

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:
CARDIOLOGIA E CIÊNCIAS CARDIOVASCULARES
FACULDADE DE MEDICINA

CARACTERIZAÇÃO DOS NÍVEIS DA PENTRAXINA-3 (PTX-3) EM
AMOSTRA DE PACIENTES COM CARDIOPATIA ISQUÊMICA ESTÁVEL
NA POPULAÇÃO BRASILEIRA

GIOVANNA GRÜNEWALD VIETTA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE:
CARDIOLOGIA E CIÊNCIAS CARDIOVASCULARES
FACULDADE DE MEDICINA

CARACTERIZAÇÃO DOS NÍVEIS DA PENTRAXINA-3 (PTX-3) EM
AMOSTRA DE PACIENTES COM CARDIOPATIA ISQUÊMICA ESTÁVEL
NA POPULAÇÃO BRASILEIRA

GIOVANNA GRÜNEWALD VIETTA

Orientador: Prof. Dr. EMÍLIO MORIGUCHI

Co-orientadora: Profa. Dra. CARISI A. POLANCZYK

*Dissertação de Mestrado apresentada no Programa de Pós-Graduação
em Cardiologia e Ciências Cardiovasculares da Universidade Federal
do Rio Grande do Sul para obtenção do título de Mestre.*

Porto Alegre, abril de 2008.

Dedico esta dissertação aos meus pais, minha avó, e meu marido. Estas pessoas com muita sabedoria, discernimento, bom senso e dedicação estiveram ao meu lado me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória, sempre me estimulando a dar grandes passos. Obrigada por serem meu porto seguro.

Agradecimentos

Toda lista de agradecimentos eventualmente peca pela ausência de uma ou outra pessoa que teve papel, ainda que pequeno, na conclusão de um trabalho como este. Mesmo assim, arrisco-me a relacionar os nomes de alguns que participaram dessa jornada comigo, ou antes dela forneceram-me os meios para a travessia.

À minha família, pela formação que me permitiu ter, com os sacrifícios que só ela sabe quais foram, e ao meu marido, pela paciência e pelo incentivo durante toda nossa ainda curta vida de casados.

Ao meu orientador Professor Dr. Emílio Moriguchi e a minha co-orientadora professora Dr^a. Carisi Anne Polanczyk pela incansável disponibilidade em saciar todas as minhas dúvidas.

Ao Programa de Pós-graduação em Cardiologia, pela infra-estrutura tornada disponível para o desenvolvimento deste e de outros trabalhos, e ao seu pessoal técnico-administrativo, que, de uma forma ou de outra, acabou por participar deste trabalho.

Aos colegas do grupo CPI que sempre estiveram prontos para ajudar no que fosse preciso.

Às colegas do Laboratório de Pesquisa Cardiovascular pelo empenho para que tudo desse certo.

Por fim, a todos os meus amigos que compreenderam o momento, e estiveram comigo, dando força e torcendo por mim.

Índice

1.	Lista de Abreviaturas – Português	6
2.	Lista de Abreviaturas – Inglês	7
3.	Revisão da Literatura	8
	i. Introdução.....	8
	ii. Definição de Angina.....	8
	iii. Marcadores Inflamatórios.....	10
	iv. Proteína-C-Reativa (PCR) Ultra Sensível (PCRus)	12
	v. Pentraxina 3 (PTX-3)	14
	vi. Interleucina 18 (IL-18)	16
	vii. Interleucina 10 (IL-10)	18
	viii. Conclusão	20
	ix. Bibliografia	22
4.	Artigo Original: versão em português	30
	i. Título.....	31
	ii. Bibliografia.....	42
	iii. Tabelas e Figuras	45
5.	Artigo Original: versão em inglês	55
	i. Title.....	56
	ii. References	66
	iii. Table and Figuras	69
6.	Anexos	
	i. Anexo I – Termo de Consentimento Informado	79
	ii. Anexo II – Protocolo/ <i>Ficha</i> de Atendimento	81

Lista de Abreviaturas – Português

Ach – Acetilcolina
AE – Angina estável
AI – Angina instável
AVC – Acidente vascular cerebral
BNP – Peptídeo natriurético atrial
CK – creatinoquinase
CK-MB – Fração MB da creatinoquinase
DAC – Doença arterial coronariana
DCV – Doenças cardiovasculares
FGF-2 – Fator de crescimento de fibroblasto 2
HSP60 – Heat-shock protein
IFN-g - Interferon-g
IL – Interleucina
IM – Infarto do miocárdio
LDL – Lipoproteína de baixa densidade
M-CSF – Fator estimulante de colônias de monócitos
NK-KB – Fator nuclear de transcrição
PCR – Proteína C reativa
PCRus – Proteína C reativa ultra-sensível
PTX-3 – Pentraxina-3
SAP – Componente amilóide P sérico
SCA – Síndrome coronariana aguda
SNP – Nitropruciato de sódio
TLRs – Receptores toll-like
TNF – Fator de necrose tumoral
TnT – Troponina T
TSG6 – proteína estimulante de TNF
VCAM – Molécula de adesão celular vascular

Lista de Abreviaturas – Inglês

ACS – Acute coronary syndrome

CAD – Coronary artery syndrome

CDH – Coronary heart disease

CRP – C reactive protein

hsCRP – High sensitive C reactive protein

IL – Interleukin

LDL – low density lipoprotein

PTX-3 – Pentraxin-3

SA – Stable angina

UA – Unstable angina

Revisão da Literatura

Introdução

As doenças cardiovasculares (DCV) representam um importante problema de saúde pública mundial, sendo a doença arterial coronariana (DAC) uma das principais causas de morbi-mortalidade. Nos Estados Unidos, estas representam a maior causa de morte, tendo chegado a praticamente 60% da mortalidade total em 2002. Neste país, aproximadamente 16 milhões de pessoas apresentam manifestações clínicas de DAC, incluindo infarto do miocárdio (IM) e angina instável (AI)¹.

No Brasil, estudos recentes demonstraram declínio na mortalidade por doenças circulatórias em algumas regiões, embora as doenças cerebrovasculares e as cardiovasculares ainda sejam responsáveis por coeficientes de mortalidade extremamente elevados, cerca de 32% da mortalidade total².

Segundo levantamento realizado pelo Ministério da Saúde, através Sistema de Informações de Mortalidade, e pelo IBGE, a taxa de mortalidade específica para doença isquêmica no Brasil, em 2004, foi de 48 óbitos por 100.000 habitantes. No Estado do Rio Grande do Sul, a taxa é de 74 óbitos por 100.000 habitantes³. No mesmo ano, em Porto Alegre, capital do Estado, foram registrados 58 óbitos por 100.000 habitantes causados por infarto agudo do miocárdio⁴.

Definição de Angina

Segundo as diretrizes de doença crônica da Sociedade Brasileira de Cardiologia, a angina é uma síndrome clínica caracterizada por dor ou desconforto em qualquer das seguintes regiões: tórax, epigástrio, mandíbula, ombro, dorso ou membros superiores, sendo tipicamente desencadeada ou agravada com atividade física ou estresse emocional e atenuada com uso de nitroglicerina e derivados. A angina usualmente acomete portadores de DAC com comprometimento de, pelo menos, uma artéria epicárdica, podendo também ocorrer em casos de doença cardíaca valvar, cardiomiopatia hipertrófica e hipertensão não controlada. Pacientes com coronárias normais e isquemia miocárdica relacionada ao espasmo ou disfunção endotelial também podem apresentar angina⁵.

Em todos os pacientes, especialmente naqueles com angina típica, as doenças associadas (simultâneas) que possam precipitar angina “funcional”, isto é, isquemia miocárdica, na ausência de obstrução coronariana anatômica significativa, devem ser consideradas (Quadro 1). Geralmente, são doenças que causam isquemia miocárdica por aumentar o consumo ou por diminuir a oferta de oxigênio para o miocárdio⁵.

Quadro 1. Condições que podem provocar ou exacerbar isquemia

Consumo aumentado de oxigênio	Oferta diminuída de oxigênio
Causas não cardíacas	
Anemia	Doença pulmonar obstrutiva crônica
Hipoxemia	Hipertensão pulmonar
Hipertermia	Fibrose pulmonar intersticial
Hipertireoidismo	Apnéia do sono obstrutiva
Toxicidade simpatomimética	Doença falciforme
Hipertensão	Hiperviscosidade
Ansiedade	Policitemia
Fístula arteriovenosa	Leucemia
Pneumonia	Trombocitose
Asma	Hipergamaglobulinemia
Causas cardíacas	
Cardiomiopatia hipertrófica	Taquicardia ventricular
Estenose aórtica	Taquicardia supraventricular
Cardiomiopatia dilatada	

César LAM *et al*, 2004⁵.

A instabilização da doença arterial coronariana, denominado angina instável, é a causa cardiovascular mais comum de internação hospitalar, e também a responsável pela maioria das internações em unidades coronarianas. A classificação da AI mais utilizada é a proposta por Braunwald, a qual leva em consideração a gravidade dos sintomas anginosos, as circunstâncias clínicas de sua ocorrência e a intensidade do tratamento utilizado. Outra opção de classificação é dividir os pacientes em subgrupos de alto, intermediário e baixo risco para óbito ou IAM não fatal, segundo critérios clínicos⁶.

Durante a evolução clínica, uma parte desses pacientes desenvolve elevações nos marcadores bioquímicos de dano miocárdico, configurando o quadro de IAM com ou sem supradesnível do segmento ST. Os pacientes com AI apresentam prognóstico variável quanto a eventos desfavoráveis, como IAM, óbito, recorrência de angina e necessidade de revascularização miocárdica⁶.

Marcadores Inflamatórios

Marcadores inflamatórios são compostos secretados por células ativadas, tendo a função de ativar ou aumentar aspectos específicos da cascata de inflamação. Estes podem ser classificados como pró-inflamatórios - promovem inflamação - ou antiinflamatórios – inibem/suprimem fatores pró-inflamatórios.

Na prática clínica, os marcadores de necrose miocárdica – Creatinofosfoquinase (CK) e sua fração MB (CK-MB)^{7,8,9-11}, Troponinas T (TnT) e I^{7,12,13,9-11,14-17}, e Mioglobina^{12,18}, bem como a Proteína C reativa (PCR)^{17,19-21} – marcador inflamatório de fase aguda – têm sido utilizados com a finalidade de aumentar o poder diagnóstico e prognóstico de pacientes com cardiopatia na sua fase de instabilização. Vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de melhorar a avaliação dos pacientes que chegam às emergências com queixa de dor torácica^{7,12,13,22}, visando aumentar a acurácia do diagnóstico de síndrome coronariana aguda (SCA) e evitando, dessa maneira, baixas hospitalares desnecessárias e liberações errôneas de pacientes.

Nas últimas décadas, a aterosclerose tem sido vastamente aceita como uma doença inflamatória crônica inicializada por diferentes fatores desencadeantes, entre eles, o acúmulo de lípidos associados à presença de marcadores inflamatórios que migram para uma região do vaso em resposta a uma injúria, ou dano ao tecido endotelial e a partir daí desencadeiam um processo de reações que alteram a funcionalidade do vaso levando ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares que podem culminar com a morte do indivíduo²³. Após um grande número de estudos epidemiológicos terem demonstrado a existência de associação ente diversos fatores inflamatórios e a DAC, vários marcadores inflamatórios sistêmicos têm sido investigados e ligados a uma predição de futuros eventos cardiovasculares e a identificação de pacientes de risco²³.

Mediadores inflamatórios estão intimamente associados com a cascata de eventos que conduz ao início, desenvolvimento e ruptura da placa aterosclerótica^{24,25}.

Hansson e Libby (2006), em uma recente revisão sobre a resposta imune na aterosclerose, descreveram o recrutamento e a ativação das células imunes nas placas ateroscleróticas (Figura 1). Onde, lipoproteínas de baixa densidade (LDL) podem associar-se com proteoglicanos da matriz extracelular, e através de ações enzimáticas

e radicais oxigênio sofrem modificações dando origem a moléculas de LDL-oxidada. Lipídeos biologicamente ativos são liberados e induzem as células endoteliais a expressarem moléculas de adesão leucocitária, como a molécula de adesão celular vascular (VCAM-1)²⁶.

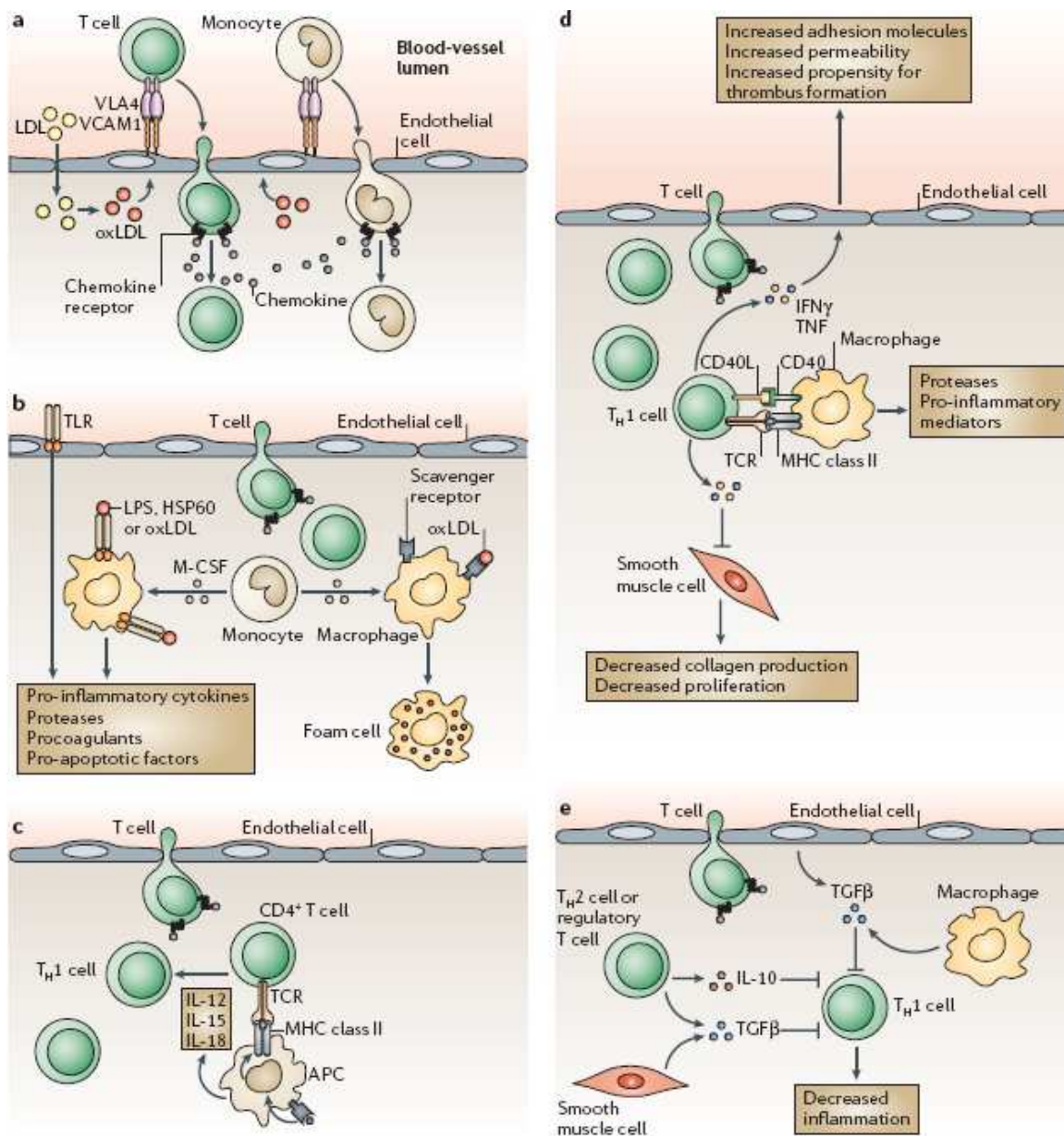


Figura 1. Recrutamento e ativação das células imunes na placa aterosclerótica. Hansson G e Libby P, 2006²⁶.

Monócitos e células T ligam-se as VCAM-1 e respondem a produção local de citocinas pela migração para o tecido arterial. Principalmente em resposta ao fator estimulante de colônia de monócitos (M-CSF), os monócitos diferenciam-se em

macrófagos. A expressão de receptores padrão aumenta, incluindo receptores *scavenger* e receptores *Toll-like* (TLRs). Os receptores *scavenger* mediam a captação de partículas LDL oxidada por macrófagos, o que leva ao acúmulo intracelular de colesterol e a formação de células espumosas. TLRs ligam-se a lipopolissacarídeos (LPS), as *heat-shock protein 60* (HSP60), a LDL-oxidada e outros ligantes, que estimulam a produção de moléculas pró-inflamatórias por macrófagos.

As células T após sofrerem ativação interagem com macrófagos ou com células dendríticas. As células *T helper* (TH 1) são responsáveis por expressar CD40 ligante (CD40L), e pela produção de citocinas inflamatórias como interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF), além da produção local de Interleucina-12 (IL-12), IL-18 e outras citocinas. A liberação destas citocinas faz com que aumente a adesão molecular, a permeabilidade e a propensão à formação de trombos, ainda inibe a proliferação de células da musculatura lisa e a produção de colágeno.

Contudo, este processo inflamatório de formação da placa aterosclerótica pode ser atenuado em resposta a presença de citocinas antiinflamatórias – como a interleucina 10 (IL-10), que é produzida pelas células TH2.

Proteína-C-Reativa (PCR) Ultra Sensível (PCRus)

A PCR é uma pentraxina de cadeia curta, produzida no fígado em resposta ao estímulo de várias citocinas, principalmente da interleucina (IL)-6^{27,28}. É um dos marcadores de inflamação de fase aguda mais estudado e utilizado na atualidade. Seu papel tem sido avaliado na estratificação de pacientes com SCA, e na possível contribuição prognóstica em pacientes com cardiopatia isquêmica estável.

Diferentes estudos avaliaram o valor da PCRus em pacientes atendidos na emergência com quadro de SCA. Lindmark e colaboradores (2001), em um estudo retrospectivo, observaram que pacientes com níveis PCRus baixos liberados da emergência tiveram menor número de eventos coronarianos tardios do que aqueles que tinham PCRus elevados²¹. Outros autores documentaram o aumento da PCRus em pacientes com AI, em relação a indivíduos controles, não obtendo diferença significativa quando avaliados pacientes com angina estável (AE) em relação ao grupo de indivíduos sadios^{21,30}.

Em pacientes com cardiopatia isquêmica estável, encontramos maior número de controvérsias no que diz respeito ao valor prognóstico desse marcador. Bogaty e colaboradores (2005) avaliaram 159 pacientes com doença coronariana conhecida,

estáveis clinicamente, com a finalidade de verificar a variabilidade da PCRus, com dosagens repetidas. As coletas foram realizadas com uma variação entre 15 dias e 6 anos. Estes autores encontraram ampla variabilidade entre as dosagens, o que foi considerado problemático para uma estratificação de risco e até mesmo para um monitoramento terapêutico³¹. Contudo, é preciso levar em consideração a grande variação do período entre as coletas e o pequeno número de pacientes estudados. O mesmo autor, acompanhando 150 pacientes durante quatro anos, divididos igualmente em três grupos (múltiplos eventos coronarianos; angina estável sem evento nos últimos três anos e pacientes sem doença coronariana), verificou níveis de PCRus elevados no grupo de pacientes mais graves em relação aos pacientes estáveis ($p < 0,0001$), demonstrando um risco relativo de 7,6 para eventos cardíacos quando a PCRus basal foi $> 3,5 \text{ mg/l}$ ³².

Em uma coorte de 2121 pacientes com angina (1030 AI; 743 AE e o restante com dor atípica), procedente do *European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities (ECATA) Angina Pectoris Study*, acompanhada por um período de dois anos, foi verificado evento cardíaco em 75 desses pacientes, demonstrando-se ser o PCRus um preditor de eventos tanto em pacientes com angina estável como instável³³.

Alguns estudos correlacionaram PCRus e evolução da doença coronariana em pacientes com cardiopatia isquêmica estável. No estudo de Liang e colaboradores (2006), um grupo de 190 pacientes com AE, submetido a cateterismo cardíaco, foi avaliado quanto ao nível de PCRus no momento da primeira arteriografia e após o segundo exame. Os pacientes foram divididos em dois grupos: os que apresentaram progressão da doença coronariana ($n=66$) e os que não apresentaram progressão ($n=124$), verificando-se diferença significativa na PCRus basal no grupo com progressão em relação ao grupo sem progressão ($p=0,018$). No grupo em que houve progressão, também havia o pior perfil lipídico ($p=0,014$), maior número de pacientes diabéticos ($p=0,024$) e a predominância de homens ($p=0,04$)³⁴.

Em concordância, um estudo caso-controle, incluindo 239 mulheres e 265 homens, com acompanhamento médio de seis e oito anos, respectivamente, sendo pareado por idade e tabagismo, foi atribuído um risco relativo de 1,79 para eventos coronarianos para pacientes com PCR $> 3,0 \text{ mg/dL}$, quando comparado com PCR $< 1,0 \text{ mg/dL}$ ³⁵.

Ainda seguindo a mesma linha, Kavsak e colaboradores (2007) dosaram PCR em 446 pacientes que chegaram à emergência com SCA e acompanharam os eventos (IAM, insuficiência cardíaca ou morte) por oito anos. Puderam assim observar que pacientes com níveis de PCR > 3,0 mg/L na admissão têm uma maior taxa de morte e de insuficiência cardíaca³⁶.

Apesar de estudos positivos relacionando inflamação e risco de eventos em indivíduos com DAC, esses achados não são consistentes em todos os estudos. Quando avaliado PCRus em 200 pacientes, considerando extensão da doença, história prévia de IAM ou classe funcional, não foi observada correlação com níveis de PCRus³⁷.

Também não foi observada alteração nos níveis de PCR em 94 pacientes estudados com AE, sem aterosclerose coronariana conhecida, em relação aos controles. Quando avaliado PCR em pacientes com AI, AE e controles – 45, 42 e 41 pacientes, respectivamente – foi observada diferença significativa do primeiro grupo em relação aos demais, mas não entre os dois últimos²⁰, sendo que outros autores encontraram resultados similares³⁸. Em um grande estudo de coorte prospectivo, com acompanhamento médio de sete anos, não foi observada associação com doença cardiovascular, quando comparado ao grupo controle.

Em uma coorte prospectiva na qual foram incluídos 128 pacientes com AI (Classe I – pacientes menos graves - n=59 e Classe II e III: n=16) e AE (n=53), foi demonstrada grande associação entre PCRus em pacientes com AI Classe II e III, quando comparados com os pacientes com AE ($p < 0,0001$), sendo que não houve diferença entre os pacientes com AI Classe I e os pacientes com AE ($p = 0,782$)³⁹.

Pentraxina 3 (PTX-3)

A PTX-3 é a primeira pentraxina de cadeia longa identificada. A metade dominante COOH da PTX-3 é homóloga à seqüência das pentraxinas de cadeia curta, enquanto à parte NH₂-terminal desta proteína não demonstra qualquer homologia significativa com outra proteína conhecida, o que confere a PTX-3 o protótipo de membro da família das pentraxinas de cadeia longa⁴⁰. Assim sendo, a PTX-3 é estruturalmente relacionada, mas diferente das clássicas pentraxinas de cadeia curta quanto à organização e localização dos genes, reconhecimento de ligações, células produtoras e sinais de indução.

O gene da PTX-3 localiza-se no cromossomo 3, na banda q25. Este é organizado em três éxons separados por dois introns: os dois primeiros éxons codificados respectivamente pelo peptídeo condutor e pela parte NH₂-terminal desta proteína; enquanto o terceiro éxon codifica a região pentraxina dominante, equiparando-se com os outros membros da família das pentraxinas ⁴¹.

PTX-3 é produzida predominantemente por macrófagos e células do endotélio vascular em resposta aos primeiros sinais pró-inflamatórios (produtos bacterianos, IL-1, TNF), mas não pela IL-6 ⁴². Levando em consideração que a PTX-3 é produzida por células do endotélio vascular e por macrófagos, e não pelo fígado, os níveis de PTX-3 podem refletir diretamente a condição inflamatória da vasculatura.

As funções fisiológicas atribuídas a PTX-3 envolvem reconhecimento e ligação a diferentes ligantes incluindo o componente C1q do sistema complemento, o fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF2), e a proteína da matriz extra celular (TSG-6 – proteína estimulante de TNF). Como as clássicas pentraxinas de cadeia curta, a PTX-3 liga-se com C1q induzindo a ativação do complemento. Em contraste, em sua fase fluida a ligação PTX-3 a C1q inibe a ativação do complemento pela obstrução de relevantes sítios de interação. Embora a ligação PTX-3 a C1q ocorra de maneira cálcio independente, sem uma prévia agregação de proteínas, a presença de cálcio é requerida para interação da PTX-3 com outros ligantes, como a TSG-6 ⁴³.

Além disso, PTX-3 está presente na lesão aterosclerótica e em vasculites de pequenos vasos em humanos ^{44,45} e é induzida pelo LDL-oxidado nas células do músculo liso ⁴⁶. O método de escolha para determinação da concentração sérica da PTX-3 é o enzima-imunoensaio (ELISA). O pico desta proteína no plasma é observado após aproximadamente 7 horas do aparecimento dos primeiros sinais e sintomas em pacientes com infarto do miocárdio, retornando aos valores basais em poucos dias ⁴⁷. Enquanto, no mesmo contexto, a PCR leva entre 24 a 48 horas, após sinais e sintomas, para atingir seu pico no plasma.

Latini e colaboradores realizaram uma avaliação do valor prognóstico da PTX-3 no infarto do miocárdio comparado com marcadores de relevância clínica conhecida. Mensuraram PTX-3, PCR, Ck, TnT e peptídeo natriurético atrial (BNP) em uma coorte de 724 pacientes (362 com eventos cardiovasculares e 362 sem eventos). Ao ser comparada com estes biomarcadores considerados preditores de mortalidade confiáveis em pacientes com infarto do miocárdio, a PTX-3 alcançou seu pico

plasmático mais cedo, mostrando-se um forte marcador prognóstico para morte em pacientes com infarto do miocárdio acompanhados por três meses. Além disso, quando a concentração máxima da PTX-3 foi utilizada com todos os outros biomarcadores como variável contínua, o risco de morte após infarto do miocárdio aumentou em 2,3% a cada 1ng/mL de aumento na PTX-3.⁴⁸

Em concordância, Inoue e colaboradores, avaliaram 162 pacientes consecutivos, de consultas anuais de revisão, (população A) que estavam sendo tratados para hipertensão, hiperlipidemia, diabetes mellitus, ou doença cardiovascular, comparando-os com 250 pacientes (população B) que estavam sendo avaliados para doença cardiovascular isquêmica por angiografia, dentre eles 52 pacientes com angina estável e 16 com angina instável. Após mensuração de PTX-3, observaram níveis de PTX-3 próximos a 1,98 ng/mL em voluntários sadios; 3,04 ng/mL para pacientes com angina estável e 6,20 ng/mL em pacientes com angina instável. Este estudo demonstrou que a PTX-3 pode ser um bom marcador prognóstico para eventos em pacientes com angina instável; enquanto níveis de PTX-3 em pacientes com angina estável não apresentaram diferença significativa quando comparados aos de voluntários sadios⁴⁹.

A ascensão rápida da PTX-3 ao início dos sinais e sintomas do IM confere vantagem a esta molécula em comparação a outros biomarcadores. Sua produção predominante por macrófagos e células do endotélio vascular em resposta aos primeiros sinais pró-inflamatórios lhe confere uma resposta mais específica da condição inflamatória da vasculatura.

Quando dosados níveis de PTX-3 em 196 pacientes com insuficiência cardíaca e 60 controles saudáveis, todos acompanhados, em média, por 655 dias, observou-se um aumento de concentração de PTX-3 conforme a gravidade dos pacientes. Com base na média e desvio padrão do grupo controle, o limite de normalidade foi considerado como 4,0 ng/mL; e constatou-se que pacientes com níveis plasmáticos de PTX-3 \geq 4,0 ng/mL desenvolveram com maior frequência eventos cardíacos do que pacientes com menor concentração⁵⁰.

Interleucina 18 (IL-18)

A Interleucina 18 (IL-18) é uma citocina pró-inflamatória da família da IL-1, produzida particularmente por macrófagos⁵¹, identificada originalmente como um fator de indução IFN- γ nas células de Kupffer e em macrófagos, possui papel central na

cascata inflamatória e nos processos imunes inato e adquirido por sua habilidade de induzir a produção de IFN- γ pelos linfócitos T e pelas células *natural killer*, que são cruciais na ruptura da placa aterosclerótica⁵². Além disso, a IL-18 age em sinergismo com a IL-12 promovendo a resposta das células T *helper*⁵³.

Recentes estudos em humanos têm relacionado o aumento da expressão de IL-18 com placa aterosclerótica, bem como, modelos animais confirmam o papel pró-aterogênico da IL-18⁵⁴.

Em uma coorte de 1229 pacientes, acompanhados em média por 3,9 anos, com diagnóstico estabelecido de cardiopatia isquêmica, tendo como desfecho morte de causas cardiovasculares, morte de outras causas e infarto do miocárdio não-fatal, foi observado não haver diferença significativa da IL-18 quando comparados pacientes com angina estável e instável. O mesmo não ocorreu com a PCRus, em que foi observada diferença significativa. A média da IL-18 foi mais elevada nos pacientes que apresentaram evento cardiovascular fatal do que nos que não apresentaram (68,4 versus 58,7 pg/mL, $p < 0,0001$). Esse estudo também demonstrou que, em cada quartil, havia um aumento de 1,46 vezes no risco de ocorrer evento cardiovascular. Quando comparados pacientes com AI e AE, foi observado que, em ambos os grupos, houve aumento do risco com o aumento da IL-18⁵².

Um estudo observacional com 73 pacientes, divididos em quatro grupos – controle (11 pacientes), AE (9 pacientes), AI (11 pacientes) e IAM (42 pacientes) – demonstrou diferença significativa entre a média dos níveis de IL-18 do grupo controle (46,8 pg/mL) quando comparada aos três outros grupos (AE 85,7 pg/mL; AI 214,7 pg/mL; IAM 164,6 pg/mL). Relacionando o grupo controle com o AE, pode-se sugerir que as concentrações da IL-18 em pacientes com AE podem estar associadas à presença de doença arterial coronariana avançada. Não foi observada diferença significante entre os grupos AI e IAM⁵⁵.

Em concordância, outro estudo realizado em pacientes com AE (n=48), AI (n=73) e pacientes sem evidências de doença coronariana (n=19) verificou haver diferença significativa entre o grupo controle com relação aos pacientes com AE e AI ($p=0,02$ e $0,002$, respectivamente), mas não houve diferença significativa entre estes dois últimos grupos⁵¹.

Além disso, o PRIME (*Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction*) avaliou a relação entre os níveis plasmáticos basal de IL-18 e a incidência

subseqüente de eventos coronarianos, acompanhando os participantes do estudo por cinco anos. Em uma análise caso-controle com homens europeus, de 50 a 59 anos, onde 335 eram casos com eventos coronarianos e 670 eram controles pareados por idade, os níveis de IL-18 basal estavam significativamente aumentados nos homens que desenvolveram evento coronariano em relação aos controles (225,1 versus 203,9 pg/mL). Após ajuste para potenciais variáveis de confusão, incluindo PCR, IL-6 e fibrinogenio, um risco relativo de 1,42 (IC 95% 1,13 a 1,79; p=0,003) foi estabelecido para um futuro evento coronariano associado com aumento dos níveis de IL-18. Sendo assim, IL-18 foi identificada como preditor independente para eventos coronarianos em homens saudáveis, europeus de meia idade⁵⁶.

Embora avaliando uma amostra pequena, Kawasaki e colaboradores (2005) mensuraram IL-18 em 27 pacientes com SCA e níveis de CK-MB normais na admissão hospitalar, comparando-os com 10 indivíduos controles. Níveis aumentados de IL-18 evidenciaram, retrospectivamente, infarto do miocárdio em 15 dos 27 pacientes. O que levou os autores a concluir que o aumento dos níveis de IL-18 plasmática precede o aumento de CK-MB em pacientes com IM, não podendo assim correlacionar a concentração de IL-18 na admissão com o pico de CK-MB⁵⁷.

Interleucina 10 (IL-10)

A IL-10 é secretada por monócitos/macrófagos ativados e linfócitos, e possui propriedades antiinflamatórias como inibição do fator nuclear de transcrição (NF-kB), conduz a supressão da produção de citocinas, inibe a matriz de degradação das metaloproteinases, reduz o fator de expressão tecidual, e inibe a apoptose de macrófagos e monócitos após infecção⁵⁸.

Assim como a IL-18, a IL-10 tem sido alvo de inúmeros estudos que objetivam demonstrar seu valor prognóstico para eventos coronarianos em populações com DAC. Dentre eles, os revisados a seguir.

Em 547 pacientes que apresentaram síndrome coronariana aguda, foi avaliada a taxa de eventos cardíacos em 24 horas, 72 horas, trinta dias e seis meses. Nas 24h iniciais, quando avaliado desfecho combinado (mortalidade e IAM não-fatal), houve tendência a menor número de eventos em pacientes que se encontravam com níveis de IL-10 mais altos, entre 3,6 a 20,6 pg/mL. Em pacientes que apresentavam PCRus elevada, IL-10 aumentada foi considerada fator protetor para evento cardiovascular.

Em análise de curva de sobrevida, em seis meses, IL-10 elevada foi um fator de bom prognóstico⁵⁹.

Smith e colaboradores (2001) avaliaram os níveis de IL-10 em 95 pacientes admitidos em unidade de dor torácica, dos quais, 50 tinham AE e 45 AI, e analisando seus achados, estabelecem que a IL-10 foi significativamente maior nos pacientes com angina estável ($p < 0,0001$)⁶⁰.

Cabe ressaltar também o trabalho de Chalikias e colaboradores, no qual foi estudado o valor prognóstico da razão entre Interleucina 18 (pró-inflamatório) e Interleucina 10 (antiinflamatório) em pacientes com SCA com relação a eventos coronarianos. Participaram do estudo 107 pacientes com SCA, dos quais, 44 tiveram eventos. O valor prognóstico da razão das interleucina (IL-18/IL-10) foi significativamente mais alto, demonstrando risco relativo de 1,74 (95% IC 1,09-2,78), do que o encontrado quando analisadas isoladamente IL-18 (RR 1,46; 95% IC 0,93-2,27) e 1/IL-10 (RR 1,63; 95% IC 1,04-2,56). Sendo demonstrado que o aumento da IL-18 e a diminuição da IL-10 estavam relacionados com o pior prognóstico destes pacientes⁶¹.

Wojakowski e colaboradores avaliaram os níveis de IL-10 em amostras de 50 pacientes com IAM e de 30 pacientes com AE; verificando que os primeiros possuíam menor concentração desse marcador do que os pacientes estáveis⁶².

Investigando se níveis séricos elevados de IL-10 estão associados a uma melhor vasoreatividade endotelial em pacientes com DAC, Fichtlscherer e colaboradores (2003) avaliaram a vasoreatividade em 65 pacientes. Para tanto, mensuraram o fluxo sanguíneo endotélio-dependente (acetilcolina – Ach - 10 a 50 $\mu\text{g}/\text{min}$) e endotélio-independente (nitropruciato de sódio – SNP - 2 a 8 $\mu\text{g}/\text{min}$) do antebraço por pletismografia. Os níveis de IL-10 estavam significativamente correlacionados com a indução do fluxo sanguíneo pelo Ach. Ainda observaram que quando os níveis de IL-10 estão aumentados em pacientes com níveis de PCR aumentados, não se obtém o comprometimento da resposta do fluxo sanguíneo estimulada pelo Ach. Logo, o aumento dos níveis de IL-10 está associado com uma melhor vasoreatividade endotelial sistêmica em pacientes com níveis aumentados de PCR, demonstrando que o balanço entre mediadores pró e antiinflamatórios é o melhor determinante de função endotelial em pacientes com DAC⁶³.

Conclusão

Nosso organismo é um grande sistema de defesa; uma sociedade perfeita em completo equilíbrio dinâmico visando sempre um bem estar geral, priorizando e preservando uma função sistêmica maior, tendo como objetivo único à manutenção da vida.

A homeostase celular de organismos eucariontes é sustentada através de complexos mecanismos precisamente regulados. A ruptura deste equilíbrio trás como consequência uma tentativa de reorganização sistêmica própria de mecanismos de defesa regidos por objetivos citoprotetores.

Assim sendo, o entendimento de que a aterosclerose não é um processo estático, onde se dá simplesmente o acúmulo de gordura na parede arterial; mas, um processo dinâmico, multifatorial, com o envolvimento de vários mediadores de inflamação; tem levado diferentes grupos de pesquisa a estudarem os mecanismos da instabilidade da placa e formação de trombos. A avaliação desses marcadores no prognóstico do paciente portador de DAC, apesar de ainda não ser liberado para uso na prática clínica, tem auxiliado em sua estratificação.

Até o momento, as evidências apontam para uma associação entre níveis elevados destes marcadores inflamatórios, como PCRus e IL18 , à maior risco de eventos coronarianos futuros, estando relacionados a pior prognóstico. Por outro lado, outros marcadores como a IL-10, por sua ação antiinflamatória, conferem um efeito protetor a esses pacientes.

Esses marcadores inflamatórios também estão relacionados a eventos cardiovasculares em pacientes livres de doença aterosclerótica, quando acompanhados por longo período. O que nos leva a acreditar que embora haja atividade dos marcadores inflamatórios que precede os eventos cardíacos, esses pacientes não apresentam evidências clínicas de instabilização da placa.

A PTX-3 é um novo marcador apontado em alguns estudos como mais sensível para identificação de dano miocárdico e mais específico para processos inflamatórios provenientes da vasculatura. Sua validação é restrita a estudos com pequeno número de pacientes ou de etnias específicas. O mesmo precisa ser melhor explorado em diferentes populações, como em indivíduos que apresentam doença coronariana estável, demonstrando assim, sua importância clínica nos diversos seguimentos populacionais. Além disso, é importante relacionar o comportamento da PTX-3, em

diferentes momentos da cascata inflamatória, com outros marcadores conhecidos para traçar seu perfil prognóstico.

Assim, compreender melhor o funcionamento da cascata inflamatória pode trazer-nos vantagens e benefícios:

- Auxiliando a estratificar os pacientes mais graves, podendo, futuramente, reservar-lhes tratamento diferenciado;
- Auxiliando uma melhor avaliação terapêuticas futura, o que pode ajudar a diminuir a morbimortalidade destes pacientes;
- Avaliando em qual ponto do ciclo da doença é possível intervir;
- Determinando em que dado momento seria possível prever a instabilização clínica de um paciente, antes que esta aconteça clinicamente, por meio da avaliação de uma “instabilização inflamatória”.

Ainda são poucos os estudos na literatura que avaliaram os marcadores inflamatórios em pacientes com cardiopatia isquêmica estável clinicamente e os relacionaram com seu valor prognóstico. Nessa revisão, descrevemos alguns marcadores de inflamação e seus respectivos achados em pacientes com angina estável e angina instável tentando visualizar quais os seus significados.

BIBLIOGRAFIA

1. Saunders E e Ofili E. Epidemiology of atherothrombotic disease and the effectiveness and risks of antiplatelet therapy. *Cardiology in Review* 2008; 16: 82–88.
2. Ministério da Saúde. Anuário Estatístico de Saúde do Brasil; 2001 [Capturado em 28 março 2008] Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/anuario2001/index.cfm>
3. Ministério da Saúde. Indicadores de mortalidade. 2004 [Capturado em 28 março 2008] Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2006/c08.def>
4. Ministério da Saúde. Indicadores municipais de saúde. 2004 [Capturado em 28 março 2008] Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/tabfusion/tabfusion.cfm>
5. César LAM, Mansur AP, Armaganijan D, Amino JG *et al.* Diretrizes de doença coronariana crônica angina estável. *Arq Bras Cardiol* 2004; 83 (2):1-43.
6. Nicolau JC, César LAM, Timerman A, Piegas LS, Marin-Neto JA. Diretrizes da sociedade brasileira de cardiologia sobre angina instável e infarto agudo do miocárdio sem supradesnível do segmento ST. *Arq Bras Cardiol* 2001; 77 (2): 1-37.
7. Fesmire FM. Delta CK-MB outperforms delta troponin I at 2 hours during the ED rule out of acute myocardial infarction. *Am J Emerg Med* 2000; 18:1-8.
8. Bassan R, Gamarski R, Pimenta L, Volschan A, Scofano M, Dohmann HF, Araujo M, Clare C, Fabricio M, Sanmartin CH, Mohallem K, Macaciel R, Gaspar S. Efficacy of a diagnostic strategy for patients with chest pain and no ST-segment elevation in the emergency room. *Arq Bras Cardiol* 2000; 74:405-17.

9. McErlean ES, Deluca SA, van Lente F, Peacock F, Rao JS, Balog CA, Nissen SE. Comparison of troponin T versus creatine kinase-MB in suspected acute coronary syndromes. *Am J Cardiol* 2000; 85(4):421-6.
10. Porela P, Pulkki K, Helenius H, Antila KJ, Pettersson K, Wacker M, Voipio-Pulkki LM. Prediction of short-term outcome in patients with suspected myocardial infarction. *Ann Emerg Med* 2000; 35(5):413-20.
11. Koukkunen H, Penttila K, Kemppainen A, Penttila I, Halinen MO, Rantanen T, Phil L, Pyorala K. Differences in the Diagnosis of Myocardial Infarction by Troponin T Compared With Clinical and Epidemiologic Criteria. *Am J Cardiol* 2001; 88:727-731.
12. Sonel A, Sasseen BM, Fineberg N, Bang N, Wilensky RL. Prospective study correlating fibrinopeptide A, troponin I, myoglobin, and myosin light chain levels with early and late ischemic events in consecutive patients presenting to the emergency department with chest pain. *Circ* 2000; 102(10):1107-13.
13. Collinson PO, Premachandram S, Hashemi K. Prospective audit of incidence of prognostically important myocardial damage in patients discharged from emergency department. *BMJ* 2000; 320:1702-5.
14. Peacock WF IV, Emerman CL, McErlean ES, Deluca SA, van Lente F, Rao JS, Nissen SE. Prediction of short- and long-term outcomes by troponin T levels in low-risk patients evaluated for acute coronary syndromes. *Ann Emerg Med* 2000; 35(3):213-20.
15. Kontos MC, Anderson FP, Alimard R, Ornato JP, Tatum JL, Jesse RL. Ability of troponin I to predict cardiac events in patients admitted from the emergency department. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36(6):1818-23.
16. Gil M, Zarebinski M, Adamus J. Plasma fibrinogen and troponin I in acute coronary syndrome and stable angina. *Int J Cardiol* 2002; 83(1):43-6.

17. Sabatine MS, Morrow DA, de Lemos JA, Gibson CM, Murphy SA, Rifai N, McCabe C, Antman EM, Cannon CP, Braunwald E. Multimarker approach to risk stratification in non-ST elevation acute coronary syndromes: simultaneous assessment of troponin I, C-reactive protein, and B-type natriuretic peptide. *Circ* 2002; 105(15):1760-3.
18. Winter RJ, Lijmer JG, Koster RW, Hoek FJ, Sanders GT. Diagnostic accuracy of myoglobin concentration for the early diagnosis of acute myocardial infarction. *Ann Emerg Med* 2000; 35(2):113-20.
19. Fiotti N, Di Chiara A, Altamura N, Miccio M, Fioretti P, Guarnieri G, Giansante C. Coagulation indicators in chronic stable effort angina and unstable angina: relationship with acute phase reactants and clinical outcome. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2002; 13(3):247-55.
20. Li JJ, Jiang H, Huang CX, Fang CH, Tang QZ, Xia H, Liu J, Li GS. Elevated level of plasma C-reactive protein in patients with unstable angina: its relations with coronary stenosis and lipid profile. *Angiology* 2002; 53(3):265-72.
21. MagadLe R, Weiner P, Beckerman M, Berar-Yanay N. C-reactive protein as a marker for active coronary artery disease in patients with chest pain in the emergency room. *Clin Cardiol* 2002;25(10):456-60.
22. Pope JH, Aufderheide TP, Ruthazer R, Woolard RH, Feldman JA, Beshansky JR, Griffith JL, Selker HP. Missed diagnoses of acute cardiac ischemia in the emergency department. *N Engl J Med* 2000; 342(16):1163-70.
23. Fichtlscherer S, Heeschen C, Zeiher AM. Inflammatory markers and coronary artery disease. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4(2):124-31.
24. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 1999; 138(5 Pt 2):S419-20.

25. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nat* 2000; 407:233-241
26. Hansson, GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat* 2006; 6: 508-19
27. Ganter U, Arcone R, Toniatti C, Morrone G, Ciliberto G. Dual control of C-reactive protein gene expression by interleukin-1 and interleukin-6. *The EMBO Journal* 1989; 8(12):3773-3779.
28. Ganapathi MK, Mackiewicz AJ, Samols D, Brabenec A, Kushner Z, Schultz D, Hu S. Induction of C-reactive protein by cytokines in human hepatoma cell lines is potentiated by caffeine. *Biochem J* 1990; 269:41-46.
29. Lindmark E, Wallentin L, Siegbahn A. Blood cell activation, coagulation, and inflammation in men and women with coronary artery disease. *Thromb Res* 2001; 103(3):249-59.
30. Cusack MR, Marber MS, Lambiase PD, Bucknall CA, Redwood SR. Systemic inflammation in unstable angina is the result of myocardial necrosis. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39(12):1917-23.
31. Bogaty P, Brophy JM, Boyer L, Simard S, Joseph L, Bertrand F, Dagenais GR. Fluctuating inflammatory markers in patients with stable ischemic heart disease. *Arch Intern Med* 2005; 165(2):221-6.
32. Bogaty P, Poirier P, Simard S, Boyer L, Solymoss S, Dagenais GR. Biological Profile in Subjects With Recurrent Acute Coronary Events Compared With Subjects With Long-Standing Stable Angina. *Circ* 2001; 103:3062-8.
33. Haverkate F, Thompson SG, Pyke SD, Gallimore JR, Pepys MB. Production of C-reactive protein and risk of coronary events in Stable and unstable angina. *Lancet* 1997; 349:262-6.

34. Liang KW, Sheu WH, Lee WL, Liu TJ, Ting CT, Chen YT, Lee WJ. Coronary artery disease progression is associated with C-reactive protein and conventional risk factors but not soluble CD40 ligand. *Can J Cardiol* 2006; 22(8):691-6.
35. Pai JK, Pischon T, Ma J, Manson JE, Hankinson SE, Joshipura K, *et al.* Inflammatory Markers and the Risk of Coronary Heart Disease in Men and Women. *N Engl J Med* 2004; 351:2599-2610.
36. Kavsak PA, MacRae AR, Newman AM, Lustig V, Palomaki GE, Ko DT, Tu JV, Jaffe AS. Elevated C-reactive protein in acute coronary syndrome presentation is an independent predictor of long-term mortality and heart failure. *Clin Biochem* 2007; 40(5-6):326-9.
37. Veselka J, Procházková S, Duchonová R, Bolomová I, Urbanová T, Tesar D, Honek T. Relationship of C-reactive protein to presence and severity of coronary atherosclerosis in patients with stable angina pectoris or a pathological exercise test. *Coron Artery Dis* 2002; 13(3):151-4.
38. Abdelmouttaleb I, Danchin N, Ilardo C, Aimone-Gastin I, Angioi M, Lozniewski A, Loubinoux J, Le Faou A, Guéant JL. C-Reactive protein and coronary artery disease: additional evidence of the implication of an inflammatory process in acute coronary syndromes. *Am Heart J* 1999; 137(2):346-51.
39. Yip HK, Wu CJ, Hang CL, Chang HW, Yang CH, Hsieh YK, Fang CY, Fu M, Yeh KH, Chen MC. Levels and values of inflammatory markers in patients with angina pectoris. *Int Heart J* 2005; 46(4):571-81.
40. Schlimgen AK, Helms JA, Vogel H, Perin MS. Neuronal Pentraxin, a Secreted Protein with Homology to Acute Phase Proteins of the Immune System. *Neuron* 1995;14: 519-526.

41. Breviario F, d'Aniello EM, Golay J, Peri G, Bottazzi B, Bairoch A, *et al.* Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells: cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component. *J Biol Chem* 1992; 267:22190 –22197.
42. Lee GW, Goodman AR, Lee TH, Vilcek J. Relationship of TSG-14 protein to the pentraxin family of major acute phase proteins. *J Immunol* 1994;153:3700
43. Bottazzi B, Garlanda C, Salvatori G, Jeannin P, Manfredi A, Mantovani A. Pentraxins as a key component of innate immunity. *Immun* 2006; 18:10–15.
44. Rolph M, Zimmer S, Bottazzi B, Garlanda C, Mantovani A, Hansson G. Production of the Long Pentraxin PTX3 in Advanced Atherosclerotic Plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:10-14.
45. Fazzini F, Peri G, Doni A, Dell'Antonio G, Dal Cin E, Bozzolo E. PTX3 in Small-Vessel Vasculitides: An Independent Indicator of Disease Activity Produced at Sites of Inflammation. *Arthritis & Rheumatism*, 2001; 44(12): 2841–2850.
46. Klouch M, Peri G, Knabbe C, Eckstein H, Schmid F, Schmitz G, *et al.* Modified atherogenic lipoproteins induce expression of pentraxin-3 by human vascular smooth muscle cells. *Atheros* 2004; 175: 221–228.
47. Peri G, Inrona M, Corradi D, Iacuitti G, Signorini S, Avanzini F, *et al.* PTX3, A Prototypical Long Pentraxin, Is an Early Indicator of Acute Myocardial Infarction in Humans. *Circ* 2000;102: 636-641.
48. Latine R, Maggioni AP, Peri G, Gonzini L, LucciD, Mocarelli P, *et al.* Prognostic Significance of the Long Pentraxin PTX3 in Acute Myocardial Infarction. *Circ* 2004;110:2349-2354.

49. Inoue K, Sugiyama A, Reid PC, Ito Y, Miyauchi K, Mukai S, et al. Establishment of a high sensitivity plasma assay for human pentraxin3 as a marker for unstable angina pectoris. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27(1):161-7.
50. Suzuki S, Takeishi Y, Niizeki T, Koyama Y, Kitahara T, Sasaki T, et al. Pentraxin 3, a new marker for vascular inflammation, predicts adverse clinical outcomes in patients with heart failure. *Am Heart J* 2008 ;155(1):75-81.
51. Rosso R, Roth A, Herz I, Miller H, Keren G, George J. Serum levels of interleukin-18 in patients with stable and unstable angina pectoris. *Int J Cardiol* 2005; 98(1):45-8.
52. Blankenberg S, Tiret L, Bickel C, Peetz D, Cambien F, Meyer J, et al. Interleukin-18 is a strong predictor of cardiovascular death in stable and unstable angina. *Circ* 2002;106:24-30.
53. Dinarello CA, Novick D, Puren AJ, Fantuzzi G, Shapiro L, Mühl H, et al. Overview of interleukin-18: more than an interferon-gamma inducing factor. *J Leukoc Biol* 1998; 63(6):658-64.
54. Mallat Z, Corbaz A, Scoazec A, Besnard S, Lesèche G, Chvatchko Y, Tedgui A. Expression of interleukin-18 in human atherosclerotic plaques and relation to plaque instability. *Circ* 2001; 104(14):1598-603.
55. Mallat Z, Henry P, Fressonnet R, Alouani S, Scoazec A, Beaufils P, et al. Increased plasma concentrations of interleukin 18 in acute coronary syndromes. *Heart* 2002; 88:467–469.
56. Blankenberg S, Luc G, Ducimetière P, Arveiler D, Ferrières J, Amouyel P, et al. Interleukin-18 and the risk of coronary heart disease in european men. *Circ* 2003; 108:2453-2459.

57. Kawasaki D, Tsujino T, Morimoto S, Masai M, Masutani M, Ohyanagi M, *et al.* Plasma interleukin-18 concentration: a novel marker of myocardial ischemia rather than necrosis in humans. *Cor Art Disease* 2005, 16:437–441.
58. Li JJ, Guo YL, Yang YJ. Enhancing anti-inflammatory cytokine IL-10 may be beneficial for acute coronary syndrome. *Med Hypotheses* 2005; 65(1):103-6.
59. Heeschen C, Dimmeler S, Hamm CW, Fichtlscherer S, Boersma E, Simoons ML, *et al.* Serum Level of the Antiinflammatory Cytokine Interleukin-10 Is an Important Prognostic Determinant in Patients With Acute Coronary Syndromes. *Circ* 2003; 107:2109-14.
60. Smith DA, Irving SD, Sheldon J, Cole D, Kaski JC. Serum Levels of the Antiinflammatory Cytokine Interleukin-10 Are Decreased in Patients With Unstable Angina. *Circ* 2001; 104:746-9.
61. Chalikias GK, Tziakas DN, Kaski JC, Hatzinikolaou EI, Stakos DA, Tentas IK, Kortsaris A, Hatseras DI. Interleukin-18: interleukin-10 ratio and in-hospital adverse events in patients with acute coronary syndrome. *Atherosclerosis* 2005; 182(1):135-43.
62. Wojakowski W, Maslankiewicz K, Ochala A, Wyderka R, Zuk-Popiolek I, Flak Z, Mroz I, Tendera M. The pro- and anti-inflammatory markers in patients with acute myocardial infarction and chronic stable angina. *Int J Mol Med* 2004; 14(2):317-22.
63. Fichtlscherer S, Breuer S, Heeschen C, Dimmeler S, Zeiher AM. Interleukin-10 serum levels and systemic endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44(1):44-9.

ARTIGO EM PORTUGUES

Caracterização dos níveis da Pentraxina-3 (PTX-3) em amostra de pacientes com cardiopatia isquêmica estável na população brasileira

Giovanna Grünewald Vietta

Carisi Anne Polanczyk

Emílio Moriguchi

Programa de Pós-graduação em Cardiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Serviço de Cardiologia e Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Título abreviado: Pentraxina-3 e angina estável

Palavras-chaves: Inflamação, Síndrome Coronariana Aguda, Angina estável, Pentraxina-3, Proteína-C-Reativa, Interleucinas.

Endereço para correspondência:

Giovanna Grünewald Vietta
Endereço: Rua Ramiro Barcelos, 2350. Bairro – Santana
Porto Alegre/RS/Brasil CEP 90035-006
Fone: (51) 2101-8844
e-mail: ggvietta@terra.com.br

Resumo

Introdução: A Pentraxina-3 (PTX-3), produzida principalmente por macrófagos e células da vasculatura endotelial em resposta aos primeiros sinais pró-inflamatórios, tem sido apontada como um novo marcador de eventos coronarianos. Este estudo objetiva caracterizar os níveis plasmáticos de PTX-3 em pacientes com doença arterial coronariana estável em uma população brasileira, bem como sua relação com outros marcadores de risco cardiovascular e manifestação clínica de doença arterial coronariana (DAC).

Métodos: Caracterização dos fatores de risco cardiovascular clássicos, e determinação dos níveis plasmáticos de PTX-3, proteína C reativa ultra-sensível (PCRus), interleucinas 18 (IL-18) e 10 (IL-10) foram realizadas numa coorte de 132 pacientes com doença arterial coronariana documentada, estáveis clinicamente. A determinação dos níveis plasmáticos de PTX-3, PCRus, IL-18 e IL-10 foi realizada pela técnica de ELISA utilizando-se kits comercialmente disponíveis. Os resultados dos valores dos marcadores inflamatórios foram comparados entre participantes que tiveram eventos clínicos ou não durante o seguimento médio de 47 meses.

Resultados: Os níveis de PTX-3 e PCR-us coletados na primeira e segunda amostra foram semelhantes 3,45 e 3,84 ng/mL, e 4,89 e 4,72 mg/dL, respectivamente. A correlação de Pearson entre a primeira e segunda amostra foi maior para a dosagem de PCR-us que para o PTX3 ($r=0,603$ e $r=0,356$; $p<0,001$). Os níveis médios de PTX-3 em pacientes sem eventos foram $3,49\pm 1,94$ ng/mL e nos pacientes que desenvolveram eventos $3,48\pm 2,33$ ng/mL ($p= 0,982$). Para PCR, os valores foram de $5,07\pm 8,26$ mg/mL e $4,60\pm 4,66$ mg/dL ($p= 0,737$), respectivamente. Não foi encontrada associação entre níveis de PTX-3 e fatores de risco cardiovascular. Valores de PCRus foram associados com níveis séricos de LDL e a fração de ejeção do ventrículo esquerdo, não havendo relação com outros fatores de risco.

Conclusões: Nesta amostra de indivíduos com DAC estável os níveis de PTX-3 e PCR foram mais elevados do que em outras populações. Não identificamos fatores de risco relacionados com níveis aumentados de PTX-3 ou sua relação com eventos em médio prazo.

Introdução

Aterosclerose é amplamente aceita como uma doença inflamatória crônica iniciada por diferentes fatores vasculares e extravasculares. Evidências sugerem que níveis aumentados de alguns marcadores inflamatórios estão fortemente relacionados com a ocorrência de complicações cardiovasculares, como angina instável, infarto agudo do miocárdio e morte. Entre os biomarcadores mais estudados, a Proteína C Reativa (PCR) é o de mais alta sensibilidade^{1, 2}.

PCR e o componente amilóide P sérico (SAP) são pentraxinas de cadeia curta, consideradas proteínas de fase aguda, produzidas no fígado em resposta, principalmente, a interleucina (IL) 6. A Pentraxina-3 (PTX-3) é a primeira pentraxina de cadeia longa identificada, produzida principalmente por macrófagos e células da vasculatura endotelial em resposta aos primeiros sinais pró-inflamatórios (IL-1, fator de necrose tumoral – TNF), tem sido apontada como um novo marcador de eventos coronarianos^{3,4,5,6}.

Recentemente, um grupo japonês desenvolveu um ensaio de ELISA com maior sensibilidade para detecção plasmática de PTX-3. A fim de validar o novo método, testaram-no em uma população japonesa de 162 pacientes, provindos de consultas de revisão anual, tratados para hipertensão, hiperlipidemia, diabetes mellitus ou doença cardiovascular, e em 52 pacientes com angina estável e 16 com angina instável admitidos em um hospital universitário. Neste estudo, observaram níveis de PTX-3 próximos a 1,98 ng/mL em voluntários saudáveis; 3,04 ng/mL para pacientes com angina estável e 6,20 ng/mL em pacientes com angina instável. Estes resultados sugerem que a PTX-3 seja um bom marcador preditivo em pacientes com angina instável; enquanto níveis de PTX-3 em pacientes com angina estável não apresentaram diferença significativa quando comparados aos de voluntários saudáveis⁷.

Além destas proteínas marcadoras de fase aguda, níveis elevados de IL-18 podem estar associados a um pior prognóstico cardiovascular. A IL-18 é uma citocina pró -inflamatória com habilidade de induzir a produção de interferon- γ pelos linfócitos T e pelas células natural killer, que são cruciais na ruptura da placa aterosclerótica^{8, 9, 10, 11}.

Entretanto, a cascata inflamatória apresenta elementos de contrapeso, fatores capazes de manter o delicado equilíbrio entre moléculas pró e antiinflamatórias, regular

a homeostase vascular e principalmente, manter a integridade da parede do vaso. Isso nos permite citar que níveis aumentados de IL-10, potente citocina antiinflamatória, estão fortemente ligados a um prognóstico mais favorável em pacientes com SCA^{12, 13, 14}.

Assim, nosso estudo pretende validar a mensuração de PTX-3 em pacientes com doença arterial coronariana clinicamente estável; analisar os níveis de PTX-3 em uma população brasileira; demonstrar a reprodutibilidade intra-ensaio e a estabilidade dos níveis de PTX-3 inter-ensaio, com uma variação média de tempo de três meses. Bem como, correlacionar os valores de PTX-3 com outros marcadores inflamatórios e associa-los a presença de eventos em médio prazo.

Materiais e Métodos

População em estudo

A população alvo foi descrita previamente¹⁵ e compreende pacientes acompanhados no Ambulatório de Cardiopatia Isquêmica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A partir de uma população global de 498 pacientes em acompanhamento nesta coorte, foram identificados e selecionados aleatoriamente 132 indivíduos que tinham amostras de sangue disponíveis armazenadas. Foram incluídos na coorte pacientes com diagnóstico confirmado de cardiopatia isquêmica, estáveis clinicamente. DAC foi definida pela presença de ao menos um dos seguintes critérios: história e evidência eletrocardiográfica de infarto, presença de lesões coronarianas obstrutivas >50% na coronariografia, procedimentos de revascularização miocárdica prévios, ou angina estável com testes não-invasivos sugestivos de isquemia. Pacientes que tivessem apresentado episódios de SCA ou tivessem sido submetidos a algum procedimento (angioplastia ou cirurgia) nos últimos três meses, fossem portadores de alguma colagenose (artrite reumatóide, lupus eritematoso sistêmico, etc), neoplasia, insuficiência renal crônica em tratamento dialítico, ou que estivessem com algum procedimento cardíaco agendado foram excluídos desta coorte.

O Projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética deste hospital e todos pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Coleta de dados e amostra de sangue

Os pacientes foram avaliados periodicamente em visitas ambulatoriais, com acompanhamento em intervalos de 3 a 4 meses. Para os pacientes incluídos no estudo era aplicado um questionário padrão, repetido em todas as consultas.

Análise Bioquímica

Após cada consulta, foram coletadas amostras de sangue venoso periférico, 10 mL de sangue total, em um frasco com EDTA, centrifugados por 15 minutos a uma velocidade de 2000 rpm, separando o plasma em tubos Eppendorfs, aliquotados numa temperatura de 20 °C, sendo os tubos imediatamente congelados a -80 °C para posterior análise.

Para realização das análises do estudo, foram separadas as duas primeiras amostras seriadas de plasma coletadas (1^a coleta e 2^a coleta), com um intervalo de aproximadamente três meses.

Para dosagem dos níveis de PCRus foram utilizados ensaios ELISA ultrasensíveis padronizados no Serviço de Bioquímica do HCPA determinados por Imunonefelometria (Dade Behring, Behring Diagnostic, Alemanha), com coeficiente de variação inferior a 5%, com limite inferior de detecção de 0,16 mg/l.

As Interleucinas 10 e 18 foram mensuradas pelo método de ELISA sandwich com ensaio comercialmente disponível da Biosource (California, USA); com sensibilidade de < 1 pg/mL (intervalo de 7,8 - 500 pg/mL), e de < 12,5 pg/mL (intervalo de 15,6 - 1000 pg/mL), respectivamente.

A Pentraxina-3 foi dosada pelo método de ELISA sandwich, com kits fornecidos pela empresa Perseus Proteomics Inc. (Tokyo, Japan), todos do mesmo lote embalados, protegidos da luz e sob refrigeração até a execução dos ensaios, observando o prazo de validade. As soluções padrões foram preparadas conforme descrito na bula. A curva de calibração baseada em padrões com variação de 0,5 à 20 ng/mL de PTX-3 foi corrida em duplicata e reproduziu a curva original. O método também foi calibrado em amostras de soro-padrão com níveis de PTX-3 previamente conhecidos, fornecidos pela empresa, dosados em triplicata. A correlação entre os valores obtidos e os esperados foi excelente ($r=0,98$), sendo a equação $y = 0,0491x + 0,1338$, com $p < 0,0001$. A precisão intra-ensaio em análises em triplicatas de 3 diferentes amostras, com valores médios de 1,96 ng/mL (1,58 – 2,23 ng/mL), 4,24 ng/ml

(3,50 – 4,87 ng/mL) e 9,29 ng/ml (7,90 – 10,68 ng/ml), com coeficiente de variação de 2,83%.

A análise da PCRus foi realizada no Laboratório de Patologia da instituição, enquanto as dosagens de IL-10, IL-18 e PTX-3 foram realizadas no Laboratório de Pesquisa Cardiovascular do HCPA.

Desfechos

A coorte de paciente foi acompanhada regularmente para ocorrência de desfechos clínicos, avaliados até novembro de 2007. Foram considerados desfechos: óbito de origem cardiovascular, internação por angina instável ou infarto do miocárdio, edema agudo de pulmão ou internação por insuficiência cardíaca descompensada, evento vascular periférico, acidente vascular cerebral isquêmico e arritmias. Análise secundária foi conduzida mantendo-se somente eventos vasculares maiores (angina instável, infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral) e óbito, excluindo insuficiência cardíaca e arritmias.

Análise Estatística

Variáveis contínuas estão expressas como média \pm desvio padrão e comparadas por teste T de Student. As variáveis categóricas foram analisadas por Qui-quadrado e exato de Fisher. A Regressão de Cox foi utilizada para prever valor independente dos marcadores inflamatórios na ocorrência de desfechos clínicos ao longo do tempo de acompanhamento desta coorte. Foi realizada Correlação de Pearson para diferentes marcadores. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. As análises foram conduzidas em pacote estatístico SPSS para Windows, versão 14.0.

Resultados

Características da amostra

Foram identificados e selecionados aleatoriamente 132 indivíduos com cardiopatia isquêmica estável, 80 homens (60%) e 52 mulheres (40%), com idade média de 61 anos. Destes, 80% eram hipertensos, 75% tinham história de dislipidemia, 39% diabetes mellitus, 17,4% fumantes ativos. O grupo era composto por indivíduos

que iniciaram acompanhamento após diferentes manifestações clínicas de doença aterosclerótica (Tabela 1).

Correlação entre PTX-3 e marcadores inflamatórios

Os coeficientes de correlação de Pearson entre marcadores inflamatórios e antiinflamatórios são apresentados na Tabela 2, não sendo possível observar correlação significativa entre as dosagens de PTX-3 e os demais marcadores. Os níveis de PTX-3 coletados na primeira e segunda amostra, com intervalo mediano de 119 dias (amplitude interquartile 98 a 140 dias), foram semelhantes 3,49 e 3,84 ng/mL, respectivamente (Figura 3). O mesmo tendo sido observado para PCR-us 4,77 e 4,51 mg/dL. A correlação de Pearson entre a primeira e segunda amostra foi maior para a dosagem de PCR-us que para o PTX3, embora significativa para ambos marcadores, ($r=0,603$ e $r=0,356$; $p<0,001$). Houve uma associação fraca entre IL-10 e PCR-us.

Associação de PTX-3 e PCR com Fatores de Risco para Eventos Cardiovasculares

Quando comparadas as características clínicas entre pacientes de acordo com a mediana da PTX-3 (3,19 ng/mL), não encontramos associação entre níveis de PTX-3 e fatores de risco cardiovascular (Tabela 3). Entretanto, quando estratificamos os pacientes de acordo com a mediana da PCR (2,28 mg/dL), podemos observar que pacientes com valores acima da mediana apresentam níveis séricos de LDL mais elevados eram mais tabagistas ativos. A fração de ejeção do ventrículo esquerdo também foi associada com PCR, não havendo relação com outros fatores de risco (Tabela 4).

Durante o tempo de acompanhamento do estudo, ocorreram 38 (29%) eventos cardiovasculares (10 IAM, 2 AVC, 27 AI) e 6 (4,6%) óbitos. Após 47 ± 27 meses de seguimento, não foi observada diferença significativa nos valores dos marcadores inflamatórios entre aqueles indivíduos que desenvolveram ou não eventos cardiovasculares (Tabela 5 e Figura 5). Houve uma tendência a maiores níveis de IL-18 e relação de IL18/IL-10 com ocorrência de eventos cardiovasculares combinados, mas não atingiu significância estatística.

Discussão

A semelhança estrutural e funcional entre a PTX-3 e a clássica proteína de fase aguda usualmente utilizada como marcador inflamatório para diagnóstico clínico, PCR, deram impulso aos esforços que visam avaliar a utilidade de PTX-3 como marcador em diversas condições patológicas. Ao contrário da PCR, produzida no fígado em resposta à presença de IL-6, a PTX-3 pode representar um rápido marcador de ativação local primária da imunidade inata e inflamação⁶. A característica geral proveniente de estudos sobre os níveis sanguíneos de PTX-3 em humanos é sua liberação precoce, em comparação com a PCR, na presença dos primeiros sinais e sintomas de inflamação.

Várias evidências ligam a PTX-3 a doença arterial coronariana. A produção PTX-3 é induzida em células musculares lisas vasculares pela LDL-oxidada e está presente em lesões ateroscleróticas^{3, 23}. Os níveis de PTX-3 aumentam rapidamente na fase aguda do infarto, atingindo um pico em cerca de 7 h após o início dos sintomas²⁰. Em pacientes com cardiopatia isquêmica estável não foi demonstrado diferença nos níveis de PTX-3 em relação a indivíduos saudáveis, em uma coorte japonesa⁷.

Este estudo primou por testar, pela primeira vez, o kit de PTX-3 por ELISA da empresa Perseus Proteomic Inc, em uma população de pacientes brasileiros com cardiopatia isquêmica estável. Os kits e os controles foram mantidos sob as condições especificadas pelo fornecedor. A curva de calibração baseada em calibradores com variação de 0,5 à 20 ng/mL foi corrida em duplicata e reproduziu a curva original. A fim de testarmos a reprodutibilidade intra-amostra, realizamos as dosagens das amostras e dos controles em triplicata e observamos um coeficiente de variação médio de 4,28% e 2,83% respectivamente, e um coeficiente de correlação de 0,923 para amostras e 0,935 para controles. A linearidade da resposta do kit foi observada pela avaliação dos valores de coeficientes de correlação obtidos para as curvas de calibração. Com base nos parâmetros de precisão foi verificada eficiência quantitativa do kit na faixa de 0,1 a 20 ng/mL. Portanto o kit de ELISA para análise de PTX-3 demonstrou a sensibilidade e a especificidade conforme esperado, podendo ser utilizado com segurança para caracterizar valores de PTX-3 em uma população diferente das já estudadas.

Nossa população apresentou níveis de PTX-3 e PCR superiores aos descritos na população japonesa, possivelmente, devido ao fato de ser composta por indivíduos com DAC mais grave. Não observamos diferença quando comparados pacientes com e sem eventos. Todavia, nosso achado está em concordância com alguns estudos que relatam não terem observado diferença significativa entre níveis de PCRus em pacientes com AE e indivíduos sem doença arterial coronariana^{16, 17, 18, 19}. Em relação a PTX-3, encontramos um único estudo que observou rapidamente seu comportamento em pacientes com AE. Inoue e colaboradores (2007) relatam ter encontrado níveis de PTX-3 em torno de 1,98 ng/mL em voluntários sadios e 3,04 ng/mL em pacientes com angina estável, dados que não expressam significância estatística⁷.

Quando comparadas as características clínicas entre pacientes de acordo com a mediana da PTX-3 (3,19 ng/mL), não encontramos associação entre níveis de PTX-3 e fatores de risco cardiovascular. Inoue e colaboradores (2007) também não observaram associação entre fatores de risco cardiovascular e PTX-3⁷. O que pode ser explicado pela via de ativação da produção de PTX-3, que necessita de dano tecidual ou condições inflamatórias exacerbadas para atingir seu ápice de liberação, como observado em quadros agudos de DAC.

Entretanto, é interessante observar que neste estudo níveis de PCR foram relacionados com níveis séricos de LDL elevados. A fração de ejeção do ventrículo esquerdo também foi associada com PCR, não havendo relação com outros fatores de risco. É conhecido que a produção de PCR ocorre principalmente no tecido hepático em resposta a estímulos da IL-6 e TNF, e por esta proteína ser responsável pela ativação da cascata que regula os processos inflamatórios, tendo sido associada com fatores de risco tradicionais, como presença de hipertensão, diabetes e dislipidemia. O motivo pelo qual a PTX-3 não foi associado com fatores de risco para DAC, inclusive níveis de colesterol, não está estabelecido. Algumas hipóteses podem ser levantadas, como falta de poder do estudo na identificação de associações de pequena magnitude ou interferência do uso prévio de fármacos como estatinas e anti-agregantes plaquetários nesta coorte.

Verificamos, também, uma possível instabilidade nos níveis de PTX-3 entre as amostras de um mesmo indivíduo, demonstrada a partir de uma baixa reprodutibilidade entre a primeira e a segunda dosagem de PTX-3 ($r=0,35$), o que representa um intervalo de tempo de aproximadamente 3 meses. Para PCR encontramos a

reprodutibilidade em torno de 60%, o que está de acordo com outros estudos^{20, 22}. Todavia, Bogaty (2005) em seu estudo sobre a flutuação dos níveis de PCR em pacientes com DAC estável levanta a possibilidade de que o perfil inflamatório dos indivíduos, com DAC aparentemente estável, pode ser mais dinâmico e complexo do que geralmente assumido²².

Apesar da cascata de inflamação inter-relacionar diferentes estímulos, citocinas e respostas, a correlação entre marcadores inflamatórios não é consistente. Neste estudo, níveis de PCR apresentaram fraca associação com IL-10 e IL-18 sem alcançar significância estatística, bem como descrito por outros autores como Peri (2000) e Latini (2004)^{20, 21}. Estudos que mostram uma associação mais forte usualmente envolveram indivíduos em fase aguda de eventos, onde os mecanismos inflamatórios estão mais ativados.

Durante o tempo de acompanhamento do estudo, ocorreram 38 eventos cardiovasculares e 6 óbitos, entretanto, após o seguimento, não foi observada diferença significativa nos valores dos marcadores inflamatórios entre aqueles indivíduos que desenvolveram ou não eventos cardiovasculares. Isso pode estar diretamente relacionado à variação de tempo entre a coleta das amostras e o evento. O que nos leva a sugerir que níveis elevados de PTX-3, PCRus e IL-18 se fazem presentes apenas em momentos mais próximos ao evento agudo, não existindo relação com pacientes clinicamente estáveis. Idealmente, estudos com alíquotas de sangue coletadas em outros momentos podem ser úteis para avaliar se a relação temporal entre a mudança nos níveis plasmáticos desses marcadores e a ocorrência de eventos coronarianos.

Limitações do Estudo

Levando em consideração que as amostras utilizadas para dosagens dos marcadores inflamatórios foram identificadas e selecionadas aleatoriamente entre amostras de sangue já disponíveis em armazenamento, nossos resultados podem não ter demonstrado um aumento nos níveis dos marcadores inflamatórios em relação a presença de eventos devido a existência de um intervalo de tempo muito grande entre a coleta de material e os eventos, isto é, não ter sido suficientemente próximo do evento para poder identificar os marcadores de instabilização da placa aterosclerótica. Além disso, a amostra de indivíduos foi pequena e restrita a um grupo de indivíduos com

doença grave. A homogeneidade da amostra pode limitar a identificação de diferenças significativas entre PTX-3, eventos e fatores de risco.

Conclusão

Nesta amostra de indivíduos com DAC estável os níveis de PTX-3 e PCR foram mais elevados do que em outras populações. Não identificamos fatores de risco relacionados com níveis aumentados de PTX-3 ou sua relação com eventos em médio prazo.

BIBLIOGRAFIA

1. Tziakas DN, Chalikias GK, Kaski JC, Kekes A, Hatzinikolaou EI, Stakos DA, *et al.* Inflammatory and anti-inflammatory variable clusters and risk prediction in acute coronary syndrome patients: a factor analysis approach. *Atherosclerosis*. 2007;193(1):196-203.
2. Fichtlscherer S, Heeschen C, Zeiher AM. Inflammatory markers and coronary artery disease. *Curr Opin Pharmacol*. 2004; 4(2):124-31.
3. Rolph M, Zimmer S, Bottazzi B, Garlanda C, Mantovani A, Hansson G. Production of the Long Pentraxin PTX3 in Advanced Atherosclerotic Plaques. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2002; 22:10-14.
4. Mantovani A, Garlanda C, Bottazzi B, Peri G, Doni A, Martinez de la Torre Y, Latini R. The long pentraxin PTX3 in vascular pathology. *Vascul Pharmacol*. 2006; 45(5):326-30.
5. Presta M, Camozzi M, Salvatori G, Rusnati M. Role of the soluble pattern recognition receptor PTX3 in vascular biology. *J Cell Mol Med*. 2007;11(4):723-38.
6. Mantovani A, Garlanda C, Doni A, Bottazzi B. Pentraxins in innate immunity: from C-reactive protein to the long pentraxin PTX3. *J Clin Immunol*. 2008;28(1):1-13.
7. Inoue K, Sugiyama A, Reid PC, Ito Y, Miyauchi K, Mukai S, *et al.* Establishment of a high sensitivity plasma assay for human pentraxin3 as a marker for unstable angina pectoris. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27(1):161-7.
8. Chen MC, Chen CJ, Yang CH, Wu CJ, Fang CY, Hsieh YK, Chang HW. Interleukin-18: a strong predictor of the extent of coronary artery disease in patients with unstable angina. *Heart Vessels*. 2007; 22(6):371-5.

9. Kawasaki D, Tsujino T, Morimoto S, Masai M, Masutani M, Ohyanagi M, *et al.* Plasma interleukin-18 concentration: a novel marker of myocardial ischemia rather than necrosis in humans. *Coronary Artery Disease* 2005, 16:437–441.
10. Blankenberg S, Tiret L, Bickel C, Peetz D, Cambien F, Meyer J, *et al.* Interleukin-18 is a strong predictor of cardiovascular death in stable and unstable angina. *Circulation* 2002;106:24-30
11. Mallat Z, Henry P, Fressonnet R, Alouani S, Scoazec A, Beaufiles P, *et al.* Increased plasma concentrations of interleukin 18 in acute coronary syndromes. *Heart* 2002; 88:467–469.
12. Smith DA, Irving SD, Sheldon J, Cole D, Kaski JC. Serum Levels of the Antiinflammatory Cytokine Interleukin-10 Are Decreased in Patients With Unstable Angina. *Circulation* 2001; 104:746-9.
13. Fichtlscherer S, Breuer S, Heeschen C, Dimmeler S, Zeiher AM. Interleukin-10 serum levels and systemic endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44(1):44-9.
14. Lakoski SG, Liu Y, Brosnihan KB, Herrington DM. Interleukin-10 concentration and coronary heart disease (CHD) event risk in the estrogen replacement and atherosclerosis (ERA) study. *Atherosclerosis*. 2008; 197(1):443-7.
15. da Silveira AD, Ribeiro RA, Rossini AP, Stella SF, Ritta HA, Stein R, Polanczyk CA. Association of anemia with clinical outcomes in stable coronary artery disease. *Coron Artery Dis*. 2008; 19(1):21-6.
16. Yamashita H, Shimada K, Seki E, Mokuno H, Daida H. Concentrations of interleukins, interferon, and C-reactive protein in stable and unstable angina pectoris. *Am J Cardiol*. 2003; 91(2):133-6.

17. Bogaty P, Poirier P, Simard S, Boyer L, Solymoss S, Dagenais GR. Biological Profile in Subjects With Recurrent Acute Coronary Events Compared With Subjects With Long-Standing Stable Angina. *Circulation* 2001; 103:3062-8.
18. Heinisch RH, Zanetti CR, Comin F, Fernandes JL, Ramires JA, Serrano CV Jr. Serial changes in plasma levels of cytokines in patients with coronary artery disease. *Vasc Health Risk Manag.* 2005; 1(3):245-50.
19. Yip HK, Wu CJ, Hang CL, Chang HW, Yang CH, Hsieh YK, Fang CY, Fu M, Yeh KH, Chen MC. Levels and values of inflammatory markers in patients with angina pectoris. *Int Heart J* 2005; 46(4):571-81.
20. Peri G, Inrona M, Corradi D, Iacuitti G, Signorini S, Avanzini F, *et al.* PTX3, A prototypical long pentraxin, is an early indicator of acute myocardial infarction in humans. *Circulation.* 2000;102(6):636-41.
21. Latini R, Maggioni AP, Peri G, Gonzini L, Lucci D, Mocarelli P, *et al.* Prognostic significance of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction. *Circulation.* 2004; 110(16):2349-54.
22. Bogaty P, Brophy JM, Boyer L, Simard S, Joseph L, Bertrand F, Dagenais GR. Fluctuating inflammatory markers in patients with stable ischemic heart disease. *Arch Intern Med* 2005; 165(2):221-6.
23. Klouche M, Peri G, Knabbe C, Eckstein HH, Schmid FX, Schmitz G, Mantovani A. Modified atherogenic lipoproteins induce expression of pentraxin-3 by human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2004;175:221-8.

Tabela 1. Características clínicas da amostra (n=132)

Variável	Nº (n=132)	% ou
	ou Média	Desvio padrão
Idade	60,8	± 10
Sexo masculino	80	61%
Hipertensão arterial sistêmica	106	80%
Diabetes mellitus	54	43%
Tabagismo		
Nunca fumou	49	37%
Fumante	23	17%
Ex-fumante	60	46%
História de dislipidemia	86	75%
Glicose sérica, mg/dL *	123	± 40
LDL sérico, mg/dL *	121	± 38
Manifestação clínica inicial		
Angina Estável	41	36%
Angina Instável	29	25%
Infarto Agudo do Miocárdio	65	49%
Insuficiência Cardíaca	4	3,5%
Acidente Vascular Encefálico	5	4%
Intervenção coronariana percutânea	27	21 %
Cirurgia de revascularização do miocárdio	18	14%

* valores médios das 3 primeiras dosagens realizadas no acompanhamento, equivalente ao primeiro ano para a maioria dos casos.

Tabela 2 - Correlação de Pearson entre marcadores inflamatórios dosados na primeira amostra do acompanhamento.

Marcador	PTX-3	PCR	IL-10	IL-18
PTX-3	1	-0,00005 (p= 0,99)	0,124 (p= 0,16)	-0,010 (p= 0,91)
PCR	-0,00005 (p= 0,99)	1	0,038 (p= 0,66)	0,079 (p= 0,37)
IL-10	0,124 (p= 0,16)	0,038 (p= 0,66)	1	0,155 (p= 0,07)
IL-18	-0,010 (p= 0,91)	0,079 (p= 0,37)	0,155 (p= 0,07)	1

Tabela 3. Associação dos níveis de PTX-3 com fatores de risco cardiovasculares.

Variável	PTX-3 baixo	PTX-3 elevado	P
	< 3,19 ng/mL	≥ 3,19 ng/mL	
Idade	61± 9	61± 11	0,97
Sexo masculino	38 (57%)	42 (64%)	0,59
Hipertensão Arterial Sistêmica	50 (76%)	56 (85%)	0,27
Diabete Mellitus	26 (48%)	28 (52%)	0,86
Tabagismo			0,62
Nunca fumou	22 (33%)	27 (41%)	
Ex-fumante	31 (47%)	29 (44%)	
Fumante atual	13 (20%)	10 (15%)	
Colesterol LDL			0,006
≤ 100 mg/dL	24 (38%)	27 (41%)	
100-130mg/dL	15 (24%)	27 (44%)	
≥ 130 mg/dL	24 (38%)	10 (15%)	
LDL médio inicial, mg/dL	126 ± 42	116 ± 33	0,13
Glicose sérica, mg/dL	118 ± 29	128 ± 48	0,13
Pressão Arterial Sistólica, mmHg	135 ± 15	134 ± 16	0,75
Fração de ejeção ventrículo esquerdo, %	55 ± 17	57 ± 13	0,52
Disfunção Ventricular	21 (32%)	17 (26%)	0,56
Angina Instável	16 (27%)	13 (23%)	0,67
Infarto do Miocárdio prévio	31 (47%)	34 (52%)	0,73
Comorbidades clínicas			0,21
Nenhuma	34 (52%)	44 (67%)	
1	20 (30%)	14 (21%)	
≥ 2	12 (18%)	8 (12%)	
Fármacos em uso			
Anti-agregante plaquetário	63 (95%)	64 (97%)	0,65
Estatinas	55 (83%)	56 (85%)	0,81
i-ECA	48 (73%)	52 (79%)	0,42
Beta-bloqueadores	54 (82%)	60 (91%)	0,13

Valores expressos em n (%) e média ± desvio padrão (DP).

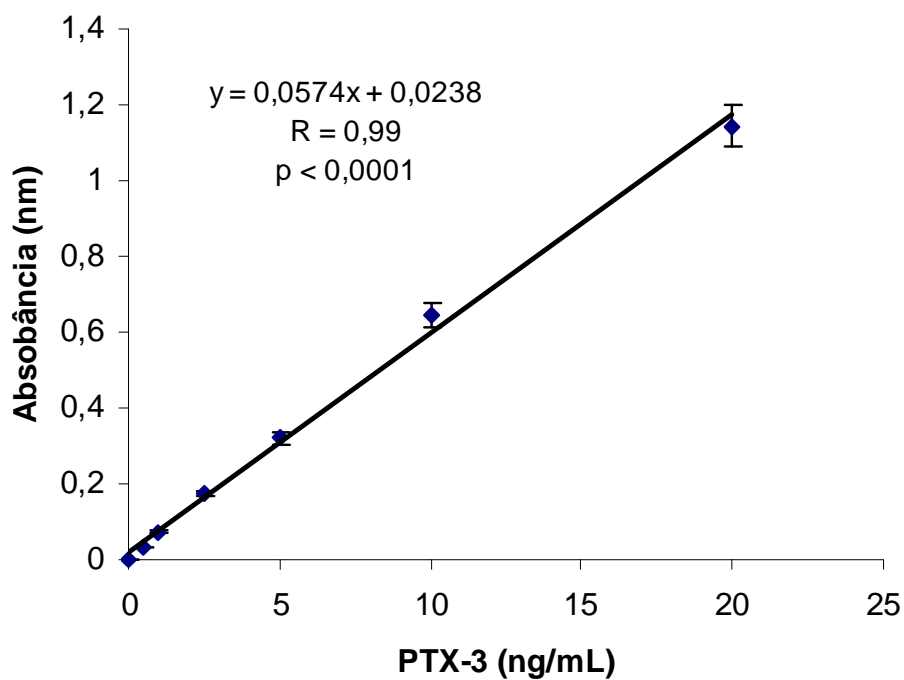
Tabela 4. Associação de PCR com Fatores de Risco para Eventos Cardiovasculares.

Variável	PCR baixo <2,28 mg/dl	PCR elevado ≥2,28 mg/dl	P
Idade	61 ± 10	61 ± 10	0,677
Sexo masculino	40 (63%)	36 (57%)	0,295
Hipertensão Arterial Sistêmica	53 (83%)	51 (80%)	0,821
Diabete Mellitus	26 (48%)	28 (52%)	1,00
Tabagismo			0,098
Nunca fumou	28 (44%)	19 (30%)	
Ex-fumante	29 (45%)	30 (47%)	
Fumante atual	7 (11%)	7 (23%)	
Colesterol LDL			0,045
≤ 100 mg/dL	26 (41%)	21 (34%)	
100 – 130 mg/dL	26 (41%)	18 (29%)	
≥ 130 mg/dL	11 (18%)	23 (37%)	
LDL médio inicial, mg/dL	114 ± 35	129 ± 40	0,036
Glicose sérica, mg/dL	125 ± 43	122 ± 37	0,639
Pressão arterial sistólica, mmHg	135 ± 16	134 ± 15	0,674
Fração de ejeção ventrículo esquerdo, %	56 ± 14	56 ± 17	0,865
Disfunção ventricular	22 (34%)	14 (22%)	0,168
Angina instável	9 (16%)	19 (35%)	0,030
Infarto do miocárdio prévio	32 (50%)	30 (47%)	0,860
Comorbidades			0,450
Nenhuma	41 (64%)	34 (53%)	
1	15 (23%)	19 (30%)	
≥ 2	8 (12%)	11 (17%)	
Fármacos em uso			
Anti-agregante plaquetário	65 (98%)	62 (94%)	0,17
Estatinas	58 (88%)	53 (80%)	0,23
i-ECA	56 (85%)	44 (67%)	0,01
Beta-bloqueadores	61 (92%)	53 (80%)	0,04

Valores expressos em n (%) e média ± desvio padrão (DP).

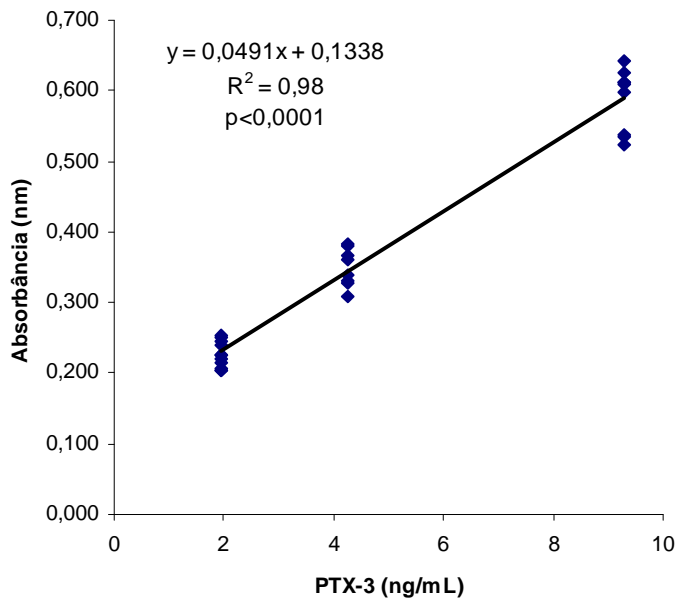
Tabela 5. Valores dos marcadores inflamatórios de acordo com a ocorrência de eventos cardiovasculares (n=132).

Marcadores Inflamatórios	Sem eventos (n=94)	Com eventos (n=38)	P
PTX-3 amostra basal	3,49 ± 1,94	3,48 ± 2,33	0,982
PTX -3 amostra seguimento	3,87 ± 2,38	3,77 ± 2,28	0,814
PCR amostra basal	5,07 ± 8,26	4,60 ± 4,66	0,737
PCR amostra seguimento	4,53 ± 7,03	5,06 ± 6,57	0,694
IL-10	5,51 ± 4,31	5,98 ± 3,92	0,564
IL-18	292,91 ± 105,21	332,16 ± 205,12	0,154
Relação IL-18/IL-10	137,2 ± 333,2	74,1 ± 78,3	0,089

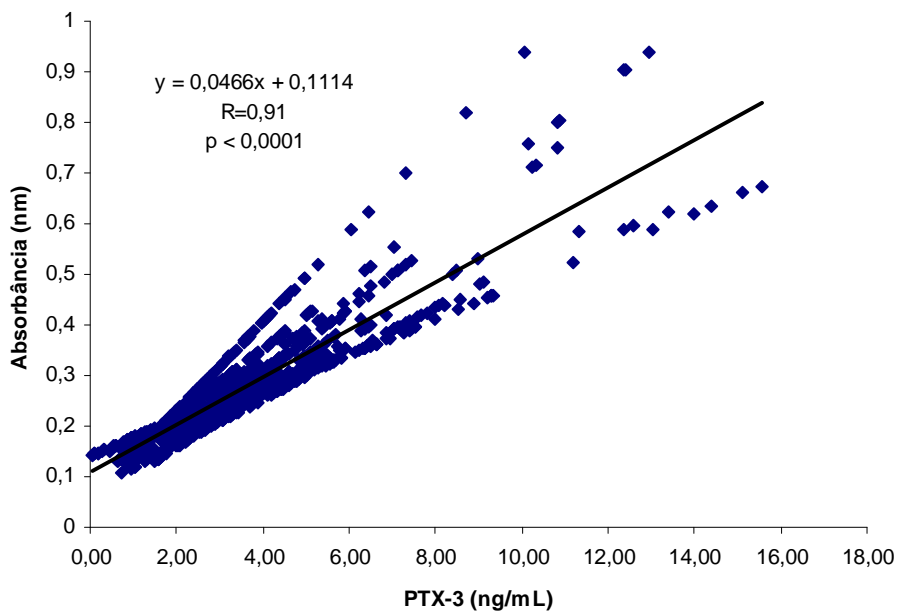


Padrão	Absorbância 1	Absorbância 2	Absorbância Média	Desvio padrão	Coefficiente de variação
0	0,045	0,043	0,044	0,001	3,21
0,5	0,077	0,076	0,077	0,001	0,92
1	0,118	0,113	0,131	0,004	2,71
2,5	0,219	0,219	0,219	0,000	0,00
5	0,356	0,374	0,365	0,013	3,49
10	0,667	0,713	0,690	0,033	4,71
20	1,148	1,229	1,189	0,057	4,82

Figura 1. Curva de calibração representativa baseada em calibradores de PTX-3 padrão entre 0,5 e 20 ng/mL.



A



B

Figura 2A. Coeficiente de Correlação de Pearson dos valores de PTX-3 conhecidos (controles).

Figura 2B. Coeficiente de Correlação dos valores obtidos em triplacata das amostras da população em estudo (n=132).

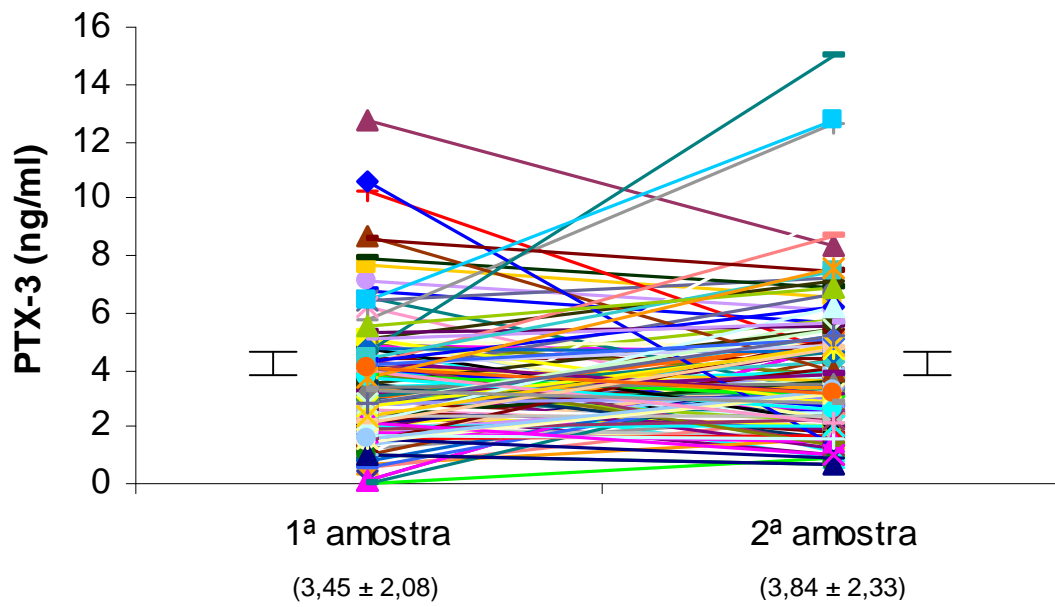


Figura 3. Valores de PTX individuais na primeira e segunda amostra, (média ± DP).

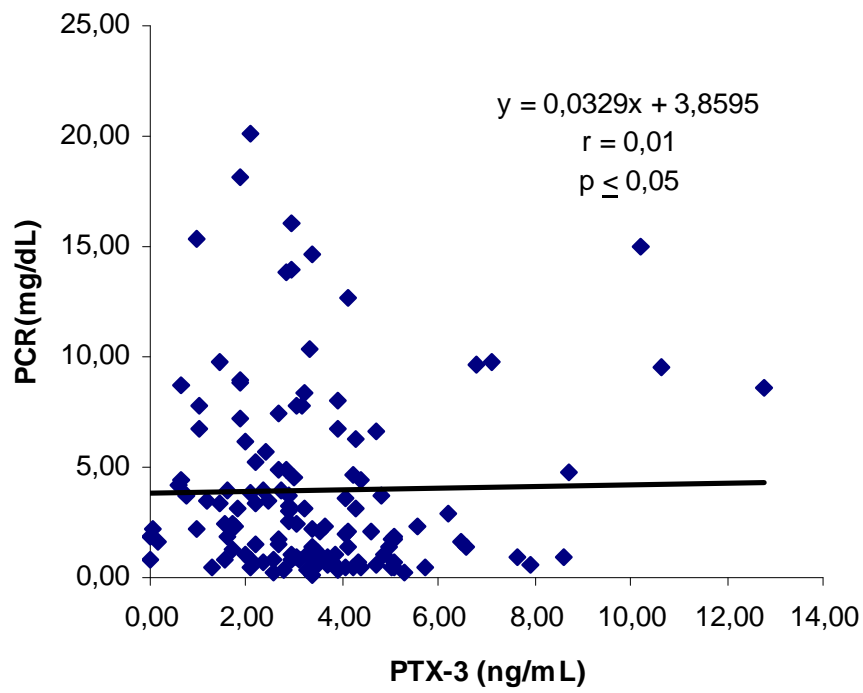


Figura 4. Correlação de Pearson entre PTX-3 e PCR.

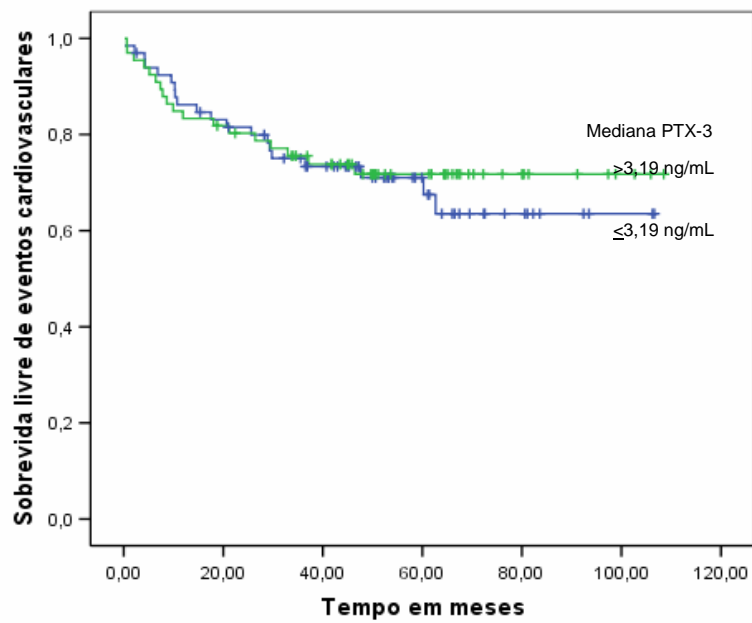


Figura 5. Curva de sobrevivida livre de eventos estratificada por níveis de PTX-3 abaixo e acima da mediana.

ENGLISH ARTICLE

Pentraxina-3 (PTX-3) levels in patients with stable coronary artery disease
in a sample of a Brazilian population

Giovanna Grünewald Vietta

Carisi Anne Polanczyk

Emílio Moriguchi

Post-Graduate Program in Cardiology of the Federal University of Rio Grande do Sul.

Department of Cardiology of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre.

Abbreviated Title: Pentraxin-3 and stable angina pectoris.

Keywords: Inflammation, Stable Angina, Pentraxin-3, C-Reactive Protein, interleukins.

Address for correspondence::

Giovanna Grünewald Vietta
Endereço: Rua Ramiro Barcelos, 2350. Bairro – Santana
Porto Alegre/RS/Brasil CEP 90035-006
Fone: (51) 2101-8844
e-mail: ggvieta@terra.com.br

PENTRAXINA-3 LEVELS IN PATIENTS WITH STABLE CORONARY ARTERY DISEASE IN A SAMPLE OF BRAZILIAN POPULATION

Vietta G.G., Furtado M.V., Coelho M., Cardoso A., Zanchet F., Polanczyk C.A., Moriguchi E.H.

Cardiovascular Laboratory – Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brazil

Post-graduate Program in Cardiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

E-mail: ggvietta@terra.com.br

Pentraxin-3 (PTX-3) one of the long pentraxins, produced mainly by macrophages and endothelial cells, upon exposure to primary inflammatory signals, such as interleukin (IL)-1, tumor necrosis factor α , oxidized low-density lipoprotein.

The aims of this study were to characterize the measurement of PTX-3 in clinically stable patients with coronary artery disease (CAD); and describe its in a Brazilian population. In additions, PTX-3 values were and clinical outcomes damage correlated with other inflammatory markers and their association with the incidence of cardiac events during 6-month follow-up.

In a prospective cohort study, 132 patients with documented CAD were enrolled from an out-patient clinic at a University Hospital. Clinical and demographic variables were obtained at baseline and blood samples were serially collected every 3-4 months during one year. Plasma levels of high sensitive CRP (hsCRP) were measured by immunonephelometric assay, PTX-3, IL-18 and IL-10 by ELISA. PTX-3 ELISA test was calibrated though a standard sample of plasma from patients of diverse ethnic (Italian and Japanese). Survival analyses were used to evaluate independent effect of each serum marker on the incidence of major adverse cardiovascular events (cardiovascular death, new episode of ACS, and need for unplanned revascularization).

RESULTS: The PTX-3 and hsCRP levels at baseline (1st sample) and after 3-month follow-up (2nd sample) were similar, 3.45 and 3.84 ng/mL, and 4.89 and 4.72 mg/mL, respectively. Pearson correlation between there samples was higher for CRP levels than PTX-3 ($r=0.603$ and $r=0.356$; $p<0.001$). PTX-3 levels were not different between patients

with no events (3.49 ± 1.94 ng/mL) and those who developed cardiac events (3.48 ± 2.33 ng/mL). The same was observed for hsCRP values (5.07 ± 8.26 mg/mL and 4.60 ± 4.66 mg/mL ($p=0.73$), respectively. High sensitive CRP values were significantly associated with serum LDL levels; whereas PTX-3 was not related to clinical or biochemical variables. Among these patients, IL-18 and IL-10 were not related with clinical events, and showed no correlation with CRP or PTX-3 levels. In conclusion, based PTX-3 showed important short variability on then results. PTX-3 were no marker of advice outcome in patients with stable CAD, it correlate with other inflammatory markers.

Introduction

Atherosclerosis is widely accepted as a chronic inflammatory disease as a number of ongoing inflammatory reactions occur in the vessel wall. Different studies have suggested that increased levels of inflammatory markers are strongly related to the occurrence of cardiovascular events, such as unstable angina, acute myocardial infarction and death^{1,2}.

The classical short pentraxin, C-reactive protein and serum amyloid P component, are members of pentraxin family. The C-reactive protein is produced in the liver as response to inflammatory mediators, most prominently interleukin-6. It has been broadly considered to be a nonspecific but sensitive marker of acute inflammatory response^{3,4,5,6}, and related with the atherosclerosis process.

Pentraxin-3 (PTX-3), one of the long pentraxins, can be produced by a variety of cell types, mainly macrophages and endothelial cells, but not liver, upon exposure to primary inflammatory signals, such as interleukin-1, tumor necrosis factor α , oxidized low-density lipoprotein^{3,4,5,6}, and seems to be more specific to reflecting the inflammatory status of the vasculature. Recently, a group of investigators established a high sensitive plasma ELISA assay for the detection of PTX-3 using monoclonal antibodies⁷. They observe in a prior study that PTX-3 was a prognostic marker in patients with unstable angina, however, PTX-3 levels were not significantly associated with prognosis in patients with stable angina⁷.

Besides pentraxins, interleukins have been used to prognosis in patients with coronary artery disease. Interleukin 18 is a proinflammatory cytokine and plays a central role in the inflammatory cascade, because of its ability to induce interferon- γ production by T lymphocytes and natural killer cells^{8,9,10,11}.

However, the inflammatory cascade presents elements able to maintain the delicate balance between pro and anti-inflammatory molecules, regulate the vascular homeostasis and especially to maintain the vessel wall integrity. Interleukin 10 is an anti-inflammatory cytokine. It is a major inhibitor of cytokine synthesis, suppresses macrophage function and inhibits the production of proinflammatory cytokine. Elevated levels of IL-10 may be associated with a better prognosis to patients with atherosclerosis^{12, 13, 14}.

In this study we had the opportunity to describe levels of PTX-3 in clinically stable patients with coronary artery disease (CAD); and to demonstrate the intra-assay reproducibility and the stability of PTX-3 inter-assay within three months. The main purpose of this study was to correlate PTX-3 values with other inflammatory markers and their association with the incidence of cardiac events during 6-month follow-up.

Materials and Methods

Design

This was a prospective study rested into a cohort of outpatients diagnosed with ischemic coronary heart disease, clinically stable and followed-up in a specialized clinic of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

Study Population

The population has been previously described¹⁵, and comprehend patients enrolled at the HCPA Ischemic Heart Disease Clinic. A prospective cohort of 498 patients, we identified and randomly selected 131 individuals who had stored blood

samples available. All patients had documented CAD, which was defined by the presence of at least one of the following factors: documented history of myocardial infarction, surgical or percutaneous myocardial revascularization and lesion > 50% at least one coronary artery assessed by angiography, or presence of angina and positive noninvasive testing of ischemia. Patients who presented episodes of acute coronary syndrome (ACS) or had been submitted to revascularization procedures for the last 3 months; that were suffering from any form of collagenosis, neoplasm, chronic renal failure undergoing dialysis, or that were currently scheduled for any cardiac procedure were excluded from this cohort.

The study was approved by the Institutional Ethics and Research Committee, and all the patients signed written informed consent.

Data collection and blood sample

All patients were recruited between 2003 August and 2004 October. Patients have a standard, uniform, routine-based appointment, with a regular follow up interval between visits vary from 3 up to 4 months. For the patients enrolled in the study, a standard questionnaire was applied, and repeated in all the appointments.

Study Endpoints and follow-up

The patient cohort was regularly followed for the occurrence of clinical outcomes, evaluated from until November of 2007. With a median follow-up of 34 ± 9 months, the primary outcome of the study was death. We conducted a secondary analysis where death from cardiovascular origin, hospitalization due to unstable angina or myocardial infarction, hospitalization due to symptomatic cardiac failure and cerebrovascular accident were outcomes.

Biochemical Analysis

In all patients peripheral blood samples were drawn within each appointment. After centrifugation at 2000 rpm for 15 min, plasma samples were frozen and stored at -80°C until biochemical assessment. For this study, the first two consecutive plasma samples were analyzed (1st sample and 2nd sample).

The hsCRP levels were determined by Immuno-nephelometry (Dade Behring, Behring Diagnostic, Germany), with a coefficient of variation lower than 5%, with a limit of detection less than 0.16 mg/l.

Sandwich enzyme immunoassay was performed for measuring concentrations of plasma IL-10 and IL-18 applying commercially available ELISA kits, Biosource (California, USA); with a minimum detectable concentration of < 1 pg/mL (range of 7,8 - 500 pg/mL) and $< 12,5$ pg/mL (range of 15,6 - 1000 pg/mL).

Sandwich enzyme immunoassay was performed for measuring concentrations of plasma PTX-3. The Human PTX-3 ELISA Kit with a minimum detectable concentration of < 0.1 ng/mL (range 0.10 to 20 ng/mL) were donated by the Japanese Company Perseus Proteomics Inc (Tokyo, Japan). The patient samples were analyzed in triplicate, and a standard sample of plasma from patients of diverse ethnic (Italian and Japanese) was used to calibrate the test.

The kits and controls were kept under the conditions specified by the manufacturer. A calibration curve based on PTX-3 calibrators of 0.5 to 20 ng/mL was analyzed in duplicate and reproduced the standard curve. To test the intra-sample reproducibility, we performed the samples and controls measures in triplicate and found a variation coefficient average of 2.83% and 4.28% respectively, and a correlation coefficient of 0,923 to samples and 0,935 to controls. The linearity of the kit response was observed by the assessment of the correlation coefficients values obtained for the

calibration curves. Based on the precision parameters was verified the kit quantitative efficiency in the range of 0,1 to 20 ng/mL. Therefore, the PTX-3 ELISA kit has demonstrated the expected sensitivity and specificity, and can be safely used to characterize PTX-3 values in a different population of already studied.

Statistical analysis

The data were expressed as mean \pm SD. Differences between two groups were analyzed by unpaired *t* test. All probability values were two-tailed, and values of less than 0.05 were considered to indicate statistical significance. The Cox regression was used to predict value from several variables over this cohort monitoring time. The Pearson correlation was used to different markers. Kaplan-Meier curve were used to evaluate cardiac events stratified by PTX-3 levels. Coefficient of variation (CV) equals the SD divided by the mean value and represents a statistical measure of the dispersion of data points in a data series around the mean, allowing for the calculation of an intra-assay precision. All confidence intervals were calculated at the 95% level.

All data were analyzed using SPSS 16 (SPSS inc., Chicago, Illinois, USA).

Results

Patient characteristics

Baseline characteristics of the 131 patients with stable CAD are present in Table 1. The mean age was 61 years, the majority was male (60%), with a high incidence of risk factors and different initial clinical manifestation of atherosclerosis disease.

Correlation between PTX-3 and inflammatory markers

We did not observed significant correlation among levels of PTX-3 and others biomarkers as show the table 2. Levels of PTX-3 in the first dosage were similar to the second one, with a median interval of 119 days (1st: 3.45; 2nd: 3.84 ng/mL Figure 1) CV of 0.6. The same was observed with CRP levels (4.89 and 4.72 mg/mL respectively) CV of 1.45. The Pearson correlation between the two samples was stronger for CPR than PTX-3, though both of then were significant ($r=0,603$ e $r=0,356$; $p<0,001$).

Association of PTX-3 and CRP with cardiovascular risk factors and events

We not found association between levels of PTX-3 and cardiovascular risk factors when compare the clinical characteristics among patients with median PTX-3 (3,19 ng/mL). But, when compare with the median CRP (2,28 mg/dL), we observed patients that levels above CRP median had elevated levels of LDL; either the left ventricular ejection fraction. The others risk factors do not present relation.

During the study follow-up there was happened 26 cardiovascular events (5 MI, 2 AVC, 13 UA, 5 hospitalization due to symptomatic cardiac failure), 6 deaths and 4 cardiovascular deaths. After a segment of 47 ± 27 months, we not observe a significant difference in the level of inflammatory markers among patients who have or not cardiovascular event (Table 4).

Kaplan-Meier survival curve for cardiac events stratified by PTX-3 levels

According to the Kaplan-Meier survival analysis, PTX-3 levels was not were used to evaluate independent effect of each serum marker on the incidence of major

adverse cardiovascular events (cardiovascular death, new episode of ACS, and need for unplanned revascularization).

Discussion

The structural and functional similarity to the classic diagnostic CRP has given impetus to efforts aimed at assessing the usefulness of PTX-3 as marker in diverse human pathological conditions. Unlike CRP that is made in the liver and induced primarily by IL-6, PTX-3 may represent a rapid marker for primary local activation of innate immunity and inflammation. The general characteristic emerging from studies on PTX-3 blood levels in human pathology is the rapidity of its increase compared to CRP⁶.

There are several evidences link PTX-3 to ischemic heart disorders. The PTX-3 levels are induced in vascular smooth muscle cells by atherogenic modified LDL and are present in human atherosclerotic lesions^{3, 23}. This levels increase rapidly in acute myocardial infarction, reaching a peak at around 7 h after the onset of symptoms, although patients with stable coronary artery disease have not submitted variation compared to healthy subjects, in a Japanese cohort evaluated.

This study is the first one to test a PTX-3 ELISA kit (Perseus Proteomic Inc., Tokyo, Japan) in a Brazilian population by patients with stable ischemic cardiopathy. Our population showed greater levels of PTX-3 and CRP than described in the Japanese population, possibly because it is composed of individuals with worse CAD. We did not observe difference when compared patients with and without events. However, our finding is in agreement with some studies that report have not observed a significant difference between levels of CRP in patients with stable angina and individuals without coronary artery disease^{16, 17, 18, 19}. We found, for PTX-3, a single study that quickly relates its behavior in patients with stable angina. Inoue *et al.* (2007) reported levels of

PTX-3 around 1,98 ng/mL to healthy volunteers and 3,04 ng/mL to patients with stable angina, data that do not express statistical significance⁷.

As well as Inoue *et al.* study⁷, when we comparing the clinical characteristics among patients according to the PTX-3 median (3,19 ng/mL), we not found association between PTX-3 levels and cardiovascular risk factors. It can be explained by activation means of the PTX-3 production, which needs exacerbated tissue damage or inflammatory conditions to reach its liberation peak, as seen in acute cases of CHD. Interesting, in this study CRP levels were related to high levels of serum LDL. Either the left ventricular ejection fraction, but the others risk factors do not present relation with PTX-3. It is known that the CRP production occurs mainly in the liver tissue in response to IL-6 and TNF stimuli. This protein is responsible for the cascade activation which regulates the inflammatory processes, and was associated with traditional risk factors, such hypertension's, diabetes' and dyslipidemia's. Is not established why it is not PTX-3 associated with CHD risk factors, including cholesterol levels. Some hypothesis can be lifted, as a study power failure in the identification of associations of small magnitude or interference of previous drugs use in this cohort, such as statins and anti-platelet aggregates.

Also, we note a possible instability in the PTX-3 levels between the same individual samples. It is shown by a low reproducibility between the first and second PTX-3 dosage ($r = 0.35$), which represents approximately 3 months. We find, to CRP, around 60% reproducibility, the same of others studies^{20, 22}. However, Bogaty (2005) in his study of the CRP fluctuation levels in patients with stable CHD raises the possibility that the inflammatory profile of individuals with apparently stable ischemic heart disease may be more dynamic than generally assumed, and more complex than a relatively static inflammatory²².

Despite the inflammation cascade inter-relate different stimuli, cytokines and responses, the correlation between inflammatory markers is not consistent. In this study, as described by Peri (2000) and Latini (2004), CRP levels had little association with IL-10 and IL-18 without statistical significance^{20, 21}. Studies that show a stronger association with CRP and others biomarkers usually involved individuals in the acute phase of events, where the inflammatory mechanisms are more active.

During the study monitoring, we observed 38 cardiovascular events and 6 deaths, however, after the follow-up, no significant difference was observed in the inflammatory markers values among individuals who developed or not cardiovascular events. This can be directly related to the time variation between collection samples and the event. Thus, we suggest that high PTX-3 PCRus and IL-18 levels are present only closer to the acute event, without relationship with clinically stable patients. Ideally, studies that collected blood aliquots at other moments may be useful to evaluate the temporal relationship between markers plasma levels changes and occurrence of coronary events.

Study limitation

Taking into account that the samples used for determination of inflammatory markers were identified and selected randomly from blood samples already available in storage, our results may not have shown an increase in inflammatory markers levels regarding the events presence because of a large time interval between the blood sample collection and the occurrence of the events. Moreover, we analyze a small sample of individuals, and both of them have serious illness. The homogeneity of the sample may limit the identification of significant differences between PTX-3, events and risk factors.

Conclusion

In this sample of Brazilians patients, with stable CAD, PTX-3 and CRP levels were higher than in Japanese populations. PTX-3 levels were not predictive of cardiac events or risk factors for coronary artery disease. Surprisingly, PTX-3 had a low intra-individual reproducibility within a 3-month period. PTX-3 ELISA kit demonstrated the expected sensibility and sensitivity.

BIBLIOGRAPHI

1. Tziakas DN, Chalikias GK, Kaski JC, Kekes A, Hatzinikolaou EI, Stakos DA, *et al.* Inflammatory and anti-inflammatory variable clusters and risk prediction in acute coronary syndrome patients: a factor analysis approach. *Atherosclerosis*. 2007;193(1):196-203.
2. Fichtlscherer S, Heeschen C, Zeiher AM. Inflammatory markers and coronary artery disease. *Curr Opin Pharmacol*. 2004; 4(2):124-31.
3. Rolph M, Zimmer S, Bottazzi B, Garlanda C, Mantovani A, Hansson G. Production of the Long Pentraxin PTX3 in Advanced Atherosclerotic Plaques. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2002; 22:10-14.
4. Mantovani A, Garlanda C, Bottazzi B, Peri G, Doni A, Martinez de la Torre Y, Latini R. The long pentraxin PTX3 in vascular pathology. *Vascul Pharmacol*. 2006; 45(5):326-30.
5. Presta M, Camozzi M, Salvatori G, Rusnati M. Role of the soluble pattern recognition receptor PTX3 in vascular biology. *J Cell Mol Med*. 2007;11(4):723-38.
6. Mantovani A, Garlanda C, Doni A, Bottazzi B. Pentraxins in innate immunity: from C-reactive protein to the long pentraxin PTX3. *J Clin Immunol*. 2008;28(1):1-13.

7. Inoue K, Sugiyama A, Reid PC, Ito Y, Miyauchi K, Mukai S, *et al.* Establishment of a high sensitivity plasma assay for human pentraxin3 as a marker for unstable angina pectoris. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27(1):161-7.
8. Chen MC, Chen CJ, Yang CH, Wu CJ, Fang CY, Hsieh YK, Chang HW. Interleukin-18: a strong predictor of the extent of coronary artery disease in patients with unstable angina. *Heart Vessels.* 2007; 22(6):371-5.
9. Kawasaki D, Tsujino T, Morimoto S, Masai M, Masutani M, Ohyanagi M, *et al.* Plasma interleukin-18 concentration: a novel marker of myocardial ischemia rather than necrosis in humans. *Coronary Artery Disease* 2005, 16:437–441.
10. Blankenberg S, Tiret L, Bickel C, Peetz D, Cambien F, Meyer J, *et al.* Interleukin-18 is a strong predictor of cardiovascular death in stable and unstable angina. *Circulation* 2002;106:24-30
11. Mallat Z, Henry P, Fressonnet R, Alouani S, Scoazec A, Beaufils P, *et al.* Increased plasma concentrations of interleukin 18 in acute coronary syndromes. *Heart* 2002; 88:467–469.
12. Smith DA, Irving SD, Sheldon J, Cole D, Kaski JC. Serum Levels of the Antiinflammatory Cytokine Interleukin-10 Are Decreased in Patients With Unstable Angina. *Circulation* 2001; 104:746-9.

13. Fichtlscherer S, Breuer S, Heeschen C, Dimmeler S, Zeiher AM. Interleukin-10 serum levels and systemic endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44(1):44-9.
14. Lakoski SG, Liu Y, Brosnihan KB, Herrington DM. Interleukin-10 concentration and coronary heart disease (CHD) event risk in the estrogen replacement and atherosclerosis (ERA) study. *Atherosclerosis*. 2008; 197(1):443-7.
15. da Silveira AD, Ribeiro RA, Rossini AP, Stella SF, Ritta HA, Stein R, Polanczyk CA. Association of anemia with clinical outcomes in stable coronary artery disease. *Coron Artery Dis*. 2008; 19(1):21-6.
16. Yamashita H, Shimada K, Seki E, Mokuno H, Daida H. Concentrations of interleukins, interferon, and C-reactive protein in stable and unstable angina pectoris. *Am J Cardiol*. 2003; 91(2):133-6.
17. Bogaty P, Poirier P, Simard S, Boyer L, Solymoss S, Dagenais GR. Biological Profile in Subjects With Recurrent Acute Coronary Events Compared With Subjects With Long-Standing Stable Angina. *Circulation* 2001; 103:3062-8.
18. Heinisch RH, Zanetti CR, Comin F, Fernandes JL, Ramires JA, Serrano CV Jr. Serial changes in plasma levels of cytokines in patients with coronary artery disease. *Vasc Health Risk Manag*. 2005; 1(3):245-50.

19. Yip HK, Wu CJ, Hang CL, Chang HW, Yang CH, Hsieh YK, Fang CY, Fu M, Yeh KH, Chen MC. Levels and values of inflammatory markers in patients with angina pectoris. *Int Heart J* 2005; 46(4):571-81.
20. Peri G, Introna M, Corradi D, Iacuitti G, Signorini S, Avanzini F, *et al.* PTX3, A prototypical long pentraxin, is an early indicator of acute myocardial infarction in humans. *Circulation*. 2000;102(6):636-41.
21. Latini R, Maggioni AP, Peri G, Gonzini L, Lucci D, Mocarelli P, *et al.* Prognostic significance of the long pentraxin PTX3 in acute myocardial infarction. *Circulation*. 2004; 110(16):2349-54.
22. Bogaty P, Brophy JM, Boyer L, Simard S, Joseph L, Bertrand F, Dagenais GR. Fluctuating inflammatory markers in patients with stable ischemic heart disease. *Arch Intern Med* 2005; 165(2):221-6.
23. Klouche M, Peri G, Knabbe C, Eckstein HH, Schmid FX, Schmitz G, Mantovani A. Modified atherogenic lipoproteins induce expression of pentraxin-3 by human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2004;175:221–8.

Table 1. Clinical characteristics (n=132)

Variable	Nº (n=132)	% or
	or Mean	SD
Age	61	± 10
Male	80	60%
Hypertantion	106	80%
Diabetes mellitus	54	43%
Smoking habit		
Never	49	37%
Current	23	17%
Ex	60	46%
Prior dyslipidemia	86	75%
Serum glucose, mg/dL *	123	± 40
Serum LDL, mg/dL *	121	± 38
Inicial clinical manifestation		
Stable Angina	41	36%
Unstable Angina	29	25%
Myocardial Infarction	65	49%
Heart Failure	4	3,5%
Cerebrovascular disease	5	4%
Percutaneous coronary intervention	27	21 %
Myocardial revascularization surgery	18	14%

* Average of the first 3 monitoring dosages, equivalent to the first year for most cases.

Table 2. Pearson correlation among first inflammatory markers dosage.

Marker	PTX-3	CRP	IL-10	IL-18
PTX-3	1	-0,00005 (p= 0,99)	0,124 (p= 0,16)	-0,010 (p= 0,91)
CRP	-0,00005 (p= 0,99)	1	0,038 (p= 0,66)	0,079 (p= 0,37)
IL-10	0,124 (p= 0,16)	0,038 (p= 0,66)	1	0,155 (p= 0,07)
IL-18	-0,010 (p= 0,91)	0,079 (p= 0,37)	0,155 (p= 0,07)	1

Table 3. Association of PTX-3 with cardiovascular risk factors.

Variable	PTX-3 low	PTX-3 high	P
	< 3,19 ng/mL	≥ 3,19 ng/mL	
Age	61± 9	61± 11	0,97
Male	38 (57%)	42 (64%)	0,59
Hypertation	50 (76%)	56 (85%)	0,27
Diabete Mellitus	26 (48%)	28 (52%)	0,86
Smoking habit			0,62
Never	22 (33%)	27 (41%)	
Ex	31 (47%)	29 (44%)	
Current	13 (20%)	10 (15%)	
LDL cholesterol			0,006
≤ 100 mg/dL	24 (38%)	27 (41%)	
100-130mg/dL	15 (24%)	27 (44%)	
≥ 130 mg/dL	24 (38%)	10 (15%)	
LDL initial mean, mg/dL	126 ± 42	116 ± 33	0,13
Serum glucose, mg/dL	118 ± 29	128 ±48	0,13
Systolic blood pressure	135 ± 15	134 ± 16	0,75
Fraction of left ventricular ejection	55 ± 17	57 ±13	0,52
Ventricular dysfunction	21 (32%)	17 (26%)	0,56
Unstable Angina	16 (27%)	13 (23%)	0,67
Prior myocardial infarction	31 (47%)	34 (52%)	0,73
Clinical comorbidities			0,21
No	34 (52%)	44 (67%)	
1	20 (30%)	14 (21%)	
≥ 2	12 (18%)	8 (12%)	
Drugs in use			

Anti-platelet agregante	63 (95%)	64 (97%)	0,65
Statin	55 (83%)	56 (85%)	0,81
i-ECA	48 (73%)	52 (79%)	0,42
Beta blocker	54 (82%)	60 (91%)	0,13

Data expressed as n (%) and mean \pm Standard deviation (SD).

Table 4. Inflammatory markers values in accordance with the occurrence of cardiovascular events(n=131).

Inflammatory markers	Without events (n=105)	With events (n=26)	P
Baseline PTX-3	3,49 ± 1,94	3,48 ± 2,33	0,982
Following sample PTX -3	3,87 ± 2,38	3,77 ± 2,28	0,814
Baseline CRP	5,07 ± 8,26	4,60 ± 4,66	0,737
Following sample CRP	4,53 ± 7,03	5,06 ± 6,57	0,694
IL-10	5,51 ± 4,31	5,98 ± 3,92	0,564
IL-18	292,91 ± 105,21	332,16 ± 205,12	0,154
Ratio IL-18/IL-10	137,2 ± 333,2	74,1 ± 78,3	0,089

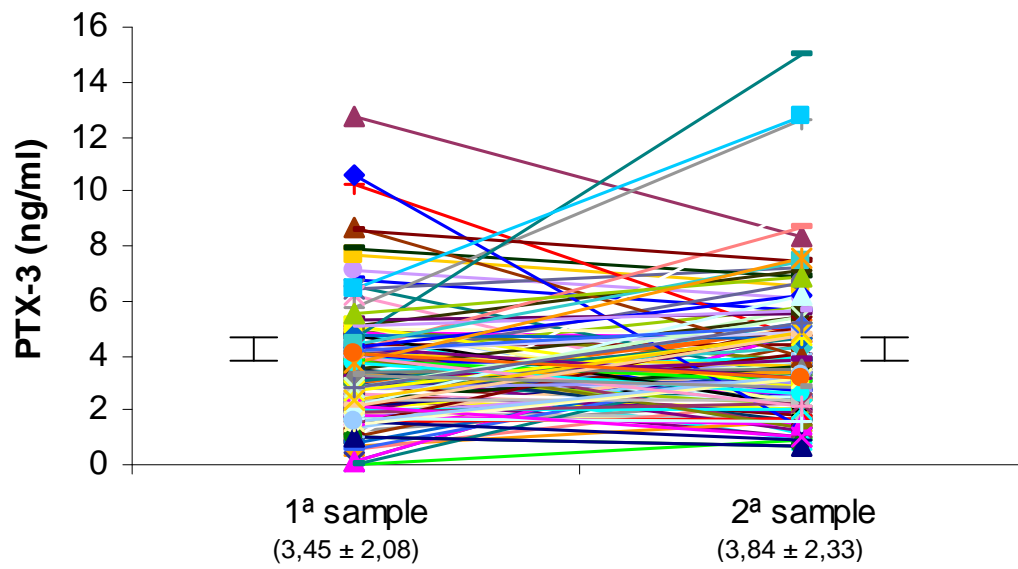


Figure 1. PTX-3 individual values of first and second sample, (mean ± SD).

Anexo I

TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO AUTORIZAÇÃO PARA PARTICIPAR DE UM PROJETO DE PESQUISA

ESTUDO: VALOR DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS SERIADOS NA PREDIÇÃO DE EVENTOS CORONARIANOS AGUDOS EM PACIENTES COM CARDIOPATIA ISQUÊMICA ESTÁVEL.

O Sr. (a) está sendo convidado (a) a participar de um protocolo de pesquisa. Este protocolo visa obter maior conhecimento a respeito de novos métodos prognósticos, os marcadores inflamatórios, para avaliação de pacientes com cardiopatia isquêmica (infarto ou angina).

Após a assinatura deste termo de consentimento, o Sr., a cada três meses, será solicitado a coletar uma amostra de sangue conforme suas possibilidades e as possibilidades do serviço onde o exame será realizado.

1. EXPLICAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Após o senhor(a) ser selecionado, será aplicado um questionário padronizado para coleta de dados. Depois de responder o questionário, será realizada uma punção venosa com agulha para retirada de sangue. A partir disso, o Sr. será solicitado a comparecer em visitas periódicas separadas por três meses, em que serão realizadas novas retiradas de amostras de sangue. Esse sangue será armazenado em um freezer para posterior análise.

2. POSSÍVEIS RISCOS E DESCONFORTOS

O desconforto é de uma coleta de sangue comum ocasionada pela introdução da agulha na veia. Os riscos de complicação dessa coleta de sangue são mínimos e relacionados, principalmente, hematomas por extravasamento de sangue e inflamações no local.

3. POSSÍVEIS BENEFÍCIOS DESSE ESTUDO

Não é esperado nenhum benefício direto para o paciente, pois é um trabalho observacional e o Sr(a) já estão em acompanhamento no ambulatório de cardiopatia isquêmica. Contudo, espera-se um benefício para este tipo de paciente com a conclusão do trabalho, pois poderemos ter mais um parâmetro

(no caso os marcadores) para melhor poder avaliar pacientes com a mesma condição clínica que o Sr(a).

Além disso, os resultados deste estudo poderão contribuir na evolução de métodos prognósticos não invasivos, melhorando a prática médica e oferecendo menos efeitos adversos aos pacientes.

4. EXCLUSÃO DO ESTUDO

O investigador responsável pode excluí-lo(a) do estudo sem seu consentimento quando julgar necessário para o melhor encaminhamento do seu caso ou se não cumprir o programa estabelecido.

5. COBERTURA

Sua participação é voluntária. Não há quaisquer ônus ou gratificações referentes à sua participação neste estudo.

6. DIREITO DE DESISTÊNCIA

O senhor(a) poderá desistir de participar do estudo a qualquer momento. Sua decisão de não participar ou de deixar a pesquisa depois de iniciada não afetará atendimentos futuros nos hospitais participantes nem trará prejuízos ao senhor(a). No caso de dúvidas ou dificuldades relacionadas a pesquisa o Sr(a) poderá entrar em contato com um dos investigadores, Dra. Carisi A Polanczyk ou Dr. Paulo Vicente S. Camargo, pelos telefones: 33168344, 33168671.

7. SIGILO

Todas as informações obtidas através deste estudo, bem como o prontuário hospitalar podem ser publicados com finalidade científica, mantendo-se o sigilo pessoal.

8. CONSENTIMENTO

Declaro ter lido – ou me foram lidas – e entendido as informações acima antes de assinar esse formulário. Foi-me dada ampla oportunidade de fazer perguntas, esclarecendo plenamente minhas dúvidas. Por este instrumento, tomo parte, voluntariamente, no presente estudo.

Assinatura do paciente.....

Testemunha.....

Entrevistador

Data/...../.....

Anexo II

VALOR DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS SERIADOS NA PREDIÇÃO DE EVENTOS CORONARIANOS AGUDOS EM PACIENTES COM CARDIOPATIA ISQUÊMICA ESTÁVEL.

Data: _____ Coleta No. _____ – (CPI.MI) No. _____ Prontuário _____

1. Identificação ..

Nome: _____ Idade: _____ DN: _____ Sexo: (1) M (2) F
Endereço: _____ Telefone: _____

2. Sintomas Atuais (Últimos 3 meses)

Dor / desconforto torácico : Classe Funcional NYHA

- (1) Classe I (5) Claudicação intermitente: _____ metros
(2) Classe II (6) Edema Mals () pé () tornozelo () joelho () coxa
(3) Classe III (7) Outros: _____
(4) Classe IV
HDA _____

3. Diagnóstico / Novos Eventos Cardiovasculares

- (1) Angina Estável: Data: _____
(2) Angina Instável: Data: _____
(3) Outros diagnósticos:
(3a) ICC Classe NYHA: _____
(3b) Arritmias: _____
(3c) Valvulopatias: _____
(3d) Eventos
Tromboembólicos: _____
(3e) AVC/AIT: _____ (3f) Outros: _____
- 1 (4) IAM: Data: _____
2 (5) Reinfarto: Data: _____
(5a) lateral alto (5f) lateral
(5b) anterior (5g) ant. extenso
(5c) septal (5h) ântero-septal
(5d) inferior (5i) não-Q
(5e) posterior (5j) VD
- (6) Internação Data: _____ Local: _____ (7) Morte – causa mortis: _____
(6a) Por outras causas: _____ (8) Emergência Data: _____ Local: _____

4. Procedimentos / Novos Procedimentos (a) CD (b) DA (c) Cx (d) Mg (e) Dg

- (1) CAT diagnóstico: Data: _____ Vasos: _____ (4) CRM: Data: _____ Vasos _____
(2) ACTP / Stent: Data: _____ Vasos: _____ Nº de pontes: _____ (4.1) Safena (4.2) Mamária (4.3) outras
(3) trombolítico _____ Data: _____ (5) outras: _____
(6) não soube informar

5. História Mórbita Progressa (Atual e nos últimos 3 meses)

- (1) Doença Reumatológica: _____ (7) Úlcera Péptica: _____
(2) IVAS/Gripe: _____ (8) DPOC: _____
(3) Doença Vascular Periférica: _____ (9) Neoplasias: _____
(4) Doença Cerebrovascular: _____ (10) Doença Renal: _____
(5) Doença Hepática: _____ (11) Outras: _____
(6) Doença da Tireóide: _____

6. Fatores de Risco Referidos TD = Tempo de Doença

- (1) DM TD _____ (2) HAS TD _____ (6) Atividade física regular: (horas/ semana)
(3) Dislipidemia (3a) Hipercolesterolemia (3b) Hipertriglic (3c) desconhecido (6a) Não (6b) 1-3 (6c) 4-6 (6d) >6
(4) História familiar de CI: (7) História de Tabagismo:
(4a) Pais (4b) Irmãos (4c) Avós Idade Tempo uso: _____ Cig/ dia: _____ Tempo abandono: _____
(4a) Pais (4b) Irmãos (4c) Avós Idade (7a) Tabagismo Atual: Cig/ dia: _____
(5) Obesidade - IMC (8) Bebida alcoólica – quantidade (doses/semana): _____

7. Medicação em Uso (droga e dose)

(13) não sabe

- (1) Antiplaquetário: _____
- (2) IECA : _____
- (3) Antagonistas Cálcio: _____
- (4) Nitratos: _____
- (5) β -bloqueador: _____
- (6) Diuréticos: _____
- (7) Antiarrítmicos: _____
- (8) Anticoagulante Oral : _____
- (9) Hipolipemiantes: _____
- (10) Antidiabéticos: _____
- (11) TRH: _____
- (12) Outros: _____

(14) Uso: (14a) regular (14b) irregular = Motivo: (14ba) preço (14bb) esquecimento (14bc) orientação médica inadequada (14c) Efeitos Adversos das Drogas: _____

8. Laboratório

	Glic. Jejum	Hb Glicosil.	Frutosamina	Col. Total	Col. HDL	Col. LDL	Triglicerídeos
Data							
Valor							

EXAME FÍSICO:

1. Geral

PA 1: ____/____ mmHg PA 2: ____/____ mmHg Freq.Cardíaca: ____ bpm
 Peso: ____ Kg Altura: ____ cm IMC: ____ Cintura: ____ cm Perímetro Braquial: ____ cm

2. Sistema Cardiovascular

- (1) Turgência jugular a 45°
- (2) Refluxo hepatojugular Sopro cardíaco: (8) Não (9) Sim _____
- (3) Sopro carotídeo (3a) Dir (3b) Esq
- ACV: (4) RR (5) RI (6) B₃ (7) B₄

3. Sistema respiratório

Ausculta pulmonar :
 AP: (1) Normal (2) Crep. Basais (3) Outro

5. Extremidades

(1) Edema de Membros Inferiores ____+/ 4+

(2) Aquecidas, perfundidas

(3) Pulsos Palpáveis – (3 a) Sim (3 b) Não _____

(4) Outros: _____

Retorno: _____