

FÁBIO HAACH TÉO

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DAS
CÉLULAS T CD4⁺CD28^{null} EM PACIENTES COM DOENÇA
CORONARIANA E INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS
PORTADORES DE FATORES DE RISCO PARA
ATEROSCLEROSE**

CAMPINAS

2010

Fábio Haach Téo

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DAS
CÉLULAS T CD4⁺CD28^{null} EM PACIENTES COM DOENÇA
CORONARIANA E INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS
PORTADORES DE FATORES DE RISCO PARA
ATEROSCLEROSE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, área de concentração em Ciências Biomédicas

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA HELOISA SOUZA LIMA BLOTTA

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. JULIANO LARA FERNANDES

CAMPINAS

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

T264c Téó, Fábio Haach
Caracterização fenotípica e funcional das células T CD4+ CD28 null em pacientes com doença coronariana e indivíduos saudáveis portadores de fatores de risco para aterosclerose / Fábio Haash Téó. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientadores: Maria Heloisa Souza Lima Blotta, Juliano Lara Fernandes
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Imunologia. 2. Linfócitos. 3. Inflamação. 4. Aterosclerose. I. Blotta, Maria Heloisa Souza Lima. II. Fernandes, Juliano Lara. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em inglês : Phenotypic and functional characterization of CD4+ CD28null T cells in patients with coronary artery disease and healthy individuals with and without risk factors for atherosclerosis

Keywords: • Immunology
• Lymphocytes
• Inflammation
• Atherosclerosis

Titulação: Mestre em Ciências Médicas
Área de concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora:

Profa. Dra. Maria Heloisa Souza Lima Blotta
Profa. Dra. Wirla Maria da Silva Cunha
Prof. Dr. Fernando Henpin Yue Cesena

Data da defesa: 27-08-2010

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Fábio Haach Téó

Orientador(a): Profa. Dra. Maria Heloisa De Souza Lima Blotta

Membros:

1. Profa. Dra. Maria Heloisa De Souza Lima Blotta -

MH Blotta

2. Profa. Dra. Wirla Maria Da Silva Cunha Tamashiro -

Wirla msu Tamashiro

3. Prof. Dr. Fernando Henpin Yue Cesena -

FERNANDO YUE CESENA

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 27/08/2010

Trabalho realizado no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Proc. 08/50530-8.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Mário e Virginia, que sempre me amaram e me apoiaram em todos os momentos de minha vida.

Ao meu irmão, Gustavo, pelo companherismo e pelo exemplo de vida.

Ao amor da minha vida, Ingrid, companheira de todas as horas, que me dedica todo o amor e carinho e com quem quero dividir uma vida inteira.

Essa vitória só foi possível por causa de vocês.

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, meu pai celeste, que sempre me amparou e me concedeu inúmeras graças durante toda a minha vida.

Aos meus pais, Mário e Virginia, que sempre me apoiaram nas minhas decisões e participaram ativamente de todo o processo, me dando suporte nos momentos mais difíceis, quero fazer um enorme agradecimento. Ao meu irmão, Gustavo, que me ensinou o que significa superar limitações e ser perseverante, dando um exemplo de vida. Não conseguiria realizar essa tese sem a ajuda imprescindível deles.

Também agradeço de maneira muito especial a pessoa com quem divido todos os momentos da minha vida, Ingrid. Quero dizer obrigado por estar presente em todos os momentos, mesmo estando a 100 Km de distância, por toda a compreensão com o meu trabalho, mesmo que isso significasse dias e dias ausentes, e por todo o amor e carinho devotados a mim, que me davam força para continuar em frente.

À Dra. Maria Heloisa Souza Lima Blotta, por me acolher em seu laboratório e depositar tamanha confiança em mim, minha profunda gratidão. Obrigado por me orientar, buscando junto comigo as soluções para os problemas que apareceram no meio do caminho, me animando sempre a acreditar no meu potencial. Ao Dr. Juliano de Lara Fernandes, meu co-orientador, pela disposição em esclarecer minhas dúvidas na parte clínica e pela ajuda valiosa na seleção dos pacientes. Minha gratidão por todos os momentos de apoio.

Ao Dr. Ronei Luciano Mamoni pelos ensinamentos junto à bancada, sempre dados com muita dedicação, e pela paciência quase que infinita em me ensinar. Ao Mestre Rômulo Tadeu Dias de Oliveira, meu companheiro na busca do entendimento dos obscuros caminhos da doença aterosclerótica, por sempre me ajudar e me transmitir toda a sua experiência. Muito obrigado!!!

Aos meus companheiros do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular: Larissa, Fernanda, Carol, Ana Lúcia, Rosiane e Munir, com os quais tive o prazer de conviver esses últimos anos, por sempre me darem apoio e me ajudarem na rotina do laboratório, meus agradecimentos.

Ao Dr. Otávio Rizzi Coelho, por me orientar na seleção dos pacientes com doença coronariana, abrindo as portas dos ambulatórios de isquemia e da Unidade Coronariana do HC. Ao Dr. Wilson Nadruz Jr e à enfermeira Carol, por inserir a coleta de material para minha pesquisa junto à rotina do ambulatório de hipertensão do HC e por todo apoio na triagem dos pacientes com fatores de risco para aterosclerose. Obrigado por estarem sempre prontos a ajudar.

Aos residentes da Cardiologia: Hugo V. Nourani, Bruno A. Colantoni, Pedro Henrique O. de Albuquerque, Ana Paula B. L. Lino, Ana Raquel A. e S. L. Zollner, Bruno F. S. Rosa, Paula S. A. Guimarães e Maurício P. Bussolo, por estarem sempre dispostos a esclarecerem minhas dúvidas sobre o quadro clínico dos pacientes e me indicarem aqueles que eram adequados para a pesquisa, contribuindo de maneira crucial para a formação dos grupos. O apoio deles foi muito importante para o sucesso do projeto.

A todos os voluntários e pacientes que doaram, sem hesitar, um pouco de seu sangue para realização dessa pesquisa. Sem a colaboração e a disposição em ajudar dessas pessoas, a tese não seria viável. Meu muito obrigado a tantas pessoas de boa-vontade.

Aos integrantes da minha Banca Examinadora: Dra Wirla M. S. C. Tamashiro, Dr. Fernando H. Y. Cesena e Dra Leonilda B. Santos, quero agradecer pela leitura da tese e pelas valiosas sugestões.

Meus agradecimentos também ao Dr. Aníbal Vercesi, por ceder o citômetro de fluxo para a leitura das amostras, e aos seus alunos, principalmente Franco e Karina, por me auxiliarem nas dúvidas quanto ao manuseio do equipamento.

Finalmente, minha gratidão à CAPES e à FAPESP, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa.

LISTA DE ABREVIATURAS

AE	Angina estável
AGE	Produtos finais de glicação avançada
APC	Célula apresentadora de antígeno
APN	Adiponectina
AT 1	Receptor da angiotensina II do tipo 1
Bcl-2	Proteína reguladora de apoptose relacionada ao linfoma de células B2
C	Controles
CCL	Quimiocina do tipo CC
CCR	Receptor de quimiocina do tipo CC
CD	<i>Cluster</i> de diferenciação
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
COX-2	Ciclooxigenase 2
CXC	Quimiocina do tipo CXC
CXCR	Receptor de quimiocina do tipo CXC
DAP	Proteína associada à morte celular
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERK	MAPK quinase regulada por sinais extracelulares
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FLIP	Proteína inibidora do tipo FLICE
FR	Fatores de risco para aterosclerose

GRANUL	Granulisina
GRANZ A	Granzima A
GRANZ B	Granzima B
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A
HSP-60	Proteína de choque térmico 60
HUVEC	Células endoteliais de veia umbilical humana
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
IL-1 β	Interleucina 1 beta
JNK	Janus quinase
KIR	Receptor <i>killer</i> do tipo imunoglobulina
LOX-1	Receptor 1 de lipoproteína de baixa densidade oxidada
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos 1
M-CSF	Fator estimulador da formação de colônias de macrófago
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
MMP	Metaloproteinase de matriz extracelular
MTC	Síndrome cardio-metabólica
MTS	Síndrome metabólica
NF- κ B	Fator nuclear kappa B

NO	Óxido nítrico
oxLDL	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
PAI-1	Inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1
PCR	Proteína C reativa
PE	Ficoeritrina
PE Cy-5	Ficoeritrina conjugada com cianina 5
PERF	Perforina
PRR	Receptor de reconhecimento de padrão
RAS	Proteína envolvida em diversas vias de sinalização intracelular
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SCA	Síndromes coronarianas agudas
SCM	Células musculares lisas
SR-A	Receptor <i>scavenger</i> A
SSA	Soro amilóide A
TCR	Receptor do linfócito T
Th1	Célula T auxiliar 1
TLR	Receptor do tipo <i>toll</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
TRAIL	Ligante do indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular 1

SUMÁRIO

RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xxiii
INTRODUÇÃO.....	27
OBJETIVOS.....	41
1. Objetivo.....	43
2. Estratégias.....	43
CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	45
1. Casuística.....	47
2. Obtenção e separação das células mononucleares do sangue periférico (CMSP).....	49
3. Citometria de fluxo.....	49
4. Estimulação de CMSP em cultura.....	53
4.1. Estimulação com anti-CD3 e ionóforo de cálcio.....	53
4.2. Estimulação com LPS.....	53
5. Determinação da concentração plasmática da proteína C reativa.....	54
6. Análise estatística.....	54
RESULTADOS.....	57
1. Caracterização dos grupos.....	59
2. Análises <i>ex vivo</i>	63
2.1. Porcentagem de células CD4 ⁺ CD28 ^{null} e CD4 ⁺ CD28 ⁺ em relação aos linfócitos totais do sangue periférico.....	63
2.2. Expressão de grânulos citotóxicos, receptores de <i>homing</i> e citocinas inflamatórias por células CD4 ⁺ CD28 ^{null} e CD4 ⁺ CD28 ⁺	64
2.3. Comparação da expressão de grânulos citotóxicos por células CD4 ⁺ CD28 ^{null} e CD4 ⁺ CD28 ⁺ nos diferentes grupos.....	70
2.4. Comparação da expressão de receptores de <i>homing</i> e IFN- γ por células CD4 ⁺ CD28 ^{null} e CD4 ⁺ CD28 ⁺ nos diferentes grupos.....	73
2.5. Correlação entre parâmetros bioquímicos e a expressão de	

grânulos citotóxicos, receptores de <i>homing</i> e IFN- γ em células CD4 ⁺ CD28 ^{null}	76
3. Análises após estimulação em cultura com anti-CD3 e ionóforo de cálcio	80
4. Análises após estimulação em cultura com LPS.....	84
5. Determinação da concentração plasmática de proteína C reativa.....	88
DISCUSSÃO	91
CONCLUSÕES	117
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
ANEXOS	137



Resumo

A aterosclerose é uma doença inflamatória caracterizada por uma intensa atividade imunológica que culmina na formação de lesões nos vasos sanguíneos. As síndromes coronarianas agudas (SCA) representam graves complicações da aterosclerose. Pacientes com SCA podem ser diferenciados de indivíduos saudáveis pela frequência aumentada de células T $CD4^+CD28^{\text{null}}$ no sangue periférico. Tais células têm sido relacionadas a processos inflamatórios crônicos, como os que ocorrem em indivíduos portadores de fatores de risco clássicos para a doença aterosclerótica. O objetivo do presente estudo foi avaliar as possíveis diferenças quanto ao número e as características das células T $CD4^+CD28^{\text{null}}$ presentes no sangue periférico de pacientes com doença coronariana e indivíduos saudáveis com ou sem fatores de risco para o desenvolvimento de aterosclerose. Para tanto, células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de controles (C), indivíduos portadores de fatores de risco (FR), pacientes com angina estável (AE) e pacientes com síndromes coronarianas agudas (SCA) foram diretamente submetidas à citometria de fluxo (*ex vivo*) para quantificação de células $CD4^+CD28^{\text{null}}$ e detecção de perforina, granzimas A e B, granzulina, CD161, CCR5, CCR7, CXCR3, IFN- γ e TNF- α . As células foram cultivadas na presença de anti-CD3 e ionóforo de cálcio por 6hs com posterior análise da expressão de citocinas inflamatórias e também com LPS por 48hs, seguida da avaliação da expressão de moléculas citotóxicas e receptores de *homing* frente a estímulo inflamatório. A concentração plasmática da proteína C reativa (PCR) também foi determinada. Nossos resultados mostraram que a porcentagem de células $CD4^+CD28^{\text{null}}$ em relação aos linfócitos totais do sangue periférico foi similar em todos os grupos. A análise *ex vivo* mostrou que a população de células $CD4^+CD28^{\text{null}}$ apresenta maior expressão de grânulos citotóxicos (granzimas A e B, perforina e granzulina) e dos receptores de *homing* CCR5 e CD161 quando comparadas à população de células $CD4^+CD28^+$, enquanto que a expressão do CCR7 e do CXCR3 é menor. A frequência de células IFN- γ^+ foi maior na população $CD4^+CD28^{\text{null}}$. Tal padrão se repetiu em todos os grupos, com praticamente todos os parâmetros se comportando dessa maneira. Entretanto, quando comparamos as células $CD4^+CD28^{\text{null}}$ dos diferentes grupos, verificamos que a perforina e as granzimas A e B foram mais frequentes nas células de indivíduos com fatores de risco e pacientes com SCA. Com relação às moléculas de *homing* e ao IFN- γ , houve maior positividade para CCR7 nas células $CD4^+CD28^{\text{null}}$ de controles e pacientes AE, enquanto o IFN- γ foi mais frequente nas

células dos pacientes AE. A estimulação das CMSP com anti-CD3 e ionóforo de cálcio mostrou que as células $CD4^+CD28^{null}$ dos grupos FR e SCA têm maior capacidade inflamatória quando comparadas às células de controles e de pacientes AE, o que foi evidenciado por um maior aumento na positividade para o $TNF-\alpha$. Após estimulação das CMSP com LPS, a população $CD4^+CD28^{null}$ apresentou diminuição da expressão dos grânulos citotóxicos analisados, o que ocorreu em todos os grupos. Com relação às moléculas de *homing*, a estimulação com LPS causou uma diminuição da frequência de $CD4^+CD28^{null}$ positivas para CCR5 em todos os grupos, enquanto houve aumento da positividade para o CXCR3 nas células do grupo AE. Os pacientes SCA apresentaram as maiores concentrações plasmáticas de PCR, seguido pelos indivíduos do grupo FR e finalmente pelos controles e pacientes AE. Coletivamente, nossos resultados mostraram que os fatores de risco para aterosclerose causam alterações fenotípicas na população $CD4^+CD28^{null}$, tornando-a mais citotóxica e inflamatória, o que poderia estar associado com a inflamação subclínica observada nessas condições. Além disso, os dados sugerem que as células $CD4^+CD28^{null}$ degranulam e alteram a expressão de receptores de *homing* quando estão em ambiente inflamatório, como ocorre na placa aterosclerótica e/ou na vigência de infecções microbianas.



Abstract

Atherosclerosis is an inflammatory disease characterized by an intense immunological activity, resulting in vascular lesions. The acute coronary syndromes (ACS) are one of the complications of atherosclerotic disease. Patients with SCA can be differentiated from healthy individuals by an increased frequency of CD4⁺CD28^{null} T cells in peripheral blood. These cells have been associated with chronic inflammatory processes, which occur in individuals with risk factors for coronary artery disease. This study aimed to evaluate the possible differences regarding the number and characteristics of peripheral blood CD4⁺CD28^{null} cells from patients with coronary artery disease and healthy individuals with and without risk factors for atherosclerosis. In order to achieve this goal, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy controls (C), individuals with risk factors (RF), patients with stable angina (SA) and patients with acute coronary syndromes (ACS) were analyzed by flow cytometry (*ex vivo*) to quantify CD4⁺CD28^{null} cells and to detect the expression of perforin, granzymes A and B, granulysin, CD161, CCR5, CCR7, CXCR3, IFN- γ and TNF- α . Cells were cultured with anti-CD3 and calcium ionophore for 6 h and analyzed regarding inflammatory cytokine expression. The cells were also cultured with LPS for 48h to evaluate expression of cytotoxic molecules and homing receptors in response to inflammatory stimulus. The plasmatic concentrations of C reactive protein (CRP) were also measured. Our results showed that the percentage of CD4⁺CD28^{null} cells in relation to total lymphocytes in peripheral blood was similar in all groups. Regarding the CD4⁺CD28^{null} population phenotype, it was observed an increased expression of cytotoxic molecules (granzymes A and B, perforin and granulysin) and homing receptors CCR5 and CD161 compared to CD4⁺CD28⁺ population. In contrast, expression of CCR7 and CXCR3 was decreased in CD4⁺CD28^{null} population. IFN- γ frequency was also increased in CD4⁺CD28^{null} cells. This pattern was found in all groups, in relation to almost all analyzed parameters. Nevertheless, when CD4⁺CD28^{null} cells from the different groups were compared, it was observed that the positivity for perforin and granzymes A and B were increased in cells from individuals with risk factors and ACS patients. On the other hand, granulysin was more frequent in CD4⁺CD28^{null} cells from SA patients and controls. Moreover, the positivity for CCR7 was increased in CD4⁺CD28^{null} cells from control and SA patients while IFN- γ was more frequent in cells from SA patients. PBMC stimulation with a anti-CD3 and calcium ionophore for 6h showed that

CD4⁺CD28^{null} cells from RF and ACS groups have an increased inflammatory capacity when compared to cells from control subjects and AE patients, which is evidenced by a bigger increase in positivity for TNF- α . After PBMC stimulation with LPS for 48hs, CD4⁺CD28^{null} population had a decrease in cytotoxic molecules expression, fact that occurred in all groups. Regarding the homing molecules, LPS stimulation caused a huge decrease of CCR5 frequency in CD4⁺CD28^{null} cells from all groups while there was a significant increase of positivity for CXCR3 in the cells from SA patients. The highest CRP plasmatic concentrations were found in ACS patients, followed by subjects from RF group. The lowest levels were found in controls and SA patients. Taking together, our results show that risk factors for atherosclerosis lead to phenotypic alterations in CD4⁺CD28^{null} population, which became more cytotoxic and inflammatory. Such alterations may be associated with the low-grade inflammation found in patients with hypertension, diabetes, dyslipidemia and smoking. Beyond that, our data suggests that CD4⁺CD28^{null} cells degranulate and modify homing receptor patterns when they are in an inflammatory environment, which takes place in atherosclerotic lesions and/or infections.



Introdução

As doenças cardiovasculares lideram o *ranking* de causas de morte em países desenvolvidos e logo constituirão o problema de saúde mais importante no mundo todo (1). Projeções da Organização Mundial da Saúde para 2020 alertam para o rápido crescimento das doenças cardiovasculares, com o aumento do número de casos em países do leste europeu e em nações em desenvolvimento (2). No Brasil, as doenças cardiovasculares são responsáveis por 27% dos casos de óbitos (3) e seu tratamento causa grande impacto econômico (4).

A aterosclerose constitui o principal fator responsável pelo aumento das patologias cardiovasculares (5). Trata-se de uma doença inflamatória caracterizada por uma intensa atividade imunológica, envolvendo a formação de lesões conhecidas como placas ateroscleróticas ou ateromas nas artérias (6). Inicialmente, tais lesões são constituídas por células, elementos do tecido conjuntivo, lipídeos e detritos celulares localizados na íntima dos vasos (7). Com o passar do tempo, os ateromas se desenvolvem e ganham novas características (6).

O primeiro evento para o desenvolvimento do ateroma é o depósito de partículas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) na íntima das artérias (8), onde se associam com os proteoglicanos da matriz extracelular. Esse *pool* de LDL é modificado por enzimas e radicais de oxigênio, formando moléculas como a LDL oxidada (oxLDL) (9). Constituintes de lipoproteínas modificadas, como a oxLDL, induzem a transcrição do gene que codifica a molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1), a qual possibilita a adesão de leucócitos mononucleares ao endotélio nos locais de formação dos ateromas. Além disso, quimiocinas expressas nesses locais, como a proteína quimiotática para macrófagos (MCP-1), a interleucina 8 (IL-8) e um trio de quimiocinas CXC induzida pelo interferon gama (IFN- γ), guiam e induzem a migração de fagócitos mononucleares e linfócitos para o ateroma

nascente (5). Uma vez dentro da íntima, os monócitos se diferenciam em macrófagos em resposta ao fator estimulador da formação de colônias de macrófagos (M-CSF) (10) e expressam uma variedade de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), incluindo os receptores *scavenger*, como o LOX-1 (lectin-type oxidized low-density lipoprotein receptor 1) e o SR-A (scavenger receptor A), além de receptores do tipo *toll* (TLRs). Os receptores *scavenger* favorecem a internalização das partículas de oxLDL, o que leva a um acúmulo intracelular de colesterol e a formação das células espumosas (*foam cells*) (11). Essas células são as predominantes nas placas nascentes (chamadas de estrias gordurosas), as quais também possuem um pequeno número de células T (6). As estrias gordurosas são prevalentes em pessoas jovens, não causam sintomas e podem progredir para a formação de um ateroma ou eventualmente desaparecer (7).

A ligação de TLRs a lipopolissacarídeo (LPS), proteína de choque térmico 60 (HSP-60), oxLDL e outras moléculas presentes na íntima das artérias leva à produção de citocinas inflamatórias pelos macrófagos. Além disso, a internalização de tais moléculas por células apresentadoras de antígeno (APCs) leva à apresentação de fragmentos para as células T no contexto de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II, culminando na ativação desses linfócitos (6). Para que o linfócito T seja ativado no local da lesão é necessária a ligação de moléculas que promovem o segundo sinal da resposta imunológica, como o CD80 e o CD86 na APC e o CD28 no linfócito (12). Uma vez ativadas, as células T dão origem a uma resposta Th1, com a produção de citocinas inflamatórias, como IFN- γ e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Esses mediadores inflamatórios induzem a ativação de macrófagos, produção de proteases e outros mediadores pró-inflamatórios, ativação de células endoteliais, maior expressão de

moléculas de adesão e propensão para a formação de trombos, culminando na formação da placa madura (6).

A principal característica das lesões ateroscleróticas avançadas é a presença de uma região central, formada por células espumosas e gotículas de lípidios, a qual é coberta por uma capa de células musculares lisas embebidas em uma matriz rica em colágeno (7). As células T e os macrófagos se acumulam nas bordas da placa e na interface entre a região central e a capa. A região da borda constitui o ponto de menor resistência da lesão (13) e, portanto, onde o risco de ruptura da placa é maior (7).

As síndromes coronarianas agudas (SCA), incluindo a angina instável (AI), representam complicações agudas da aterosclerose (13). Elas são causadas pela erosão ou ruptura da placa aterosclerótica, o que dá origem a trombose (14), que pode ocluir a artéria no sítio da ruptura e levar ao infarto do miocárdio (6). A ruptura do ateroma tem múltiplas causas, mas a presença de inflamação é um dos fatores determinantes mais importantes da vulnerabilidade dessas lesões (15). Certas citocinas inflamatórias, como o IFN- γ , inibem a proliferação das células musculares lisas da íntima (16) e a produção de colágeno (17). Além disso, os mediadores inflamatórios, como o TNF- α e a interleucina 1-beta (IL-1 β), também aumentam a expressão de metaloproteinases nos fagócitos mononucleares, células endoteliais e células musculares lisas (18). O resultado desse processo, ou seja, a degradação da matriz de colágeno da capa deixa essa estrutura friável e susceptível ao rompimento, quando exposta a estresses hemodinâmicos (5).

Pacientes com SCA podem ser diferenciados de indivíduos saudáveis de mesma idade ou de pacientes com angina estável pela frequência aumentada de células T CD4⁺ que foram expandidas de forma oligoclonal no sangue periférico e perderam a expressão da molécula coestimulatória CD28 (13). A habilidade dessas células T CD4⁺CD28^{null} em

produzir grandes quantidades de IFN- γ e TNF- α , aliada ao fato de que elas podem ser isoladas de ateromas rompidos, indica que, juntamente com outros mecanismos pró-inflamatórios, podem ter um papel nos eventos que culminam com a desestabilização da placa e a ocorrência de SCA (19).

Embora a molécula CD28 seja constitutivamente expressa na superfície de células T humanas, sua expressão pode ser inibida, causando um aumento na porcentagem de células T CD4⁺CD28^{null}. Tal fato é comum durante o processo de envelhecimento e em pacientes com doenças inflamatórias crônicas, como artrite reumatóide e esclerose múltipla (20). Estudos sobre o mecanismo de bloqueio da expressão de CD28 revelaram que tal inibição se dá por dois mecanismos diferentes. No caso das doenças inflamatórias crônicas, nas quais há estimulação antigênica persistente, há uma diminuição da expressão de ambos os *motifs* de ligação de proteínas nucleares α e β na região promotora do gene da molécula CD28, enquanto no envelhecimento apenas o *motif* de ligação β do promotor está inibido. De qualquer maneira, em ambos os casos, o gene do CD28 não é transcrito (21). É importante destacar que a presença de TNF- α modula a expressão de CD28, provocando a inibição de sua transcrição (22). Em concordância com tal estudo, Rizzello et al. (23) verificaram uma diminuição do número de células T CD4⁺CD28^{null} em pacientes com angina instável submetidos ao tratamento com anticorpo anti-TNF- α .

Pesquisas sobre as características funcionais das células T CD4⁺CD28^{null} revelaram que esse tipo incomum de célula T possui características especiais quando comparadas com as células T CD4⁺CD28⁺, como longevidade e expansão clonal *in vivo* (24). A longevidade está associada com defeitos nas vias de apoptose, com a manutenção de altas taxas da proteína FLIP após a ativação (25) e de alta expressão de bcl-2 independentemente de estímulo via citocinas (26). Além disso, as células T CD4⁺CD28^{null} possuem expressão

constitutiva das duas subunidades do receptor da interleucina 12 (IL-12) e respondem a essa citocina mesmo sem ativação via receptor do linfócito T (TCR), passando a expressar CD161 e CCR5, o que permite a migração para os sítios de inflamação, onde produzem grandes quantidades de IFN- γ (15). Além do mais, as células CD4⁺CD28^{null} são refratárias aos efeitos das células T supressoras (27). Diante disso, verifica-se a existência de uma correlação entre a gravidade de várias doenças e a frequência de células T CD28^{null}. Na artrite reumatóide, a frequência de células T CD28^{null} é associada com manifestações extra-articulares, particularmente, alterações vasculares. Pacientes com artrite reumatóide e expansão persistente de células T CD4⁺CD28^{null} mostram sinais de dano vascular aterosclerótico, indicando que essas células podem ter um papel na patogenia dos problemas cardiovasculares que afetam tais pacientes (28).

Além de contribuir para a inflamação com a produção de IFN- γ , as células T CD4⁺CD28^{null} expressam perforina e granzima B, podendo ter ação citotóxica (24). Outra molécula com atividade citotóxica presente nos linfócitos T CD8⁺ e nas células *natural killer* (NK) denominada granulicina ainda não foi descrita nas células T CD4⁺CD28^{null} (29). A ação citotóxica das células T CD4⁺CD28^{null} pode ser dependente ou não da ligação de antígeno via TCR. Isso ocorre porque as células T CD4⁺CD28^{null} expressam receptores KIR (*killer immunoglobulin-like*) estimulatórios, os quais podem ter atividade estimulatória, aumentando a capacidade de síntese de IFN- γ dessas células, ou atividade citotóxica sem a necessidade de ligação de antígeno ao TCR. O efeito da ligação dos receptores KIR estimulatórios aos seus respectivos ligantes depende da molécula adaptadora a eles acoplada (30).

As células T CD4⁺CD28^{null} de pacientes com SCA exibem atividade citotóxica independentemente da ligação de antígenos ao TCR (14), o que não ocorre em pacientes

com artrite reumatóide. Tal fato pode ser explicado porque, apesar de ambas as células possuírem o KIR estimulatório KIR2DS2, aquelas provenientes de pacientes com artrite reumatóide não expressam a proteína adaptadora DAP 12 (13). Células T CD4⁺ CD28^{null} DAP12⁻ ativam apenas a cascata de sinalização JNK, via um adaptador ainda desconhecido, tendo efeito coestimulatório e aumentando a produção de IFN- γ . Já células T CD4⁺ CD28^{null} DAP12⁺ podem ativar a via ERK e a via JNK ao mesmo tempo. A ativação da via ERK faz com que essas células tenham a capacidade citotóxica após a ligação do KIR2SD2 ao seu ligante, não sendo necessária a participação do TCR (30). É importante destacar que as células T CD4⁺CD28^{null} podem adquirir a capacidade citotóxica por outros mecanismos, como via TRAIL (31) e TLR 4 (32).

Enquanto a frequência de células CD4⁺CD28^{null} compreende de 0,1 a 2,5% das células T CD4⁺ do sangue periférico de indivíduos normais (33), este número se encontra elevado em pacientes com diferentes tipos de enfermidades autoimunes (34). Sun e colaboradores (35) constataram que as células CD4⁺CD28^{null} passam por um processo de expansão em pacientes com Doença de Graves, correspondendo a 19% dos linfócitos T CD4⁺. Outras doenças nas quais foi constatado aumento de células CD4⁺CD28^{null} são espondilite anquilosante (36), granulomatose de Wegener (37), lúpus eritematoso sistêmico (38), esclerose múltipla (39), dermatomiosite e polimiosite (40). Mais recentemente verificou-se que as células T CD4⁺CD28^{null} também estão presentes em número elevado em infecções como hepatite B (41) e doença de Chagas (42,43).

A hipertensão é considerada um dos fatores de risco mais importantes para doenças cardiovasculares (44). Somado a isso, elevações da pressão arterial estão intimamente relacionadas com processos inflamatórios subclínicos (45). Foi observado que existe uma relação gradual e contínua entre a concentração sérica de proteína C reativa (PCR),

marcador de atividade inflamatória (46), e os níveis de pressão arterial (47). O estado pró-inflamatório encontrado em pacientes com hipertensão pode ser explicado por alterações no *shear stress*, que provoca a ativação das células endoteliais, que passam a expressar ICAM-1 e P-selectina (48). Entretanto, grande parte do processo inflamatório observado em indivíduos hipertensos é mediada pela angiotensina II, através do receptor AT 1 (49). A ligação da angiotensina II ao seu receptor ativa a proteína RAS, acionando diversas vias de sinalização intracelular (50), culminando com a ativação do NF- κ B, fator de transcrição para diversos genes da resposta inflamatória (51). A ativação do receptor AT 1, portanto, resulta na produção de espécies reativas de oxigênio, de TNF- α , IL-6 e IL1- β (52), moléculas cuja expressão aumenta com o aumento da pressão sanguínea (53,54). O óxido nítrico, por sua vez, importante na manutenção do tônus vascular, tem sua produção diminuída nas células endoteliais (55). A ação combinada das ROS e das citocinas inflamatórias culmina com a disfunção endotelial, um dos eventos mais importantes do processo aterosclerótico (56,57).

A *diabetes mellitus* também constitui um dos fatores de risco para aterosclerose, visto que a elevação de glicose no sangue está sempre relacionada à vasculopatias (58). Assim como ocorre na hipertensão, pacientes com *diabetes mellitus* apresentam problemas no tônus vascular, devido à baixa disponibilidade de NO (59). O endotélio se encontra ativado, expressando moléculas de adesão, e há um estado pró-trombótico, com o acúmulo de plaquetas e adesão ao endotélio (60). Dentre os diversos fatores que contribuem para tais modificações no endotélio, os mais importantes são os produtos finais de glicação avançada (*Advanced Glycosylation End Products* - AGEs) (61).

Os AGEs têm origem endógena e exógena. A formação endógena se dá nas células devido à hiperglicemia persistente, enquanto que os AGEs exógenos são adquiridos através

da alimentação (60). Uma vez no organismo, os AGEs se ligam às proteínas do endotélio e da matriz extracelular, causando mudanças nas suas estruturas e funções (62). Nesse sentido, contribuem para modificações nas moléculas de LDL, tornando-as aterogênicas. Os AGEs também geram cascatas de sinalização intracelular através da ligação com seu receptor específico, gerando stress oxidativo e produção de citocinas como TNF- α e IL-6 através da ativação do NF- κ B (61).

Concentrações sanguíneas elevadas de lipídeos (dislipidemias), principalmente do LDL, constituem um dos fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento da aterosclerose (63). O excesso de LDL plasmático acaba se acumulando na íntima das artérias, onde passa por modificações que o tornam altamente inflamatório e aterogênico. Por sua vez, a redução nos níveis dos níveis plasmáticos de lipoproteína de alta densidade (HDL) também está associada ao aumento do risco para aterosclerose (64). Tal fato ocorre porque, a HDL, ao contrário da LDL, tem funções anti-inflamatórias (65). Nesse sentido, a HDL é associada com a ativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) em células endoteliais *in vitro* (66) e com a melhora no relaxamento vascular *in vivo* (67). Além disso, a HDL inibe a expressão de moléculas de adesão no endotélio (68,69) e a ativação dos macrófagos (70). A HDL atua ainda como um anti-oxidante, contendo os efeitos inflamatórios da LDL oxidada (71).

Os fatores de risco para as doenças cardiovasculares podem ainda associar-se entre si, ocasionando a Síndrome Metabólica (MTS), também referida como Síndrome Cardio-Metabólica (SCM). Tal síndrome se caracteriza por uma constelação de alterações metabólicas e vasculares, incluindo a resistência à insulina, obesidade visceral ou central, hipertensão, dislipidemia e microalbuminúria (72). Todos esses fatores geram stress

oxidativo em conjunto com alterações inflamatórias que contribuem para um estado de hipercoagulação sanguínea e disfunção endotelial sistêmica (73).

Evidências recentes sugerem que a SCM ocorre, em parte, pelo acúmulo de gordura visceral, que promove o desenvolvimento de dislipidemias, alterações no metabolismo da glicose e o aparecimento de hipertensão (74). De fato, o tecido adiposo deixou de ser considerado um mero depósito de energia, sendo recentemente reconhecido como um complexo órgão endócrino que secreta uma série de substâncias denominadas coletivamente de adipocitocinas na circulação (75). Dentre essas substâncias estão o TNF- α , adiponectina (APN), IL1- β , IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, PAI-1, resistina e leptina (76). Alterações na síntese e na liberação das APNs ocorrem na obesidade e possuem papel importante no desenvolvimento da resistência à insulina (77). A resistência à insulina, diabetes, obesidade e dislipidemia são caracterizadas por baixos níveis plasmáticos de APN (78), enquanto os níveis de citocinas inflamatórias como o TNF- α aumentam (79). O aumento da síntese de citocinas inflamatórias em pessoas obesas ocorre pela infiltração e acúmulo de macrófagos inflamatórios no tecido adiposo (80). Em resposta a dietas ricas em gordura, tais macrófagos, ao contrário dos macrófagos residentes, produzem moléculas inflamatórias e induzem a inibição da produção de APN pelos adipócitos adjacentes, o que causa aumento do stress oxidativo e disfunção endotelial (81).

O stress oxidativo sistêmico também ocorre em tabagistas, sendo que o hábito de fumar tem sido relacionado com doenças sistêmicas, como a aterosclerose e a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (82). De fato, a fumaça do cigarro é composta de milhares de substâncias, muitas delas altamente oxidantes (83). Devido ao stress oxidativo, os fumantes apresentam um aumento nos níveis de oxidação do LDL (84) e outras proteínas, como fibronogênio, transferrina, plasminogênio e ceruloplasmina (85), além de

apresentarem depleção sistêmica dos antioxidantes endógenos, como a vitamina C (86). Além disso, o consumo de cigarros altera o sistema imunológico, causando uma resposta inflamatória sistêmica, com aumento do número de leucócitos no sangue, principalmente neutrófilos, indicando uma ativação do sistema hematopoiético na medula óssea (87). A resposta inflamatória sistêmica é evidenciada ainda pelo fato dos tabagistas apresentarem altas concentrações plasmáticas de PCR e fibrinogênio, proteínas de fase aguda (88). Os fumantes também possuem concentrações mais elevadas de ICAM-1 solúvel, P-selectina e E-selectina, quando comparados a voluntários saudáveis (89). A produção de citocinas inflamatórias como TNF- α e IL-6 também é alterada, havendo um aumento do estímulo inflamatório, o que culmina em disfunção endotelial (90).

Os fatores de risco para a doença aterosclerótica apresentam, portanto, mecanismos fisiopatológicos em comum, culminando na ocorrência de um estado inflamatório crônico, que gera stress oxidativo e disfunção endotelial. Tal processo é caracterizado pelo aumento dos níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias e proteínas de fase aguda, como o TNF- α , IL-6 e PCR, que estão elevados na hipertensão, na diabetes, na dislipidemia e no tabagismo.

A aterosclerose é uma doença caracterizada pela ocorrência de processo inflamatório crônico. Concentrações elevadas de PCR e de citocinas inflamatórias são encontradas em aproximadamente 50 a 75% dos pacientes apresentando SCA (7). Nakajima et al. (14) demonstraram que a PCR aumenta a susceptibilidade de células endoteliais à lise mediada pelas células T CD4⁺CD28^{null}. Portanto, estados inflamatórios crônicos podem estar associados com alterações nas células CD4⁺CD28^{null}. Diante desses dados, Raines (91) questiona se tais células, apesar de quase ausentes em pacientes com angina estável, estariam presentes em indivíduos apresentando fatores de risco para eventos agudos. Não existe na literatura dados a respeito do número e do fenótipo das células CD4⁺CD28^{null} em

peessoas portadoras de fatores de risco para aterosclerose, mas que ainda não desenvolveram a doença coronariana. Existe a possibilidade das $CD4^+CD28^{null}$ estarem associadas com os fatores de risco, contribuindo para o estado inflamatório subclínico encontrado nesses pacientes.



Objetivos

Objetivo

Avaliar o número e as características das células T CD4⁺CD28^{null} presentes no sangue periférico de pacientes com doença coronariana e indivíduos saudáveis com ou sem fatores de risco para o desenvolvimento de aterosclerose.

Estratégias

- Quantificar as células T CD4⁺CD28^{null} do sangue periférico
- Avaliar a expressão de moléculas relacionadas à citotoxicidade (perforina, granzimas A e B e granulicina) e à migração celular para sítios inflamatórios (CCR5, CCR7 e CD161) em células T CD4⁺CD28^{null} do sangue periférico *ex vivo* e após estimulação *in vitro* com LPS
- Verificar a produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e TNF- α) pelas células T CD4⁺CD28^{null} do sangue periférico *ex vivo* e após estimulação *in vitro* com anti-CD3 e ionóforo de cálcio
- Avaliar a magnitude do processo inflamatório em curso pela dosagem da PCR



Casuística e Métodos

1. Casuística

Os pacientes incluídos no estudo foram selecionados nos Ambulatórios de Isquemia e Hipertensão da Disciplina de Cardiologia e na Unidade Coronariana do Hospital das Clínicas da UNICAMP. Indivíduos saudáveis sem fatores de risco para aterosclerose constituíram o grupo controle (Grupo C). Segue abaixo a descrição dos grupos analisados.

Grupo C (grupo controle) - Indivíduos sem doença coronária e sem fatores de risco para aterosclerose

Grupo FR – Pacientes sem doença coronária aparente com fatores de risco para aterosclerose: pacientes sem história de doença coronariana, sem antecedentes familiares de primeiro grau ou com teste de isquemia negativo ou com cinecoronariografia sem lesões obstrutivas acima de 50% da luz. Os pacientes apresentaram pelo menos um fator de risco dentre os quais: hipertensão arterial sistêmica (pressão arterial > 140X90mmHg ou uso de medicação anti-hipertensiva), diabetes melitus (glicemia de jejum > 126mg/dL ou uso de medicação hipoglicemiante), dislipidemia (colesterol total > 200mg/dL ou uso de medicação hipolipimeante) ou tabagismo.

Grupo AE – pacientes com doença coronária estabelecida crônica: doença coronariana documentada através de cateterismo cardíaco com pelo menos uma artéria coronária envolvida com obstrução acima de 50% da luz, teste de isquemia positivo, história prévia documentada de síndrome isquêmica aguda (laboratorial ou eletrocardiográfica) ou

revascularização cirúrgica, sem episódios de eventos agudos ou mudança na classe funcional nos últimos 6 meses.

Grupo SCA – pacientes com síndromes coronárias agudas com ou sem supradesnível de segmento ST: história de síndrome coronária instável definida como pelo menos um episódio de angina de repouso durando mais que 20 minutos nas 24 horas anteriores com alterações dinâmicas de segmento ST ≥ 1 mm, angina com hipotensão ou edema pulmonar e/ou elevação de marcadores cardíacos.

Para os todos os grupos, os seguintes critérios de exclusão foram considerados:

- a.* Gravidez
- b.* Doença valvar significativa
- c.* Fibrilação atrial
- d.* História de cirurgia ou trauma nas últimas 4 semanas
- e.* História de doença inflamatória aguda ou uso de imunossupressores nas últimas duas semanas
- f.* História de neoplasia
- g.* Insuficiência cardíaca congestiva ou miocardiopatia dilatada avançada
- i.* Insuficiência renal

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (Parecer CEP No 665/2007, anexo 1) e

todos os indivíduos incluídos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo 2).

2. Obtenção e separação das células mononucleares do sangue periférico (CMSP)

Pacientes e controles selecionados para o estudo foram submetidos à punção venosa (30 mL) em tubos contendo heparina sódica. As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram obtidas após a separação em Ficoll-Hypaque ($d=1,077$) e lavagem com meio RPMI gelado estéril (1250 r.p.m., 10 minutos, 4° C). Após a lavagem, o sedimento de células foi ressuspensionado em meio RPMI suplementado com 10% de soro AB + L-glutamina [2mM] + gentamicina [5µg/mL] e a concentração ajustada para 2×10^6 cel/mL.

3. Citometria de fluxo

Alíquotas da suspensão de CMSP (com e sem estímulo em cultura) foram submetidas à citometria de fluxo para a detecção, quantificação e caracterização das células T CD4⁺CD28^{null}. Para tanto, as células foram centrifugadas (1250 r.p.m., 10 minutos, a 4°C) e o sobrenadante descartado, sendo então o sedimento ressuspensionado na concentração de 1×10^7 cel/mL em tampão PBS-BSA-azida sódica [2mM] (PBS-B-A). Após esse procedimento, 30 µL da suspensão de células (3×10^5 células) foram transferidos para tubos de microtitulação contendo a mistura de anticorpos para a marcação de superfície (tabela 1), assim como os controles de isotipo, diluídos em 20 µL de PBS-B-A. Os tubos foram deixados por 20 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Em seguida, os tubos foram centrifugados (1250 r.p.m., 10 minutos, temperatura ambiente), o sobrenadante descartado e 200 µL do tampão PBS-B-A foram adicionados, sendo os tubos submetidos à

nova centrifugação. Após o término da centrifugação, o sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas (vórtex) e 200 µL de formaldeído a 2% em PBS foram adicionados a cada tubo, incubando-se por 20 minutos à temperatura ambiente. Após nova centrifugação, as células foram ressuspensas e 200 µL de tampão de permeabilização (PBS – BSA [0,1%] – Saponina [0,5%]) foram adicionados, sendo os tubos, então, incubados por 10 minutos à temperatura ambiente. Após nova centrifugação, as células foram ressuspensas seguido da adição de uma mistura de anticorpos para marcação intracitoplasmática (tabela 1) diluídos em 20 µL de tampão de permeabilização. Os tubos foram então incubados à temperatura ambiente por 30 minutos, quando então se adicionou 150 µL de tampão de permeabilização, seguido de nova centrifugação. O sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas (vórtex) e 200 µL de tampão PBS-B-A foram adicionados a cada tubo. Finalmente, após nova centrifugação, as células foram ressuspensas em 250 µL de formaldeído a 2% e armazenadas nos tubos de microtitulação em geladeira por no máximo dois dias para posterior leitura em citômetro de fluxo (FACScalibur - Beckton & Dickinson) e análise com software específico (FCS Express v3.00.0320 - De Novo Software). A estratégia de análise utilizada está descrita na figura 1.

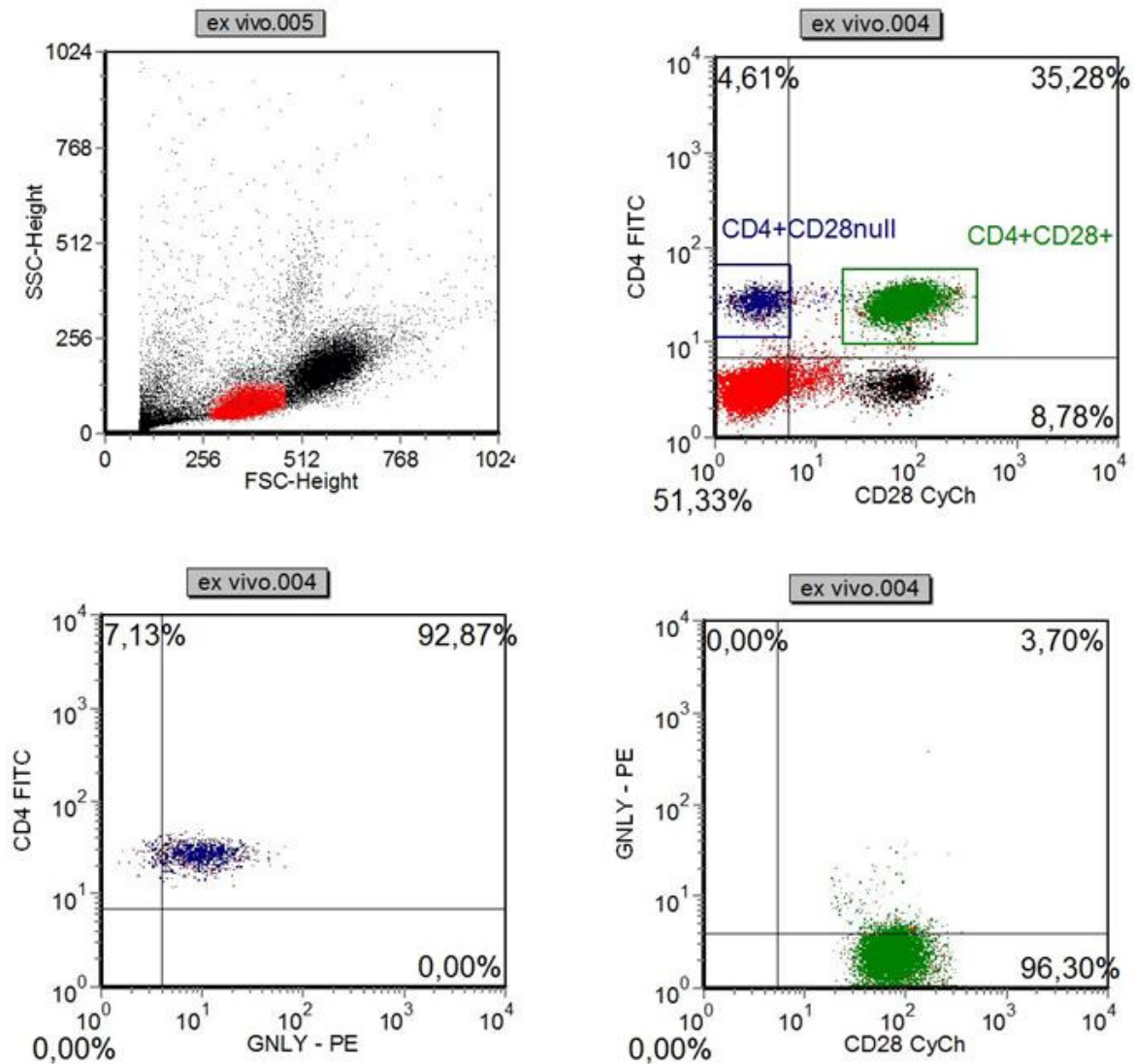


Figura 1. Estratégia utilizada para análise de marcadores específicos em células $CD4^+CD28^{null}$ e $CD4^+CD28^+$. Em um primeiro momento foi gerado um gráfico do tipo *dot-plot*, no qual a população de linfócitos foi determinada de acordo com as suas características quanto aos parâmetros de tamanho (FSC) e complexidade citoplasmática (SSC), sendo então delimitada a região R1 (linfócitos - em vermelho) (A). A partir desse gráfico foi gerado outro *dot-plot* no qual foi visualizada a marcação de células com os anticorpos anti-CD4 e anti-CD28. Nesse gráfico foram delimitadas as populações $CD4^+CD28^{null}$ (R2 - azul) e $CD4^+CD28^+$ (R3- verde) (B). Para análise final foram gerados novos gráficos a partir das combinações das regiões R1 e R2 (C) ou R1 e R3 (D), nos quais foram analisados os seguintes marcadores: granzimas A e B, perforina, granulisina, CCR5, CD161, CXCR3, CCR7, IFN- γ e TNF- α (na figura acima estão representados dados obtidos para a granulisina). Os resultados finais foram expressos em porcentagem de células positivas para cada parâmetro.

Tabela 1. Anticorpos utilizados na citometria de fluxo

Especificidade	Fluorocromo	Volume para [1x10⁷ cel/mL]	Fabricante
CD4	FITC	4uL	BD
CD4	PE	1uL	Caltag
CD28	PE-Cy5	4uL	BD
CCR5	PE	4uL	BD
CD161	PE	4uL	BD
CXCR3	PE	4uL	BD
CCR7	PE	4uL	BD
Granzima A	FITC	4uL	BD
Granzima B	FITC	4uL	BD
Perforina	FITC	4uL	BD
Granulisina	PE	4uL	e-Bioscience
IFN- γ	FITC	0,2 uL	BD
TNF- α	PE	2uL	BD

4. Estimulação de CMSP em cultura

4.1. Estimulação com anti-CD3 e ionóforo de cálcio

Alíquotas de CMSP [2×10^6 células/mL] foram transferidas para placas de cultura de 24 cavidades (1 mL/poço), sendo adicionado anticorpo estimulatório anti-CD3 [$1\mu\text{g/mL}$] e ionóforo de cálcio [250 ng/mL] ou somente meio (controle). Foi adicionado $1\mu\text{g/mL}$ de Brefeldina A (Sigma, St. Louis, USA) em cada cavidade. As placas foram incubadas a 37°C em estufa de CO_2 a 5% por 6 horas. Após o período de incubação, as células foram coletadas por meio da lavagem das cavidades com 2 mL de azida sódica [2mM] e transferidas para um tubo do tipo FALCON de 15 mL, sendo, então, preparadas para utilização na citometria de fluxo.

4.2. Estimulação com lipopolissacarídeo (LPS)

Alíquotas de CMSP [$2 \times 10^6\text{mL}$] foram transferidas para placas de cultura de 24 cavidades (1mL/poço), onde foi adicionado LPS de *E.coli* O127:B8 [$10\mu\text{g/mL}$] ou somente meio (controle). As placas foram incubadas a 37°C em estufa de CO_2 a 5% por 48 horas. Após o período de incubação, as células foram coletadas por meio da lavagem das cavidades com 2 mL de tampão PBS-azida sódica (2mM) e transferidas para um tubo do tipo FALCON de 15 mL, sendo, então, preparadas para utilização na citometria de fluxo.

5. Determinação da concentração plasmática da proteína C reativa

O plasma para dosagem da PCR foi obtido durante o processo de separação em Ficoll-Hypaque. As amostras obtidas foram transferidas para tubos do tipo EPPENDORF e armazenadas a -80°C até o momento do uso.

Antes do início do procedimento as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e centrifugadas para eliminar a lipemia. A dosagem da PCR plasmática foi realizada pela técnica de imunonefelometria no nefelômetro BN II (Dade Behring), utilizando o kit N Reagente PCR High Sensitivity (Dade Behring), constituído por partículas de poliestireno revestidas com anticorpo monoclonal de rato contra PCR humana. A técnica de nefelometria baseia-se na dispersão da luz ao interagir com complexos antígeno-anticorpo. Dessa maneira, as amostras são colocadas em cuvetas contendo as partículas revestidas com anti-PCR humana e os anticorpos interagem com a PCR presente no plasma, ocorrendo a formação de imunocomplexos. Um feixe de luz, então, é dirigido para a cuveta. Ao encontrar os imunocomplexos, a luz é desviada, sendo dispersa. A intensidade de luz dispersa é proporcional a quantidade de imunocomplexos presentes na cuveta, sendo possível, então, obter a concentração de antígeno (no caso, a PCR) através da utilização de uma curva de referência criada a partir de um padrão com concentrações conhecidas do antígeno e o sinal de luz disperso por cada uma dessas concentrações.

6. Análise estatística

Os resultados foram analisados com o software GraphPad Prism (Jandel Corporation). Para comparação dos diferentes parâmetros entre as células CD4⁺CD28^{null} e CD4⁺CD28⁺ foi utilizado o teste não paramétrico, não pareado de Mann Whitney. Para

comparar os diferentes parâmetros entre os 4 grupos incluídos no estudo foi utilizado o teste não paramétrico, não pareado de Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn. Para comparar os parâmetros *ex vivo* e após estimulação com LPS nas diferentes populações de células CD4, foi utilizado o teste não paramétrico pareado de Wilcoxon. Correlações entre parâmetros foram avaliadas pelo teste não paramétrico de Spearman. Para comparação dos diferentes grupos quanto aos fatores de risco, medicamentos em uso e a proporção de homens e mulheres foi utilizado o teste do χ^2 . O nível de significância foi definido como $p < 0,05$.



Resultados

1. Caracterização dos grupos

Os parâmetros clínicos, demográficos e laboratoriais dos indivíduos incluídos no estudo estão descritos na **tabela 2**.

O grupo controle foi constituído de 16 indivíduos, principalmente homens, sem os fatores de risco clássicos para a doença aterosclerótica, a saber: hipertensão, dislipidemia, diabetes e tabagismo. Os controles também não poderiam ter qualquer tipo de doença cardíaca ou processo inflamatório em curso ou recente (menos de dois meses) e nem tampouco estar fazendo uso de medicamentos anti-inflamatórios. É importante ressaltar que os controles possuíam média de idade ($58 \pm 5,2$ anos) similar aos pacientes dos grupos FR, AE e SCA, já que tal fator tem influência nas células $CD4^+CD28^{\text{null}}$. Assim como os indivíduos dos outros grupos, os controles apresentaram os resultados dos testes bioquímicos dentro dos valores de referência e níveis pressóricos dentro da normalidade.

Tabela 2. Parâmetros clínicos, demográficos e laboratoriais dos indivíduos controle (grupo C), indivíduos portadores de fatores de risco para aterosclerose (grupo FR), pacientes com angina estável (grupo AE) e pacientes com síndromes coronarianas agudas (grupo SCA)

	C	FR	AE	SCA	p
Número de pacientes	16	22	30	20	-
Idade (média ± DP)	58 ± 5,2	57,8 ± 7	61,6 ± 7,1	62,1 ± 12,6	0,1
Sexo (H/M)	10/6	8/14	25/5	12/8	<0,01
Pressão arterial (média ± DP)					
Pressão sistólica (mmHg)	120 ± 10	145 ± 14	133,8 ± 20,6	130 ± 10	0,1
Pressão distólica (mmHg)	80 ± 9	86,7 ± 6,8	81,1 ± 13,9	80 ± 14	0,2
Fatores de risco (%)					
Histórico familiar de doença cardíaca isquêmica	-	5	14	7	0,6
Diabetes	-	22	31	20	0,3
Dislipidemia	-	78	61	69	0,1
Hipertensão	-	78	89	73	0,6
Tabagismo	-	11	7	25	0,2
Medicamentos prévios (%)					
β-bloqueador	-	38	76	50	0,3
AAS	-	44	92	45	0,1
IECA	-	67	88	29	0,06
Nitrato oral	-	5	7	5	0,2

Bloqueador de canal de cálcio	-	33	31	13	0,1
Estatinas	-	56	75	40	0,1
Diuréticos	-	56	52	20	0,2
Parâmetros bioquímicos (média ± DP)					
ALT (U/L)	-	25,8 ± 19	24,1 ± 11,15	29,6 ± 18	0,7
AST (U/L)	-	21,6 ± 7,2	22,7 ± 6,2	24,8 ± 9,6	0,9
CR (mg/dL)	-	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,1 ± 0,4	<0,01
COL total (mg/dL)	172,3 ± 22,6	188,8 ± 57,4	167 ± 40,6	177,9 ± 55,2	0,5
HDL-colesterol (mg/dL)	53,7 ± 12,3	50,8 ± 15,7	45,5 ± 12,5	43,6 ± 11,4	0,3
LDL-colesterol (mg/dL)	100,9 ± 15	104,7 ± 54,3	90,7 ± 37,6	102,5 ± 27,8	0,6
TRIG (mg/dL)	145,6 ± 40,2	152,4 ± 37,3	149,0 ± 60,4	133,6 ± 56,5	0,1
K (mEq/L)	-	4,5 ± 0,6	4,5 ± 0,4	4,1 ± 0,5	0,06
Na (mEq/L)	-	140,7 ± 1,5	143,7 ± 9,2	138,1 ± 2,7	<0,01
GLI (mg/dL)	98,7 ± 11,9	104,3 ± 18,1	120,2 ± 52,7	97,1 ± 20,3	0,2
U (mg/dL)	-	35,8 ± 10,4	37,9 ± 9,5	43,7 ± 22,3	0,7

ALT- aspartato aminotransferase; **AST-** alanina aminotransferase; **CR-** creatinina; **COL total-** colesterol total; **HDL-** lipoproteína de alta densidade; **LDL-** lipoproteína de baixa densidade; **TRIG-** triglicérides; **K-** potássio; **Na-** sódio; **GLI-** glicose; **U-** uréia; **AAS-** ácido acetilsalicílico (aspirina); **IECA-** inibidores da enzima conversora da angiotensina; **DP-** desvio padrão; **H-**homem, **M-**mulher

Ao observar a **tabela 2** pode-se constatar média de idade similar entre os grupos de pacientes. Entretanto, nota-se que os grupos diferem entre si no que diz respeito à distribuição de gênero. Nesse sentido, o grupo FR é formado por um número muito maior de mulheres do que de homens, enquanto que no grupo AE os homens constituem a grande maioria. O grupo SCA é o mais homogêneo em relação à distribuição de gênero, com um leve predomínio de homens. Já com relação aos fatores de risco para aterosclerose, os grupos FR, AE e SCA são bastante similares, sendo a hipertensão o fator de risco mais prevalente. A hipertensão aparece acompanhada de dislipidemia ou diabetes na grande maioria dos pacientes, sendo que apenas alguns pacientes apresentam tabagismo ou história familiar para doença coronariana obstrutiva. Nesse sentido, a dislipidemia é o segundo fator de risco mais prevalente, enquanto a diabetes é o terceiro. Também se observa **na tabela 2** que os grupos de pacientes apresentam muita similaridade nos exames bioquímicos, com níveis de colesterol, glicose e pressão arterial dentro da normalidade ou próximos da meta preconizada para tais grupos. Não houve diferença significativa quanto à medicação em uso nesses 3 grupos, mas pode-se notar uma maior frequência de indivíduos em uso de estatinas e AAS no grupo AE.

Analisados em conjunto, os dados da **tabela 2** mostram que os indivíduos dos diferentes grupos estavam devidamente controlados quanto a fatores de risco como diabetes, dislipidemia e hipertensão arterial sistêmica. Portanto, pudemos constatar que a única diferença significativa entre os pacientes (grupos AE e SCA) e os outros grupos (C e FR) era a presença de doença aterosclerótica, já que os parâmetros bioquímicos e a maioria dos parâmetros demográficos (com exceção da distribuição de gênero) eram similares.

2. Análises *ex vivo*

2.1 Porcentagem de células $CD4^+CD28^{null}$ e $CD4^+CD28^+$ em relação aos linfócitos totais do sangue periférico

O primeiro parâmetro analisado nas amostras *ex-vivo* foi a porcentagem de células $CD4^+CD28^{null}$ e $CD4^+CD28^+$ na população de linfócitos totais do sangue periférico. Não houve diferença significativa entre os indivíduos dos grupos FR, AE, SCA e C na porcentagem de células $CD4^+CD28^{null}$ (**fig. 2**). Entretanto, tendo o grupo controle como referência, observou-se uma diminuição gradativa da porcentagem de células $CD4^+CD28^+$ nos linfócitos totais dos grupos FR e AE, sendo a menor porcentagem encontrada nos indivíduos com angina estável. Nesse sentido, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos AE e C. A porcentagem de células $CD4^+CD28^+$ nos linfócitos totais do sangue periférico é maior no grupo SCA, sendo semelhante ao valor encontrado nos controles.

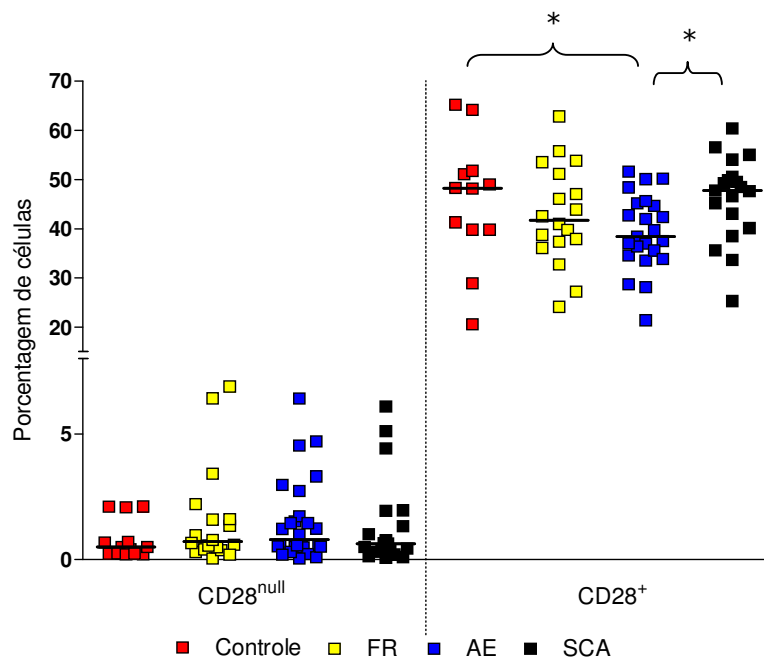


Figura 2. Porcentagem de células $CD4^+CD28^{\text{null}}$ e $CD4^+CD28^+$ em relação aos linfócitos totais em amostras de CMSP *ex vivo*. As amostras avaliadas foram coletadas de indivíduos controle (grupo C), pacientes com fatores de risco para aterosclerose (grupo FR), pacientes com angina estável (grupo AE) e pacientes com síndromes coronarianas agudas (grupo SCA). As barras horizontais representam a mediana. * $p < 0,05$ (Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn)

2.2. Expressão de grânulos citotóxicos, receptores de *homing* e citocinas inflamatórias por células $CD4^+CD28^{\text{null}}$ e $CD4^+CD28^+$

A população de linfócitos T $CD4^+$ também foi analisada quanto à expressão de grânulos citotóxicos, receptores de *homing* e citocinas inflamatórias *ex vivo*. Os resultados referentes aos controles estão na **figura 3**. Observa-se que, tomando como base a expressão da molécula CD28, a população $CD4^+$ apresentou-se heterogênea, sendo que a porcentagem de células positivas para perforina e granzimas A e B era muito maior na população $CD28^{\text{null}}$ do que na população $CD28^+$, demonstrando que a

expressão de grânulos citotóxicos se dá quase que exclusivamente nas células CD28^{null}. Além disso, destaca-se a detecção de granulicina nas células CD4⁺CD28^{null}, fato ainda não relatado na literatura.

As populações CD28^{null} e CD28⁺ também diferem com relação à expressão de receptores de quimiocinas e moléculas de *homing* (**fig 3**), sendo que existe uma maior porcentagem de células positivas para CD161 (apesar da diferença não ser significativa) e CCR5 na população CD28^{null}. Tais moléculas são importantes para o endereçamento e migração das células para a lesão aterosclerótica. Já com relação à expressão de CXCR3 e CCR7, os controles apresentaram menor positividade para tais receptores na população CD28^{null}, sendo que eles são mais expressos na população CD28⁺. O CXCR3 e o CCR7 também são receptores importantes na migração dos linfócitos CD4⁺, sendo o CXCR3 envolvido na migração para as placas ateroscleróticas e o CCR7 envolvido no direcionamento das células para os linfonodos.

Com relação à expressão da citocina inflamatória IFN- γ , nota-se que as células CD4⁺CD28^{null} possuem uma maior positividade para a citocina do que as células CD4⁺CD28⁺, tendo portanto, maior capacidade inflamatória. Entretanto, a expressão de IFN- γ nas populações de células CD4⁺ *ex vivo* é muito pequena, sendo que a população de células CD28^{null}, mesmo apresentando maior positividade para IFN- γ em relação à população CD28⁺, não apresenta uma grande expressão dessa citocina. Também se comparou as duas populações (CD28^{null} e CD28⁺) com relação à positividade para TNF- α . Entretanto, a expressão da citocina nas células *ex vivo* também é muito pequena (menor até que a expressão de IFN- γ) e não foram encontradas diferenças entre as duas populações (dados não mostrados).

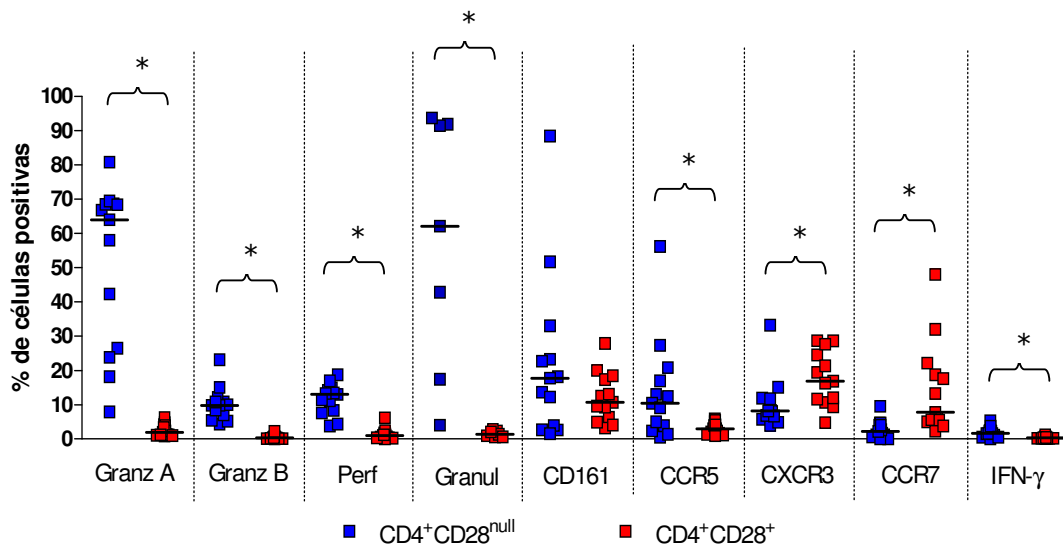


Figura 3. Porcentagem de células positivas para os marcadores indicados nas populações de linfócitos CD4⁺ em amostras de CMSP *ex vivo* coletadas de indivíduos controle (**grupo C**). As barras horizontais representam a mediana. * p<0,05 (Mann Whitney)

Os pacientes do grupo FR, por sua vez, apresentaram o mesmo padrão do grupo controle com relação ao fenótipo das células CD4⁺CD28^{null} e CD4⁺CD28⁺ *ex vivo* (**fig. 4**). Nesse sentido, há maior número de células positivas para os grânulos citotóxicos (perforina, granzimas A e B e granulisina) no *pool* de células CD4⁺CD28^{null} do que no *pool* de células CD4⁺CD28⁺. Também há maior positividade para IFN-γ e CD161 (apesar da diferença não ser significativa) e menor positividade para CXCR3 e CCR7 nas células CD4⁺CD28^{null} do que nas células CD4⁺CD28⁺. Novamente, não houve diferença na expressão de TNF-α entre as duas populações analisadas (dados não mostrados). Diferentemente dos outros grupos, entretanto, não houve diferença na positividade para CCR5 entre as células CD28^{null} e CD28⁺.

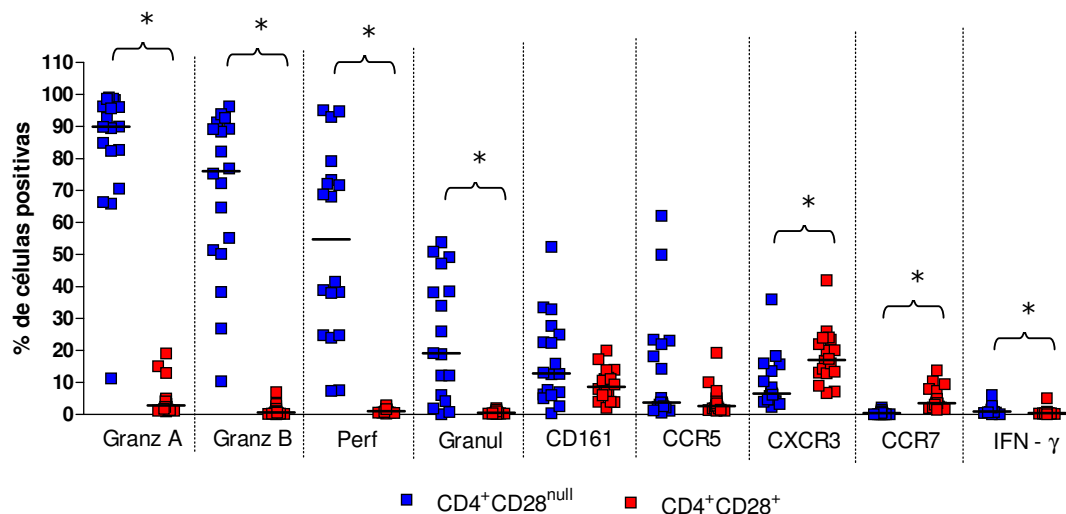


Figura 4. Porcentagem de células positivas para os marcadores indicados nas populações de linfócitos CD4⁺ em amostras de CMSP *ex vivo* coletadas de indivíduos com fator de risco para aterosclerose (**grupo FR**). As barras horizontais representam a mediana. *p<0,05 (Mann Whitney)

Com relação ao fenótipo das células CD4⁺, os pacientes com doença aterosclerótica (AE e SCA) apresentaram um perfil muito similar aos indivíduos dos grupos FR e C. Nesse sentido, os pacientes AE apresentaram altos níveis de grânulos citotóxicos nas células CD4⁺, sendo que a porcentagem de células positivas para perforina e granzimas A e B era maior na população CD28^{null} do que na população CD28⁺ (**fig. 5**). Também detectamos a presença de granulisina nas células CD4⁺CD28^{null}, fato que, até onde temos conhecimento, ainda não foi descrito nessa população em pacientes com angina estável. De maneira análoga aos outros grânulos citotóxicos, a granulisina praticamente não é expressa nas células CD4⁺CD28⁺.

Além dos grânulos citotóxicos, há diferenças entre as populações de células CD4 em relação a moléculas envolvidas no tráfego das mesmas pelo organismo (*homing*). Há uma maior porcentagem de células positivas para CD161 (apesar da diferença não ser significativa) e CCR5 na população CD28^{null} do que na população CD28⁺ (**fig. 5**). Tais moléculas podem ser importantes para o endereçamento dessas células para a lesão

aterosclerótica nesses pacientes. Por sua vez, o CXCR3 está mais presente nas células CD28⁺, mais também é muito frequente nas células CD28^{null}.

Quanto à expressão de IFN- γ verificamos que as células CD28^{null} apresentaram uma maior positividade para tal marcador quando comparadas às células CD28⁺ (**fig. 5**). Entretanto, similarmente ao que ocorreu nos grupos sem doença aterosclerótica (C e FR), apenas uma pequena proporção das células CD28^{null} foi positiva. De maneira similar aos grupos FR e C, também não houve diferença na positividade para TNF- α nas duas populações de células CD4⁺ (CD28^{null} e CD28⁺) *ex vivo* (dados não mostrados).

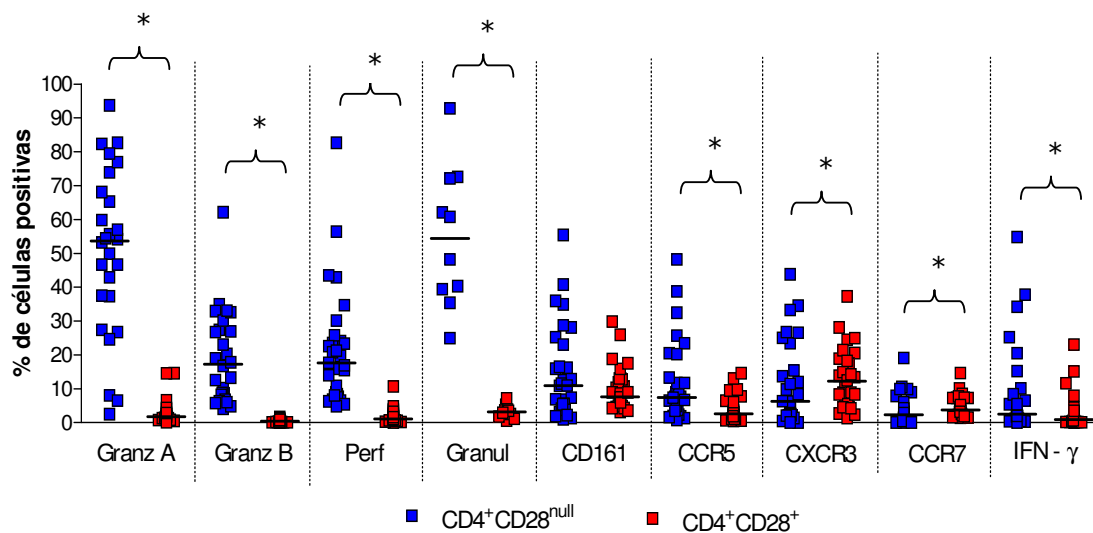


Figura 5. Porcentagem de células positivas para os marcadores indicados nas populações de linfócitos CD4⁺ em amostras de CMSP *ex-vivo* coletadas de pacientes do **grupo AE**. As barras horizontais representam a mediana. *p<0,05 (Mann Whitney)

Os pacientes com síndromes coronarianas agudas (grupo SCA) apresentaram um padrão parecido com o perfil visto no grupo AE (**fig. 6**). Nesse sentido, há maior positividade para os grânulos citotóxicos na população de células CD4⁺CD28^{null} do que na população CD4⁺CD28⁺. Com relação às moléculas de *homing*, há diferença significativa quanto à positividade para o CCR5 entre as células CD4⁺CD28^{null} e

CD4⁺CD28⁺, mas não há diferença estatisticamente significativa entre as duas populações com relação à expressão de CD161, apesar da mediana ser maior para a população CD4⁺CD28^{null}. Como o CCR5 e o CD161 são os principais responsáveis pelo endereçamento das células CD4⁺CD28^{null} para as placas ateromatosas, as células CD4⁺CD28^{null} seriam sequestradas nos vasos. Já com o CCR7, o padrão observado no grupo AE se repete, com maior positividade para esses marcadores na população CD4⁺CD28⁺. Entretanto, as medianas para os CXCR3 nas duas populações ficam praticamente iguais, indicando que tal receptor pode ser importante no mecanismo de *homing* tanto das células CD28^{null} quanto das células CD28⁺. Também há de se ressaltar que existe diferença significativa na positividade para IFN- γ entre as duas populações, sendo que a população CD4⁺CD28^{null} apresenta maior positividade para a citocina do que a população CD4⁺CD28⁺. Novamente, não houve diferença na expressão de TNF- α entre os dois tipos celulares analisados *ex vivo* (dados não mostrados).

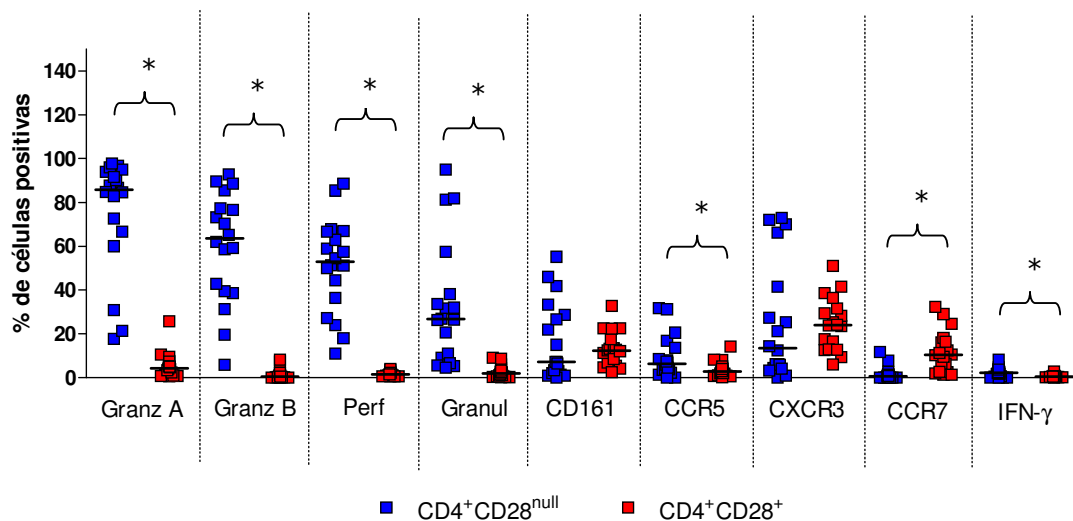


Figura 6. Porcentagem de células positivas para os marcadores indicados nas populações de linfócitos CD4⁺ em amostras de CMSP *ex-vivo* coletadas de pacientes do **grupo SCA**. As barras horizontais representam a mediana. *p<0,05 (Mann Whitney)

Diante do que foi exposto acima, nota-se que o padrão de expressão de grânulos citotóxicos em células CD4⁺ (CD28^{null} e CD28⁺) *ex vivo* é muito semelhante em todos os grupos. Dessa maneira, as células CD4⁺CD28^{null} apresentam grande expressão de granzimas A e B, perforina e granulina, enquanto as células CD4⁺CD28⁺ praticamente não expressam tais moléculas. Com relação aos receptores relacionados com o *homing*, as células CD28^{null} apresentam maior expressão de CCR5 e CD161 do que as células CD28⁺ (exceto no grupo FR, onde a expressão do CCR5 é igual nas duas populações celulares), enquanto o CCR7 e o CXCR3 são mais expressos na população CD28⁺ (exceto no grupo SCA, onde a positividade para o CXCR3 é igual nas duas populações de células CD4⁺). Quanto à expressão de citocinas inflamatórias *ex vivo*, nota-se que a positividade para IFN- γ e TNF- α (dado não mostrado) em células CD4⁺CD28^{null} e CD4⁺CD28⁺ é muito pequena, mas que as células CD28^{null} apresentam maior positividade para IFN- γ do que as células CD28⁺.

2.3. Comparação da expressão de grânulos citotóxicos por células CD4⁺CD28^{null} e CD4⁺CD28⁺ nos diferentes grupos

Além da comparação das diferentes populações de células CD4⁺ *ex-vivo* dentro de cada grupo, foi feita a comparação entre os grupos. Nesse sentido, foram observadas diferenças significativas entre as células CD28^{null} de indivíduos dos grupo C (controles), FR (indivíduos com fatores de risco para aterosclerose), AE (pacientes com doença coronariana crônica) e SCA (pacientes com síndromes coronarianas agudas) quanto à positividade para os grânulos citotóxicos (**fig. 7**). Os indivíduos dos grupos FR e SCA apresentaram maior positividade para perforina, granzima A e granzima B nas células CD4⁺CD28^{null} em relação aos controles e os pacientes AE. Os pacientes AE, por sua

vez, apresentam uma mediana maior para perforina e granzima B e menor para a granzima A em relação aos indivíduos controle (apesar das diferenças não serem significativas). A granulicina, por sua vez, possui um padrão de expressão diferente dos outros grânulos, sendo mais expressa em controles em nos pacientes AE.

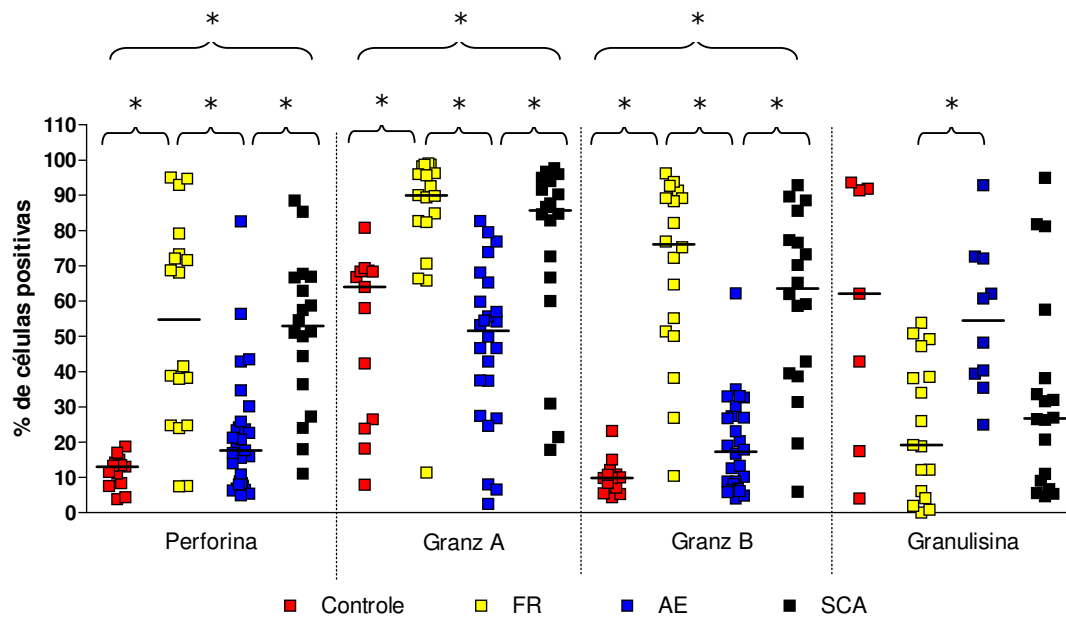


Figura 7. Porcentagem de células positivas para os grânulos citotóxicos indicados na população $CD4^+CD28^{\text{null}}$ em amostras de CMSP *ex-vivo*. As amostras avaliadas foram coletadas de indivíduos controle (grupo C), indivíduos com fatores de risco para aterosclerose (grupo FR), pacientes com angina estável (grupo AE) e pacientes com síndromes coronarianas agudas (grupo SCA). As barras horizontais representam a mediana. * $p < 0,05$ (Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn)

Com relação às células $CD4^+CD28^+$, os controles, os indivíduos com fatores de risco para aterosclerose, os pacientes AE e os pacientes SCA não apresentaram diferenças importantes quanto à positividade para os grânulos citotóxicos (**fig. 8**). Nesse sentido, observa-se que as células $CD4^+CD28^+$ de indivíduos dos grupos FR e SCA apresentam positividade levemente maior para as granzimas A e B, sendo que as células de indivíduos dos grupos C e AE apresentam medianas similares. Entretanto, a expressão das granzimas A e B nas células $CD4^+CD28^+$ de indivíduos do grupo C e SCA é muito pequena, sendo que tais células não devem ter poder citotóxico significativo. Há diferença significativa na expressão de granulina pelas células $CD4^+CD28^+$ dos diferentes grupos, sendo que a positividade nas células de indivíduos dos grupos SCA e AE é maior do que nas células de pessoas com fatores de risco para aterosclerose e controles (apesar da diferença para os controles não ser significativa). Assim como ocorre com os outros grânulos, a expressão de granulinsina é muito baixa nas células $CD4^+CD28^+$, embora significativamente maior nos pacientes do que nos grupos C e FR.

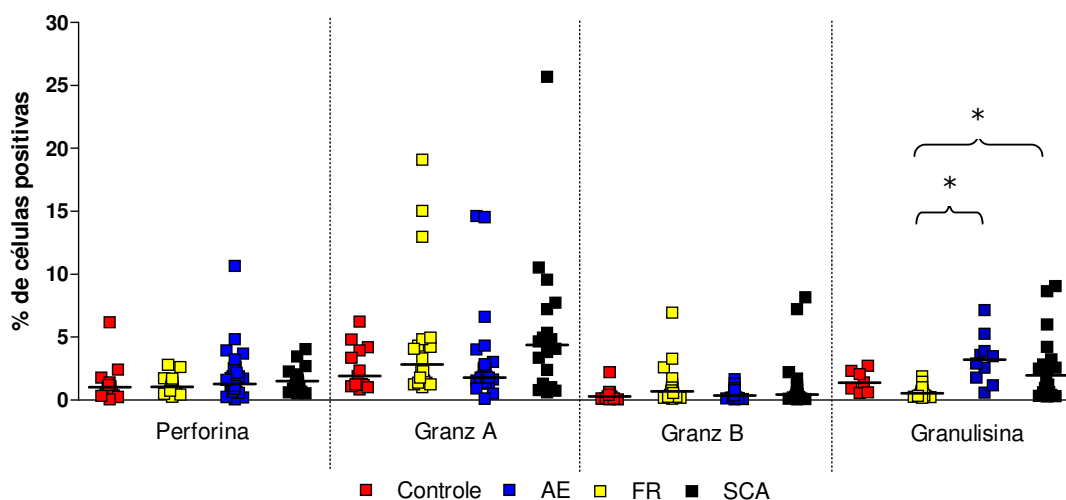


Figura 8. Porcentagem de células positivas para os grânulos citotóxicos indicados na população $CD4^+CD28^+$ em amostras de CMSP *ex vivo*. As amostras analisadas foram coletadas de indivíduos controle (grupo C), indivíduos com fatores de risco para aterosclerose (grupo FR), pacientes com angina estável (grupo AE) e pacientes com síndromes coronarianas agudas (grupo SCA). As barras horizontais representam a mediana. * $p < 0,05$ (Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn)

2.4. Comparação da expressão de receptores de *homing* e $IFN-\gamma$ por células $CD4^+CD28^{null}$ e $CD4^+CD28^+$ nos diferentes grupos

Com relação às moléculas de *homing*, também foram observadas diferenças entre as células $CD4^+CD28^{null}$ dos diferentes grupos (**fig. 9**). A maior parte das diferenças não foi significativa, mas poderia se tornar significativa com o aumento do número de indivíduos do grupo C. As células dos controles apresentaram a maior positividade para o CCR5, enquanto que as células $CD4^+CD28^{null}$ dos indivíduos com fatores de risco para aterosclerose tiveram a menor expressão do receptor. A positividade para o CCR5 nas células $CD4^+CD28^{null}$ de indivíduos dos grupos AE e SCA foi similar, não havendo diferença entre os grupos. Já o CD161 é menos frequente nas células de pacientes SCA, sendo mais presente em células de indivíduos com fatores

de risco para aterosclerose e pacientes AE e alcançando maior expressão nos controles. O CCR7, por sua vez, tem menor positividade nas células de indivíduos do grupo FR e nos pacientes SCA, sendo mais expresso nas células de pacientes AE e controles.

Com relação a expressão de IFN- γ *ex vivo* (**fig. 9**), foram detectadas apenas diferenças significativas entre as células CD4⁺CD28^{null} dos grupos FR e AE, sendo a mediana maior nos pacientes AE e menor nos indivíduos com fatores de risco para aterosclerose.

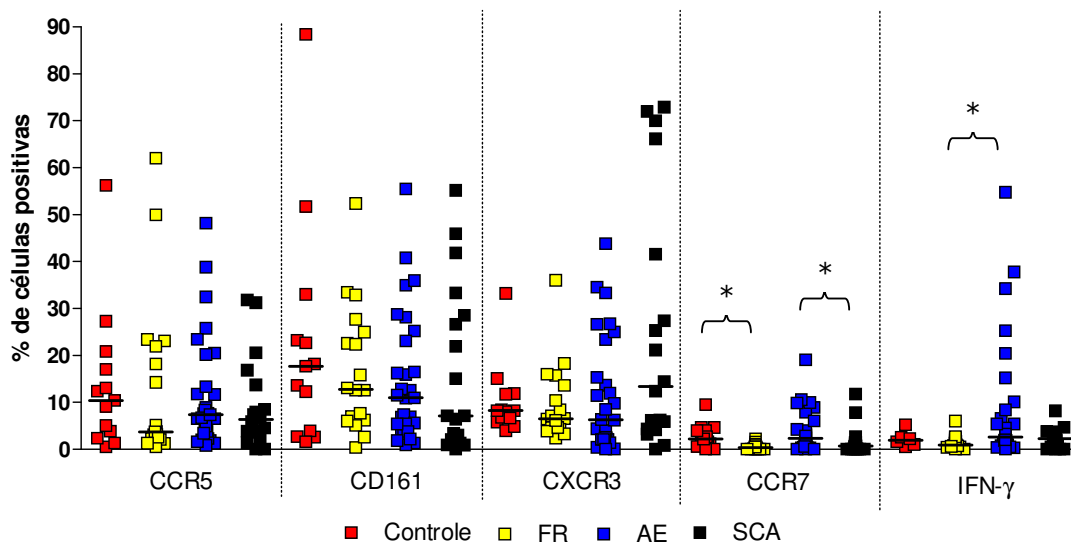


Figura 9. Porcentagem de células positivas para os receptores celulares indicados e IFN- γ na população CD4⁺CD28^{null} em amostras de CMSP *ex-vivo*. As amostras avaliadas foram coletadas de indivíduos controle (grupo C), indivíduos com fatores de risco para aterosclerose (grupo FR), pacientes com angina estável (grupo AE) e pacientes com síndromes coronarianas agudas (grupo SCA). As barras horizontais representam a mediana. * $p < 0,05$ (Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn)

Não houve diferença entre os grupos quanto à positividade para CCR5 nas células CD4⁺CD28⁺ (**fig. 10**). Entretanto, as células dos pacientes AE e dos indivíduos portadores de fatores de risco para aterosclerose apresentaram menor positividade para o CD161 em relação às células dos pacientes SCA e dos controles. Já o CXCR3 é mais

frequente nas células $CD4^+CD28^+$ de pacientes SCA, enquanto que a menor positividade para tal marcador é encontrado nas células de pacientes AE. Os grupos FR e C, por sua vez, apresentam expressão intermediária de CXCR3, sendo a positividade para esse marcador bastante similar entre os dois grupos. O CCR7 possui positividade similar nas células $CD4^+CD28^+$ de pacientes AE e indivíduos com fatores de risco para aterosclerose, mas é mais frequente nas células de indivíduos controles e de pacientes com síndromes coronarianas agudas.

Com relação à expressão de $IFN-\gamma$ *ex vivo* (**fig. 10**), foram encontradas diferenças significativas apenas entre as células $CD4^+CD28^+$ de pacientes AE e controles, sendo a mediana maior nos pacientes AE e menor nos controles.

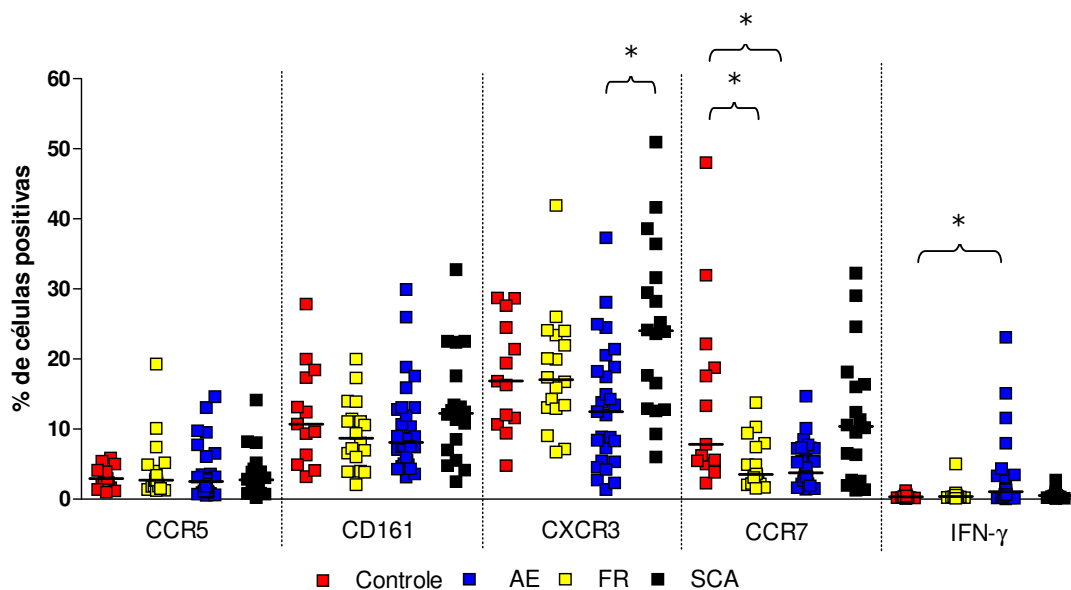


Figura 10. Porcentagem de células positivas para os receptores celulares indicados e $IFN-\gamma$ população $CD4^+CD28^+$ em amostras de CMSP *ex vivo*. As amostras avaliadas foram coletadas de indivíduos controle (grupo C), indivíduos com fatores de risco para aterosclerose (grupo FR), pacientes com angina estável (grupo AE) e pacientes com síndromes coronarianas agudas (grupo SCA). As barras horizontais representam a mediana. * $p < 0,05$ (Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn).

As diferenças observadas na positividade para grânulos citotóxicos entre células $CD4^+CD28^{null}$ dos indivíduos com fatores de risco para doença coronariana (grupo FR) e indivíduos controle (grupo C) indicam que os fatores de risco mais prevalentes para doença aterosclerótica, como dislipidemia, diabetes e hipertensão, já são suficientes para causar alterações nas células $CD4^+CD28^{null}$, tornando-as mais citotóxicas e adesivas. Nesse sentido, foram feitas correlações para determinar se a positividade para os diversos marcadores analisados nos grupos FR, AE e SCA estava diretamente relacionada com os perfis lipídico e glicêmico e os níveis de pressão arterial dos indivíduos dos respectivos grupos.

2.5. Correlação entre parâmetros bioquímicos e expressão de grânulos citotóxicos, receptores de *homing* e IFN- γ em células $CD4^+CD28^{null}$

Não foram encontradas correlações entre a positividade para os marcadores analisados e os parâmetros bioquímicos dos indivíduos do grupo FR e pacientes do grupo SCA (dados não mostrados). Entretanto, com relação aos indivíduos do grupo AE, constatamos que existe uma correlação diretamente proporcional entre a porcentagem de células $CD4^+CD28^{null}$ positivas para granzima B e CD161 e os níveis séricos de colesterol total (**figs. 11 e 12**) e LDL colesterol (**figs 13 e 14**). Além disso, detectou-se uma correlação inversa entre a porcentagem de células positivas para CXCR3 e granzima B no *pool* de células $CD4^+CD28^{null}$ desses pacientes e os níveis de pressão sistólica (**figs. 15 e 16**), assim como entre a frequência de células $CD4^+CD28^{null}$ CXCR3⁺ e os níveis de pressão diastólica (**fig. 17**).

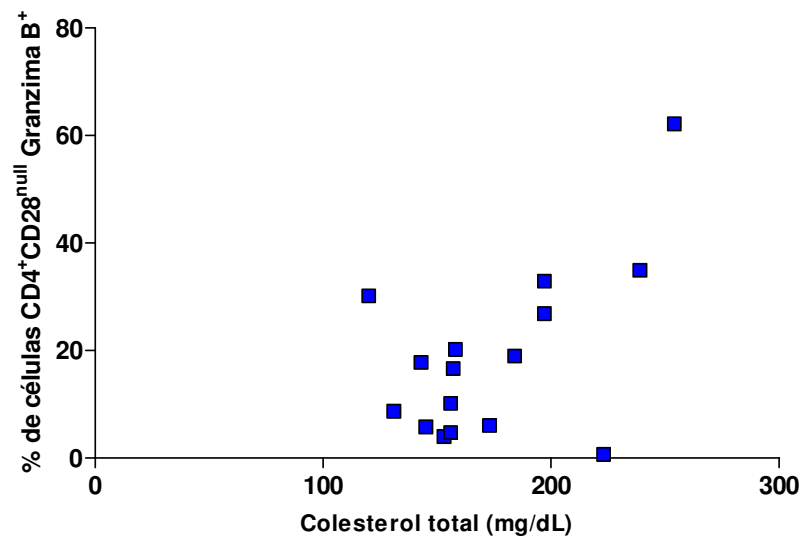


Figura 11. Correlação entre a concentração sérica de colesterol total e a porcentagem de células de células CD4⁺CD28^{null} granzima B⁺ em pacientes AE (grupo AE). $r = 0,55$; $p = 0,02$ (Spearman)

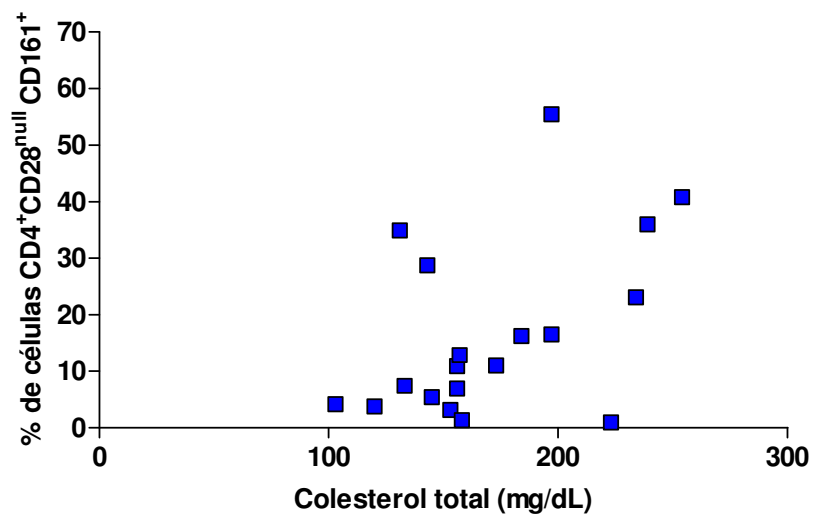


Figura 12. Correlação entre a concentração sérica de colesterol total e a porcentagem de células CD4⁺CD28^{null} CD161⁺ em pacientes AE (grupo AE). $r = 0,47$; $p = 0,03$ (Spearman)

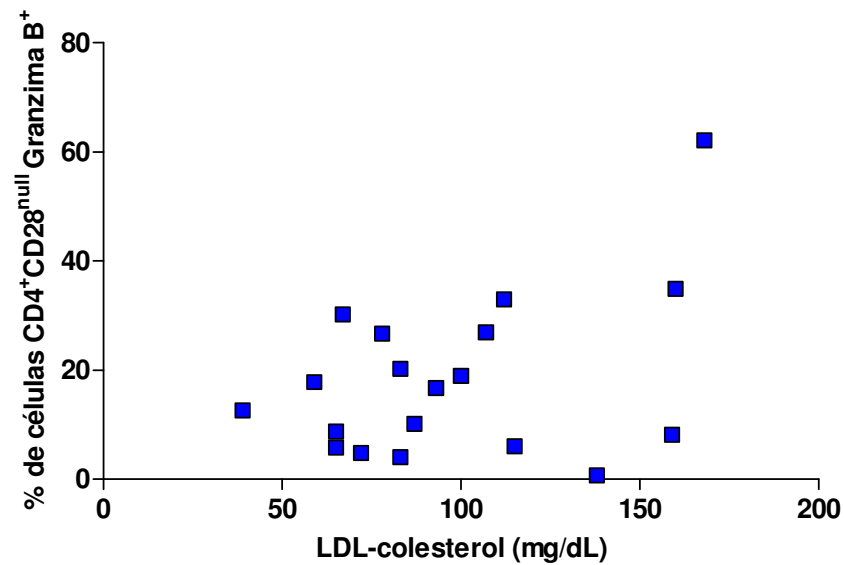


Figura 13. Correlação entre a concentração sérica de LDL-colesterol e a porcentagem de células CD4⁺CD28^{null} granzima B⁺ em pacientes AE (grupo AE). $r = 0,45$; $p = 0,04$ (Spearman)

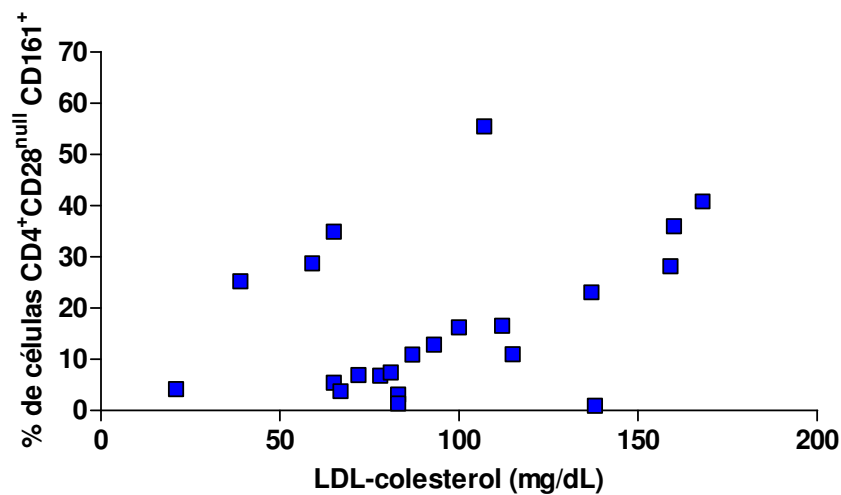


Figura 14. Correlação entre a concentração sérica de LDL-colesterol e a porcentagem de células CD4⁺CD28^{null} CD161⁺ em pacientes AE (grupo AE). $r = 0,41$; $p = 0,04$ (Spearman)

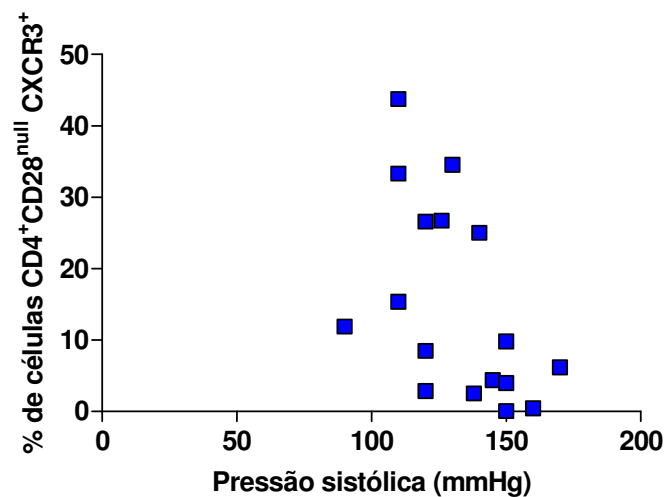


Figura 15. Correlação entre os níveis de pressão sistólica e a porcentagem de células CD4⁺CD28^{null} CXCR3⁺ em pacientes AE (grupo AE). $r = -0,58$; $p = 0,01$ (Spearman)

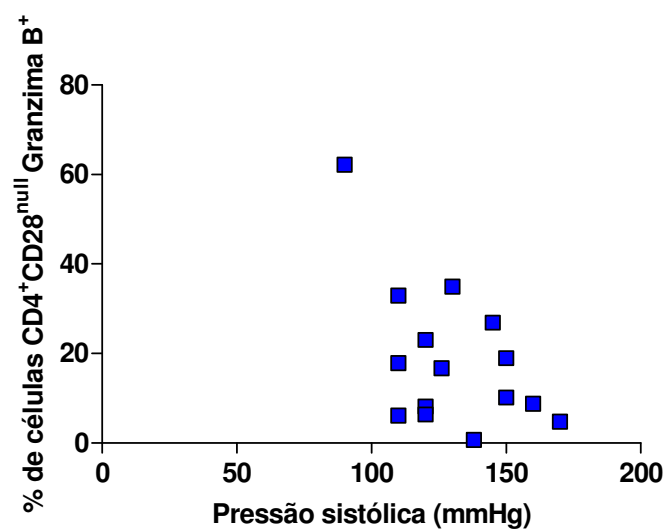


Figura 16. Correlação entre os níveis de pressão sistólica e a porcentagem de células CD4⁺CD28^{null} granzima B⁺ em pacientes AE (grupo AE). $r = -0,53$; $p = 0,04$ (Spearman)

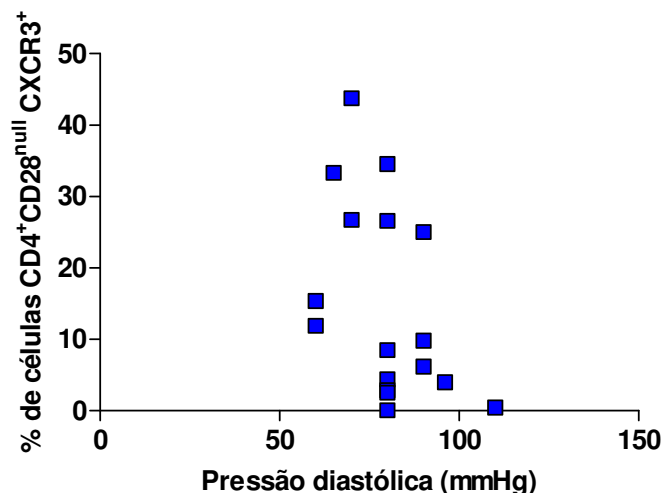


Figura 17. Correlação entre os níveis de pressão diastólica e a porcentagem de células CD4⁺CD28^{null}CXCR3⁺ em pacientes AE (grupo AE). $r = -0,49$; $p = 0,04$ (Spearman)

3. Análises após estimulação em cultura com anti-CD3 e ionóforo de cálcio

Além dos experimentos *ex-vivo*, foram realizados ensaios de estimulação das CMSP em cultura para detecção de citocinas. Após 6h de estímulo com anti-CD3 e ionóforo de cálcio, houve aumento da porcentagem de células positivas para IFN- γ e TNF- α na população CD4⁺CD28^{null} de indivíduos dos grupos C, FR, AE e SCA, enquanto o aumento da positividade para as citocinas na população CD4⁺CD28⁺ foi alterada em uma magnitude muito menor (**figs 18 e19**).

Comparando-se os grupos estudados, não houve diferenças significativas na frequência de células IFN- γ ⁺ na população CD4⁺CD28^{null} após estimulação com anti-CD3 e ionóforo de cálcio (**fig. 18**). Entretanto, foi possível observar um menor aumento do número de células positivas para IFN- γ no *pool* de células CD4⁺CD28^{null} dos

pacientes AE do que dos indivíduos com fatores de risco. Surpreendentemente, as células do grupo controle apresentaram o maior aumento na positividade para IFN- γ após estímulo. As células dos pacientes com SCA apresentaram níveis de positividade para IFN- γ semelhantes aos controles, porém ainda baixos em relação ao esperado.

A estimulação com anti-CD3 e ionóforo de cálcio induziu um aumento significativamente maior da frequência de células TNF- α^+ no pool de células CD4 $^+$ CD28 $^{\text{null}}$ de pacientes SCA e de indivíduos com fatores de risco para aterosclerose comparado aos pacientes AE, sendo que as células CD4 $^+$ CD28 $^{\text{null}}$ dos indivíduos SCA exibem o maior aumento de positividade para a citocina entre os grupos estudados (**fig. 18**). Apesar de não ser estatisticamente significativo, nota-se que o aumento da positividade para TNF- α nas células CD4 $^+$ CD28 $^{\text{null}}$ de controles após estimulação com anti-CD3 e ionóforo de cálcio é menor do que nas células CD4 $^+$ CD28 $^{\text{null}}$ de indivíduos com fatores de risco para aterosclerose. A população CD4 $^+$ CD28 $^{\text{null}}$ de pacientes AE apresenta o menor aumento no número de células TNF- α^+ após estímulo entre os grupos estudados.

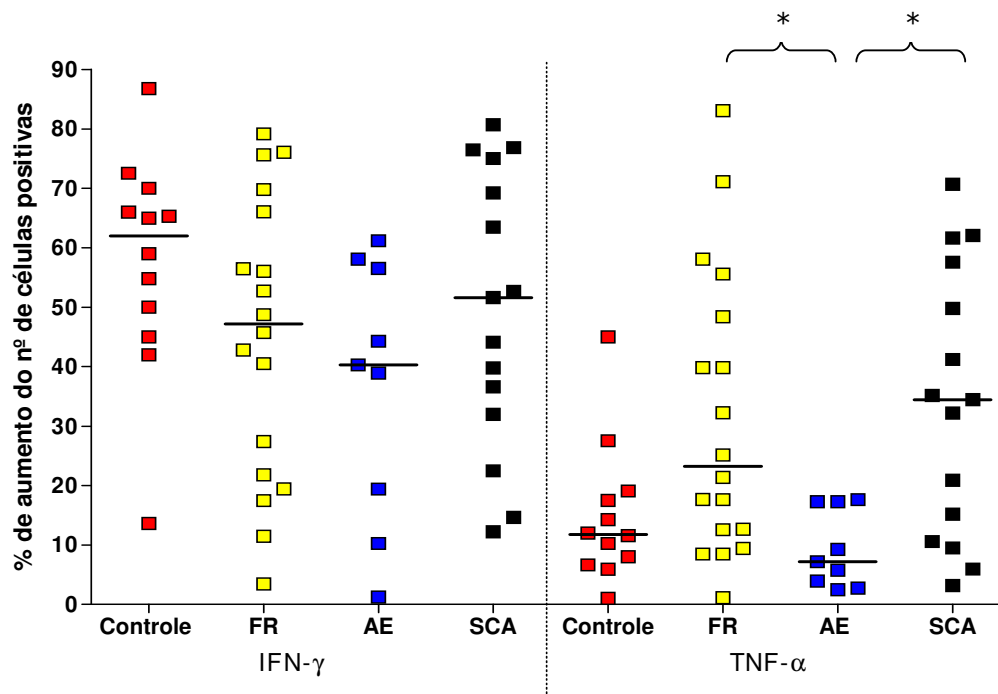


Figura 18. Porcentagem de aumento do número de células positivas para IFN- γ e TNF- α na população $CD4^+CD28^{\text{null}}$ em amostras de CMSP após estimulação em cultura. As amostras avaliadas foram coletadas de indivíduos controle (grupo C), indivíduos com fatores de risco para aterosclerose (grupo FR), pacientes com angina estável (grupo AE) e pacientes com síndromes coronarianas agudas (grupo SCA). As células foram estimuladas com anti-CD3 e ionóforo de cálcio por 6h. As barras horizontais representam a mediana. * $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn)

Os diferentes grupos também foram comparados no que diz respeito à expressão de IFN- γ e TNF- α na população $CD4^+CD28^+$ após 6h de estímulo com anti-CD3 e ionóforo de cálcio (**fig 19**). Com relação ao aumento de positividade para o IFN- γ , nota-se que a população $CD4^+CD28^+$ de indivíduos com fatores de risco apresenta o menor aumento de células positivas para tal citocina em comparação com os outros grupos, sendo a diferença com relação ao grupo SCA estatisticamente significativa. No que diz respeito ao TNF- α , nota-se que as células $CD4^+CD28^+$ dos indivíduos com SCA apresentam um grande aumento na positividade para a citocina após estímulo. Dessa

maneira, nota-se que a população $CD4^+CD28^+$ apresenta uma pequena capacidade de produção de citocinas inflamatórias em todos os grupos, sendo a população $CD4^+CD28^{null}$ a principal produtoras de $IFN-\gamma$ e $TNF-\alpha$. Apenas no grupo SCA, o qual apresenta o estado inflamatório de maior magnitude, o *pool* de células $CD4^+CD28^+$ apresenta uma capacidade inflamatória considerável, sendo ativado para a produção de $IFN-\gamma$ e $TNF-\alpha$ (principalmente $TNF-\alpha$).

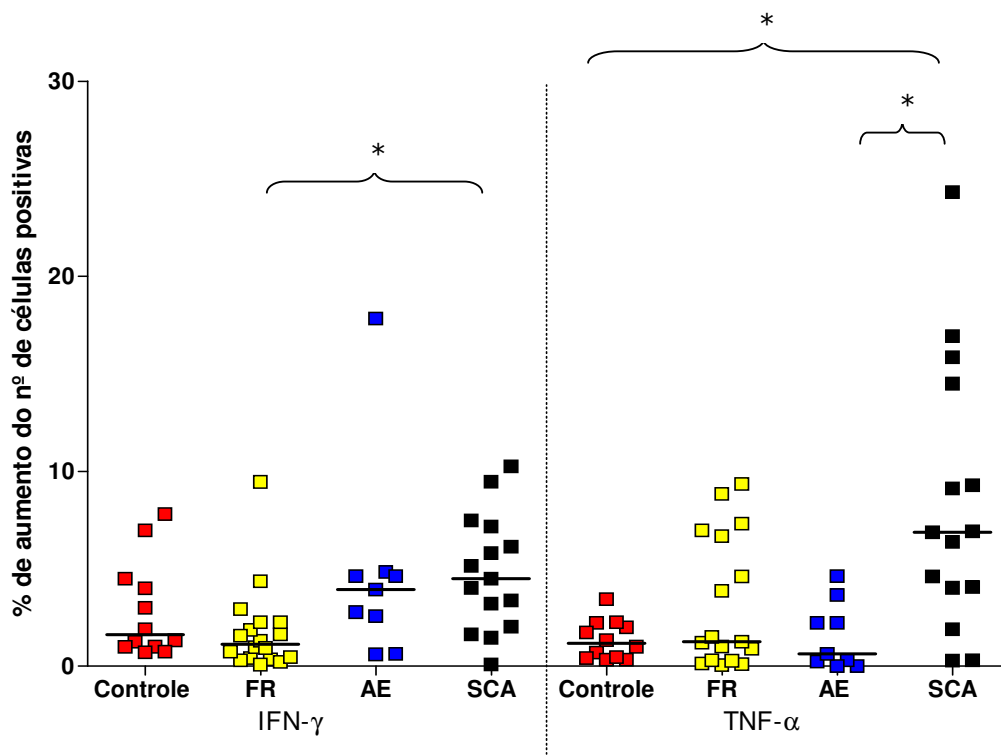


Figura 19. Porcentagem de aumento do número de células positivas para $IFN-\gamma$ e $TNF-\alpha$ na população $CD4^+CD28^+$ em amostras de CMSP após estimulação em cultura. As amostras avaliadas foram coletadas de indivíduos controle (grupo C), indivíduos com fatores de risco para aterosclerose (grupo FR), pacientes com angina estável (grupo AE) e pacientes com síndromes coronarianas agudas (grupo SCA). As células foram estimuladas com anti-CD3 e ionóforo de cálcio por 6h. As barras horizontais representam a mediana. * $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn)

4. Análises após estimulação em cultura com LPS

As células CD4⁺ dos diferentes grupos (C, FR, AE e SCA) também foram analisadas quanto à expressão de grânulos citotóxicos e receptores de *homing* nas populações CD28^{null} e CD28⁺ após estimulação com LPS por 48 h. Com relação aos grânulos citotóxicos, nota-se que a população CD4⁺CD28^{null} de todos os grupos se comporta de maneira semelhante, sendo que há uma diminuição da porcentagem de células positivas para granzimas A e B após estímulo com LPS (**tab. 3**). Ainda na **tabela 3**, nota-se que a frequência de linfócitos CD4⁺CD28^{null} positivos para perforina também cai após estimulação com LPS, mas tal diminuição é significativa apenas nos grupos C e AE. Finalmente, observa-se que a granzima não tem sua expressão alterada no *pool* de células CD4⁺CD28^{null} após o estímulo com LPS em praticamente todos os grupos, sendo que apenas no grupo C houve diminuição estatisticamente significativa na porcentagem de células positivas para o grânulo.

Diferentemente, a população CD4⁺CD28⁺, de maneira geral, não apresenta alterações significativas na expressão de grânulos citotóxicos, sendo a porcentagem de células positivas para os grânulos muito pequena tanto antes quanto após a estimulação com LPS (**tab. 4**). Entretanto, houve aumento da expressão de granzima B no *pool* de células CD4⁺CD28⁺ dos pacientes AE após o estímulo, demonstrando que a produção de tal grânulo é alterada em ambiente inflamatório, aumentando o poder citotóxico das células. No entanto, mesmo após o estímulo, a porcentagem de células CD4⁺CD28⁺ positivas para granzima B é muito pequena, sendo que tal população não deve representar fonte importante do grânulo.

Com relação às moléculas de *homing*, nota-se que a porcentagem de células CD4⁺CD28^{null} positivas para CCR5 diminui drasticamente após estímulo com LPS, fato que ocorreu em todos os grupos (**tab. 5**). Já o CD161, após estimulação, tem sua

positividade aumentada nas células $CD4^+CD28^{null}$ dos grupos C, FR, AE e SCA, embora as diferenças não sejam significativas. Ainda na **tabela 5**, nota-se que a frequência de linfócitos $CD4^+CD28^{null}$ positivos para o CXCR3 aumenta após estímulo com LPS no grupo AE. Finalmente, observa-se que, após estimulação com LPS, a expressão de CCR7 diminui nas células $CD4^+CD28^{null}$ dos indivíduos com fatores de risco para aterosclerose.

De maneira similar ao que ocorre com as células $CD4^+CD28^{null}$, a porcentagem de células $CD4^+CD28^+$ positivas para CCR5 diminui após estimulação com LPS, fato que ocorreu em todos os grupos (**tab. 6**). Já o CD161, ao contrário do observado na população $CD28^{null}$, tem a sua expressão diminuída na população $CD28^+$ após o estímulo, fato que se repete nos grupos C, FR, AE e SCA, mas é estatisticamente significativo apenas nos grupos FR e SCA. O CXCR3, por sua vez, está presente em uma maior porcentagem de células $CD28^+$ após estímulo no grupo AE. Ainda na **tabela 6**, nota-se que houve um aumento na frequência de células $CD28^+$ que expressam CCR7 após estimulação com LPS, o que ocorreu em todos os grupos. Chama a atenção a grande expressão dessa molécula no *pool* de células $CD28^+$ de controles e pacientes SCA antes mesmo da estimulação *in vitro*.

Tabela 3: Frequência (%) de células CD4⁺CD28^{null} de indivíduos do grupo controle (grupo C), indivíduos com fatores de risco para aterosclerose (grupo FR), pacientes com angina estável (grupo AE) e pacientes com síndromes coronarianas agudas (grupo SCA) expressando moléculas citotóxicas antes e após estimulação com LPS por 48h

	Granzima A			Granzima B			Perforina			Granulisina		
	s/est	LPS	p	s/est	LPS	p	s/est	LPS	p	s/est	LPS	p
Controle	60 (41,9-75,6)	43,1(4,7-62,4)	0,03	60,6 (14-74,37)	45 (2,9-62,6)	0,03	32 (4,8-59,2)	15,7 (2,2-43,2)	0,03	36,6 (10,1-78,9)	24,8 (6,8-70,8)	0,06
FR	65,1 (4-95)	35,8(2,1-86,3)	<0,01	32,9 (0-65,4)	19,1 (0-60,7)	<0,01	39 (3,4-71,9)	10,4 (1,7-89)	0,3	8,7 (0-46,9)	6,8 (2-69,5)	0,7
AE	51,8 (27,4-98,5)	35,4 (6-93,4)	<0,01	33,3 (10,8-80,7)	10,7 (2-58,3)	<0,01	27,6 (1,7-68)	15,2 (0,6-59)	<0,01	16,1 (1,3-41,9)	22,3 (4,1 - 34,4)	0,1
SCA	48,7 (13,8-92,4)	26 (11,8-67,4)	0,04	30,4 (3,3-65)	20,4 (2,9-40,3)	0,01	19,8 (12,1-59)	17,2 (4,1-22,9)	0,1	18,1 (2,7-78,9)	9,6 (2,6-28,8)	0,3

Tabela 4: Frequência (%) de células CD4⁺CD28⁺ de indivíduos do grupo controle (grupo C), indivíduos com fatores de risco para aterosclerose (grupo FR), pacientes com angina estável (grupo AE) e pacientes com síndromes coronarianas agudas (grupo SCA) expressando moléculas citotóxicas antes e após estimulação com LPS por 48h

	Granzima A			Granzima B			Perforina			Granulisina		
	s/est	LPS	p	s/est	LPS	p	s/est	LPS	p	s/est	LPS	p
Controle	3,2 (0,6-7)	3,5 (0,5-7,4)	0,7	0,6 (0,1-1,5)	0,8 (0,1-1,9)	0,6	0,4 (0,3-1)	0,3 (0,1-1)	0,6	1,2 (0,5-1,6)	1,2 (0,5-1,8)	1
FR	1,8 (0,7-21,4)	1,9 (0,3-18,5)	0,9	0,6 (0,08-8,6)	1,2 (0,1-18,5)	<0,01	1,3 (0,5-4,3)	0,9 (0,2-6,2)	0,3	0,8 (0,1-2,2)	0,9 (0,3-3,4)	0,2
AE	1,2 (0,5-17,2)	1,6 (0,6-14,1)	0,7	0,4 (0,07-5,75)	0,6 (0,1-4,2)	0,3	0,8 (0,3-4)	0,7 (0,3-3,6)	0,6	0,7 (0,7-3,3)	1,1 (1-5,8)	0,1
SCA	2,5 (1,2-20,8)	2,9 (1,2-18,4)	0,2	0,6 (0,15-4,71)	0,6 (0,2-7)	0,9	0,9 (0,2-2,8)	0,8 (0,1-5,9)	0,6	1,8 (0,4-6,5)	2,2 (1,3-5,6)	0,5

Tabela 5: Frequência (%) de células CD4⁺CD28^{null} de indivíduos do grupo controle (grupo C), indivíduos com fatores de risco para aterosclerose (grupo FR), pacientes com angina estável (grupo AE) e pacientes com síndromes coronarianas agudas (grupo SCA) expressando receptores de *homing* antes e após estimulação com LPS por 48h

	CCR5			CD161			CXCR3			CCR7		
	s/est	LPS	p	s/est	LPS	p	s/est	LPS	p	s/est	LPS	p
Controle	8,0 (1,3-63,4)	2,4 (0,3-4,1)	0,06	10,6 (4,3-94,3)	27,2 (10,3-78,5)	0,3	67,3 (20,5-97,3)	54,5 (13,8-74,1)	0,3	2,7 (0-10,3)	2,1 (0,5- 4,4)	0,6
FR	10,5 (2,2-69,6)	1 (0,3-6,8)	<0,01	10 (0,2-41,9)	11,9 (1,1-24,3)	0,5	13,8 (8,5-68,2)	16,7 (4,2-84,6)	0,4	1,3 (0 - 51,7)	0,7 (0-6,1)	0,04
AE	6,5 (0-49,5)	0,6 (0-2,5)	<0,01	3,3 (0-27,3)	6 (1,1-28,2)	0,1	9,9 (0,2-68,9)	24,9 (0,6-66,4)	0,08	0,8 (0-12,7)	0,4 (0,1-32,8)	0,9
SCA	12,3 (3-64,4)	1,1 (0-4,3)	0,04	10,6 (0,4-67,6)	19,3 (0-47)	0,9	28,3 (1,8-76,5)	39,7 (1-73,5)	1	0,5 (0-39,1)	3,4 (0,3-2,9)	0,8

Tabela 6: Frequência (%) de células CD4⁺CD28⁺ de indivíduos do grupo controle (grupo C), indivíduos com fatores de risco para aterosclerose (grupo FR), pacientes com angina estável (grupo AE) e pacientes com síndromes coronarianas agudas (grupo SCA) expressando receptores de *homing* antes e após estimulação com LPS por 48h

	CCR5			CD161			CXCR3			CCR7		
	s/est	LPS	p	s/est	LPS	p	s/est	LPS	p	s/est	LPS	p
Controle	1,5 (0,6-4)	0,4 (0,1-0,6)	0,03	8,4 (3,6-15,8)	7,2 (3-16,6)	0,3	17,6 (11,4-23,2)	13,2 (9,2-20,7)	0,2	44,4 (3,6-60,4)	68,3 (15,8-81,5)	0,03
FR	1,4 (0,3-15,7)	0,9 (0,1-1,5)	0,03	8,1 (2,6-14,9)	6,3 (1,7-14,4)	<0,01	4,9 (1,4-14,7)	4,8 (2,3-18,8)	0,5	7,8 (2-27,9)	20,9 (3-51,7)	<0,01
AE	1,4 (0,3-14)	0,4 (0,3-1,4)	<0,01	5,2 (1,6-16)	4 (1,6-12,7)	0,1	2,8 (0,3-19,4)	3,7 (0,7-66,9)	0,05	6,1 (1,7-19)	18 (4-63,7)	<0,01
SCA	2,1 (0,6-3,9)	0,3 (0,1-1)	<0,01	13,3 (2,2-32,4)	10,6 (1,5-31,6)	<0,01	15 (5,1-43,1)	18,3 (6,3-33,5)	0,9	29,4 (3,3-54)	40,5 (6-67,2)	<0,01

5. Determinação da concentração plasmática de Proteína C reativa

A fim de se comprovar a existência e magnitude do processo inflamatório em curso nos indivíduos FR e pacientes com AE e SCA em relação ao grupo controle, realizou-se a quantificação da proteína C reativa (PCR), pelo método ultra-sensível, em amostras de plasma obtidas por punção venosa. Os resultados de cada um dos grupos estão representados na **fig. 20**.

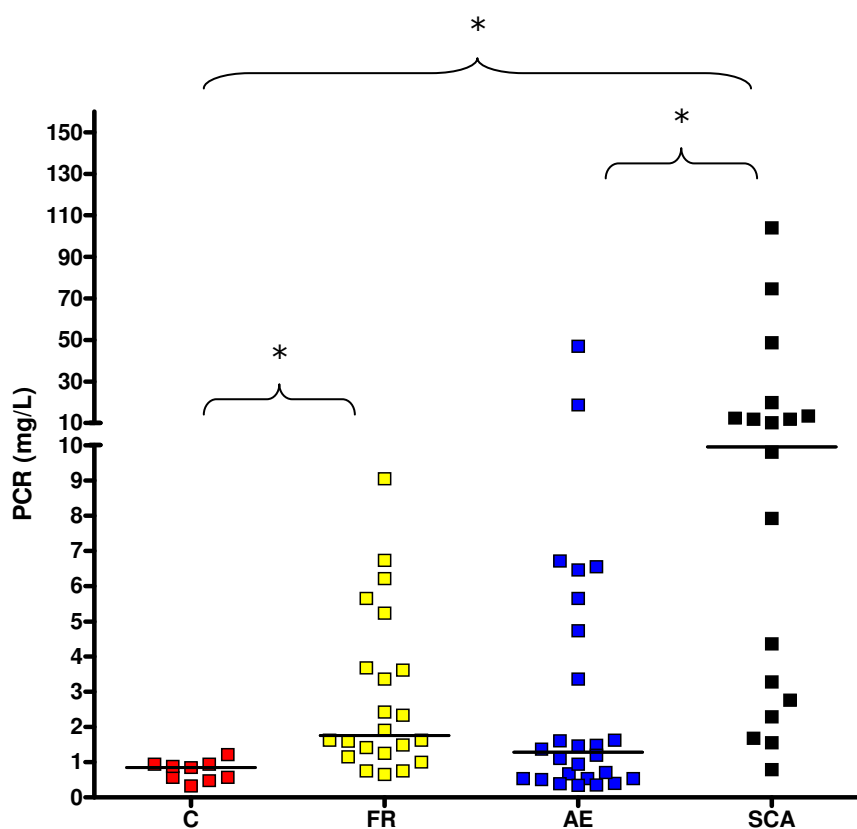


Figura 20. Concentração plasmática da proteína C reativa (mg/L). As amostras de plasma avaliadas foram coletadas indivíduos controle (grupo C), indivíduos com fatores de risco para aterosclerose (grupo FR), pacientes com doença coronariana crônica (grupo AE) e pacientes com síndromes coronarianas agudas (grupo SCA). A dosagem foi realizada pelo método ultra-sensível, utilizando-se a técnica de nefelometria. As barras horizontais representam a mediana. * $p < 0,05$ (Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn)

Observando-se a **figura 20**, nota-se que os indivíduos com fatores de risco para aterosclerose apresentam maior concentração plasmática da PCR quando comparados aos indivíduos controles. Notamos também que, como era esperado, os níveis da PCR são mais altos nos indivíduos do grupo SCA, que apresentam um processo inflamatório de alta magnitude em curso. Já os indivíduos do grupo AE apresentam níveis plasmáticos da PCR apenas um pouco mais elevados do que os controles, sendo que a diferença não é significativa. Com relação aos indivíduos do grupo FR, os pacientes com doença coronariana crônica apresentam níveis plasmáticos da PCR evidentemente menores, apesar da diferença ainda não ser significativa.



Discussão

Vários estudos mostraram que ocorre uma expansão da população de células $CD4^+CD28^{null}$ nas manifestações mais graves da doença aterosclerótica como as SCA, associando-as ao processo inflamatório vigente (13,14,23,28,92,93).

Fatores de risco para as doenças vasculares têm em comum o fato de ocasionar uma inflamação subclínica. Desta forma, diante da associação das células $CD4^+CD28^{null}$ com processos inflamatórios, foi levantada a hipótese que tais células pudessem ter alguma participação nos quadros mais brandos das doenças cardiovasculares e não apenas nos estágios mais tardios e graves. Nesse sentido, nosso estudo é pioneiro em mostrar que já existem alterações importantes na população $CD4^+CD28^{null}$ de indivíduos com fatores de risco para aterosclerose, indicando que estas células podem atuar em diferentes fases do processo.

Para avaliar as células $CD4^+CD28^{null}$ em todos os estágios da doença aterosclerótica, foram analisados quatro grupos. O grupo FR corresponderia ao primeiro estágio do processo, no qual, além dos fatores de risco, não há manifestação clínica da doença. O segundo estágio seria representado pelos pacientes com angina estável, que pode evoluir para as síndromes coronarianas agudas, quadro que caracteriza o grupo SCA. O grupo C corresponderia aos indivíduos controle, isto é, indivíduos sem fatores de risco para aterosclerose e sem doença coronariana.

Os grupos C, FR, AE e SCA foram avaliados quanto aos parâmetros demográficos, clínicos e laboratoriais. Quanto aos parâmetros demográficos, constatou-se que os grupos não possuíam diferenças estatisticamente significativas quanto à média de idade. Tal fato é importante para uma análise fidedigna da porcentagem de células $CD4^+CD28^{null}$ em relação aos linfócitos totais do sangue periférico, uma vez que a frequência dessas células aumenta

com a idade (94). Os grupos diferiram quanto à proporção de homens e mulheres (H/M), sendo 10/6 no grupo C, 8/14 no grupo FR, 25/5 no grupo AE e 12/8 no grupo SCA. A grande maioria de homens no grupo AE é um fato inesperado, uma vez que quase todos os pacientes têm acima de 50 anos (média de idade de 61 anos) e sabe-se que a proporção de mulheres com doença coronariana se aproxima muito da proporção de homens nessa faixa etária, sobretudo após a menopausa (95). Entretanto, uma explicação possível seria o fato dos pacientes do grupo serem doentes crônicos, isto é, desenvolveram a doença há muitos anos, em uma faixa etária na qual a proporção de homens afetados é muito maior do que a de mulheres (3:1) (96). De fato, esses pacientes já estavam sendo acompanhados há muito tempo e a grande maioria se encontrava com a doença estabilizada após a ocorrência de quadros agudos (grande parte sofreu revascularização prévia). Já o grande número de mulheres no grupo FR é esperado diante do fato da maioria dos indivíduos ter sido selecionada junto a um ambulatório de prevenção, serviço no qual as mulheres constituem, por motivos culturais, a maioria. Entretanto, acreditamos que estas diferenças não tenham afetado os resultados e conclusões apresentadas uma vez que não existem estudos na literatura indicando que o sexo está associado a alterações nas células $CD4^+CD28^{null}$.

Não houve diferenças entre os grupos quanto à porcentagem de células $CD4^+CD28^{null}$, o que é parcialmente inesperado, uma vez que outros pesquisadores relataram aumento desse subtipo celular no sangue periférico de pacientes com quadros agudos e mais graves (síndromes coronarianas agudas) (14,97). Liuzzo e colaboradores (92) verificaram que nos indivíduos com doença coronariana controlada e crônica e, portanto, menos grave, a porcentagem de células $CD28^{null}$ era estatisticamente igual a encontrada nos controles. Um dos motivos de não ter sido constatado aumento da

porcentagem das células CD4⁺CD28^{null} em relação aos linfócitos totais nos indivíduos com SCA poderia ser o tratamento ao qual os pacientes são submetidos na Unidade de Emergência Referenciada do Hospital de Clínicas da UNICAMP que inclui estatinas.

Estudo recente demonstrou que as estatinas induzem uma diminuição da porcentagem de células CD4⁺CD28^{null} no sangue periférico (98). As estatinas são substâncias desenvolvidas a partir da identificação de metabólitos fúngicos que bloqueavam a síntese de colesterol (2). Nos anos 80, a administração de análogos sintéticos denominados estatinas se mostraram eficientes no tratamento de dislipidemias, reduzindo os níveis de LDL colesterol em pacientes com hipercolesterolemia (99,100). A diminuição da síntese de colesterol pelas estatinas se dá pela inibição da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), responsável pela redução de HMG-CoA em ácido mevalônico. Tal passo é limitante na biossíntese de colesterol (101). Trabalhos recentes, entretanto, atestam que as estatinas possuem efeitos pleotrópicos, tendo ação anti-inflamatória. Altas concentrações de rosuvastatina inibiram a adesão de monócitos e a expressão de ICAM-1, MCP-1, IL-8, IL-6 e COX-2 em HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) estimuladas com TNF- α (102). Em consonância com tais resultados, o estudo JUPITER demonstrou que o tratamento com rosuvastatina reduziu a incidência de eventos cardiovasculares em indivíduos sem hiperlipidemia, mas com altas concentrações séricas de PCR (103). A sinvastatina, uma das estatinas mais utilizadas na prática clínica, modula a enzima eNOS em modelos animais contribuindo na redução da disfunção endotelial (104). Além disso, a sinvastatina diminui a expressão de quimiocinas e receptores de quimiocinas em macrófagos humanos (105). A expressão de TLR4 em monócitos CD14 positivos também é alterada, com a diminuição do número de receptores

na superfície das células, culminando na supressão da resposta imune inata (106). A sinvastina também altera a resposta imune celular e humoral *in vitro* e *in vivo*, inibindo a ativação de linfócitos B e T humanos (107,108). Entretanto, muitos dos efeitos anti-inflamatórios das estatinas ainda são desconhecidos (101).

Ainda com respeito à porcentagem de células T $CD4^+CD28^{null}$ em relação aos linfócitos totais do sangue periférico, chama a atenção a grande variação observada nos pacientes com doença coronariana (grupos AE e SCA), o que provavelmente não permitiu a observação de diferenças significativas entre eles. Em consonância com nossos achados, Alber e colaboradores (109) descreveram a grande variabilidade no número dessas células em pacientes com angina estável e que a expansão dessa população estaria relacionada a uma maior extensão e gravidade da doença. O aumento da população $CD4^+CD28^{null}$ também foi associado à recorrência de eventos agudos em pacientes com angina instável, indicando um possível papel nos processos patológicos que caracterizam as SCA (93).

Quanto à porcentagem de células $CD4^+CD28^+$ em relação aos linfócitos totais do sangue periférico, foram observadas algumas diferenças entre os grupos. Pacientes com angina estável apresentaram uma menor porcentagem de células $CD4^+CD28^+$ quando comparados aos indivíduos controle e aos pacientes com SCA. É interessante notar que a porcentagem desse subtipo celular é menor nos indivíduos do grupo FR, mas a diferença em relação ao grupo controle só se torna estatisticamente significativa em pacientes AE. A diminuição na porcentagem de células $CD4^+CD28^+$ em relação aos linfócitos totais no grupo AE também poderia ser explicada pelo fato da maioria dos pacientes do grupo fazer uso prolongado de estatinas. Além disso, o baixo número de células $CD4^+CD28^+$ no sangue periférico de pacientes AE poderia ser relacionado ao sequestro desses linfócitos na placa

aterosclerótica, conforme sugerido por Fernandes e colaboradores (110). Já nos pacientes com SCA, a porcentagem de células $CD4^+CD28^+$ é similar a encontrada nos controles. Tal achado poderia ser resultante da reativação da hematopoiese em resposta ao processo altamente inflamatório em curso nesses pacientes, levando a um aumento no número de leucócitos no sangue (111)

Além da porcentagem de células $CD4^+CD28^{null}$ e $CD4^+CD28^+$ em relação aos linfócitos totais do sangue periférico, foi avaliado o fenótipo dessas duas populações celulares nos quatro grupos. Nesse sentido, primeiramente foram feitas comparações entre as populações $CD28^+$ e $CD28^{null}$ dentro de cada um dos grupos, sendo avaliada a expressão de grânulos citotóxicos, moléculas de *homing* e citocinas inflamatórias.

De maneira geral, todos os grupos apresentaram o mesmo perfil, com diferenças marcantes entre as células $CD28^+$ e $CD28^{null}$. As células $CD28^{null}$ exibiram alta positividade para grânulos citotóxicos, expressando granzimas A e B e perforina, praticamente ausentes nas células $CD28^+$. Tais resultados estão de acordo com outros trabalhos na literatura, que atestam o alto poder citotóxico das células $CD4^+CD28^{null}$ (112). Além disso, essas células também expressam granulicina, molécula citotóxica previamente relacionada à lise de microrganismos, como bactérias e fungos (113-115). Fica evidente, portanto, que as células $CD4^+CD28^{null}$, diferentemente das $CD4^+CD28^+$, apresentam um arsenal de moléculas citotóxicas que as habilitam a provocar a morte de outras células por apoptose ou por lise direta, podendo contribuir, portanto, para a desestabilização da capa fibrosa que impede a ruptura da lesão aterosclerótica. Somado a isso, a detecção de granulicina, uma molécula com atividade microbida direta (116), indica que as células $CD4^+CD28^{null}$ podem ter um papel importante no combate a agentes infecciosos. Sabe-se que pacientes com doença

arterial coronariana têm uma piora do quadro clínico quando acometidos por infecções microbianas e que a incidência de infarto após episódios infecciosos aumenta (117). Nesse sentido, a ativação de células $CD4^+CD28^{null}$ em resposta a agentes infecciosos poderia resultar em uma maior destruição da capa fibrosa, favorecendo o agravamento do quadro clínico. Experimentos comparando o fenótipo e o número dessas células em modelos experimentais antes e durante infecções microbianas são necessários para a comprovação dessa hipótese.

A população $CD28^{null}$ também expressa mais CCR5 e CD161 e menos CXCR3 e CCR7 quando comparadas à população $CD28^+$. A alta expressão de CCR5 e CD161 está de acordo com o que foi descrito por outros pesquisadores (14). Entretanto, tais estudos analisaram apenas pacientes com angina estável e síndromes coronarianas agudas, sendo que o fenótipo das células $CD28^{null}$ nos controles e em indivíduos apenas com fatores de risco para aterosclerose, mas sem doença coronariana, ainda não havia sido descrito. Nosso estudo, portanto, deixa claro que o perfil das células $CD4^+CD28^{null}$ de pacientes com doença coronariana (grupos AE e SCA) e indivíduos sem doença aterosclerótica (grupos C e FR) é o mesmo não só com respeito às moléculas citotóxicas, mas também com relação às moléculas de *homing*.

As moléculas de *homing* estudadas podem estar envolvidas na migração das células $CD4^+CD28^{null}$ para a lesão aterosclerótica. Foi demonstrado que o ateroma expressa grandes quantidades de CCL5 (RANTES), um dos ligantes para o CCR5 (118). O CXCR3, por sua vez, é o receptor da tríade de citocinas CXCL detectadas no ateroma (CXCL9, CXCL10 e CXCL11), sendo responsável pelo endereçamento dos linfócitos do tipo Th1 para a lesão (119). A detecção de CXCR3 nas células $CD28^{null}$ sugere que tal receptor

também possa estar envolvido na migração dessas células para o ateroma, o que ainda não foi confirmado na literatura.

Chama a atenção a menor porcentagem de células positivas para CCR7 na população CD28^{null} dos pacientes com doença coronariana, já que Raines (91) relatou a presença desse receptor como característica das células CD4⁺CD28^{null}. Outros pesquisadores (120) mostraram que as estatinas podem inibir a expressão de CCR7 nessa população, o que poderia explicar nosso resultado, uma vez que a grande maioria dos pacientes analisados (grupos FR, AE e SCA) fazia uso deste medicamento. Levando-se em consideração todos os resultados referentes às moléculas de *homing*, observamos que as células CD28^{null} podem migrar para a lesão aterosclerótica através de mecanismos diferentes do que aqueles usados pelas células CD28⁺, utilizando-se dos receptores CCR5 e do CD161, mas também podem chegar à placa através de mecanismos similares, através da expressão do receptor CXCR3.

Com relação às citocinas inflamatórias, os grupos também apresentaram o mesmo perfil, com maior frequência de células expressando IFN- γ na população CD28^{null} do que na população CD28⁺. Entretanto, a expressão de citocinas foi muito pequena nas amostras *ex vivo*, o que pode ter prejudicado as análises. Tal resultado é surpreendente nos pacientes com doenças coronarianas, que exibem um processo inflamatório crônico. Outros pesquisadores também não conseguiram detectar grandes quantidades de citocinas inflamatórias nas células CD4⁺CD28^{null} *ex vivo*, sendo que isso só foi possível após estimulação *in vitro* (92).

Apesar de não haver diferenças quanto ao perfil das células CD4⁺CD28^{null} em relação às células CD4⁺CD28⁺ dentro dos diferentes grupos, verificou-se que existem

diferenças importantes se compararmos as células $CD4^+CD28^{null}$ entre os grupos. Dessa maneira, verificou-se que as populações $CD4^+CD28^{null}$ dos indivíduos com fatores de risco para aterosclerose (grupo FR) e com síndromes coronarianas agudas (grupo SCA) apresentavam alta porcentagem de células expressando grânulos citotóxicos (perforina, granzima A e granzima B), enquanto a frequência de células positivas em controles e pacientes com angina estável era menor. A granulinsina, por sua vez, apresentou comportamento distinto dos outros grânulos, sendo mais frequente nas células $CD4^+CD28^{null}$ de indivíduos dos grupos C e AE. Diante desse quadro, fica claro que as células de pessoas com fatores de risco para aterosclerose, controles, pacientes AE e pacientes SCA apresentam potenciais citotóxicos diferentes. Nesse sentido, vemos um número maior de células $CD4^+CD28^{null}$ em pacientes SCA apresentando capacidade citotóxica do que em pacientes AE, o que contribuiria para o quadro mais grave observado nesse grupo. Os pacientes AE, por sua vez, apresentam uma maior frequência de células $CD4^+CD28^{null}$ lesivas em relação aos controles. Chama a atenção, entretanto, a alta porcentagem de células $CD4^+CD28^{null}$ expressando perforina e granzimas nas pessoas com fatores de risco para aterosclerose, com medianas superiores às presentes em pacientes AE e controles, sendo equiparáveis aos valores encontrados nos pacientes SCA. A diferença observada em relação aos pacientes AE, os quais já têm doença coronária e, portanto, um quadro mais grave, poderia ser explicada em parte pelo uso prolongado de estatinas. Entretanto, uma interpretação mais provável seria a degranulação dessas células nas lesões ateroscleróticas. Após degranulação nas lesões, tais células seriam estimuladas a produzir altas quantidades de moléculas citotóxicas, contribuindo para a ocorrência de SCA.

Portanto, os resultados sugerem que a população $CD4^+CD28^{null}$ adquire alta capacidade citotóxica nos indivíduos com fatores de risco para a aterosclerose.

Também foram constatadas pequenas diferenças entre as células $CD4^+CD28^{null}$ dos diferentes grupos em relação às moléculas de *homing*. O CD161 foi menos frequente nas células $CD4^+CD28^{null}$ de indivíduos do grupo SCA, alcançando positividade intermediária nos pacientes com angina estável e indivíduos com fatores de risco para aterosclerose e atingindo frequência máxima nos controles. Entretanto, nenhuma dessas diferenças foi estatisticamente significativa, refletindo a grande variação que existe entre os indivíduos de um mesmo grupo. A frequência de células $CCR7^+$ foi maior nas populações $CD4^+CD28^{null}$ de pacientes AE e controles, sendo que as diferenças entre o grupo C e FR e entre os grupos AE e SCA foram estatisticamente significativas. Tais resultados indicam que os fatores de risco podem alterar a expressão de moléculas envolvidas na migração das células $CD4^+CD28^{null}$ para o ateroma (como o CD161), capacitando as células a migrarem rapidamente para o local. Nesse sentido a diminuição da porcentagem de células $CD4^+CD28^{null}$ expressando CD161 em indivíduos do grupo FR quando comparados aos indivíduos controle sugere que tais células podem estar na periferia, agindo nas lesões iniciais (pré-ateroscleróticas) dos vasos sanguíneos. O fato das células dos pacientes AE apresentarem menor positividade para CD161 em relação às células dos controles sugere que os linfócitos $CD4^+CD28^{null}$ desses indivíduos migram para o ateroma, pois tal molécula está envolvida na migração e retenção das células na lesão e, portanto, os linfócitos que as expressam estariam no ateroma e não no sangue periférico. O recrutamento de linfócitos $CD4^+CD28^{null}$ seria intensificado ao grau máximo nos indivíduos SCA, já que o grupo apresenta a menor frequência de células $CD4^+CD28^{null}$ expressando CD161 no sangue

periférico entre os grupos estudados, culminando com a ocorrência dos quadros agudos. De acordo com essa hipótese, portanto, as células $CD4^+CD28^{null}$ poderiam ter efeitos lesivos em pacientes com doença aterosclerótica mais branda ou em estágios mais iniciais.

Com relação às citocinas inflamatórias, as comparações entre as células $CD4^+CD28^{null}$ *ex vivo* entre os grupos foi prejudicada pela pequena porcentagem de células expressando as moléculas, conforme anteriormente discutido. Entretanto, há de se esperar que as células de pacientes com doenças coronarianas tenham maior positividade para IFN- γ do que as células de indivíduos controle, uma vez que possuem um processo inflamatório de maior magnitude, conforme demonstrado pelos níveis de PCR. Entretanto, houve diferença significativa apenas entre os indivíduos dos grupos FR e AE, sendo a positividade para IFN- γ maior nas células $CD4^+CD28^{null}$ dos indivíduos com angina estável.

Os resultados mostraram, portanto, que há alterações na população $CD4^+CD28^{null}$ *ex vivo* de indivíduos com fatores de risco para aterosclerose em relação aos controles. Uma maneira de se verificar se os fatores de risco estão envolvidos com a expressão das moléculas analisadas é através de correlações entre os marcadores analisados *ex vivo* e os parâmetros bioquímicos e níveis pressóricos. Diante disso, o fato de não serem encontradas correlações no grupo FR é surpreendente, mas pode ser explicado pelo número pequeno de dados nas correlações. No grupo AE, onde a quantidade de dados para as correlações foi maior, foram encontradas associações inversamente proporcionais entre os níveis pressóricos e a porcentagem de células $CD4^+CD28^{null}$ positivas para o CXCR3 e para a granzima B, enquanto os níveis de colesterol total e LDL colesterol foram diretamente proporcionais à positividade para CD161 e granzima B na população $CD4^+CD28^{null}$. Essa é uma indicação direta de que os fatores de risco para aterosclerose, como a

dislipidemia e a hipertensão, modificam as características das células $CD4^+CD28^{null}$ dos pacientes AE, fato que poderia também ser observado nos outros grupos, se aumentado o tamanho amostral. Além disso, as correlações indicam que diferentes fatores de risco podem atuar de diferentes maneiras. Nesse sentido, a dislipidemia aumentaria a atividade citotóxica e a capacidade adesiva da população $CD4^+CD28^{null}$ através do aumento da frequência de células positivas para granzima B e CD161, enquanto a hipertensão provocaria a degranulação das células e a migração das mesmas para a placa aterosclerótica, o que explicaria a correlação negativa desse parâmetro com a positividade para CXCR3 e granzima B na população $CD4^+CD28^{null}$ dos pacientes AE.

Além da comparação das células $CD4^+CD28^{null}$, os diferentes grupos foram avaliados quanto às diferenças com relação às células $CD4^+CD28^+$ *ex vivo*. Não foram encontradas diferenças na porcentagem de células positivas para perforina e granzimas A e B nas populações $CD4^+CD28^+$ dos grupos. Entretanto, houve diferença estatisticamente significativa quanto à positividade para a granulicina, sendo tal grânulo mais frequente nas células dos grupos AE e SCA em comparação com o grupo FR. Há de se destacar, porém, que os grânulos citotóxicos quase não estão presentes nesse tipo celular, indicando que as células $CD4^+CD28^+$ não possuem capacidade citotóxica significativa. A frequência de células $CD4^+CD28^+$ *ex vivo* expressando citocinas inflamatórias também é muito baixa, indicando que tal tipo celular possui reduzida capacidade inflamatória, sendo que há diferença estatística na positividade para IFN- γ apenas entre os grupos C e AE, com maior porcentagem de células positivas para a citocina no grupo AE. Também foram encontradas diferenças entre os linfócitos $CD4^+CD28^+$ dos diferentes grupos em relação às moléculas de *homing*, com maior positividade para CD161 nas células de pacientes com angina estável e

indivíduos portadores de fatores de risco para aterosclerose. Já CXCR3 está presente em um número maior de células nos indivíduos do grupo SCA, enquanto a menor positividade para tal marcador é encontrada nas células de pacientes AE. Os grupos FR e C apresentam porcentagens intermediárias de células expressando o receptor. O CCR7, por sua vez, é mais frequente nas células de controles e indivíduos com SCA.

Levando-se em consideração todos os resultados para as moléculas de *homing* (CCR5, CXCR3 e CCR7), vemos que as células CD4⁺CD28⁺ poderiam ter um padrão de migração para a lesão aterosclerótica distinto daquele observado para as células CD4⁺CD28^{null}. Nesse sentido, o CCR5 não seria primordial para a migração das células CD4⁺CD28⁺, uma vez que não há alteração da frequência de células positivas para esse marcador nos indivíduos dos diferentes grupos, sendo a positividade nas células dos pacientes e dos indivíduos portadores de fatores de risco para aterosclerose igual à encontrada nas células dos controles. O CD161, por sua vez, poderia ter um papel significativo, uma vez que a frequência de células positivas para o receptor é menor nos pacientes AE e nos indivíduos com fatores de risco para aterosclerose, sugerindo uma migração das células CD161⁺ para as lesões nos vasos sanguíneos. Nos indivíduos com SCA, a positividade para o CD161 volta a ser maior na população CD4⁺CD28⁺, sugerindo que tal marcador pode ter um papel na migração das células para a lesão após as mesmas serem reativadas. O padrão de expressão do CXCR3 nas células dos diferentes grupos indica que esse receptor também pode ter um papel importante na migração dos linfócitos para o ateroma, já que a positividade é menor nas células dos indivíduos do grupo AE, sugerindo que as células CD4⁺CD28⁺ CXCR3⁺ estão migrando para a lesão. De maneira similar ao CD161, a frequência desse marcador volta a ser maior na população CD4⁺CD28⁺

de pacientes SCA, indicando um papel importante desse marcador na migração para o ateroma após as células serem reativadas. Finalmente, a menor porcentagem de células positivas para o CCR7 nos indivíduos dos grupos FR e AE indica que os indivíduos controle possuem uma maior quantidade de células *naive*. Chama a atenção a alta frequência de células positivas para o CCR7 na população CD4⁺CD28⁺ de indivíduos com SCA, o que indica que há recrutamento de células *naive* para os linfonodos para ativação. Nesse sentido, uma parte das células CD4⁺CD28⁺ pode ser *naive*, se dirigindo aos linfonodos para serem ativadas, sendo que as células dos indivíduos do grupo FR já estariam passando por essa etapa. Uma vez ativadas, tais células migrariam, via CXCR3 e CD161, para o ateroma. A outra parte das células CD4⁺CD28⁺, que seriam de memória, já expressaria CXCR3 e migraria diretamente para a placa. A população CD4⁺CD28^{null}, por sua vez, seria formada apenas por células de memória, que migrariam diretamente para a lesão, principalmente via CCR5 e CD161, sem necessidade de ativação nos linfonodos.

Além das análises *ex vivo*, as células CD4⁺CD28^{null} e CD4⁺CD28⁺ foram estimuladas em cultura com anticorpo estimulatório anti-CD3 e ionóforo de cálcio para análise da produção de citocinas. Primeiramente, a população CD4⁺CD28^{null} foi comparada com a população CD4⁺CD28⁺ dentro de cada grupo. Nesse sentido, observou-se que a população CD4⁺CD28^{null} de pacientes com doença coronariana (grupos AE e SCA) era altamente inflamatória quando comparada à população CD4⁺CD28⁺, apresentando um maior número de células produtoras de IFN- γ e TNF- α após estímulo. Nesse sentido, as a população CD4⁺CD28^{null} seria a principal fonte de citocinas inflamatórias. Nossos resultados estão de acordo com o que foi relatado previamente na literatura, sendo que outros pesquisadores já haviam constatado que a quantidade de IFN- γ no sobrenadante de

culturas de PBMC após estimulação é diretamente proporcional ao número de células $CD4^+CD28^{null}$, indicando que essas células são as principais produtoras dessa citocina em indivíduos com doença coronariana (92). Nosso estudo mostra que esse mesmo padrão encontrado nos pacientes com DAC se repete nos controles e nos indivíduos com fatores de risco para aterosclerose, sendo que o aumento do número de células expressando $IFN-\gamma$ e $TNF-\alpha$ é muito maior na população $CD4^+CD28^{null}$ do que na população $CD4^+CD28^+$ desses indivíduos.

Quando comparamos a capacidade inflamatória da população $CD4^+CD28^{null}$ dos diferentes grupos, observamos que, com relação à produção de $TNF-\alpha$ após estimulação *in vitro*, as populações celulares se mostraram heterogêneas. Nota-se que a porcentagem de células positivas para $TNF-\alpha$ aumenta na população $CD4^+CD28^{null}$ de indivíduos com fatores de risco para aterosclerose, sugerindo que fatores como a dislipidemia e a hipertensão tornam a população $CD28^{null}$ mais inflamatória. A maior frequência de células positivas para o $TNF-\alpha$ se dá nos pacientes com SCA, o que era esperado, uma vez que, como demonstrado pelas altas concentrações da PCR, esse grupo apresentou o estado inflamatório de maior intensidade. Chama a atenção a pequena frequência de células positivas para $TNF-\alpha$ na população $CD28^{null}$ dos pacientes AE, com níveis de positividade similares aos controles. Tal fato é inesperado, mas pode, mas pode refletir uma regulação diferencial dos genes do $TNF-\alpha$ e do $IFN-\gamma$. Nesse contexto, o gene do $TNF-\alpha$ seria ativado primeiro, em situações de inflamação subclínica, como ocorre nos pacientes com fatores de risco, favorecendo a expressão de moléculas de adesão. Nos pacientes AE, com doença coronariana estabelecida, as células $CD4^+CD28^{null}$ migrariam para a lesão e seriam ativadas, passando a produzir preferencialmente $IFN-\gamma$. A produção de $TNF-\alpha$ seria

retomada, então, paulatinamente, sendo que um grande número de células seria positiva para a citocina nos indivíduos com síndromes coronarianas agudas. Outra explicação possível seria a regulação diferenciada da produção de TNF- α frente à estatina entre os grupos FR e AE.

Com relação à produção de IFN- γ após estimulação *in vitro*, observamos que, apesar das diferenças não serem significativas, a porcentagem de células produtoras de IFN- γ é maior na população CD4⁺CD28^{null} de controles do que na de indivíduos com fatores de risco para aterosclerose, sendo que a positividade para a citocina atinge o nível mínimo na população CD4⁺CD28^{null} de pacientes AE. Nos pacientes com SCA, a porcentagem de células positivas para IFN- γ na população CD4⁺CD28^{null} após estímulo é semelhante a encontrada nos controles. Tais fatos são inesperados, uma vez que os pacientes com AE e SCA apresentam níveis de citocinas inflamatórias levemente aumentados e os indivíduos com fatores de risco para a aterosclerose se encontram em estado inflamatório subclínico. Entretanto, como apontado anteriormente, muitos pacientes dos grupos FR, AE e SCA tomam estatinas, as quais possuem comprovadas ações anti-inflamatórias. Dessa maneira, a menor frequência de células positivas para IFN- γ na população CD4⁺CD28^{null} poderia ser resultado de efeitos anti-inflamatórios diretos ou indiretos dessa classe de medicamento. Outra explicação possível é a de que nos controles a população CD4⁺CD28^{null} não estão sendo constantemente ativadas, mantendo sua capacidade total de produção de citocinas inflamatórias, enquanto nos pacientes AE e SCA e nos indivíduos com fatores de risco ela perdeu parte da sua capacidade inflamatória por estar constantemente em estado de ativação.

Os diferentes grupos também foram comparados com respeito à produção de IFN- γ e TNF- α pela população CD4⁺CD28⁺ após estímulo com anti-CD3 e ionóforo. Observou-se que o aumento da positividade para o IFN- γ nas células CD4⁺CD28⁺ se deu em igual magnitude para todos os grupos, exceto para os indivíduos com fatores de risco para a aterosclerose, que apresentaram uma menor porcentagem de células positivas para a citocina após o estímulo, sendo que a diferença em relação ao grupo de pacientes com SCA foi significativa. No que diz respeito ao IFN- γ , apenas os indivíduos com SCA apresentaram um grande número de células positivas na população CD4⁺CD28⁺ após as 6hs de incubação. Tais fatos atestam que a população CD4⁺CD28⁺ apresenta uma pequena capacidade inflamatória, sendo ativada de maneira importante somente em estágios mais graves da doença aterosclerótica, onde a magnitude da inflamação é muito maior, como ocorre nos pacientes com SCA. Nesses quadros inflamatórios, a população CD4⁺CD28⁺ pode produzir preferencialmente IFN- γ , mas em menor magnitude que a população CD4⁺CD28^{null}. Dessa maneira, as células CD4⁺CD28^{null} são as principais produtores de IFN- γ e TNF- α nas doenças coronarianas obstrutivas. Há de se destacar que tais células são ativadas em inflamações subclínicas, como ocorre nos indivíduos com fatores de risco para aterosclerose, produzindo preferencialmente TNF- α . Nos quadros mais graves, as células CD28^{null} passam, provavelmente, a produzir mais IFN- γ .

A estimulação das CMSP dos diferentes grupos com LPS por 48hs foi utilizada para se avaliar a resposta das populações de células CD4⁺ frente a um estímulo inflamatório prolongado de grande magnitude. Além disso, o LPS se liga ao TLR4 (121), expresso em macrófagos (122), receptor também capaz de se ligar ao LDL oxidado (123). Portanto, o LPS é capaz de ativar os macrófagos de maneira similar à que ocorre na placa

aterosclerótica, ativando vias de sinalização similares aquelas iniciadas pela molécula desencadeadora da aterosclerose. O TLR4 também está associado com a resposta a microrganismos patogênicos. Portanto, o estímulo das CMSP com LPS também mimetiza infecções por agentes microbianos. A ação de patógenos pode desempenhar papel importante na doença aterosclerótica, sendo que linfócitos T específicos para a HSP65 de *C. pneumoniae* foram detectados em lesões humanas (124).

Após estimulação das CMPS com LPS, a porcentagem de células positivas para as granzimas A e B no *pool* de células $CD4^+CD28^{null}$ diminui, fato que ocorre em todos os grupos. O mesmo acontece com relação à perforina, embora as diferenças sejam significativas apenas no grupo controle e no grupo AE, devido à grande variabilidade quanto à expressão desta molécula nos grupos FR e SCA. A granulisina, por sua vez, mostrou um comportamento diferente dos outros grânulos, sendo que o estímulo com LPS provocou mudanças significativas apenas na população $CD4^+CD28^{null}$ do grupo C, resultando na diminuição da porcentagem de células positivas para o grânulo. Tais dados demonstram, de maneira indireta, que as células $CD4^+CD28^{null}$ de todos os grupos degranulam em ambientes inflamatórios, liberando granzimas A e B e perforina para meio. Portanto, nosso estudo sugere que o ambiente altamente inflamatório gerado pela ativação de macrófagos nas placas ateroscleróticas leva à degranulação das células $CD4^+CD28^{null}$, o que pode acarretar desestruturação da capa fibrosa e da matriz extracelular nas lesões. Nesse sentido, a granzima A, a granzima B e a granulisina são capazes de gerar a apoptose das células, enquanto a perforina é necessária para que as granzimas possam agir, provavelmente participando do processo de liberação das granzimas do endossomo das células-alvo e auxiliando no transporte das mesmas para o núcleo, onde elas ativam as vias

de sinalização de apoptose (125). A morte de células endoteliais e de células musculares lisas enfraquece a capa fibrosa dos ateromas, tornando-a mais propensa à ruptura. Nakajima e colaboradores demonstraram que as células $CD4^+CD28^{null}$ são capazes de lisar células endoteliais (14). Além de provocar apoptose, a granzima B provoca a desestruturação da matriz extracelular pela clivagem de fibronectina, vitronectina e laminina (126). Nosso estudo mostra, portanto, que o estímulo inflamatório prolongado de alta magnitude pode ser o gatilho para a degranulação das células $CD4^+CD28^{null}$ que ocorre não só nas SCA, mas também pode estar presente nos pacientes AE.

A população $CD4^+CD28^+$, por sua vez, não apresenta alterações significativas na expressão de grânulos citotóxicos, sendo as porcentagens de células positivas para os grânulos muito pequenas tanto antes quanto após a estimulação com LPS. O aumento da frequência de células granzima B⁺ no *pool* de células $CD4^+CD28^+$ dos pacientes AE após o estímulo inflamatório, apesar estatisticamente significativo, é muito pequeno e não deve levar a um aumento significativo na citotoxicidade da população. Portanto, os dados mostram, de maneira geral, que a porcentagem de células $CD4^+CD28^+$ positivas para moléculas citotóxicas não é alterada em resposta a um estímulo inflamatório prolongado de alta magnitude.

Com relação à expressão de receptores de *homing*, a população $CD4^+CD28^{null}$ apresentou diminuição da positividade para CCR5 após estímulo com LPS, fato que ocorreu em todos os grupos. Entretanto, o CD161, após estimulação, tem sua frequência aumentada nas células $CD4^+CD28^{null}$ de todos os grupos, embora as diferenças não tenham sido significativas. O CXCR3 também está mais presente nas células dos pacientes AE após estimulação. A positividade para o CCR7, por sua vez, diminui nas células

CD4⁺CD28^{null} do grupo FR. Coletivamente, tais resultados mostram que a população CD4⁺CD28^{null} altera a expressão de receptores de *homing* frente a estímulo inflamatório prolongado de alta magnitude. Os dados ainda sugerem que, uma vez no ambiente inflamatório do ateroma, as células CD4⁺CD28^{null} alteram seus receptores. Portanto, o mecanismo de retenção das células na placa aterosclerótica pode ser diferente do mecanismo de recrutamento, sendo o primeiro mais dependente de CCR5 e o segundo mais dependente de CXCR3 e CD161. Entretanto, na ocorrência de processo infeccioso, os mecanismos de migração e retenção das células na placa podem ser semelhantes, dependentes principalmente de CXCR3 e CD161.

De maneira similar ao que ocorre com a população CD4⁺CD28^{null}, a frequência de células expressando receptores de *homing* se altera na população CD4⁺CD28⁺ após estimulação com LPS. De maneira similar ao que ocorre com as células CD4⁺CD28^{null}, a positividade para CCR5 diminui nas células CD4⁺CD28⁺ após o estímulo, enquanto a porcentagem de células CD161⁺ diminui, fatos que ocorrem em todos os grupos. O CXCR3 passa a ser expresso em uma maior porcentagem de células do grupo AE após estímulo. Já o CCR7 tem sua expressão induzida em um grande número de células da população CD4⁺CD28⁺ após estímulo. A porcentagem de células expressando CCR7 já é alta no *pool* de linfócitos CD4⁺CD28⁺ sem estímulo de controles e pacientes SCA. Coletivamente tais resultados mostram que as células CD4⁺CD28⁺ podem ser menos dependentes de CD161 para retenção nas placas, sendo o CXCR3 o principal responsável. Além disso, o aumento da expressão de CCR7 e a leve diminuição da positividade para o CCR5 frente a estímulo inflamatório sugerem que uma parcela importante da população CD4⁺CD28⁺ é *naive* e, portanto, precisa ser direcionada para os linfonodos para haver a apresentação de antígeno e

a consequente ativação das células. Dessa maneira, sabe-se que os linfócitos $CD4^+CD28^+$ têm a sua atividade dependente da ativação antigênica, enquanto as células $CD4^+CD28^{null}$ possuem atividade inflamatória e citotóxica independente de ativação prévia via TCR (14).

Diante dos resultados expostos anteriormente, fica claro que a população de células $CD4^+CD28^{null}$ possui alta capacidade lesiva, podendo contribuir com processos patológicos de caráter inflamatório. Portanto, a fim de se verificar a existência de processo inflamatório em curso nos indivíduos dos diferentes grupos e se determinar a magnitude de tais processos, realizou-se a dosagem da proteína C reativa pelo método ultra-sensível. Os resultados mostraram que os indivíduos com fatores de risco para aterosclerose apresentam uma concentração plasmática da PCR significativamente maior que o grupo controle e levemente aumentada em relação aos indivíduos do grupo AE. Tais resultados estão de acordo com o que foi relatado na literatura, já que Sesso e colaboradores (47) detectaram níveis elevados de PCR em indivíduos com hipertensão arterial (fator de risco presente em quase todos os indivíduos do grupo FR). Uma vez que a PCR é um marcador rotineiramente utilizado para detecção e acompanhamento de processos inflamatórios, sendo altamente sensível (127), fica evidente que tais indivíduos apresentam um processo inflamatório crônico subclínico. Dessa maneira, o processo inflamatório crônico pode contribuir para o maior risco para doenças cardiovasculares nesses indivíduos. Diante dos resultados expostos anteriormente, o *pool* de células $CD4^+CD28^{null}$ encontra-se mais ativado no grupo FR, sendo altamente citotóxico e inflamatório, com alto potencial lesivo. Nesse sentido, a população $CD28^{null}$ pode contribuir para o aumento dos níveis da PCR em portadores de fatores de risco para aterosclerose através da participação no processo inflamatório em andamento. Entretanto, não encontramos nenhuma correlação entre os

parâmetros analisados nas células $CD4^+CD28^{null}$ *ex-vivo* com os respectivos níveis plasmáticos da PCR.

Ainda com relação à concentração plasmática da PCR, nota-se que os indivíduos do grupo SCA apresentam valores bem mais altos em relação aos outros grupos, o que é esperado diante do quadro altamente inflamatório que apresentam. Já os indivíduos com doença coronariana crônica (grupo AE) apresentam concentrações plasmáticas de PCR baixas, sendo um pouco inferiores às encontradas nos indivíduos com fatores de risco e um pouco superiores aos indivíduos controle. Esses resultados são similares aos descritos na **figura 7**, que mostra maior frequência de células $CD4^+CD28^{null}$ positivas para perforina e granzimas A e B nos indivíduos FR e SCA do que nos grupos C e AE. Os pacientes com AE são os que geralmente fazem uso mais prolongado das estatinas e outras drogas com atividade anti-inflamatória, como a aspirina. Em trabalho anterior de nosso grupo verificamos valores baixos de PCR e SAA (soro amilóide A), outra proteína de fase aguda, em pacientes com AE comparados com indivíduos com SCA (110).

Diante do exposto, tomando como base o conjunto dos resultados, vemos que as células $CD4^+CD28^{null}$ possuem capacidade citotóxica, inflamatória e migratória em todos os grupos analisados (grupos C, FR, AE e SCA). Entretanto, os resultados apontam um modelo no qual a população $CD4^+CD28^{null}$ passa por modificações sequenciais, sendo altamente lesiva nos indivíduos SCA. Nesse sentido, nos indivíduos controle as células já teriam capacidade citotóxica (expressão de grânulos citotóxicos) e inflamatória (expressão de IFN- γ e TNF- α após estímulo), além de estarem prontas para migrar para a lesão (presença de CD161 e CCR5), mas não são lesivas e não migram porque não são estimuladas por sinais desencadeados pelo ateroma (quimiocinas, principalmente). Nos

indivíduos com fatores de risco, a população $CD4^+CD28^{null}$ se torna altamente citotóxica e apresenta um aumento da capacidade de *homing* para a lesão. Nesse sentido, Chen e colaboradores (128) detectaram um aumento na adesão de CMSP de indivíduos hipertensos a células endoteliais, enquanto Fukuda e colaboradores (129) constataram que, em modelos animais, mediadores inflamatórios podem alterar as características dos leucócitos, tornando-os mais adesivos. Nesses indivíduos, as células $CD4^+CD28^{null}$ produziram principalmente $TNF-\alpha$ quando ativadas, favorecendo a ativação do endotélio dos vasos sanguíneos, com o aumento da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais. Nos indivíduos AE, as células são expostas às citocinas provenientes do ateroma e se ligam às moléculas de adesão já expressas no endotélio, migrando em número significativo para o ateroma e degranulando, o que culmina no agravamento das lesões. Após degranularem, células da população $CD4^+CD28^{null}$ seriam continuamente reativadas e recrutadas para as lesões, tornando-se altamente lesivas, culminando com a ocorrência de síndromes coronarianas agudas. Portanto, os resultados sugerem que os fatores de risco atuam aumentando a capacidade citotóxica, inflamatória e migratória da população $CD4^+CD28^{null}$.

Limitações do estudo

O estudo ficou limitado pelo pequeno número de indivíduos, principalmente no grupo controle e nos experimentos de estimulação em cultura.

Outro ponto a ser destacado é a grande desproporção homem/mulher em alguns grupos, como o FR (predomínio de mulheres) e o AE (predomínio de homens), conforme mencionado no início da discussão. Entretanto, não há relato na literatura mostrando qualquer influência do sexo sobre a frequência ou fenótipo das células $CD4^+CD28^{null}$.

O uso do índice de massa corpórea ou circunferência abdominal para caracterizar os indivíduos estudados nos permitiria uma melhor caracterização dos grupos, uma vez que estes podem estar associados também ao conjunto de modificações inflamatórias. Entretanto, estes dados não foram colhidos de rotina e não pudemos realizar tal análise. De qualquer forma, a interferência destes achados pode ser considerada indireta e refletida nos fatores de risco e demais variáveis clínicas colhidas, de modo que esta limitação foi minimizada.

Outro ponto importante é que o estudo se focou na análise de células do sangue periférico *ex vivo* e após estimulação *in vitro*, portanto, fora do ambiente inflamatório da lesão. Entretanto, a estimulação prolongada com LPS teve o objetivo de simular um estímulo inflamatório crônico, mimetizando o microambiente do ateroma.

Implicações clínicas

Os resultados do estudo reforçam a ideia de que os indivíduos com fatores de risco para aterosclerose, como hipertensão, diabetes, dislipidemia e tabagismo, devem receber tratamento agressivo, objetivando a redução do processo inflamatório vigente. Terapias com metas mais rígidas têm sido advogadas nas principais diretrizes e grandes trabalhos multicêntricos, levando em consideração os principais fatores de risco para doenças cardiovasculares, especialmente HAS (130), diabetes (131) e dislipidemia (132).

Nesse sentido, o estudo JUPITER demonstrou que o uso de rosuvastatina para o tratamento de pacientes com baixos níveis de LDL-c (<130mg/dL) e concentrações de PCR ultra-sensível maiores ou iguais a 2mg/L resultou em uma redução de 44% no número de

eventos cardiovasculares (103). Portanto, tratamentos objetivando a redução do processo inflamatório levam a um menor risco cardiovascular.

A alta frequência de células expressando moléculas citotóxicas, principalmente nos grupos FR e SCA, merece um estudo mais aprofundado no sentido de melhor estabelecer o seu papel na doença. Os achados aqui demonstrados sugerem que a avaliação das moléculas citotóxicas poderia auxiliar no prognóstico dos indivíduos estudados. Além disso, nossos resultados sugerem que terapias capazes de inibir as células $CD4^{+}CD28^{null}$ poderiam ser benéficas, principalmente com relação aos indivíduos com fatores de risco para aterosclerose e pacientes com síndromes coronarianas agudas.



Conclusões

Coletivamente, nossos resultados mostraram que os fatores de risco para aterosclerose causam alterações fenotípicas na população $CD4^+CD28^{null}$, tornando-a mais citotóxica e inflamatória, o que poderia estar associado com a inflamação subclínica observada nessas condições. Além disso, os dados sugerem que as células $CD4^+CD28^{null}$ degranulam e alteram a expressão de receptores de *homing* quando estão em ambiente inflamatório, como ocorre na placa aterosclerótica e/ou na vigência de infecções microbianas.



Referências Bibliográficas

1. Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 1997; 349 (9064): 1498-504.
2. Endo A. A gift from nature: the birth of the statins. *Nat Med*. 2008; 14 (10): 1050-2.
3. Sociedade Brasileira de Cardiologia. IV Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. *Arq Bras Cardiol*. 2004; 82.
4. Ribeiro RA, Mello RG, Melchior R, Dill JC, Hohmann CB, Lucchese AM et al. [Annual cost of ischemic heart disease in Brazil. Public and private perspective]. *Arq Bras Cardiol*. 2005; 85 (1): 3-8.
5. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002; 420 (6917): 868-74.
6. Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6 (7): 508-19.
7. Liuzzo G, Giubilato G, Pinnelli M. T cells and cytokines in atherogenesis. *Lupus*. 2005; 14 (9): 732-5.
8. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*. 1999; 138 (5 Pt 2): S419-20.
9. Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem*. 1997; 272 (34): 20963-6.
10. Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92 (18): 8264-8.
11. Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol*. 2002; 14 (1): 123-8.
12. Buono C, Lichtman AH. Co-stimulation and plaque-antigen-specific T-cell responses in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*. 2004; 14 (4): 166-72.
13. Nakajima T, Goek O, Zhang X, Kopecky SL, Frye RL, Goronzy JJ et al. De novo expression of killer immunoglobulin-like receptors and signaling

- proteins regulates the cytotoxic function of CD4 T cells in acute coronary syndromes. *Circ Res*. 2003; 93 (2): 106-13.
14. Nakajima T, Schulte S, Warrington KJ, Kopecky SL, Frye RL, Goronzy JJ et al. T-cell-mediated lysis of endothelial cells in acute coronary syndromes. *Circulation*. 2002; 105 (5): 570-5.
 15. Zhang X, Niessner A, Nakajima T, Ma-Krupa W, Kopecky SL, Frye RL et al. Interleukin 12 induces T-cell recruitment into the atherosclerotic plaque. *Circ Res*. 2006; 98 (4): 524-31.
 16. Hansson GK, Hellstrand M, Rymo L, Rubbia L, Gabbiani G. Interferon gamma inhibits both proliferation and expression of differentiation-specific alpha-smooth muscle actin in arterial smooth muscle cells. *J Exp Med*. 1989; 170 (5): 1595-608.
 17. Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb*. 1991; 11 (5): 1223-30.
 18. Saren P, Welgus HG, Kovanen PT. TNF-alpha and IL-1beta selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages. *J Immunol*. 1996; 157 (9): 4159-65.
 19. Zal B, Kaski JC, Arno G, Akiyu JP, Xu Q, Cole D et al. Heat-shock protein 60-reactive CD4+CD28null T cells in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*. 2004; 109 (10): 1230-5.
 20. Warrington KJ, Vallejo AN, Weyand CM, Goronzy JJ. CD28 loss in senescent CD4+ T cells: reversal by interleukin-12 stimulation. *Blood*. 2003; 101 (9): 3543-9.
 21. Vallejo AN, Brandes JC, Weyand CM, Goronzy JJ. Modulation of CD28 expression: distinct regulatory pathways during activation and replicative senescence. *J Immunol*. 1999; 162 (11): 6572-9.
 22. Bryl E, Vallejo AN, Weyand CM, Goronzy JJ. Down-regulation of CD28 expression by TNF-alpha. *J Immunol*. 2001; 167 (6): 3231-8.

23. Rizzello V, Liuzzo G, Brugaletta S, Rebuzzi A, Biasucci LM, Crea F. Modulation of CD4(+)CD28null T lymphocytes by tumor necrosis factor- α blockade in patients with unstable angina. *Circulation*. 2006; 113 (19): 2272-7.
24. Namekawa T, Snyder MR, Yen JH, Goehring BE, Leibson PJ, Weyand CM et al. Killer cell activating receptors function as costimulatory molecules on CD4+CD28null T cells clonally expanded in rheumatoid arthritis. *J Immunol*. 2000; 165 (2): 1138-45.
25. Vallejo AN, Schirmer M, Weyand CM, Goronzy JJ. Clonality and longevity of CD4+CD28null T cells are associated with defects in apoptotic pathways. *J Immunol*. 2000; 165 (11): 6301-7.
26. Schirmer M, Vallejo AN, Weyand CM, Goronzy JJ. Resistance to apoptosis and elevated expression of Bcl-2 in clonally expanded CD4+CD28- T cells from rheumatoid arthritis patients. *J Immunol*. 1998; 161 (2): 1018-25.
27. Thewissen M, Somers V, Hellings N, Fraussen J, Damoiseaux J, Stinissen P. CD4+CD28null T cells in autoimmune disease: pathogenic features and decreased susceptibility to immunoregulation. *J Immunol*. 2007; 179 (10): 6514-23.
28. Gerli R, Schillaci G, Giordano A, Bocci EB, Bistoni O, Vaudo G et al. CD4+CD28- T lymphocytes contribute to early atherosclerotic damage in rheumatoid arthritis patients. *Circulation*. 2004; 109 (22): 2744-8.
29. Clayberger C, Krensky AM. Granulysin. *Curr Opin Immunol*. 2003; 15 (5): 560-5.
30. Snyder MR, Nakajima T, Leibson PJ, Weyand CM, Goronzy JJ. Stimulatory killer Ig-like receptors modulate T cell activation through DAP12-dependent and DAP12-independent mechanisms. *J Immunol*. 2004; 173 (6): 3725-31.
31. Sato K, Niessner A, Kopecky SL, Frye RL, Goronzy JJ, Weyand CM. TRAIL-expressing T cells induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in the atherosclerotic plaque. *J Exp Med*. 2006; 203 (1): 239-50.

32. Raffeiner B, Dejaco C, Duftner C, Kullich W, Goldberger C, Vega SC et al. Between adaptive and innate immunity: TLR4-mediated perforin production by CD28null T-helper cells in ankylosing spondylitis. *Arthritis Res Ther*. 2005; 7 (6): R1412-20.
33. Morishita Y, Sao H, Hansen JA, Martin PJ. A distinct subset of human CD4+ cells with a limited alloreactive T cell receptor repertoire. *J Immunol*. 1989; 143 (9): 2783-9.
34. Ramos-Casals M, Garcia-Carrasco M, Brito MP, Lopez-Soto A, Font J. Autoimmunity and geriatrics: clinical significance of autoimmune manifestations in the elderly. *Lupus*. 2003; 12 (5): 341-55.
35. Sun Z, Zhong W, Lu X, Shi B, Zhu Y, Chen L et al. Association of Graves' disease and prevalence of circulating IFN-gamma-producing CD28(-) T cells. *J Clin Immunol*. 2008; 28 (5): 464-72.
36. Markovic-Plese S, Cortese I, Wandinger KP, McFarland HF, Martin R. CD4+CD28- costimulation-independent T cells in multiple sclerosis. *J Clin Invest*. 2001; 108 (8): 1185-94.
37. Lamprecht P, Moosig F, Csernok E, Seitzer U, Schnabel A, Mueller A et al. CD28 negative T cells are enriched in granulomatous lesions of the respiratory tract in Wegener's granulomatosis. *Thorax*. 2001; 56 (10): 751-7.
38. Thewissen M, Somers V, Venken K, Linsen L, van Paassen P, Geusens P et al. Analyses of immunosenescent markers in patients with autoimmune disease. *Clin Immunol*. 2007; 123 (2): 209-18.
39. Miyazaki Y, Iwabuchi K, Kikuchi S, Fukazawa T, Niino M, Hirotsu M et al. Expansion of CD4+CD28- T cells producing high levels of interferon- γ in peripheral blood of patients with multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2008; 14 (8): 1044-55.
40. Fasth AE, Dastmalchi M, Rahbar A, Salomonsson S, Pandya JM, Lindroos E et al. T cell infiltrates in the muscles of patients with dermatomyositis and

- polymyositis are dominated by CD28null T cells. *J Immunol.* 2009; 183 (7): 4792-9.
41. Wang Y, Bai J, Li F, Wang H, Fu X, Zhao T et al. Characteristics of expanded CD4+CD28null T cells in patients with chronic hepatitis B. *Immunol Invest.* 2009; 38 (5): 434-46.
 42. Albareda MC, Olivera GC, Laucella SA, Alvarez MG, Fernandez ER, Lococo B et al. Chronic human infection with *Trypanosoma cruzi* drives CD4+ T cells to immune senescence. *J Immunol.* 2009; 183 (6): 4103-8.
 43. Menezes CA, Rocha MO, Souza PE, Chaves AC, Gollob KJ, Dutra WO. Phenotypic and functional characteristics of CD28+ and CD28- cells from chagasic patients: distinct repertoire and cytokine expression. *Clin Exp Immunol.* 2004; 137 (1): 129-38.
 44. Pepine CJ. Systemic hypertension and coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 1998; 82 (3A): 21H-4H.
 45. Edwards KM, Ziegler MG, Mills PJ. The potential anti-inflammatory benefits of improving physical fitness in hypertension. *J Hypertens.* 2007; 25 (8): 1533-42.
 46. Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation.* 2003; 107 (3): 391-7.
 47. Sesso HD, Buring JE, Rifai N, Blake GJ, Gaziano JM, Ridker PM. C-reactive protein and the risk of developing hypertension. *JAMA.* 2003; 290 (22): 2945-51.
 48. Paravicini TM, Touyz RM. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res.* 2006; 71 (2): 247-58.
 49. Unger T. Significance of angiotensin type 1 receptor blockade: why are angiotensin II receptor blockers different? *Am J Cardiol.* 1999; 84 (10A): 9S-15S.
 50. Rizvi AA. Hypertension, Obesity, and Inflammation: The Complex Designs of a Deadly Trio. *Metab Syndr Relat Disord.*

51. Fasth AE, Snir O, Johansson AA, Nordmark B, Rahbar A, Af Klint E et al. Skewed distribution of proinflammatory CD4+CD28null T cells in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2007; 9 (5): R87.
52. Schieffer B, Luchtefeld M, Braun S, Hilfiker A, Hilfiker-Kleiner D, Drexler H. Role of NAD(P)H oxidase in angiotensin II-induced JAK/STAT signaling and cytokine induction. *Circ Res.* 2000; 87 (12): 1195-201.
53. Peeters AC, Netea MG, Janssen MC, Kullberg BJ, Van der Meer JW, Thien T. Pro-inflammatory cytokines in patients with essential hypertension. *Eur J Clin Invest.* 2001; 31 (1): 31-6.
54. Chae CU, Lee RT, Rifai N, Ridker PM. Blood pressure and inflammation in apparently healthy men. *Hypertension.* 2001; 38 (3): 399-403.
55. Cheng ZJ, Vapaatalo H, Mervaala E. Angiotensin II and vascular inflammation. *Med Sci Monit.* 2005; 11 (6): RA194-205.
56. Tabet F, Savoia C, Schiffrin EL, Touyz RM. Differential calcium regulation by hydrogen peroxide and superoxide in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004; 44 (2): 200-8.
57. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000; 87 (10): 840-4.
58. Negrean M, Stirban A, Stratmann B, Gawlowski T, Horstmann T, Gotting C et al. Effects of low- and high-advanced glycation endproduct meals on macro- and microvascular endothelial function and oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr.* 2007; 85 (5): 1236-43.
59. Baynes JW, Thorpe SR. Glycooxidation and lipoxidation in atherogenesis. *Free Radic Biol Med.* 2000; 28 (12): 1708-16.
60. Xanthis A, Hatzitolios A, Koliakos G, Tatola V. Advanced glycosylation end products and nutrition--a possible relation with diabetic atherosclerosis and how to prevent it. *J Food Sci.* 2007; 72 (8): R125-9.

61. Vlassara H, Palace MR. Diabetes and advanced glycation endproducts. *J Intern Med.* 2002; 251 (2): 87-101.
62. Esposito C, Gerlach H, Brett J, Stern D, Vlassara H. Endothelial receptor-mediated binding of glucose-modified albumin is associated with increased monolayer permeability and modulation of cell surface coagulant properties. *J Exp Med.* 1989; 170 (4): 1387-407.
63. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation.* 2002; 106 (25): 3143-421.
64. Schaefer EJ, Asztalos BF. Increasing high-density lipoprotein cholesterol, inhibition of cholesteryl ester transfer protein, and heart disease risk reduction. *Am J Cardiol.* 2007; 100 (11 A): n25-31.
65. Barter PJ, Puranik R, Rye KA. New insights into the role of HDL as an anti-inflammatory agent in the prevention of cardiovascular disease. *Curr Cardiol Rep.* 2007; 9 (6): 493-8.
66. Yuhanna IS, Zhu Y, Cox BE, Hahner LD, Osborne-Lawrence S, Lu P et al. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med.* 2001; 7 (7): 853-7.
67. Spieker LE, Sudano I, Hurlimann D, Lerch PG, Lang MG, Binggeli C et al. High-density lipoprotein restores endothelial function in hypercholesterolemic men. *Circulation.* 2002; 105 (12): 1399-402.
68. Ashby DT, Rye KA, Clay MA, Vadas MA, Gamble JR, Barter PJ. Factors influencing the ability of HDL to inhibit expression of vascular cell adhesion molecule-1 in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18 (9): 1450-5.
69. Cockerill GW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15 (11): 1987-94.

70. Dansky HM, Charlton SA, Barlow CB, Tamminen M, Smith JD, Frank JS et al. Apo A-I inhibits foam cell formation in Apo E-deficient mice after monocyte adherence to endothelium. *J Clin Invest.* 1999; 104 (1): 31-9.
71. Hessler JR, Robertson AL, Jr., Chisolm GM, 3rd. LDL-induced cytotoxicity and its inhibition by HDL in human vascular smooth muscle and endothelial cells in culture. *Atherosclerosis.* 1979; 32 (3): 213-29.
72. Whaley-Connell A, Sowers JR. Hypertension and insulin resistance. *Hypertension.* 2009; 54 (3): 462-4.
73. Kurukulasuriya LR, Stas S, Lastra G, Manrique C, Sowers JR. Hypertension in obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2008; 37 (3): 647-62, ix.
74. Wei Y, Chen K, Whaley-Connell AT, Stump CS, Ibdah JA, Sowers JR. Skeletal muscle insulin resistance: role of inflammatory cytokines and reactive oxygen species. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008; 294 (3): R673-80.
75. Cnop M, Havel PJ, Utzschneider KM, Carr DB, Sinha MK, Boyko EJ et al. Relationship of adiponectin to body fat distribution, insulin sensitivity and plasma lipoproteins: evidence for independent roles of age and sex. *Diabetologia.* 2003; 46 (4): 459-69.
76. Sowers JR. Endocrine functions of adipose tissue: focus on adiponectin. *Clin Cornerstone.* 2008; 9 (1): 32-8; discussion 9-40.
77. Cano P, Cardinali DP, Rios-Lugo MJ, Fernandez-Mateos MP, Reyes Toso CF, Esquifino AI. Effect of a high-fat diet on 24-hour pattern of circulating adipocytokines in rats. *Obesity (Silver Spring).* 2009; 17 (10): 1866-71.
78. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med.* 2001; 7 (8): 941-6.
79. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993; 259 (5091): 87-91.

80. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest.* 2007; 117 (1): 175-84.
81. Suganami T, Nishida J, Ogawa Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25 (10): 2062-8.
82. Yanbaeva DG, Dentener MA, Creutzberg EC, Wesseling G, Wouters EF. Systemic effects of smoking. *Chest.* 2007; 131 (5): 1557-66.
83. Pryor WA, Stone K. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxynitrate, and peroxynitrite. *Ann N Y Acad Sci.* 1993; 686: 12-27; discussion -8.
84. Yamaguchi Y, Haginaka J, Morimoto S, Fujioka Y, Kunitomo M. Facilitated nitration and oxidation of LDL in cigarette smokers. *Eur J Clin Invest.* 2005; 35 (3): 186-93.
85. Pignatelli B, Li CQ, Boffetta P, Chen Q, Ahrens W, Nyberg F et al. Nitrated and oxidized plasma proteins in smokers and lung cancer patients. *Cancer Res.* 2001; 61 (2): 778-84.
86. Wei W, Kim Y, Boudreau N. Association of smoking with serum and dietary levels of antioxidants in adults: NHANES III, 1988-1994. *Am J Public Health.* 2001; 91 (2): 258-64.
87. Wannamethee SG, Lowe GD, Shaper AG, Rumley A, Lennon L, Whincup PH. Associations between cigarette smoking, pipe/cigar smoking, and smoking cessation, and haemostatic and inflammatory markers for cardiovascular disease. *Eur Heart J.* 2005; 26 (17): 1765-73.
88. Danesh J, Whincup P, Walker M, Lennon L, Thomson A, Appleby P et al. Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses. *BMJ.* 2000; 321 (7255): 199-204.

89. Bermudez EA, Rifai N, Buring JE, Manson JE, Ridker PM. Relation between markers of systemic vascular inflammation and smoking in women. *Am J Cardiol.* 2002; 89 (9): 1117-9.
90. Helmersson J, Larsson A, Vessby B, Basu S. Active smoking and a history of smoking are associated with enhanced prostaglandin F(2alpha), interleukin-6 and F2-isoprostane formation in elderly men. *Atherosclerosis.* 2005; 181 (1): 201-7.
91. Raines EW. Antigen-independent targeting of long-lived CD4+ cytolytic T effector cells to lesions of atherosclerosis. *Circ Res.* 2006; 98 (4): 434-6.
92. Liuzzo G, Kopecky SL, Frye RL, O'Fallon WM, Maseri A, Goronzy JJ et al. Perturbation of the T-cell repertoire in patients with unstable angina. *Circulation.* 1999; 100 (21): 2135-9.
93. Liuzzo G, Biasucci LM, Trotta G, Brugaletta S, Pinnelli M, DiGiannuario G et al. Unusual CD4+CD28null T lymphocytes and recurrence of acute coronary events. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 50 (15): 1450-8.
94. Vallejo AN, Weyand CM, Goronzy JJ. T-cell senescence: a culprit of immune abnormalities in chronic inflammation and persistent infection. *Trends Mol Med.* 2004; 10 (3): 119-24.
95. Arnal JF, Laurell H, Fontaine C, Billon A, Calippe B, Lenfant F et al. Estrogen receptor actions on vascular biology and inflammation: implications in vascular pathophysiology. *Climacteric.* 2009; 12 Suppl 1: 12-7.
96. Arnal JF, Scarabin PY, Tremollieres F, Laurell H, Gourdy P. Estrogens in vascular biology and disease: where do we stand today? *Curr Opin Lipidol.* 2007; 18 (5): 554-60.
97. Liuzzo G, Goronzy JJ, Yang H, Kopecky SL, Holmes DR, Frye RL et al. Monoclonal T-cell proliferation and plaque instability in acute coronary syndromes. *Circulation.* 2000; 101 (25): 2883-8.
98. Brugaletta S, Biasucci LM, Pinnelli M, Biondi-Zoccai G, Di Giannuario G, Trotta G et al. Novel anti-inflammatory effect of statins: reduction of

- CD4+CD28null T lymphocyte frequency in patients with unstable angina. *Heart*. 2006; 92 (2): 249-50.
99. Hoeg JM, Brewer HB, Jr. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl--coenzyme A reductase inhibitors in the treatment of hypercholesterolemia. *JAMA*. 1987; 258 (24): 3532-6.
 100. Illingworth DR, Bacon S. Hypolipidemic effects of HMG-CoA reductase inhibitors in patients with hypercholesterolemia. *Am J Cardiol*. 1987; 60 (12): 33G-42G.
 101. Montecucco F, Mach F. Update on statin-mediated anti-inflammatory activities in atherosclerosis. *Semin Immunopathol*. 2009; 31 (1): 127-42.
 102. Kim YS, Ahn Y, Hong MH, Kim KH, Park HW, Hong YJ et al. Rosuvastatin suppresses the inflammatory responses through inhibition of c-Jun N-terminal kinase and Nuclear Factor-kappaB in endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2007; 49 (6): 376-83.
 103. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM, Jr., Kastelein JJ et al. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med*. 2008; 359 (21): 2195-207.
 104. Chen H, Ren JY, Xing Y, Zhang WL, Liu X, Wu P et al. Short-term withdrawal of simvastatin induces endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease: a dose-response effect dependent on endothelial nitric oxide synthase. *Int J Cardiol*. 2009; 131 (3): 313-20.
 105. Veillard NR, Brauersreuther V, Arnaud C, Burger F, Pelli G, Steffens S et al. Simvastatin modulates chemokine and chemokine receptor expression by geranylgeranyl isoprenoid pathway in human endothelial cells and macrophages. *Atherosclerosis*. 2006; 188 (1): 51-8.
 106. Methe H, Kim JO, Kofler S, Nabauer M, Weis M. Statins decrease Toll-like receptor 4 expression and downstream signaling in human CD14+ monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005; 25 (7): 1439-45.

107. Rudich SM, Mongini PK, Perez RV, Katznelson S. HMG-CoA reductase inhibitors pravastatin and simvastatin inhibit human B-lymphocyte activation. *Transplant Proc.* 1998; 30 (4): 992-5.
108. Ulivieri C, Fanigliulo D, Benati D, Pasini FL, Baldari CT. Simvastatin impairs humoral and cell-mediated immunity in mice by inhibiting lymphocyte homing, T-cell activation and antigen cross-presentation. *Eur J Immunol.* 2008; 38 (10): 2832-44.
109. Alber HF, Duftner C, Wanitschek M, Dorler J, Schirmer M, Suessenbacher A et al. Neopterin, CD4+CD28- lymphocytes and the extent and severity of coronary artery disease. *Int J Cardiol.* 2009; 135 (1): 27-35.
110. Fernandes JL, Mamoni RL, Orford JL, Garcia C, Selwyn AP, Coelho OR et al. Increased Th1 activity in patients with coronary artery disease. *Cytokine.* 2004; 26 (3): 131-7.
111. Barron HV, Cannon CP, Murphy SA, Braunwald E, Gibson CM. Association between white blood cell count, epicardial blood flow, myocardial perfusion, and clinical outcomes in the setting of acute myocardial infarction: a thrombolysis in myocardial infarction 10 substudy. *Circulation.* 2000; 102 (19): 2329-34.
112. Namekawa T, Wagner UG, Goronzy JJ, Weyand CM. Functional subsets of CD4 T cells in rheumatoid synovitis. *Arthritis Rheum.* 1998; 41 (12): 2108-16.
113. Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ et al. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science.* 1998; 282 (5386): 121-5.
114. Ochoa MT, Stenger S, Sieling PA, Thoma-Uszynski S, Sabet S, Cho S et al. T-cell release of granulysin contributes to host defense in leprosy. *Nat Med.* 2001; 7 (2): 174-9.
115. Ma LL, Spurrell JC, Wang JF, Neely GG, Epelman S, Krensky AM et al. CD8 T cell-mediated killing of *Cryptococcus neoformans* requires granulysin

- and is dependent on CD4 T cells and IL-15. *J Immunol.* 2002; 169 (10): 5787-95.
116. Ernst WA, Thoma-Uszynski S, Teitelbaum R, Ko C, Hanson DA, Clayberger C et al. Granulysin, a T cell product, kills bacteria by altering membrane permeability. *J Immunol.* 2000; 165 (12): 7102-8.
 117. Smeeth L, Thomas SL, Hall AJ, Hubbard R, Farrington P, Vallance P. Risk of myocardial infarction and stroke after acute infection or vaccination. *N Engl J Med.* 2004; 351 (25): 2611-8.
 118. Wilcox JN, Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Schall TJ. Local expression of inflammatory cytokines in human atherosclerotic plaques. *J Atheroscler Thromb.* 1994; 1 Suppl 1: S10-3.
 119. Mach F, Sauty A, Iarossi AS, Sukhova GK, Neote K, Libby P et al. Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. *J Clin Invest.* 1999; 104 (8): 1041-50.
 120. Damas JK, Smith C, Oie E, Fevang B, Halvorsen B, Waehre T et al. Enhanced expression of the homeostatic chemokines CCL19 and CCL21 in clinical and experimental atherosclerosis: possible pathogenic role in plaque destabilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27 (3): 614-20.
 121. Tapping RI, Akashi S, Miyake K, Godowski PJ, Tobias PS. Toll-like receptor 4, but not toll-like receptor 2, is a signaling receptor for Escherichia and Salmonella lipopolysaccharides. *J Immunol.* 2000; 165 (10): 5780-7.
 122. Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, Yan ZQ. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation.* 2002; 105 (10): 1158-61.
 123. Michelsen KS, Doherty TM, Shah PK, Arditi M. TLR signaling: an emerging bridge from innate immunity to atherogenesis. *J Immunol.* 2004; 173 (10): 5901-7.
 124. Kol A, Sukhova GK, Lichtman AH, Libby P. Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis

- factor-alpha and matrix metalloproteinase expression. *Circulation*. 1998; 98 (4): 300-7.
125. Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3 (5): 361-70.
 126. Buzza MS, Zamurs L, Sun J, Bird CH, Smith AI, Trapani JA et al. Extracellular matrix remodeling by human granzyme B via cleavage of vitronectin, fibronectin, and laminin. *J Biol Chem*. 2005; 280 (25): 23549-58.
 127. Ridker PM. C-reactive protein, inflammation, and cardiovascular disease: clinical update. *Tex Heart Inst J*. 2005; 32 (3): 384-6.
 128. Chen NG, Abbasi F, Lamendola C, McLaughlin T, Cooke JP, Tsao PS et al. Mononuclear cell adherence to cultured endothelium is enhanced by hypertension and insulin resistance in healthy nondiabetic volunteers. *Circulation*. 1999; 100 (9): 940-3.
 129. Fukuda S, Yasu T, Predescu DN, Schmid-Schonbein GW. Mechanisms for regulation of fluid shear stress response in circulating leukocytes. *Circ Res*. 2000; 86 (1): E13-8.
 130. SBC, SBH, SBN. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Arq Bras Cardiol*. 2010; 95 (1 supl 1): 1-51.
 131. ADA. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care*. 2010; 33 Suppl 1: S11-61.
 132. Lin Y, Mousa SS, Elshourbagy N, Mousa SA. Current status and future directions in lipid management: emphasizing low-density lipoproteins, high-density lipoproteins, and triglycerides as targets for therapy. *Vasc Health Risk Manag*. 2010; 6: 73-85.



Anexos

Anexo 1 - Parecer CEP No 665/2007



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 23/10/07.
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 665/2007 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0497.0.146.000-07

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS TCD4+ CD28NULL EM PACIENTES COM DOENÇA CORONARIANA E INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS PORTADORES DE FATORES DE RISCO PARA ATROSCLOEROSE".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Fábio Haach Téó

INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas / UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 11/09/2007

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 23/10/08 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Verificar se há diferenças quanto ao número e as características das células T CD4+ CD28 null presentes no sangue periférico de pacientes com doença coronariana e indivíduos saudáveis com e sem fatores de risco para o desenvolvimento de aterosclerose.

III - SUMÁRIO

Serão selecionados pacientes nos Ambulatórios da Disciplina de Cardiologia e na Unidade Coronariana do HC/UNICAMP. Serão divididos em 3 grupos (32 indivíduos cada). O grupo I será formado por pacientes sem doença coronariana portadores de risco para o desenvolvimento de aterosclerose, enquanto o grupo II será formado por indivíduos com doença coronariana crônica estabelecida. O grupo III será constituído por pacientes com síndrome coronária aguda e o grupo IV por indivíduos que não apresentam doença coronariana e fatores de risco para a aterosclerose. Amostras de sangue periférico serão obtidas de cada indivíduo para caracterizar as células T CD4+ CD28null e as moléculas relacionadas a citotoxicidade e a resposta inflamatória antes e após estimulação *in vitro* com antígenos comumente presentes na placa aterosclerótica.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Projeto bem estruturado, com cálculo adequado de tamanho amostral. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido adequado. Recomenda-se que sejam emitidos laudos dos testes laboratoriais e anexados ao prontuário médico.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas - SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br



V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

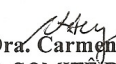
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na X Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 23 de outubro de 2007.


Prof. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Nome do Estudo: Quantificação e caracterização das células TCD4⁺ CD28^{null} em pacientes com doença coronária e indivíduos saudáveis portadores de fatores de risco para aterosclerose

Pesquisador Principal: Fábio Haach Téó

Orientadores: Profa. Dra. Maria Heloisa Souza Lima Blotta

Prof. Dr. Juliano de Lara Fernandes

Local: Hospital das Clínicas - UNICAMP

Nome do Paciente: _____ Idade: _____

RG: _____ HC: _____ Fone: _____

Endereço:

Contatos:

Fábio Haach Téó – (19) 3788-8991.

Profa. Dra. Maria Heloisa Souza Lima Blotta – (19) 3788 9453 – (19) 9798-7660.

Prof. Dr. Juliano de Lara Fernandes - (19) 3251-04-77 - (19) 3788-8991.

Objetivos do Estudo:

Nós pedimos a permissão de incluir o (a) senhor (a) como participante de um protocolo de pesquisa. O objetivo deste estudo é verificar a quantidade de um tipo de célula denominada linfócito T CD4⁺ CD28^{null} no sangue e analisar algumas substâncias por ela produzidas. Esse tipo de célula e os seus produtos têm sido relacionados a certas doenças do coração, como a angina (dor) no peito. Em alguns tipos de angina, o número dessas células no sangue aumenta e há uma maior quantidade das substâncias por elas fabricadas. Estudos mostram que essas células, através de seus produtos, estão envolvidas na formação de aterosclerose e na sua progressão, o que levaria aos quadros de angina. Queremos investigar a quantidade dessas células e os produtos liberados por elas em diferentes tipos de angina e em pessoas saudáveis com fatores de risco para a aterosclerose. Este estudo permitirá aos médicos compreender melhor como se iniciam e como ocorrem as doenças

cardíacas. Com este entendimento, novos meios de lidar com este tipo de doença poderão ser criados, melhorando o tratamento dado aos doentes.

Procedimentos:

Neste estudo colheremos uma amostra de sangue com a qual realizaremos todos os testes que necessitamos. Não será feita nenhuma punção extra além da qual seria realizada normalmente. Apenas colheremos um pouco de sangue a mais para realização de testes específicos. Essa é a única maneira de obtermos as informações necessárias para a pesquisa. Também pediremos para o/a senhor/a voltar em cerca de 30 dias para nova consulta em consultório conosco, também procedimento de rotina em casos como o do/a senhor/a. Seu tratamento não será alterado em nada: não serão adicionados ou retirados medicamentos e todos os outros procedimentos ocorrerão sem nenhuma interferência. Esclarecemos ainda que o/a senhor/a pode ser incluído/a no grupo controle da pesquisa e que os eventuais gastos adicionais que o/a senhor/a tiver por participar dessa pesquisa (não inclui os gastos com o seu tratamento) serão ressarcidos integralmente.

Riscos e Desconfortos

Nenhum risco maior ou desconforto ocorrerá devido ao estudo. A punção venosa será realizada por pessoa habilitada, seguindo os procedimentos de rotina e utilizando materiais descartáveis. Serão coletados apenas 30ml de sangue (nosso corpo tem 5000 ml de sangue em média) e todo o material utilizado será descartável.

Recusa de Participação ou Retirada do Estudo

A participação neste estudo é voluntária. Você não tem nenhuma obrigação de participar desta pesquisa. Seu tratamento atual ou futuro não será afetado em nada no caso de você se recusar a colaborar conosco. Se você decidir participar, você poderá mudar de opinião e sair do estudo a qualquer momento sem que isto interfira em seu tratamento neste hospital.

Confidencialidade

As informações médicas obtidas neste estudo farão parte do seu prontuário médico neste hospital. Aqueles dados que não fizerem parte do prontuário serão colocados junto a arquivo dos investigadores e identificados por códigos. O prontuário médico fica à disposição de médicos do complexo hospitalar do Hospital das Clínicas da UNICAMP e quem tiver acesso a ele deverá manter a confidencialidade de acordo com as leis e política do hospital. Assim, nenhuma informação será distribuída a pessoas fora do hospital sem seu consentimento prévio, a não ser em casos previstos neste termo de consentimento.

Esclarecemos que as informações do seu prontuário poderão eventualmente ser disponibilizadas a órgãos governamentais no cumprimento de seu dever legal de zelar pela ética na pesquisa médica. Além disso, os resultados deste estudo poderão ser publicados em revistas ou livros médicos e serem usados para o ensino. Porém, garantimos que o seu

nome e outros dados pessoais não serão usados em nenhum momento sem a sua devida permissão.

Requerimento de Maiores Informações

Você pode fazer novas perguntas sobre o estudo a qualquer momento. Os pesquisadores vão dar a você números de telefone e estarão disponíveis para esclarecer quaisquer dúvidas. Você também ficará com uma cópia desse termo de consentimento.

Se durante ou após o estudo você desejar discutir seus direitos como participante dos grupos experimentais, tiver qualquer reclamação ou se sentir pressionado para participar do estudo ou para continuar nele, por favor entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP pelo telefone (19) 3521-8936, pelo e-mail cep@fcm.unicamp.br ou indo até a Rua Tessália Vieira Camargo, nº 126.

Assinatura:

Eu confirmo que o objetivo do estudo, seus procedimentos e os possíveis riscos e desconfortos que eu possa experimentar foram explicados para mim. Alternativas a minha participação também foram discutidas. Todas as minhas questões foram respondidas. Atesto que li ou leram para mim este termo de consentimento. Minha assinatura abaixo indica minha inclusão no estudo.

Paciente

Data

Testemunha

Data

Eu atesto que expliquei ao voluntário o objetivo do estudo e seus procedimentos, esclarecendo os benefícios da investigação e os possíveis riscos e desconfortos dela decorrentes. Atesto também que respondi a todas as questões do voluntário a respeito do estudo da melhor maneira possível.

Representante do Estudo

Data