*) afirmaram que há correlação significativa entre a inibição da expressão de MMP-9, bem como de sua atividade na medida em que o vírus CMV ativaria a expressão de TIMP-1, o que revelaria sua participação na aterosclerose. Embora não haja correlação linear entre CMV-IgG e MMP-9 neste estudo, como já foi dito, essas situações poderiam decorrer do momento da coleta das amostras em relação ao estado de desenvolvimento da doença em função de instabilidade de placa, em relação aos resultados de Straat (*ib.*).

Da mesma forma, as correlações lineares positivas entre MMP-1 e apoB nos DCA, poderiam ser explicadas pela participação dessa MMP no processo inflamatório na aterosclerose (RAJAVASHISTH *et al.*, 1999; TORZEWSKI *et al.*, 2004; JÖNSSON-RYLANDER *et al.*, 2007; HINSBERGH & KOOLWIJK, 2008; CHARRIER-HISAMUDDIN *et al.*, 2008; PACKARD e LIBBY, 2008; LEHRKE *et al.*, 2009). Ainda que a MMP-1, isoladamente, não tenha mostrado relação significativa com o grupo DCA neste estudo, contraditoriamente, houve correlação linear positiva entre MMP-1 e HDL-C, tornando mais complexas possíveis inferências, na medida em que a maior concentração de HDL-C deveria inibir a expressão de MMP-1 pelos macrófagos (PACKARD e LIBBY, 2008; LIBBY e AIKAWA, 2003), como foi demonstrado por Monteiro *et al.* (2006) que encontraram proporção significativa inversa entre o nível de HDL-C e de MMP-1 em doentes ateroscleróticos. Cabe observar que mutações do gene da CTP (fosfocolina citidiltransferase alfa) – importante regulador hepático do nível de HDL –, causam elevação de HDL-C (LUOMA, 2010), caso similar ao apontado por Wang *et al.* (2002) para indivíduos com mutação no gene CETP (proteína de transferência de ésteres de colesterol) e por Vergeer *et al.* (2010) e Chirinos *et al.* (2005) para pacientes com doença arterial coronária que apresentam níveis elevados de HDL, pelo que se conjectura que possam ocorrer também em indivíduos ateroscleróticos, elevando HDL-C.

Dentre esses dados, outra possível inferência poderia ser feita sobre fato de que a MMP-9 possui uma ação protetora segundo alguns autores (SCHWARTZ *et al.*, 2007; MURROW *et al.*, 2010; NEWBY, 2005; GAUBATZ *et al.*; 2010), apresentando, portanto,

níveis mais reduzidos em doentes ateroscleróticos, o que explicaria sua correlação linear negativa com a apoB e positiva com HDL-C nos DCA. Contudo, diversos outros autores mostraram que níveis aumentados da MMP-9 estariam correlacionados com a inflamação, intumescimento, agravo e ruptura da placa de ateroma em doentes (YASMIN *et al.* (*ib.*), ALTMAN, 2003; BLANKENBERG *et al.*, 2003; LUBOS, *et al.*, 2006; CAVUSOGLU *et al.*, 2006; GARVIN *et al.*, 2008; LEHRKE *et al.*, 2009; MAAS e FURIE, 2009; JEFFERISA *et al.*, 2010; HANSSON *et al.*, 2011; GUTTE *et al.*, 2011; TANINDI *et al.*, 2011; WELSH *et al.*, 2008; IAN *et al.*, 2004; ROMERO *et al.* (2008).

No grupo NDCA, a correlação linear foi positiva entre MMP-1 e MMP-12, mas negativa com TG. A correlação positiva entre MMP-1 e MMP-12, no grupo NDCA, pode ser explicado pelo fato deste estudo não ter excluído pacientes com outros tipos de aterosclerose, ou seja, central e periférica, como observado na doença aterosclerótica em função da capacidade ativadora que a MMP-1 apresenta em relação a outras MMP (incluindo a MMP-12) (RAJAVASHISTH *et al.*, 1999; TORZEWSKI *et al.*, 2004; JÖNSSON-RYLANDER *et al.*, 2007; HINSBERGH & KOOLWIJK, 2008; CHARRIER-HISAMUDDIN *et al.*, 2008). Lehrke *et al.* (2009), por exemplo, encontraram que a MMP-1 tem correlação significativa positiva com a MMP-9, PCR de alta sensibilidade e TG durante o processo de ruptura de placas, mas não acharam correlação com outros fatores associados à aterosclerose e doença carotídea.

A correlação linear negativa entre MMP-1 e TG no grupo NDCA, nesse caso, se dá em função dos valores médios observados de TG na população NDCA serem muito superiores aos valores de MMP-1, ou seja, avaliados em função da ABS refletindo sua DO.

Os testes de ELISA para MMP mostraram que somente a MMP-9 e a 2 têm participação significativa no decurso da DCA nesta casuística, ($p = 0,0246$ e $p = 0,0001$; teste de Mann-Whitney) respectivamente (Tabela 11, Figuras 14 e 15) entre os grupos DCA e NDCA. As demais MMP (1, 8 e 12) não apresentaram níveis significativos por ELISA, cujos pontos de corte foram calculados de acordo com a área sob a curva ROC, ponderando-se a maior especificidade possível dentro do intervalo de confiança e com sensibilidade mínima de 50%. Reforçando o que fora comentado anteriormente, a maioria dos autores considera que as metaloproteinasas estão aumentadas nas DAC (CREEMERS *et al.*, 2001; KALELA, 2002; SCATENA, LIAW, GACHELLI, 2007; PACKARD & LIBBY, 2008; CHARRIER-HISAMUDDIN *et al.*, 2008; MALLAT, 2009; LAXTON *et al.*, 2009; WELSH *et al.*, 2008; YASMIN *et al.*, 2005; ALTMAN, 2003; BLANKENBERG *et al.*, 2003; LUBOS, *et al.*, 2006; CAVUSOGLU *et al.*, 2006; GARVIN *et al.*, 2008; LEHRKE *et al.*, 2009; MAAS e

FURIE, 2009; JEFFERISA *et al.*, 2010; HANSSON *et al.*, 2011; GUTTE *et al.*, 2011; TANINDI *et al.*, 2011), sendo que as MMP seriam indicadores de risco de agravamento da doença ou de ruptura da placa aterosclerótica. Em relação ao grau de estenose, Romero *et al.* (2008), por exemplo, comentaram que a ação da MMP-9 e da TIMP-1 está diretamente relacionada com o espessamento das carótidas.

No entanto, divergindo da maioria daqueles autores, neste estudo as MMP-9 e 2 apresentaram maior atividade nos indivíduos NDCA do que nos doentes (DCA), o que foi confirmado pela zimografia, de tal forma que a MMP-2 apresentou o maior VPN (0,833) (Tabela 13) em relação às MMP-1, 8 e 12 e os altos níveis de MMP-9 não representam risco de desenvolvimento de DCA. Desse modo, os baixos níveis de MMP-2 significam risco aumentado de cerca de 3 a 3,7 vezes maior de desenvolvimento da DCA (Tabela 14), em especial para os graus de estenose II e IV, bem como a redução de MMP-9 significa risco de 100% para DCA (Figura 22). Esses achados são consistentes com os argumentos de Murrow *et al.* (2010), David *et al.* (2003), Gaubatz *et al.* (2010) e Newby (2005) e Straat *et al.* (2009), segundo os quais MMP como a 2 e 9, em especial, teriam ação protetora, tendo níveis aumentados em indivíduos não doentes e atuando no remodelamento vascular, enquanto que outras (MMP-1, 3, 7, 8) agravariam a lesão da placa aterosclerótica nos doentes. Essa ação protetora da MMP-9 e 2 estaria evidenciada neste estudo na medida em que há maior atividade de MMP-9 e 2 em NDCA do que em DCA, apesar de haver maior nível de MMP-9 e 2 (maior DO) nos DCA. As razões para isso são especuladas no parágrafo que segue.

Os ensaios de zimografia demonstraram que há atividade de digestão na faixa de 60 a 90 kDa, cujos pesos moleculares correspondem ao das MMP-2 (72kDa – gelatinase A) e MMP-9 (92kDa – gelatinase B). Curiosamente, essa atividade de digestão é significativamente maior nos indivíduos DCA do que nos NDCA, apesar de os DCA possuírem menores níveis de MMP-2 e 9 indicados por ELISA. Dessa forma, a maior atividade pode ser devida à maior regulação supressora nos NDCA (*e.g.* pela ação de TIMP, Romero *et al.*, 2008), ou então, por outro lado, haveria maior ativação e ação local de MMP na lesão ateromatosa em DCA do que nos NDCA. Esses dados parecem ser contraditórios ao fato de que menores níveis de MMP representariam maior risco do desenvolvimento de DCA, levando a crer que a atividade das MMP não é diretamente proporcional, nem é dependente dos níveis séricos de MMP, havendo, muito provavelmente, uma dependência muito maior da presença de outros fatores como citocinas (*e.g.* IL6, TNF α), PCR, (KABLAK–ZIEMBICKA *et al.*, 2011, BALANESCU *et al.*, 2010), bem como da própria TIMP (ROMERO *et al.*, 2008) e outras MMP (*e.g.* ADAMS, ADAMTS) e controle da expressão gênica (BORGES, 2006;

MIYAGI, 2008; RAFFETTO e KHALIL, 2008; CORRÊA, 2009; KLEIN e BISCHOFF, 2011), tamanho de partícula de LDL, incorporação de CL na HDL (MAKI *et al.*, 2012) e aumento de dislipidemias e presença de doenças associadas à aterosclerose como a hipertensão e diabetes.

É, ainda, possível fazer mais inferências sobre a relação das MMP e TIMP com o agravamento da aterosclerose e/ou sua ação eventualmente protetora (Schwartz *et al.*, 2007, entre outros), ou agravante (Romero *et al.*, 2008, entre outros). De tal forma que se pode pensar que na avaliação do risco em longo prazo (pacientes jovens, lesões iniciais), a aterosclerose provocaria espessamento fibroso da íntima arterial ao longo do tempo, uma vez que o processo de fibrose envolveria a inibição da ação de MMP por consequente maior expressão de TIMP. Num segundo cenário, na avaliação em curto prazo (pacientes graves com placas vulneráveis e lesões ateroscleróticas avançadas) haveria maior expressão de MMP e menor de TIMP. A casuística estudada aqui se aproxima do primeiro cenário, pois não há pacientes graves ou lesões ateroscleróticas avançadas, o que corroboraria as afirmações de Romero *et al.* (*ib*), porém, os dados não são suficientes para uma definição. Ao mesmo tempo, é preciso levar em conta que o panorama investigado não é *in situ* (no local da lesão) e não reflete, necessariamente, o comportamento das MMP circulantes. Ou seja, é necessário investigar qual é a relação entre a expressão/liberação *in situ* e a concentração plasmática/sérica das MMP e das TIMP.

O uso de amostras de soro para aferição de MMP é desaconselhado por alguns autores (TANUS-SANTOS e GERLACH, 2005; Van der WATT e BERMAN, 2005; MANELLO, 2008; FERRETTI *et al.*, 2006; JUNG, 2008; FATÁS *et al.*, 2008) que argumentaram não haver correlação entre os níveis séricos das MMP e seus níveis plasmáticos, além disso, o uso de anticoagulantes ao coletar o plasma, em particular EDTA, alteraria esses níveis aumentando-os e recomendam o uso de citrato (FATÁS *et al.*, 2008). Sendo assim, contestam as avaliações feitas com soro e ou com o uso de EDTA como anticoagulante. Ao mesmo tempo, outros autores (VIHINEN *et al.*, 2005; VIHINEN, 2005; AHARINEJAD *et al.*, 2007; AHARINEJAD, 2008; SUZUKI *et al.*, 2008) defendem o uso do soro para aferir o nível de MMP, desde que a coleta seja feita seguida de imediata centrifugação e congelamento, e afirmam que os níveis séricos são representativos do quadro clínico do indivíduo, bem como do estado da doença. De parte desta pesquisa, o uso do soro para avaliar os níveis de MMP por ELISA e Zimografia (além dos demais exames laboratoriais) apresentou resultados significativos que refletem o quadro clínico da DCA em relação ao grupo NDCA e, portanto,

são considerados válidos para fins comparativos e estimativa do risco associado ao desenvolvimento da DCA.

5.1 Limitações do estudo

As limitações deste estudo consistem na perda de seguimento e falta de amostras para concluir o protocolo do estudo. Além disso, a população estudada não apresenta casos graves, não foi possível avaliar a instabilidade de placa, nem o estado atual dessas placas. Bem como há limitações inerentes ao desenho de estudo por corte transversal, como: eventuais erros na diagnose dos doentes; viés de prevalência ou na determinação do risco e dos casos de verdadeiramente positivos, falsos negativos, verdadeiramente negativos e falsos negativos; problemas decorrentes do tempo de acompanhamento e de exposição à doença; impossibilidade de determinar o risco absoluto da doença e de testar as hipóteses.

6 Conclusões

Neste estudo, verificou-se que as dislipidemias são bastante prevalentes nos indivíduos com DCA e, em decorrência disso, as análises evidenciaram a diminuição da incorporação de colesterol livre na HDL, menor tamanho estimado de partícula de LDL e maior concentração de apoB conferindo assim, maior risco para aterosclerose no grupo DCA em comparação ao grupo NDCA. A maior incorporação de $^3\text{H-CL}$ no grupo NDCA, aponta para a deficiência no transporte reverso do colesterol no grupo DCA, pois, a deficiência de incorporação neste grupo implica diretamente na incapacidade de remover colesterol, aceitar e transportar essa molécula, dos tecidos periféricos para o fígado, onde será eliminado. Esse quadro de risco cardiovascular inabilita os mecanismos de proteção onde é mostrada a participação de enzimas do remodelamento vascular (MMP) atuando, principalmente, nas placas e/ou lesões ateroscleróticas, por se mostrarem reduzidas nas determinações séricas no grupo DCA. As MMP e demais marcadores relevantes nesse grupo mostraram que o evento não tem apenas participação de moléculas relacionadas ao transporte lipídico, mas também, aquelas relacionadas à infecção por vírus como, o marcador CMV-IgG, esse evidenciado pela presença de correlação positiva entre o marcador e a MMP-1, enzima essa relacionada à degradação de colágeno tipo I e III. Sendo assim, a menor incorporação de $^3\text{H-CL}$, baixa densidade óptica das MMP-2 e 9, maior digestão do gel poli(acrilamida-copolimerizado com gelatina e à MMP-1 quando associada à infecção por CMV, são marcadores a serem avaliados para utilização na predição de risco cardiovascular em pacientes com DCA.

7 Perspectivas Futuras

Considerar, para os novos estudos, aumento da casuística para verificar a ação das metaloproteinases e seus inibidores (TIMP) na doença aterosclerótica, determinando sua ação local em comparação com o nível circulante, tanto por ELISA e imunistoquímica, como por testes de imunodifusão e ou *western-immunoblotting*, assim como uso de padrões puros de MMP e TIMP, para melhor estabelecer suas relações entre indicadores de remodelamento de partículas lipoproteicas e seus valores preditivos calculados para avaliação do risco cardiovascular.

8 Referências

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

AHARINEJAD S; KRENN K; ZUCKERMANN A; SCHÄFER R; PAULUS P; SEEBACHER G; WOLNER E; GRIMM M. Matrix metalloproteases and their tissue inhibitor in cardiac transplantation. *Eur J Cardiothorac Surg*, v.32, n.1, p.48-51, Jul. 2007.

AHARINEJAD, Seyedhossein. Reply to Jung. *Letters to the Editor / European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, v.33, p.933-952, 2008.

ALTMAN, Raul. Risk factors in coronary atherosclerosis athero-inflammation: the meeting point. *Thrombosis Journal*, v.1, n.4, p.1-11, 2003.

BALANESCU, Serban; Lucian CALMAC; Dana CONSTANTINESCU; Mugur MARINESCU; Roxana ONUT; Maria DOROBANTU. Systemic Inflammation and Early Atheroma Formation: Are They Related? *A Journal of Clinical Medicine*, v.5, n.4, p.292-301, 2010.

BERGMANN, Katarzyna. Non-HDL cholesterol and evaluation of cardiovascular disease risk. *N engl j med.*, v.364, n.2, p.127-135, 2011.

BLANKENBERG, Stefan; Hans J. RUPPRECHT; Odette POIRIER; Christoph BICKEL; Marek SMIEJA; Gerd HAFNER; Jürgen MEYER; François CAMBIEN; Laurence TIRET. Plasma Concentrations and Genetic Variation of Matrix Metalloproteinase 9 and Prognosis of Patients With Cardiovascular Disease. *Circulation*, v.107, p.1579-1585, 2003.

BORGES, Luciano de Figueiredo. **Matriz extracelular na aorta ascendente humana: quantificação morfométrica do colágeno em aortas normais e análise topográfica da matrilisina, estromelisina e plasmina em disseções e aneurismas não-inflamatórios.** São Paulo: USP, Tese: Universidade de São Paulo, 2006. 75p.

BOSEVSKI, Marijan ; VLADIMIR BOROZANOV; Ljubica GEORGIEVSKA-ISMAIL. Influence of metabolic risk factors on the presence of carotid artery disease in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease. *Diabetes and Vascular Disease Research*, v.4, n.1, p.49-52, 2007.

CAVUSOGLU, Erdal; Cyril RUWENDE; Vineet CHOPRA; Sunitha YANAMADALA; Calvin ENG; Luther T. CLARK; David J. PINSKY e Jonathan D. MARMUR. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) is an independent predictor of all-cause mortality, cardiac mortality, and myocardial infarction. *American Heart Journal*, v.151, n.5, p.1101e1-e8, 2006.

CHARLTON-MENYS, Valentine; Yifen LIU e Paul N. DURRINGTON. Semiautomated Method for Determination of Serum Paraoxonase Activity Using Paraoxon as Substrate. *Clinical Chemistry*, v.52, n.3, p.453-457, 2006.

- CHARRIER-HISAMUDDIN L; LABOISSE CL; MERLIN D.; FASEB J. ADAM-15: a metalloprotease that mediates inflammation. *The FASEB Journal*, v.22, n.3, p.641-53, Mar.2008.
- CHIRINOS, J. A.; J. P. ZAMBRANO; S. CHAKKO; A. SCHOB; R. B. GOLDBERG; G. PEREZ; A. J. MENDEZ. Ability of serum to decrease cellular acylCoA: cholesterol acyl transferase activity predicts cardiovascular outcomes. *Circulation*, v.112, p.2446 – 2453, 2005.
- 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.
- CORRÊA, Mara Adriana. **Mecanismos de ação de metaloproteínas endógenas na injúria de queratinócitos humanos induzida por veneno de *Loxosceles laeta* e a SMase I.** São Paulo: USP, Dissertação: Universidade de São Paulo, 2009. 28p.
- 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; R.D.; DALLAN; L.A.O.; LISBOA; L.A.; MESQUITA; C. H.; VINAGRE; C.G.C.M.; MARANHÃO; R.C. Deposition of free cholesterol in the blood vessels of patients with coronary artery disease: a possible novel mechanism for atherogenesis. *Lipids*, v.42, p.411-418, 2007.
- CREEMERS EE, CLEUTJENS JP; SMITS JF, DAEMEN MJ. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ Res*, v.89, n.3, p.201-103, ago.2001.
- DATASUS. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php>. Acessado em: 17.abr.2010.
- DURRINGTON; P.N.; B. MACKNESS; M.I. MACKNESS. Paraoxonase and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v.21, p.473-480, 2001.
- FATÁS, Maria; FRANQUELO, Pablo; FRANQUELO, Ricardo. Impact of Blood sampling on the Circulating Matrix Metalloproteinases 1, 2, 3, 7, 8 e 9. *Clinical Chemistry*, v.54, p.4, 2008.
- FEITOSA-FILHO, Gilson Soares; Talita de Mattos SEYDELL; Alina Coutinho Rodrigues FEITOSA; Raul Cavalcante MARANHÃO; José Antônio Franchini RAMIRES. Transferências Lipídicas para HDL em Diabéticos Tipo 2: Associações com Microalbuminúria, Estatina e Insulina. *Arq Bras Cardiol*, v.92, n.2, p.100-106, 2009.
- FERRAZ, Mara Lúcia da Fonseca. **Avaliação Morfológica da Aterosclerose em Aortas de Pacientes Autopsiados.** Tese: Universidade Federal do Triângulo Mineiro, 2008. 99p.
- FERRETI, Gianluigi; FABI, Alessandra; CARLINI, Paolo; PAPALDO, Paola; FELICI, Alessandra; COGNETTI, Francesco. What is the Biological Significance of Circulating Blood Levels of Metalloproteinases? *Clin Cancer Res*, v.12, n.11, p.3550, 01.jun.2006.
- FIOTTI, Nicola Altamura, Claudio ORLANDO, Lisa SIMI, Bernhard REIMERS, Pietro PASCOTTO, Bartolo ZINGONE, Andrea PASCOTTO, Mario SERIO, Gianfranco GUARNIERI, Carlo GIANANTE. Metalloproteinases-2, -9 and TIMP-1 expression in stable and unstable coronary plaques undergoing PCI. *International Journal of Cardiology*, v.127, n.3,

p.350-357, 21.jul.2008.

FRIEDEWALD, William T.; LEVI, Robert I.; FREDRICKSON, Donald S. Estimation of the concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*, v.18, n.6, p.499-502, 1972.

FRINK, Richar J. **Inflammatory Atherosclerosis** – Characteristics of the Injurious Agent Sacramento (CA): Heart Research Fundation, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2025>. Acessado em: 01.fev.2011.

FUSTER, V. Aterosclerose, trombose e biologia vascular. In: GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D.(Ed.). Cecil: **Tratado de Medicina Interna**. 22ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005, p.442-448.

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.

GARIN, Marie-Claude Blatter; Xenia MOREN e Richard W. JAMES. Paraoxonase-1 and serum concentrations of HDL-cholesterol and apoA-I. *Journal of Lipid Research*, v.47, p. 515-520, 2006.

GARVIN, Peter; Lennart NILSSON; John CARSTENSEN; Lena JONASSON; Margareta KRISTENSON. Circulating Matrix Metalloproteinase-9 Is Associated with Cardiovascular Risk Factors in a Middle-Aged Normal Population. *PLoS ONE*, v.3, n.3, p.e1774, 2008.

GAUBATZ, John W.; Christie M. BALLANTYNE, Bruce A. WASSERMAN, Max HE, Lloyd E. CHAMBLESS, Eric BOERWINKLE, Ron C. HOOGEVEEN. Association of Circulating Matrix Metalloproteinases With Carotid Artery Characteristics: The Atherosclerosis Risk in Communities Carotid MRI Study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v.30, p.1034-1042, 18.fev.2010.

GERLACH RF, DEMACQ C, Jung K, TANUS-SANTOS JE. Rapid separation of serum does not avoid artificially higher matrix metalloproteinase (MMP)-9 levels in serum versus plasma. *Clin Biochem*, v.40, n.1-2, p.119-23, jan.2007.

GINSBERG, H.N. & GOLDBERG, I.J. Distúrbios do Metabolismo das Lipoproteínas. In: FAUCI *et al.* **Harrison Medicina Interna**. 14.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill - Interamericana, 1998. v.2, p.2270-2281.

GIULIANO ICB, CARAMELLI B, PELLANDA L, et al. Sociedade Brasileira De Cardiologia. Departamento de Aterosclerose et al. I Diretriz de Prevenção da Aterosclerose na Infância e na Adolescência. *Arq. Bras. Cardiol.* v.85, sup.6, p.1-36, 2005.

GÓMEZ-GAVIRO M; DOMÍNGUEZ-LUIS M; CANCHADO J; CALAFAT J; JANSSEN H; LARA-PEZZI E; FOURIE A; TUGORES A; VALENZUELA-FERNÁNDEZ A; MOLLINEDO F; SÁNCHEZ-MADRID F; DÍAZ-GONZÁLEZ F. Expression and regulation of the metalloproteinase ADAM-8 during human neutrophil pathophysiological activation and its catalytic activity on L-selectin shedding. *J Immunol*, v.178, n.12, p.8053-63, 15.jun.2007.

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.

GUS, I.; FFISCHMANN, A.; MEDINA, C. Prevalência dos fatores de risco da doença arterial coronariana no estado do Rio Grande do Sul. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* v.78, n.5, p.478-483, 2002.

GUTTE H, Mortensen J; HAG AM; JENSEN CV; KRISTOFFERSEN US; BRINTH L; KJAER A. Limited value of novel pulmonary embolism biomarkers in patients with coronary atherosclerosis. *Clin Physiol Funct Imaging*, v.31, n.6, p.452, 07.nov.2011.

HANSSON, Jonas; RAMACHANDRAN S. VASAN; JOHAN ÄRNLÖV; ERIK INGELSSON; LARS LIND; ANDERS LARSSON; KARL MICHAËLSSON; JOHAN SUNDSTRÖM. Biomarkers of Extracellular Matrix Metabolism (MMP-9 and TIMP-1) and Risk of Stroke, Myocardial Infarction, and Cause-Specific Mortality: Cohort Study. *PLoS ONE*, v.6, n.1, p.e16185, 2011.

HEBERT P.R.; GAZIANO J.M.; CHAN K.S.; HENNEKENS C.H. Cholesterol lowering with statin drugs, risk of stroke, and total mortality. An overview of randomized trials. *JAMA*, v.278, p.313-21, 1997.

HERMANSON B.; OMENN G.S.; KRONMAL R.A.; GERSH B.J. Beneficial six-year outcome of smoking cessation in older men and women with coronary artery disease. Results from the CASS registry. *N Engl J Med*, v.319, p.1365-9, 1988.

HEUSSEN, C.; DOWDLE, E.B. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem.* v.102, p.196-202, 1980.

INOUE, Teruo; TORU KATO; KAN TAKAYANAGI; THOSHIHIKO UCHIDA; ISAO YAGUCHI; HIROTOSHI KAMISHIRADO; SHIGENORI MAROOKA; NABUO YOSHIMOTO. Circulating Matrix Metalloproteinase-1 and -3 in Patients with and Acute Coronary Syndrome. *Am J Cardiol*, v.92, p.1461-1464, 2003.

JEFFERISA, Barbara J.; Peter WHINCUPB; Paul WELSHC; Goya WANNAMETHEEA; Ann RUMLEYC; Lucy LENNONA; Andy THOMSONA; Debbie LAWLORD; Claire CARSONE; Shah EBRAHIME; and Gordon LOWEC. Prospective study of matrix metalloproteinase-9 and risk of myocardial infarction and stroke in older men and women. *Atherosclerosis*, v.208, n.2, p.557-563, 2010.

JÖNSSON-RYLANDER AC; NILSSON T; FRITSCHÉ-DANIELSON R; HAMMARSTRÖM A; BEHRENDT M; ANDERSSON JO; LINDGREN K; ANDERSSON AK; WALLBRANDT P; ROSENGREN B; BRODIN P; THELIN A; WESTIN A; HURT-CAMEJO E; LEE-SØGAARD CH. Role of ADAMTS-1 in atherosclerosis: remodeling of carotid artery, immunohistochemistry, and proteolysis of versican. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, v.25, n.1, p.180-5, jan.2005.

JUNG, Klaus. Matrix Metalloproteinase do not properly work as peripheral blood biomarkers without taking into account the preanalytical impact of blood sampling. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, v.33, p.944-952, 2008.

KABŁAK–ZIEMBICKA, Anna; Tadeusz PRZEWŁOCKI, Ewa STĘPIEŃ, Piotr PIENIAŹEK, Daniel RZEŹNIK, Dorota ŚLIWIAK, Monika KOMAR, Wiesława TRACZ, Piotr PODOLEC. Relationship between carotid intima–media thickness, cytokines, atherosclerosis extent and a two–year cardiovascular risk in patients with arteriosclerosis. *Kardiol Pol*, v.69, n.10, p.1024–1031, 2011.

KALELA, Anne. Factors affecting serum matrix metalloproteinase-9 with special reference to atherosclerosis. *Acta Universitatis Tamperarensis*, 886. Dissertação: Medical School of the University of Tampere. 2002. 78p.

KARAPANAGIOTIDIS, Georgios T.; Polychronis ANTONITSIS; Nicholas CHAROKOPOS; Christophoros N FOROULIS; Kyriakos ANASTASIADIS; Efthymia ROUSKA; Helena ARGIRIADOU; Kyriakos RAMMOS e Christos PAPAKONSTANTINOY. Serum levels of matrix metalloproteinases -1,-2,-3 and -9 in thoracic aortic diseases and acute myocardial ischemia. *Journal of Cardiothoracic Surgery*, v.4, p.59, 2009.

KAWAMOTO, Ryuichi; Yuichiro OKA; Hitomi TOMITA; Akihiro KODAMA . Non HDL as a predictor of Carotid Atherosclerosis in the elderly. *J Atheroscl Thromb*, v.12, n.03, p.143-148, 2005.

KHERA, Amit V.; Marina CUCHEL; Margarita de la LLERA-MOYA; Amrith RODRIGUES; Megan F. BURKE; Kashif JAFRI; Benjamin C. FRENCH; Julie A. PHILLIPS; Megan L. MUCKSAVAGE; Robert L. WILENSKY; Emile R. MOHLER; George H. ROTHBLAT; Daniel J. RADER. Cholesterol Efflux Capacity, High-Density Lipoprotein Function, and Atherosclerosis. *N Engl J Med*, v.364, n.2, p.127–135, 2011.

KLEIN, T. e R. BISCHOFF. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteinases. *Amino Acids*, v.41, p.271–290, 2011

KWITEROVICH, P. O. The Metabolic Pathways of High-Density Lipoprotein, Low-Density Lipoprotein, and Triglycerides: A Current Review. *The American Journal of Cardiology*, v.86, sup.12A, p.5L-10L, 2000.

LA ROCCA, G.; I. PUCCI-MINAFRA, A. MARRAZZO, P. TAORMINA e S. MINAFRA. Zymographic detection and clinical correlations of MMP-2 and MMP-9 in breast cancer sera. *British Journal of Cancer*, v.90, p.1414-1421, 2004.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, p.680-685, 1970.

LAXTON, Ross C.; Yanhua HU; Johan DUCHENE; Feng ZHANG; Zhongyi ZHANG; Kit-Yi LEUNG; Qingzhong XIAO; Ramona S. SCOTLAND; Conrad P. HODGKINSON; Katherine SMITH; Johann WILLEIT; Carlos LÓPEZ-OTÍN; Iain A. SIMPSON; Stefan KIECHL; Amrita AHLUWALIA; Qingbo XU; e Shu YE. A role of matrix metalloproteinase-8 in atherosclerosis. *Circ Res.*, v.105, n.9, p.921–929, 23.out.2009.

LEAL, M. F. *et al.* Acute myocardial infarction in elderly patients: comparative analysis of the mortality. The elderly versus the young. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, São Paulo, v.79,

n.4, p.369-374, out.2002.

LEHRKE, Michael; Martin GREIF; Uli C BROEDL; Corinna LEBHERZ; Rüdiger P LAUBENDER; Alexander BECKER; Franz von ZIEGLER; Janine TITTUS; Maximilian REISER; Christoph BECKER; Burkhard GÖKE; Gerhard STEINBECK; Alexander W LEBER; Klaus G PARHOFER. MMP-1 serum levels predict coronary atherosclerosis in humans. *Cardiovascular Diabetology*, v.8, n.1, p.e50, 2009.

LEPORE MR JR; STERNBERGH WC 3rd; SALARTASH K; TONNESSEN B; MONEY SR. Influence of NASCET/ACAS trial eligibility on outcome after carotid endarterectomy. *J Vasc Surg*. v.34, n.4, p.581-6, out.2001.

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

LIBBY, Peter; Masanori AIKAWA. Mechanisms of plaque stabilization with statins. *The American Journal of Cardiology*, v.91, n.4, p.4-8, 2003.

LIMA, É.S.; COUTO, R.D. Estrutura, metabolismo e funções fisiológicas da lipoproteína de alta densidade. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, Rio de Janeiro. v.42, n.3, p.169-178, 2006.

LOSCALZO, Joseph. Paraoxonase and Coronary Heart Disease Risk : Language Misleads, Linkage Misinforms, Function Clarifies. *Circ Cardiovasc Genet*, v.1, p.79-80, 2008.

LUBOS, Edith; Renate SCHNABEL; Hans J. RUPPRECHT; Christoph BICKEL; Claudia M. MESSOW; Susanne PRIGGE; François CAMBIEN; Laurence TIRET; Thomas MÜNDEL e Stefan BLANKENBERG. Prognostic value of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 for cardiovascular death among patients with cardiovascular disease: results from the AtheroGene study. *European Heart Journal*, v.27, p.150-156, 2006.

LUOMA, Pauli V. Gene activation regresses atherosclerosis, promotes health, and enhances longevity. *Lipids in Health and Disease*, v.9, n.67, p.e12, 2010.

LUSIS, A. J. Atherosclerosis. *Nature*, v.407, p.233-241, 2000.

MAAS, Matthew B. e Karen L. FURIE. Molecular biomarkers in stroke diagnosis and prognosis. *Biomark Med*, v.3, n.4, p.363-383, 01.ago.2009.

MACKNESS, B. *et al.* Serum paraoxonase (PON1) 55 and 192 polymorphism and paraoxonase activity and concentration in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. v.139, n.2, p.341-9, 1998.

MACKNESS, Bharti; Rozenn QUARCK; Wim VERRETH; Mike MACKNESS; Paul HOLVOET. Human Paraoxonase-1 Overexpression Inhibits Atherosclerosis in a Mouse Model of Metabolic Syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v.26, p.1545-1550, 2006.

MAKI, Kevin C; Mary R DICKLIN; Michael H DAVIDSON; Patrick D MIZE; Krishnaji R KULKARNI. 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.

MALLAT, Ziad. Inflammation, and Atherosclerotic Lesion Growth Matrix Metalloproteinase-8 and the Regulation of Blood Pressure, Vascular. *Circ. Res*, v.105, p.827-829, 2009.

MANNELLO, Ferdinando. Serum or Plasma Samples? The “Cinderella” Role of Blood Collection Procedures Preanalytical Methodological Issues Influence the Release and Activity of Circulating Matrix Metalloproteinases and Their Tissue Inhibitors, Hampering Diagnostic Trueness and Leading to Misinterpretation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v.28, p.611-614, 2008.

MARUYAMA C; IMAMURA K; TERAMOTO T. Assessment of LDL particle size by triglyceride/HDL-cholesterol ratio in non-diabetic, healthy subjects without prominent hyperlipidemia. *J Atheroscler Thromb.*, v.10, n.3, p.186-91, 2003.

MAYR M; KIECHL S; WILLEIT J; WICK G; XU Q. Infections, immunity, and atherosclerosis: associations of antibodies to *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, and cytomegalovirus with immune reactions to heat-shock protein 60 and carotid or femoral atherosclerosis. *Circulation.*, v.102, n.8, p.833-9, 22.ago.2000.

MIYAGI, Sueli Patrícia Harumi. **Análise *in vitro* da expressão de proteínas da matriz extracelular (MEC) e de metaloproteinases de matriz (MMPs) em células tronco de polpa dentária humana.** São Paulo: USP, Tese: Universidade de São Paulo, 2008. 128p.

MONTERO, Ines; JOSUNE ORBE; NEREA VARO; OSCAR BELOQUI; JOSÉ I. MONREAL; JOSÉ A. RODRÍGUEZ; JAVIER DÍEZ; PETER LIBBY; JOSÉ A. PÁRAMO. C-Reactive Protein Induces Matrix Metalloproteinase-1 and -10 in Human Endothelial Cells : Implications for Clinical and Subclinical Atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology*, v.47, n.7, p.1369–1378, 2006.

MURROW, Jonathan R.; Ibhaz Al MHEID; Nino KAVTARADZE; Sarfraz ALI; Konstantinos Aznaouridis; Muhiddin Ozkor; Jesse Jorgensen; Saurabh Dhawan; Hamid Syed; Riyaz Patel; W. Craig HOOPER; Christine DeSTARECK; R. Wayne ALEXANDER e Arshed QUYYUMI. Association of plasma matrix metalloproteinase-9 levels with subclinical atherosclerosis and vascular stiffness in healthy subjects. *J. Am. Coll. Cardiol.*, v.55, n.10A, p.A169-E1589, 2010.

NEWBY, Andrew C. Dual Role of Matrix Metalloproteinases (Matrixins) in Intimal Thickening and Atherosclerotic. Plaque Rupture. *Physiol Rev.*, v.85, p.1–31, 2005.

NIKKOLA J; VIHINEN P; VUORISTO MS; KELLOKUMPU-LEHTINEN P; KÄHÄRI VM; PYRHÖNEN S. High serum levels of matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-1 are associated with rapid progression in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res*. v.11, n.14, p.5158-66, 15.jul.2005.

NOFER, J.R. *et al.* HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport. *Atherosclerosis*, v.161, p.1-16, 2002.

OLIVEIRA, J.J. e SILVA, S.R.A.S. Fatores de risco para doença arterial coronariana. *ARS CVRANDI – A Revista da Clínica Médica*, p.29-40, jun.1999.

PACKARD RR e LIBBY P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem.*, v.54, n.1, p.24-38, jan.2008.

- 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.
- PRAKOBWONG S; PINLAOR S; YONGVANIT P; SITHITHAWORN P; PAIROJKUL C; HIRAKU Y. Time profiles of the expression of metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases, cytokines and collagens in hamsters infected with *Opisthorchis viverrini* with special reference to peribiliary fibrosis and liver injury. *Int J Parasitol.*, v.39, n.7, p.825-835, jun.2009.
- PROCHNAU D, LEHMANN M, STRAUBE E, FIGULLA HR, RÖDEL J. Human cytomegalovirus induces MMP-1 and MMP-3 expression in aortic smooth muscle cells. *Acta Microbiol Immunol Hung*, v.58, n.4p.303-17, 2011.
- RADER, D. J. High-density lipoproteins and atherosclerosis. *The American Journal of Cardiology*, v.90 (Suppl), p.62i-70i, 2002.
- RADER, D.J.; A. DAUGHERTY. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature*. v.451, p.904-13, 2008.
- RAFFETTO, Joseph D. e Raouf A. KHALIL. Matrix Metalloproteinases and their Inhibitors in Vascular Remodeling and Vascular Disease. *Biochem Pharmacol.*, v.75, n.2, p.346–359, 15.jan.2008.
- RAJAVASHISTH TB; XU XP; JOVINGE S; MEISEL S; XU XO; CHAI NN; FISHBEIN MC; KAUL S; CERCEK B; SHARIFI B; SHAH PK. Membrane type 1 matrix metalloproteinase expression in human atherosclerotic plaques: evidence for activation by proinflammatory mediators. *Circulation.*, v.99, n.24, p.3103-9, 22.jun.1999
- RANDOUX B; MARRO B; KOSKAS F; DUYME M; SAHEL M; ZOUAOUI A; MARSAULT C. Carotid artery stenosis: prospective comparison of CT, three-dimensional gadolinium-enhanced MR, and conventional angiography. *Radiology*. v.220, n.1, p.179-85, jul.2001.
- REDDY KS. Cardiovascular diseases in the developing countries: dimensions, determinants, dynamics and directions for public health action. *Public Health Nutr.*, v.5, n.1A, p.231-237, fev.2002.
- RODRÍGUEZ, José A; Josune ORBE; José A PÁRAMO. Metalloproteinases, Vascular Remodeling and Atherothrombotic Syndromes. *Rev Esp Cardiol*. 2007, v.60, p.959-967.
- ROMERO, Jose R.; Ramachandran S. VASAN; Alexa S. BEISER; Joseph F. POLAK; Emelia J. BENJAMIN; Philip A. WOLF; Sudha SESHADRI. Association of Carotid Artery Atherosclerosis with Circulating Biomarkers of Extracellular Matrix Remodeling: The Framingham Offspring Study. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, v.17, n.6, p.412-417, 2008.
- ROSS, R. Mechanisms of disease: atherosclerosis – an inflammatory disease. *The New England Journal of Medicine*, v.340, n.2, p.115-126, 14.jan.1999.
- ROVER, Marina R. M.; Emil KUPEK; Rita de C. B. DELGADO; Liliete C. SOUZA. A Importância da Avaliação de Fatores de Risco para Aterosclerose na Infância e Adolescência – Revisão. *News Lab.*, v.102, p.136-144, 2010.

SANTOS, RD. (Coord.) III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose. Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq Bras Cardiol.*, v.77, sup.3, p. 1-48, 2001.

SCATENA M; LIAW L; GIACHELLI CM. Osteopontin: a multifunctional molecule regulating chronic inflammation and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, v.27, n.11, p.2302-9, nov.2007.

SCHWARTZ, Stephen M.; Zorina S. GALIS; Michael E. ROSENFELD e Erling FALK. Plaque Rupture in Humans and Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, v.27, p.705-713, 2007

SEON, Choon Sik; Kyung Wan MIN, Seung Yup LEE, Kyoung Woo NHO, Se Hwan PARK, Bo Kyung KOO, Kyung Ah HAN. Cardiovascular Risk Assessment with Vascular Function, Carotid Atherosclerosis and the UKPDS Risk Engine in Korean Patients with Newly Diagnosed Type 2 Diabetes. *Diabetes Metab J*, v.35, p.619-627, 2011.

SNOEK-van BEURDEN, Patricia A.M. e Johannes W. Von den HOFF. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *BioTechniques*, v.38, p.73-83. Jan.2005.

SOUZA, M. F. M *et al.* Tendências do risco de morte por doenças circulatórias nas cinco regiões do Brasil no período de 1975 a 1996. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v.77, n.6, p.562-568, 2001.

SPOSITO, AC. (Coord.) IV Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose. Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq Bras Cardiol.* v.88, sup.1, p.1-18, 2007;

STANHOPE, Kimber L.; Jean Marc SCHWARZ; Nancy L. KEIM; et al. Consuming fructose-sweetened, not glucosesweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J. Clin. Invest.*, 2009, v.119, p.1322-1334.

STEIN, O. e STEIN, Y. Atheroprotective mechanisms of HDL. *Atherosclerosis*. v.144, p.285-301, 1999.

STENDER, S., Hjeims, E. In vivo transfer of cholesteryl ester from high and low density plasma lipoproteins into human aortic tissue. *Arteriosclerosis*, v.8, p.252 - 262, 1988.

STOKKE, K.T. e NORURN, K.R. Determination of lecithin: cholesterol acyl-transfer in human blood plasma. *Scand J Clin Lab Invest*, v.27, n.1, p.21-27, 1971.

STRAAT K, de KLARK R, GREDMARK-RUSS S, ERIKSSON P, SÖDERBERG-NAUCLÉR C. Infection with human cytomegalovirus alters the MMP-9/TIMP-1 balance in human macrophages. *J Virol.*, v.83, n.2, p.830-5, 2009.

SUZUKI H; KUSUYAMA T; SATO R; YOKOTA Y; TSUNODA F; SATO T; SHOJI M; ISO Y; KOBAYASHI S; KATAGIRI T. Elevation of matrix metalloproteinases and interleukin-6 in the culprit coronary artery of myocardial infarction. *Eur J Clin Invest.*, v 38, n.3, p.166-73, mar.2008.

TANINDI, Asli; Asife SAHINARSLAN; Sehri ELBEG e Mustafa CEMRI. Relationship Between MMP-1, MMP-9, TIMP-1, IL-6 and Risk Factors, Clinical Presentation, Extent and Severity of Atherosclerotic Coronary Artery Disease. *The Open Cardiovascular Medicine Journal*, v.5, p.110-116, 2011.

TANUS-SANTOS, José e GERLACH, Raquel F. Circulating Matrix Metalloproteinase-9 Levels as a Possible Marker of Aortic Stiffness. *Atheroscler Thromb Vasc Biol.*, v.25, p.e127, 2005.

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.

TUOMAINEN, Anita M.; NYSSÖNEN, Kristiina; LAUKKANEN, Jari A.; TERVAHARTIALA, Taina; TUOMAINEN, Tomi-Pekka; SALONEN, Jukka T.; SORSA, Timo; PUSSINEN, Pirkko J. Serum Matrix Metalloproteinase-8 Concentrations are Associated with Cardiovascular Outcome in Men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, p.2722-2728, 2007.

VACCARINO, Viola; Harlan M. KRUMHOLZ. Risk Factors for Cardiovascular Disease: One Down, Many More to Evaluate. *Ann Intern Med*, v.131, p.62-63, 6.jul.1999.

van der WATT, George; BERMAN, Peter. Concentration of Circulating Gelatinases (Matrix Metalloproteinase-2 and 9) are Dependent on the Conditions of Blood Collection. *Clinical Chemistry*, v.51, n.1, p.274-276, 2005.

van HINSBERGH, VW.; KOOLWIJK P. Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead. *Cardiovasc Res.*, v.78, n.2, p.203-12, 01.maio.2008.

VERGEER, Menno; Adriaan G. HOLLEBOOM, John J. P. KASTELEIN; Jan Albert KUIVENHOVEN. The HDL hypothesis: does high-density lipoprotein protect from atherosclerosis?. *Journal of Lipid Research*, v.51, p.2050-2073, 2010

VIEIRA; Eder Andrade; Wilson Andrade CARVALHO; Roque Aras Júnior; Fábio David COUTO; Ricardo David COUTO. Razão triglicérides/HDL-C e proteína C reativa de alta sensibilidade na avaliação do risco cardiovascular. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, v.47, n.2., 2011

VIHINEN, Pia. In Response: Circulating Matrix Metalloproteinase Levels as a Biomarker of Disease. *Clin Cancer Res*, v.11, n.24, p.8887-8888, 15.dez.2005.

VIRELLA G; LOPES-VIRELLA MF. Atherogenesis and the humoral immune response to modified lipoproteins. *Atherosclerosis.*, v.200, n.2, p.239-46, out.2008.

VLACHOPOULOS, Charalambos; Ioanna DIMA; Konstantinos AZNAOURIDIS; Carmen VASILIADOU; Nikolaos IOAKEIMIDIS; Constadina AGGELI; Marina TOUTOUZA e Christodoulos STEFANADIS. Acute Systemic Inflammation Increases Arterial Stiffness and Decreases Wave Reflections in Healthy Individuals. *Circulation*, v.112, p.2193-2200, 2005.

WANG J, QIANG H, CHEN D, ZHANG C, ZHUANG Y. CETP gene mutation (D442G) increases low-density lipoprotein particle size in patients with coronary heart disease. *Clin Chim*

Acta., v.322, n.1-2, p.85-90, 2002.

WEINSTOCK N; BARTHOLOME M; SEIDEL D. Determination of apolipoprotein A-I by kinetic nephelometry. *Biochim Biophys Acta.*, v.663, n.1, p.279-88, 26.jan.1981.

WELSH, P.; P.H. WHINCUP; O. PAPACOSTA; S.G. WANNAMETHEE; L. LENNON; A. THOMSON; A. RUMLEY E G.D.O. LOWE. Serum matrix metalloproteinase-9 and coronary heart disease: a prospective study in middle-aged men. *Q J Med.*, v.101, p.785-791, 2008.

WILSON, David; HAMID MASSAELI; JAMES C. RUSSELL; GRANT N. PIERCE e PETER ZAHRADKA. Low matrix metalloproteinase levels precede vascular lesion formation in the JCR:LA-cp rat. *Molecular and Cellular Biochemistry.*, v.249, n.1-2, p.151-155, 2003.

WU ZS; WU Q; YANG JH; WANG HQ; DING XD; YANG F; XU XC. Prognostic significance of MMP-9 and TIMP-1 serum and tissue expression in breast cancer. *Int J Cancer.*, v.122, n.9, p.2050-6, 01.mai.2008.

XIN, J Ian G; Zen G HE-SONG ; Guo YI ; Zhou ZHI-BIN ; Tan G BING-SHAN e L I FU-KANG. The expression of matrix metalloproteinases-9 , transforming growth factor- β 1 and transforming growth factor- receptor in human atherosclerotic plaque and their relationship with plaque stability. *Chinese Medical Journal*, v.117, n.12, p.1825-1829, 2004.

YASMIN, Sharon Wallace; Carmel M. MCENIERY; Zahid DAKHAM; Pawan PUSALKAR; Kaisa MAKI-PETAJA; Mike J. ASHBY; John R. COCKCROFT e Ian B. WILKINSON. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and Serum Elastase Activity Are Associated With Systolic Hypertension and Arterial Stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, v.25, p.372-378, 2005.

9 Apêndices

QUADRO 01 – CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO DCA POR SEXO E IDADE							
PACIENTE	NOME	SEXO	IDADE	PACIENTE	NOME	SEXO	IDADE
1	ASS	F	70	16	JSC	M	70
2	AMMO	F	56	17	JWP	M	41
3	ASS	M	69	18	JV	M	41
4	ACSJ	F	65	19	JEJS	M	74
5	CSC	M	68	20	JHF	M	70
6	CP	M	65	21	JMSSR	F	54
7	DCS	F	76	22	LJE	M	72
8	EC	F	70	23	MR	F	67
9	EAG	M	71	24	MLAES	F	53
10	EM	F	62	25	NNB	M	69
11	EMC	F	73	26	SNN	F	72
12	FCSF	M	54	27	WFN	M	59
13	FCL	M	52	28	WFS	M	77
14	HPS	M	77	29	CLL	M	64
15	JPS	F	72	30	RSS	F	57
				31	ORC	F	66

QUADRO 02 – CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO NDCA POR SEXO E IDADE							
PACIENTE	NOME	SEXO	IDADE	PACIENTE	NOME	SEXO	IDADE
32	AMS	F	67	49	ACPS	F	34
33	ACCA	F	36	50	AC	F	26
34	ASP	F	66	51	EIF	M	40
35	ARPV	M	32	52	EFA	F	46
36	CAL	F	18	53	EVD	F	74
37	ENA	F	69	54	GFSJ	F	41
38	EAS	F	49	55	JER	F	25
39	ESS	F	73	56	JNS	M	34
40	JHF	M	70	57	JPFA	F	46
41	JMSR	F	54	58	LMSR	F	53
42	MJBJ	F	66	59	NRRCM	F	68
43	MCGS	F	52	60	PRM	F	37
44	MHS	F	66	61	PMS	M	43
45	MJSS	F	62	62	RAR	F	20
46	MASS	M	51	63	TJPF	F	36
47	NSN	F	50	64	VMSC	F	39
48	UFC	M	77	65	VCMG	F	22

TABELA 03 – PERFIL CLÍNICO DOS GRUPOS DCA E NDCA

CARACTERÍSTICA	DCA n (%)	NDCA n (%)	Total n (%)
Sexo	F 14(45) M 17 (55)	F 27 (79) M 7 (21)	F 41 (63) M 24(37)
Dislipidemia	25 (81)	20 (59)	45 (69)
Hipotireoidismo	6 (19)	9 (27)	15 (23)
Diabetes	20 (65)	6 (18)	26 (40)
Hipertensão	27 (87)	15 (44)	42 (65)
Fumante	12 (39)	8 (24)	20 (31)
Sedentário	19 (61)	19 (56)	38 (59)
Etilismo	29 (94)	4 (12)	33 (51)
Total de indivíduos	31 (48)	34 (52)	65 (100)

DCA – Indivíduos doentes; NDCA – Indivíduos não doentes, F – Feminino; M- Masculino; n - número.

TABELA 11 – ESTIMATIVA DE CENTRALIDADE E DISPERSÃO DO ELISA PARA MMP (LEITURA DE ABSORBÂNCIA A 450 nm) DE DCA E NDCA.

Grupos	MÉDIA	SD	EPM	Valor Mínimo e Máximo	(n)
MMP1 DCA	0,3010	0,09380	0,02098	0,2571 - 0,3449	31
MMP1 NDCA	0,3374	0,1221	0,02800	0,2786 - 0,3963	34
MMP2 DCA	0,2548	0,08300	0,01856	0,2160 - 0,2936	31
MMP2 NDCA	0,3673	0,1654	0,03794	0,2876 - 0,4470	34
MMP8 DCA	0,2739	0,2739	0,2739	0,2387 - 0,3091	31
MMP8 NDCA	0,2604	0,2604	0,2604	0,2279 - 0,2928	34
MMP9 DCA	0,1362	0,1362	0,1362	0,1310 - 0,1413	31
MMP9 NDCA	0,2304	0,2304	0,2304	0,2170 - 0,2438	34
MMP12 DCA	0,3179	0,3179	0,3179	0,2845 - 0,3513	31
MMP12 NDCA	0,3407	0,3407	0,3407	0,3071 - 0,3743	34

DCA – doença carotídea aterosclerótica; NDCA – sem doença carotídea; MMP – metaloproteinase; SD – desvio padrão; EPM – erro padrão da média.

TABELA 12 – PARÂMETROS DIAGNÓSTICOS DE SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, VALOR PREDITIVO POSITIVO, VALOR PREDITIVO NEGATIVO E RAZÃO DE CHANCES.

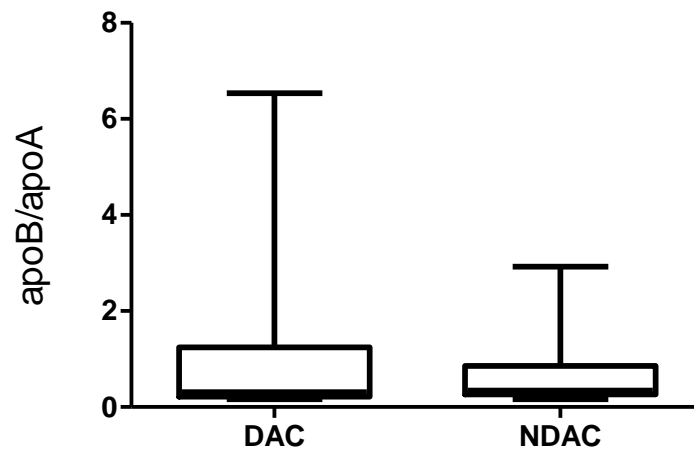
PARÂMETROS	MMP1		MMP2		MMP8		MM12	
	VALOR	IC 95%	VALOR	IC 95%	VALOR	IC 95%	VALOR	IC 95%
SENS	0,684	0,434 a 0,874	0,947	0,739 a 0,998	0,315	0,125 a 0,565	0,736	0,487 a 0,905
ESPF	0,400	0,191 a 0,639	0,250	0,0864 a 0,490	0,500	0,272 a 0,728	0,450	0,230 a 0,684
VPP	0,520	0,313 a 0,721	0,545	0,363 a 0,718	0,375	0,152 a 0,645	0,560	0,349 a 0,755
VPN	0,571	0,288 a 0,823	0,833	0,358 a 0,995	0,434	0,232 a 0,655	0,642	0,351 a 0,872
LR	1,140	-	1,263	-	0,631	-	1,340	-

SENS – sensibilidade; ESPF – especificidade; VPP – valor preditivo positivo; VPN – valor preditivo negativo; LR – *linkhood ratio*.

TABELA 14 – ESTIMATIVA DE CENTRALIDADE E DISPERSÃO DAS CONTAGENS DE FÓTONS POR MINUTO ENTRE DCA e NDCA.

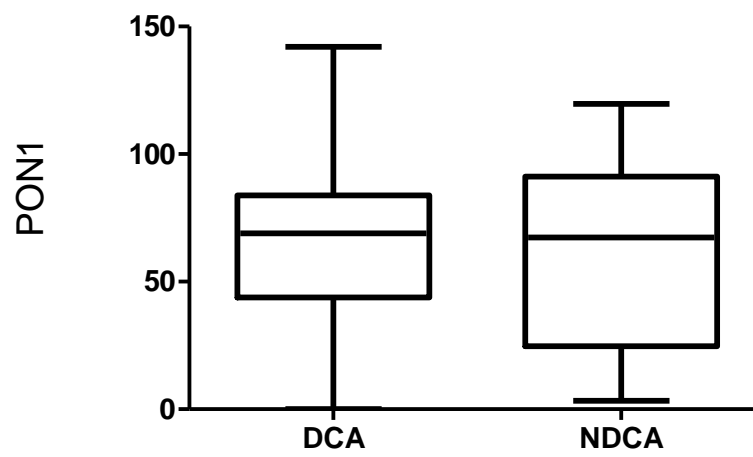
Parâmetros	Mediana	Mínimo	Máximo	n
3H-CL (CPM) DCA	132100	2345	446600	31
3H-CL (CPM) NDCA	191200	24330	596700	34

CPM – contagem por minuto, CL – colesterol livre, 3H-CL – colesterol triado, DCA – grupo com Doença Carotídea Aterosclerótica; NDCA – grupo sem DCA (sadio)



$p = \text{NS}$

Figura 11 – Razão apoB/apoA



$P = \text{NS}$

Figura 12 – Atividade da paraoxonase

TERMO DE CONSENTIMENTO

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:
METALOPROTEINASES DE MATRIZ E INCORPORAÇÃO DE COLESTEROL PELA
LIPOPROTEÍNA DE ALTA DENSIDADE (HDL) NA DOENÇA CAROTÍDEA COMO MARCADORES
DE RISCO CARDIOVASCULAR

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: PROF. DR. RICARDO DAVID COUTO
CARGO/FUNÇÃO: PROFESSOR ADJUNTO I DO DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E
TOXICOLÓGICAS DA FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA – BA Nº 2884
UNIDADE: LABORATÓRIO DE ANÁLISES CLÍNICAS DA FACULDADE DE FARMÁCIA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

PESQUISADOR EXECUTANTE: ÁLVARO LUÍS MÜLLER DA FONSECA
CARGO/FUNÇÃO: PÓS-GRADUANDO DA FIOCRUZ (CPqGM) , PROFESSOR ASSISTENTE DA
UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA, MAT. 74.357565-1

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: 02 ANOS (ABRIL 2010 - ABRIL 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.

Coordenador - Contatos: Tel.xx71-3283-6952, Cel. xx71-9963-8131

- Álvaro Luís Müller da Fonseca

Pós Graduando – Contatos: Tel. -3022-4446, Cel. 71-9993-3837

(Professor Assistente da UNEB e aluno da FIOCRUZ-CPqGM)

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 2010.

.....
 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.