

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

ELAYNE HEIDE MELO DA SILVA

Interleucina 17A
Expressão na Doença Arterial Coronariana Crônica

Recife

2014

ELAYNE HEIDE MELO DA SILVA

**Interleucina 17A
Expressão na Doença Arterial Coronariana Crônica**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Inovação
Terapêutica da Universidade Federal de
Pernambuco, para a obtenção do Título de
Mestre em Inovação Terapêutica**

**Orientador(a): Prof. Dr. João Bosco de Oliveira Filho
Co-orientador(a): Prof. Dr. Dinaldo Cavalcanti de Oliveira**

**Recife
2014**

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Silva, Elayne Heide Melo da
Interleucina 17 A expressão na doença Arterial coronariana crônica / Elayne Heide
Melo da Silva. – Recife: O Autor, 2014.

83 folhas: il.

Orientador: João Bosco de Oliveira Filho, Dinaldo Cavalcanti de Oliveira
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Inovação
terapêutica, 2014.

Inclui bibliografia e anexos

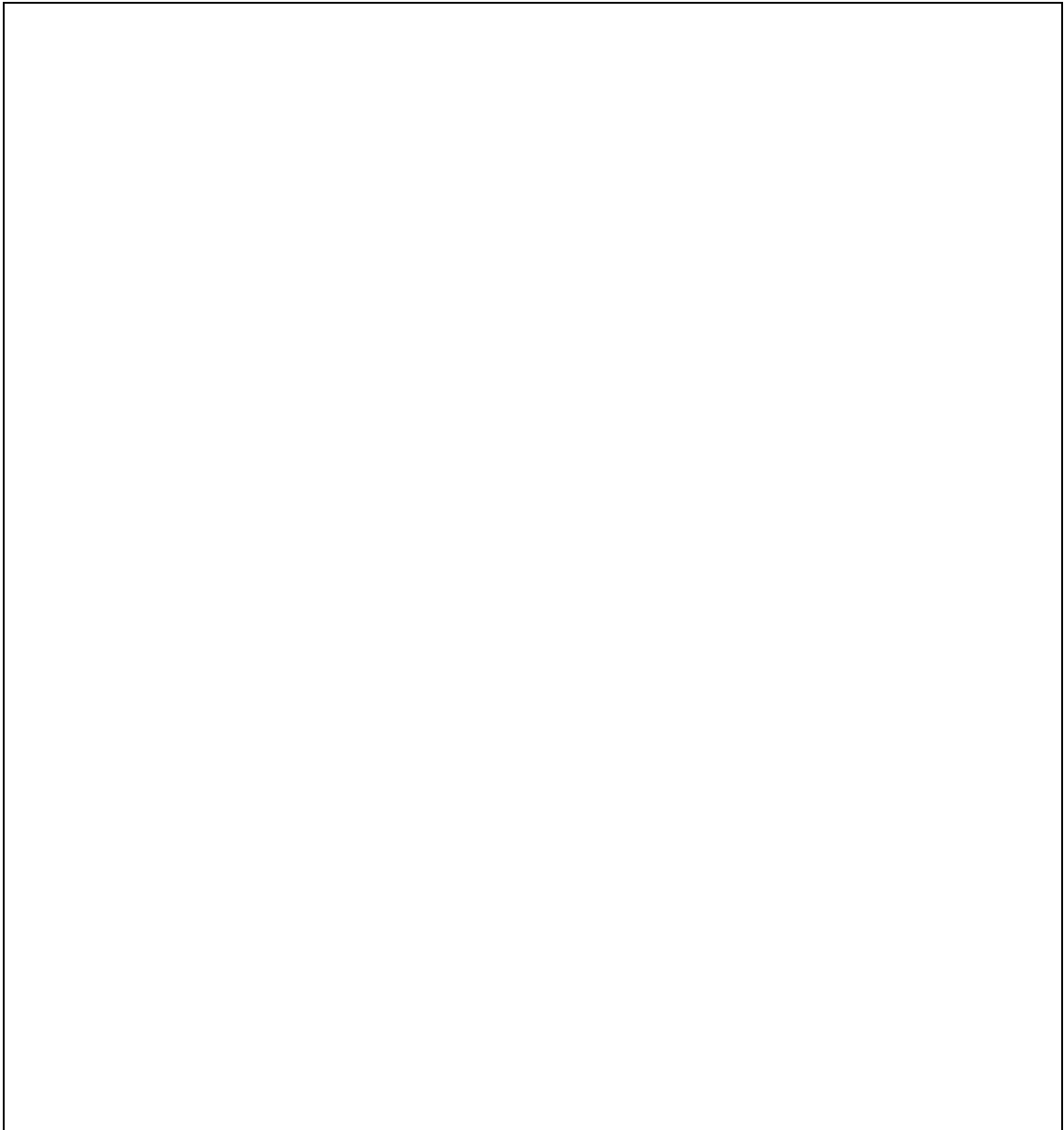
1. Artérias - Doenças 2. Artérias coronárias 3. Imunidade 4. I. Oliveira
Filho, João Bosco de (orient.) II. Oliveira, Dinaldo Cavalcanti de III.
Título.

616.1232

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-294

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Profª. Drª. Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profª Maria Eduarda Lacerda de Larrazábal da Silva

VICE- DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profª Oliane Maria Correia Magalhães

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Profª. Drª. Maira Galdino da Rocha Pitta

VICE- COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Prof. Dr. João Policarpo Rodrigues Lima



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Recife, 29 de agosto de 2014.

Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 29 de agosto de 2014, cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E PRIMEIRO EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Moacyr Jesus Barreto de Melo Rêgo (Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

PRIMEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Edgar Guimarães Victor (Departamento de Medicina Clínica – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

SEGUNDO EXAMINADOR EXTERNO: Profa. Dra. Michelly Cristiny Pereira (NUPIT – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Ao Pai Celestial, por tornar possível toda esta caminhada e iluminar meus caminhos, sem Ele, eu nada seria.

Aos meus pais, Israel e Conceição, por todos sacrifícios e por estarem sempre ao meu lado com imenso amor.

Aos meus irmãos, Israel e Ismael, pela parceria e disposição em me ajudar sempre.

À minha avó Magnólia, e meu tio Dayvison, que foram exemplos de profissionais para mim.

Ao meu namorado, Mateus, pelo incentivo, por toda paciência e apoio, estando sempre ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Prof. João Bosco de Oliveira Filho e Prof Dinaldo Cavalcanti de Oliveira pela orientação, confiança, compreensão, profissionalismo e pelo apoio durante estes dois anos de convivência e trabalho.

A Profª Máira da Rocha Pitta, pela confiança, ajuda, incentivo e todas as preciosas contribuições durante a realização deste trabalho.

Aos amigos Michelly e Moacyr, muito obrigada pelo apoio científico e muitas colaborações neste trabalho.

Aos Amigos do Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas, **Andréia, Flaviana, Henrique, Kamila, Karla, Laurindo, Luana, Leidiane, Marina, Mardonny, Mariana Brayner, Michael, Pablo, Priscilla, Rafael, Sayonara, e Thiago** pela convivência que deixavam o dia-a-dia muito melhores, e por compartilharem comigo seus conhecimentos e experiências desde que iniciei este estudo.

Ao secretário do PPGIT, Sr. Paulo Germano por toda atenção e disposição na prestação dos seus serviços a mim prestados durante todo o período de convivência.

Aos profissionais do Setor da Hemodinâmica do Hospital, o gerente e médico Dr. Edgar Victor, as enfermeiras Cristiane e Raquel, a todas as técnicas e ao atendente Moaby, pela excelente recepção e disponibilidade e atenção durante a realização deste estudo.

Aos amigos e colaboradores Neto, Augusto, Myrtson e Daniel, do grupo de Pesquisa do Coração pelo apoio e contribuições.

Aos amigos Quitéria e Geraldo, que gentilmente colaboraram com esta pesquisa.

A amiga Priscilla exemplo de determinação e superação.

A amiga Milena, por todo apoio e incentivo desde a faculdade.

Às amigas Bárbara Helena e Bárbara Barros, exemplos a serem seguidos de pessoas e profissionais, as quais tenho o privilégio de conhecer desde a escola.

Ao CNPq e FACEPE, pelo suporte financeiro para realização deste estudo.

A meus pais **Israel e Conceição** pelo amor e dedicação, e aos meus irmãos **Israel e Ismael**, por sempre me apoiarem e terem paciência comigo. A minha avó Magnólia e meu tio Dayvison, exemplos de dedicação a profissão.

A meu namorado, Mateus, pelo amor, carinho, compreensão e paciência, além de todo apoio. E minha sogra Maninha, por todo apoio e atenção.

A **todos os meus familiares**, especialmente meus tios Cleiton, Luciano e Francisco, por todo carinho, amor e incentivo a mim dispensados.

Dez leis para ser feliz

“Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes, mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo. E que posso evitar que ela vá à falência.

Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver, apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.

Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar autor da própria história.

É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma.

É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.

Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos. É saber falar de si mesmo. É ter coragem para ouvir um “não”. É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.”

Augusto Cury

RESUMO

SILVA, E. H. M. Interleucina 17A e Doença Arterial Coronariana. 2014. 88f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

O papel das vias imunes e inflamatórias na Doença Arterial Coronariana (DAC) é importante, mas não é totalmente compreendido. O presente estudo tem como objetivo avaliar a concentração de interleucina 17A em pacientes com DAC estável. Este estudo transversal, prospectivo, analítico, que recrutou pacientes de agosto a dezembro de 2012. Nós incluímos 40 pacientes (P) com DAC crônica estável e 20 controles voluntários saudáveis (C). A interleucina 17A foi mensurada no soro de pacientes e controles, e em cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) com e sem estimulação proliferativa (anti-humano CD3 e anti-humano CD-28) após 48 horas. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de Mann-Whitney e valor de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo. Houve 24 homens e 16 mulheres no grupo de pacientes, 12 homens e 8 mulheres nos controles. A idade foi semelhante entre os grupos (Média $\pm$ DP, 63.2 ± 8.9). A comparação entre os grupos revelou níveis de IL 17A (pg/ml): Soro $P = 3,91$ ($3,91 -- 3,91$) vs $C = 3,91$ ($3,91 -- 3,91$) , $p = 0,3$; cultura sem estímulo : $P = 3,91$ ($3,91 -- 3,91$) vs $C = 3,91$ ($3,91 -- 3,91$) , $p = 0,3$; cultura com estimulação : $P = 222,12$ ($27,60 -- 707,35$) vs $C = 154,39$ ($3,91 -- 574,80$) , $p = 0,4$. Portanto, não houve diferença em nenhum dos grupos testados entre pacientes e controles. Desta forma, podemos concluir que neste grupo de pacientes com DAC crônica e estável, com isquemia grave e DAC diagnosticada por angiografia coronariana a IL 17A não esteve aumentada. Baseados nestes resultados foi gerada a hipótese de ser esta interleucina um marcador de estabilidade na doença aterosclerótica coronariana.

Palavras-chave: doença arterial coronariana, inflamação, imunidade, interleucina 17A, angiografia coronariana

ABSTRACT

SILVA, E. H. M. Interleukin 17A Coronary Artery Disease Brazilians.2014.87f. Dissertation (Master). Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

The role of the immune and inflammatory pathways in coronary artery disease (CAD) is important but it is not understood completely. The aim of this study was to evaluate interleukins 17 A levels in patients with stable coronary artery disease. This is a cross-sectional, prospective, analytical study. Conducted from August to December 2012. We included 40 patients (P) with stable CAD, and 20 control healthy volunteers (C) to take up comparison of interleukins concentrations. Interleukin 17A was measured in the serum of patients and controls, and culture of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with and without (anti-human CD3 and anti-human CD-28) after 48 hours proliferative stimulation. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test and p-value ≤ 0.05 was considered significant. There were 26 men and 14 women in the group of the patients and 12 men and 8 women in the controls. The age was similar between the groups (Mean $\pm$ DP, 63.2 $\pm$ 8.9). The comparison between the groups showed: Interleukin 17 A: Serum: P = (P) = 3,91 (3,91 -- 3,91) vs (C) = 3,91 (3,91 -- 3,91), p = 0.3; culture without stimulus: P = 3,91 (3,91 -- 3,91) vs C = 3,91 (3,91 -- 3,91), p = 0.3; culture with stimulus: P = 222,12 (27,60 -- 707,35) vs C = 154,39 (3,91-- 574,80), p = 0.4. There were no differences in interleukins 17 groups, does not matter serum, cell in culture. In conclusion, patients with stable and chronic CAD did not have interleukin 17 A levels increased. Based on these results we believe in the hypothesis that IL 17 A may be a biomarker of stable CAD.

Keywords: coronary artery disease, inflammation, immunity, interleukin 17A, coronary angiography

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Moléculas e células envolvidas na aterosclerose coronariana.....	24
Figura 2. Imunidade inata e adaptativa na aterosclerose.....	25
Figura 3. Diferenciação de células T.....	26
Figura 4. Protocolo de avaliação das citocinas inflamatórias.....	40
Figura 5. Fluxograma do estudo.....	42

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Comparações dos níveis de interleucina 17 A no soro de acordo com a gravidade da estenose.....60

Gráfico 2. Comparações dos níveis de interleucina 17 A em cultura de células sem estímulos (48 horas) de acordo com a gravidade da estenose.....60

Gráfico 3. Comparações dos níveis de interleucina 17A em cultura de células com estímulos (48 horas) de acordo com a gravidade da estenose61

Gráfico 4. Comparações dos níveis de interleucina 17 A no soro de acordo com a presença ou não de estenoses em três artérias.....62

Gráfico 5. Comparações dos níveis de interleucina 17 A em cultura de células (48 horas) sem estímulos com a presença ou não de estenoses em três artérias.....62

Gráfico 6. Comparações dos níveis da interleucina 17 A em cultura de células (48 horas) com estímulos com a presença ou não de estenoses em três artérias.....63

Gráfico 7. Comparações dos níveis de interleucina 17A no soro de pacientes e controles segundo grupo do sexo masculino64

Gráfico 8. Comparações dos níveis de interleucina 17A em cultura de células de pacientes e controles (48 horas) sem estímulo por grupo do sexo masculino.....65

Gráfico 9. Comparações dos níveis de interleucina 17A em cultura de células de pacientes e controles (48 horas) com estímulo segundo grupo do sexo masculino.....65

Gráfico 10. Comparações dos níveis de interleucina 17A no soro de pacientes e controles segundo grupo do sexo feminino66

Gráfico 11. Comparações dos níveis de interleucina 17A em cultura de células de pacientes e controles (48 horas) sem estímulo por grupo do sexo feminino.....67

Gráfico 12. Comparações dos níveis de interleucina 17A em cultura de células de pacientes e controles (48 horas) com estímulo segundo grupo do sexo feminino.....67

Gráfico 13 Comparações dos níveis de interleucina 17A no soro entre sexos do grupo de pacientes do gênero masculino e feminino.....68

Gráfico 14 Comparações dos níveis de interleucina 17A em cultura de células com 48 horas sem estímulo entre pacientes do gênero masculino e feminino.....69

Gráfico 15 Comparações dos níveis de interleucina 17A em cultura de células com 48 horas sem estímulo entre pacientes do gênero masculino e feminino.....69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Interleucina 17A. Comparação entre pacientes e controles.....	52
Tabela 2. Interleucina 17A: Comparações entre diabéticos e tabagistas.....	53
Tabela 3. Interleucina 17A: Comparações de acordo com presença ou ausência de dislipidemia.....	55
Tabela 4. Perfil Clínico dos Pacientes	59
Tabela 5. Comparações nos níveis da interleucina 17A no soro e em cultura de células (48horas) com e sem estímulos segundo o grupo de pacientes e classificação da lesão (CATE).....	61
Tabela 6. Comparações nos níveis de interleucina 17A no soro e em cultura de células (48horas) com e sem estímulos segundo o grupo de pacientes com a presença ou não de estenoses em três artérias.....	63
Tabela 7. Comparações dos níveis da interleucina 17A no soro e em cultura de células (48 horas) com e sem estímulos em pacientes e controles do sexo masculino.....	66
Tabela 8. Comparações dos níveis da interleucina 17A no soro e em cultura de células (48 horas) com e sem estímulos em pacientes e controles do sexo feminino.....	68
Tabela 9. Comparações dos níveis da interleucina 17A no soro e em cultura de células (48 horas) com e sem estímulos entre pacientes homens e mulheres.....	70

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ASK	Cinase reguladora do sinal de apoptose (Do inglês, Apoptosis signal-regulating kinase)
AVC	Acidente Vascular Cerebral
CD	Grupo de Diferenciação (Do inglês, Cluster of differentiation)
CD4+	Grupo de Diferenciação 4 (Do inglês, Cluster of Differentiation 4)
CD8+	Grupo de Diferenciação 8 (Do inglês, Cluster of Differentiation 8)
CD40	Proteína co-estimuladora de células apresentadoras de antígenos
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Cr	Creatinina
DAC	Doença Arterial Coronariana
DCV	Doença Cardiovascular
DLP	Dislipidemia
DM	Diabetes Mellitus
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido Etileno-Diamino-Tetra-Acético
ELISA	Ensaio de Enzima Imunoabsorvente Ligada à Enzima
IAM	Infarto Agudo do Miocárdio
IFN-γ	Interferon Gama
IL	Interleucina
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular (Do inglês, Intercellular Adhesion Molecule 1)
I-TAC	Interferon alfa-induzível de células T quimioatrativa (Do inglês, Interferon-Inducible T-Cell Alpha Chemoattractant)
JNKp38	Jun quinase N-terminal ativada por mitógeno proteína cinase
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade (Do inglês, Low Density Lipoprotein)
M1-like	Macrófago 1 fenótipo polarizado
M2-like	Macrófago 2 fenótipo polarizado
MCP-1	Proteína quimiotática do monócito (Do inglês, Monocyte chemoattractant protein-1)
MMP-9	Matriz da metalopeptidase 9 (Do inglês, Matrix Metalloproteinase 9)

MNCs	Células mononucleares
Naïve	Imaturo
NUPIT	Núcleo de Pesquisa e Inovação Terapêutica
PBMCs	Células Mononucleares de Sangue Periférico (Do inglês, Peripheral Blood Mononuclear Cells)
reg	Regulatório
RM	Revascularização do Miocárdio
T CD4	Linfócitos T com Grupo de Diferenciação 4
T Naïve	Linfócitos T imaturos
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF- β	Fator de Crescimento Transformante β (Do inglês, Transforming Growth Factor)
Th	Linfócitos T auxiliar Helper (Do inglês, Helper)
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa (Do inglês, Tumor Necrosis Factor)
Treg	Linfócitos T regulatórios
TXNIP	Proteína de interação com tioredoxina (Do inglês, Thioredoxin-interacting protein)
VCAM-1	Molécula de adesão de celular vascular (Do inglês, Vascular Cell Adhesion Molecule 1).

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
nm	Nanômetros
pg/ml	Picogramas por mililitro
µg/ml	Microgramas por mililitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	21
2.1	Geral.....	21
2.2	Específicos	21
3	REVISÃO DE LITERATURA	22
3.1	Epidemiologia da Doença Arterial Coronariana	22
3.2	Doença Arterial Coronariana, Inflamação e Imunidade.....	23
3.3	O Tecido Fibroso da Placa e o Papel das CMLs.....	29
3.4	IL-17A na Doença Arterial Coronariana.....	36
4	HIPÓTESE.....	38
5	METODOLOGIA	38
5.1	Delineamento do Estudo.....	38
5.2	População.....	38
5.3	Ficha Clínica do Estudo	39
5.4	Protocolo de Avaliação de Interleucinas Inflamatórias IL-17A	39
5.4.1	Coleta de sangue.....	39
5.4.2	Cultura de células.....	39
5.4.3	Determinação de citocinas.....	41
5.5	Fluxograma do estudo.....	41
5.6	Análise Estatística.....	42
5.7	Aspectos Éticos.....	42
6	RESULTADOS	43
6.1	Artigo 1:Interleucina 17A na Doença Arterial Coronariana Crônica.....	44
6.2	Resultados II: Subanálises de Acordo com a Gravidade da Estenose, Extensão da Lesão e Gênero dos Pacientes.	59
7	COMENTÁRIOS DOS RESULTADOS.....	71
8	CONCLUSÕES	72
9	PERSPECTIVAS	72
10	REFERÊNCIAS	72
11	ANEXO(S)	81

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença Aterosclerótica Coronariana

A Doença Arterial Coronariana (DAC) representa um dos maiores problemas de saúde pública nos dias atuais. A sua etiologia, assim como a sua fisiopatologia são complexas, e têm sido motivo de vários estudos nos últimos 50 anos. (Jones et al.,2012; Laurent,2005).

Notadamente nos últimos 10 a 15 anos, o aspecto imuno-inflamatório desta doença tem ganho destaque e tem sido motivo de várias pesquisas. (Jones et al.,2012; Laurent,2005).

É bem estabelecido que a Doença Arterial Coronariana (DAC) pode ser silenciosa, ou gerar manifestações clínicas, a saber a angina estável ou as síndromes coronarianas agudas (angina instável e infarto agudo do miocárdio (Lotufo,2005; Libby, 2008; Hamm et al., 2009).

Avanços no estudo desta doença permitiram identificar características morfológicas da placa aterosclerótica associadas a maior ou menor chance de manifestações clínicas estáveis ou instáveis (agudas). (Libby, 2002; Hansson et al., 2002).

Nas síndromes estáveis a placa aterosclerótica apresenta capa fibrosa espessa, poucas células inflamatórias, fibrose, calcificação, pouco *core* lipídico e remodelamento vascular negativo. A limitação ao fluxo sanguíneo decorre por obstrução fixa devido ao ateroma, principalmente quando existe necessidade de aumento deste fluxo, como por exemplo durante a atividade física. Uma estenose de 70% na angiografia coronariana determina redução de 90% na luz de secção transversal do vaso, o que limita o fluxo através deste. Chama-se a manifestação clínica decorrente deste processo de angina de demanda ou angina estável. Em alguns pacientes este tipo de obstrução não provoca sintoma, mas é possível a detecção de isquemia em testes complementares, tais como o teste ergométrico, cintilografia do miocárdio, etc. A presença de isquemia miocárdica na ausência de sintomas chama-se isquemia silenciosa. A maioria dos pacientes com DAC

apresentam síndromes coronarianas estáveis como manifestações clínicas. (Ley,2003; Libby,2002).

Entretanto quando a placa aterosclerótica apresenta capa fibrosa fina, grande *core* lipídico, numerosas células inflamatórias, remodelamento vascular positivo está relacionada as síndromes instáveis. Geralmente estes ateromas provocam menos de 70% de estenose e sofrem ruptura da capa fibrosa, exposição da região subcapsular, seguida de adesão, ativação e agregação plaquetária e com isso ativação da cascata de coagulação e formação de trombo que quando provoca total oclusão determina infarto agudo do miocárdio e quando suboclusão angina instável. Quadros clínicos de síndrome coronariana aguda podem representar uma emergência médica. (Hansson et al., 2002; Binder et al., 2002).

Os principais determinantes dos aspectos morfológicos do ateroma ainda são temas de investigação. Sabe-se que determinadas doenças, tais como diabetes mellitus, são associadas a síndrome coronariana aguda. Entretanto muito ainda necessita ser estudado neste tema (Glenn et al.,2011; Christian et al.,2012; Hani et al, 2012; Patrick et al.,2012).

A quantidade de células, moléculas inflamatórias, fibrose, cálcio, etc. do ateroma depende de uma série de fatores, e neste contexto a ativação imunológica e inflamatória têm grande importância. (Glenn et al.,2011;Christian et al.,2012; Hani et al, 2012; Patrick et al.,2012).

Certos aspectos desta resposta estão bem documentados e estudados, porém existem outros que necessitam de esclarecimentos adicionais. Novas células e moléculas relacionadas ao sistema imunológico e a inflamação têm sido estudadas. (Glenn et al.,2011;Christian et al.,2012; Hani et al, 2012; Patrick et al.,2012).

Acredita-se ser possível uma associação entre os tipos de resposta imunológicas, a morfologia da placa aterosclerótica e as manifestações clínicas. Estudos avaliaram potenciais moléculas do sistema imunoinflamatório envolvidas na fisiopatologia da aterosclerose coronariana. (Libby,2002; Hansson et al., 2002).

A interleucina 17A, por exemplo, está envolvida na fisiopatologia da DAC, já tendo sido demonstrado sua presença na placa aterosclerótica. Existe controvérsia se esta interleucina é pro ou antiinflamatória. (Cheng et al., 2008; Aukrust et al., 2008)

Estudos têm sugerido que níveis séricos elevados da IL 17A estejam associados com síndromes coronárias agudas, mas não com síndromes crônicas. Entretanto os critérios para tal definição utilizados foram clínicos, na maioria dos estudos. (Zhou, 2009; Zhu et al., 2011; Boer et al., 2010; Liua et al., 2012; Hashmia, 2006).

Associações entre DAC diagnosticada por angiografia coronariana, que é o método padrão para diagnóstico anatômico, e IL 17A não foram descritas com frequência. Neste sentido, não existem informações consistentes em pacientes com isquemia grave em testes funcionais e com estenoses na angiografia coronariana sobre possível associação entre IL 17A e DAC (Zhou, 2009; Zhu et al., 2011; Boer et al., 2010; Liua et al., 2012; Hashmia, 2006).

A resposta imunoinflamatória na aterosclerose coronariana é um assunto palpitante na cardiologia moderna e a falta de informações sobre a IL 17 A em população específica com DAC de acordo com angiografia coronariana e isquemia grave foram os motivos para realização do estudo que será descrito adiante.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo do estudo é caracterizar o padrão de expressão de níveis séricos da IL-17A em pacientes brasileiros com DAC crônica e estável.

2.2 Específicos

- Avaliar expressão sérica e em sobrenadantes de cultura de células mononucleares (PBMCs) da citocina IL-17A em pacientes com DAC crônica e controles saudáveis com e sem estímulos após 48 horas.

- Comparar os níveis séricos e em sobrenadantes de culturas de PBMCs (48h com e sem estímulos) da citocina IL-17A em pacientes com DAC crônica e controles saudáveis.
- Comparar os níveis séricos e em sobrenadantes de culturas de células de PBMCs (48h com e sem estímulos) da citocina IL-17A e associar com dados clínicos: gênero, número de artérias acometidas e grau de estenose.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Epidemiologia da Doença Arterial Coronariana

A prevalência de DAC em adultos com idade maior que 20 anos nos Estados Unidos da América é de 7%, sendo 8,5% nos homens e 5,8% nas mulheres. Nessa mesma faixa etária a prevalência de infarto do miocárdio é 3,1%, sendo nos homens 4,3% e nas mulheres 2,2% (Jones, 2012).

Cerca de 16.000.000 de americanos têm doença arterial coronariana (DAC). Estima-se que em 2030 16,6% da população tenha DAC. Uma a cada 6 mortes são devido a doenças cardiovasculares. A cada 25 segundos ocorre um evento clínico, a cada 34 segundos um infarto agudo do miocárdio (IAM) a cada minuto uma morte. Ao final do primeiro ano de seguimento 34% dos pacientes que tiveram IAM morrem (Jones, 2012).

Anualmente são realizadas aproximadamente 1.133.000 intervenções coronárias percutâneas e 4160.000 cirurgias de revascularização do miocárdio nos Estados Unidos. Os custos diretos e indiretos com as doenças cardiovasculares foram 297 bilhões e com a doença coronariana cardíaca são de 190 bilhões de dólares, o que representa a maior parte do gasto com doenças cardiovasculares (Jones, 2012).

No Brasil, no período de 1999 a 2009, foram registrados 258.867 óbitos por doença cardiovascular, tendo sido a DAC responsável por aproximadamente 30% destes, sendo a segunda causa de mortalidade (Laurent, 2005). Destaca-se o custo com cardiopatia isquêmica que representou, entre as doenças do aparelho

circulatório, aproximadamente um terço dos gastos por internação no sistema único de saúde em 2009 (Lotufo, 2005; Andrade, 2013)

O custo direto com o manejo da DAC no Brasil é elevado e é responsável por grandes gastos públicos da saúde como com medicamentos, internações e na atenção da alta complexidade. Em 2007, foram registradas 1.157.509 internações por estas doenças no SUS (10,22% do total do país), a insuficiência cardíaca foi a principal causa. Em novembro de 2009, foram registradas 91.970 internações por DCV, totalizando um custo de R\$165.461.644,33, segundo o Ministério da Saúde (DATASUS) (Andrade 2013).

As síndromes coronarianas agudas (infarto e angina instável) são importantes causas de atendimento de emergência no Brasil, onde menos de 20% das emergências possuem laboratório de cateterismo cardíaco. O custo total do tratamento padrão do infarto agudo do miocárdio, com angioplastia primária, em 2008, foi estimado em R\$12.873,69, custando o dobro caso se utilizado o *stent* coronário. Casos de IAM com complicações, como cardioversão elétrica, marca-passo, entubação orotroqueal ou drenagem pericárdica, os custos são elevados em 15 vezes. (Andrade, 2013)

Em 2010, o número de angioplastias primárias correspondeu a apenas 12% dos casos de IAM e, se considerarmos que o uso de trombolíticos correspondeu a quase 20% dos casos, assim, estando na média brasileira, tratando efetivamente com reperfusão apenas um terço dos casos de IAM com supra (Marques et al., 2012).

3.2 Doença Arterial Coronariana, Inflamação e Imunidade

Informações cada vez mais consistentes associam a doença cardiovascular (DCV) à inflamação, tanto local quanto sistêmico. (Libby, 2008).

Entre as DCVs não há dúvidas que a aterosclerose seja responsável pela maioria dos eventos clínicos e mortes que ocorrem nos pacientes. O papel da inflamação na formação da placa aterosclerótica e na ocorrência de eventos clínicos tem sido esclarecido na última década (Libby, 2008, Hamm et al., 2009).

Quando o endotélio vascular está alterado (lesão ou disfunção) a sua permeabilidade torna-se aumentada. Esse evento permite que pequenas moléculas (LDL) entrem na parede dos vasos e sejam transformadas em proteoglicanas, os quais são mais facilmente oxidados (Libby, 2008, Hamm et al., 2009) (Figura 1).

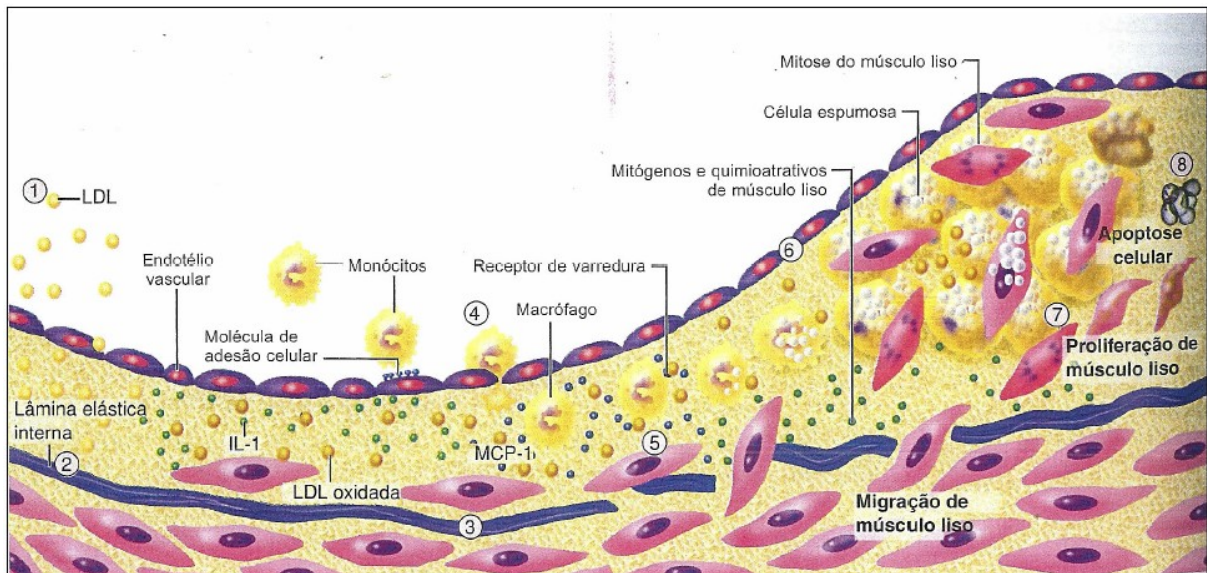


Figura 1. Moléculas e células envolvidas na aterosclerose coronariana.

Fonte: Adaptado de LIBBY, 2008.

Os fatores de risco para doença aterosclerótica contribuem para lesão e morte de células endoteliais que são reconhecidas como substâncias estranhas ao organismo. Células progenitoras endoteliais, originadas da medula óssea são mobilizadas para cicatrização do endotélio lesado, mas usualmente são insuficientes para perfeita recuperação da região lesada (Fuster, 2010).

Leucócitos são recrutados para essa região, por moléculas recrutadoras. Em seguida ocorre adesão desses leucócitos na região lesada por ação de moléculas de adesão, sendo que a família das super imunoglobulinas (VCAM1 e ICAM1) determina adesão e imobilidade, enquanto as selectinas (P-selectina e E-selectina) promovem locomoção em “saltos e rolante” (CybulskyMI, 2004; Ley, 2003).

Moléculas como (MCP-1), IL-8, IL-10, (I-TAC) e interferon gama estão envolvidas no recrutamento de leucócito e sua penetração na parede dos vasos, onde fagocitam lipídeos e transformam-se em células espumosas. (Libby,2002).

A progressão da aterosclerose está relacionada ao sistema imune, tanto a imunidade inata quanto a adaptativa. O macrófago (imunidade inata) produz citocinas inflamatórias e fatores de crescimento que participam e têm importante papel na fisiopatologia da aterosclerose (Hansson et al., 2002; Binder et al., 2002; Rackley, 2009). (Figura 2)

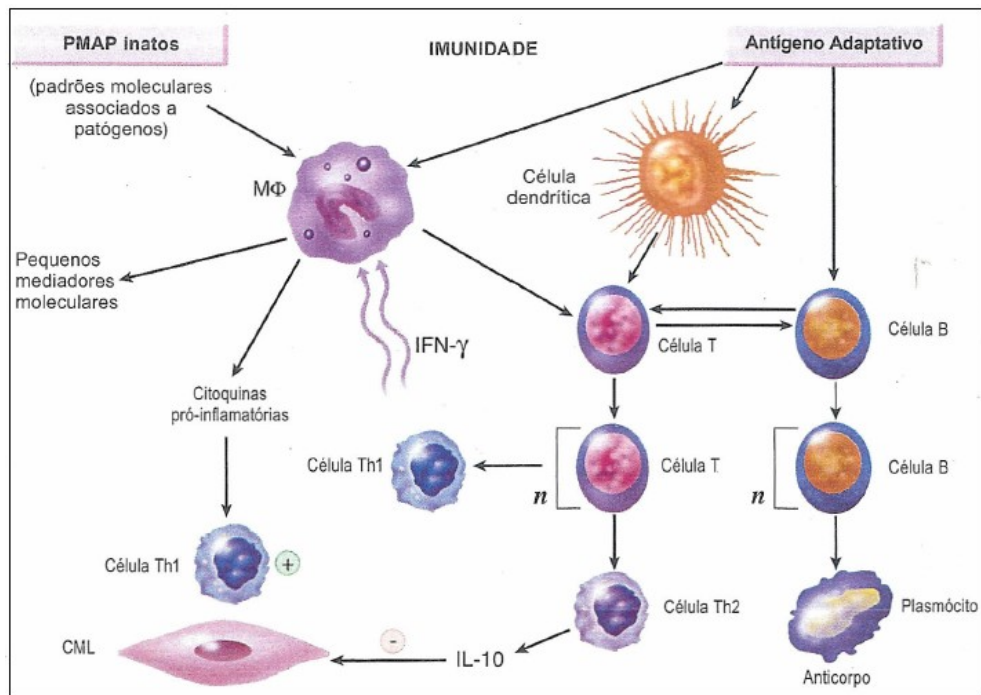


Figura 2. Imunidade inata e adaptativa na aterosclerose.

Fonte: Adaptado de LIBBY, 2008.

Os receptores Toll-like regulam tanto a imunidade inata quanto a adaptativa. A ativação desses receptores induz a produção de citocinas inflamatórias (por exemplo, IL-6, IL-12, IL-1B, fator de necrose tumoral), MCP-1, proteína inflamatória do macrófago, citocinas anti-inflamatórias (por exemplo, IL-1, IL-4, IL-10). Apesar do avanço no entendimento da participação dos receptores Toll-like na DAC, muitos aspectos ainda necessitam de esclarecimentos (Wyss et al., 2010).

Quanto à imunidade adaptativa as células do sistema fagocitário (macrófagos, células endoteliais e células dendríticas) apresentam antígenos (lipoproteínas modificadas, proteína do choque, glicoproteína beta 2 I B e agentes infecciosos) aos linfócitos T, que são ativados a células T auxiliares (CD4). Os linfócitos CD4 originam linhagens de células, e 3 estão mais relacionadas à aterosclerose, a saber, T auxiliares (Th 1), T auxiliares 2 (Th 2) e célula T citotóxica (CD8). Os Th 1 estão

associados à liberação de interferon gama, linfotoxinas, ligante CD40 e fator de necrose tumoral alfa, que em conjunto contribuem para progressão, instabilização e trombogenicidade da placa aterosclerótica. Os linfócitos T auxiliares 2 estão associados a liberação de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10. As células T citotóxicas estão relacionadas à citólise e apoptose. (Hansson et al., 2002; Binder et al., 2002; Rackley, 2009; Wyss et al., 2010; Pei et al., 2009; Geng, 2002) (Figura 3)

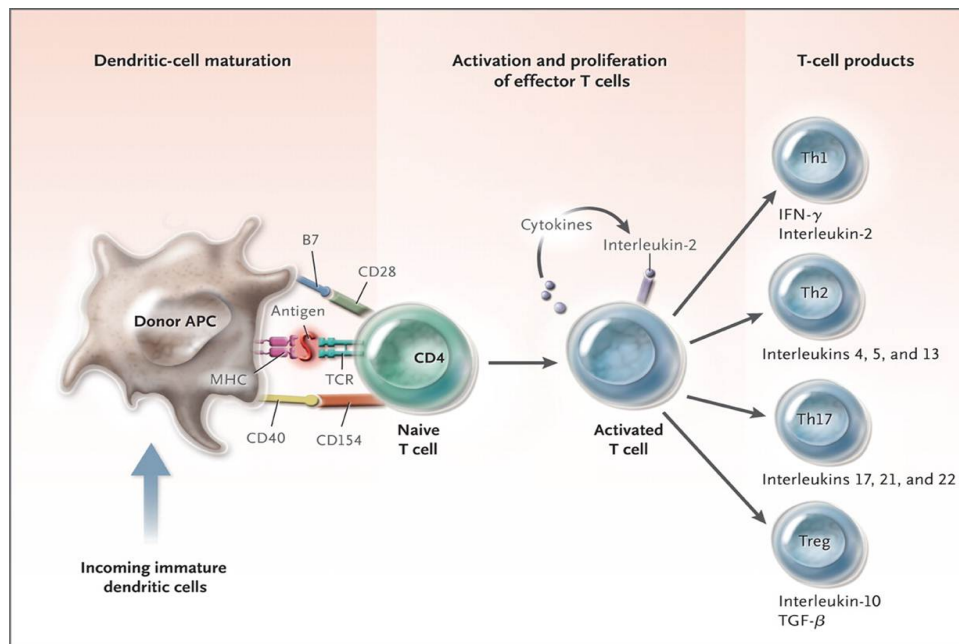


Figura 3. Diferenciação de Células T.
Fonte: Adaptado de NANKIVELL, 2010.

O LDL-colesterol causa aterosclerose pois fica acumulado na íntima das artérias onde é modificada por oxidação e agregação. Partículas derivadas do LDL modificado e oxidado agem como estimuladores da imunidade adaptativa e inata. Elas induzem células endoteliais e musculares lisas a expressarem moléculas de adesão, quimioatraentes e fatores de crescimento que interagem com receptores no monócito e estimulam sua migração e diferenciação em macrófagos e células dendríticas. (Steinberg, 2010; Libby, 2011; Subramanian, 2014).

A ligação do LDL aos proteoglicanos da íntima é uma importante etapa da iniciação da doença, explicando os espessamentos das íntimas das artérias coronárias. Com o progredir da doença, o endotélio torna-se espaçado e a expressão de lipoproteínas na placa promove a habilidade de retenção do LDL

colesterol. São necessários altos níveis de LDL colesterol para indução e progressão das lesões ateromatosas. (Skalen et al.,2002; Tabas,2007).

O recrutamento de macrófagos permite a expressão de diferentes fenótipos dos mesmos que podem exercer diferentes efeitos no desenvolvimento da lesão. Alguns macrófagos agem através do fenótipo M1-like (pró-inflamatório) que reconhece LDL por alguns receptores como por exemplo o Toll – like, eles secretam citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo a citocina 1B, fator de necrose tumoral alfa, enzimas e espécies reativas do oxigênio que podem promover modificações adicionais no LDL. Além disso, outros mediadores da aterosclerose, tais como, ativadores do plasminogênio, catepsinas, e matriz metaloproteinases são ativados ou induzidos por tais macrófagos (Leitinger,2013; Bouhlef et al.,2007; Stoger et al.,2012).

Outro tipo de fenótipo dos macrófagos é o M2-like, que secretam fatores tais como: fator de crescimento beta, pró-revolvedores de lipídeos e outros que favorecem a resolução da inflamação (Tabas,2010).

Ambos os macrófagos e células dentríticas servem de depósito de lipídeos e se transformam em células espumosas por mecanismos que permanecem ainda não totalmente compreendidos. Isto envolve receptores de varredura que se ligam ao LDL oxidado, hidrólise do colesterol livre de agregados de LDL, e direta penetração do LDL ou combinação destes mecanismos descritos acima. Salienta-se que células musculares lisas também podem acumular ésteres de colesterol por mecanismos similares aos descritos acima. (Kunjathoor et al.,2002; HAKA et al.,2009; Witztum,2005).

As células espumosas se ligam aos proteoglicanos da íntima arterial e formam linhas amarelas denominadas estrias gordurosas que são passíveis de reversão desde que seus estímulos formadores sejam interrompidos. Muitas estrias gordurosas não progridem mas outras irão progredir para placa de ateroma. Comumente, estrias gordurosas são observadas em artérias coronárias de pessoas entre os 20 e 30 anos. Em algumas lesões, agregados de lipídeos crescem e formam espécies de “piscinas” que tornam-se mais evidentes após a invasão de macrófagos, Estes processos destroem de forma irreversível a estrutura da íntima. (Witztum,2005).

Apoptose e necrose secundária de células espumosas e células musculares lisas são consideradas importantes causas de desenvolvimento de *necrotic core*. (Moore,2011; Clarke,2009).

Muitos fatores são capazes de induzir apoptose em placas. Em estágios precoces de aterosclerose, inibição seletiva de apoptose de macrófagos aumenta o número de células espumosas indicando que a apoptose apesar de não detectável neste estágio causa um eficiente eferocitose, permitindo um balanço dinâmico entre o recrutamento e a proliferação de macrófagos. (Myoishi et al.,2007; Seimon et al.,2010; Lutgens et al.,1999)

Entretanto, após início do *necrotic core*, a apoptose de macrófagos de células musculares lisas aumentam a formação destes e a inflamação da placa, porque possivelmente, células do sistema fagocitário não removem eficientemente os remanescentes apoptóticos (Schrijvers et al.,2005).

A composição química do *necrotic core* indica que outras fontes de lipídeos também são co-contribuintes, incluindo a acumulação direta de ésteres de colesterol do LDL e colesterol livre das membranas dos eritrócitos decorrentes de hemorragias intraplacas. É possível que macrófagos catalisem reações de hidrólise dos agregados de LDL, o que contribui para altas concentrações de colesterol livre no *necrotic core* (Guyton,2001;Kolodgie et al.,2003;Haka et al.,2013)

O porquê que necrose ocorre em algumas placas, porém em outras não, não é conhecido, e interessante, homens e mulheres desenvolvem quantidades semelhantes de estrias gordurosas na fase precoce da vida, mas os homens têm mais lesões ateroscleróticas progressivas na terceira década de vida (Mcgrill et al.,1997).

Os vasos da placa aterosclerótica originam-se predominantemente da *vasa vasorum* da adventícia, crescendo na base da lesão aterosclerótica e representa uma via alternativa para a entrada de monócitos e células imunes de importância quantitativa não conhecida (Kumamoto,1995; Sluimer et al.,2009; Davies,1984).

A migração e replicação de células endoteliais promovem a formação de neovascularização das placas, o que permite trânsito intra-placa dos mediadores

citados nos parágrafos acima e deposição de sais minerais, principalmente o cálcio (Libby,2008; Hamm et al.,2009).

O fator I alfa induzido por hipóxia é o maior estímulo para neoangiogênese e proliferação da *vasa vasorum* (Fuster,2010).

A nova vasculatura da placa não apresenta células de suporte, são frágeis, espaçadas, permitindo o extravasamento de proteínas plasmáticas e eritrócitos. Este tipo de sangramento é comum em fibroateromas e expandem *necrotic core* e promovem inflamação. (Falk,1983).

Outra fonte comum de hemorragia de placa é o extravasamento de sangue através de rotura da capa fibrosa. Hemorragia da placa é associada com macrófagos do fenótipo hemoglobina induzido que expressa CD163, que é um receptor de varredura que capta hemoglobina ligada com hepatoglobina e desta forma protege contra os efeitos citotóxicos da hemoglobina livre. Estes macrófagos não apresentam marcas típicas dos macrófagos M1, expressam receptores de diferenciação do macrófago M2 e são resistentes a formação de células espumosas(Finn,2012).

Informações recentes atestam que a resposta inflamatória para hemorragia intraplaca é acentuada em pacientes com Diabetes Mellitus e por isso existe um risco elevado desta doença em indivíduos com hemoglobina glicosilada elevada. (Purushothaman et al.,2012; Cahill et al.,2013).

3.3 O Tecido Fibroso da Placa e o Papel das CMLs

O tecido conectivo das lesões é inicialmente da camada íntima e do espessamento adaptativo, porém gradualmente, ocorre perda fibrocelular, que é reposta e expandida por tecido fibroso rico em colágeno que às vezes cresce e torna-se o componente dominante das placas. Tecidos que estão entre o *necrotic core* e a superfície da placa são fibrosos e têm alto conteúdo de colágeno tipo 1(Kragel et al.,1989).

O colágeno, a elastina e os proteoglicanos da matriz fibrosa são produzidos por células musculares lisas. Estas células na placa são caracterizadas por um

grande retículo endoplasmático e complexo de Golgi e espaços miofilamentos (Stary,1999).

Este fenótipo é chamado sintético e é diferente do fenótipo contrátil de células musculares lisas da média. O número de células musculares lisas no ateroma é subestimado, pois muitas delas não contem proteínas contráteis e não podem ser reconhecidas rotineiramente (Stary et al.,1995).

A habilidade de migração de células musculares lisas contráteis da camada média para a íntima e sua transformação no fenótipo secreto, isto mediado por marcadores inflamatórios tem sido reconhecida por décadas (Gomez et al.,2013; Campbell,2012).

Tais células migram da camada média para íntima, onde expressam um fenótipo embrionário, tornando-se capaz de secretar uma série de substâncias que estimulam a produção de matriz extracelular. O fator de crescimento derivado das plaquetas, o fator de crescimento derivado dos fibroblastos, a angiotensina II e a endotelina são substâncias que mediam a migração das células musculares lisas (CML). As CMLs também podem aumentar sua quantidade no ateroma por processo de mitose. Entretanto, é possível haver apoptose dessas células que é sinalizada por pelos linfócitos T. Portanto a quantidade de CMLs depende do balanço entre migração, divisão e apoptose (Pei et al.,2009;Boyle,2003).

Recentemente, outras origens de CMLs na placa têm sido reportadas, incluindo células progenitoras circulantes, subpopulações do tipo sintética da camada média, células tronco multipotentes na média ou na adventícia (Bentzon,2010; Nguyen et al.,2013).

A matriz celular é o maior componente de uma placa aterosclerótica. É composta predominantemente por colágeno tipo I e III, proteoglicanas e fibras de elastina. Os linfócitos T sinalizam para fatores de crescimento derivados das plaquetas e TGF Beta que estimulam as CMLs a produzirem matriz extracelular. Enquanto a via citada determina a produção de matriz, certas enzimas conhecidas como matriz metaloproteinases agem dissolvendo-a. Portanto a quantidade de matriz extracelular depende do balanço entre as citadas vias de produção e degradação (Dollery,2006).

Calcificações são comuns na aterosclerose progressiva e aumentam com a idade. Restos de células apoptóticas, matriz extracelular e *necrotic core* agem para formação de grãos de cálcio que agem na estimulação de pontos de calcificação que podem progredir para grande depósito de cálcio. O *necrotic core* pode sofrer processo completo de calcificação (Otsuka et al.,2014; Stary,2001;Qiao et al.,1995).

A metaplasia óssea pode ocorrer em lesões humanas mas é raro nas artérias humanas. Algumas vezes, existe presença de placas fibrocalcificadas sem acúmulos de lipídeos extracelular ou *necrotic core*. O mecanismo de formação destas placas não é completamente compreendido (Qiao et al.,1995; Otsuka, 2013).

Durante a aterogênese, o seguimento do vaso tende a se remodelar em crescimento externo para acomodar a placa ateromatosa sem que haja o comprometimento da luz arterial (Glagov et al.,1987).

Este remodelamento expansível é visto mais comumente em placas fibroateromas e é correlatado positivamente com a inflamação da placa, atrofia da média e tamanho do *necrotic core*. A este tipo de remodelamento dá-se o nome de positivo (Nishioka et al.,1996; Varnava,2002;BURKE,2002).

Placas fibrocalcificadas podem ter o chamado remodelamento negativo, no qual o vaso diminui seu diâmetro máximo, como se encurtasse e pequenas quantidades de aterosclerose podem comprometer a luz arterial. (Nishioka et al.,1996; Varnava,2002; BURKE,2002).

Aterosclerose pode determinar obstrução do fluxo coronariano e causar angina do peito estável, mas raramente é fatal na ausência de cicatriz do miocárdio, que determina arritmia e pode causar morte súbita (Davies,2000).

Síndromes coronarianas agudas ocorrem por oclusão trombo-luminal ou uma hemorragia súbita na placa com ou sem vasoconstricção associada. Quando existe supra desnivelamento do segmento supra ST, na maioria das vezes existe um trombo oclusivo, porém, quando não existe supra-desnivelamento do segmento ST no eletrocardiograma, este trombo produz apenas uma colusão parcial da artéria. (Davies,2000; Libby,2006).

A rotura da placa é a causa mais frequente de trombose. Existe uma rotura da placa fibrosa e a exposição de material subcapsular altamente trombogênico ao sangue. A partir disto, as plaquetas se aderem ativam e agregam-se desencadeando o processo de formação de um trombo sobre uma placa aterosclerótica rota. Em casos raros, um nódulo de cálcio pode protundir através da cápsula e ser o mecanismo precipitante da trombose (Libby,2006; Falk,1995; Schaar et al.,2004; Falk,2013).

Quando não pode ser identificada rotura da capa através da microscopia, mas existe a formação de um trombo, justifica-se isto pelo fenômeno de erosão da placa. (Libby,2006).

Este termo foi escolhido, porque o endotélio é ausente abaixo do trombo. Recentes informações revelaram que a rotura da placa é um mecanismo fisiopatológico mais comum das Síndromes Coronarianas Agudas (SCA) (Angina estável, infarto agudo do miocárdio e morte súbita) (Libby,2006; Falk,1995; Schaar et al.,2004;Falk,2013).

Alguns estudos têm revelado que o diabetes mellitus (DM), o tabagismo e os níveis de dislipidemia (DLP) estão associados com níveis de trombose nas SCA por rotura da placa (Schaar et al.,2004; Falk,2013).

A rotura da placa ocorre onde a capa é mais fina e mais infiltrada por células espumosas. Em placas excêntricas, o ponto mais fraco são os ombros destas, e apenas capas fibrosas finas estão sobre risco de rotura.(Falk,1995).

Quando a capa fibrosa tem menos de 65 micrometros, existe risco de rotura e afinamento da capa fibrosa que envolvem dois mecanismos: 1- é a perda gradual de células musculares lisas da capa fibrosa. Capas rotas contem menos células musculares lisas e menos colágenos que capas intactas. Essa redução do colágeno ocorre devido a ação de macrófagos que estão infiltrados na placa e degradam este colágeno (Libby,2006; Kolodgie et al.,2001; Van Der Wal et al.,1994).

A habilidade das estatinas em proteger contra eventos agudos indica que este tipo de inflamação é derivado de lipoproteínas, capas rotas contêm bastante células espumosas derivadas de macrófagos, as quais secretam enzimas proteolíticas, tais como ativadores dos plasminogênio, catepsinas, e matriz metaloproteinases. Uma

prova deste princípio é a presença de macrófagos secretores MMP-9 que em modelos animais degradam a matriz extracelular e produz afinamento da capa fibrosa e desta forma aumenta a chance de rotura da mesma. (Falk,1983; Van Der Wal et al.,1994; Gough et al., 2006).

O processo de desenvolvimento da placa aterosclerótica e afinamento da capa fibrosa é extremamente lento, por isso apesar de nas fases iniciais da vida já haver estrias gordurosas, os eventos clínicos comumente ocorrem após a quarta e quinta década de vida (Stary et al.,1995; Dalager et al.,2007).

A rotura de uma placa fibrosa fina e a trombose subsequente geralmente ocorre espontaneamente, mas em alguns casos, um aumento temporário no estresse emocional ou físico é um fator desencadeante deste evento. Fatores desencadeantes conhecidos são, atividades físicas, sexuais, raiva, ansiedade, estresses no trabalho, terremotos, guerras, ataques terroristas, mudanças de temperatura, infecções e uso de cocaína. O ritmo do ciclo circadiano também pode desencadear o rompimento da placa, que ocorre predominantemente pela manhã. (Mittleman,2011; Muller et al.,1985;Martin et al.,2012).

O mecanismo que determina a trombose sem rotura da placa é uma das mais importantes não resolvidas questões nas pesquisas com aterosclerose. O endotélio abaixo do trombo é usualmente ausente, mas não existe características morfológicas identificadas na placa que predisponham a formação do trombo. Alguns autores têm focado em reações inflamatórias existentes abaixo do trombo. Vasoespasma também tem sido sugerido como uma causa de lesão endotelial e consequentemente de trombose. (Libby,2006; Kramer et al.,2010;Virmani et al.,2006).

Estudos de autopsia indicam que apenas a minoria das roturas ou erosões determinam eventos clínicos. A magnitude da resposta trombótica sobre uma placa rota ou erodida varia extremamente. (Davies et al.,1989; Mann,1999).

Provavelmente, os determinantes clássicos da tríade de Virchow: trombogenicidade do material exposto, distúrbios de fluxo local e propensão sistêmica a trombose. Com a rotura da placa, colágeno, centro trombogênico de lipídeo, tecido apoptótico são expostos aos agentes trombogênicos do sangue

circulante. A erosão da placa é provavelmente menos trombogênica que a ruptura. (Falk,2013; Barua,2013; Fernandez-Ortiz,1994).

A relação temporal entre a ruptura de uma placa e o início dos sintomas não é facilmente compreendida. Algumas vezes, o material da placa é encontrado dentro do trombo indicando a formação deste imediatamente após a ruptura da placa (Falk 1983; Van Der Wal et al.,1994).

Em outros casos, a resposta trombótica é dinâmica e trombose e trombólises associadas com vasoespasmos ocorrem simultaneamente, determinando alterações de fluxo intermitentes e formação tardia do trombo. Algumas vezes, o fluxo sanguíneo continua através de uma lesão rota e trombo suboclusivo sobre esta, porém, existe microembolizações distais que comprometem a viabilidade do miocárdio. (Falk,1985).

No padrão não uniforme do denso colágeno tipo 1 ou do colágeno tipo 3 indica cicatrização de uma placa rota e pode ser identificada em muitas placas coronarianas, particularmente, naqueles que provocam crônico alto percentual de estenose (Libby,2006; Mann,1999).

Para alguns, este evento indica que de uma forma silenciosa, a placa pode sofrer ruptura ou erosão seguida de trombose e cicatrização sem a ocorrência de eventos clínicos (Yee,1999).

Em pesquisas clínicas existe a necessidade de caracterização da aterosclerose ou de placas individualmente de acordo com características que permitam identificar o estado evolutivo e o risco de evolução da mesma, alguns termos aplicados neste contexto: carga de placa, atividade e vulnerabilidade (Schaar et al.,2004).

Quantidade ou carga de placa é a medida da extensão da aterosclerose no corpo ou em particular sítio vascular independente da atividade e composição da mesma. Isto pode ser medido pelo volume da placa, superfície arterial coberta por lesões (Dalager et al.,2008; Otsuka et al.,2012).

Devido a aterosclerose ser uma doença multifocal que pode afetar a vasculatura inteira do organismo tendo uma elevada quantidade de placa em um

território pode significar a presença de doença avançada em qualquer território vascular susceptível.(Otsuka et al.,2012; Sillesen et al 2012).

Consistente com a característica de modificação lenta de tecidos fibróticos e hipocelulares, a quantidade de placa muda vagarosamente e de forma modesta com a terapia que diminui o risco de eventos clínicos agudos (Kragel et al.,1989; Gonçalves et al.,2010).

Dentre os diferentes componentes da placa aterosclerótica, lipídeos e macrófagos parecem ser os mais relacionados a regressão. Atividade da doença ou de placas individuais é importante, porém um difícil conceito. A habilidade de avaliar esta atividade por biomarcadores ou exames de imagem poderia contribuir para o descobrimento de fatores causais e terapias que controlassem a placa aterosclerótica e com isso reduzissem a chance de eventos clínicos. (Kini et al.,2013; Björkegren et al.,2014).

Infelizmente, não existem estudos que tenham avaliado com possibilidade de aplicação clínica tal atividade. Existe uma dificuldade quanto ao conceito de atividade da placa pois não é simples defini-lo, alguns autores utilizam a mensuração da inflamação, outros a densidade de macrófagos na placa (Falk,2006).

Existem outros processos em placas ateroscleróticas, tais como: necrose intimal que tem sido relacionada com atividade da placa, destaca-se ainda a angiogênese, ausência de endotélio, sangramento da placa e outros (Falk,2006).

Acredita-se haver diferenças importantes entre a inflamação no início da aterosclerose e a inflamação local na capa fibrosa que determina sua rotura portanto, o conceito e a medida da atividade da placa representam um desafio da cardiologia moderna (Kolodgie et al.,2001; Falk,2006).

Para predizer quais placas estão em riscos de formação de trombo e entender os mecanismos que levam a isto, muitos esforços têm sido desprendidos na tentativa de identificar fatores relacionados às chamadas placas vulneráveis, ou seja, aquelas que têm alto risco de trombose num curto intervalo de tempo (Schaar et al.,2004).

O termo placa vulnerável tem sido mais utilizado para descrever a presença de certas placas em pacientes que apresentam um risco em curto intervalo de tempo de sofrerem trombose e determinarem um evento clínico agudo. Isto depende da quantidade de placa, da vulnerabilidade da placa numa propensão trombótica sistêmica e uma susceptibilidade do miocárdio a isquemia e a arritmia (Schaar et al.,2004).

Marcadores de riscos de vulnerabilidade de placas são grandes *necrotic core*, capas fibrosas finas (menor 65micrometros), alta densidade de macrófagos, poucas células musculares, remodelamento positivo, neovasculatura, hemorragia de placa, inflamação da adventícia e perivascular, e pontos de calcificação (Falk,1995; Kolodgie et al.,2001)

Aspectos hidro-hemodinâmicos são relevantes no processo aterosclerótico. O estresse laminar estimula a superóxido dismutase, óxido nítrico sintetase, fator KupferLike 2 (antiinflamatório, antitrombótico e vasodilator), Ikb2 (atuando na inibição do fator nuclear Kappa Beta), determinado redução do estado inflamatório e pró-trombótico) e diminui o *Thioredoxin-interacting protein* (TxNIP) (atuando no aumento de tioredoxina, determinando efeito antiinflamatório e reduzindo ASK e JNK/p38) (Falk,1983; Libby,2006).

Estudos têm sugerido participação dos mastócitos no processo aterosclerótico, pois são encontrados em lesões ateroscleróticas e acredita-se que causam inflamação pela secreção de citocinas que podem atrair outras células imunológicas e alterar a atividade de células endoteliais, da musculatura lisa ou de proteases envolvidas no remodelamento vascular (Rackley,2009).

3.4 IL-17A na Doença Arterial Coronariana

Uma linhagem de linfócitos T, chamados de 17 têm sido relacionada à doença aterosclerótica coronariana. Essas células produzem interleucinas, tais como IL 17-A, IL- 21, IL- 22 e outras. Essas citocinas induzem a expressão de IL-6, IL8, IL1 Beta, fator de necrose tumoral, proteína C reativa, quimiocinas, moléculas de adesão, prostaglandinas E2, oxido nítrico, cicloxigenase 2, matriz metaloproteinases, células endoteliais, células musculares lisas e macrófagos. Em 2006, Hashmia e colaboradores demonstraram que na síndrome coronariana aguda os níveis de IL-17

e linfócitos T 17 estão elevados (Hashmia et al.,2006). Em 2008, Cheng e colaboradores realizaram estudo que confirmou a elevação das IL-17 e dos linfócitos T 17 em sangue periférico de pacientes com síndrome coronariana aguda (Cheng et al. 2008)

A DAC pode ter apresentações clínicas diversas, a saber: doença arterial crônica estável (angina estável e isquemia silenciosa) e síndrome coronariana aguda (angina instável, infarto agudo do miocárdio e morte súbita). (Hani et al.,2012;Patrick et al., 2012; Stephan et al.,2012).

Na DAC crônica existe crescimento progressivo da placa de ateroma e quando este obstrui 70% ou mais do diâmetro interno da artéria pode haver isquemia do miocárdio relacionada ao aumento das necessidades de oxigênio e nutrientes (isquemia de demanda). (Hani et al.,2012; Patrick et al., 2012; Stephan et al.,2012).

O paciente pode apresentar sintomas (angina estável) ou não, sendo neste caso detectado a isquemia por exames complementares (isquemia silenciosa) (Hani et al.,2012; Patrick et al., 2012; Stephan et al.,2012).

Nas síndromes coronarianas agudas o substrato fisiopatológico na maioria das vezes é a formação de um trombo relacionado a uma placa aterosclerótica que não obstrui mais que 70% do vaso. Tal placa sofre rotura da capa fibrosa e existe exposição de material trombogênico ao sangue circulante, sendo desencadeado os mecanismos formadores de trombo (Hani et al.,2012; Patrick et al., 2012; Stephan et al.,2012).

Quando existe sintomas pode levar também a certas alterações eletrocardiográficas e de enzimas cardíacas que dividem os pacientes naqueles com infarto agudo do miocárdio (oclusão total da artéria) ou com angina instável (suboclusão da artéria). (Hani et al.,2012; Patrick et al., 2012; Stephan et al.,2012).

A oclusão súbita de uma artéria coronariana pelo mecanismo descrito acima pode determinar a morte rápida e inesperada do paciente, o que é denominado morte súbita. (Hani et al.,2012; Patrick et al., 2012; Stephan et al.,2012).

A terapia farmacológica dos pacientes com DAC é baseada nas seguintes classes de medicações: antiagregantes plaquetários (aspirinas, clopidogrel, ticagrelol e prasugrel), anticoagulantes (heparina não fracionada, heparina de baixo peso molecular, fondaparinux e bivalirudina), anti-isquêmicos (nitratos, betabloqueadores, bloqueadores dos canais de cálcio) e outras medicações como exemplo: vastatinas, inibidores da enzima de conversão da angiotensina, antiarrítmicos, etc. (Hani et al.,2012; Patrick et al., 2012; Stephan et al.,2012).

Os tipos de medicações utilizados no tratamento dos pacientes dependem dos tipos de manifestações clínicas e de características próprias dos pacientes. (Hani et al.,2012; Patrick et al., 2012; Stephan et al.,2012).

4 HIPÓTESE

As interleucinas IL-17A não está aumentada no sangue periférico de pacientes brasileiros com diagnóstico angiográfico de doença arterial coronariana crônica.

5 METÓDOS

5.1 Delineamento do Estudo

Esse foi um estudo transversal, prospectivo e analítico, realizado no período de março de 2012 a agosto 2013 no setor da Hemodinâmica do Hospital das Clínicas da UFPE e no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT). O período de recrutamento dos pacientes foi de março de 2012 a dezembro de 2012.

5.2 População

A amostra foi composta de 40 pacientes (definição arbitrária dos pesquisadores) atendidos nos Hospital das Clínicas da UFPE.

Foram incluídos os pacientes que apresentarem todos os critérios de inclusão, e excluídos aqueles que tiverem pelo menos um dos critérios de exclusão.

Critérios de inclusão: Idade entre 18 e 80 anos, presença de doença arterial coronariana crônica em classe funcional Cardiovascular Canadian Society III ou IV

com cintilografia do miocárdio evidenciando isquemia (na vigência de tratamento clínico otimizado), que não tenham sido submetidos a nenhuma modalidade de revascularização do miocárdio, que tivessem pelo menos uma estenose coronariana $\geq 50\%$ de acordo com angiografia coronariana realizada no dia do recrutamento.

Critérios de exclusão: pacientes com hepatopatia ou pneumopatia grave, portadores de câncer ou qualquer doença reumatológica ou imune, ou que tivessem sofrido doença aguda nos últimos 3 meses.

Foram avaliadas as IL-17A de 20 voluntários saudáveis, sendo os resultados usados como referência dos valores normais. Todos os paciente e controles foram orientados quanto ao estudo, com concordância e assinaram do termo de consentimento livre e esclarecido.

5.3. Ficha clínica do estudo

Os pesquisadores utilizaram uma ficha clínica estruturada para coleta de variáveis clínicas e de exames complementares de interesse (anexo 03).

5.4 Protocolo de avaliação de Interleucinas Inflamatórias IL-17A

5.4.1 Coleta de amostras de sangue periférico

Para este estudo foi necessário coletar amostras do sangue periférico. As coletas foram feitas por profissionais devidamente treinados para reduzir os riscos para o paciente. Nenhuma coleta foi realizada sem a autorização prévia dos voluntários. Para isso, membros da equipe apresentaram aos pacientes o objetivo do estudo e o interesse da sua participação. As amostras de sangue periférico foram obtidas em tubos de coleta (vacuette) contendo anticoagulante heparina (2x9ml), dos quais foram isoladas as PBMCs. Também coletamos amostras de sangue periférico em tubos secos contendo gel separador (1x5ml), dos quais obtivemos o soro. Anteriormente, a análise das citocinas, as amostras de sangue periférico contidas nos tubos secos com gel separador foram centrifugadas à 1811G por 10 min, sendo então obtido o soro que foi armazenado em tubos eppendorf de 1,5ml e estocados a temperatura de -80°C para posterior quantificação de citocina.

5.4.2 Cultura de PBMCs de Pacientes com DAC crônica e Controles Sadios

As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram isoladas a partir do sangue total por centrifugação com FicollPaque™ Plus (GE HealthcareBio-Sciences) no Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT) do Núcleo de Pesquisa e Inovação Terapêutica (NUPIT). As PBMCs isoladas foram contadas e cultivadas na concentração (10^6 células/1000 μ L) em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com L-Glutamina, 10% de Soro Bovino Fetal (Lonza), 10mM de HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) (Gibco) e 200U/mL de Penicilina/Estreptomicina (Gibco) em placa de cultura de 24 poços (TPP). Foram determinadas 2 condições: apenas células e células estimuladas com anti-human CD3 e anti-human CD28 (Ebiosciences) nas devidas concentrações 2,5 μ g/mL e 2,0 μ g/mL. Estas células foram cultivadas à 37°C em estufa de CO₂ (5%, Ultrasafe, HF 212 UV) durante 48 horas. A contagem foi efetuada em Câmara de Neubauer. Após o período de 48 horas, os sobrenadantes de cultura com a produção espontânea e estimulada de citocinas foram coletados e armazenados à -20°C. (Figura 4).

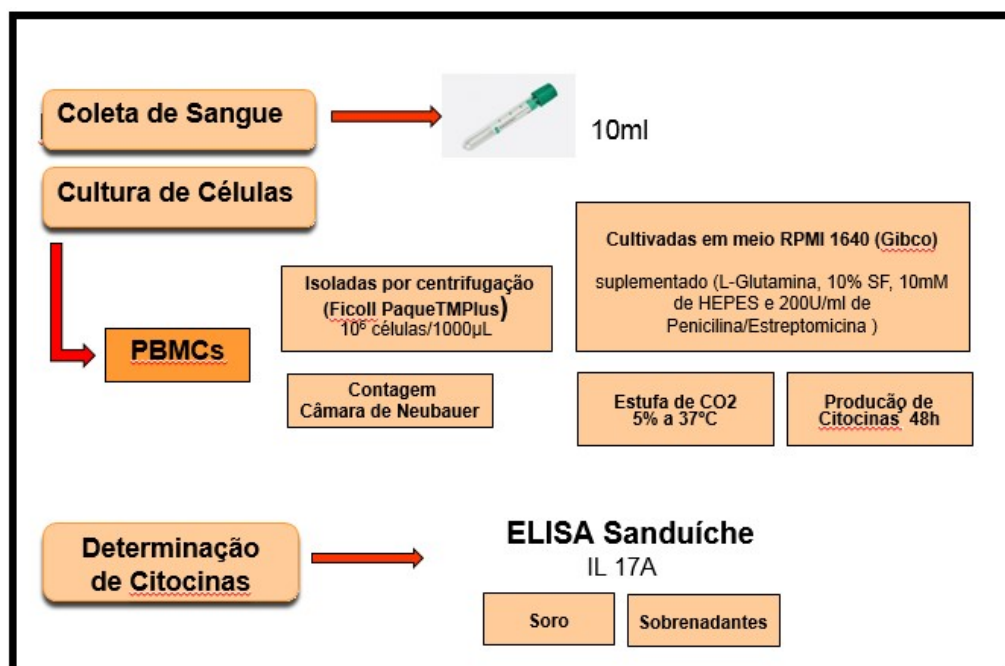


Figura 4. Protocolo de avaliação das citocinas inflamatórias.

5.4.3 Determinação de citocinas

As citocinas presentes no sobrenadante de cultura e no soro dos pacientes e dos controles foram quantificadas por ELISA sanduíche (Enzyme-linked immunosorbent assay) analisando a citocina IL-17A (Ebiosciences), seguindo as informações recomendadas pelos fornecedores. Os resultados colorimétricos obtidos a partir da etapa final do ELISA sanduíche foram lidos no espectrofotômetro (EL808, Biotek) na faixa de 450 e 570 nm. O limite de detecção para cada kit foi: IL-17A (3,906 pg/ml).

5.5 Fluxograma do estudo

Os potenciais candidatos foram identificados no setor de cardiologia invasiva do Hospital das Clínicas da UFPE (pacientes com indicação clínica de cinecoronariografia) de contato pessoal dos investigadores com os mesmos.

Após avaliação dos critérios de inclusão e exclusão, aos pacientes que preencheram os critérios foi explicado o estudo, com seus potenciais benefícios e riscos. Em seguida os pacientes foram convidados a participarem da pesquisa, sendo que para aqueles que aceitaram foram solicitadas as assinaturas do termo de consentimento livre e esclarecido do estudo (anexo 1).

A seguir foi realizada uma anamnese e um exame clínico direcionados para preenchimento da ficha clínica do estudo. Posteriormente foi coletada uma amostra de 10 mililitros de sangue periférico. O sangue coletado foi enviado para o núcleo de pesquisa e inovação terapêutica (NUPIT), onde foram avaliadas as citocinas inflamatórias.

No Hospital das Clínicas foram identificados os 20 voluntários saudáveis (funcionários ou estudantes da área de saúde) aos quais foram explicados o estudo, riscos e benefícios. Em seguida foram convidados a participarem da pesquisa, e os que aceitaram assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido de voluntário (anexo 2), sendo posteriormente realizada a coleta do sangue e o envio ao LINAT para avaliação dos marcadores inflamatórios. (Figura 5)

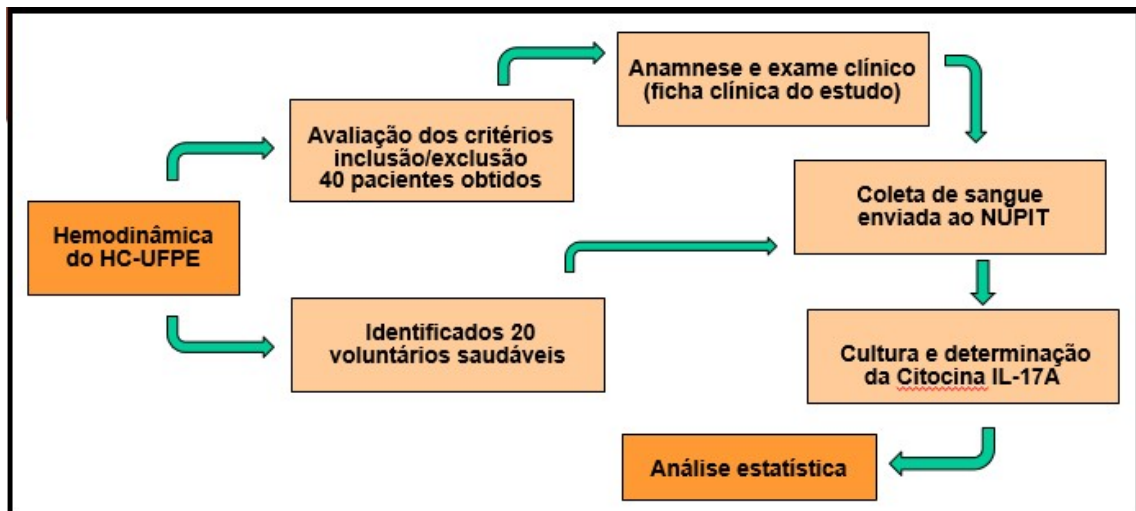


Figura 5. Fluxograma do estudo

5.6 Análise Estatística

As variáveis categóricas foram descritas na forma de percentagem, enquanto as numéricas na mediana e valores máximo e mínimo, devido a distribuição anormal. A verificação da normalidade da distribuição dos valores foi realizada aplicando-se o teste de Normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Foram realizadas descrições estatísticas das frequências das variáveis de interesse do estudo (clínicas e laboratoriais). Análise comparativa das interleucinas foi realizada através do teste T não paramétrico de Mann-Whitney. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes, enquanto valores entre 0,05 e 0,10 serão marginalmente significativos. Foi utilizado o programa SPSS versão 15.

5.7 Aspectos Éticos

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da instituição e apenas teve início após a aprovação do mesmo. Protocolo de aprovação: Registro CEP/CCS/UFPE nº 297/10 (anexo 4).

6 RESULTADOS

6.1 Resultados I: Artigo original sobre IL 17 (Normas da Revista e Aceite – Anexo 5 e 6)

Interleucina 17A Expressão na Doença Arterial Coronariana
Crônica

Interleukin 17A Expression in Chronic Coronary Artery Disease

Titulo resumido: Interleucina 17A na Doença Arterial Coronariana

Palavras Chaves: Interleucina 17, doença arterial coronariana, angiografia coronariana

Interleukin 17 A Expression in Chronic Coronary Artery Disease

Key words: Interleukin 17 A, coronary artery disease, inflammation

Dinaldo Cavalcanti de Oliveira *, MD, PhD

Elayne Heide

Moacyr Rego, PhD

Maira Galdino Pitta, PhD

Hospital das Clínicas. Universidade Federal de Pernambuco.

Recife- PE, Brasil.

Autor Correspondente:

Dinaldo Cavalcanti de Oliveira

Division of Cardiology, Internal Medicine department.

Av Prof. Moares Rego, 1235, cep:50670-901, Cidade Universitaria, Recife, Pernambuco, Brasil.

*Professor of Medicine at Federal University of Pernambuco

ABSTRACT

The role of the immune and inflammatory pathways in coronary artery disease (CAD) is important but not completely understood. The aim of this study was to evaluate interleukin 17 A levels in patients with stable coronary artery disease.

This is a cross-sectional, prospective, analytical study, conducted from August to December 2012. We included 40 patients (P) with stable CAD, and 20 healthy volunteers (C) to take up comparison of interleukin concentrations. There were 26 men and 14 women in the group of the patients and 12 men and 8 women in the controls. The age was similar between the groups. The comparison between the groups showed: Interleukin 17 A: Serum: P = (P) = 3,91 (3,91--3,91) vs (C) = 3,91 (3,91--3,91), $p = 0.3$; culture without stimulus: P = 3,91 (3,91--3,91) vs C = 3,91 (3,91--3,91), $p = 0.3$; culture with stimulus: P = 222,12 (27,60--707,35) vs C = 154,39 (3,91--574,80), $p = 0.4$. There were no differences in interleukin 17 concentrations, does not matter serum, cell in culture. In conclusion, patients with stable CAD did not have interleukin 17 A concentrations increased.

INTRODUCTION

Coronary atherosclerosis is a major cause of death in humans. The roles of inflammation and immunity in the pathophysiology of coronary artery disease (CAD) and in the occurrence of clinical events have been clarified in recent years [1,2].

The progression of atherosclerosis is associated with both the innate and adaptive immune systems. Macrophages, which are cells that play a central role in atherosclerosis, produce inflammatory cytokines and growth factors that have an essential participation in the pathophysiology of atherosclerosis [3-5].

Three cell lines originating from CD4 lymphocytes are closely associated with atherosclerosis, namely Th1 and Th2 T-helper cells and cytotoxic T cells (CD8) [3-8].

A new T-lymphocyte cell line, T-helper 17 cells (Th17), has been associated with coronary atherosclerotic disease. These cells produce interleukins such as IL-17, IL-21, and IL-22. These cytokines induce the expressions of IL-6, IL-8, IL-1 beta, tumor necrosis factor, C-reactive protein, chemokines, adhesion molecules, prostaglandins E2, nitric oxide, cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinases, endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages [9,10].

Although the participation of IL-17 in CAD has been studied, several aspects still need to be clarified [9,10].

The primary objective of the present study was to compare serum IL-17 levels between patients with CAD and healthy volunteers. In addition, we compared the IL-17 levels in cell cultures with and without stimulation from patients and controls.

METHODS

This was a prospective, descriptive, and cross-sectional study conducted between

August and December 2012. This study was conducted in accordance with the ethical principles regarding clinical research and was approved by the clinical research ethics committee of the institution where it was performed.

The study sample was defined empirically by the researchers. It included 40 patients with CAD and Canadian Cardiovascular Society functional class III or IV; who had myocardial scintigrams showing ischemia (under optimized medical treatment) but had not undergone myocardial revascularization; who had at least one coronary stenosis $\geq 50\%$ according to the result of the coronary angiography performed on the recruitment day; who did not have severe liver or lung disease, cancer, or any rheumatic or immune disease; who had not undergone acute disease in the last 3 months; and who agreed to participate in the study by signing the consent form.

Twenty healthy volunteers were selected as controls and were matched with the patients (1:2) for sex and age (± 3 years).

The clinical characteristics of the patients were evaluated by anamnesis and physical examination, and data were collected and stored through questionnaires.

Coronary angiography was performed according to the standard technique. Stenoses were categorized as moderate (50% to 69% obstruction) and severe ($\geq 70\%$ obstruction).

The patients were categorized according to the number of arteries with stenosis; they were considered as having a single-artery disease (one artery with stenosis $\geq 50\%$), a two-artery disease (two arteries with stenosis), or a multi-artery disease (3 or more arteries with stenosis) [11].

A 10-mL sample of peripheral blood was collected from the patients and controls immediately after recruitment, which was sent to the laboratory for enzyme-linked

immunosorbent assay (ELISA) and cell culture.

Mononuclear cells were extracted from the heparinized peripheral blood samples from the patients and controls. These cells were then isolated using the standard Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation method (GE Healthcare). The cells were placed in a Neubauer chamber, and cell viability was determined using the trypan blue exclusion method. Cells were used when viability was >98%. Comparisons were made after 48 hours of culture with and without stimulation.

ELISA kits were used (according to the manufacturer's instructions) to determine IL-17 concentrations. The lower detection limit was 0.03 pg/mL.

Descriptive statistical analysis was performed to describe the clinical variables and complementary tests in the study. The Kolmogorov-Smirnov normality test was applied for quantitative variables, and the Mann-Whitney nonparametric test was used to compare the groups. A $P \leq 0.05$ was considered as statistically significant. The categorical variables were expressed as percentages, and the numerical were expressed as median and range values.

Comparative analyses of IL-17 levels in serum and cell cultures with and without stimulation were performed between the patient and control groups. In addition, IL-17 levels were compared between the diabetic, dyslipidemic, and smoker patient groups. The analyses were performed using the SPSS version 15 software.

RESULTS

The patient group included 24 men and 16 women, and the control group was comprised of 12 men and 8 women. No significant difference in age was observed between the groups patients: 63.2 ± 8.9 years and controls: 57.9 ± 9.4 years, $p =$ not significant).

The following were the main clinical characteristics of the patients: systemic arterial hypertension (SAH), 100%; dyslipidemia (DLP), 47.5%; diabetes mellitus (DM), 37.5%;

smoking, 47.5%; history of acute myocardial infarction, 35%; alcoholism, 30%; peripheral artery disease, 15%; stroke, 5%; and chronic kidney disease, 5%. The most frequent family histories were the following: SAH, 28%; DM, 14%; DLP, 14%; CAD, 13%; and stroke, 6%.

Stenosis $\geq 50\%$ was present in the anterior descending artery in 31 patients, in the circumflex artery in 19 patients, and in the right coronary artery in 24 patients. No cases of stenosis were observed in the left coronary branch. Eighteen patients (45%) had single-artery disease, 8 patients (20%) had two-artery disease, and 14 patients (35%) had multi-artery disease.

The results of the comparisons of the IL-17 A levels between the groups (patients vs. controls) were as follows: serum, 3.91 (3.91–3.91) vs 3.91 (3.91–3.91), $P = 0.3$; cell culture without stimulation, 3.91 (3.91–3.91) vs 3.91 (3.91–3.91), $P = 0.3$; cell culture with stimulation, 222.12 (27.60–707.35) vs 154.39 (3.91–574.80), $P = 0.4$. (Table 1)

In addition, no significant differences in IL-17 A levels were observed between the diabetic, dyslipidemic, and smoker subgroups in the assessed scenarios (Tables 2 and 3).

DISCUSSION

Our study demonstrated that the IL-17 A levels were not increased in the patients with chronic and stable CAD, and coronary stenosis $\geq 50\%$ on coronary artery angiography.

Atherosclerosis is caused by the penetration of abnormal circulating lipoproteins into the arterial walls and inflammation resulting from vascular injury that contributes to the formation of atheroma [12,13]. These phenomena that occur in the coronary arteries lead to CAD [13].

The progression of CAD includes phases such as rupture or erosion of the atheromatous plaque, intraplaque hemorrhage, inadequate arterial remodeling, inflammatory

aneurism, and embolization of plaque debris. Inflammation plays a significant role in all these phases [14].

Active chronic inflammation with periods of exacerbation is a characteristic of CAD¹⁵. Inflammation is activated by innate immunity via myeloid cells and innate lymphocytes that recognize antigens and present them to T lymphocytes, thus initiating an adaptive immune response [15,16].

CD4⁺ T cells are the major effectors of adaptive immunity; they release interleukins that act on myeloid cells, other lymphocytes, and tissue cells to eradicate sources of antigens [16].

Th17 cells that produce IL-17 exhibit plasticity by changing the effector cytokines they release in response to environmental stimuli; they are sometimes converted from effector cells into protective regulatory T cells [17].

The roles of IL-17 in CAD are controversial. Some authors believe that this cytokine has a pro-atherosclerotic effect, and others state that it has an atheroprotective action [18]. However, it is an uncontested fact that IL-17 has been found in plaques of human atheromas [19].

In the study by Zhendon et al [20], IL-17 did not have correlations with the thickness of the intima-media complex of the carotid arteries, which is a measure that is known to have a correlation with CAD.

Patients with acute coronary syndromes exhibit higher IL-17 levels, compared with patients with stable CAD or healthy controls [21]. A possible explanation for this is the fact that this interleukin induces apoptosis in the cells of the vascular endothelium and accumulation of macrophages in the atheroma plaque, thus leading to rupture and thrombosis.

In addition, it induces the release of other ILs such as IL-6 and IL-8 [18,21].

However, the immunoinflammatory response has a dynamic aspect that is affected by the type and quantity of existing cytokines; this balance determines the final pro- or anti-atherogenic effect of some cells and molecules. In this scenario, the environment in which the events and sources of antigens occur has a relevant role [13,15,22,23].

Our comparison between the patients with stable CAD and controls did not show an increase in IL-17 A. We can thus hypothesize that the differentiation of T lymphocytes into Th17 cells and subsequent production of IL-17 A did not occur or was not sufficient to allow the detection of increased cytokine concentrations in peripheral blood.

This finding can be explained by the diagnosis of chronic CAD in the patients under study and is in line with the study by Hashmi et al.[21], in which only patients with acute artery disease exhibited elevated IL-17 levels.

The differentiation of CD4⁺ into Th17 cells is affected by IL-6 levels, which are low in patients with stable and chronic CAD[18,24,25]. Considering that the patients in our study had chronic and stable CAD, we probably did not observe an increase in IL-17 levels because the number of Th17 cells was small.

The pro-apoptotic effect of IL-17 may occur via T-cell binding, endothelial dysfunction, and vascular injury [18].

Therefore, we support the hypothesis that IL-17 participates in the pathophysiology of acute coronary syndromes and that when the levels of this cytokine are not elevated, CAD is in a chronic and stable phase, as was demonstrated by our study and other studies.

CONCLUSIONS

The present study showed that the systemic IL-17 A levels were not elevated in the

patients with CAD. These results are novel because we assessed patients with chronic and stable CAD, whereas other studies evaluated patients with acute CAD. There is increasing evidence that IL-17 levels are not increased in patients with chronic CAD.

Table 1. Interleukin 17 A : Comparison between patients and controls

Variables	Groups		p-value *
	Cases	Controls	
	Median (Q1; Q3)	Median (Q1; Q3)	
IL 17 A Serum	3.91 (3.91; 3.91)	3.91 (3.91; 3.91)	0.363
IL 17 A - 48h without stimulation	3.91 (3.91; 3.91)	3.91 (3.91; 3.91)	0.301
IL 17 A- 48h with stimulation	222.12 (27.60; 707.35)	154.39 (3.91; 574.80)	0.479

(*) Teste Mann-Whitney, IL: Interleukin

Table 2. Interleukin 17 A: Comparison according to diabetes and smoking status

Groups	IL 17 A		
	IL 17 A Serum	IL 17 A - 48h without stimulation	IL 17 A - 48h with stimulation
	Median (Q1; Q3)	Median (Q1; Q3)	Median (Q1; Q3)
Diabetes Mellitus			
Diabetic cases	3.91 (3.91; 3.91)	3.91 (3.91; 3.91)	199.39 (3.91; 520.61)
Controls	3.91 (3.91; 3.91)	3.91 (3.91; 3.91)	154.39 (3.91; 574.80)
<i>p-value *</i>	0.827	0.069	0.973
Not diabetic cases	3.91 (3.91; 3.91)	3.91 (3.91; 3.91)	358.48 (67.58; 900.15)
Controls	3.91 (3.91; 3.91)	3.91 (3.91; 3.91)	154.39 (3.91; 574.80)
<i>p-value *</i>	0.247	0.898	0.291
Diabetic cases	3.91 (3.91; 3.91)	3.91 (3.91; 3.91)	199.39 (3.91; 520.61)
Not diabetic cases	3.91 (3.91; 3.91)	3.91 (3.91; 3.91)	358.48 (67.58; 900.15)
<i>p-value *</i>	0.197	0.054	0.281
Smoking			
Smoking cases	3.91 (3.91; 3.91)	3.91 (3.91; 3.91)	222.12 (55.45; 725.15)
Controls	3.91 (3.91; 3.91)	3.91 (3.91; 3.91)	154.39 (3.91; 574.80)
<i>p-value *</i>	0.311	0.941	0.428
Not smoking cases	3.91 (3.91; 3.91)	3.91 (3.91; 3.91)	213.03 (3.91; 741.82)

Controls	3.91 (3.91; 3.91)	3.91 (3.91; 3.91)	154.39 (3.91; 574.80)
<i>p-value *</i>	<i>0.646</i>	<i>0.088</i>	<i>0.655</i>
Smoking cases	3.91 (3.91; 3.91)	3.91 (3.91; 3.91)	222.12 (55.45; 725.15)
Not smoking cases	3.91 (3.91; 3.91)	3.91 (3.91; 3.91)	213.03 (3.91; 741.82)
<i>p-value *</i>	<i>0.342</i>	<i>0.091</i>	<i>0.818</i>

(*) Teste Mann-Whitney, IL: Interleukin

Table 3. Interleukin 17 A: Comparisons according to the presence or absence of dyslipidemia

Groups	IL 17 A		
	IL 17 A SERUM	IL 17 A - 48h without stimulation	IL 17 - 48h with stimulation
	Median (Q1; Q3)	Median (Q1; Q3)	Median (Q1; Q3)
Dyslipidemia			
Dyslipidemic cases	3.91 (3.91; 3.91)	3.91 (3.91; 3.91)	464.55 (111.51; 922.12)
Controls	3.91 (3.91; 3.91)	391 (3.91; 3.91)	154.39 (3.91; 574.80)
<i>p-value *</i>	0.699	0.163	0.247
Not dyslipidemia			
Not dyslipidemic cases	3.91 (3.91; 3.91)	3.91 (3.91; 3.91)	194.85 (3.91; 546.36)
Controls	3.91 (3.91; 3.91)	3.91 (3.91; 3.91)	154.39 (3.91; 574.80)
<i>p-value *</i>	0.287	0.583	0.916
Comparison between dyslipidemic and not dyslipidemic cases			
Dyslipidemic cases	3.91 (3.91; 3.91)	3.91 (3.91; 3.91)	464.55 (111.51; 922.12)
Not dyslipidemic cases	3.91 (3.91; 3.91)	3.91 (3.91; 3.91)	194.85 (3.91; 546.36)
<i>p-value *</i>	0.293	0.553	0.184

(*) Teste Mann-Whitney, IL: Interleukin

REFERENCES

1. Libby P. The vascular biology of atherosclerosis. In: Braunwald's Heart Disease. A Textbook of Cardiovascular Medicine. Editors: Libby P, Bonow RO, Mann DL, Zipes DP. Eighth edition 2012. Saunders Elsevier, Philadelphia, USA.
2. Hamm CW, Mollmann H, Bassand JP, Van der Werf F. Acute coronary Syndromes. In: The ESC Textbook of Cardiovascular Medicine. Editors: Camm AJ, Luscher TF, Serruys PW. Second edition 2009. Oxford University Press Inc, New York, USA.
3. Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, Qun ZY. Innate and adaptative immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. Circ Res. 2002;91:281-291.
4. Binder CJ, Chang MK, Shaw PX, Miller YI, Hartvigsen K, Dewan A et al. Innate and acquired immunity in atherogenesis. Nat Med. 2002;8:1218-1226.
5. Rackley CE. Pathogenesis of atherosclerosis. www.uptodate.com/ acesso em 20/06/2014
6. Wyss CA, Neidhart M, Altwegg L, Spanaus KS, Yonekawa K, Wischnowsky MB et al. Cellular actors, Toll-like receptors, and local cytokine profile in acute coronary syndromes. European Heart Journal. 2010;31:1457-1469.
7. Pei F, Han Y, Zhang X, Yan C, Huang M, Deng J et al. Association analysis of the IL17-F His 161 ARG and polymorphism in myocardial infarction. Coronary artery disease. 2009;20:513-517.
8. Geng YJ, Libby P. Progression of atheroma. A struggle between death and procreation. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2002;22:1370-1380.
9. Cheng X, Yu X, Ding YJ, Fu QQ, Xie JJ, Tang TT et al. The Th 17/Treg imbalance in

patients with acute coronary syndrome. *Clin Immunol.* 2008;127:89-97.

10. Aukrust P, Otterdal K, Yndestad A, Sandberg WJ, Smith C, Ueland T et al. The complex role of T cell based immunity in atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* 2008;10:236-243.

11. Kundtson M. Coronary scoring systems. A historical perspective. www.approach.org/images/CorScorTut/History_of_Coronary_Scoring.pdf. Acesso 05/02/2014.

12. Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999; 340:115–126.

13. Taleb S , Tedgui A, Mallat Z, Adaptive T cell immuneresponses and atherogenesis, *Curr. Opin. Pharmacol.* 2010;10: 197–202.

14. Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ, Folco E. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. *Circ J.* 2010;74:213–220.

15. Jordan S. Pober. Interleukin-17 and Atherosclerotic Vascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:1465-1466

16. Allusto F, Lanzavecchia A. Heterogeneity of CD4⁺ memory T cells: functional modules for tailored immunity. *Eur J Immunol.* 2009;39: 2076 –2082.

17. Zhou L, Chong MM, Littman DR. Plasticity of CD4⁺ T cell lineage differentiation. *Immunity.* 2009;30:646–655.

18. Zhu F, Wang Q, Guo C, Wang X, Cao X, Shi Y, et al. IL-17 induces apoptosis of vascular endothelial cells — A potential mechanism for human acute coronary syndrome. *Clinical Immunology.* 2011;141:152–160

19. de Boer JJ, van der Meer JJ, Teeling P, van der Loos CM, Idu MM, van Maldegem F, et al. Differential expression of interleukin-17 family cytokines in intact and complicated

human atherosclerotic plaques, *J. Pathol.* 2010;220:499–508.

20. Liua Z, Lua F, Pana H, Zhaoa Y, Wanga S, Suna S, et al. Correlation of peripheral Th17 cells and Th17-associated cytokines to the severity of carotid artery plaque and its clinical implication . *Atherosclerosis.* 2012;221:232–241

21. Hashmia S and Zengb QT. Role of interleukin-17 and interleukin-17-induced cytokines interleukin-6 and interleukin-8 in unstable coronary artery disease. *Coron Artery Dis.* 2006;17:699–706

22. Zhang X, Pei F, Zhang MX, Yan C, Huang M, Wang T, et al. Interleukin-17A gene variants and risk of coronary artery disease: A large angiography-based study . *Clinica Chimica Acta.* 2011;412; 327–331.

23. Usui F, Kimura H, Ohshiro T, Tatsumi K, Kawashima A, Nishiyama A, et al. Interleukin-17 deficiency reduced vascular inflammation and development of atherosclerosis in Western diet-induced apoE-deficient mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2012;420:72–77

24. Kimura A, Kishimoto T. IL 6 Regulator of Treg/Th 17 balance. *Euro. J. Immunol.* 2010;40:1830-1835

25. Chen Z, O'Shea JJ. Th 17 cells: a new fate for differentiating helper T cells. *Immunol. Res.* 2008;41:87-102.

6.2 Resultados II: Subanálises de Acordo com a Gravidade da Estenose, Extensão da Lesão e Gênero dos Pacientes

As principais características clínicas dos pacientes são descritas na tabela (4).

Tabela 4. Perfil Clínico dos Pacientes

Variáveis	Resultados
Homem, n (%)	26 (65%)
Mulher, n (%)	14 (35%)
Idade, media +- DP	63.2 ± 8.9
Dislipidemia, n (%)	19 (47,5%)
Diabetes Mellitus, n (%)	15 (37.5%)
Tabagismo, n (%)	19 (47,5%)
Infarto Agudo do Miocárdio, n (%)	14 (35%)
Etilista, n (%)	12 (30%)
Doença Arterial Periférica, n (%)	06 (15%)
Acidente Vascular Encefálico, n (%)	02 (5%)
Doença Renal Crônica	02 (5%)

Análises de subgrupos foram realizadas e a seguir apresentaremos algumas. Salienta-se que nesta dissertação de mestrado não existe o objetivo de discutir detalhadamente tais subanálises, visto que tal abordagem será realizada em outro momento.

Os pesquisadores pretendem escrever artigos com estas subanálises, e nestes serão discutidos seus detalhes.

Neste momento a autora da dissertação apenas comentará alguns aspectos relevantes deste do seu estudo.

Comparando-se os níveis de IL-17A de acordo com a gravidade de estenose não houve diferença estatística entre os grupos. (gráficos 1, 2, 3 e tabela 5)

Gráfico 1 – Comparações dos níveis de interleucina 17 A no soro de acordo com a gravidade da estenose

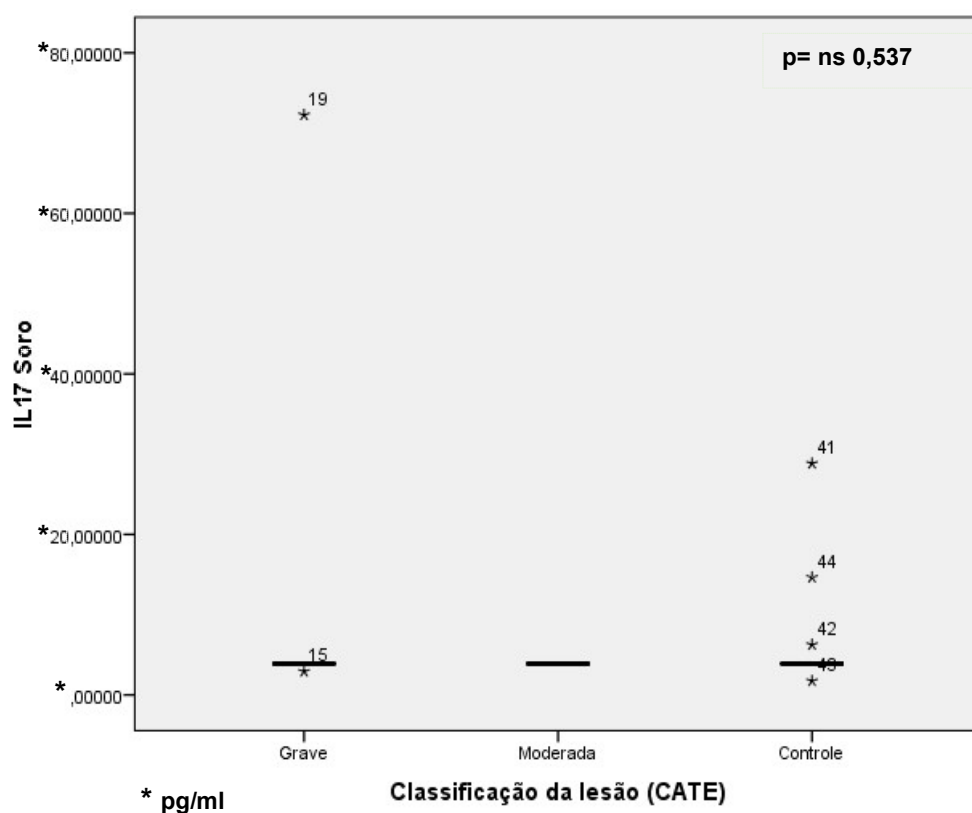


Gráfico 2 – Comparações dos níveis de interleucina 17A em cultura de células sem estímulos (48 horas) de acordo com a gravidade da estenose

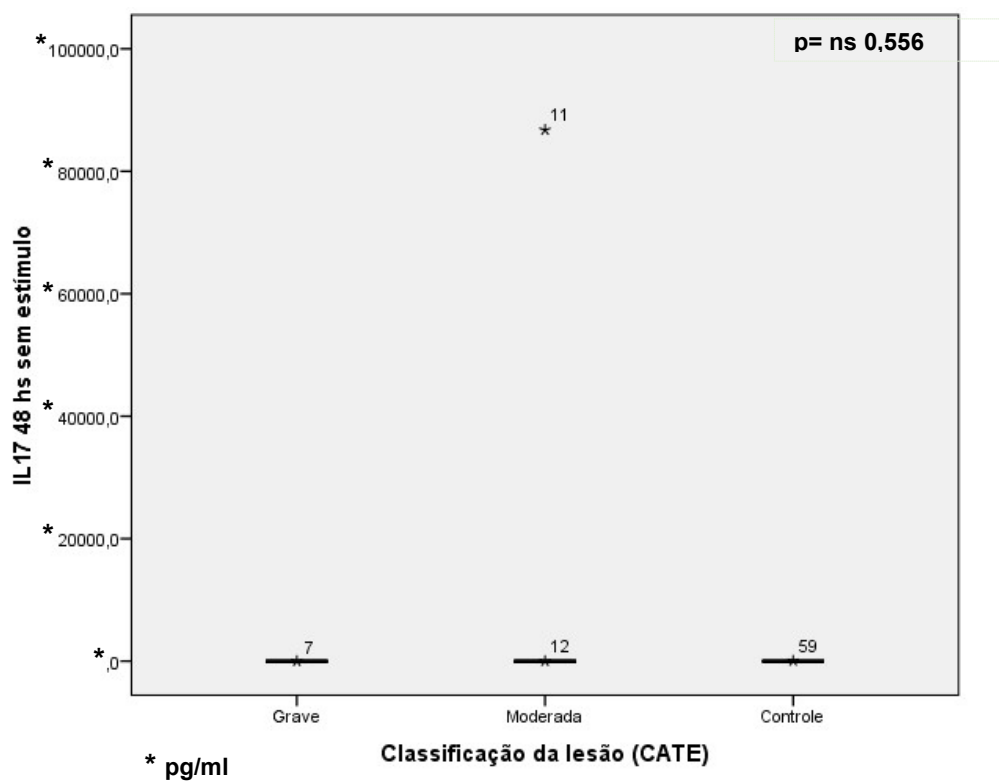


Gráfico 3 – Comparações dos níveis de interleucina 17A em cultura de células com estímulos (48 horas) de acordo com a gravidade da estenose

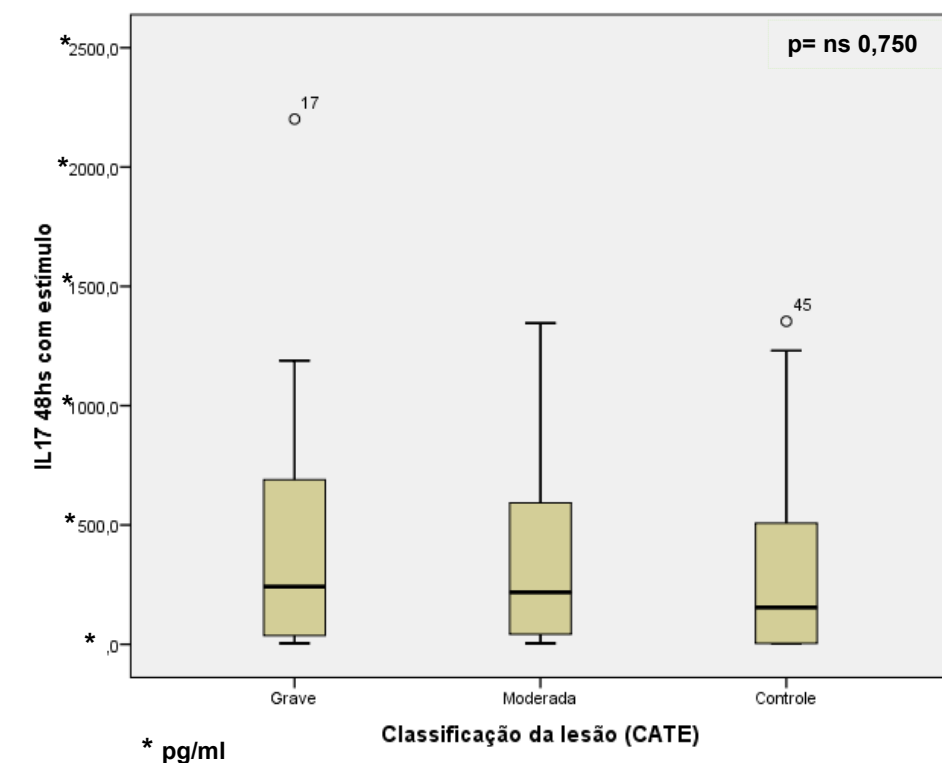


Tabela 5. Comparações nos níveis da interleucina 17A no soro e em cultura de células com 48 horas com e sem estímulos segundo o grupo de pacientes e classificação da lesão (CATE)

Variável	Avaliação	CATE			Valor de p
		Grave	Moderada	Controle	
		Mediana (Mín;Máx)	Mediana (Mín;Máx)	Mediana (Mín;Máx)	
• IL17 A	Soro	3,91 (3,91;72,27)	3,91 (3,91;3,91)	3,91 (3,91;28,84)	p ⁽¹⁾ = 0,537
	Sem estímulo	3,91 (3,91;3,91)	3,91 (3,91; 86747,84)	3,91 (3,91; 53,37)	p ⁽¹⁾ = 0,556
	Com estímulo	241,82 (3,91; 2200,74)	217,58 (3,91; 1346,36)	154,39 (3,91 ;1353,37)	p ⁽¹⁾ = 0,750

(*): Diferença significativa ao nível de 5,0%.

(1): Através do teste de Kruskal Wallis.

A comparação dos os níveis de IL 17 A de acordo com a presença ou não de estenoses em 3 artérias coronárias revelou não haver diferença entre os grupos. (gráficos 4, 5, 6 e tabela 6)

Gráfico 4 – Comparações dos níveis de interleucina 17 A no soro de acordo com a presença ou não de estenoses em três artérias

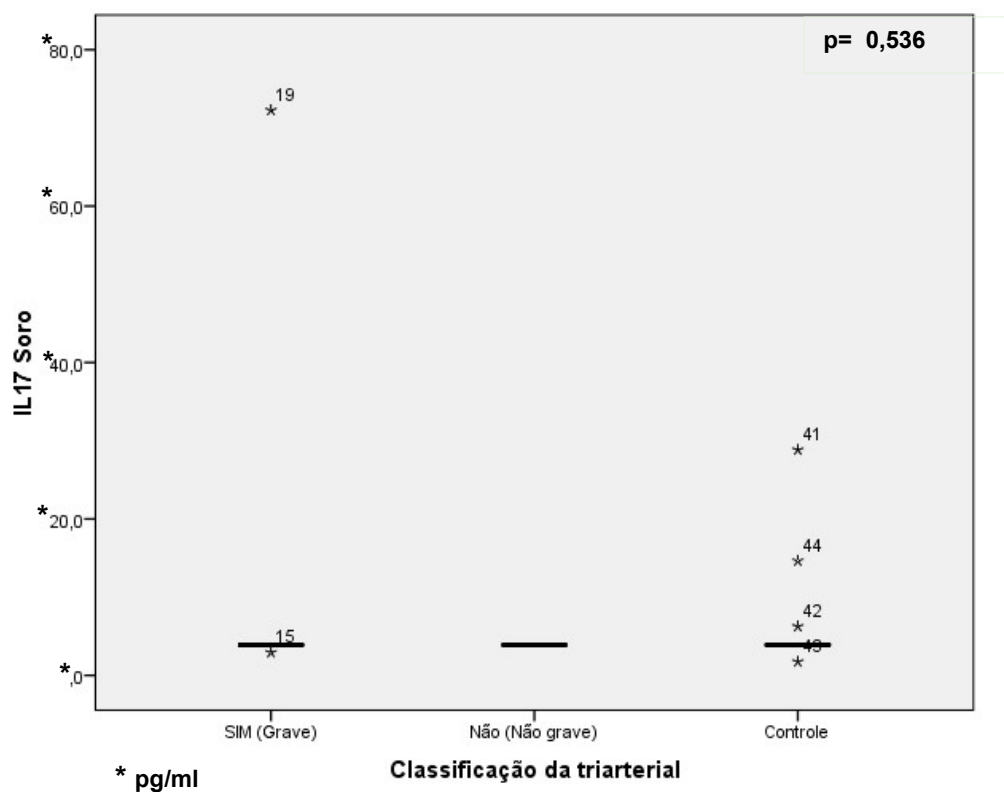


Gráfico 5 – Comparações dos níveis de interleucina 17 A em cultura de células (48 horas) sem estímulos com a presença ou não de estenoses em três artérias

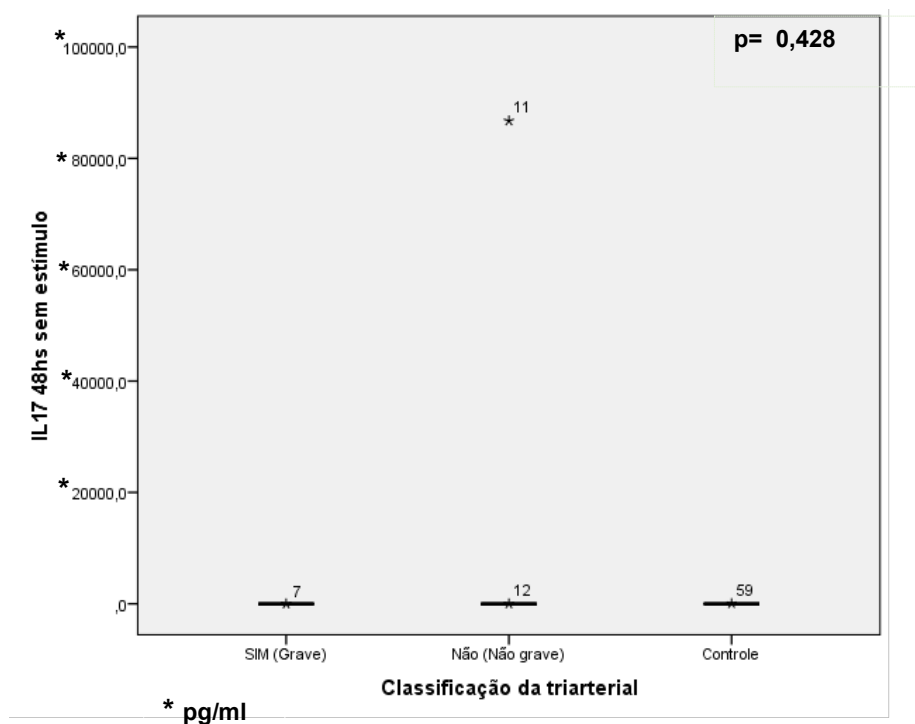


Gráfico 6 – Comparações dos níveis da interleucina 17 A em cultura de células 48 horas com estímulos com a presença ou não de estenoses em três artérias.

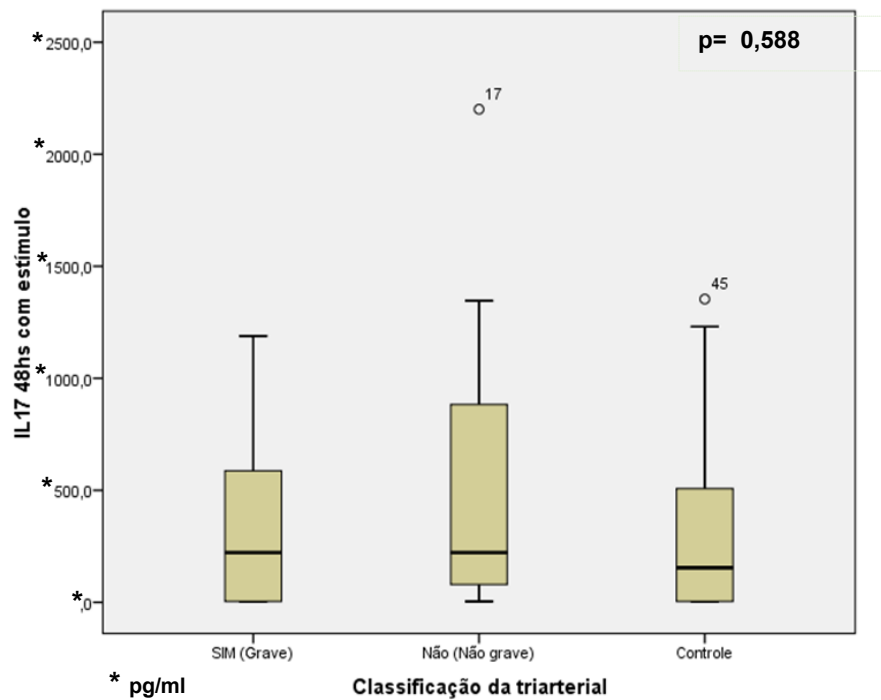


Tabela 6. Comparações nos níveis de interleucina 17A no soro e em cultura de células com 48 horas com e sem estímulos segundo o grupo de pacientes com a presença ou não de estenoses em três artérias.

Variável	Avaliação	Triarterial			Valor de p
		Grave	Não grave	Controle	
		Mediana (Mín;Máx)	Mediana (Mín;Máx)	Mediana (Mín;Máx)	
• IL17 A	Soro	3,91 (3,91; 72,27)	3,91 (3,91;3,91)	3,91 (3,91;28,84)	p ⁽¹⁾ = 0,536
	Sem estímulo	3,91 (3,91;3,91)	3,91 (3,91; 86747,84)	3,91 (3,91; 53,37)	p ⁽¹⁾ = 0,428
	Com estímulo	222,12 (3,91; 53,37)	222,12 (3,91; 2200,74)	154,39 (3,91;1353,37)	p ⁽¹⁾ = 0,588

(*): Diferença significativa ao nível de 5,0%.

(1): Através do teste de Kruskal Wallis.

A comparação entre pacientes homens versus controles homens, pacientes mulheres versus controles mulheres e pacientes homens versus pacientes mulheres revelou que os pacientes homens apresentaram maiores níveis de IL-17 A do que pacientes mulheres e homens controles. (Gráficos 7, 8, 9 e tabela 7)

Gráfico 7 Comparações dos níveis de interleucina 17A no soro de pacientes e controles segundo grupo do sexo masculino

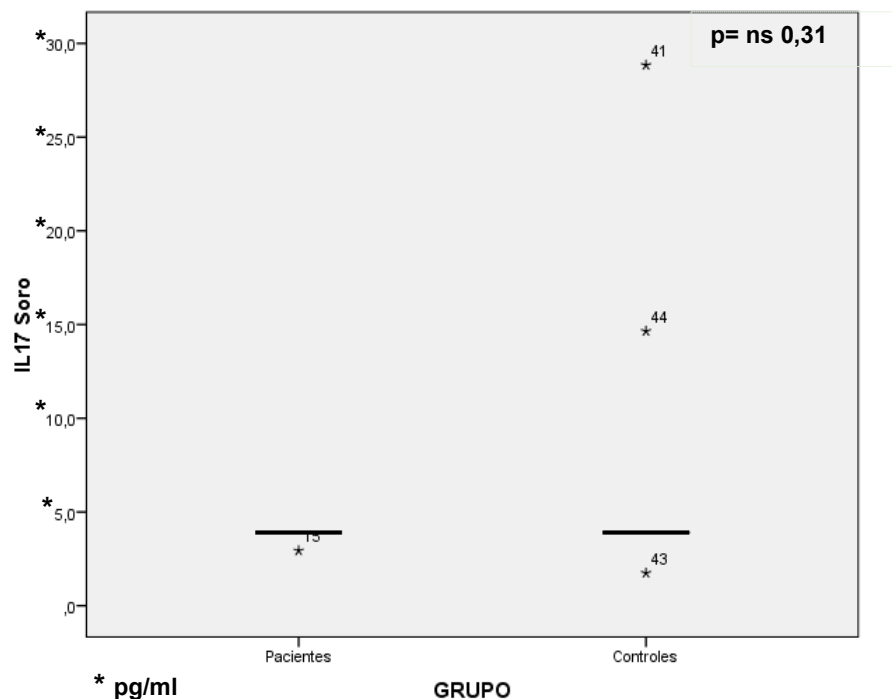


Gráfico 8 – Comparações dos níveis de interleucina 17A em cultura de células de pacientes e controles com 48 horas sem estímulo por grupo do sexo masculino

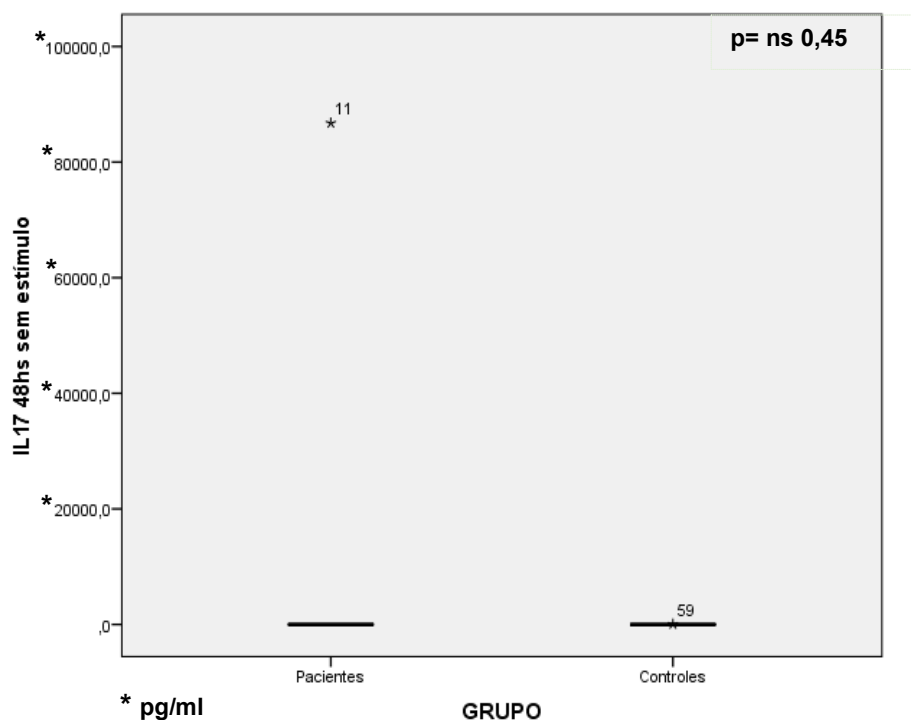


Gráfico 9 Comparações dos níveis de interleucina 17A em cultura de células de pacientes e controles com 48 horas com estímulo segundo grupo do sexo masculino

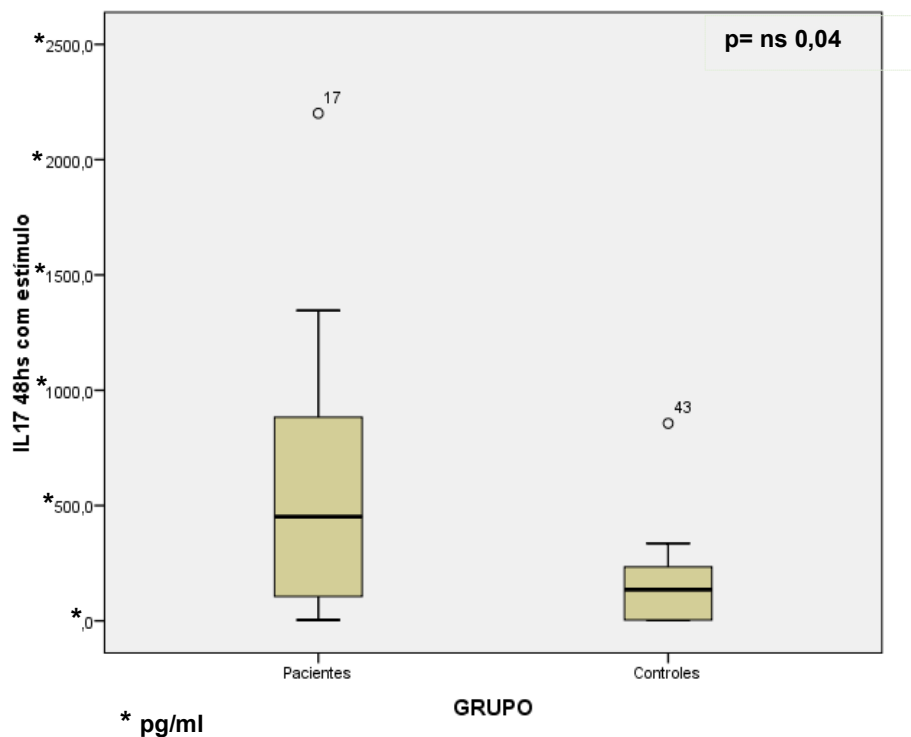


Tabela 7. Comparações dos níveis da interleucina 17A no soro e em cultura de células de 48 horas com e sem estímulos em pacientes e controles do sexo masculino

Variável	Avaliação	Homens		Valor de p
		Paciente	Controle	
		Mediana (Mín;Máx)	Mediana (Mín;Máx)	
• IL17 A	Soro	3,91 (3,91;3,91)	3,91 (3,91;9,28)	$p^{(1)} = 0,31$
	Sem estímulo	3,91 (3,91;3,91)	3,91 (3,91; 3,91)	$p^{(1)} = 0,45$
	Com estímulo	451,67 (99,02;892,58)	135 (3,91; 285)	$p^{(1)} = 0,04$

(*): Diferença significativa ao nível de 5,0%.

(1): Através do teste de Mann-Whitney

Gráfico 10 – Comparações dos níveis de interleucina 17A no soro de pacientes e controles segundo grupo do sexo feminino

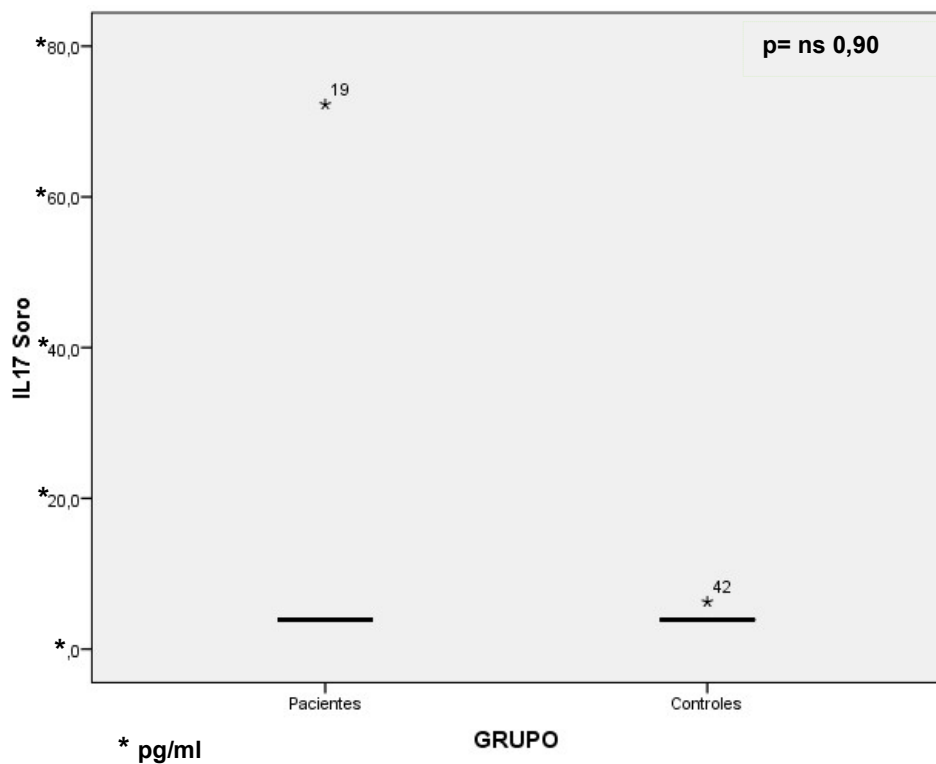


Gráfico 11 – Comparações dos níveis de interleucina 17A em cultura de células de pacientes e controles com 48 horas sem estímulo por grupo do sexo feminino

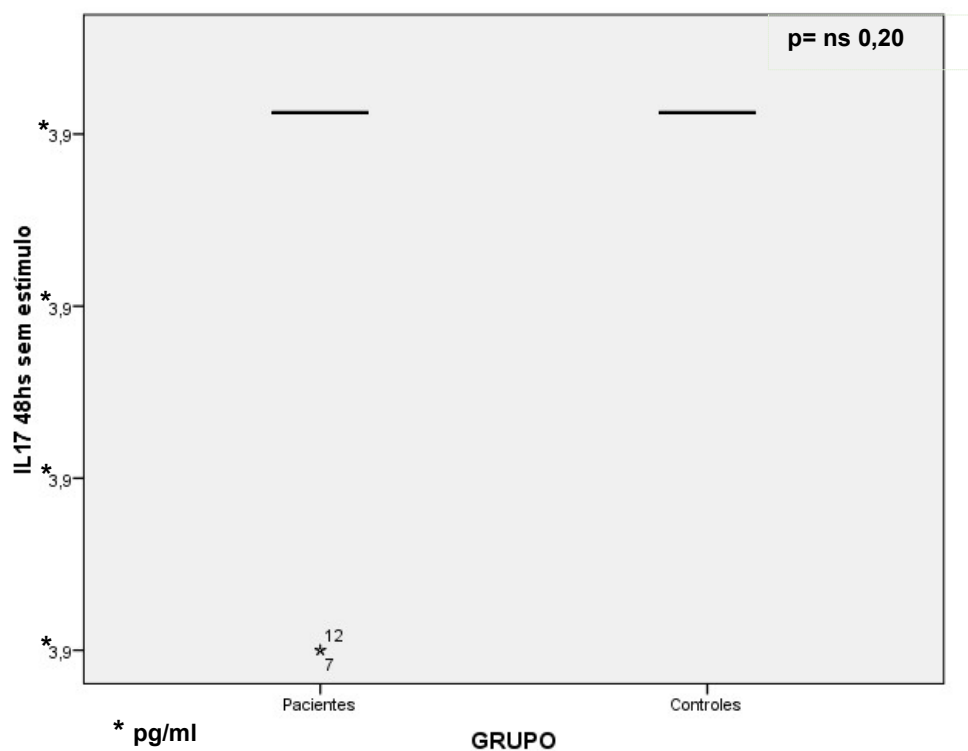


Gráfico 12 – Comparações dos níveis de interleucina 17A em cultura de células de pacientes e controles com 48 horas com estímulo segundo grupo do sexo feminino

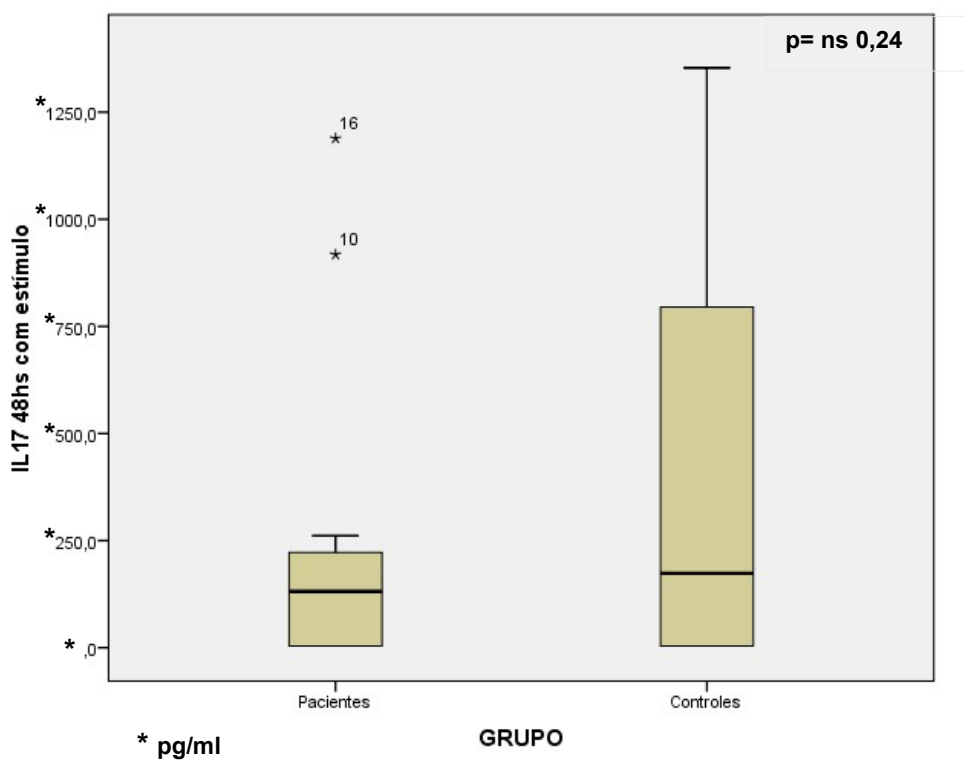


Tabela 8 .Comparações dos níveis da interleucina 17A no soro e em cultura de células de 48 horas com e sem estímulos em pacientes e controles do sexo feminino

Variável	Avaliação	Mulheres		Valor de p
		Paciente	Controle	
		Mediana (Mín;Máx)	Mediana (Mín;Máx)	
• IL17	Soro	3,91 (3,91;;3,91)	3,91 (3,91;6,25)	p ⁽¹⁾ = 0,90
	Sem estímulo	3,91 (3,91;3,91)	3,91 (3,91; 3,91)	p ⁽¹⁾ = 0,20
	Com estímulo	131,21 (3,91;231,97)	173,78 (3,91; 642)	p ⁽¹⁾ = 0,24

(*): Diferença significativa ao nível de 5,0%.

(1): Através do teste de Mann-Whitney.

Gráfico 13 Comparações dos níveis de interleucina 17A no soro entre sexos do grupo de pacientes do gênero masculino e feminino.

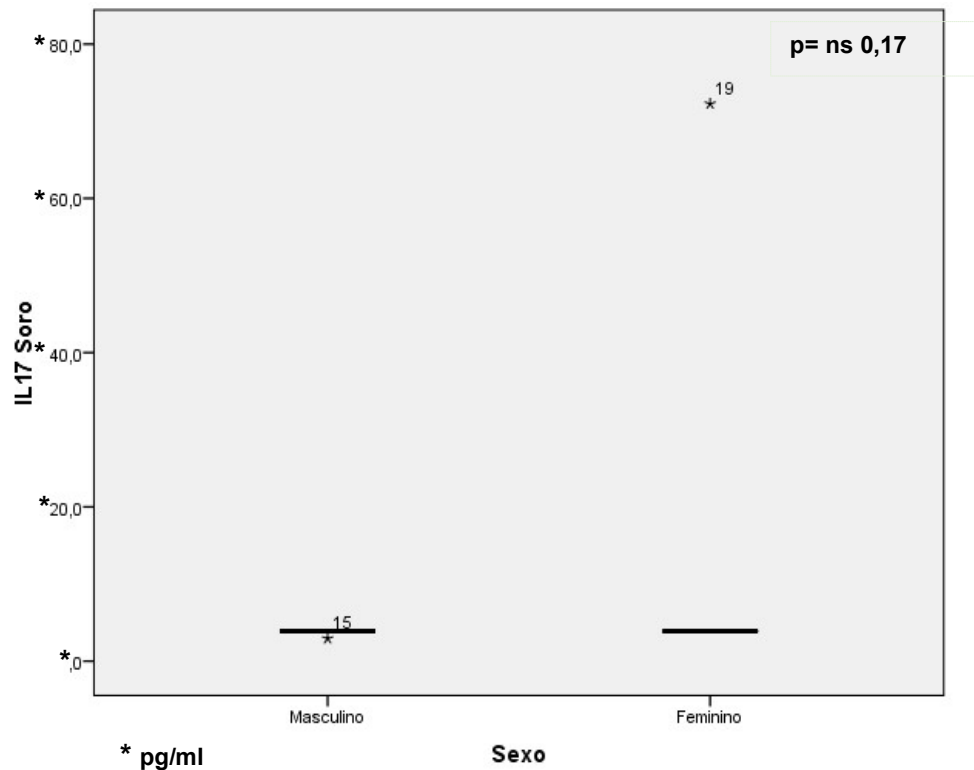


Gráfico 14 – Comparações dos níveis de interleucina 17A em cultura de células com 48 horas sem estímulo entre pacientes do gênero masculino e feminino.

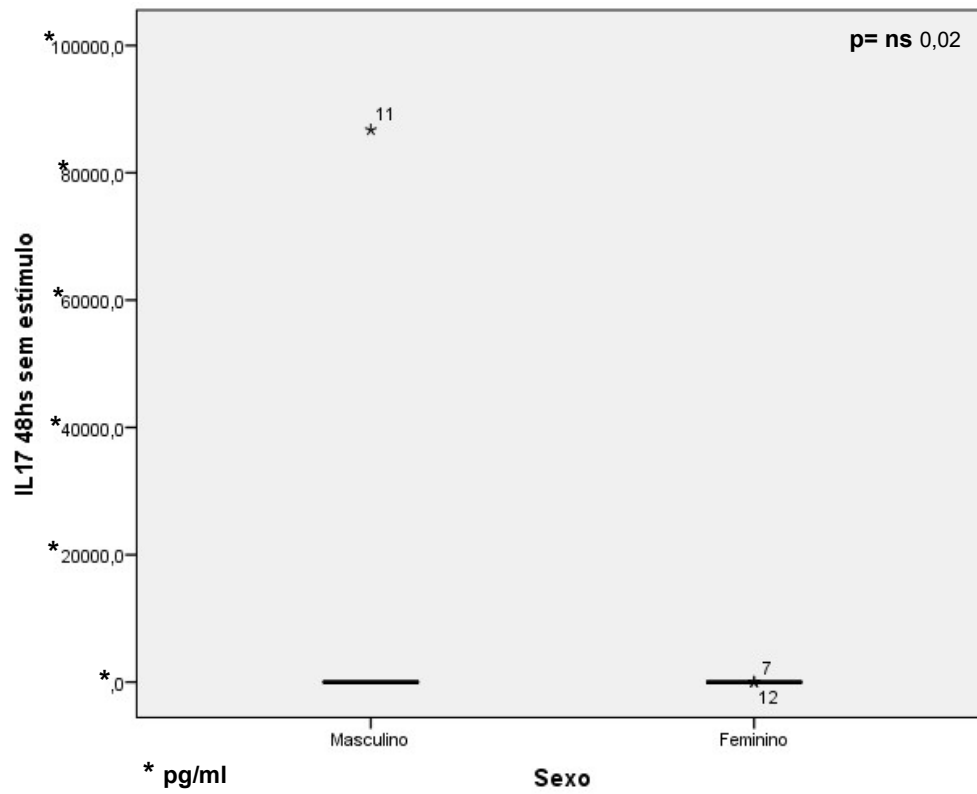


Gráfico 15 – Comparações dos níveis de interleucina 17A em cultura de células com 48 horas sem estímulo entre pacientes do gênero masculino e feminino.

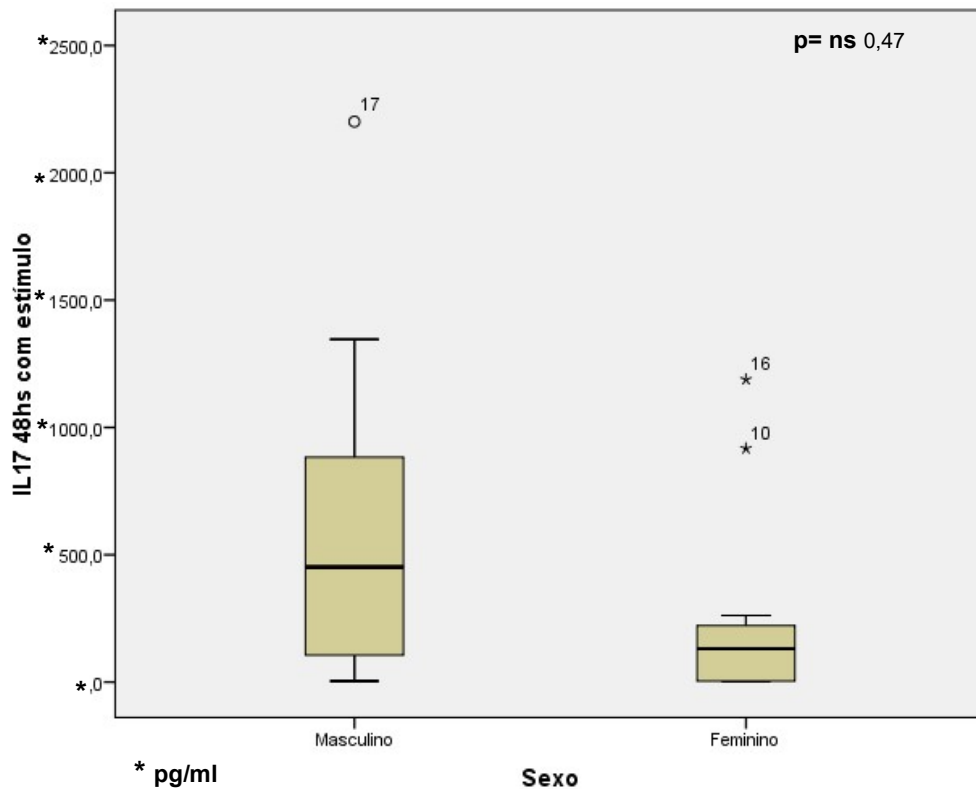


Tabela 9. Comparações dos níveis da interleucina 17A no soro e em cultura de células de 48 horas com e sem estímulos entre pacientes homens e mulheres

Variável	Avaliação	Pacientes		Valor de p
		Homem	Mulher	
		Mediana (Mín;Máx)	Mediana (Mín;Máx)	
• IL17	Soro	3,91 (3,91;3,91)	3,91 (3,91;3,91)	$p^{(1)} = 0,17$
	Sem estímulo	3,91 (3,91;3,91)	3,91 (3,91; 3,91)	$p^{(1)} = 0,47$
	Com estímulo	451,67 (99;82)	131,21 (3,91; 231,97)	$p^{(1)} = 0,02$

(*): Diferença significativa ao nível de 5,0%.

(1): Através do teste de Mann-Whitney.

7. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Nas avaliações dos níveis da IL-17 A (nos cenários testados), quando as comparações realizadas foram de acordo com a gravidade da estenose ou número de vasos acometidos não foram observadas diferenças estatisticamente significativa entre pacientes e controles.

Destaque-se que na literatura não existe disponibilização de dados para comparação utilizando metodologia semelhante a deste estudo. Portanto este é o primeiro trabalho com este tipo de avaliação na população com as características descritas na metodologia. O grupo de pesquisadores fará uma comunicação breve e pretende desenvolver estudo para testar a hipótese gerada.

Quanto as comparações realizadas entre os gêneros, observou-se que os homens com DAC exibiram maiores concentrações de IL 17 A quando comparados a homens controles e mulheres pacientes.

Sabe-se que existem diferenças entre aspectos anatômicos e clínicos entre homens e mulheres com DAC. Por exemplo, até a menopausa a incidência da doença é maior nos homens, porém prognóstico é pior nas mulheres. Outra diferença é que os diâmetros das artérias coronárias são menores nas mulheres. (Glenn et al.,2011; Christian et al.,2012).

Portanto existem várias diferenças entre homens e mulheres com DAC, e o achado dos maiores níveis de IL 17A gerou a hipótese desta IL ser uma via que pode contribuir para algumas destas diferenças. Estes achados desta subanálise também serão escritos na forma de comunicação breve e esta hipótese será testada em estudo específico.

8. CONCLUSÕES

As concentrações da IL 17A em pacientes com doença arterial crônica não foram detectados ou apresentaram-se abaixo do limite de detecção no soro e após 48 horas de cultura em células com e sem estímulo.

Não houve diferenças nas concentrações da IL 17A entre os pacientes e os controles.

Pacientes do gênero masculino apresentaram maiores concentrações de IL 17 A em cultura de células com estímulos quando comparados a controles do sexo feminino e pacientes mulheres.

Nas avaliações dos níveis de IL 17A de acordo com a gravidade da estenose ou número de vasos acometidos não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre pacientes e controles.

9. PERSPECTIVAS

É possível que a interleucina IL-17A represente biomarcador periférico de estabilidade da doença arterial coronariana, visto que alguns estudos da literatura e o nosso foram concordantes na informação que em pacientes com DAC crônica, tal interleucina não está aumentada quando comparada a de controles saudáveis.

10. REFERÊNCIAS

1. ANDRADE J.P.et al. Programa nacional de qualificação de médicos na prevenção e atenção integral às doenças cardiovasculares. Arq. Bras. Cardiol., São Paulo , v. 100, n. 3, Mar. 2013 . Disponível em< http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2013000300001&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 23/08/2014.
2. AUKRUST P. et al. The complex role of T cell based immunity in atherosclerosis. Curr. Atheroscler. Rep. 2008;10:236-243.
3. BARUA RS, AMBROSE JA. Mechanisms of coronary thrombosis in cigarette smoke exposure. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013; 33: 1460-1467.
4. BENTZON JF, FALK E. Circulating smooth muscle progenitor cells in atherosclerosis and plaque rupture: current perspective and methods of analysis. Vascul Pharmacol. 2010; 52: 11-20.

5. BINDER C.J., et al. Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nat Med.* 2002; 8: 1218-1226.
6. BJÖRKEGREN JL, et al. Plasm cholesterol-induced lesion networks activated before regression of early, mature, and advanced atherosclerosis. *PLoS Genet.* 2014;10:e1004201.
7. BOER JJ. et al. Differential expression of interleukin-17 family cytokines in intact and complicated human atherosclerotic plaques, *J. Pathol.* 2010;220:499–508.
8. BOUHLEL MA, et al. PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab.* 2007; 6: 137-143.
9. BOYLE JJ, WEISSBERG PL, BENNET MR. Tumor necrosis factor alpha promotes macrophage-induced vascular smooth muscle cell apoptosis by direct and autocrine mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 1553-1558.
10. BURKE AP, et al. Morphological predictors of arterial remodeling in coronary atherosclerosis. *Circulation.* 2002; 105: 297-303.
11. CAHILL LE, et al. Haptoglobin genotype is a consistent marker of coronary heart disease risk among individuals with elevated glycosylated hemoglobin. *J Am Coll Cardiol.* 2013; 61: 728-737.
12. CAMPBELL JH, CAMPBELL GR. Smooth muscle phenotypic modulation-a personal experience. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32: 1784-1789.
13. CHENG X, YU X, DING YJ, FU QQ, XIE JJ, TANG TT et al. The Th 17/Treg imbalance in patients with acute coronary syndrome. *Clin Immunol.* 2008; 127: 89-97.
14. CLARKE MC, BENNETT MR. Cause or consequence: what does macrophage apoptosis do in atherosclerosis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29:153-155.
15. CHRISTIAN W. et al. Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. 2012 Disponível em: < www.escardio.org/> Acesso em; 25 fevereiro 2014.
16. CYBULSKYMI, WON D., HAIDARI M. Leukocyte recruitment to atherosclerotic lesions. *Can J Cardiol.* 2004; 20 Suppl B: 24B.
17. DALAGER S, et al. Artery-related differences in atherosclerosis expression: implications for atherogenesis and dynamics in intima-media thickness. *Stroke.* 2007; 38: 2698-2705.

18. DALAGER S, et al. Plaque in superficial femoral arteries indicates generalized atherosclerosis and vulnerability to coronary death: an autopsy study. *J Vasc Surg*.2008; 47:296-302.
19. DAVIES MJ, et al. Factors influencing the presence or absence of acute coronary artery thrombi in sudden ischemic death. *Eur Heart J*. 1989; 10: 203-208.
20. DAVIES MJ. The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart*. 2000; 83: 361-366.
21. DAVIES MJ, THOMAS A. Thrombosis and acute coronary-artery lesions in sudden cardiac ischemic death. *N Engl J Med*. 1984; 310: 1137-1140.
22. DOLLERY CM, LIBBY P. Atherosclerosis and proteinases activation. *Cardiovas Res*.2006;69:625-635.
23. FALK E SHAH PK, FUSTER V. Coronary plaque disruption. *Circulation*. 1995;92:657-671.
24. FALK E. Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47:C7-C12.
25. FALK E. Plaque rupture with severe pre-existing stenosis precipitating coronary thromb. Characteristics of coronary atherosclerotic plaques underlying fatal occlusive thrombi. *Br Heart J*. 1983;50:127-134.
26. FALK E. Unstable angina with fatal outcome: dynamic coronary thrombosis leading to infarction and/or sudden death. Autopsy evidence of recurrent mural thrombosis with peripheral embolization culminating in total vascular occlusion. *Circulation*. 1985;71:699-708.
27. FALK E, et al. Update on acute coronary syndromes: the pathologists' view. *Eur Heart J*. 2013;34:719-728.
28. FERNANDEZ-ORTIZ A, BADIMON L. Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: implications for consequences of plaque rupture. *J Am Coll Cardiol*. 1994;23:1562-1569.
29. FINN AV, et al. Hemoglobin directs macrophage differentiation and prevents foam cell formation in human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol*.2012;59: 166-177.
30. FUSTER V., LOIS F., FRANCO M. Early identification of atherosclerotic disease by noninvasive imaging. *Nat. Rev. Cardiol*. 2010;7:327-333.
31. GENG Y.J., LIBBY P. Progression of atheroma. A struggle between death and procreation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1370-1380.
32. GLAGOV S, et al. Compesatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1987;316:1371-1375.

33. GLENN N. et al. CCF/AHA/SCAI Guideline for Percutaneous Coronary Intervention. A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions. 2011 Disponível em: <<http://circ.ahajournals.org/content/124/23/e574>>. Acesso em: 25 fevereiro 2014.
34. GOMEZ D, et al. Detection of histone modifications at specific gene loci in single cells in histological sections. *Nat Methods*. 2013;10:171-177.
35. GONÇALVES I, et al. Short communication: dating componentes of human atherosclerotic plaques. *Circ Res*. 2010;106:1174-1177.
36. GOUGH PJ, et al. Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice. *J Clin Invest*. 2006;116:59-69.
37. GUYTON JR. Phospholipid hydrolytic enzymes in a 'cesspool' of arterial intimal lipoproteins: a mechanism for atherogenic lipid accumulation. *Arteriscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:884-886.
38. HAKA AS, et al. Macrophages create an acidic extracellular hydrolytic compartment to digest aggregated lipoproteins. *Mol Biol Cell*. 2009;20:4932-4940.
39. HAKA AS, et al. Plasmin promotes foam cell formation by increasing macrophage catabolism of aggregate low-density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:1768-1778.
40. HAMM C.W., et al. Acute coronary Syndromes. In: *The ESC Textbook of Cardiovascular Medicine*. Editors: Camm AJ, Luscher TF, Serruys PW. Second edition 2009. Oxford University Press Inc, New York, USA.
41. HANI JNEID, et al. ACCF/AHA Focused Update of the Guideline for the Management of Patients With Unstable Angina/ST-Elevation Myocardial Infarction (Updating the 2007 Guideline and Replacing the 2011 Focused Update): A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. 2012. Disponível: <<http://circ.ahajournals.org/content/early/2012/07/16/CIR.0b013e318256f1e0.citation>>. Acesso em: 20 fevereiro 2014.
42. HANSSON G.K., et al. Innate and adaptative immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res*. 2002;91: 281-291.
43. HASHMIA S., ZENGB QT. Role of interleukin-17 and interleukin-17-induced cytokines interleukin-6 and interleukin-8 in unstable coronary artery disease. *Coron Artery Dis*. 2006;17:699–706.
44. JONES D.L., et al. Heart Disease and Stroke Statistics 2012 Update. A report from American Heart Association. Disponível em: [www. Circ.ahajournals.org/](http://www.Circ.ahajournals.org/). Acesso em: 30/05/2013.

45. KINI AS, et al. Changes in plaque lipid content after short-term intensive versus standard statin therapy: the YELLOW trial (reduction in yellow plaque by aggressive lipid-lowering therapy). *J Am Coll Cardiol*. 2013;62:21-29.
46. KOLODZIE FD, et al. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med*. 2003;349:2316-2325.
47. KOLODZIE FD, et al. The thin-cap fibroatheroma: a type of vulnerable plaque: the major precursor lesion to acute coronary syndromes. *Curr Opin Cardiol*. 2001;16:285-292.
48. KRAGEL AH, et al. Morphometric analysis of the composition of atherosclerotic plaques in the four major epicardial coronary arteries in acute myocardial infarction and in sudden coronary death. *Circulation*. 1989;80:1747-1756.
49. KRAMER MC, et al. Relationship of thrombus healing to underlying plaque morphology in sudden coronary death. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55:122-132.
50. KUMAMOTO M, NAKASHIMA Y, SUEISHI K. Intimal neovascularization in human coronary atherosclerosis: its origin and pathophysiological significance. *Hum Pathol*. 1995;26:450-456.
51. KUNJATHOOR VV, et al. Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J. Biol. Chem*. 2002;277:49982-49988.
52. LAURENTI, R. Mortalidade por Doenças Cardiovasculares no Brasil (Capítulo 2), pp 16-21. Em: *Tratado de Cardiologia SOCESP*. Eds: Nobre F, Serrano CV. São Paulo, Ed. Manole Ltda, 2005.
53. LEITINGER N, SCHULMAN IG. Phenotypic polarization of macrophages in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:1120-1126.
54. LEY K. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol Med*. 2003;9:263.
55. LIBBY P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420:868.
56. LIBBY P, RIDKER PM, HANSSON GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011;473:317-325.
57. LIBBY P. The vascular biology of atherosclerosis. In: Braunwald's Heart Disease. A Textbook of Cardiovascular Medicine. Editors: Libby P, Bonow RO, Mann DL, Zipes DP. Eighth edition 2008. Saunders Elsevier, Philadelphia, USA.
58. LIBBY P, AIKAWA M, JAIN MK. Vascular endothelium and atherosclerosis. *HandbExp Pharmacol*. 2006;285-306.
59. LIUA Z. et al. Correlation of peripheral Th17 cells and Th17-associated

- cytokines to the severity of carotid artery plaque and its clinical implication . *Atherosclerosis*. 2012;221:232–241.
60. LOTUFO, P.A. Doenças Cardiovasculares no Brasil Capítulo 1), pp 7- 15. Em: Tratado de Cardiologia SOCESP. Eds: Nobre F, Serrano CV. São Paulo, Ed. Manole Ltda, 2005.
 61. LUTGENS E, et al. Biphasic pattern of cell turnover characterizes the progression from fatty streaks to ruptured human atherosclerotic plaques. *Cardiovasc Res*. 1999;41:473-479.
 62. MANN J, DAVIES MJ. Mechanisms of progression in native coronary artery disease: role of healed plaque disruption. *Heart*. 1999;82:265-268.
 63. MARQUES R. et al. Custos da cadeia de procedimentos no tratamento do infarto agudo do miocárdio aos hospitais brasileiros de excelências e especializada Rev Assoc Med Bras. 2012;58(1):104-11.
 64. MARTIN JF, et al. The causal role of megakaryocyte-platelet hyperactivity in acute coronary syndromes. *Nat Rev Cardiol*. 2012;9:658-670.
 65. MCGRILL HC JR, et al. Effects of serum lipoproteins and smoking on atherosclerosis in young men and women. The PDAY Research Group. Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:95- 106.
 66. MITTLEMAN MOSTOFSKY E. Physical, psychological and chemical triggers of acute cardiovascular events: preventive strategies. *Circulation*. 2011; 124:346-354.
 67. MOORE KJ, TABAS I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell*. 2011;145:341-355.
 68. MULLER JE, et al. Circadian Variation in the frequency of onset of acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1985;313:1315-1322.
 69. MYOISHI M, et al. Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome. *Circulation*. 2007;116:1226-1233.
 70. NGUYEN AT, et al. Smooth muscle cell plasticity: fact or fiction? *Circ Res*. 2013;112:17-22.
 71. NISHIOKA T, et al. Contribution of inadequate compensatory enlargement to development of human coronary artery stenosis: an in vivo intravascular ultrasound study. *J Am Coll Cardiol*. 1996;27:1571-1576.
 72. OTSUKA F, FINN AV, VIRMANI R. Do vulnerable and ruptured plaques hide in heavily calcified arteries? *Atherosclerosis*. 2013;229:34-37.
 73. OTSUKA F, et al. Has our understanding of calcification in human coronary atherosclerosis progressed? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34:724-736.

74. OTSUKA F, et al. Omnipresent atherosclerotic disease: time to depart from analysis of individual vascular beds. *Mt Sinai J Med.* 2012;79:642-653.
75. PATRICK T. et al. Guideline for the Management of ST-Elevation Myocardial Infarction: A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. Disponível em: <http://circ.ahajournals.org/content/early/2012/12/17/CIR.0b013e3182742cf6.citation> Acesso em: 20/02/2014.
76. PEI F, et al. Association analysis of the IL17-F His 161 ARG and polymorphism in myocardial infarction. *Coronary artery disease.* 2009;20:513-517.
77. PURUSHOTHAMAN M, et al. Genotypedependent impairment of hemoglobin clearance increases oxidative and inflammatory response in human diabetic atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:2769-2775.
78. QIAO JH, et al. Genetic determination of cartilaginous metaplasia in mouse aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:2265-2272.
79. RACKLEY CE. Pathogenesis of atherosclerosis, vol. 202, pp. 167-174, 2009. Disponível em: www.uptodate.com/ acesso em 20/05/2013.
80. SCHAAR JA, et al. Terminology for high-risk and vulnerable coronary artery plaques. Report of a meeting on the vulnerable plaque, June 17 and 18, 2003, Santorini, Greece. *Eur Heart J.* 2004;25:1077-1082.
81. SCHRIJVERS DM, et al. Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages is impaired in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1256-1261.
82. SEIMON TA, et al. Atherogenic lipids and lipoproteins trigger CD36-TLR2-dependent apoptosis in macrophages undergoing endoplasmic reticulum stress. *Cell Metab.* 2010;12:467-482.
83. SKALEN K, et al. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Natura.* 2002;417:750-754.
84. SILLESEN H, et al. Carotid plaque burden as a measure of subclinical atherosclerosis: comparison with other for subclinical arterial disease in the High Risk Plaque BioImage study. *J Am Coll Cardiol Cardiovasc Imaging.* 2012;5:681-689.
85. SLUIMER JC, et al. Thin-walled microvessels in human coronary atherosclerotic plaques show incomplete endothelial junctions relevance of compromised structural integrity for intraplaque microvascular leakage. *J Am Coll Cardiol.* 2009;53:1517-1527.
86. STARY HC, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation.* 1995;92:1355-1374.

87. STARY HC. An Atlas of Atherosclerosis: progression and Regression. New York: Parthenon Publishing Group; 1999.
88. STARY HC. The development of calcium deposits in atherosclerotic lesions and their persistence after lipid regression. *Am J Cardiol.* 2001;88:16E-19E.
89. STEINBERG D., WITZTUM J.L. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc boil.*2010;30:2311-2316.
90. STEPHAN D, et al. CCF/AHA/ACP/AATS/PCNA/SCAI/STS Guideline for the Diagnosis and Management of Patients With Stable Ischemic Heart Disease. A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association. Task Force on Practice Guidelines, and the American College of Physicians, American Association for Thoracic Surgery.Preventive Cardiovascular Nurses Association, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society of Thoracic Surgeons. 2012. Disponível<<http://circ.ahajournals.org/content/early/2012/11/19/CIR.0b013e318277d6a0.citation>> Acesso em: 20/02/2014
91. STÖGER JL, et al. Distribution os macrophage polarization markers in human atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2012;225:461-468.
92. SUBRAMANIAN M, TABAS I. Dendritic cells in atherosclerosis. *Semin Immunopathol.*2014;36:93-102.
93. TABAS I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat,rev Immunol.*2010;10:36-46.
94. TABAS I, WILLIAMS KJ, BOREN J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update ante therapeutiv implications. *Circulation.*2007;116:1832-1844.
95. VAN DER WAL AC, et al. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation.* 1994;89:36-44.
96. VARNAVA AM, MILLS PG, DAVIES MJ. Relationshion between coronary artery remodeling and plaque vulnerability. *Circulation.* 2002;105:939-943.
97. VIRMANI R, et al. Pathology of the vulnerable plaque. *J Am Coll Cardiol.*2006;47:C13-C18.
98. WITZTUM JL. You are right too. *J clin Invest.*2005;115:2072-2075.
99. WYSS C.A., et al. Cellular actors, Toll-like receptors, and local cytokine profile in acute coronary syndromes. *European Heart Journal.* 2010;31:1457-1469.
100. YEE KO, SCHWARTZ SM. Why atherosclerotic vessels narrow: the fibrin hypotheses. *Thromb Haemost.* 1999;82:762-771.

101. ZHOU L. et al. Plasticity of CD4⁺ T cell lineage differentiation. *Immunity*. 2009;30:646–655.
102. ZHU F. et al. IL-17 induces apoptosis of vascular endothelial cells .A potential mechanism for human acute coronary syndrome. *Clinical Immunology*. 2011;141:152–160.

11. ANEXO(S)

Anexo 1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dos Pacientes

O Senhor (a). Está sendo convidado a participar do Protocolo de Pesquisa Intitulado:

“Citocinas Inflamatórias em Pacientes Brasileiros com Doença Arterial Coronariana”

A inflamação participa da origem e progressão da doença obstrutiva das artérias do coração. Informações de pesquisas recentes revelam que o melhor entendimento e reconhecimento da inflamação do organismo podem ajudar no diagnóstico de obstruções das artérias coronárias, e contribuir para um melhor tratamento dos pacientes.

O objetivo de nosso trabalho é identificar alterações em substâncias que revelam presença de inflamação ativa.

O procedimento que será realizado por recomendação da pesquisa é apenas a coleta de 10 mililitros de sangue. Riscos relacionados a esse procedimento são baixíssimos.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com a de outros pacientes, e não será divulgada a identificação de nenhum paciente. Os dados coletados serão utilizados única e exclusivamente para pesquisa.

A participação nesta pesquisa clínica é voluntária, não remunerada, e o participante pode desistir da participar em qualquer momento, sem nenhum tipo de prejuízo no seu tratamento.

Qualquer dúvida com relação à pesquisa poderá ser esclarecida pelo Dr (s). Dinaldo Cavalcanti de Oliveira ou Maira Pitta, no setor de cardiologia, do Hospital das Clínicas, da Universidade Federal de Pernambuco ou pelo telefone 32718000.

Se o Sr. (a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde da UFPE – CEP/CCS/UFPE. Localizado à Avenida da Engenharia, 1º Andar, Sala 4. Cidade Universitária, Recife-PE. CEP: 50.740.600. Telefone: 81.2126-8588.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim e concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____/____/____

Testemunha 1

Testemunha 2

Pesquisador

Anexo 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dos Voluntários

O Senhor(a). Está sendo convidado a participar do Protocolo de Pesquisa Intitulado:

“Citocinas Inflamatórias em Pacientes Brasileiros com Doença Arterial Coronariana

A inflamação participa da origem e progressão da doença obstrutiva das artérias do coração. Informações de pesquisas recentes revelam que o melhor entendimento e reconhecimento da inflamação do organismo pode ajudar no diagnóstico de obstruções das artérias coronárias, e contribuir para um melhor tratamento dos pacientes.

O objetivo de nosso trabalho é identificar alterações em substâncias que revelam presença de inflamação ativa.

O procedimento que será realizado por recomendação da pesquisa é apenas a coleta de 10 mililitros de sangue. Riscos relacionados a esse procedimento são baixíssimos.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com a de outros pacientes, e não será divulgada a identificação de nenhum paciente. Os dados coletados serão utilizados única e exclusivamente para pesquisa.

A participação nesta pesquisa clínica é voluntária, não remunerada, e o participante pode desistir da participar em qualquer momento, sem nenhum tipo de prejuízo.

Quando são avaliadas certas substâncias relacionadas à inflamação é preciso ter-se informações dos valores dessas substâncias na população saudável. Por essa razão, estamos convidando você a participar da pesquisa, ou seja, para termos os valores considerados normais das substâncias inflamatórias.

Qualquer dúvida com relação à pesquisa poderá ser esclarecida pelo Dr (s). Dinaldo Cavalcanti de Oliveira ou Maira Pitta, no setor de cardiologia, do Hospital das Clínicas, da Universidade Federal de Pernambuco ou pelo telefone 32718000.

Se o Sr. (a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde da UFPE – CEP/CCS/UFPE. Localizado à Avenida da Engenharia, 1º Andar, Sala 4. Cidade Universitária, Recife-PE. CEP: 50.740.600. Telefone: 81.2126-8588.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que lí ou que foram lidas para mim e concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

Data ____/____/____

Assinatura do paciente/representante legal

Testemunha 1

Testemunha 2

Pesquisador

Anexo 3. Ficha Clínica do Estudo

Identificação

IH: _____ Nome: _____ Idade _____
 _____ Sexo (M) (F) IMC _____

Antecedentes

☐ HAS ☐ Arritmia ☐ Tabagismo ☐ AVC ☐ DLP ☐ IR (Cr > 2) ☐ História familiar
 DAC

☐ Sorologia + (☐ HIV, ☐ Hepatite B ou ☐ C) ☐ Lesão de carótida ☐ Hepatopatia ☐
 DPOC ☐ Insuf Vasc Per ☐ Cirurgia prévia Qual (is) _____ (/ /)

☐ IAM: ☐ < 1 mês (☐ 1ª Sem ☐ 2ª Sem ☐ 3ª Sem ☐ 4ª Sem) ou ☐ > 1 mês

Tipo do IAM: ☐ Anterior ☐ Lateral ☐ Inferior ☐ Outro

☐ Antecedente infecção _____ ☐ Câncer

☐ DM	☐ DAC	☐ Disfunção VE (FE%)
o dieta	o RM	o Discreta (40 – 50)
o hipoglicemiante oral	o ICP (ATC)	o Moderada (30 – 40)
o insulina	o Outra (_____)	o Grave (< 30)

☐ Outros:

Exames Complementares

Índice tornozelo-braquial: _____

ECG: Ritmo: ☐ Sinusal ☐ Outros (_____)

☐ ST infra (região: _____) ☐ ST supra (região: _____) ☐ T invertida (região: _____)

☐ BRE ☐ BRD ☐ BDAE ☐ BAVT ☐ outros: _____

Ecocardiograma: nº exame _____

Bioquímica e hemograma:

☐ Potássio: _____ ☐ Sódio: _____ ☐ Uréia: _____ ☐ Creatinina: _____
☐ Glicemia: _____ ☐ Magnésio: _____ ☐ Troponina (pico): _____
☐ CKMB(pico): _____ ☐ Hemoglobina: _____ ☐ Hematócrito: _____
 Leucócitos: _____ (Desvio esquerda: ☐ sim ☐ não) ☐ Plaquetas: _____

Cinecoronariografia: nº exame _____

Angiografia coronária quantitativa:

Variável	Vaso	Vaso	Vaso	Vaso	Vaso
DR proximal					
DR distal					
DML					
% estenose					
Extensão(mm)					
Segmento					

DR: diâmetro de referência, DLM: diâmetro mínimo da luz

Evolução Hospitalar:

☐ Alta: _____ (data)

☐ Óbito: _____ (data)

☐ Complicações:

Anexo 4 . Carta de Aprovação do Comitê de Ética



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Comitê de Ética em Pesquisa

Av. da Engenharia, s/n – 1º Andar, Cid. Universitária, CEP 50740-600, Recife - PE,
Tel/fax: 81 2126 8588 - www.ufpe.br/ccs; e-mail: cepccs@ufpe.br

Of. N°. 156/2012 - CEP/CCS

Recife, 29 de fevereiro de 2012

Ao

Dr. Dinaldo Cavalcanti de Oliveira
Hospital das Clínicas- UFPE

Registro do SISNEP FR - 364651

CAAE – 0298.0.172.000-10

Registro CEP/CCS/UFPE N° 297/10

Título: Caracterização de citocinas inflamatórias em pacientes brasileiros com doença arterial coronariana.

Pesquisador Responsável: Dinaldo Cavalcanti de Oliveira

Senhor (a) Pesquisador (a):

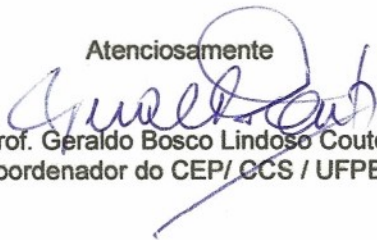
Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, liberando-o para início da coleta de dados em 01 de fevereiro 2012.

Ressaltamos que a aprovação definitiva do projeto será dada após a entrega do relatório final, conforme as seguintes orientações:

- a) Projetos com, no máximo, 06 (seis) meses para conclusão: o pesquisador deverá enviar apenas um relatório final;
- b) Projetos com períodos maiores de 06 (seis) meses: o pesquisador deverá enviar relatórios semestrais.

Dessa forma, o ofício de aprovação somente será entregue após a análise do relatório final.

Atenciosamente


Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto
Coordenador do CEP/CCS / UFPE

Anexo 5. Normas Periódicas da Revista e Aceite (Experimental & Clinical Cardiology Journal)

9pt)

Journal Title (Frutiger 12pt, left align)

Title of the Paper – do not exceed two rows (Frutiger 27pt regular, left align)

¶(10pt)

Article Type (Frutiger 12pt, left align)

¶(12pt)

¶(18pt)

Author Full Name^{1*}, First Co-Author Full Name² and Second Co-Author Full Name³ (Frutiger 12pt, left align)

¶(9 pt)

1 Corresponding Author Affiliation (Frutiger 8pt regular, left align)

2 First Co-Author Affiliation (if different from Author Affiliation) (Frutiger 8pt regular, left align)

3 Second Co-Author Affiliation (if different from upper affiliations) (Frutiger 8pt regular, left align)

© 2013 et al.; licensee Cardiology Academic Press. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

¶(15pt)

¶(10pt)

Abstract The abstract should briefly introduce the manuscript, not exceeding 190 words. No citations should be included in the abstract. (Palatino Linotype 9 pt regular, justify)

¶(9pt)

Keywords A list of three to five key words that clearly describe the subject matter. Body text, justify, single space (Palatino Linotype 9 pt regular, justify)

(18pt)

1. Introduction (Palatino Linotype 9 pt regular, left align)

¶(9 pt)

The introduction section should provide a context for your manuscript. When preparing the introduction, please bear in mind that some readers will not be experts in your field of research.

¶(9 pt)

2. Main heading (Palatino Linotype 9 pt regular, left align)

¶(9pt)

2.1 Secondary Heading (Palatino Linotype 9pt italic, left align)

¶(9pt)

2.1.1 Tertiary Heading (Palatino Linotype 9pt regular, left align)

¶(9pt)

¶(9pt)

3. Figures (Palatino Linotype 9 pt regular, left align)

¶(9pt)

Make sure you place figures in the manuscript in the exact position you want them to appear. If you are submitting figures as separate files, make sure you indicate the position of figures in the manuscript. Figures must be in high resolution, which is suitable for reproduction and print. High resolution starts at 300 DPI for .JPEG and .TIFF formats. EPS, as well as other vector image files, are also acceptable. Color figures are welcome. Place figures as close as possible to the first reference to them in the manuscript. When referring to a figure in the body of the text, the word "Figure" is used.

Figure

Figure

Figure 1. Title of figure, justify (Palatino Linotype 8 pt regular)

¶(9pt)

4. Tables (Palatino Linotype 9 pt regular, left align)

¶(9pt)

Avoid submitting tables in image formats (e.g. .jpeg, .tiff). If you are submitting tables as separate files, make sure you indicate the position of tables in the manuscript. Place tables as close as possible to the first reference to them in the manuscript. When referring to a table in the manuscript, no abbreviation is used, e.g. "Table". Each table should be given a number in Arabic numerals. All tables must be incorporated into the text in Portrait orientation.

¶(9pt)

Table 1. Title of table, justify (Palatino Linotype 8 pt regular)

¶(9pt)

5. Equations (Palatino Linotype 9 pt regular, left align)

¶(9pt)

Avoid submitting equations in image formats (e.g. .jpeg, .tiff). Equations are to be centered and numbered consecutively, with Arabic numerals, from 1 upwards. Enumeration of equations is in brackets and right-aligned. You are free to use equation-editor programs such as "MathType" and "Aurora".

¶(9pt)

6. Acknowledgments (Palatino Linotype 9 pt regular, left align)

¶(9pt)

You as the author are free to decide whether to include acknowledgments or not. Usually, the acknowledgments section includes the names of people who in some way contributed to the work, but do not fit the criteria to be listed as the authors. This section of your manuscript can also include information about funding sources.

¶(9pt)

7. References (Palatino Linotype 9 pt regular, left align)

¶(9pt)

Cardiology Academic Press uses the numbered citation method for reference formatting, with sequential numbering in the text, and respective ordering in a list at the end of the paper.

¶(9pt)

The list should contain at least five references and should be arranged in the order of citation in text, not in alphabetical order. List only one reference per reference number.

¶(9pt)

In the text, each reference number should be enclosed by square brackets. Citations of references may be given simply as "in [1] ...", or as "in reference [1] ...". Similarly, it is not necessary to mention the authors of a reference, unless the mention is relevant to the text. Phrases such as "For example," should not introduce references in the list, but should instead be given in square brackets in the text,

followed by the reference number, i.e., "For example, see [5]."

¶(9pt)

Multiple citations within a single set of brackets should be separated by commas. Where there are three or more sequential citations, they should be given as a range [2,7-9,13].

¶(9pt)

In order to make reading and searching simpler, references will be linked electronically to the papers they cite. Formatting the references properly is therefore crucial.

Anexo 6. Aceite da Revista (Experimental & Clinical Cardiology Journal)

Dear Prof. Dinaldo Oliveira,

Congratulations!

We are pleased to inform you that your paper "Interleukin 17 A Expression in Chronic Coronary Artery Disease" was accepted for publication in the Experimental & Clinical Cardiology journal.
Our 2 out of 3 independent reviewers have approved its content.

For any assistance you might need, we remain at your disposal.

Sincerely,

Mark Williams
Cardiology Academic Press

Eigerstrasse 2, 3007 Bern, Switzerland